

УДК[616.127-005.8+616.831-005.1]-06:575

І.О. Розуменко,

В.Ю. Гарбузова,

О.В. Атаман,

О.А. Обухова

ЗВ'ЯЗОК T134967G ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА ANKH ІЗ РОЗВИТКОМ ГОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМУ В ОСІБ З НОРМАЛЬНИМИ ТА ПІДВИЩЕНИМИ ПОКАЗНИКАМИ ІНДЕКСУ МАСИ ТІЛА

Сумський державний університет

Ключові слова: регулятор транспорту неорганічного пірофосфату ANKH, поліморфізм генів, гострий коронарний синдром.

Резюме. Наведено результати вивчення T134967G поліморфізму гена ANKH серед 118 хворих із гострим коронарним синдромом (ГКС) і 110 практично здорових осіб (контрольна група) з нормальними та підвищеними показниками індексу маси тіла (ІМТ). Виявлено, що у гомозигот за основним алелем T/T з $ІМТ \geq 25 \text{ кг/м}^2$ існує достовірний зв'язок із ризиком виникнення ГКС ($P=0,028$). У носіїв мінорного алелю (T/G+G/G) з $ІМТ < 25 \text{ кг/м}^2$ ризик виникнення ГКС в 3,1 раза вищий, ніж у пацієнтів з генотипом T/T.

Вступ

Відомим є той факт, що неорганічний пірофосфат (PPi) слугує фізіологічним інгібітором судинної кальцифікації [10]. До основного регулятора транспорту PPi у позаклітинне середовище належить білок ANKH [9]. Як відомо, основна функція ANKH зводиться до аниткальциногенної дії шляхом підвищення рівня PPi у позаклітинному просторі, що призводить до інгібування відкладання кристалів гідроксиапатиту [4]. Білок ANKH містить від 7 до 12 трансмембранних доменів, складається з 492 амінокислотних залишків та має молекулярну масу понад 54 кДа [8]. Ген ANKH знаходиться на короткому плечі 5 хромосоми. На сьогодні відомо понад 7 тисяч одонуклеотидних поліморфізмів гена ANKH. Поліморфізми даного гена здебільшого асоційовані з розвитком краніометафізарної дисплазії [11], анкілозом [5] і хондрокальцинозом [12]. Лише у деяких працях був виявлений зв'язок зниження рівня білка ANKH з розвитком кальцифікації аортального клапана [3]. Щодо зв'язку одонуклеотидного T134967G поліморфізму гена ANKH з розвитком гострого коронарного синдрому (ГКС), то ця проблема досліджується нами вперше.

Одним із модифікованих факторів ризику ГКС відноситься підвищена величина індексу маси тіла (ІМТ). Доведено, що збільшення маси тіла на 5-8 кг супроводжується збільшенням ризику інфаркту міокарда і смерті від коронарної хвороби серця на 25%. При збільшенні ІМТ до 25-29 кг/м^2 відносний ризик ГКС зростає у 2 рази, а при ІМТ вище 29 кг/м^2 - у 3 рази.

Мета дослідження

Провести аналіз зв'язку T134967G полімор-

фізму гена ANKH із розвитком ГКС у осіб із нормальними та підвищеними показниками ІМТ.

Матеріали і методи

У дослідженнях було використано венозну кров 118 хворих із ГКС середнім віком $55,91 \pm 0,89$ роки, яких було госпіталізовано у кардіологічне відділення Сумської міської клінічної лікарні № 1.

Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Хельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етнічні 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 з наступним забором венозної крові на генетичний аналіз.

Діагноз гострого інфаркту міокарда та нестабільної стенокардії було встановлено на підставі даних клінічних, електрокардіографічних та біохімічних досліджень згідно з рекомендаціями експертів ВООЗ, а також відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів [2, 7]. Контрольна група складалася зі 110 пацієнтів, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збору анамнестичних даних, запису електрокардіограм, вимірювання артеріального тиску та дослідження ряду біохімічних показників крові. Контрольна група і група хворих на ГКС не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ($P = 0,294$ за χ^2 -критерієм) та за середнім віком ($P = 0,103$).

