

ГАРБУЗОВА В.Ю.✉, ОБУХОВА О.А., РОЗУМЕНКО І.О., ДУБОВИК Є.І., ОЛЕШКО Т.М.,
ГАРБУЗОВА Є.А., ШВАЧКО Д.В., АТАМАН О.В.

Сумський державний університет МОН України,
Україна, 40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
✉ v.garbuszova@med.sumdu.edu.ua, (099) 484-12-00

РОЗПОДІЛ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ ІНГІБІТОРІВ ТА АКТИВАТОРІВ ЕКТОПІЧНОЇ КАЛЬЦИФІКАЦІЇ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ГОСТРИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ

Кальцифікація атеросклеротичної бляшки є одним із несприятливих ускладнень, що призводить до звуження просвіту артерії та розвитку критичної ішемії серця і дестабілізації бляшки. Численними дослідженнями доведено, що розвиток гострих коронарних явищ із руйнуванням атеросклеротичної бляшки у 70–80 % випадків відбувається на тлі кальцифікації коронарних артерій [1, 2]. На сьогодні показник кальцифікації коронарних судин є достовірною прогностичною передумовою розвитку кардіоваскулярних явищ і кардіальної смертності [3, 4]. Відомо, що розвиток кальцифікації судин відбувається за умов порушення балансу між факторами – активаторами та інгібіторами – відкладення кристалів кальцію в судинній стінці. До основних чинників, що захищають судинну стінку від звапніння, належить неорганічний пірофосфат (PPi). Антикальциногенна дія PPi у тканинах пов'язана з пригніченням росту кристалів оксіапатиту за рахунок його хелатороподібної дії, гальмуванням трансдиференціювання гладком'язових клітин у хондроцити, активацією остеопонтину [5]. Кількість PPi у судинній стінці визначається діяльністю 3 основних ферментів: два з них – ENPP1 (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family 1) та ANKH (inorganic pyrophosphate transport regulator) – забезпечують підвищення концентрації PPi й захищають судинну стінку від кальцифікації, третій – TNAP (tissue non-specific alkaline phosphatase) сприяє кальцифікації шляхом гідролізу PPi [6–11]. Активність цих ферментів може залежати від багатьох факторів, зокрема й від структури генів, що кодують відповідні білки. Незважаючи на значну кількість праць, присвячених ролі алельного поліморфізму генів у розвитку атеросклерозу та його ускладнень, дані про значення антикальциногенних маркерів, серед яких PPi,

нечисленні й суперечливі. Тому метою дослідження стало вивчення розподілу поліморфних варіантів K121Q (ген ENPP1), T134967G (ген ANKH) та A69314G (ген TNAP) у пацієнтів із гострим коронарним синдромом (ГКС).

Матеріали і методи

У роботі використано венозну кров 118 хворих із ГКС і 110 осіб контрольної групи. Кров набирали в стерильних умовах у моновети тетраоцтової кислоти (11,7 мМ) як антикоагулянт («Sarstedt», Німеччина), заморожували та зберігали за температури – 20°C. Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Хельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000 р.) та Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Усі пацієнти підписали інформовану угоду на участь у дослідженнях із наступним забором венозної крові на генетичний аналіз. Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ТОВ «Лабораторія «Ізоген», Росія) згідно з протоколом, наведеним у наборі. Виділену ДНК використовували для вивчення алельного поліморфізму генів шляхом проведення полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) (табл. 1). Детекцію продуктів ампліфікації та рестрикції проводили шляхом горизонтального електрофорузу в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію (0,13 А; 200 В; 25 хв).

© ГАРБУЗОВА В.Ю., ОБУХОВА О.А., РОЗУМЕНКО І.О., ДУБОВИК Є.І., ОЛЕШКО Т.М.,
ГАРБУЗОВА Є.А., ШВАЧКО Д.В., АТАМАН О.В.

