

УДК: 616.12:575.113.2+577.152.1

КП

№ держреєстрації 0115U000688

Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет
(СумДУ)

40007, Україна, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, тел. (0542) 33 41 08

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи

д.ф-м.н., професор

_____ А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

«Зв'язок алельного поліморфізму “генів ектопічної кальцифікації” з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень»
(проміжний)

Начальник НДЧ,
к.ф-м.н., снс

Д.І. Курбатов

Керівник НДР,
д.мед.н., професор

О.В. Атаман

2016

Рукопис закінчено 17 грудня 2016 року

Результати роботи розглянуто науковою радою,

протокол від 2016.12.23, № 4

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, д.мед.н., професор, завідувач кафедри фізіології і патофізіології	2016.12.17	О.В.Атаман (вступ, розділ 1)
Професор кафедри фізіології і патофізіології , д.б.н	2016.12.17	В.Ю.Гарбузова (розділи, 4.1, 4.2)
Асистент кафедри фізіології і патофізіології, к.б.н	2016.12.17	О.А. Обухова (розділ 4.3, 4.4)
Аспірант медичного інституту	2016.12.17	Є.І. Дубовик (розділ 4.5, 4.6)
Студентка медичного інституту	2016.12.17	В.А. Сухарева (розділ 2)
Студентка медичного інституту	2016.12.17	Є.А. Гарбузова (розділи 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 94 с., 14 рис., 32 табл., 152 джерел.

Об'єкт дослідження – молекулярно-генетичні механізми розвитку патологічних процесів і хвороб людини.

Мета роботи – встановлення зв'язків між однонуклеотидними поліморфізмами "генів ектопічної кальцифікації" і розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень.

Методи дослідження – полімеразна ланцюгова реакція з наступним аналізом довжин рестрикційних фрагментів.

Уперше досліджено розподіл алелів та генотипів за поліморфізмами генів MGP та ENPP1 у практично здорових осіб та хворих із ГКС в українській популяції. Уперше проаналізовано зв'язок поліморфізмів генів інгібіторів та активаторів ектопічної кальцифікації з ГКС у пацієнтів з різними величинами індексу маси тіла (ІМТ). У пацієнтів з ІМТ < 25 кг/м², носіїв мінорного алеля, гострий коронарний синдром виникає в 3,9 (K121Q поліморфізм гена ENPP1). Уперше одержано дані про зв'язок K121Q поліморфізму гена ENPP1 із порушеннями ліпідного обміну та гіперкоагуляцією крові у пацієнтів із ГКС. У хворих із ГКС, які мають К/К генотип, виявлені порушення ліпідного спектра плазми крові та коагуляції крові, що свідчать про більшу схильність як до розвитку атеросклерозу, так і до його ускладнень. Встановлення такого зв'язку дасть змогу в майбутньому прогнозувати ризик виникнення і розвитку склеротичних уражень судин та їх тяжких наслідків і на цій основі пропонувати та застосовувати сучасні методи профілактики та лікування в осіб, що мають спадково зумовлену схильність до судинної патології. Наукові результати будуть доповнювати банк даних про поширеність різних видів поліморфізму генів серед населення України та зв'язок цього явища з виникненням патологічних процесів та хвороб.

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ, ГЕН, MGP, ENPP1, СЕРЦЕВО-СУДИННІ ЗАХВОРЮВАННЯ, ШЕМИЧНИЙ АТЕРОТРОМБОТИЧНИЙ ІНСУЛЬТ.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів.	5
Передмова.	6
Вступ.	7
1 Огляд літератури з питання ролі алельного поліморфізму генів <i>MGP</i> і <i>ENPP1</i> у розвитку серцево-судинних захворювань	
1.1 Сучасні уявлення про участь кальцифікації атеросклеротичної бляшки у розвитку гострого коронарного синдрому.	11
1.2 Властивості білку <i>MGP</i> та структура його гена.	19
1.3 Роль генетичних чинників гена <i>ENPP1</i> у механізмах звапніння судин	21
2 Характеристика біологічного матеріалу дослідження	27
3 Методика проведення полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів.	33
4 Алельний поліморфізм генів <i>MGP</i> , <i>ENPP1</i>	
4.1 Поліморфізми гена <i>MGP</i> у хворих з ГКС і в контрольній групі.	41
4.2 Частота алельних варіантів <i>MGP</i> -гена у хворих на ГКС (поліморфізм <i>G-7A</i>).	42
4.3 Поліморфізм <i>T-138C</i> гена <i>MGP</i> у групі практично здорових донорів.	44
4.4 Вплив алельного поліморфізму <i>K121Q</i> гена <i>ENPP1</i> на розвиток гострого коронарного синдрому.	47
4.5 Аналіз зі статтю алельного поліморфізму <i>K121Q</i> гена <i>ENPP1</i> на розвиток гострого коронарного синдрому.	49
4.6 Вплив алельного поліморфізму <i>K121Q</i> гена <i>ENPP1</i> на розвиток гострого коронарного синдрому з різними фактора ризику.	54
Висновки.	76
Перелік посилань.	77

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АГ – артеріальна гіпертензія

АТ – артеріальний тиск

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

ГП – гострий ішемічний інсульт

ГКК – гіперкоагуляція крові

ГКС – гострий коронарний синдром

ГМК – гладкі м'язові клітини

ДАТ – діастолічний артеріальний тиск

ДАХ – дисліпідемія атерогенного характеру

ІАТІ – ішемічний атеротромботичний інсульт

ІМТ – індекс маси тіла

ІХС – ішемічна хвороба серця

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

ПАТ – пульсовий артеріальний тиск

РРі – неорганічний пірофосфат

САТ – систолічний артеріальний тиск

СрАТ – середній артеріальний тиск

ПЕРЕДМОВА

Проблема походження і механізмів розвитку склеротичних уражень кровоносних судин – основної причини смертельно небезпечних ускладнень: гострого коронарного синдрому (ГКС) та ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТІ) – посідає одне з перших місць серед наукових проблем як клінічної, так і експериментальної медицини. Причиною цього є велика поширеність та смертність від серцево-судинних недуг у високорозвинених країнах світу загалом і в Україні зокрема.

Хоча за останні кілька десятиріч смертність від артеріосклерозу істотно зменшилася, його ускладнення все ще посідають перше місце серед причин летальності в економічно розвинених країнах світу. Не є винятком і Україна, де на серцево-судинні недуги, зумовлені артеріосклерозом, припадає понад 60 % усіх смертей.

Такий стан проблеми спонукає дослідників проникати все глибше і глибше в патогенетичні механізми склерозування судин, вивчати їх не лише на традиційних – тканинному й клітинному, а й на молекулярному та молекулярно-генетичному рівнях.

Дослідження в цьому напрямі проводяться і в Україні. Їхнім центром є Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України та Інститут кардіології ім. М.Д.Стражеска АМН України. Так, у цих наукових закладах досліджується роль поліморфізму генів, що кодують ряд ферментів (NO-синтазу, конвертазу, металопротеїнази та ін.) та важливих білків-регуляторів, у розвитку гострого коронарного синдрому, артеріальної гіпертензії та інших серцево-судинних хвороб. На відміну від цих досліджень у роботі, що проведена, вивчено поліморфізм гена, причетного до розвитку кальцифікації судинної стінки – важливого компоненту атеросклеротичних уражень і артеріосклерозу Менкеберга.

ВСТУП

Вивчення захворювань серцево-судинної системи було й залишається одним із актуальних питань сучасної теоретичної та практичної медицини. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, за 1 рік від хвороб серця і судин помирає понад 17 мільйонів осіб. У Європі гострий інфаркт міокарда є причиною смерті кожного шостого чоловіка і кожної сьомої жінки. Прикра статистика свідчить, що сьогодні Україна посідає перше місце серед країн Європи за рівнем смертності від хвороб серця та судин. Цей показник у нашій державі перевищує у 2,5 рази показники європейських країн. За даними Державної служби статистики в Україні 65,8 % смертей припадає на захворювання серцево-судинної системи [1], хворобами системи кровообігу страждають 25,9 млн осіб, із них 9,3 млн – працездатного віку [2]. За останні 25 років поширеність серцево-судинних хвороб серед населення країни зросла у 3 рази, а рівень смертності від них збільшився на 45 %. Очевидно, що традиційні підходи у діагностиці та лікуванні серцево-судинних захворювань є неефективними. Тому зусилля світової наукової спільноти сьогодні спрямовані на пошук нових сучасних засобів прогнозування, профілактики, діагностики та лікування цих хвороб. Вивчення механізмів патогенезу кардіоваскулярних патологій на молекулярному та молекулярно-генетичному рівнях дозволить скласти цілісну уяву про механізми їх формування та відкриє нові шляхи для дослідження ефективних засобів їх фармакологічної корекції. Патолофізіологічною основою більшості серцево-судинних хвороб є атеросклеротичний процес [3]. Одним із найтяжчих ускладнень атеросклерозу вважають гострий коронарний синдром (ГКС) – період вираженого загострення ішемічної хвороби серця, до якого відносять такі нозологічні одиниці, як нестабільну стенокардію, дрібновогнищевий (без зубця Q) інфаркт міокарда, великовогнищевий (із зубцем Q) інфаркт міокарда та раптову коронарну смерть [4, 5]. Розвиток останніх зумовлений гострим або підгострим первинним зменшенням постачання міокарда киснем, що спричиняється розривом або ерозією атеросклеротичної бляшки, асоційованим із запаленням,

стійким або нестійким тромбозом вінцевої артерії, вазоконстрикцією та мікроемболізацією [6]. Кальцифікація атеросклеротичної бляшки є одним із несприятливих ускладнень, що призводить до звуження просвіту артерії та розвитку критичної ішемії серця і дестабілізації бляшки. Саме нестабільність бляшки в коронарних артеріях спричиняє розвиток прогресуючої нестабільної стенокардії та інфаркту міокарда. Численними дослідженнями доведено, що розвиток гострих коронарних явищ із руйнуванням атеросклеротичної бляшки у 70–80 % випадків відбувається на тлі кальцифікації коронарних артерій [7, 8]. На сьогодні показник кальцифікації коронарних судин є достовірною прогностичною передумовою розвитку кардіоваскулярних явищ і кардіальної смертності [9, 10]. Доведено, що мінімальне підвищення інтенсивності кальцифікації співвідноситься із дворазовим підвищенням ймовірності серцево-судинних явищ та смертності [11]. 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 [12]. Кількість PPi у судинній стінці визначається дією 3 основних ферментів: два з яких – 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 [13–18]. Активність цих ферментів може залежати від багатьох факторів, зокрема й від структури генів, що кодують відповідні білки. Доведено, що порушення утворення або посиленій гідроліз PPi можуть бути зумовлені генетичними аномаліями. 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. Неспростовні докази того, що відкритий наприкінці 80-х років минулого сторіччя MGP є потужним антикальциногенним чинником, добуто за допомогою новітньої методики генетичного нокауту. Так, було встановлено, що у мишей, позбавлених гена MGP (MGP $-/-$ миші), закономірно розвивається медіакальциноз, який, як правило, завершується аневризмою аорти, розрив якої призводить до смерті тварин [2].

У великій кількості праць удалося з'ясувати фактори, причетні до регуляції експресії гена MGP, і виявити можливі механізми, через які реалізують себе антикальциногенні властивості відповідного білка. Це дало підстави вести мову про функціональну систему MGP, до якої можуть бути зараховані, крім самого протеїну, такі чинники, як рецептор вітаміну D (VDR), ферменти, що беруть участь у біохімічних перетвореннях MGP, – вітамін К-оксидоредуктаза (VKOR) і γ -глутамілкарбоксилаза (GGCX).

Із впровадженням методів молекулярної генетики в медичну практику стало можливим вивчення генетичних маркерів, які обумовлюють виникнення тих чи інших мультифакторіальних хвороб, що має велике значення не тільки для визначення спадкової схильності до них, а й для вибору метода лікування, прогнозу розвитку ускладнень. Успіхами світової наукової спільноти сьогодні накопичена значна кількість даних про участь різних поліморфних генів у формування схильності до мультифакторної патології [1].