Визначення поліморфізму T134967G (rs187483) гена ANKH (8-й інтрон) було проведено за

допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморожували і зберігали при температурі -20°C . ДНК з неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт T134967G поліморфізму, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) 5' AACCTCTTCTTTCTGCAGC 3' і зворотного (antisense) - 5' CCAGAATAACCCAGCAACA 3'. Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 10 рМ кожного з праймерів і 1,0 ОД Taq-полімерази ("Thermo Scientific", США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента 8-го інтрону складалася з 33 циклів: денатурація - 94°C (50 с), гібридизація праймерів - $64,5^{\circ}\text{C}$ (45 с) і елонгація - 72°C (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 год. з 3 ОД рестриктази Hin6I (HinP1I) ("Thermo Scientific", США) у Tango-буфері такого складу: 33 мМ трис-НСІ (рН 7,9), 10 мМ хлориду магнію, 66 мМ хлориду калію і 0,1 мг/мл альбуміну. Наявність у 134967-й позиції гена ANKH тиміну перешкоджає рестрикції, а при заміні тиміну на гуанін рестриктаза Hin6I розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина - 350 п.о.) на два фрагменти: 235 і 115 пар основ.

Ампліфікати вивченого фрагмента гена ANKH після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (0,13А; 200V) проводили протягом 25 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм і за t - критерієм Стьюдента. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним. Відношення шансів (OR) і 95%-ий довірчий інтервал розраховували за допомогою методу логістичної регресії.

Обговорення результатів дослідження

Генотипування хворих із ГКС за T134967G поліморфізмом гена ANKH дало можливість встановити частоту, з якою зустрічаються окремі варіанти цього гена в осіб із нормальними та

підвищеними показниками ІМТ. У осіб контрольної групи з генотипом T/T показник ІМТ дорівнював $27,27 \pm 0,48$ кг/м², а у осіб з генотипом T/G+G/G - $26,94 \pm 0,74$ кг/м². У хворих із ГКС показники ІМТ в осіб з різними генотипами (T/T і T/G+G/G) становили $28,74 \pm 0,52$ кг/м² і $28,15 \pm 0,63$ кг/м² відповідно. Із отриманих результатів видно, що немає достовірної відмінності у величинах ІМТ у пацієнтів з різними генотипами як у осіб контрольної групи ($P = 0,729$), так і у хворих із ГКС ($P = 0,471$).

При порівнянні величин ІМТ між контрольною групою і хворими із ГКС з різними генотипами, отримано дещо інші результати. Так, у гомозигот за основним алелем T/T, хворих із ГКС, показник ІМТ дорівнював $28,74 \pm 0,52$ кг/м², а у практично здорових осіб із таким генотипом - $27,27 \pm 0,48$ кг/м². Отже виявлено, що в осіб з T/T генотипом, хворих із ГКС, ІМТ достовірно вищий, ніж у практично здорових індивідуумів ($P = 0,040$). У носіїв мінорного алелю T/G+G/G достовірної відмінності у показниках ІМТ серед хворих із ГКС і тих, що не мали цієї недуги, виявлено не було. У осіб із генотипом T/G+G/G хворих із ГКС ІМТ дорівнював $28,15 \pm 0,63$ кг/м², а у контролі - $26,94 \pm 0,74$ кг/м² ($P = 0,222$).

Як у осіб контрольної групи ($\chi^2 = 0,056$; $P = 0,814$), так і у хворих із ГКС ($\chi^2 = 2,138$; $P = 0,144$) не було виявлено достовірного зв'язку між поліморфними T134967G варіантами гена ANKH і величиною ІМТ (табл. 1).

