

**ВИВЧЕННЯ ЗВ'ЯЗКУ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА
МАТРИКСНОГО GLA-ПРОТЕЇНУ З ДЕЯКИМИ ФАКТОРАМИ РИЗИКУ
ГОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМУ В УКРАЇНСЬКІЙ
ПОПУЛЯЦІЇ**

ЗМІСТ

	стор.
Вступ.....	4
Огляд літератури	
1. Матриксний Gla-протеїн	
1.1. Структура молекули MGP, його біохімічні властивості.....	6
1.2. Ген MGP, однонуклеотидні поліморфізми.....	7
1.3. Роль MGP у кальцифікації судинної стінки.....	8
2. Гострий коронарний синдром	
2.1. Сучасні уявлення про патогенез.....	9
2.2. Фактори ризику.....	11
Матеріал і методи дослідження.....	12
Результати власних досліджень та їх обговорення	16
Висновки.....	25
Список використаних джерел.....	26

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГКС – гострий коронарний синдром

MGP – матриксний Gla-протеїн

АГ – артеріальна гіпертензія

АТ – артеріальний тиск

АТ_{сис.} – систолічний артеріальний тиск

АТ_{діаст.} – діастолічний артеріальний тиск

ЦД – цукровий діабет

ІХС – ішемічна хвороба серця

ІМТ – індекс маси тіла

SNP – однонуклеотидний поліморфізм

G – гуанін

A – аденін

T – тимін

C – цитозин

Gla – γ -карбоксіглютамінова кислота

Glu – глютамінова кислота

GGCX – γ -глютамілкарбоксилаза

VKOR K – епоксидредуктазний комплекс

ВСТУП

Початок ХХІ сторіччя відзначається зміною і переглядом багатьох уявлень про причини, механізми розвитку і стратегії лікування серцево-судинних захворювань.

Хвороби серця, зумовлені атеросклеротичними ураженнями вільцевих судин, зокрема гострий коронарний синдром (ГКС), належать до категорії мультифакторіальних, у виникненні яких важливе значення мають як дія несприятливих чинників довколишнього середовища, так і спадкова схильність [1,2]. З розвитком молекулярно-генетичних технологій з'явилися широкі можливості для вивчення генетичної складової цих захворювань. Сьогодні накопичена значна кількість даних про участь різних поліморфних генів у формування схильності до мультифакторіальної патології [3,4]. Проте, не зважаючи на успіхи світової наукової спільноти у вивченні геному людини, відома відносно невелика кількість генів, які у сукупності тільки частково пояснюють деякі ланки патогенезу інфаркту міокарда. Щодо української популяції такі дані взагалі незначні і суперечливі.

Враховуючи можливий вплив MGP на розвиток кальцифікації артеріальних судин, що вважається однією з провідних ознак їх дегенерації, можна припустити, що генетичний поліморфізм промоторної ділянки може впливати на рівень експресії гена MGP, а варіабельність 4-го екзону - на якісні характеристики білка. Літературні дані з цього приводу є неоднозначними і суперечливими [5-10]. Беручи до уваги беззаперечну участь факторів навколишнього середовища у виникненні та розвитку гострого коронарного синдрому, та значну роль поліморфізму поодиноких нуклеотидів генів, що причетні до патогенезу вище згаданого синдрому, стає цікавим прослідкувати асоціацію між, так званими, зовнішніми та внутрішніми факторами ризику гострого коронарного синдрому.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ :

З'ясувати зв'язок між однонуклеотидними поліморфізмами гена MGP і деякими факторами ризику розвитку гострого коронарного синдрому (ГКС) в українській популяції.

ЗАДАЧІ ДОСЛІДЖЕННЯ:

1. Визначити частоту однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена MGP у практично здорових індивідуумів – представників української популяції.
2. Дослідити частоту алельного поліморфізму гена MGP у хворих на гострий коронарний синдром.
3. Провести статистичний аналіз зв'язку деяких факторів ризику ГКС з різним варіантами генотипу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ:

- Виділення ДНК з клітин крові.
- Полімеразна ланцюгова реакція з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів.
- Горизонтальний електрофорез ампліфікатів ДНК.
- Статистичні методи аналізу з використанням пакету SPSS 17.0

НАУКОВА НОВИЗНА ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ :

Уперше на сучасному методичному рівні отримана інформація про розподіл різних алельних варіантів гена MGP в українській популяції. Виявлений їхній зв'язок з деякими факторами ризику ГКС.

ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ :

Одержані результати можуть бути покладені в основу виявлення людей, схильних до розвитку ГКС, з метою своєчасної профілактики цієї хвороби і запобігання розвитку їх ускладнень.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Біохімія MGP

Молекула *MGP* людини (мол. маса 10 кДа) складається з 84 амінокислотних залишків, 5 з яких представлено γ -карбоксиглютаміною кислотою (*Gla*) [11,12] (рис. 1). На відміну від усіх відомих сьогодні вітамін К-залежних білків *MGP* не має форми пропептиду [13]. Хоча *MGP* містить великий відсоток гідрофільних амінокислотних залишків, він майже не розчинний у воді (розчинність < 10 мкг/мл), а тому його транспорт плазмою крові може відбуватися тільки в комплексі з іншими водорозчинними білками.

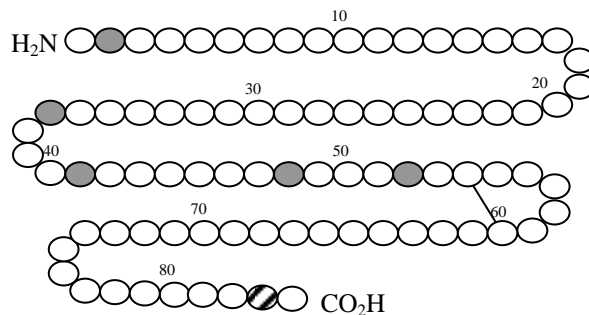


Рис.1. Схема пептидного ланцюга молекули *MGP*. Темні кружечки – залишки глутамінової кислоти, які зазнають γ -карбоксилювання. У положенні 83 може бути треонін або аланін (поліморфізм Tht83Ala)

Щойно синтезована молекула *MGP* складається із 103 амінокислотних залишків (84 – це зрілий білок та 19 – трансмембранний сигнальний пептид) і містить, починаючи з N-кінця, три функціональні ділянки: (1) трансмембранний сигнальний пептид (*transmembrane signal peptide*); (2) імовірний сайт, що його розпізнає γ -карбоксилаза (*putative recognition site for γ -carboxylase*); (3) домен, що містить залишки *Gla* (*Gla-containing domain*) [13].

Утворений у клітинах *MGP* зазнає посттрансляційної модифікації, яка полягає в карбоксилюванні п'яти залишків глутамінової кислоти (*Glu*) з утворенням γ -карбоксиглютамінової кислоти (*Gla*). Зазначена реакція каталізується ферментом γ -глутамілкарбоксилазою (*GGCX*) і є спряженою з окисненням відновленої форми вітаміну К (гідрохінону) в 2,3-епоксид вітаміну К. Таким чином, без окиснення вітаміну К не може відбуватися

карбоксилювання *Glu*-залишків молекули *MGP*. У свою чергу достатня кількість вітаміну К для реакції карбоксилювання *MGP* залежить від стану зворотної реакції його відновлення, яка здійснюється за допомогою вітаміну К-епоксидредуктазного комплексу (*VKOR*). Після наведених вище реакцій *MGP* накопичується у структурах апарату Гольджі і секретується в позаклітинний простір, де і виконує свої функції.

