

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

І.О. Розуменко, В.Ю. Гарбузова, О.В. Атаман

**РОЗПОДІЛ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ЗА А69314G ПОЛІМОРФІЗМОМ  
ГЕНА *TNAP* У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ КОРОНАРНИЙ СИНДРОМОМ  
У КУРЦІВ І ТИХ, ЩО НЕ КУРЯТЬ**

Сумський державний університет

**Резюме.** Наведено результати вивчення А69314G поліморфізму гена *TNAP* серед 118 хворих на гострий коронарний синдром (ГКС) і 110 практично здорових осіб (контрольна група) у курців і тих, що не курять. Виявлено, що в курців із А/G+G/G генотипом ризик виникнення ГКС майже в 3,4 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем А/А (P=0,045; OR=3,393). Як в осіб із А/А генотипом (P=0,032), так і в

носіїв мінорного алеля А/G+G/G (P=0,032) за А69314G поліморфізмом встановлено достовірний зв'язок між розвитком ГКС та курінням.

**Ключові слова:** тканиннонеспецифічна лужна фосфатаза (*TNAP*), поліморфізм генів, гострий коронарний синдром.

**Вступ.** Неорганічний пірофосфат (PPi) слугує потужним фізіологічним фактором, що захищає судинну стінку від кальцифікації. Основним ферментом, що розщеплює PPi з утворенням неорганічного фосфату (Pi) у позаклітинному просторі, є тканиннонеспецифічна лужна фосфатаза (*TNAP*). Таким чином, безпосередньо *TNAP* є активатором кальцифікації в судині [7, 9, 10, 11]. Ген *TNAP* знаходиться в одній хромосомі. На сьогодні відомо близько 3500 однонуклеотидних поліморфізмів гена *TNAP*. Більшість робіт з вивчення поліморфізмів даного гена присвячено його асоціації з розвитком гіпофосфатазії [5, 6, 8]. Що стосується зв'язку А69314G поліморфізму гена *TNAP* із розвитком гострого коронарного синдрому (ГКС), то ця проблема досліджується нами вперше.

Куріння відноситься до основного модифікованого фактору ризику розвитку серцево-судинної патології. Доведено, що серед тих чоловіків, що курять, гострий коронарний синдром виникає у два рази частіше, ніж у тих, що не курять. В Україні майже 90 % летальних випадків від серцево-судинної патології в осіб чоловічої статі віком до 45 років пов'язано з курінням [2]. Саме куріння вважається причиною кожної 5-ї смерті пацієнтів старше 35 років [1].

**Мета дослідження.** Провести аналіз зв'язку А69314G поліморфізму гена *TNAP* із розвитком ГКС в осіб, що курять, і тих, що не курять.

**Матеріал і методи.** У роботі використано венозну кров 118 хворих на ГКС середнім віком 55,91±0,89 року, яких госпіталізовано в кардіологічне відділення Сумської міської клінічної лікарні № 1.

Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінкської 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 дослідженні з наступним забором венозної крові на генетичний аналіз.

Діагноз гострого інфаркту міокарда та нестабільної стенокардії встановлювали на підставі даних клінічних, електрокардіографічних та біохімічних досліджень згідно з рекомендаціями експертів ВООЗ, а також відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів [3, 4]. Контрольна група складалася зі 110 осіб, 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  $\chi^2$ -критерієм) та за середнім віком (P=0,103).

Визначення А69314G (rs3200255) поліморфізму гена *TNAP* проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах у 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 А69314G поліморфізму, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) 5' ССТААТТCTGGGCCCAААА 3' і зворотного (antisense) – 5' ССТТССАССАGCAAGAAGAA 3'. Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 1 мкл 10-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 1,0 ОД Таq-полімерази ("Thermo Scientific", США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента 9-го екзона складалася з 30 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 60,0°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом

18 годин із 3 ОД рестриктази BcnI (NciI) ("Thermo Scientific", США) у Tango-буфері такого складу: 10 мМ трис-НСІ (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію 100 мМ хлориду калію і 0,1 мг/мл альбуміну. Наявність у 69314-й позиції гена *TNA-P* аденіну перешкоджає рестрикції, а при заміні аденіну на гуанін рестриктаза BcnI (NciI) розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина – 308 п.о) на два фрагменти: 185 і 123 пар основ.