При розподілі пацієнтів на дві підгрупи - окремо за генотипами T/T і T/G+G/G, було виявлено достовірний зв'язок між величиною ІМТ і розвитком ГКС у підгрупі з T/T генотипом. Так, серед гомозигот за основним алелем (T/T) осіб контрольної групи з ІМТ < 25 кг/м² було 28,4%, а з ІМТ ≥ 25 кг/м² - 71,6%. У хворих із ГКС дане співвідношення становило 12,9% і 87,1%. Таким чином, у осіб із генотипом T/T виявлено достовірний зв'язок між розвитком ГКС і величиною ІМТ ≥ 25 кг/м² ($\chi^2 = 4,816$; $P = 0,028$). У носіїв мінорного алелю T/G+G/G достовірного зв'язку між розвитком ГКС і показниками ІМТ виявлено не було. Серед носіїв мінорного алелю (T/G+G/G) осіб контрольної групи з ІМТ < 25 кг/м² було 30,6%, а з ІМТ ≥ 25 кг/м² - 64,9%. Співвідношення величин ІМТ у пацієнтів з генотипом T/G+G/G хворих із ГКС становило 23,2% і 76,8% відповідно ($\chi^2 = 0,612$; $P = 0,434$).

Поділ кожної з двох груп - дослідної і контрольної - на дві підгрупи залежно від величини ІМТ (< 25 кг/м² і ≥ 25 кг/м²) дав можливість проаналізувати вплив поліморфних варіантів гена ANKH на розвиток ГКС в осіб із нормальним і

Таблиця 1

Вплив поліморфних T134967G варіантів гена ANKH на індекс маси тіла (ІМТ) в осіб контрольної групи і у хворих із ГКС

Групи пацієнтів	Генотип		ІМТ < 25 кг/м ²	ІМТ ≥ 25 кг/м ²
Контрольна група	T/T	n	21 (65,6%)	53 (67,9%)
	T/G+G/G	n	11 (34,4%)	25 (32,1%)
	Разом	n	32 (100%)	78 (100%)
$\chi^2 = 0,056; P = 0,814$				
Хворі із ГКС	T/T	n	8 (38,1%)	54 (55,7%)
	T/G+G/G	n	13 (61,9%)	43 (44,3%)
	Разом	n	21 (100%)	97 (100%)
$\chi^2 = 2,138; P = 0,144$				

Примітка: подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках. P – статистична значимість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм.

підвищеним рівнем цього показника.

Із отриманих результатів випливає, що серед людей із ІМТ ≥ 25 кг/м² достовірного зв'язку між T134967G поліморфізмом гена ANKH і розвитком ГКС виявлено не було. Осіб з ІМТ ≥ 25 кг/м² контрольної групи з генотипом T/T було 67,9%, а з генотипом T/G+G/G – 32,1%. Співвідношення поліморфних варіантів даного гена серед пацієнтів із ІМТ ≥ 25 кг/м² у хворих із ГКС становило 55,7% і 44,3% відповідно ($\chi^2 = 2,744; P = 0,098$). У пацієнтів з ІМТ < 25 кг/м² було виявлено достовірний зв'язок між поліморфними ва-

ріантами за T134967G поліморфізмом досліджуваного гена і розвитком ГКС. Так, серед осіб із ІМТ < 25 кг/м² контрольної групи з генотипом T/T було 65,6%, а з генотипом T/G+G/G – 34,4%. Співвідношення алейних варіантів серед осіб із ІМТ < 25 кг/м² хворих із ГКС дорівнювало 38,1% і 61,9% відповідно. Таким чином, у пацієнтів із ІМТ < 25 кг/м² носіїв мінорного алелю (T/G+G/G) ГКС виникає частіше, ніж у гомозигот за основним алелем (T/T) ($\chi^2=3,878; P=0,049$).

Застосування методу логістичної регресії дало можливість підтвердити цей висновок (табл. 2).