Структура гену *MGP* та його однонуклеотидні поліморфізми

Ген *MGP* у людини представлено однією копією, яка міститься в короткому плечі 12-ї хромосоми (12p12.3-13.1) [13]. У ньому закодовано 84 амінокислотні залишки зрілого білка і 19 залишків трансмембранного сигнального пептиду. Довжина гена – 3900 нуклеотидів, він складається з 4 екзонів, розділених трьома великими проміжними послідовностями (інтронами), на які припадає більш ніж 80% загальної довжини гена [13] (рис. 2). Кожна з трьох функціональних ділянок білка – трансмембранний сигнальний пептид, сайт розпізнавання γ -карбоксилази і домен, що містить залишки *Gla*, – кодується окремим екзоном гена *MGP* (екзони 1,3,4). Екзон 2 кодує ділянку білка, що складається з 11 амінокислотних залишків (*α -helical domain*) і лежить між трансмембранним сигнальним пептидом та сайтом розпізнавання γ -карбоксилази. Функція цієї ділянки *MGP* поки що не відома.

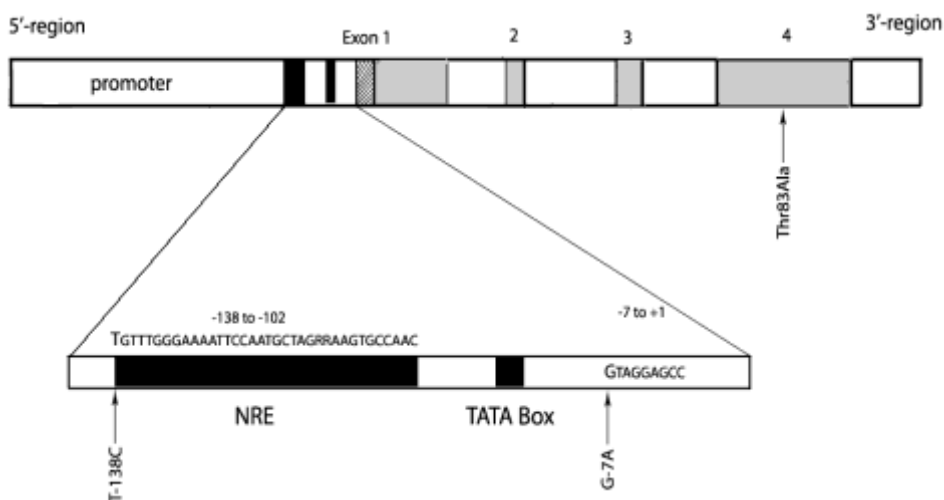


Рис.3. Структура гену *MGP* і локалізація трьох його однонуклеотидних поліморфізмів.
NRE – negative-responsive element

Сьогодні описано понад 120 видів поліморфізму поодиноких нуклеотидів (*SNP*) у гені *MGP* людини. З них найкраще досліджено, з огляду їхньої асоціації з різними хворобами, три види: (1) $T^{-138} \rightarrow C$ (rs 1800802); (2) $G^{-7} \rightarrow A$ (rs 1800801); (3) $Thr_{83} \rightarrow Ala$ (rs 4236) [5-10] (рис. 2).

Поліморфізм $T^{-138} \rightarrow C$ стосується промоторної частини гена – ділянки, яка утворює комплекси з ядерними білками і сприймає їх регуляторні впливи; $G^{-7}A$ локалізований у початковому відрізку промотора, з якого стартує власне процес транскрипції; $Thr_{83} \rightarrow Ala$ – у четвертому екзоні, що кодує *Gla*-місткий домен. Останній варіант *SNP* зумовлює заміну треоніну на аланін у передостанньому 83-у залишку молекули *MGP*.

Питання про те, як різні види поліморфізму гена *MGP* впливають на його експресію і здатність сприймати різні регуляторні впливи, перебуває сьогодні у центрі уваги дослідників. Слід відмітити що на даний час доведено зв'язок певних поліморфізмів поодиноких нуклеотидів гена *MGP* з розвитком деяких хвороб та патологічних станів. Зокрема для французької популяції був доведений зв'язок $G^{-7} \rightarrow A$ і $Thr_{83} \rightarrow Ala$ поліморфізмів з розвитком атеросклерозу стегнових артерій [5]. У чоловічого населення Сполучених Штатів Америки виявлена асоціація $G^{-7} \rightarrow A$, $T^{-138} \rightarrow C$ та $Thr_{83} \rightarrow Ala$ поліморфізмів із розвитком кальцифікації коронарних артерій [9]. У представників Північної Ірландії серед населення з низьким ризиком розвитку інфаркту міокарда була доведена кореляція між $G^{-7} \rightarrow A$, $Thr_{83} \rightarrow Ala$ поліморфізмами та розвитком інфаркту міокарда [5]. Слід зауважити, що також був встановлений зв'язок із поліморфізмами гена *MGP* та смертністю пацієнтів від серцево-судинних захворювань на фоні хронічної ниркової недостатності для італійської популяції [8,14]. Крім впливу на розвиток серцево-судинних хвороб, алельний поліморфізм *MGP* може мати стосунок і до деяких інших недуг та патологічних процесів, таких як сечокам'яна хвороба [14], остеопороз [15,16], випадіння зубів [17] та ін.

Отже, враховуючи можливий зв'язок поліморфізму поодиноких нуклеотидів гена *MGP* з розвитком серцево-судинної патології серед

іноземного населення, можемо висунути припущення про можливість наявності зв'язку різних алельних варіантів гена *MGP* із розвитком гострого коронарного синдрому у вітчизняній популяції.

***MGP* і кальцифікація судинної стінки.**

Наявність *Gla*-вмісних білків у судинній стінці було вперше показано *J.B.Lian et al.* [18], які виділили амінокислоту *Gla* з лужних гідролізатів кальцифікованих атероматозних бляшок аорти людини.

Після відкриття *MGP* було доведено, що у стінках кровоносних судин *Gla*-вмісні білки представлено саме цим протеїном [19]. В артеріальній стінці *MGP* синтезується ГМК медії та інтими, а в місцях атеросклеротичних уражень – і макрофагами [20]. За допомогою моноклональних антитіл було показано, що в стінці нормальних артерій людини *MGP* асоційований з ГМК та еластичними мембранами в медії і з позаклітинним матриксом в адвентиції [21]. Було встановлено, що *MGP* має стосунок до різних видів кальцифікації артеріальних судин. Реалізація антикальцифікуючого ефекту *MGP* *in vivo* реалізується за допомогою зв'язування іонів кальцію та кристалів гідроксіапатиту [13], зв'язуванням із компонентами позаклітинного матриксу [22]. Також *MGP* взаємодіє із кістковим морфогенетичним протеїном BMP-2 (останній відіграє важливу роль в кальцифікації судинної стінки)[22,23]. Розглядається роль *MGP* в регуляції апоптозу, проте на сьогодні механізм не вивчений.