Ампліфікати вивченого фрагмента гена *TNA-P* 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  $\chi^2$ -критерієм. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Генотипування хворих на ГКС за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* дало змогу встановити частоту окремих варіантів цього гена в курців і тих, що не курять. Нами встановлено, що серед хворих на ГКС тих, що не курять, осіб із А/А генотипом було 73,4 %, а з А/Г+Г/Г генотипом – 26,6 %. Розподіл генотипів (А/А і А/Г+Г/Г) у хворих на ГКС курців становив 64,8 % і 35,2 % відповідно. Таким чином, у хворих на ГКС частота генотипів за досліджуваним поліморфізмом (А/А і А/Г+Г/Г) достовірно не відрізнялася серед курців і тих, що не курять ( $\chi^2 = 1,027$ ;  $P = 0,311$ ).

Розподіл генотипів за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* у курців і тих, що не курять, подано в табл. 1. Серед тих, що не курять, практично здорових осіб із А/А генотипом було 82,7 %, а з А/Г+Г/Г генотипом – 17,3 %. Розподіл алельних варіантів серед хворих на ГКС, що не курили, становив 73,4 % і 26,6 % відповідно. Отже, в осіб, що не курять, не виявлено достовірного

зв'язку між А69314G поліморфізмом гена *TNAP* і розвитком ГКС ( $\chi^2 = 1,831$ ;  $P = 0,176$ ). Серед курців у групі контролю гомозигот за основним алелем А/А було 86,2 %, а носіїв мінорного алеля А/Г+Г/Г – 13,8 %. У хворих на ГКС, що курять, хворих із ГКС співвідношення поліморфних варіантів було 64,8 % і 35,2 % відповідно. Таким чином, у курців із ГКС частіше трапляється АГ+ГГ генотипи, А69314G поліморфізму гена *TNAP* ( $\chi^2 = 4,310$ ;  $P = 0,038$ ), ніж у контролі.

Застосування методу логістичної регресії дало можливість підтвердити цей висновок. У результаті проведених нами розрахунків встановлено, що ризик виникнення ГКС у курців, що були носіями мінорного алеля (А/Г+Г/Г), майже в 3,4 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем А/А ( $P = 0,045$ ;  $OR = 3,393$ ) (табл. 2).

Поділ двох груп – дослідної і контрольної – на дві підгрупи залежно від факту куріння (курці й ті, що не курять) дав можливість проаналізувати вплив А69314G поліморфізму гена *TNAP* на розвиток ГКС у курців і тих, що не курять. У контрольній групі осіб, що не курять, з генотипом А/А було 82,7%, а з генотипом А/Г+Г/Г – 17,3%; а тих, що курять, з різними варіантами генотипів (А/А і А/Г+Г/Г): 86,2% і 13,8% відповідно. Отримані дані свідчать про відсутність статистично значимих відмінностей у розподілі алельних варіантів за вивченим поліморфізмом між особами, що курять і не курять, у контрольній групі ( $\chi^2 = 0,190$ ;  $P = 0,663$ ). Серед хворих на ГКС тих, що не курять, з генотипом А/А було 73,4%, з генотипом А/Г+Г/Г – 26,6%; а курців 64,8% і 35,2% відповідно. Отже, не виявлено статистично значимих відмінностей у розподілі генотипів між особами-курцями і тими, що не курять, серед хворих на ГКС ( $\chi^2 = 1,027$ ;  $P = 0,311$ ).