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили за допомогою програми SPSS-17. Перед перевіркою статистичних гіпотез відповідно до вимог ГОСТу 11.006-74 проведено аналіз нормальності розподілу величин у вибірках за допомогою критерію Колмогорова–Смирнова за

алгоритмами, що реалізовані у програмі SPSS-17. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. Значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

Таблиця 1. Умови проведення PCR і рестрикційного аналізу

Ген, поліморфізм	Нуклеотидна послідовність праймерів	Рестриктаза	Фрагменти рестрикції, п. о.
ENPP1, rs1044498	П: 5' CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG 3' З: 5' GACGCTGGAAGATACCAGGCTG 3'	Eco47I (AvaII)	238, 148, 90
TNAP, rs3200255	П: 5' CCTAATTCTGGGCCACAAA 3' З: 5' CCTCCACCAGCAAGAAGAA 3'	VcnI (NciI)	308, 185, 123
ANKH, rs187483	П: 5' AACCTCTTCCTTTCTGCAGC 3' З: 5' CCAGAATAACCCAGCAACA 3'	Hin6I (HinPII)	350, 235, 115

Примітка. п. о. – пари основ.

Результати та обговорення

Аналіз розподілу генотипів К/К, К/Q і Q/Q за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 виявив, що співвідношення генотипів між хворими з ГКС та здоровими особами не виходило за межі статистичної значущості ($P = 0,128$) (табл. 2).

Результати генотипування за A69314G поліморфізмом гена TNAP дали можливість зробити висновок про наявність зв'язку між цим поліморфізмом і розвитком ГКС. Так, в осіб контрольної групи співвідношення гомозигот за основним алелем А/А, гетерозигот А/Г та гомозигот за мінорним алелем Г/Г становило 83,6 %, 14,6 %, 1,8 %, тоді як в осіб з ГКС відповідно 69,5 %, 25,4 %, 5,1 % ($P = 0,038$). При об'єднанні гетерозигот і гомозигот за мінорним

алелем в одну групу – носії мінорного алеля – різниця у розподілі генотипів між досліджуваними групами стала ще більш значущою ($P = 0,012$). Методом логістичної регресії доведено, що ризик виникнення ГКС в осіб, які були носіями мінорного алеля А/Г + Г/Г, у 2,24 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем А/А ($P = 0,013$; OR = 2,244).

При аналізі результатів генотипування пацієнтів за T134967G поліморфізмом гена ANKH не виявлено різниці у розподілі генотипів між контрольною групою та пацієнтами з ГКС ($P = 0,77$). Проте співвідношення генотипів (Т/Т і Т/Г + Г/Г) у контролі становило 67,3 і 32,7 %, а у хворих з ГКС – 52,5 і 47,5 % відповідно.

Таблиця 2. Розподіл генотипів за поліморфізмами K121Q (ген ENPP1), A69314G (ген TNAP) та T134967G (ген ANKH) у пацієнтів із ГКС та осіб контрольної групи

Ген, поліморфізм	Група	Розподіл генотипів			P
		11, n (%)	12, n (%)	22, n (%)	
ENPP1, K121Q (rs1044498)	Контроль	83 (75,5)	27 (24,5)	0 (0)	0,128
	ГКС	79 (67,0)	36 (30,5)	3 (2,5)	
TNAP, A69314G (rs3200255)	Контроль	92 (83,6)	16 (14,6)	2 (1,8)	0,038
	ГКС	82 (69,5)	30 (25,4)	6 (5,1)	
ANKH, T134967G (rs187483)	Контроль	74 (67,3)	32 (29,1)	4 (3,6)	0,077
	ГКС	62 (52,5)	50 (42,4)	6 (5,1)	

Примітки: 11 – гомозиготи за основним алелем; 12 – гетерозиготи; 22 – гомозиготи за мінорним алелем; n – кількість осіб.

Отже, встановлено відмінність у розподілі генотипів серед осіб контрольної групи і хворих з ГКС ($P = 0,023$). Методом логістичної регресії підтверджено, що ризик виникнення ГКС в осіб, які були носіями мінорного алеля T/G + G/G, майже в 1,9 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем T/T ($P = 0,024$; OR = 1,857).