Ефективна діяльність цієї системи може залежати від багатьох факторів, серед яких поліморфізм генів, що кодують структуру відповідних білків. Останнім часом цей аспект проблеми привертає все більшу і більшу увагу, про що свідчить значна кількість праць, присвячених зв'язкам молекулярно-генетичних чинників із розвитком патологічних процесів та хвороб у людини. Проте комплексні дослідження, у яких би вивчалася роль генетичного поліморфізму MGP і пов'язаних із ним протеїнів у розвитку серцево-судинних недуг, до цього часу не проводилися. З огляду на це ми поставили за мету вивчити зв'язок цілого ряду одонуклеотидних поліморфізмів генів системи MGP з такими тяжкими ускладненнями артеріосклерозу, як гострий коронарний синдром та ішемічний атеротромботичний інсульт.

Крім того, важливим, на наш погляд, було з'ясувати, яким чином пригнічення функціонування MGP впливає на стан судинної стінки в умовах дії на неї патогенних факторів, що індукують кальцифікацію артерій і зумовлюють розвиток артеріосклерозу Менкеберга.

Дослідженнями ВООЗ показано, що традиційні підходи в терапії цих та інших поширених мультифакторних хвороб малоефективні і ведуть до суттєвих економічних витрат. Проблема низької ефективності лікувально-профілактичних заходів пов'язана з відсутністю їхньої етіологічної спрямованості внаслідок недостатнього розуміння провідних механізмів формування переважної більшості мультифакторних хвороб [1].

Виконання проекту може в перспективі мати важливе практичне значення, оскільки на підставі даних вивчення геному можна буде прогнозувати ризик розвитку серцево-судинних хвороб та їхніх ускладнень і на цій основі пропонувати засоби ефективної профілактики, а в разі виникнення недуг – адекватні методи їх лікування, що поліпшить якість життя і його тривалість у населення України. Здобутий у дослідженні науковий матеріал може скласти основу розділів підручників та навчальних посібників, у яких викладаються молекулярно-генетичні механізми розвитку патологічних процесів і хвороб.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ З ПИТАННЯ РОЛІ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ *MGP* І *ENPP1* У РОЗВИТКУ СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ЗАХВОРИЮВАНЬ

1.1. Сучасні уявлення про участь кальцифікації атеросклеротичної бляшки у розвитку гострого коронарного синдрому

Гострий коронарний синдром (ГКС) – загострення стабільного перебігу ішемічної хвороби серця, сукупність патологічних реакцій, що клінічно проявляються розвитком інфаркту міокарда з чи без підвищення сегмента ST, нестабільною стенокардією або раптовою коронарною смертю [4, 5]. Найбільш частою причиною розвитку ГКС є тромбоз коронарних артерій, який виникає в місці розриву атеросклеротичної бляшки [19, 20]. Атеросклеротична бляшка (АБ) є основним компонентом атеросклеротичного процесу. В її структурі виділяють ядро й зовнішню оболонку (покришку). Ядро атеросклеротичної бляшки містить ліпіди – вільний холестерол, його ефіри та ближче до периферії – «опасисті» клітини. Після того як макрофаги доставляють ліпіди до ядра бляшки, вони руйнуються, ліпіди виходять із них, збільшуючи розмір ядра. Зовнішня оболонка – ділянка бляшки, що виступає в просвіт артерії, являє собою фіброзний утвір і багата на колаген I типу та еластин. Стійкість покришки визначається її екстрацелюлярним матриксом та його компонентами – колагеном і еластином, що утворюються гладком'язовими клітинами. У стабільній фазі атеросклеротичного процесу оболонка бляшки здатна витримувати значне розтягнення без розриву, у нестабільній фазі – стає схильною до розриву. Ділянки оболонки бляшки, що переходять на незмінену стінку артерій, називаються плечовою ділянкою бляшки. Це найтонші ділянки покришки, і тому вони найбільш уразливі. Як правило, розрив атеросклеротичної бляшки в нестабільній фазі відбувається саме в цій ділянці. Основними патогенетичними факторами нестабільного перебігу атеросклеротичної бляшки є її ерозії, тріщини, надриви, розриви; судинний спазм; висока активність металопротеїназ, що виділяються активованими макрофагами та ушкоджують фібринозну оболонку бляшки; запалення;

тромбоз. Одним із ускладнень атеросклерозу сьогодні вважають процес її кальцифікації – атерокальциноз. Кількість коронарного кальцію корелює з тяжкістю атеросклерозу у різних пацієнтів, а також з ураженням різних сегментів артерій вінцевого русла в одного й того самого індивідуума [21]. Всупереч загальноприйнятій думці доведено, що кальциноз не є пізнім проявом атеросклерозу [22]. Більшість атеросклеротичних бляшок містять мікро- та макрокальцинати, при цьому невеликі відкладення кальцію спостерігаються вже на ранніх стадіях атеросклеротичного процесу [23]. Доведено, що кальцифікація атеросклеротичної бляшки починається ще на стадії формування ліпідних смуг уже на другому десятилітті життя. Тому сьогодні оцінювання коронарного кальцинозу є методикою раннього виявлення атеросклерозу артерій [24]. Сьогодні існує дві точки зору щодо значення процесу кальцифікації у патогенезі атеросклерозу. Прихильники першої вважають, що кальцифікація є несприятливою прогностичною ознакою ускладнення атеросклеротичного процесу. За даними С. R. Becker (2002), ризик можливих серцевих ускладнень вищий у пацієнтів із коронарокальцинозом [25]. Згідно з М. Vláha (2009) навіть мінімальне зростання рівня кальцифікації співвідноситься з двократним збільшенням ймовірності серцево-судинних захворювань та смертності [11]. F. Otsuka та A. V. Finn установили, що ділянки з'єднання кальцинованих і некальцинованих частин бляшки внаслідок різної жорсткості є дуже чутливими до підвищень артеріального тиску й до розриву [26]. У дослідженні Т. О. Севергіної виявлено певну кореляцію між звапнінням нестабільних атеросклеротичних бляшок вінцевих артерій та розвитком гострого коронарного синдрому. Згідно з одержаними даними незначний ступінь кальцифікації АБ характерний для пацієнтів із ГКС, тоді як АБ із вираженим звапнінням асоціювалися з хронічною серцево-судинною патологією. Разом із тим наявність самих вогнищ кальцифікації у вінцевих артеріях у пацієнтів старше 60 років віднесено до факторів ризику розвитку ГКС [27]. Згідно з патоморфологічними дослідженнями В. С. Жданова та співавт., одержаними в результаті ендартеректомії під час проведення операцій аортокоронарного шунтування, кальциноз вінцевих артерій виявлено у 92 %

спостережень. Морфологічні ознаки нестабільності АБ при хронічній формі ішемічної хвороби серця (ІХС) відзначені у 23,3 % спостережень, причому в 2/3 випадків вони були пов'язані з кальцинозом пластинчастого типу [28]. Прихильники другої точки зору вважають, що кальцифікація відіграє роль захисного механізму, підсилюючи міцність атеросклеротичних бляшок, схильних до розривів. За даними Н. В. Гагаріної та співавт., бляшка, що має щільну кальциновану покривку, майже у 5 разів більш стійка, ніж нормальна судинна стінка або «м'яка» бляшка, і набагато більш резистентна до розривів [29]. Деякі клінічні спостереження свідчать про те, що бляшки, пов'язані з розвитком ГКС, як правило, менш кальциновані, і що кальцій надає бляшкам стійкості [30, 31]. На тлі численних досліджень про погіршення прогнозу та збільшення ризику серцево-судинних ускладнень при зростанні індексу коронарного кальцію точка зору про захисний вплив кальцинозу може здатися парадоксальною [32]. Проте необхідно зауважити, що кальцифікація АБ не є обов'язковою причиною гострої події, а ступінь звапнення вінцевих артерій є перш за все маркером атеросклерозу і свідчить про більш виражене ураження атеросклеротичним процесом судинної стінки. Наявність кальцифікації асоціюється з різким зростанням серцево-судинного ризику незалежно від його стандартних факторів ризику [8]. При поширеному звапненні судинного русла існує висока ймовірність наявності нестабільних бляшок, схильних до розриву [33, 34].

За даними сучасної судинної біології, відкладення кальцієвих депозитів в артеріальній стінці розглядається як активний регульований процес, подібний до формування кісткової тканини [35]. Кальцифікація інтими (атеросклеротичної бляшки) схожа з процесом енхондрального скостеніння на відміну від кальцифікації медії, що нагадує інтрамембранозний остеогенез [36, 37]. Останніми роками досягнуто значного прогресу у вивченні клітинних аспектів атерогенезу. Це стосується в першу чергу появи нових даних про участь в атерогенезі кістковомозкових стовбурових клітин як гемопоетичної, так і стромальної ліній диференціації. Ці дані дозволили припустити, що остеобласто- та остеокластоподібні клітини, які проліферують в

атеросклеротичній бляшці, швидше за все, мають кістковомозкову природу. Проникнення в інтиму в місцях концентрації ліпідів стовбурових клітин гемопоетичної та стромальної ліній диференціювання є важливим моментом у розвитку атеросклерозу [38, 39]. До основних чинників, здатних спричиняти кальцифікацію атеросклеротичної бляшки, відносять запалення, оксидаційний стрес та активацію ренін-ангіотензин-альдостеронової системи. Розвиток запального процесу атеросклеротичної бляшки є невід'ємною складовою її розвитку і важливим фактором нестабільності. Про запалення атеросклеротичної бляшки свідчать її інфільтрація макрофагами, велика кількість Т-лімфоцитів [20], виявлення опасистих клітин і нейтрофілів. Запалення впливає на розвиток кальцифікації атеросклеротичної бляшки через виділення макрофагами прозапальних цитокінів: інтерлейкіну-2 (IL-2), інтерлейкіну-1 β (IL-1 β) [40, 41] та фактора некрозу пухлин – α (TNF- α) [41, 42] (рис. 1.1). Оксидаційний стрес активує кальцифікацію через ушкоджувальний вплив на судинну стінку активних форм кисню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окиснених ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) [36, 41, 43]. Не менш важливу роль у патогенезі атеросклерозу і розвитку звапніння інтими судин відіграє активація ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС). Серед компонентів РААС ангіотензин II (АГII) є основним атерогенним агентом [44]. Він не лише регулює експресію молекул адгезії (VCAM-1, ICAM-1, P-selectin), секрецію цитокінів і факторів росту судинної стінки, а й сприяє накопиченню в атеросклеротичній бляшці моноцитів, лімфоцитів, TNF- α , IL-6 і циклоксигенази-2. Процес кальцифікації атеросклеротичної бляшки розпочинається з того, що прозапальні цитокіни, продукти вільнорадикального окиснення та активований АГII, діючи на фібробласти, стимулюють утворення й секрецію ними кісткового морфогенетичного протеїну-2 (BMP-2). BMP-2 – представник сімейства кісткових морфогенетичних протеїнів, що належить до групи факторів росту. Його роль у звапнінні пов'язана зі здатністю активувати остеобласт-специфічний фактор транскрипції – Runx 2/Cbfa 1 (runt-related transcription factor 2/core-binding factor 1), який запускає хондрогенний шлях диференціації

мезенхімальних клітин і утворення подібних до хондроцитів/остеобластів кальцифікуючих судинних клітин (CVCs) [36, 37, 41, 45]. У дослідженнях G. Karsenty описаний посилений синтез Runx 2/Cbfa 1 за 2–3 доби до початку кальцифікації. Автор припустив два механізми розв'язання цього питання: або Runx 2/Cbfa 1 контролює експресію інших факторів транскрипції, або Runx 2/Cbfa 1 гальмується посттрансляційними факторами [46]. Alexei Y. Savinov та ін. у своїй роботі зазначають, що гіперекспресія тканинної неспецифічної лужної фосфатази, про яку мова піде далі, значно підвищує активацію Runx2/Cbfa1 [47]. Активований Runx 2/Cbfa 1 діє на остеобластоподібні клітини ендотелію [48] й активує експресію генів, що кодують білки кісткової/хрящової тканини: колагену типу I, остеокальцину, остеопонтину, матриксної металопротеази 1, кісткового сіалопротеїну, лужної фосфатази, RANKL (receptor activator of nuclear Factor kappa-B ligand), рецептора TGF- β (transforming growth factor - beta) [49].