MGP і атеросклероз. Кальцифікація атероматозних бляшок є одним з процесів, що завершує розвиток дегенеративних змін в інтимі [24-26]. Вивчення накопичення і експресії *MGP* в таких бляшках людини показало, що молекули цього білка мають тісний просторовий зв'язок з місцями відкладання гідроксіапатиту: їх виявляли на межі з осередками кальцифікації [20,21]. Проте, експресія гена *MGP* (утворення відповідної мРНК) в ГМК атероматозних бляшок була нижчою, якщо порівнювати з ГМК нормальних судин, які конститутивно експресують цей білок. Водночас у бляшках ГМК починали утворювати протеїни, що мають стосунок до процесів остео/хондрогенезу

(остеокальцин, кістковий сіалопротейн, лужну фосфатазу), і в нормі в артеріальній стінці не синтезуються. Ці спостереження дали підстави думати, що мінералізація структур судинної стінки може бути результатом порушення балансу між прокальциногенними (остео/хондрогенними) і антикальциногенними чинниками. До останніх було віднесено *MGP* [20].

Антикальцифікуючий ефект *MGP* та його участь у формуванні атеросклеротичної бляшки вказують на його пряму причетність та недругорядну роль в етіопатогенезі гострого коронарного синдрому.

Гострий коронарний синдром: сучасні уявлення про патогенез

Поняття про гострий коронарний синдром (ГКС) увійшло в мову вчених-кардіологів і клініцистів з початку 90-х років. Виникнення цього терміна пов'язано з появою нових даних про механізми "загострення" ішемічної хвороби серця, синтезом і впровадженням в клініку нових груп фармакологічних препаратів, зміною поглядів на тактику ведення хворих з гострою коронарною недостатністю [27].

На теперішній час до ГКС відносять такі нозологічні одиниці: нестабільна стенокардія, дрібновогнищевий (без зубця Q) інфаркт міокарда, великовогнищевий (із зубцем Q) інфаркт міокарда та раптову коронарну смерть [28]. Розвиток останніх зумовлений гострим або підгострим первинним зменшенням постачання міокарда киснем, яке спричиняється розривом або ерозією атеросклеротичної бляшки, асоційованими із запаленням, стійким або нестійким тромбозом вінцевої артерії, вазоконстрикцією та мікроемболізацією [28,29].

Доведено, що атеросклеротичні бляшки, схильні до розриву, мають велике ліпідне ядро, низьку щільність гладком'язових клітин, високу щільність макрофагів, тонку фіброзну покривку з дезорганізованого колагену, а також високу концентрацію тканинного фактора. Ліпідне ядро формує клітинну масу всередині колагенового матриксу бляшки [30].

Розрив атеросклеротичної бляшки є наслідком поєднання різних факторів. Останні умовно ділять на зовнішні і внутрішні. До перших можна віднести: високий рівень ЛПНЩ, тригліцеридів, молекул типу фібриногену, фібронектину, фактор Фон Віллебранда [29], артеріальна гіпертензія, підвищення активності симпато-адреналової системи, спазм коронарних артерій. Внутрішні чинники, що сприяють пошкодження покриття бляшки - переважання ліпідного ядра, зниження кількості гладком'язових клітин і синтезу колагену, підвищення активності макрофагів всередині бляшки і їх апоптоз, запалення всередині бляшки, що супроводжується інфільтрацією її покриття макрофагами [31]. Крім розриву бляшки, одним із основних механізмів патогенезу ГКС є ерозія бляшки, яку частіше спостерігають у жінок, пацієнтів з цукровим діабетом і артеріальною гіпертензією [29]. Коли виникає ерозія, на поверхні бляшки утворюється тромб, що здатен спричинити швидкі зміни ступеня стенозу, а також призвести до субтотальної або тотальної оклюзії судини. А коли бляшка розривається, тромб захоплює глибші її шари, аж до ліпідного ядра [28].

Наявність макрофагальної інфільтрації бляшок (особливо розірваних), присутність активованих Т-лімфоцитів у місці розриву бляшки, а також здатність виділення тромбом вазоконстрикторних субстанцій, таких як серотонін і тромбоксан А₂, вказують на роль запалення та місцевої вазоконстрикції в розвитку гострих коронарних станів [32].

Таким чином головною ланкою патогенезу ГКС є пошкодження атеросклеротичної бляшки. Участь у формуванні останньої приймає MGP. Це дає підстави вважати MGP причетним до патогенезу ГКС та досліджувати зв'язок між ними.

Фактори ризику гострого коронарного синдрому

Фактори ризику ГКС – обставини або чинники, наявність яких призводить до розвитку даного стану. Оскільки основною ланкою патогенезу

ішемічної хвороби серця, і ГКС зокрема, є атеросклероз коронарних артерій, ці чинники багато в чому схожі з факторами ризику атеросклерозу.

Для класифікації численних факторів ризику, пов'язаних з серцево-судинними захворюваннями, пропонуються різні моделі. Як варіант, показники ризику можна класифікувати наступним чином [33].

Фактори ризику, що не модифікуються. До них відносять спадковість, вік та стать. Спадковість вважається обтяженою по ІХС при наявності у близьких родичів (батьки, дідусі, бабусі, брати, сестри) випадків виникнення ІХС по чоловічій лінії до 55 років, по жіночій до 65 років. У різних популяціях виявлена пряма залежність між віком людини і частотою виникнення ІХС - чим більше вік, тим вище захворюваність ІХС. Чоловіки значно частіше хворіють ІХС. У жінок до 50-55 років (вік настання стійкої менопаузи) випадки виявлення ІХС вкрай рідкісні. Після настання менопаузи частота виникнення ІХС у жінок починає неухильно зростати і після 70-75 років чоловіча та жіноча криві захворюваністю ІХС однакові.

До основних факторів ризику, що модифікуються належать: артеріальна гіпертензія (АГ), ожиріння, цукровий діабет (ЦД) та тютюнопаління. В останні роки в усьому світі приділяється увага вивченню такого фактору ризику, як хронічний психоемоційний стрес [28,30].

Наявність у хворих із ГКС зовнішніх факторів ризику, наведених вище, а також можливість певної відмінності генетичної складової від такої у здорових людей, зокрема по гену MGP (так звані внутрішні фактори ризику), наводить на думку про вірогідну кореляцію між зовнішніми та внутрішніми факторами ризику ГКС.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено із використанням венозної крові 118 хворих з гострим коронарним синдромом і 110 практично здорових донорів. Кінцевий діагноз нестабільної стенокардії (НС) виставлено у 33,5% хворих, гострого інфаркту міокарда (ІМ) – у 66,5% пацієнтів (табл.1). Діагноз гострого ІМ і НС встановлено на підставі даних клінічних, електрокардіографічних і біохімічних обстежень, відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів. Контрольна група і група хворих не відрізнялися за віком і співвідношенням осіб різної статі ($P > 0,05$ за χ^2 -критерієм).

Таблиця 1.