K121Q поліморфізм пов'язаний зі зміною амінокислотної послідовності у соматомедин-В-подібному домені ENPP1 і порушенням ферментативної функції білка. Ферментативна активність ENPP1 може змінюватися двома шляхами. Перший із них пов'язаний із пригніченням гідролізу АТФ до АДФ, що супроводжується зменшенням кількості P_i. Другий – призводить до посилення процесу розщеплення АТФ до цАМФ зі зростанням концентрації неорганічного фосфату (P_i). Обидві зміни порушують баланс у системі P_i-P_i у бік неорганічного фосфату, що створює умови для відкладання кальцію у судині. T134967G поліморфізм гена ANKH відбувається у 8-му інтроні на його межі з 8-м екзоном. Заміна тиміну на гуанін, ймовірно, призводить до зміни рамки зчитування і порушення процесу сплайсингу мРНК. Наслідком цих процесів, як правило, є порушення структури білка або зменшення кількості білкових молекул. У нашому випадку неповноцінність ANKH чи недостатня його кількість призводить до порушення транспорту P_i з клітини у позаклітинне середовище і посилення кальцифікації судини. A69314G поліморфізм гена TNAP є «мовчазною» мутацією: заміна аденіну на гуанін не впливає на амінокислотну послідовність білка-фермента. Однак є дані про те, що зміна нуклеотидної послідовності мРНК впливає на швидкість надходження амінокислот у рибосоми. Ймовірно, заміна триплету CCA на CCG викликає у зрілій мРНК тканинної неспецифічної лужної фосфатази прискорення доставки амінокислот і трансляції білка. Зростання TNAP у позаклітинному середовищі посилює гідроліз P_i з утворенням P_i. Наслідком збільшення кількості неорганічного фосфату у тканинах кровоносних судин є створення сприятливих фізико-хімічних умов для відкладання солей кальцію. Зменшення концентрації неорганічного пірофосфату посилює нуклеацію і ріст кристалів гідроксіапатиту, сприяє диференціації ГМК судин у хондроцити, викликає зменшення кількості остеопонтину. Як наслідок, посилюється кальцифікація атеросклеротичної бляшки.

Таким чином, доведений зв'язок A69314G поліморфізму гена TNAP та T134967G поліморфізму гена ANKH з розвитком ГКС в українській популяції. Що стосується інших популяцій, то М. Moehlecke et al., досліджуючи зв'язок K121Q поліморфізму гена ENPP1 з ішемічною хворобою серця (ІХС) у хворих на цукровий діабет (ЦД) у бразильській популяції, не виявили зв'язку цього генетичного чинника із хворобою [12]. G. Lazarevic et al. встановили, що мешканці Сербії носії мінорного алеля мають високий ризик розвитку ІХС у поєднанні із ЦД 2-го типу [13]. I. Tasic et al. у своїй праці одержали подібні результати [14]. V. Stefanovic і S. Antic підтвердили, що носійство Q-алеля є фактором ризику розвитку інфаркту міокарда в Сербії (незалежно від будь-яких інших факторів ризику) [15]. O. G. Shaker et al. встановили, що в єгипетській популяції хворі носії мінорного алеля (K/Q і Q/Q) за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 мають у 3 рази вищий ризик розвитку інфаркту міокарда, ніж особи з K/K генотипом ($P = 0,004$) [16]. G. Endler et al. довели, що в осіб з K/Q і Q/Q генотипами, мешканців Відня, ризик виникнення інфаркту міокарда у 2,6 раза вищий, а в мешканців центральної Німеччини – у 4,5 раза вищий, ніж у пацієнтів з K/K генотипом (за досліджуваним поліморфізмом гена ENPP1) [17]. J. E. Lee et al. довели достовірний зв'язок між K121Q поліморфізмом і кальцифікацією аорти у хворих на ЦД 2-го типу мешканців Кореї [18]. Протилежні результати щодо мешканців Кореї одержали D.J. Jeong et al. Автори не виявили асоціації K121Q поліморфізму із кальцифікацією коронарних судин у хворих на ЦД 2-го типу ($P = 0,858$) [19]. p. Eller et al. виявили, що у хворих із термінальною стадією ниркової недостатності, що супроводжується зниженням рівня позаклітинного P_i, які є носіями мінорного алеля (K/Q + Q/Q), ризик виникнення кальцифікації коронарних судин достовірно вищий, ніж в осіб з K/K генотипом ($P = 0,033$) [20]. Що стосується розподілу генотипів за A69314G поліморфізмом гена TNAP і T134967G поліморфізмом гена ANKH серед хворих із серцевосудинною патологією в інших популяціях, то такі дані відсутні.