Крім того, BMP-2 може активувати ще один важливий фактор транскрипції Dlx 5 (Distal-less 5), що сприяє утворенню регулятора транскрипції – фактора Osterix, якому належить важлива роль у диференціюванні остеобластоподібних клітин. Osterix активує експресію генів колагену типу I, остеокальцину, остеопонтину, остеоонектину. За даними деяких авторів, Osterix може також активувати експресію Runx 2/Cbfa 1 [50, 51]. Дослідженнями K. A. Hruska et al. та K. Nakashima et al. доведено, що підвищення рівня лужної фосфатази в позаклітинному середовищі, пов'язане зі зростанням експресії Osterix, що створює додаткові умови для посилення кальцифікації [45, 52]. Згідно із сучасними уявленнями, необхідною умовою ініціації кальцифікації судинної стінки є порушення балансу між про- і антикальциногенними факторами. Останніми роками досягнуті значні успіхи у вивченні молекулярно-генетичних механізмів реалізації ролі цих чинників у звапнінні судин. Важливе значення у регуляції судинної кальцифікації належить системі RANKL/RANK/OPG. OPG (остеопротегерин) – білок, що продукується остеобластами і належить до сімейства TNF- α -рецепторів (receptor activator of nuclear factor kappa-B – RANK) [36, 53, 54]. OPG

вважається розчинною формою, своєрідною «приманкою», рецептора активатора ядерного фактора каппа-В (receptor activator of nuclear factor kappa-B – RANK), саме тому він зв'язує та інгібує цитокіни сімейства TNF- α (RANKL), таким чином запобігаючи їх взаємодії із RANK клітин. Взаємодія RANKL із рецептором RANK клітинпрогеніторів кісткової тканини є важливою умовою їх диференціації в остеокласти. Збільшення у тканині вмісту OPG призводить до порушення цього процесу, зменшення утворення остеокластів у кістках, зростання інтенсивності мінералізації. У судинній стінці RANKL відіграє роль прокальциногенного цитокіну, значно посилюючи кальцифікацію її структур [54, 55]. Тому активація RANKL-рецепторів вважається необхідною умовою кальцифікації атеросклеротичної бляшки [56]. OPG конкурентно зв'язує в судинах RANKL і тому чинить опосередкований інгібіторний вплив на кальцифікацію [57]. Імунореактивні OPG і RANKL виявляються у судинній стінці вже на ранніх етапах атеросклеротичних змін. У сформованих осередках кальцифікації OPG знаходиться по краях, а RANKL – у місцях відкладення кальцію [54]. За даними S. Jono et al., підвищений рівень OPG у сироватці крові корелює з наявністю й тяжкістю ураження коронарних артерій [58]. Показаний прямий зв'язок між рівнем OPG і серцево-судинною смертністю літніх жінок [59]. M. Schorpet et al. виявили OPG в неоінтимі навколо скупчення пінистих клітин і вогнищ кальцифікації, що були наявні приблизно в 15 % зразків атеросклеротичних бляшок із каротидних артерій і серцевих клапанів. [60]. Деякі автори не виключають позитивного впливу OPG на судинну стінку незалежно від RANKL за рахунок збільшення виживання ендотеліальних клітин, що сприяє захисту судинної стінки від пошкодження [61, 62]. Одним із важливих антикальциногенних факторів є матриксний Глабілок – MGP. В артеріальній стінці MGP синтезується гладком'язовими клітинами (ГМК) медії та інтими, а в місцях атеросклеротичних уражень – і макрофагами [63]. Антикальциногенна активність білка виявляється лише після попереднього γ -карбоксилювання деяких залишків глутамінової кислоти за участі залежного від вітаміну К ферменту γ -глутамінкарбоксилази [64, 65]. Доведено, що у мишей із генетично зумовленим дефіцитом MGP активується

ендохондральний механізм осифікації судин і розвивається масивна кальцифікація артерій [66]. Провідним механізмом антикальциногенної дії MGP є його здатність зв'язувати BMP-2, тим самим пригнічуючи диференціювання мезенхімних клітин у клітини остеогенної лінії [67]. За рахунок своїх хелаторних властивостей MGP може зв'язувати іони кальцію у середовищі, отже, зменшувати інтенсивність його відкладання та стабілізувати фібрили еластину [68, 69]. Наявність Gla-вмісних білків у судинній стінці було вперше доведено J. V. Lian et al. [70], які виділили амінокислоту Gla з лужних гідролізатів кальцифікованих атероматозних бляшок аорти людини. У гідролізатах неуражених судин і в не ускладнених кальцинозом атеросклеротичних бляшках Gla не виявляли, що дало підстави для висновку про тісний зв'язок між Gla-вмісними білками та процесами ектопічної кальцифікації. Пізніше R. G Levy et al. [71] за допомогою EDTA- екстракції виділили з атеросклеротично змінених артерій білкову фракцію, що містить Gla. Низький рівень білків цієї фракції був характерний для жирових смужок і фіброзних бляшок, проте в кальцифікованих бляшках кількість їх була значною. Серед чинників, що захищають судинну стінку від звапніння важливе значення має матриксний адгезивний білок – остеопонтин (OPN). Механізми його інгібіторної дії пов'язані зі здатністю пригнічувати ріст кристалів гідроксіапатиту за рахунок взаємодії з ними аргінін-гліцин-аспартат-послідовностей білка [33, 72], активацією остеокластоподібних клітин судинної стінки [33], ацидифікацією позаклітинного матриксу за рахунок активації ферменту карбоангідрази II [33, 73]. Експериментально доведено, що у тварин з поєднаним дефіцитом OPN і MGP кальцифікація аорти розвивається швидше та інтенсивніше, ніж за умови відсутності одного MGP [74]. Важливим інгібітором судинної кальцифікації є неорганічний пірофосфат – PPi. Існує 2 механізми генерування PPi у судинній стінці. Перший із них – внутрішньоклітинний – пов'язаний із мембранним транспортним білком ANKH, що переміщує утворений усередині клітин PPi у позаклітинне середовище [12, 13, 75]. Другий, на думку більшості авторів, основний, механізм – позаклітинний – здійснюється за участі ектоферменту ENPP1

(ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1), який розщеплює позаклітинні нуклеозидтрифосфати, зокрема АТФ, з утворенням РРі [12, 75]. РРі є фізіологічним субстратом для тканинної неспецифічної лужної фосфатази (tissue nonspecific alkaline phosphatase – TNAP), локалізованої в мембранах мінералізувальних матриксних везикул (MMVs) і кальцифікуючих судинних клітин (CVCs). Цей ектофермент, гідролізуючи РРі, створює навколо високу концентрацію неорганічного фосфату (Pi), що істотно пришвидшує відкладення солей кальцію [12, 76, 77].

Ураховуючи це, можна стверджувати, що концентрація РРі в позаклітинному середовищі залежить від активності трьох ектоферментів: ENPP1, який генерує РРі, і TNAP [78], що його гідролізує, а також трансмембранного білка ANKH, який переміщує РРі у позаклітинний простір. Провідним шляхом, завдяки якому РРі чинить інгібіторний вплив на кальцифікацію, є порушення нуклеації та ріст кристалів оксіапатиту. Крім того, РРі здатний пригнічувати трансдиференціювання судинних ГМК у хондроцити та посилювати утворення остеопонтину [12]. К. Johnson et al. зазначили, що РРі відіграє роль у стабілізації фенотипу ГМК. Судинні ГМК, не здатні генерувати РРі, зазнають остео/хондрогенної метаплазії [79]. Зменшення рівня РРі у позаклітинному просторі через зміну ферментативної активності ENPP1 або дефіцит ANKH, спричиняє масивну кальцифікацію артерій. Така кальцифікація розвивається у мишей (NPP1-/mice) та людей із генетично зумовленим дефіцитом ENPP1, що клінічно виявляється спадковою хворобою – дитячою «ідіопатичною» кальцифікацією артерій [80, 81]. Також було доведено, що особи, які перебувають на хронічному гемодіалізі, мають знижений рівень у плазмі РРі і зазвичай артеріальну кальцифікацію [82]. Деякі науковці зазначають, що окиснені ЛПНЩ та оксистероли мають здатність посилювати ферментативну активність TNAP у стінці судин [83, 84]. Це безпосередньо призводить до того, що TNAP вивільнює неорганічний фосфат (Pi) із органічних фосфоровмісних сполук та гідролізує РРі, що сприяє розвитку кальцифікації. Якщо компенсаторне збільшення активності ENPP1 і ANKH-залежної секреції РРі не є адекватним підвищенню активності TNAP,

розвивається кальцифікація судинної стінки. Ураховуючи механізм регулювання PPI за участі білків ENPP1, ANKH і TNAP, подальші наші дослідження були спрямовані на вивчення асоціації поліморфізмів їх генів із розвитком гострого коронарного синдрому.

1.2 Властивості білку MGP та структура його гена

Матриксний Gla-протеїн (MGP) є представником групи залежних від вітаміну К білків, що містять залишки γ -карбоксиглютамінової кислоти (Gla). До цієї ж групи належать білки, що беруть участь у коагуляції крові: протромбін, фактори VII, IX і X, протеїни C, S і Z. Уперше білок MGP було виділено в 1983 році в лабораторії Price з екстрактів демінералізованого матриксу кісток биків [11]. Згодом було визначено первинну структуру MGP, основні хімічні характеристики, локалізацію гена MGP та його будову [12,13]. MGP утворюється в багатьох м'яких тканинах, зокрема в хрящах, серці, нирках, легенях, стінках кровоносних судин [9,14]. У кожній з цих тканин експресію MGP виявляли лише в окремих, специфічних для даного органа, типах клітин [14]. Здатність до синтезу MGP мають остеобласти, хондроцити, гладкі м'язові клітини (ГМК) судин, пневмоцити, клітини ниркового епітелію, фібробласти, макрофаги [9,14,15].

У тканинах серця і легень щурів рівень мРНК MGP у 10 разів, а в тканинах нирок – у 5 разів вищий, ніж у кістках. Натомість вміст самого MGP у цих тканинах у 40-500 разів нижчий, якщо порівнювати з кістками [14]. MGP акумулюється тільки в місцях кальцифікації, а більша його частина, синтезована в м'яких тканинах, надходить у плазму крові, де концентрація MGP складає від 0,3 до 1 мкг/мл залежно від виду тварин [9].

Молекула MGP людини (мол. маса 10 кДа) складається з 84 амінокислотних залишків, 5 з яких представлено γ -карбоксиглютаміновою кислотою (Gla) [9]. З кісток щурів виділено дві форми MGP, що мають 79 і 83 залишки, тобто в них бракує відповідно 5 і 1 амінокислот від С-кінця білкової молекули [15,16]. На відміну від усіх відомих сьогодні вітамін К-залежних

білків MGP не має форми пропептиду [15]. Щойно синтезована молекула MGP складається із 103 амінокислотних залишків (84 – це зрілий білок та 19 – трансмембранний сигнальний пептид).

Ген MGP у людини представлено однією копією, яка міститься в короткому плечі 12-ї хромосоми (12p12.3-13.1) [15]. У ньому заковано 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 [15]. Аналіз промоторної частини гена MGP показав, що поряд з типовими ТАТА і САТ-боксами, вона містить регуляторні послідовності (putative regulatory sequences), гомологічні раніше ідентифікованим елементам, що відповідають на дію гормонів і транскрипційних факторів (hormone and transcription factor responsive elements). Зокрема, окреслено дві ділянки промотора, що містять можливі сайти зв'язування рецепторів ретиноевої кислоти і вітаміну D [15].

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-138C (rs 1800802); (2) G-7A (rs 1800801); (3) Ala83Thr (rs 4236).

Поліморфізм T-138C стосується промоторної частини гена – ділянки, яка утворює комплекси з ядерними білками і сприймає їх регуляторні впливи; G-7A локалізований у початковому відрізку промотора, з якого стартує власне процес транскрипції; Thr83Ala – у четвертому екзоні, що кодує Gla-місткий домен. 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. Перше таке дослідження було проведено Herrmann et al. [17]. Автори показали, що поліморфізм G-7A не впливає на промоторну активність гена MGP, тимчасом як активність промотора з мінорним алелем -138C (патологічний варіант), при порівнянні з -138T (нормальним варіантом), була менша на 20% у ГМК судин щура і на 50% у культивованих фібробластах людини.

Зовсім інші дані було отримано у дослідженні Farzaneh et al. [18]. Автори встановили, що промотори з поліморфізмами G-7A і T-138C істотно змінюють транскрипційну активність гена MGP в судинних ГМК щурів *in vitro*. Так, варіант промотора з мінорним алелем -7A виявляв активність у 1,5 рази вищу, ніж -7G, а варіант -138C був у 4 рази активніший за -138T. Таким чином, неоднозначні дані щодо впливу різних видів поліморфізму гена MGP на його транскрипційну активність свідчать про складність проблеми і зумовлюють необхідність продовжувати дослідження в цьому напрямі.