Загальна характеристика пацієнтів з гострим коронарним синдромом

Характеристики	Загалом (n = 118)	Жінки (n = 26)	Чоловіки (n = 92)	P
Вік, років	55,9±0,89	61,0±1,47	54,5±1,01	0,002
Зріст, см	172±0,7	163±1,1	174±0,6	< 0,001
Маса тіла, кг	83,6±1,21	83,6±2,30	83,7±1,41	0,979
Індекс маси тіла, кг/м ²	28,5±0,41	31,5±0,90	27,6±0,42	< 0,001
Ожиріння	97 (82,2%)	26 (100%)	71 (71,0%)	0,013
Цукровий діабет	30 (25,4%)	11 (42,3%)	19 (20,7%)	0,064
Артеріальна гіпертензія	72 (61,0%)	72 (61,0%)	47 (51,1%)	< 0,001
Куріння	54 (45,8%)	54 (45,8%)	51 (55,4%)	< 0,001
Стресові професії	49 (41,5%)	5 (19,2%)	44 (47,8%)	0,009
Глюкоза, ммоль/л	7,9±0,24	9,1±0,65	7,6±0,24	0,006

Примітка: p – значимість відмінностей між жіночою і чоловічою статтю

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтном. Кров заморожували і зберігали при температурі -20°C. ДНК з неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Методом ПЦР з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів визначали T⁻¹³⁸→C поліморфізм промотора (rs1800802). Для цього ампліфікували ділянку промотора вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5`-AAGCATACGATGGCCAAAАСТТСТGСА-3` і зворотного (antisense) – 5`-GAACTAGCATTTGGAАСТТТТСССААСС-3`. Праймери було синтезовано

фірмою “Metabion” (Німеччина). Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0,5 ОД Таq-полімерази (“Ферментас”, Литва), об’єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 (“Applied Biosystems”, США). Ампліфікація фрагмента промотора складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (30 с), гібридизація праймерів – 57°C (1 хв) і елонгація – 72°C (1 хв). Пізніше 6 мкл продукту ампліфікації фрагмента промотора інкубували при 37°C протягом 18 годин з 3 ОД рестриктази *BseNI* (“Ферментас”, Литва). Якщо в -138 позиції гена MGP містився тимін, ампліфікат, який складався з 142 пар основ, розщеплювався рестриктазою *BseNI* на два фрагменти – 118 і 24 пари основ. У разі заміни тиміну на цитозин сайт рестрикції для *BseNI* втрачався і утворювався один фрагмент розміром 142 пари основ (рис. 4А).

Послідовність нуклеотидів у специфічних праймерах для вивчення поліморфізму $G^{-7} \rightarrow A$ (rs1800801) була такою: прямий (sense) – 5`-CTAG TTCAGTGCCAACCSTTCCCCACC-3`, зворотний (antisense) – 5`-TAGCAGCA GTAGGGAGAGAGGCTCCCA-3`. Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази (“Ферментас”, Литва), об’єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента, що містив стартову ділянку, складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 годин з 2 ОД рестриктази *NcoI*. Якщо в -7 позиції гена MGP містився гуанін, ампліфікат, який складався з 500 пар основ, розщеплювався рестриктазою *NcoI* на два фрагменти – 240 і 260 пар основ. У разі заміни гуаніну на аденін сайт рестрикції для *NcoI* втрачався і візуалізувався один фрагмент завдовжки 500 пар основ (рис. 4Б).

Для визначення поліморфізму 4-го екзону Thr₈₃→Ala (rs4236) гена MGP використовували прямий (sense) – 5`-TCAATAGGGAAGCCTGTGATG-3` і зворотний (antisense) – 5`-AGGGGGATACAAAATCAGGTG-3`. Програма ампліфікації була такою: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с), елонгація – 72°C (1 хв), разом 33 цикли. У подальшому 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 годин з 3 ОД рестриктази *Eco477*. Наявність у 3748 позиції гена MGP аденіну перешкоджає рестрикції, а при заміні аденіну на тимін рестриктаза розщеплює ампліфіковану ділянку 4-го екзону (довжина – 173 пари азотистих основ) на два фрагменти: 127 і 46 пар основ (рис. 4В).

Після рестрикції ампліфікати розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 25 хв (T⁻¹³⁸→C), 40 хв (G⁻⁷→A) та 20 хв (Thr₈₃→Ala). Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

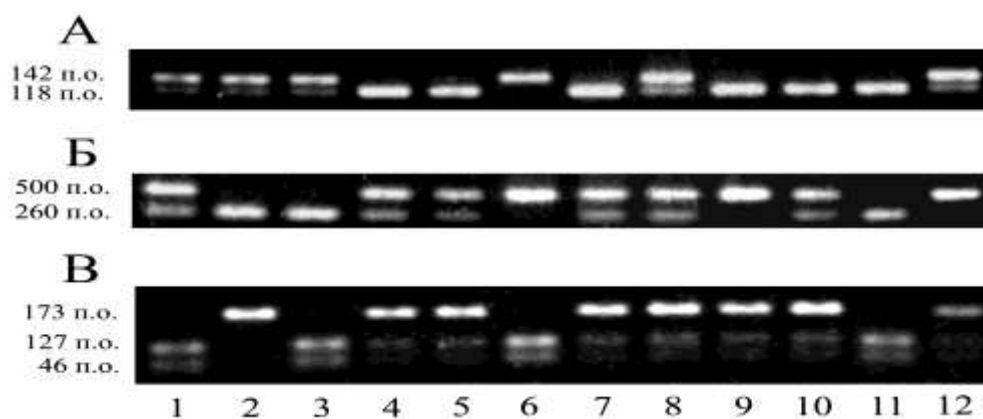


Рис. 4. Результати рестрикційного аналізу однонуклеотидних поліморфізмів гена MGP: А - T⁻¹³⁸→C поліморфізм (доріжки 4, 5, 9, 10, 11 відповідають Т/Т-генотипу, 1, 2, 3, 8, 12 – Т/С-генотипу, 6 - С/С-генотипу); Б - G⁻⁷→А поліморфізм (доріжки 2, 3, 11 відповідають G/G-генотипу, 1, 4, 5, 7, 8, 10 – G/A-генотипу, 6, 9, 12 – А/А-генотипу); В - Thr₈₃→Ala поліморфізм (доріжки 1, 3, 6, 11 відповідають Thr/Thr-варіанту, 4, 5, 7–10, 12 – Thr/Ala-варіанту, 2 – Ala/Ala-варіанту).

Одержані результати опрацьовували статистично з використанням пакету SPSS 17.0. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм Пірсона та t-критерієм Стьюдента. Значення P < 0,05 вважали достовірним.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування по кожному з трьох сайтів гена MGP дало можливість виділити три групи особин: гомозиготи за основним алелем, гетерозиготи та гомозиготи за мінорним алелем.

У контрольній групі співвідношення між зазначеними трьома групами по $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізму склало 58,7%, 36,7%, 4,6% відповідно; при дослідженні $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму - 41,8%, 54,5%, 3,6%; при оцінці $Thr_{83} \rightarrow Ala$ поліморфізму - 43,9%, 45,9%, 10,2%.

Генотипування хворих із ГКС по трьох сайтах гена MGP дало змогу встановити, що співвідношення нормальних гомозигот, гетерозигот і гомозигот із мінорним алелем при аналізі $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізму промотора складало у хворих з ГКС: 59,8%, 32,7%, 7,5%. Частота алельних варіантів при вивченні $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму становила 42,1%, 45,6%, 12,3%, а при аналізі поліморфізму $Thr_{83} \rightarrow Ala$ – 42,6%, 43,5%, 13,9% відповідно.