Таблиця 2

Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за T134967G поліморфізмом гена ANKH в осіб з нормальним і підвищеним ІМТ

Показник	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
ІМТ < 25 кг/м ²	T/G+G/G	1,132	0,583	3,765	0,052	3,102	0,989	9,735
ІМТ ≥ 25 кг/м ²	T/G+G/G	0,542	0,317	2,724	0,099	1,688	0,907	3,144

Примітка: порівняння проводилося відносно носіїв мінорного алелю (T/G+G/G); CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда; P – статистична значимість; OR – відношення ризику; CI – довірчий інтервал.

У результаті проведених розрахунків було встановлено, що ризик виникнення ГКС у носіїв мінорного алелю (T/G+G/G) із ІМТ < 25 кг/м² в 3,1 раза вищий, ніж у пацієнтів гомозигот за основним алелем (T/T).

На сьогодні досліджено понад 7 тисяч одно-

нуклеотидних поліморфізмів гена ANKH. Алейний поліморфізм T134967G знаходиться у 8-му інтроні досліджуваного гена, у 134967-й позиції азотиста основа тимін заміщується на гуанін [6]. Відомим є той факт, що поліморфізми в інтронах не призводять до змін послідовності азотистих

основ у змістовній частині гена [1]. Але завдяки альтернативному сплайсингу T134967G поліморфізм гена ANKH (rs187483) може бути зчеплений із 8-м екзоном (rs2288474), що в подальшому призводить до розвитку патологічних станів.

У наших дослідженнях було встановлено зв'язок розвитку ГКС із підвищеною величиною ІМТ у гомозигот за основним алелем (Т/Т) T134967G поліморфізму гена ANKH. А також виявлено, що носії мінорного алелю (Т/Г+Г/Г) за даним поліморфізмом мають достовірно вищий ризик розвитку ГКС, ніж особи з Т/Т генотипом. Дослідження щодо зв'язку T134967G поліморфізму гена ANKH із розвитком ГКС у осіб із нормальним та підвищеним показником ІМТ в інших популяціях відсутні.

Висновки

1. У хворих із ГКС, гомозигот за основним алелем Т/Т, показники ІМТ достовірно вищі, ніж у осіб контрольної групи (P=0,040).

2. У носіїв мінорного алелю Т/Г+Г/Г за T134967G поліморфізмом гена ANKH з ІМТ < 25 кг/м² ризик виникнення ГКС в 3,1 раза вищий, ніж у пацієнтів із генотипом Т/Т.

3. У осіб із Т/Т генотипом виявлений достовірний зв'язок між величиною ІМТ ≥ 25 кг/м² і ризиком виникнення ГКС (P=0,028).

Перспективи подальших досліджень можуть бути пов'язані із вивченням впливу інших одонуклеотидних поліморфізмів гена ANKH на розвиток серцево-судинних захворювань і процесу, що лежить у його основі - атеросклерозу.

Література. 1. Частота поліморфізму ApaI гена рецептора вітаміну D у хворих з ішемічним інсультом / В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, Ю.О. Атаман [та ін.] // Загальна патологія та патологічна фізіологія. - 2012. - № 7(2). - С. 142-148. 2. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non ST-elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the american college of cardiology / E. Braunwald, E.M. Antman, J.W. Beasley [et al.] // Circulation. - 2000. - Vol. 102. - P. 1193-1209. 3. Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting progressive ankylosis protein homolog expression / G. Zhao, M.J. Xu, M.M. Zhao [et al.] // Kidney Int. - 2012. - Vol. 82(1). - P. 34-44. 4. Association of ANKH gene polymorphisms with radiographic hand bone size and geometry in a Chuvasha population / I. Malkin, S. Dahmb, A. Sukc [et al.] // Bone. - 2005. - Vol. 36. - P. 365-373. 5. Association of mineralization-related genes TNAP and ANKH polymorphisms with ankylosing spondylitis in the Chinese Han population / Z. Liu, Y. Cui, X. Zhou [et al.] // BioScience Trends. - 2013. - Vol. 7(2). - P. 89-92. 6. Investigation of the Role of ANKH in Ankylosing Spondylitis / A. E. Timms, Y. Zhang, L. Bradbury [et al.] // Arthritis & rheumatism. - 2003. - Vol. 48(10). - P. 2898-2902. 7. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation / M.E.