1.3 Роль генетичних чинників гена *ENPP1* у механізмах звапніння судин

Доведена важлива роль генетичних чинників у розвитку кальцифікації судинної стінки. Тому вивчення поліморфізмів генів, що кодують білкиучасники (ENPP1, ANKH і TNAP) регуляції рівня позаклітинного неорганічного пірофосфату у тканинах, може мати важливе значення в розумінні механізмів патогенезу гострого коронарного синдрому. Ектонуклеотид пірофосфатаза/фосфодіестераза 1 (ENPP1) є одним із членів сімейства нуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази, що складається з ізоферментів зі структурно спорідненими каталітичними доменами. Всі члени сімейства пронумеровані від ENPP1 до ENPP7 відповідно до порядкового номера клонування. Лише три ферменти сімейства – ENPP1, ENPP2 і ENPP3 – здатні гідролізувати пірофосфатні та фосфодієфірні зв'язки [85]. ENPP1 – фермент, що має широку специфічність: проявляє свою пірофосфатазну активність шляхом розщеплення АТФ до АМФ із виділенням неорганічного пірофосфату (PPi), фосфодіестеразну активність – шляхом утворення АМФ із цАМФ [86, 87]. ENPP1 є гомодимерним трансмембранним білком, що міститься в плазматичних мембранах клітин і матричних везикулах. Білок ENPP1 людини складається з 925 амінокислотних залишків та має молекулярну масу приблизно 125 кДа [88, 89]. Протеїн зазнає посттрансляційної модифікації у вигляді аутофосфорилування як частини каталітичного циклу в активуванні

пірофосфатази/фосфодіестерази 1, а також глікозилювання N-кінця. Молекула білка ENPP1 складається з 5 частин: внутрішньоклітинного домену (із N-кінцевою спіраллю), двох соматомедин-B-подібних доменів і двох каталітичних позаклітинних доменів (фосфодіестеразоподібного і нуклеазоподібного) [85, 90, 91, 92, 93]. Внутрішньоклітинний домен містить аміногрупу і складається з 24–76 залишків. Більша частина домену знаходиться в мембрані, і лише незначна частина – у цитоплазмі. Це є специфічною особливістю 3 ферментів сімейства – ENPP1, ENPP2, ENPP3 – і відрізняє їх від інших членів, N-кінець яких розміщений поза клітиною [85, 94]. Два багатих на цистеїн соматомедин-B-подібних (SMB-1 і SMB-2) домени довжиною 40–50 амінокислотних залишків знаходяться між трансмембранним і каталітичним доменами. На думку Н. Zimmermann et al., таке розміщення SMB-доменів забезпечує стабілізацію молекули ENPP1 [95]. Свою каталітичну активність фермент виявляє у формі гомодимеру. Об'єднання відбувається за рахунок утворення дисульфідних містків між молекулами цистеїну SMB доменів двох мономерів ENPP1 [96, 97]. Необхідно зазначити, що досліджений K121Q поліморфізм міститься в домені SMB-2 білка ENPP1 [95]. Сьогодні не відомий можливий механізм зв'язку заміни лізину (K) на глутамін (Q) у 121-му положенні молекули з каталітичною активністю ферменту. Фосфодіестеразоподібний домен знаходиться між SMB-2 і нуклеазоподібним доменом і складається приблизно з 400 амінокислот. Фосфодіестеразна активність білка здійснюється шляхом утворення АМФ із цАМФ [90, 92]. Нуклеазоподібний домен містить карбоксильну групу, спрямовану в позаклітинне середовище. Довжина цього домена приблизно 250 амінокислот [96]. ENPP1 проявляє свою пірофосфатазну активність шляхом розщеплення АТФ до АМФ із виділенням неорганічного пірофосфату (PPi). С. Stefan et al. довели, що каталітичні домени ENPP1 мишей мають високу ідентичність із людськими ізоформами (до 60 % амінокислот) [85]. Ira D. Goldfine et al. зазначають, що каталітичні домени забезпечують розщеплення глюкозофосфатних, фосфосульфатних, пірофосфатних і фосфодіестеразних зв'язків [89]. Автори зазначають, що активний центр ферменту пірофосфатази і

фосфодіестерази містить залишок треоніну-204. Каталітична активність ENPP1 залежить від двовалентних катіонів та оптимальна при рН 9–10 [98]. Реакція, що здійснюється каталітичними доменами, відбувається двома етапами. Перший полягає в утворенні зв'язку між каталітичним сайтом треонін-204 і фосфатною групою субстрату. На другому етапі відбувається регенерація сайту треонін-204 із використанням молекули води і вивільненням фосфорильованого продукту. В результаті реакції аденозинтрифосфат (АТФ) гідролізується в будь-якому випадку до аденозинмонофосфату (АМФ) і неорганічного пірофосфату (PPi) або аденозиндифосфату (АДФ) і неорганічного фосфату (Pi) [85, 90, 99]. Білок ENPP1 експресується в епітеліальних клітинах дихальних шляхів [100–102], печінки [48–50], нирках [17], судинах [17], відіграючи важливу роль у функціонуванні вищезазначених органів і тканин. Відомо, що ENPP1 є інгібітором інсулінових рецепторів. Взаємодіючи з α -субодиницею рецептора, він пригнічує активність тирозинкінази, викликаючи інсулінорезистентність [105]. Miao-Pei Chen et al. зазначають, що рівень інсулінорезистентності залежить від активності ENPP1 [105]. Однією з найважливіших функцій ENPP1 є його антикальциногенна дія. Доведено, що ENPP1 є масивним інгібітором кальцифікації за рахунок його здатності підвищувати рівень неорганічного пірофосфату у позаклітинному середовищі [13, 15, 17, 18, 85, 99]. Крім того, відомо, що білок здатний зв'язуватися з кристалами гідроксіапатиту, попереджаючи їх подальший ріст [12]. Дослідженнями N. Côté et al. встановлено, що за рахунок значного зниження рівня позаклітинного АТФ ENPP1 пригнічує апоптоз клітин, чим обмежує залежну від апоптозу кальцифікацію [106]. Вперше ENPP1 було ідентифіковано T. Takahashi et al. у 1970 році як поверхневий маркер плазматичних клітин (PC-1) із лімфоцитів мишей [107], у подальшому його ген клонували та секвенували від мишей [108] і людини із циклічної дезоксирибонуклейнової кислоти (цДНК) [109, 110]. Ген ENPP1 міститься на довгому плечі 6 (6q22–23q) хромосоми, має 25 екзонів і 24 інтрони [80, 81]. Регуляцію експресії гена ENPP1 контролює ціла низка регулювальних чинників, зокрема глюкокортикоїди [112], активатори протеїнкінази С [113],

фактори росту фібробластів [114, 115], цитокіни (IL-1 β і TNF- α) [89, 114]. А. Abhishek і М. Doherty зазначають, що експресія гена ENPP1 залежить від TGF- β (трансформуючого фактора росту- β), IGF1 (інсуліноподібного фактора росту 1), CILP (cartilage intermediate layer protein). За даними вчених, TGF- β і CILP підвищують експресію ENPP1, IGF1 та IL-1 β її зменшують [116]. На сьогодні відомо близько 2 тисяч однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена ENPP1 людини. Найкраще дослідженими з яких є K121Q (rs1044498), IVSdelT-11 (rs1799774), A/G +1044TGA (rs7754561) [118–120]. Суть однонуклеотидного поліморфізму K121Q полягає у тому, що в 43213-й позиції гена ENPP1 (4-й екзон) азотиста основа аденін заміщена на цитозин, це призводить до заміни лізину (K) на глутамін (Q) у 121-му положенні молекули білка [111]. Більшість досліджень присвячена вивченню зв'язку K121Q поліморфізму гена ENPP1 із розвитком цукрового діабету 2-го типу [105, 117, 121–126]. Доведено, що у носіїв мінорного алеля K/Q + Q/Q ризик виникнення розвитку цукрового діабету 2-го типу вищий, ніж у гомозигот за основним алелем. Така залежність доведена для більшості європейських [125, 126, 127], африканських [121] та азіатських [121, 128, 129] популяцій. Проте ряд учених не виявили такого зв'язку для мешканців Північної Індії [130], Ірану [131], Кореї [123], деяких країн Африки [121], Кавказу [132]. Низка досліджень присвячена вивченню зв'язку K121Q поліморфізму гена ENPP1 у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу, які мають ускладнення. К. L. Keen et al. довели зв'язок дослідженого генетичного чинника з розвитком діабетичної нефропатії в афроамериканців [124]. Denise Alves Sortica et al. виявили такий зв'язок у мешканців Америки [133], а С. С. Lin et al. – у Тайвані [134]. Доведений зв'язок поліморфізму K121Q із розвитком ожиріння у хворих на цукровий діабет 2-го типу у мешканців Марокко [122], Іспанії [135], Німеччини [136], Кавказу [119] і Данії [126]. А. Morandi et al. виявили зв'язок поліморфізму K121Q гена ENPP1 із розвитком ожиріння у дітей із порушенням толерантності до глюкози у французькій популяції [137]. Було встановлено асоціацію поліморфних варіантів досліджуваного гена з ожирінням в Європі та Південній Африці [138, 139]. Проте К. Valli-Jaakola et al. у мешканців Фінляндії такого зв'язку не

встановили [140]. S. Tanyolac et al. довели зв'язок K121Q поліморфізму з ожирінням у мешканців Туреччини чоловічої статі, тоді як у жінок цього зв'язку не було [141]. V. Stefanovic et al. у своїй праці зазначають, що існує асоціація K121Q поліморфізму в мешканців Сербії, хворих на цукровий діабет 2-го типу, поєднаний з ожирінням та уремією [142]. Stefani Huhn et al. виявили зв'язок K121Q поліморфних варіантів гена ENPP1 у хворих на колоректальний рак із супутнім цукровим діабетом 2-го типу в мешканців Чехії, в той час як у мешканців Німеччини такого зв'язку не встановили [143]. T. Baba et al. в Японії, а Y. Shi et al. в Китаї не виявили достовірного зв'язку поліморфізму K121Q гена ENPP1 у хворих жінок із полікістозом яєчників [144, 145]. E. K. Suk et al., досліджуючи роль генетичних чинників у розвитку остеоартриту у мешканців Чуваської республіки Російської Федерації, довели зв'язок між K121Q поліморфізмом і цим захворюванням [146]. V. Levi-Litan et al. установили асоціацію цього поліморфізму гена ENPP1 із розвитком гіпофосфатемічного рахіту в американців [147].

Що стосується вивчення асоціації K121Q поліморфізму гена ENPP1 із розвитком серцево-судинних хвороб, то ця проблема на сьогодні малодосліджена. Так, J. E. Lee et al. у своїй праці засвідчують зв'язок поліморфізму K121Q із кальцифікацією дуги аорти у хворих на цукровий діабет 2-го типу мешканців Кореї. Вчені установили, що у хворих на ЦД 2-го типу, які були носіями мінорного алеля K/Q + Q/Q за K121Q поліморфізмом, ризик виникнення кальцифікації аортального клапана у 2 рази вищий, ніж у гомозигот за основним алелем K/K [148]. G. Lazarevic et al. установили зв'язок досліджуваного поліморфізму з розвитком ішемічної хвороби серця (ІХС) у хворих на цукровий діабет 2-го типу мешканців Сербії. Автори стверджують, що в осіб з генотипом K/Q + Q/Q за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 хворих на ЦД високий ризик виникнення ІХС [149]. O. G. Shaker і M. F. Ismail виявили асоціацію цього поліморфізму з інфарктом міокарда в єгипетській популяції. Вчені установили, що у носіїв мінорного алеля ризик виникнення інфаркту міокарда в 3 рази вищий, ніж у гомозигот за основним алелем [150]. P. Eller et al., вивчаючи механізми кальцифікації клапанів серця у хворих на термінальну стадію ниркової

недостатності, з'ясували, що у пацієнтів із K/Q і Q/Q генотипами за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 звапніння аортального клапана спостерігається у 57 % випадках, а мітрального клапана – у 53 % [151].

G. Endler et al. довели, що у носіїв мінорного алеля K/Q + Q/Q мешканців Відня ризик виникнення інфаркту міокарда у 2,6 раза вищий, а в мешканців центральної Німеччини – у 4,5 раза вищий, ніж у осіб з K/K генотипом, за досліджуваним поліморфізмом гена ENPP1 [152]. Проте D. J. Jeong et al., вивчаючи асоціацію K121Q поліморфізму гена ENPP1 із розвитком кальцифікації коронарних артерій у хворих із ЦД 2-го типу в корейській популяції, у носіїв мінорного алеля K/Q + Q/Q не виявили достовірного зв'язку з цією патологією [78].