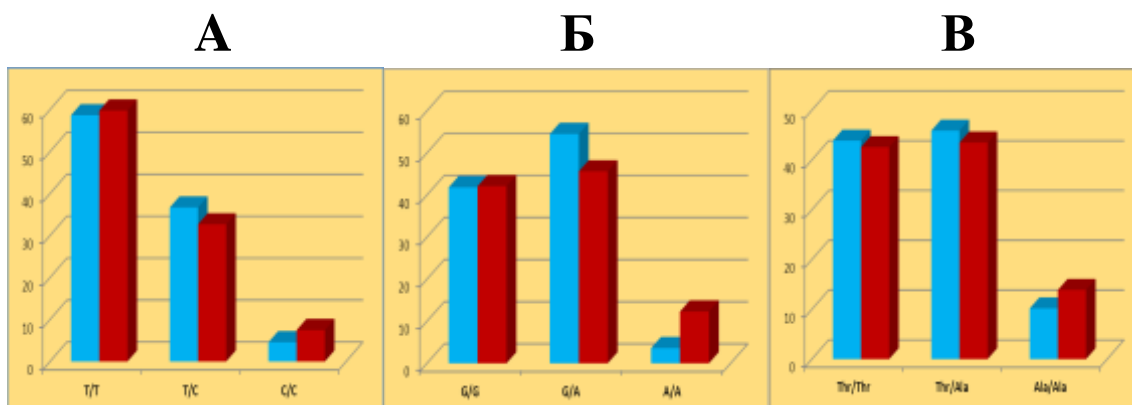


Рис. 5. Частота різних генотипів при визначенні одонуклеотидних поліморфізмів гена MGP у практично здорових індивідумів (блакитні стовпчики) та хворих із гострим коронарним синдромом (червоні стовпчики): А - $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізм, Б - $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізм, В - $Thr_{83} \rightarrow Ala$ поліморфізм.

Порівняння одержаних даних з результатами рестрикційного аналізу в групі відносно здорових донорів дало змогу встановити, що частота, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена, є різною при $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізмі ($p=0,039$) і статистично не відрізняється, коли йдеться про $T^{-138} \rightarrow C$ та $Thr_{83} \rightarrow Ala$ поліморфізми ($p=0,586$, $p=0,633$ відповідно за χ^2 -критерієм).

Доведено, що у хворих з ГКС мінорний („патологічний”) варіант А/А виявляли в 3,4 раза частіше, ніж у здорових донорів.

Усі пацієнти з дослідної групи були розділені на тих, що мають та тих, що не мають певні фактори ризику ГКС (стать, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет, ожиріння, тютюнопаління та стресова професія). Застосовуючи методи аналітичної статистики було проведено порівняння розподілу різних алельних варіантів по трьом досліджуваним поліморфізмам гена MGP у представників зазначених груп.

Розподіл нормальних гомозигот, гетерозигот та гомозигот із мінорним алелем при аналізі T¹³⁸→C поліморфізму за наявністю чи відсутністю факторів ризику ГКС приведені у табл. 2.

Табл. 2

Розподіл алельних варіантів гена MGP по T¹³⁸→C поліморфізму у хворих із ГКС за факторами ризику

Фактор ризику	Показник	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)	P
Артеріальна гіпертензія	відсутня	63,00	34,80	2,20	0,043
	наявна	56,90	30,90	12,10	
Систолічний АТ	менше 140 мм.рт.ст	60,42	37,50	2,08	0,017
	більше 140 мм.рт.ст	58,57	30,00	11,43	
Діастолічний АТ	менше 90 мм.рт.ст	66,04	32,08	1,89	0,021
	більше 90 мм.рт.ст	53,85	33,85	12,30	
Стать	чоловіча	58,70	33,70	7,60	0,961
	жіноча	61,50	30,80	7,70	
Цукровий діабет	немає	58,00	34,10	8,00	0,872
	1 та 2 типів	65,40	26,90	7,70	
Куріння	не курять	62,50	32,80	4,70	0,402
	курять	55,60	33,30	11,10	
Стрессова професія	нестрессова	59,40	33,30	7,20	0,982
	стрессова	59,20	32,70	8,20	
Ожиріння	ІМТ менше 25 кг/м ²	47,60	38,10	14,30	0,321
	ІМТ 25 і більше кг/м ²	61,90	32,00	6,20	

Примітка: p – значимість відмінностей

При аналізі T¹³⁸→C поліморфізму була виявлена статистично достовірна різниця в розподілі різних алельних варіантів у хворих на ГКС з АГ та без неї (p=0,043): у пацієнтів з АГ кількість гомозигот за мінорним алелем була у 5,5 разів більша, ніж у хворих на ГКС без АГ (табл. 2).

Розділивши експериментальну групу на підгрупу із систолічним артеріальним тиском ($AT_{\text{сист.}}$) більше 140 мм.рт.ст. та менше 140 мм.рт.ст. виявили, що розподіл генотипу у представників першої підгрупи достовірно відрізнявся від такого у пацієнтів, що мали показники $AT_{\text{сист.}}$ нижче 140 мм.рт.ст. ($p=0,017$). Розподіл різних алельних варіантів у хворих з $AT_{\text{діаст.}}$ більше 90 мм.рт.ст достовірно відрізнявся від таких, що мали показники нижче 90 мм.рт.ст. ($p=0,021$).

У пацієнтів з генотипом T/T $AT_{\text{сист.}}$ склав $140,92 \pm 3,67$ мм.рт.ст., з генотипом T/C - $139,62 \pm 4,79$ мм.рт.ст. та $158,89 \pm 6,33$ мм.рт.ст. у хворих з генотипом C/C. При порівнянні виявлена достовірна відмінність між T/T та C/C, T/C та C/C генотипами ($p=0,047$). Величина $AT_{\text{діаст.}}$ у носіїв T/T генотипу складала $88,29 \pm 2,09$ мм.рт.ст., T/C генотипу - $88,44 \pm 3,42$ мм.рт.ст. та $98,89 \pm 4,23$ мм.рт.ст. у хворих з генотипом C/C. Статистично достовірна відмінність виявлена між T/T та C/C генотипами ($p=0,039$).

У чоловіків з генотипом T/T середній індекс маси тіла (ІМТ) був достовірно вищим ($29,32 \pm 0,99$), ніж у представників T/C ($27,99 \pm 0,65$) та C/C ($25,02 \pm 1,67$) генотипів ($p=0,048$).

Статистично значимої різниці в розподілі алельних варіантів гена MGP по T¹³⁸→C поліморфізму серед жінок та чоловіків, курців і пацієнтів, що не палять, серед хворих на цукровий діабет та тих, що не мають діабету, серед представників стресових та нестресових професій та серед людей із ожирінням та без нього виявлено не було.

Результати порівняння розподілу різних алельних варіантів по G⁷→A поліморфізму гена MGP у хворих на ГКС за наявності чи відсутності тих чи інших факторів ризику наведені в табл.3.

Розподіл алельних варіантів гена *MGP* по $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму у хворих із ГКС за факторами ризику

Фактор ризику	Показник	G/G (%)	G/A (%)	A/A (%)	P
Артеріальна гіпертензія	відсутня	41,30	54,10	4,60	0,043
	наявна	41,70	43,10	15,30	
Систолічний АТ	менше 140 мм.рт.ст	45,28	49,65	5,66	0,017
	більше 140 мм.рт.ст	30,77	45,23	20,00	
Діастолічний АТ	менше 90 мм.рт.ст	45,28	49,06	5,66	0,021
	більше 90 мм.рт.ст	38,46	43,08	18,48	
Цукровий діабет	немає	47,70	43,20	9,10	0,039
	1 та 2 типів	19,20	53,80	26,90	
Ожиріння	ІМТ менше 25 кг/м ²	42,90	56,90	1,20	0,012
	ІМТ 25 і більше кг/м ²	41,20	43,30	15,50	
Стать	чоловіча	45,70	43,50	10,90	0,192
	жіноча	26,90	53,80	19,20	
Куріння	не курять	37,50	46,90	15,60	0,468
	курять	46,30	44,40	9,30	
Стресова професія	нестресова	42,00	46,40	11,60	0,911
	стресова	40,80	44,90	14,30	

Примітка: *p* – значимість відмінностей

При аналізі $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму була виявлена статистично достовірна різниця в розподілі різних алельних варіантів у хворих на ГКС з АГ та без неї ($p=0,041$): у пацієнтів з АГ кількість гомозигот за мінорним алелем була у 3,3 раза більша, ніж у хворих на ГКС без АГ (табл. 3).