У результаті проведених розрахунків встановлено відмінність у підгрупах пацієнтів, утворених за окремими алельними варіантами SNP (табл. 3). Серед гомозигот за основним алелем А/А осіб контрольної групи тих, що не курять, було

Таблиця 1

**Частота генотипів А69314G поліморфізму гена *TNAP* у хворих на гострий коронарний синдром, у курців і тих, хто не курять**

	Генотип		Контроль	ГКС
Ті, що не курять	А/А	n (%)	67 (82,7%)	47 (73,4%)
	А/Г+Г/Г	n (%)	14 (17,3%)	17 (26,6%)
	Разом	n (%)	81 (100%)	64 (100%)
$\chi^2 = 1,831$ ; $P = 0,176$				
Курці	А/А	n (%)	25 (86,2%)	35 (64,8%)
	А/Г+Г/Г	n (%)	4 (13,8%)	19 (35,2%)
	Разом	n (%)	29 (100%)	54 (100%)
$\chi^2 = 4,310$ ; $P = 0,038$				

Примітка. Подано частоту генотипів в абсолютних одиницях і відсотках. P – статистична значимість відмінностей між порівнюваними групами за  $\chi^2$ -критерієм

Таблиця 2

**Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* в осіб, що курять і не курять**

Показник	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
Не курять	A/G+G/G	0,549	0,408	1,809	0,179	1,731	0,778	3,851
Курять	A/G+G/G	1,222	0,609	4,021	0,045	3,393	1,026	11,199

Примітка. Порівняння проводилось відносно носіїв мінорного алеля (A/G+G/G); CR - коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS - статистика Вальда; P - статистична значимість; OR – відношення ризику; CI – довірчий інтервал

Таблиця 3

**Частота осіб, що курять і не курять, у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP***

Генотип			Контроль	ГКС
A/A	Куріння (-)	n (%)	67 (72,8%)	47 (57,3%)
	Куріння (+)	n (%)	25 (27,2%)	35 (42,7%)
	Разом	n (%)	92 (100%)	82 (100%)
$\chi^2 = 4,616; P = 0,032$				
A/G+G/G	Куріння (-)	n (%)	14 (77,8%)	17 (47,2%)
	Куріння (+)	n (%)	4 (22,2%)	19 (52,8%)
	Разом	n (%)	18 (100%)	36 (100%)
$\chi^2 = 4,582; P = 0,032$				

Примітка. Див. табл. 1

72,8%, а тих, що курять – 27,2%. Співвідношення тих, що не курять, і курців хворих на ГКС у даній підгрупі становило 57,3% і 42,7% відповідно. Отже, у гомозигот за основним алелем A/A виявлено достовірний зв'язок між курінням і розвитком ГКС ( $\chi^2 = 4,616; P = 0,032$ ). У носіїв мінорного алеля (A/G+G/G) було отримано схожі результати. Серед осіб із A/G+G/G генотипом у контролі тих, що не курять, було 77,8%, а тих, що курять – 22,2%. Співвідношення осіб, що не курять, і курців серед хворих на ГКС становило 47,2% і 52,8%. Таким чином, у носіїв мінорного алеля також було виявлено достовірний зв'язок між курінням і розвитком ГКС не залежно від поліморфізму аналізованих генів у тих, що курять, ГКС виникає достовірно частіше ( $\chi^2 = 4,582; P = 0,032$ ).

За даними ВООЗ, причиною близько третини летальних випадків від серцево-судинної патології серед пацієнтів середнього віку є факт куріння [12]. У проведених нами дослідженнях у хворих на ГКС не встановлено достовірної різниці в розподілі генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* серед курців і тих, що не курять.

Проте в курців, що були носіями мінорного алеля (A/G+G/G) за досліджуваним однонуклеотидним поліморфізмом гена *TNAP*, нами виявлено асоціацію між A69314G поліморфізмом та розвитком ГКС. Окрім того, встановлено, що не залежно від генотипу (A/A чи A/G+G/G) існує

достовірний зв'язок між фактом куріння та гострим коронарним синдромом. Отримані нами результати підтверджують той факт, що куріння безпосередньо є потужним модифікованим фактором ризику розвитку серцево-судинних подій.

Що стосується досліджень зв'язку A69314G поліморфізму гена *TNAP* із серцево-судинними патологіями та факторами ризику їх розвитку в інших популяціях, то такі дані відсутні.

#### Висновки

1. У курців носіїв мінорного алеля A/G+G/G за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* ризик виникнення гострого коронарного синдрому майже в 3,4 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем A/A.

2. Як в осіб із A/A генотипом, так і в осіб із A/G+G/G генотипом виявлений достовірний зв'язок між курінням та розвитком гострого коронарного синдрому.