2 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні використано кров 118 хворих на ГКС, яких було госпіталізовано у кардіологічне відділення Сумської міської клінічної лікарні № 1, і 234 практично здорових осіб, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збору анамнестичних даних, запису електрокардіограм, вимірювання артеріального тиску та дослідження ряду біохімічних показників крові.

До дослідження не залучалися хворі із хронічною серцевою недостатністю ІІБ – ІІІ ст., кардіогенним шоком, вираженою нирковою та печінковою недостатністю, бронхіальною астмою, травмою або великим хірургічним втручанням, гострими чи хронічними запальними процесами в стадії загострення, онкологічними та системними захворюваннями.

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 [61]. Критерієм залучення до дослідження була наявність типового ангінозного больового синдрому в спокої тривалістю від 10 до 30 хв упродовж останніх 24 годин до госпіталізації із змінами ЕКГ без навантаження (депресія сегмента «ST» 1 мм та більше або інверсія зубця «Т» 2 мм та більше щонайменше у двох суміжних відведеннях). Заключний діагноз нестабільної стенокардії поставлено 33.5% хворих, гострого інфаркту міокарда – 66,5 % хворих.

Контрольна група і група хворих із ГКС відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ($P = 0,034$ за χ^2 -критерієм), середній вік першої ($66,0 \pm 0,95$ років) був істотно вищим, ніж другої ($P < 0,001$) (табл. 2.1). Остання обставина збільшувала надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ГКС у пацієнтів контрольної групи в майбутніх періодах їхнього життя.

Таблиця 2.1 – Загальна клінічна характеристика пацієнтів із ГКС та осіб контрольної групи

	<i>Контрольна група</i> (n = 234)	<i>Пацієнти з ГКС</i> (n = 118)	<i>P</i>
Стать, ж/ч	77/157 (32,9 % / 67,1 %)	26/92 (22 % / 78 %)	0,034*
Вік, роки	66,0±0,95	55,9±0,89	< 0,001
ІМТ (ж), кг/м ²	28,6±0,13	31,5±0,9	0,013
ІМТ (ч), кг/м ²	26,8±0,34	27,6±0,42	0,141
САТ	139,5±1,5	140,8±1,7	0,532
ДАТ	83,4±0,7	89,5±0,9	< 0,001
Глюкоза крові, ммоль/л	5,27±0,05	7,9±0,24	< 0,001
Паління	60 (25,6 %)	54 (45,8 %)	< 0,001*
Стресові професії	65 (27,8 %)	49 (41,5 %)	0,009*

Примітка: * – за χ^2 -критерієм

Хворі з ГКС мали істотно вищі, якщо порівнювати з контрольною групою, показники ДАТ, концентрації глюкози крові натще, серед них було більше курців і представників стресових професій. Жінки з ГКС мали достовірно вищий показник ІМТ, ніж здорові представниці жіночої статі: 31,5±0,9 кг/м² проти 28,6±0,13 (P = 0,013).

У табл. 2.2 наведена клінічна характеристика хворих з ГКС жіночої і чоловічої статі. З неї випливає, що чоловіки хворіють на ГКС у більш ранньому віці, ніж жінки: середній вік хворих чоловічої статі становив 54,5±1,01 роки проти 61,0±1,47 – у жіночої (P = 0,002). Чоловіки мають більший зріст, серед них більше курців і таких, які мають стресову професію. У жінок зареєстровані вищі, ніж у чоловіків, значення ІМТ, рівня глюкози натще, серед них більше таких, які мають артеріальну гіпертензію та ожиріння.

Таблиця 2.2 – Загальна клінічна характеристика пацієнтів з гострим коронарним синдромом

№	Характеристика	Загалом (n = 118)	Жінки (n = 26)	Чоловіки (n = 92)	P
1.	Вік, років	55,9±0,89	61,0±1,47	54,5±1,01	0,002
2.	Зріст, см	172±0,7	163±1,1	174±0,6	< 0,001
3.	Маса тіла, кг	83,6±1,21	83,6±2,30	83,7±1,41	0,979
4.	Індекс маси тіла, кг/м ²	28,5±0,41	31,5±0,90	27,6±0,42	< 0,001
5.	Ожиріння	97 (82,2 %)	26 (100 %)	71 (71,0 %)	0,013
6.	Цукровий діабет	30 (25,4 %)	11 (42,3 %)	19 (20,7 %)	0,064
7.	Артеріальна гіпертензія	72 (61,0 %)	72 (61,0 %)	47 (51,1 %)	< 0,001
8.	Паління	54 (45,8 %)	54 (45,8 %)	51 (55,4 %)	< 0,001
9.	Стресові професії	49 (41,5 %)	5 (19,2 %)	44 (47,8 %)	0,009
10.	Глюкоза крові, ммоль/л	7,9±0,24	9,1±0,65	7,6±0,24	0,006
11.	Ліпидограма:				
	Загальний холестерол (ХС)	6,4±0,13	6,1±0,32	6,5±0,14	0,312
	ХС-ЛПНГ	4,5±0,14	4,2±0,34	4,6±0,16	0,237
	ХС-ЛПДНГ	0,81±0,036	0,88±0,092	0,79±0,038	0,284
	ХС-ЛПВГ	1,04±0,02	1,04±0,041	1,04±0,025	0,863
	Тригліцериди	1,77±0,079	1,93±0,2	1,72±0,084	0,284
	Індекс атерогенності	5,62±0,25	5,29±0,57	5,72±0,29	0,477
12.	Коагулограма:				
	Протромбіновий час	10,6±0,16	10,4±0,32	10,7±0,18	0,509
	Протромбіновий індекс	96,3±1,27	95,4±2,55	96,5±1,47	0,715
	Тромбіновий час	17,8±0,42	18,0±0,88	17,7±0,48	0,807
	Фібриноген	3,67±0,11	3,34±0,17	3,77±0,13	0,051
	Фібринолітична активність	474±3,5	474±7,9	474±3,9	0,917

Примітка: P – значимість відмінностей між жіночою і чоловічою статтю

Відмінності між групами за масою тіла, наявністю ЦД, рівнем ліпідів та показниками згортання крові були статистично не достовірними (P>0,05).

Дані про наявність відомих сьогодні факторів ризику у групі хворих із ГКС відображено в табл. 2.3.

Таблиця 2.3 – Дані про наявність факторів ризику в осіб жіночої і чоловічої статі, хворих із ГКС

<i>Показник</i>	<i>Жінки (n = 26)</i>	<i>Чоловіки (n = 92)</i>	<i>Загалом (n = 118)</i>
Ожиріння	13 (50,0)	27 (29,3)	40 (33,9)
	$\chi^2 = 3,859; P = 0,049$		
Артеріальна гіпертензія	25 (96,2)	47 (51,1)	72 (61,0)
	$\chi^2 = 17,309; P < 0,001$		
Цукровий діабет	11 (42,3)	19 (20,7)	30 (25,4)
	$\chi^2 = 5,014; P = 0,025$		
Дисліпопротеїнемія	22 (84,6)	76 (82,6)	98 (83,1)
	$\chi^2 = 0,058; P = 0,810$		
Гіперкоагуляція крові	6 (23,1)	16 (17,4)	22 (18,6)
	$\chi^2 = 0,432; P = 0,511$		
Стресові професії	5 (19,2)	44 (47,8)	49 (41,5)
	$\chi^2 = 6,826; P = 0,009$		
Паління	3 (11,5)	51 (55,4)	54 (45,8)
	$\chi^2 = 15,737; P < 0,001$		

Примітка: n – кількість пацієнтів; у дужках – %

Привертає до себе увагу та обставина, що основним фактором ризику як у жінок, так і у чоловіків була дисліпопротеїнемія атерогенного характеру, яку відзначали відповідно у 84,6 і 82,6 % пацієнтів. Друге місце займала артеріальна гіпертензія: її виявляли у 96,2 % жінок і 51,1 % осіб чоловічої статі. Причому серед хворих із ГКС осіб жіночої статі вона реєструвалася достовірно частіше, ніж серед чоловіків. Значні статеві відмінності в частоті факторів ризику встановлено при порівнянні відповідних показників, що характеризують ожиріння, цукровий діабет і паління. Так, ожиріння та цукровий діабет у жінок виявляли частіше, ніж у чоловіків (у 50,0 і 43,2 % проти 29,3 і 20,7 % відповідно). Натомість серед чоловіків курців було набагато більше (55,4 %), ніж серед жінок (11,5 %). Особи чоловічої статі, які хворіли на ГКС, частіше мали стресові професії (47,8% проти 19,5 % у жінок).

Ішемічний атеротромботичний інсульт. У дослідженні використано кров 170 хворих на ІАТІ, які перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні № 5, і 124 практично здорових донорів. Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, результатами МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [62], на підставі анамнезу і особливостей клінічного перебігу хвороби, даних ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови, ЕКГ. Контрольна група і група хворих з ІАТІ не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ($P=0,294$), проте середній вік першої ($76,7\pm 0,93$ роки) був істотно вищим, ніж другої ($P < 0,001$).

У табл. 2.4 наведено порівняльну клінічну характеристику обох груп пацієнтів.

Таблиця 2.4 – Загальна клінічна характеристика пацієнтів з ІАТІ та осіб контрольної групи

<i>Показники</i>	<i>Хворі з ІАТІ (n = 170)</i>	<i>Контрольна група (n = 124)</i>	<i>P</i>
Вік, роки	64,7±0,73	76,7±0,93	<0,001
Стать, ж/ч	72/98	45/79	0,294*
Маса тіла (ж), кг	77,6±1,42	69,8±1,8	0,001
Маса тіла (ч), кг	82,6±1,33	75,7±1,77	0,002
Зріст (ж), см	163,6±0,65	156,1±1,26	<0,001
Зріст (ч), см	172,9±0,76	167,2±0,96	<0,001
ІМТ (ж), кг/м ²	29,0±0,54	28,7±0,77	0,744
ІМТ (ч), кг/м ²	27,6±0,41	27,0±0,55	0,355
САТ, мм рт. ст.	167±2,3	152,6±2,1	<0,001
ДАТ, мм рт. ст.	95,4±1,2	86,3±1,1	<0,001
Глюкоза крові, ммоль/л	5,92±0,12	5,29±0,06	<0,001

Примітка: n – кількість пацієнтів; ж – жінки; ч – чоловіки; P – статистична значимість відмінностей; * – за χ^2 -критерієм

Із неї випливає, що хворі з ІАТІ мали істотно вищі, якщо порівнювати з контрольною групою, показники зросту, маси тіла, систолічного і діастолічного артеріального тиску, концентрації глюкози крові натще.

Дані про наявність відомих на сьогодні факторів ризику у групі хворих з ІАТІ відображено в табл. 2.5.

Таблиця 2.5 – Дані про наявність факторів ризику в осіб жіночої і чоловічої статі, хворих на ІАТІ

<i>Показник</i>	<i>Жінки (n = 72)</i>	<i>Чоловіки (n = 98)</i>	<i>Загалом (n = 170)</i>
Ожиріння	31 (43,1)	28 (28,6)	59 (34,7)
	$\chi^2 = 3,843; P = 0,050$		
Артеріальна гіпертензія	59 (81,9)	69 (70,4)	128 (75,3)
	$\chi^2 = 2,969; P = 0,085$		
Цукровий діабет	18 (25,0)	12 (12,2)	30 (17,6)
	$\chi^2 = 4,647; P = 0,031$		
Дисліпопротеїнемія [#]	40 (58,8)	52 (58,4)	92 (58,6)
	$\chi^2 = 0,002; P = 0,960$		
Гіперкоагуляція крові	45 (62,5)	46 (46,9)	91 (53,5)
	$\chi^2 = 2,969; P = 0,085$		
Паління	8 (11,1)	42 (42,9)	50 (29,4)
	$\chi^2 = 20,15; P < 0,001$		

Примітка: n – кількість пацієнтів; # – для цього показника: n = 68 (жінки); n = 89 (чоловіки); n = 157 (загалом); у дужках – %

Привертає до себе увагу та обставина, що основним фактором ризику як у жінок, так і у чоловіків була артеріальна гіпертензія, яку відзначали відповідно у 81,9 і 70,4 % пацієнтів. Друге місце посідали порушення складу ліпопротеїнів плазми крові атерогенного характеру: їх виявляли у 58,8 % жінок і 58,4 % осіб чоловічої статі. Значні статеві відмінності в частоті факторів ризику встановлено при порівнянні відповідних показників, що характеризують ожиріння, цукровий діабет і паління. Так, ожиріння та цукровий діабет у жінок виявляли частіше, ніж у чоловіків (у 43,1 і 25,0 % проти 28,6 і 12,2 % відповідно). Натомість серед чоловіків курців було набагато більше (42,9 %), ніж серед жінок (11,1 %).

З МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ З НАСТУПНИМ АНАЛІЗОМ ДОВЖИНИ РЕСТРИКЦІЙНИХ ФРАГМЕНТІВ

Для молекулярно-генетичних досліджень використовували венозну кров, яку набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл із калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 мМ) як антикоагулянт («Sarstedt», Німеччина), заморожували та зберігали за температури – 20 °С. Забір крові для досліджень проводили кваліфікованими спеціалістами в клінічних умовах із дотриманням усіх правил медичної асептики та антисептики. Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Хельсінкської 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. Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ТОВ «Лабораторія «Ізоген», Росія). Метод базується на застосуванні лізуючого реагенту із гуанідинізоціанатом, призначеним для лізису клітин, солубілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За наявності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoSTM-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагують із сорбенту та переносять у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. У процесі виділення ДНК дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно з таким протоколом. Протокол виділення ДНК. 1. У пробірку об'ємом 1,5 мл внести 100 мкл нерозведеної венозної крові та додати 400 мкл лізуючого розчину. Перемішати вміст пробірок обертанням 10 разів; 2. Термостатування суміші 5 хв за температури 65 °С. Для молекулярно-генетичних досліджень використовували венозну кров, яку набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл із калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 мМ)

як антикоагулянт («Sarstedt», Німеччина), заморожували та зберігали за температури – 20 °С. Забір крові для досліджень проводили кваліфікованими спеціалістами в клінічних умовах із дотриманням усіх правил медичної асептики та антисептики. Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Хельсінкської 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. Виділення геномної ДНК проводили з використанням комерційного набору «Diatom DNA Prep 100» (ТОВ «Лабораторія «Ізоген», Росія). Метод базується на застосуванні лізуючого реагенту із гуанідинізоціанатом, призначеним для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. За наявності лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoSTM-сорбенті, потім легко відмивається від білків та солей спиртовим розчином. Згодом ДНК екстрагують із сорбенту та переносять у стерильні вільні від ДНК та РНК мікропробірки. У процесі виділення ДНК дотримувалися рекомендацій, наведених у комерційному наборі, та проводили маніпуляції згідно з таким протоколом.

Протокол виділення ДНК. 1. У пробірку об'ємом 1,5 мл внести 100 мкл нерозведеної венозної крові та додати 400 мкл лізуючого розчину. Перемішати вміст пробірок обертанням 10 разів; 2. Термостатування суміші 5 хв за температури 65 °С; 3. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та додавання 20 мкл ретельно збовтаної на вортексі суспензії сорбенту NucleoSTM.; 4. Перемішування проб упродовж 10 хвилин; 5. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту; 6. Додавання 200 мкл лізуючого розчину, ретельне перемішування на вортексі до гомогенного стану; 7. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок 10 разів; 8. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення

супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту із ДНК; 9. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок на вортексі до гомогенного стану; 10. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту із ДНК; 11. Повторне виконання положень 9 та 10 протоколу; 12. Висушування осаду при температурі 65 °С протягом 5 хв.; 13. Додавання в пробірки 50 мкл ЕкстраГену™ при постійному перемішуванні останнього розчину; 14. Суспензування вмісту пробірок на вортексі до отримання гомогенної суспензії і термостатування за температури 65 °С протягом 5 хв.; 15. Суспензування вмісту пробірок та центрифугування протягом 1 хв при 10 000 об/хв.; 16. Перенесення супернатанту до мікропробірок та зберігання за температури –20 °С. Виділену ДНК використовували для вивчення алельного поліморфізму генів шляхом проведення полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступною рестрикцією та детекцією продуктів ампліфікації та рестрикції шляхом електрофорезу в 2,5 % агарозному гелі, що містив що містив 10 мкг/мл бромистого етидію (0,13 А; 200 V; 25 хв).

(2) *Визначення алельних поліморфізмів генів MGP*

Ампліфікацію ділянок гена MGP, T-138C (rs1800802), G-7A (rs1800801), Thr83Ala (rs4236) поліморфних варіантів, проводили за допомогою пар специфічних праймерів, синтезованих фірмою «Metabion» Німеччина (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Умови проведення PCR і рестрикційного аналізу

Ген	Полі-морфний варіант	Послідовність нуклеотидів у праймерах	Ферменти	Фрагменти рестрикції, п. н.
<i>MGP</i>	T-138C rs1800802	П 5`-AAGCATACGATGGCCAAAАСТТСТGCA-3` З 5`-GAACTAGCATTGGAАСТТТТСССААСС-3`	<i>Bse</i> MI	142, 118, 24
	G-7A rs1800801	П 5'-СТАGТТCAGTGCCAACCСТТССССАСС-3' З 5'-TAGCAGCAGTAGGGAGAGAGGCTСССА-3'	<i>Nco</i> I	500, 240, 260
	Thr83Ala rs4236	П 5`-TCAATAGGGAAGCCTGTGATG-3` З 5`-AGGGGGATACAAAATCAGGTG-3`	<i>Eco</i> 47I	173, 127, 46

Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 250 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД *Taq*-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США).

Для ампліфікації поліморфізму Т-138С 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 *Taq*-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) у буфері В такого складу: 10 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 10 мМ хлориду магнію і 0,1 мг/мл альбуміну. 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. 3.1).

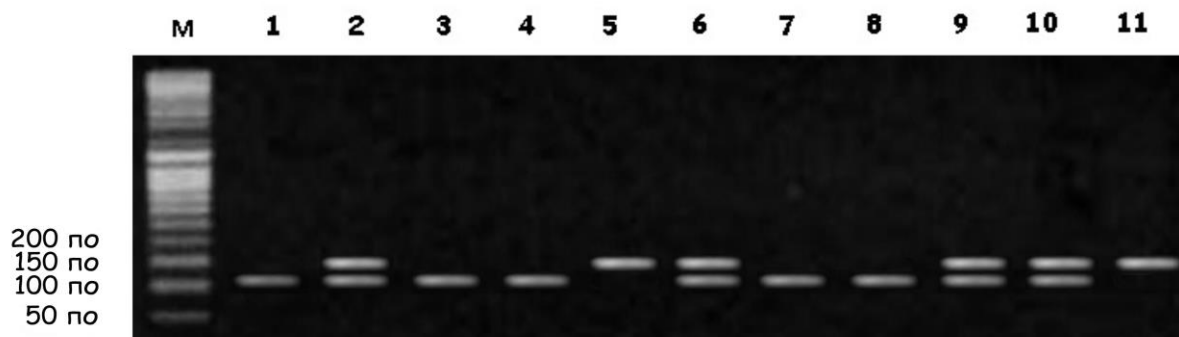


Рисунок 3.1 – Результати рестрикційного аналізу Т-138С поліморфізму гена *MGP*. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 1,3,4,7,8 відповідають Т/Т-генотипу; доріжки 2,6,9,10 – Т/С-генотипу; 5,11 – С/С-генотипу

Для ампліфікації алельного поліморфізму промотора гена MGP G-7A 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* у буфері Tango такого складу: 33 мМ трис-ацетату (рН 7.9), 10 мМ ацетату магнію, 66 мМ ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. 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. 3.2).

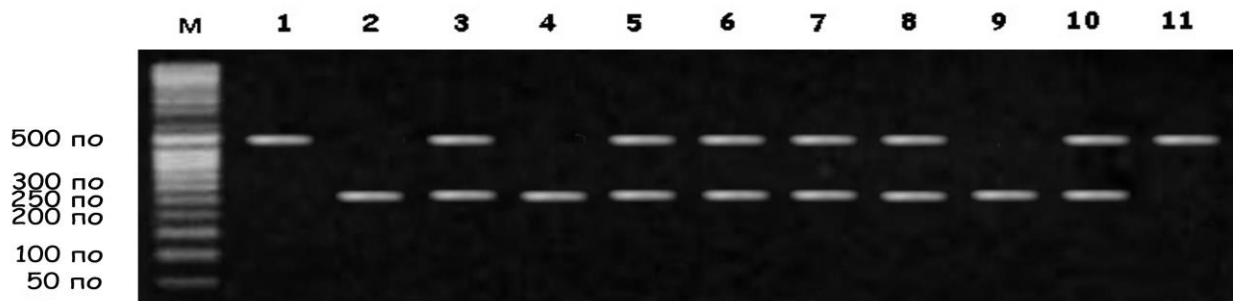


Рисунок 3.2 – Результати рестрикційного аналізу G-7A поліморфізму гена MGP. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 2,4,9 відповідають G/G-генотипу; доріжки 3,5,6,7,8,10 – G/A-генотипу; 1,11 – A/A-генотипу.

Програма ампліфікації алельного поліморфізму 4-го екзону гена MGP Thr83Ala 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 *Eco47I* у буфері R такого складу: 10 мМ трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію 100 мМ хлориду калію і 0,1 мг/мл альбуміну. 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. 3.3).

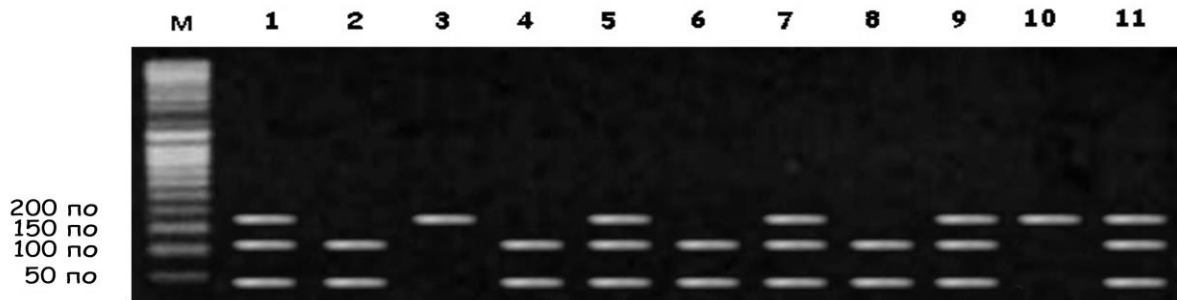


Рисунок 3.3 – Результати рестрикційного аналізу Thr83Ala поліморфізму гена MGP. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 2,4,6,8 відповідають Thr/Thr-генотипу; доріжки 1,5,7,9,11 – Thr/Ala-генотипу; 3,10 – Ala/Ala-генотипу.

3) Визначення K121Q поліморфізму 4-го екзона гена ENPP1 (rs1044498)

Ділянку гена, що містить сайт K121Q поліморфізму, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) 5' CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG 3' і зворотного (antisense) 5' GACGCTGGAAGATACCAGGCTG 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-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 Од Taq-полімерази («Thermo Scientific», США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагменту 4-го екзона складалася із 33 циклів: денатурації – 94 °С (50 с), гібридизації праймерів – 64,5 °С (45 с) і елонгації – 72 °С (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°С упродовж 18 годин із 5 Од рестриктази Eco47I (AvaII) («Thermo Scientific», США) у буфері R такого складу: 10 мМ трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду калію та 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 43213-й позиції гена ENPP1 містився цитозин, ампліфікат, який складався із 238 пар основ, розщеплювався рестриктазою Eco47I на два фрагменти – 148 і 90 пар основ. У разі заміни цитозину на аденін сайт рестрикції для Eco47I

втрачався та утворювався один фрагмент розміром 238 пар основ. (рис. 2.2.1). С; 3. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та додавання 20 мкл ретельно збовтаної на вортексі суспензії сорбенту NucleoSTM; 4. Перемішування проб упродовж 10 хвилин; 5. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту; 6. Додавання 200 мкл лізуючого розчину, ретельне перемішування на вортексі до гомогенного стану; 7. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок 10 разів; 8. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту із ДНК; 9. Додавання 1 мл сольового розчину та перемішування пробірок на вортексі до гомогенного стану; 10. Центрифугування пробірок упродовж 10 с при 5 000 об/хв та видалення супернатанту за допомогою помпи, не торкаючись осаду сорбенту із ДНК; 11. Повторне виконання положень 9 та 10 протоколу; 12. Висушування осаду при температурі 65 °С протягом 5 хв.; 13. Додавання в пробірки 50 мкл ЕкстраГенуTM при постійному перемішуванні останнього розчину; 14. Суспензування вмісту пробірок на вортексі до отримання гомогенної суспензії і термостатування за температури 65 °С протягом 5 хв.; 15. Суспензування вмісту пробірок та центрифугування протягом 1 хв при 10 000 об/хв.; 16. Перенесення супернатанту до мікропробірок та зберігання за температури –20 °С. Виділену ДНК використовували для вивчення алельного поліморфізму генів шляхом проведення полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступною рестрикцією та детекцією продуктів ампліфікації та рестрикції шляхом електрофорезу в 2,5 % агарозному гелі, що містив що містив 10 мкг/мл бромистого етидію (0,13 А; 200 V; 25 хв). Визначення K121Q поліморфізму 4-го екзона гена ENPP1 (rs1044498).