Розділивши дослідну групу на підгрупу із АТ_{сист.} більше 140 мм.рт.ст. та менше 140 мм.рт.ст. виявили, що розподіл генотипу у хворих із АТ_{сист.} більше 140 мм.рт.ст. достовірно відрізнявся від таких, що мали показники нижче 140 мм.рт.ст. Співвідношення нормальних гомозигот, гетерозигот і гомозигот із мінорним алелем при аналізі $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму в пацієнтів із АТ_{діаст.} більше 90 мм.рт.ст. та у хворих із показниками АТ_{діаст.} менше 90 мм.рт.ст. було достовірно різним ($p = 0,017$, $p = 0,021$ відповідно).

У пацієнтів з генотипом G/G АТ_{сист.} склав $131,29 \pm 5,06$ мм.рт.ст., з генотипом G/A - $140,38 \pm 3,71$ мм.рт.ст. та $162,19 \pm 8,67$ мм.рт.ст. у хворих з генотипом A/A. При порівнянні показників виявлена достовірна відмінність між G/G та A/A, G/A та A/A генотипами ($p=0,039$). Крім того, статистично

значима різниця виявлена між G/A та A/A генотипами у представників чоловічої статі ($p=0,031$).

Достовірна різниця в розподілі різних алельних варіантів гена MGP по $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму була доведена для пацієнтів з ЦД та без нього (генотип A/A зустрічався в 3 рази частіше), із ожирінням та без ожиріння (варіант A/A виявлявся в 13 разів частіше).

ІМТ склав $29,09 \pm 0,86$, $28,07 \pm 0,63$ та $32,28 \pm 1,75$ у пацієнтів із генотипом G/G, G/A та A/A відповідно. Достовірна відмінність за показником ІМТ була виявлена між нормальними гомозиготами і гомозиготами за мінорним алелем, а також між гетерозиготами і гомозиготами за мінорним алелем ($p = 0,027$).

Достовірної різниці в розподілі різних алельних варіантів у хворих різної статі, хворих які палять та не палять та у представників стресових та нестресових професій по $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму виявлено не було.

Порівнюючи розподіл різних алельних варіантів по $Thr_{83} \rightarrow Ala$ поліморфізму четвертого екзону гена MGP у представників експериментальної групи за наявністю чи відсутністю факторів ризику гострого коронарного синдрому виявлено наступні дані (табл. 4).

Розподіл генотипів за ступенем ожиріння достовірно відрізнявся між пацієнтками без ожиріння та з ожирінням у Thr/Thr-26,7%, Thr/Ala-33,3%, Ala/Ala-3,3%, проти 3,3%, 16,7% і 16,7% відповідно ($p < 0,001$).

У жінок з генотипом Ala/Ala середній $AT_{\text{сист.}}$ склав $175 \pm 11,3$ та достовірно відрізнявся від жінок із Thr/Thr і Thr/Ala генотипами ($139,5 \pm 11,8$ і $142,1 \pm 7,0$ відповідно) ($p=0,031$). За $AT_{\text{діаст}}$ у жінок, хворих на ГКС, статистичні відмінності були лише між Thr/Ala ($88,8 \pm 3,6$) і Ala/Ala ($101,7 \pm 5,1$) ($p < 0,039$). У жінок з генотипом Ala/Ala середній ІМТ виявився достовірно вищим ($35 \pm 1,7$), ніж у жінок з генотипом Thr/Thr ($29 \pm 1,5$) і Thr/Ala ($29 \pm 0,9$) ($p < 0,029$).

Достовірна різниця в розподілі алельних варіантів по $Thr_{83} \rightarrow Ala$ поліморфізму гена MGP у чоловіків та жінок, у хворих на ГКС із АГ та без АГ, із ЦД та без нього, у курців та тих, які не палять, у представників стресових та

нестресових професій та у людей з ожирінням та без ожиріння виявлена не була.

Табл. 4

Розподіл алельних варіантів гена MGP по Thr₈₃→Ala поліморфізму у хворих із ГКС за факторами ризику

Фактор ризику	Показник	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)	P
Стать	чоловіча	47,80	40,20	12,00	0,120
	жіноча	26,90	50,00	23,10	
Артеріальна гіпертензія	відсутня	43,50	47,80	8,70	0,327
	наявна	43,10	38,90	18,10	
Цукровий діабет	немає	46,60	40,90	12,50	0,231
	1 та 2 типів	26,90	50,00	23,10	
Куріння	не курять	40,60	43,80	15,60	0,809
	курять	46,30	40,70	13,00	
Стресова професія	нестресова	44,90	44,90	10,10	0,292
	стресова	40,80	38,80	20,40	
Ожиріння	ІМТ менше 25 кг/м ²	38,10	52,40	9,50	0,554
	ІМТ 25 і більше кг/м ²	44,30	40,20	15,50	

Примітка: p – значимість відмінностей

Від часу встановлення антикальцифікуючих властивостей MGP постало питання, яку роль відіграє цей білок у розвитку кальцифікації артеріальної стінки, зокрема атеросклеротичних бляшок у людини. Дослідження пішли у двох основних напрямках. З одного боку, проводяться молекулярно-генетичні дослідження впливу однонуклеотидних поліморфізмів в промоторі на ефективність транскрипції із застосування люциферазного тесту. З другого, дослідники шукають функціональне значення SNP на клінічному матеріалі, вивчаючи зв'язок між рівнем MGP крові і розвитком атеросклеротичних змін [34-36], поліморфізмами в гені MGP та деякими іншими показниками ураження артерій [5-10].

Щодо вивчення поліморфізму гена MGP у хворих з інфарктом міокарда, то тут дані небагаточисельні. Лише в одному дослідженні (ESTIM Study, Північна Ірландія, Франція) аналізували зв'язок 6 варіантів гена MGP з розвитком інфаркту міокарда (ІМ) [5]. Було показано, що частота алелів і розподіл генотипів за всіма видами SNP однакові у хворих на ІМ і в

контрольній групі. Тільки в одній підгрупі, у якій хворих і контрольних суб'єктів було поділено на таких, що мають високий і низький ризик розвитку ішемічної хвороби серця, встановлено, що частота мінорних алелів (-7A і Ala83) у хворих на ІМ з низьким рівнем факторів ризику є більшою, ніж у відповідній контрольній підгрупі.

Окрім безпосереднього зв'язку поліморфізмів поодиноких нуклеотидів з розвитком тих чи інших хвороб та патологічних станів на сьогодні накопичена значна кількість робіт присвячених визначенню зв'язку SNP певних генів з, так званими, зовнішніми факторами ризику розвитку захворювань, зокрема серцево-судинних [37-39]. Зв'язок досліджується як з модифікуючими так і з не модифікуючими факторами ризику.