Висновки

Алельний поліморфізм генів інгібіторів та активаторів ектопічної кальцифікації є важливим чинником спадкової схильності до розвитку

склеротичних уражень артеріальних судин та їх ускладнень. Існує зв'язок між гострим коронарним синдромом та поліморфними варіантами генів TNAP (A69314G) і ANKH (T134967G). Ри-

зик ГКС у носіїв мінорного алейя для A69314G поліморфізму у 2,2 ($P = 0,013$; $OR = 2,244$), а для T134967G – у 1,9 ($P = 0,024$; $OR = 1,857$) раза вищий, ніж у гомозигот за основним алейем.

Література

- Schmermund A., Erbel R. Unstable Coronary Plaque and Its Relation to Coronary Calcium // *Circulation*. – 2001. – V. 104. – P. 1682–1687. doi.org/10.1161/hc3901.093339.
- Талаева Т.В., Братусь В.В. Сосудистая кальцификация: реальность и гипотезы // *Здоров'я України. Кардіологія. Наука – практиці*. – 2014, лютий. – С. 56–60.
- Detrano R., Guerci A.D., Carr J.J., Bild D.E., Burke G., Folsom A.R., Liu K., Shea S., Szklo M., Bluemke D.A., O'Leary D.H., Tracy R., Watson K., Wong N.D., Kronmal R.A. Calcium as a Predictor of Coronary Events in Four Racial or Ethnic Groups // *The New England Journal of Medicine*. – 2008. – V. 358. – P. 1336–1345. doi: 10.1056/NEJMoa072100.
- Polonsky T.S., McClelland R.L., Jorgensen N.W., Bild D.E., Burke G.L., Guerci A.D., Greenland P. Coronary Artery Calcium Score and Risk Classification for Coronary Heart Disease Prediction // *Journal of the American Medical Association*. – 2010. – V. 303, № 16. – P. 1610–1616. doi: 10.1001/jama.2010.461.
- Towler D.A. Inorganic Pyrophosphate. A Paracrine Regulator of Vascular Calcification and Smooth Muscle Phenotype // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2005. – V. 25. – P. 651–654. doi: 10.1161/01.ATV.0000158943.79580.9d.
- Clement T., Salone V., Charpentier B., Jouzeau J.Y., Bianchi A. Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes // *Bio-medical materials and engineering*. – 2014. – V. 24. – P. 3–16. doi: 10.3233/BME-140969.
- Huesa C., Houston D., Kiffer-Moreira T. The functional co-operativity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) and PHOSPHO1 during initiation of skeletal mineralization // *Biochemistry and biophysics reports*. – 2015. – V. 4. – P. 196–201. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.09.013.
- Moochhala S.H., Sayer J.A., Carr G., Simmons N.L. Renal calcium stones: insights from the control of bone mineralization // *Exp. Physiol*. – 2007. – V. 93, № 1. – P. 43–49. doi: 10.1113/expphysiol.2007.040790.
- Ramaswamy J., Nam H.K., Ramaraju H., Hatch N.E., Kohn D.H. Inhibition of osteoblast mineralization by phosphorylated phage-derived apatite-specific peptide // *Biomaterials*. – 2015. – V. 73. – P. 120–130. doi: 10.1016/j.boimaterials.2015.09.012.
- Zweifler L.E., Patel M.K., Nociti F.H., Wimer H.F., Millán J.L., Somerman M.J., Foster B.L. Counter-regulatory phosphatases TNAP and NPP1 temporally regulate tooth root cementogenesis // *International Journal of Oral Science*. – 2014. – V. 1. – P. 1–15. doi: 10.1038/ijos.2014.62.
- Du G., Zhan H., Ding D. Abnormal Mechanical Loading Induces Cartilage Degeneration by Accelerating Meniscus Hypertrophy and Mineralization After ACL Injuries *In Vivo* // *Am. J. Sports Med*. – 2016. – P. 652–663. doi: 10.1177/0363546515621285.
- Moehlecke M., Kramer C.K., Leitão C.B., Krahe A.L., Balbosco I., Jobim de Azevedo M., Gross J.L., Canani Luis H., ENPP1 K121Q polymorphism and ischemic heart disease in diabetic patients // *Arq. Bras. Cardiol*. – 2010. – V. 94, № 2. – P. 157–161. dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2010000200005.
- Lazarevic G., Milojkovic M., Tasic I., Naiman S., Antic S., Stefanovic V. PC-1 (ENPP1) K121Q polymorphism in overweight and obese type 2 diabetic coronary heart disease patients // *Acta Cardiologica*. – 2008. – V. 63, № 3. – P. 323–330. doi: 10.2143/AC.63.3.1020308.
- Tasic I., Milojkovic M., Sunder-Plassmann R., Lazarevic G., Tasic N.M., Stefanovic V. The association of PC-1 (ENPP1) K121Q polymorphism with metabolic syndrome in patients with coronary heart disease // *Clinica Chimica Acta*. – 2007. – V. 377. – P. 237–242. doi: 10.1016/j.cca.2006.10.003.
- Stefanovic V., Antic S. Plasma cell membrane glycoprotein 1 (PC-1): a marker of insulin resistance in obesity, uremia and diabetes mellitus // *Clinical Laboratory*. – 2004. – V. 50. – P. 271–278.
- Shaker O.G., Ismail M.F. Association of genetic variants of MTHFR, ENPP1, and ADIPOQ with myocardial infarction in Egyptian patients // *Cell Biochem. Biophys*. – 2014. – V. 69. – P. 265–274. doi: 10.1007/s12013-013-9794-2.
- Endler G., Mannhalter C., Sunder-Plassmann H., Schillinger M., Klimesch A., Exner M., Kapiotis S., Meier S., Kunz F., Raiger E., Huber K., Wagner O., Sunder-Plassmann R. The K121Q polymorphism in the plasma cell membrane glycoprotein 1 gene predisposes to early myocardial infarction // *J. Mol. Med*. – 2002. – V. 80. – P. 791–795. doi: 10.1007/s00109-002-0385-8.
- Lee J.E., Choi Y.K., Seo H.A., Jeon J.H., Jeong J.Y., Moon S.S., Kim J.G., Kim B.W., Kim S.W., Min Yoo, Kim J.Y., Lee I.K. Impact of ENPP1 and MMP3 gene polymorphisms on aortic calcification in patients with type 2 diabetes in a Korean population // *Diabetes research and clinical practice*. – 2010. – V. 88. – P. 87–96. doi: 10.1016/j.diabres.2010.01.002.
- Jeong D.J., Lee D.G., Kim H.J., Cho E.H., Kim S.W. ENPP1 K121Q Genotype Not Associated with Coronary Artery Calcification in Korean Patients with Type 2 Diabetes Mellitus // *Korean Diabetes J*. – 2010. – V. 34. – P. 320–326. doi: 10.4093/kdj.2010.34.5.320.
- Eller P., Hochegger K., Feuchtnner G.M., Zitt E., Tancevski I., Ritsch A., Kronenberg F., Rosenkranz A.R., Patsch J.R., Mayer G. Impact of ENPP1 genotype on arterial calcification in patients with end-stage renal failure // *Nephrol. Dial. Transplant*. – 2008. – V. 23. – P. 321–327. doi: 10.1093/ndt/gfm566.