Ділянку гена, що містить сайт K121Q поліморфізму, ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) 5' CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG 3' і зворотного (antisense) 5' GACGCTGGAAGATACCAGGCTG 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-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Taq-полімерази («Thermo Scientific», США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагменту 4-го екзона складалася із 33 циклів: денатурації – 94 °С (50 с), гібридизації праймерів – 64,5 °С (45 с) і елонгації – 72 °С (1 хв). Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°С упродовж 18 годин із 5 ОД рестриктази Eco47I (AvaII) («Thermo Scientific», США) у буфері R такого складу: 10 мМ трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду калію та 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 43213-й позиції гена ENPP1 містився цитозин, ампліфікат, який складався із 238 пар основ, розщеплювався рестриктазою Eco47I на два фрагменти – 148 і 90 пар основ. У разі заміни цитозину на аденін сайт рестрикції для Eco47I втрачався та утворювався один фрагмент розміром 238 пар основ. (рис. 3.4).

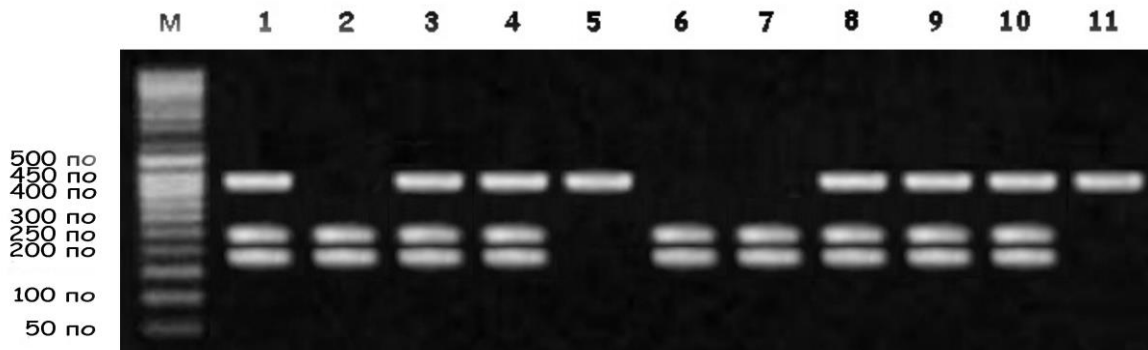


Рисунок 3.4 – Результати рестрикційного аналізу *K121Q* поліморфізму гена *ENPP1*. М – маркер молекулярної маси (по – пари нуклеїнових основ); доріжки 5,11 відповідають *K/K*-генотипу; доріжки 1,3,4,8,9,10 – *K/Q*генотипу; 2,6,7 – *Q/Q*-генотипу.

4 АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ *MGP*, *ENPP1*

4.1 Поліморфізми гена *MGP* у хворих з ГКС і в контрольній групі

Генотипування практично здорових донорів по G-7A поліморфізму гена *MGP* дало змогу встановити, що частота, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена становить 41,8%, 54,5%, 3,6% (рис.4.1).

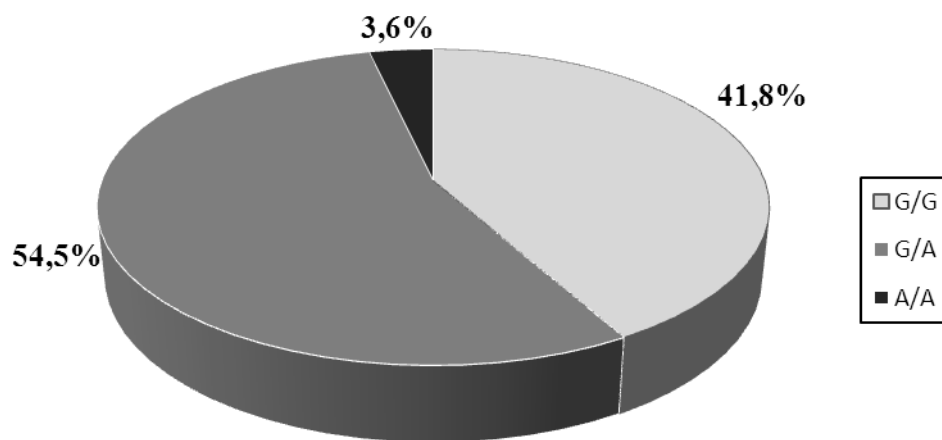


Рисунок 4.1 - Розподіл алельних варіантів гена *MGP* (поліморфізм G-7A) у групі практично здорових донорів

Отримані в роботі дані було порівняно з результатами досліджень в інших популяціях: французькій [5], північноірландській [5], італійській [73], нідерландській [78], північноамериканській [8], мексиканській [79], японській [6,11], індійській [13,14].

При порівнянні частоти поліморфізму G-7→A встановлені статистично достовірні відмінності між отриманими нами даними й результатами досліджень у Франції, Італії, США, Мексиці (рис.4.2). Характер розподілу алелей по G-7→A поліморфізму в Україні статистично відрізняється від показників не тільки азіатських і американських популяцій, але й деяких європейських країн (Франції, Італії). Це може свідчити про те, що поліморфізм G-7→A є особливим маркером для української популяції й не залежить від расової приналежності. Зазначений поліморфізм досить варіабельний, про що

свідчать істотні відмінності при порівнянні вивчених популяцій між собою (наприклад, французької з мексиканською; італійської з мексиканською, північноірландською, нідерландською; а також північноамериканських з мексиканськими популяціями).

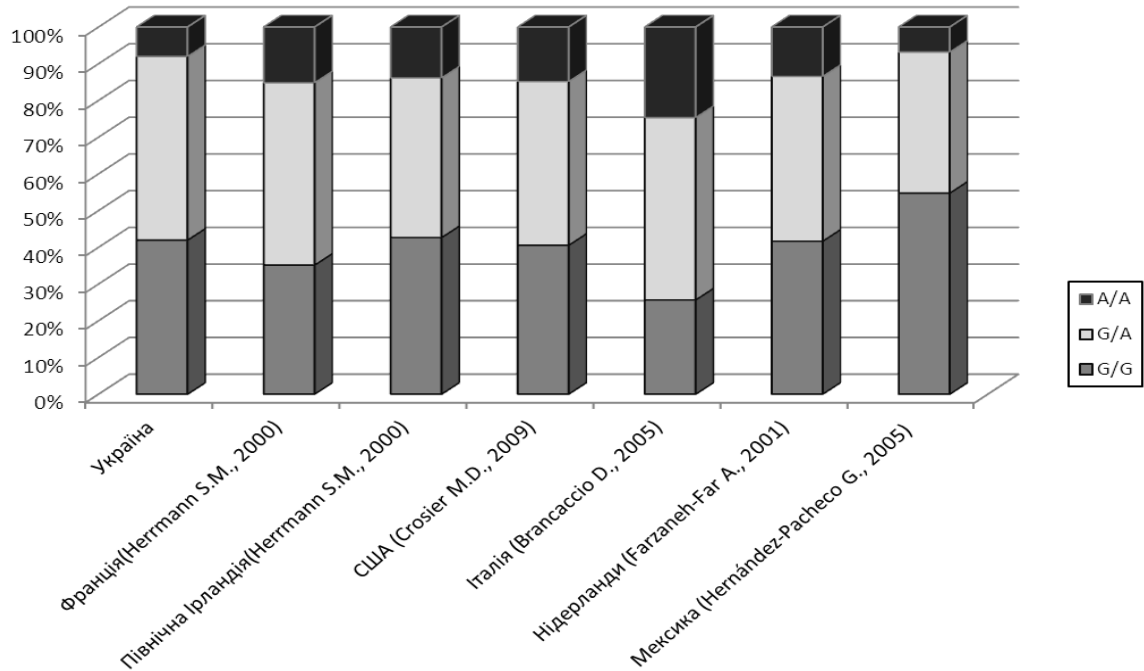


Рисунок 4.2 - Характер розподілу алелей по MGP G-7A поліморфізму в різних популяціях

4.2 Частота алельних варіантів MGP-гена у хворих на ГКС (поліморфізм G-7A)

Генотипування хворих на ГКС по G-7A поліморфізму гена MGP дало змогу встановити, що частота, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена становить 42,1%, 45,6% і 12,3% (рис.4.3).

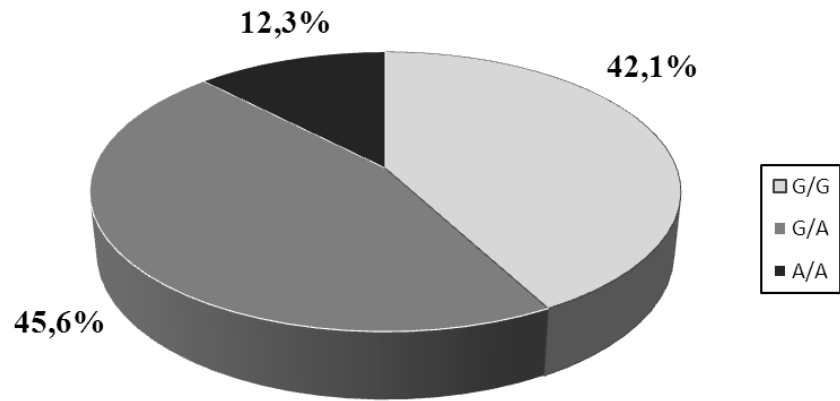


Рисунок 4.3 - Розподіл алельних варіантів гена MGP (поліморфізм G-7A) у хворих з ГКС

Генотипування хворих із ГКС по G-7→A поліморфізму гена MGP і порівняння одержаних даних з результатами рестрикційного аналізу в контрольній групі дало змогу встановити, що частота, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена, є різною ($P < 0,05$). У хворих з ГКС мінорний („патологічний”) варіант A/A виявляли в 3,4 раза частіше, ніж у донорів (рис. 4.4).

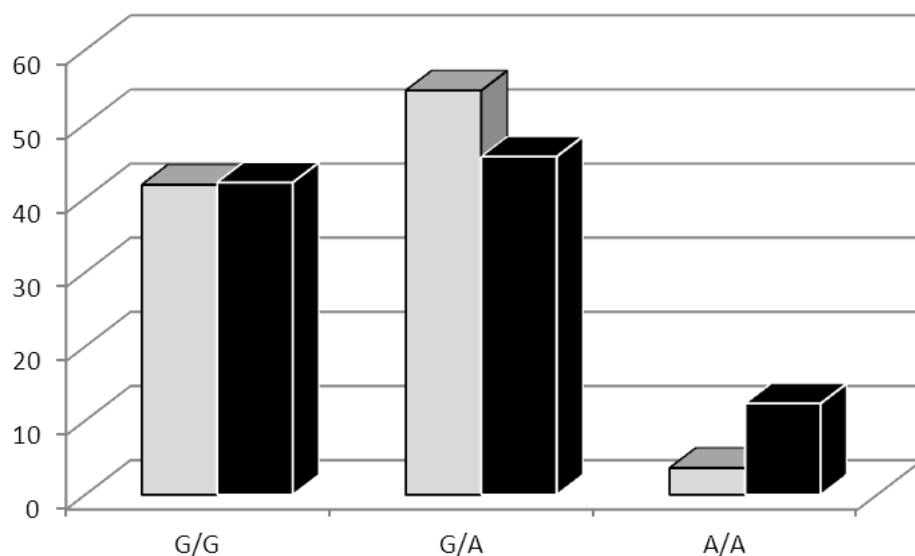


Рисунок 4.4 - Частота різних генотипів при визначенні одонуклеотидних поліморфізмів гена MGP (G-7→A поліморфізм) у практично здорових індивідумів (світлі стовпчики) та хворих із ГКС (темні стовпчики)

Суть однонуклеотидного поліморфізму G-7A полягає в тому, що в початковій ділянці промотора гена MGP, у сайті -7, азотиста основа гуанін заміщена на аденін. Унаслідок цього цілком можливою є зміна функціональних властивостей промотора, що може виявляти себе підвищенням або пригніченням транскрипції гена MGP, а в кінцевому підсумку і його експресії, у відповідь на ті чи ті регуляторні впливи.