Bertrand, M.L. Simoons, K.A. Fox [et al.] // Eur. Heart J. - 2002. - Vol. 23. - P. 1809-1840. 8. Renal calcium stones: insights from the control of bone mineralization / S. H. Mochhala, J. A. Sayer, G. Carr [et al.] // Exp Physiol. - 2007. - Vol. 93 (1). - P. 43-49. 9. Osteoprotegerin Plasma Levels are Strongly Associated with Polymorphisms in Human Homologue of the Mouse Progressive Ankylosis (ANKH) Gene / Vistorovsky Y., Malkin I., Kobylansky E., Livshits G. // Annals of Human Genetics. - 2007. - Vol. 71. - P. 302-307. 10. Terkeltaub R.A. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology / R.A. Terkeltaub // Am J Physiol Cell Physiol. - 2001. - Vol. 281. P. 1-11. 11. Two novel large ANKH deletion mutations in sporadic cases with craniometaphyseal dysplasia / E.H. Dutra, I-P Chen, T.L. McGregor [et al.] // Clin Genet. - 2012. - Vol. 81(1). - P. 93-95. 12. Williams C.J. Familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease and the ANKH gene / C.J. Williams // Curr Opin Rheumatol. - 2003. - Vol. 15. - P. 326-331.

СВЯЗЬ T134967G ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ANKH С РАЗВИТИЕМ ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА У ЛИЦ С НОРМАЛЬНЫМ И ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ ИНДЕКСА МАССЫ ТЕЛА

И.А. Розуменко, В.Ю. Гарбузова, О.В. Атаман, О.А. Обухова

Резюме. Приведены результаты изучения T134967G полиморфизма гена ANKH среди 118 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и 110 практически здоровых лиц (контрольная группа) с нормальными и повышенными показателями индекса массы тела (ИМТ). Выявлено, что у гомозигот по основному алелю Т/Т с ИМТ ≥ 25 кг/м² существует достоверная связь с риском развития ОКС (P=0,028). У носителей мінорного алелю (Т/Г+Г/Г) с ИМТ < 25 кг/м² риск возникновения ОКС в 3,1 раза выше, чем у пациентов с Т/Т генотипом.

Ключевые слова: регулятор транспорта неорганического пирофосфата ANKH, полиморфизм генов, острый коронарный синдром.

ASSOCIATION T134967G POLYMORPHISM OF ANKH GENE WITH THE GENESIS OF ACUTE CORONARY SYNDROME IN PATIENTS WITH NORMAL AND INCREASED BODY MASS INDEX

I.O. Rozumenko, V.Yu. Harbusova, O.A. Obukhova, A.V. Ataman

Abstract. The results of studying T134967G polymorphism of ANKH gene among 118 patients with acute coronary syndrome (ACS) and 110 healthy individuals (control group) with normal and increased body mass indexes (BMI) is presented. A reliable association between the amount BMI ≥ 25 kg/m² and the risk of ACS in homozygotes for the major allele T/T (P=0,028) was detected. Carriers of minor allele (T/G+G/G) with BMI < 25 kg/m² risk of ACS is 3,1 times higher than in patients with genotype T/T.

Keywords: ANKH inorganic pyrophosphate transport regulator, acute coronary syndrome, allelic polymorphism.

Sumy State University

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol. 14, №2 (52). - P. 172-175.

Надійшла до редакції 18.05.2015

Рецензент – проф. Л.П. Сидорчук

© I.O. Rozumenko, V.Yu. Harbusova, O.V. Ataman, O.A. Obukhova, 2015