HARBUZOVA V.Yu., OBUKHOVA O.A., ROZUMENKO I.O., DUBOVYK Y.I., OLESHKO T.M., HARBUZOVA E.A., SHVACHKO D.V., ATAMAN O.V.

Sumy State University,

Ukraine, 40007, Sumy, Rymkogo-Korsakova str., 2, e-mail: v.garbusova@med.sumdu.edu.ua

DISTRIBUTION OF ALLELIC VARIANTS OF GENES INHIBITORS AND ACTIVATORS ECTOPIC CALCIFICATION IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Aim. The study of the distribution of polymorphic variants K121Q (gene ENPP1), T134967G (gene ANKH) and A69314G (gene TNAP) is in patients with acute coronary syndrome. **Methods.** Venous blood of 118 patients with ACS and 110 persons of control group were genotyped for the polymorphism by PCR and restriction fragment length polymorphism method. **Results.** There is an association between acute coronary syndrome and polymorphic variants of genes TNAP (A69314G) and ANKH (T134967G). ACS risk in carriers of the minor allele of A69314G polymorphism to 2.2 times ($P = 0.013$; $OR = 2.244$), and for T134967G polymorphism to 1.9 times ($P = 0.024$; $OR = 1.857$) higher than homozygotes for the major allele. **Conclusions.** Allelic polymorphism gene activators and inhibitors of ectopic calcification is an important factor in hereditary susceptibility to sclerotic lesions of arteries and their complications.

Keywords: gene polymorphism, calcification, acute coronary syndrome.