Під час дослідження поліморфізму eNOS 4b/4a у хворих із атеротромботичним ішемічним інсультом та хронічною ішемічною хворобою мозку [37] у хворих із цукровим діабетом в обох групах частка 4a/4b генотипу виявилась достовірно вищою у порівня з іншими генотипами eNOS. Автори припустили, що алельний варіант 4a і генотипи 4a/4a та 4a/4b можуть робити певний внесок у розвиток цукрового діабету як одного з факторів ризику, що лежить в основі розвитку патології серцево-судинної системи.

У роботі Д. Джиреллі та ін.,(2001) [38] у групі хворих з ІХС частота основних факторів ризику важких ускладнень серцево-судинних захворювань була однаковою як серед осіб, які перенесли раніше інфаркт міокарда, так і серед тих, хто ніколи не страждав цим захворюванням. Виняток склали лише такі ознаки як чоловіча стать та куріння - пацієнти з перенесеним інфарктом міокарда частіше були курцями та чоловіками. Проте не було достовірних відмінностей між курцями та особами, які не палять, між жінками та чоловіками за частотою розподілу різних алельних варіантів за 5'F7 та R353Q поліморфізмами гена фактору згортання VII .

При дослідженні в іспанській популяції [39] була оцінена вірогідність асоціації поліморфізма G2548A промотора гена лептину (Lep) із цукровим діабетом у хворих на артеріальну гіпертензію. Знайдені достовірні відмінності

між розподіленням генотипів у групі цукрового діабету та в групі пацієнтів, що не мали цукрового діабету. Наявність алелю А (генотипи А/А та А/Г) підвищувало ризик розвитку ЦД. У цьому ж дослідженні роль поліморфізму оцінювали у пацієнтів з підвищеним ІМТ $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ та нормальною вагою (ІМТ: $18.5 \leq 25 \text{ kg/m}^2$). Отриманий результат показав, що гомозиготний варіант алелю А поліморфізма 2548G/A достовірно пов'язаний із підвищеним ризиком ожиріння.

У виконаних нами дослідженнях показано, що в групі хворих з ГКС, що є найбільш небезпечною формою ішемічної хвороби серця, частота алелю -7А була вищою, ніж у контрольній групі. Це дає підстави вважати, що $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізм має стосунок до розвитку саме цієї форми ішемічної хвороби серця в українській популяції і може розглядатися як один з генетичних чинників серцево-судинної патології. Також наявність зв'язку А/А варіанту промотора з артеріальною гіпертензією, із цукровим діабетом та з ожирінням надають підстави вважати $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізм генетичним маркером вище наведених захворювань та патологічних станів у хворих із ГКС і стверджувати про роль даного поліморфізму в їх патогенезі.

Виявлена асоціація С/С генотипу $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізму з артеріальною гіпертензією у хворих в групі з ГКС може вказувати на певну причетність даного поліморфізму до механізмів розвитку артеріальної гіпертензії. Враховуючи зв'язок Т/Т генотипа з підвищеним індексом маси тіла у чоловіків небезпідставним буде припущення про певний зв'язок $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізму з ожирінням у чоловіків.

На відміну від $G^{-7} \rightarrow A$ та $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізмів, для $\text{Thr}_{83} \rightarrow \text{Ala}$ поліморфізму гена MGP зв'язок з основними факторами ризику ГКС для загальної вибірки не доведено. Проте виявлений зв'язок Ala/Ala генотипу з розвитком ожиріння та підвищеним систолічним і діастолічним артеріальним тиском у жінок, хворих на ГКС. Тому можна припустити, що наведений поліморфізм відіграє певну роль у формуванні ожиріння та артеріальної гіпертензії у представників жіночої статі.

Таким чином, високий рівень захворюваності та смертності від серцево-судинних недуг, зокрема від гострого коронарного синдрому, слугують достатнім приводом для пошуку генетичної складової даних патологій. Перспективними мають стати цілеспрямовані дослідження по вивченню нових генетично детермінованих факторів ризику та їх можливого зв'язку з, так званими, зовнішніми факторами ризику, що надасть змогу розширити уявлення про провідні патофізіологічні механізми серцево-судинних захворювань, розробити сучасні підходи до діагностики, лікування та запобігання цих хвороб із урахуванням як набутих так і генетично обумовлених чинників.

ВИСНОВКИ :

1. Встановлено, що в контрольній групі співвідношення нормальних гомозигот, гетерозигот і гомозигот із мінорним алелем при аналізі $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізму промотора гена *MGP* становить 58,7%, 36,7%, 4,6%, при аналізі $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму промотора - 41,8%, 54,5%, 3,6% , а при визначенні поліморфізму $Thr_{83} \rightarrow Ala$ 4-го екзону – 43,9%, 45,9%, 10,2%.
2. Виявлено, що у хворих на ГКС співвідношення нормальних гомозигот, гетерозигот і гомозигот із мінорним алелем при аналізі $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізму промотора гена *MGP* становить 59,8%, 32,7%, 7,5%, при аналізі $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму промотора - 42,1%, 45,6%, 12,3% , а при визначенні поліморфізму $Thr_{83} \rightarrow Ala$ 4-го екзону – 42,6%, 43,5%, 13,9%.
3. Доведено, що *A/A*-варіант промотора гена *MGP* ($G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізм) асоційований зі збільшення ризику розвитку гострого коронарного синдрому в українській популяції.
4. *C/C* варіант $T^{-138} \rightarrow C$ поліморфізму гена *MGP* асоційований з артеріальною гіпертензією, підвищеними $AT_{\text{сист.}}$, $AT_{\text{діаст.}}$; *T/T* варіант промотора асоційований з підвищенням показників ІМТ у чоловіків.
5. Встановлено, що *A/A* варіант $G^{-7} \rightarrow A$ поліморфізму гена *MGP* асоційований із артеріальною гіпертензією, підвищеними $AT_{\text{сист.}}$, $AT_{\text{діаст.}}$, із цукровим діабетом та з ожирінням у хворих із ГКС. Також отримані дані про зв'язок генотипу *A/A* з підвищеним індексом маси тіла.
6. Генотип *Ala/Ala* поліморфізму $Thr_{83} \rightarrow Ala$ гена *MGP* асоційований із ожирінням та підвищенням показників $AT_{\text{сист.}}$, $AT_{\text{діаст.}}$ у жінок, хворих на ГКС.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ :

1. Медико-демографічний атлас України. Вип. 1. - К. - 2007. - 31.
2. Ивашкин В.Т., Уланова И.Н. Преждевременная смертность в Российской Федерации и пути ее снижения. Стратегия «шесть в четырех» //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии . 2006. - 1- С.9 - 14.
3. Cooper, R., Kaufman, J. Ward, R. Race and Genomics // New England Journal of Medicine. - 2003. - 348 (12) - P.1166-1169.
4. Lohmueller K.E., Pearce C.L., Pike M., Lander E.S., Hirschhorn J.N. Metaanalysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease // Nat Genet. 2003. - 33. - P. 177-182.
5. Herrmann S.M., Whatling C., Brand E., Nikaud V., Garipey J., Simon A., Evans A., Ruidavets L.B., Arveiler D., Luc G., Tiret L., Henney A., Cambien F. Polymorphisms of the human matrix Gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2000.– 20.– P. 2386-2393.
6. Farzaneh-Far A., Davies J.D., Braam L.A., Spronk H.M., Proudfoot D., Chan S.W., O'Shaughnessy K.M., Weissberg P.L., Vermeer C., Shanahan C.M. A Polymorphism of the human matrix γ -carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels // J. Biol. Chem.– 2001.– 276.– P. 32466–32473.
7. Kobayashi N., Kitazawa R., Maeda S., Schurgers L.J., Kitazawa S. T-138C polymorphism of matrix Gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification // Kobe J. Med. Sci.– 2004.– 50.– P. 69-81.
8. Brancaccio D., Biondi M.L., Gallieni M., Turri O., Galassi A., Cecchini F., Russo D., Andreucci V., Cozzolino M. Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients // Am. J. Nephrol.– 2005.– 25.– P. 548-552.