**Перспективи подальших досліджень.** Вивчення впливу інших однонуклеотидних поліморфізмів гена *TNAP* на розвиток серцево-судинних захворювань і процесу, що лежить у його основі – атеросклерозу.

#### Література

1. Кваша О.О. Рекомендації з профілактики і лікування тютюнопаління / О.О. Кваша, І.М. Горбась, І.П. Смирнова // Здоров'я України. – 2010. – № 2 (231). – С. 34–36.

2. Лутай М.И. Улучшение прогноза у больных со стенокардией: модификация образа жизни, фармакотерапия / М.И. Лутай, А.Ф. Лысенко // Укр. мед. часопис. – 2012. – № 1 (87). – С. 45-50.
3. 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.
4. 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.
5. Mornet E. Hypophosphatasia / E. Mornet // Best Practice & Research Clinical Rheumatology. – 2008. – Vol. 22 (1). – P. 113-127.
6. Narisawa S. Genetically Modified Mice for Studying TNAP Function / S.Narisawa // Subcellular Biochemistry. – 2015. – Vol. 76. – P. 45-57.
7. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease / H. Orimo // J. Nippon Med. Sch. – 2010. – Vol. 77. – P. 4-12.
8. Recombinant Enzyme Replacement Therapy in Hypophosphatasia / C.Hofmann, F. Jakob, L. Seefried [et al.] // Subcell Biochem. – 2015. – Vol. 76. – P. 323-341.
9. Role of Bone-Type Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase and PHOSPO1 in Vascular Calcification / Y. V. Bobryshev, A. N. Orekhov, I. Sobenin, A. D. Chistiakov // Current Pharmaceutical Design. – 2014. – Vol. 20 (37). – P. 5821-5828.
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. The functional co-operativity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) and PHOSPHO1 during initiation of skeletal mineralization / C. Huesa, D. Houston, T. Kiffer-Moreira [et al.] // Biochemistry and Biophysics Reports. – 2015. – Vol. 4. – P. 196-201.
12. World Health Organization. Controlling the smoking Epidemic. Report of the WHO Expert Committee. – Geneva : WHO, 1979. – 87 p.

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ПО А69314G ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА *TNAP* У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ У КУРЯЩИХ И ТЕХ, КТО НЕ КУРИТ

*И.А. Розуменко, В.Ю. Гарбузова, А.В. Атаман*

**Резюме.** Приведены результаты изучения T134967G полиморфизма гена *ANKH* среди 118 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и 110 практически здоровых лиц (контрольная группа) у курильщиков и тех, кто не курит. Выявлено, что у курящих пациентов с A/G+G/G генотипом риск развития ОКС почти в 3,4 раза выше, чем у гомозигот по основному аллелю A/A (P = 0,045; OR = 3,393). Как у лиц с A/A генотипом (P = 0,032), так и у носителей минорного аллеля A/G+G/G (P = 0,032) по A69314G полиморфизму установлена достоверная связь между развитием ОКС и курением.

**Ключевые слова:** тканенеспецифическая щелочная фосфатаза (TNAP), полиморфизм генов, острый коронарный синдром.

### DISTRIBUTION OF THE ALLELIC VARIANTS ACCORDING TO THE A69314G POLYMORPHISM OF GENE *TNAP* IN SMOKING AND NON-SMOKING PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

*I.A. Rozumenko, V.Yu. Harbuzova, A.V. Ataman*

**Abstract.** The article presents the results of the study of A69314G polymorphism of gene *TNAP* in 118 patients with acute coronary syndrome (ACS) and 110 actually healthy people (group of control) smokers and non-smokers. It was established that in smokers with A/G+G/G genotype the risk of development of ACS is by almost 3,4 times higher than in the homozygote with the main allele A/A (P = 0,045; OR = 3,393). Both in people with the A/A genotype (P = 0,032) and in the bearers of minor allele A/G+G/G (P = 0,032) according to the A69314G polymorphism it is distinguished the direct relation between ACS and smoking.

**Key words:** tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), allelic polymorphism, acute coronary syndrome.

State University (Sumy)

Рецензент – проф. Л.П. Сидорчук

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 1 (77). – P. 137-140

Надійшла до редакції 21.01.2016 року