9. Taylor B.C., Schreiner P.J., Doherty T.M., Fornage M., Carr J.J., Sidney S. Matrix Gla protein and osteopontin genetic associations with coronary artery calcification and bone density: the CARDIA study // *Hum. Genet.*– 2005.– 116.- P. 525-528.
10. Crosier M.D., Booth S.L., Peter I., Dawson-Hughes B., Price P.A., O'Donnell C.J., Hoffmann U., Williamson M.K., Ordovas J.M. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*– 2009.– 55.– P. 59-65.
11. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2000.- V.20.- P. 317-327.
12. Price P.A., Williamson M.K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein // *J. Biol. Chem.*– 1985.– V. 260.– P. 14971-14975.
13. Cancela L., Hsieh C.-L., Franck U., Price P.A. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene // *J. Biol. Chem.*– 1990.– V. 265.– P. 15040-15048.
14. Gao B., Yasui T., Itoh Y., Tozawa K., Hayashi Y., Kohri K. A polymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stones // *J. Urol.*– 2007.– V. 177.– P. 2361-2365.
15. Tsukamoto K., Orimo H., Hosoi T., Miyao M., Yoshida H., Watanabe S., Suzuki T., Emi M. Association of bone mineral density with polymorphism of the human matrix Gla protein locus in elderly women // *J. Bone Miner. Metab.*– 2000.–V. 18.– P. 27-30.
16. Kim J.G., Ku S.Y., Lee D.O., Jee B.C., Suh C.S., Kim S.H., Choi Y.M., Moon S.Y. Relationship of osteocalcin and matrix Gla protein gene polymorphisms to serum osteocalcin levels and bone mineral density in postmenopausal Korean women // *Menopause*– 2006.– V. 13.– P. 467-473.
17. Hirano H., Ezura Y., Ishiyama N., Yamaguchi M., Nasu I., Yoshida H., Suzuki T., Hosoi T., Emi M. Association of natural tooth loss with genetic variation at the

- human matrix Gla protein locus in elderly women // *J. Hum. Genet.*– 2003.–V. 48.– P. 288-292.
18. Lian J.B., Skinner M., Glimcher M.J., Gallop P. The presence of γ -carboxyglutamic acid in the proteins associated with ectopic calcification // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 1976.– V. 73.– P. 349-356.
19. Shanahan C.M., Weissberg P.L., Metcalfe J.C. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells // *Circ. Res.*–1993.– V 73.– P. 193-204.
20. Shanahan C.M., Proudfoot D., Tyson K.L., Cary N. R. B., Edmonds M., Weissberg P. L. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification // *Z. Kardiol.*– 2000.– V. 89, Suppl. 2.– P. II/63-II/68.
21. Spronk H.M., Soute B.A., Schurgers L.J., Cleutjens J.P., Thijssen H.H., De Mey J.G., Vermeer C. Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2001.– V. 289.– P. 485-490.
22. Yang H., Curinga G., Giachelli C.M. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro // *Kidney Int.*– 2004.– V. 66.– P. 2293-2299.
23. Farzaneh-Far A., Weissberg P.L., Proudfoot D., Shanahan C.M. Transcriptional regulation of matrix gla protein // *Z. Kardiol.*– 2001.– V. 90, Suppl. 3.– P. 38-42.
24. Bostrom K., Watson K.E., Horn S., Wortham C., Herman I.M., Demer L.L. Bone morphogenetic expression in human atherosclerotic lesions // *J. Clin. Invest.*– 1993.– V.91.– P. 1800-1809.
25. Jeziorska M., McCollum C., Wooley D.E. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries // *Virchows Arch.*– 1998.– V.433.– P. 559-565.
26. Bobryshev Y.V. Calcification of elastic fibers in human atherosclerotic plaque // *Atherosclerosis.*– 2005.– V.180.– P. 293–303.

27. Козулин В.Ю. Современное состояние проблемы лечения острого коронарного синдрома // Вестник Санкт-петербургского университета. Сер. 11. 2008. Вып. 4. С. 7 – 18
28. Пархоменко А.Н., Лутай Я.М.. Новые аспекты патогенеза и лечения больных с нестабильной стенокардией и мелкоочаговым инфарктом миокарда // Український медичний часопис – №4 (18) – VII/VIII 2000. - С 17-26.
29. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, et al. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;105:1760–1763.
30. Амосова К.М., Ковганич Т.О., Тер-Вартаньян С.Х.. Системна склеродермія і атеросклероз // Український ревматологічний журнал № 1 (27).- 2007. – с14-29.
31. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;107: 2109–2114
32. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KAA, et al. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2002;23:1809–1840.
33. Sonia S. Anand, Shofiqul Islam, Annika Rosengren. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study // *European Heart Journal* (2008) 29, 932–940.
34. Braam L.A., Dissel P., Gijbbers B.L., Spronk H.M.H., Hamulyak K., Soute B.A.M., Debie W., Vermeer C. Assay for human matrix Gla protein in serum. Potential applications in the cardiovascular field // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*–2000.– 20.– P. 1257-1261.
35. Jono S., Vermeer C., Dissel P., Hasegawa K., Shioi A., Taniwaki H., Kizu A., Nishizawa Y., Saito S. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography // *Thromb. Haemost.*– 2004.– 91.- P. 790-794.

36. O'Donnell C.J., Kyla Shea M., Price P.A., Gagnon D.R., Wilson P.W.F., Larson M.G., Kiel D.P., Hoffmann U., Ferencik M., Clouse M.E., Williamson M.K., Cupples L.A., Dawson-Hughes B., Booth S.L. Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification) // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2006.- 26.- P. 2769-2774.
37. Скворцова В.И., Лимборская С.А., Сломинский П.А., Кольцова Е.А., Шетова И.М.. Роль полиморфных вариантов генов ренин-ангиотензиновой системы, эндотелиальной NO-синтазы и p53 в развитии основных факторов риска сосудистой патологии головного мозга и в формировании инфаркта мозга // *Consilium Medicum* Том 05/N 5/2003, с. 12-27
38. Доменико Джирелли, Карла Руссо, Паоло Феррарези. // Полиморфизм гена фактора свертывания VII и риск инфаркта миокарда у больных с ишемической болезнью сердца // *Международный Медицинский Журнал* »» 1 / 2001, с 42-51.
39. Pia Riestra, Alicia Garcia-Anguita, Enrique Viturro. Influence of the leptin G-2548A polymorphism on leptin levels and anthropometric measurements in healthy Spanish adolescents // *Annals of Human Genetics* Volume 74, Issue 4, pages 335–339, July 2010.