У який спосіб зміни промотора впливають на діяльність гена – проблема, до розв'язання якої намагаються підійти сьогодні, використовуючи введення в культивовані клітини генетичних конструкцій, що містять "нормальний" і "патологічний" варіанти промотора MGP та ген люциферази (люциферазний тест). Перше таке дослідження було проведено Herrmann et al. [5]. Автори показали, що поліморфізм G-7A, на відміну від T-138C, не впливає на активність промотора гена MGP у гладких м'язових клітинах (ГМК) судин щура і в культивованих фібробластах людини.

Зовсім інші дані було отримано в роботі Farzaneh et al. [28]. У дослідженнях *in vitro* встановлено, що промотори з поліморфізмом G-7A істотно змінюють транскрипційну активність гена MGP в судинних ГМК щурів. Так, варіант промотора з мінорним алелем -7A виявляв активність у 1,5 рази вищу, ніж -7G.

4.3 Поліморфізм T-138C гена MGP у групі практично здорових донорів

Генотипування хворих на ГКС по T-138C поліморфізму гена MGP дало змогу встановити, що частота, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена становить 58,7%, 36,7%, 4,6% (рис.4.5).

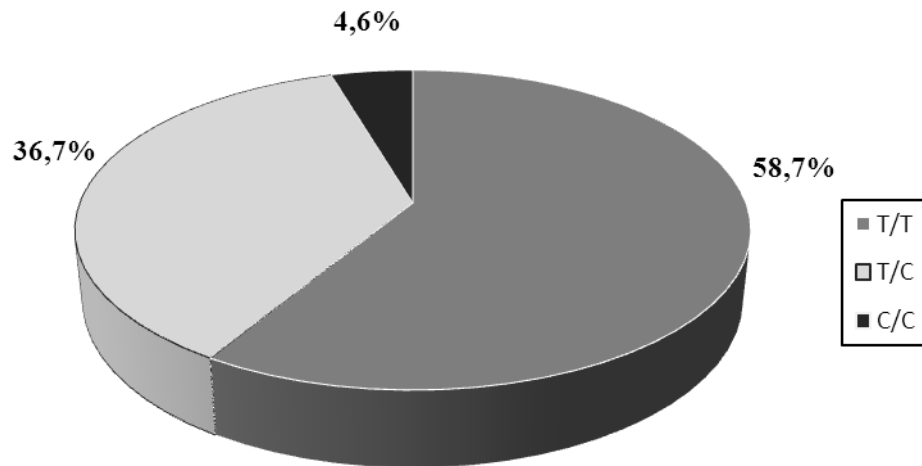


Рисунок 4.5 - Розподіл алельних варіантів гена MGP (поліморфізм Т-138С) у групі практично здорових донорів

Аналіз частоти алельних варіантів гена MGP по Т-138→С поліморфізму (рис. 6) дозволив виявити достовірні відмінності між їхнім розподілом в українській популяції, з одного боку, і в японській, індійській, мексиканській – з іншого. Відмінностей між вивченим показником в Україні та в інших країнах Європи, а також у США не виявлено. З урахуванням того, що європейські популяції, як і українська, відрізнялися за розподілом алельних варіантів гена MGP від представників країн Азії (Японія, Індія) і Мексики, є підстави вважати ці відмінності генотипу не стільки популяційними, скільки расовими. Підтверджують цю думку й достовірні відмінності в характері розподілу алелів по Т-138→С поліморфізму між мексиканцями, з одного боку, і представниками індійської і японської популяцій – з іншої, за відсутності відмінностей між двома останніми (рис.4.6).

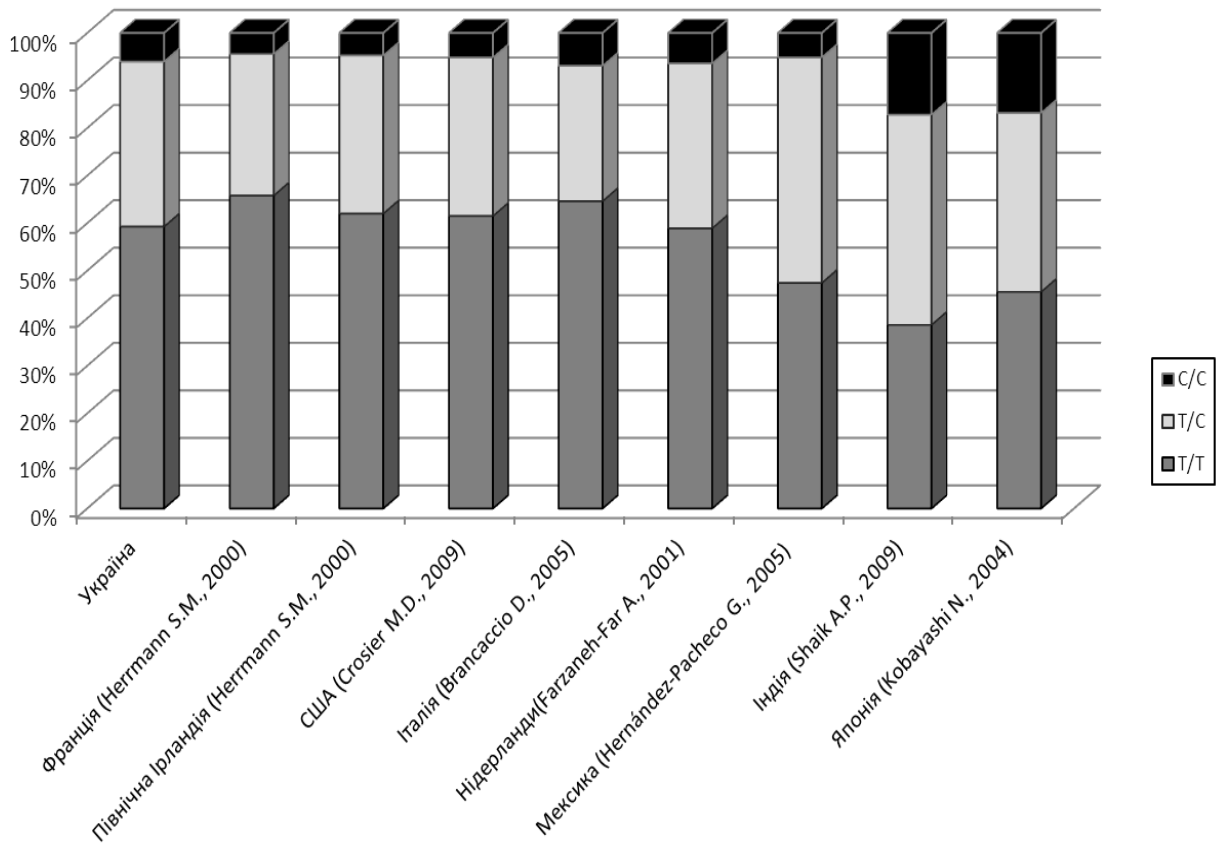


Рисунок 4.6 - Характер розподілу алелей MGR по T-138C поліморфізму в різних популяціях.

Суть одонуклеотидного поліморфізму T-138C полягає в тому, що в ділянці промотора гена MGR, у сайті -138, азотиста основа тимін заміщена на цитозин. Унаслідок цього цілком можливою є зміна функціональних властивостей промотора, що може виявляти себе підвищенням або пригніченням транскрипції гена MGR, а в кінцевому підсумку і його експресії, у відповідь на ті чи ті регуляторні впливи.

У який спосіб зміни промотора впливають на діяльність гена – проблема, до розв'язання якої намагаються підійти сьогодні, використовуючи введення в культивовані клітини генетичних конструкцій, що містять "нормальний" і "патологічний" варіанти промотора MGR та ген люциферази (люциферазний тест). Перше таке дослідження було проведено Herrmann et al. [5]. Автори показали, що активність промотора з мінорним алелем -138C (патологічний варіант), при порівнянні з -138T (нормальним варіантом), була менша на 20% у

гладких м'язових клітинах (ГМК) судин щура і на 50% у культивованих фібробластах людини.

Зовсім інші дані було отримано у дослідженні Farzaneh et al. [28]. Автори встановили, що промотори з поліморфізмом T-138C істотно змінюють транскрипційну активність гена MGP в судинних ГМК щурів *in vitro*. Так, варіант промотора з мінорним алелем -138C був у 4 рази активніший за основний варіант -138T. Аналіз промотора гена MGP показав, що поліморфізм T-138C стосується ділянки, яка є критичною для процесів транскрипції в судинних ГМК. Саме тут, у позиції між -142 і -136, розташований елемент, що може зв'язувати активаційний протеїн-1 (AP-1). Встановлено, що при поліморфізмі T-138C змінюється зв'язування цієї ділянки промотора з комплексом AP-1. Варіант промотора з алелем -138T добре зв'язує комплекси AP-1, до складу яких входять c-Jun, JunB, Fra-1 і Fra-2, і активується флорболовими сполуками, тим часом здатність до зв'язування AP-1 і наступної активації у промотора з алелем -138C є дуже низькою.

Наведені вище дані підтверджуються роботою Kobayashi et al. [6], у якій встановлено, що активність -138T варіанту промотора гена MGP істотно вища, ніж -138C. На думку авторів, це зумовлено різною здатністю цих двох варіантів зв'язуватися з AP-1 комплексами.

Таким чином, неоднозначні дані щодо впливу T-138C поліморфізму гена MGP на його транскрипційну активність свідчать про складність проблеми і зумовлюють необхідність продовжувати дослідження в цьому напрямі. Тому наші подальші дослідження будуть присвячені вивченню частоти алельних варіантів гена MGP по T-138C поліморфізму у хворих із ГКС та порівняння отриманих даних із результатами генотипування у групі відносно здорових донорів.

4.4 Вплив алельного поліморфізму K121Q гена *ENPP1* на розвиток гострого коронарного синдрому

Серед однонуклеотидних поліморфізмів гена *ENPP1*, K121Q поліморфізм є одним з найбільш значимих. Заміна аденіну на цитозин у

43213- й позиції гена, що призводить до заміщення 121-ї амінокислоти лізин на глютамін у соматомедин-В-подібному домені білка, має доведений зв'язок з цілою низкою захворювань, у тому числі й серцево-судинних. Враховуючи роль ENPP1 у продукції неорганічного пірофосфату (PPi), що є потужним антикальциногенним фактором, поліморфізми його гена можуть виступати важливим генетичним чинником у розвитку гострого коронарного синдрому. Частоту трьох можливих поліморфних варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1*, а також перевірку відповідності розподілу основного (K) і мінорного (Q) алелів рівновазі Харді–Вайнберга подано у таблиці 3.1.1. Як випливає з наведених даних, частота K- і Q-алелів у контрольній групі та в групі хворих із ГКС не має статистично достовірних відхилень від очікуваних за генетично-популяційним законом величин ($P > 0,05$). Оскільки в контрольній групі не виявлено жодного пацієнта з Q/Q генотипом, то для подальшого аналізу носіїв мінорного алеля K/Q + Q/Q було об'єднано в одну групу.

Таблиця 4.1 – Частота алельних варіантів і алелів за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у контрольній групі та у хворих із ГКС

	<i>Контрольна група</i>	<i>Хворі із ГКС</i>
Гомозиготи K/K, n (%)	83 (75,5 %)	79 (67,0 %)
Гетерозиготи K/Q, n (%)	27 (24,5 %)	36 (30,5 %)
Гомозиготи Q/Q, n (%)	0 (0 %)	3 (2,5 %)
K-алель	0,88	0,82
Q-алель	0,12	0,18
χ^2	2,15	0,22
P	> 0,050	> 0,050

Примітка: n – кількість пацієнтів; χ^2 і P відображають відхилення у кожній групі від рівноваги Харді–Вайнберга

На рисунку 4.7 подано результати аналізу частот окремих генотипів за поліморфізмом K121Q в осіб контрольної групи і у хворих із гострим коронарним синдромом.

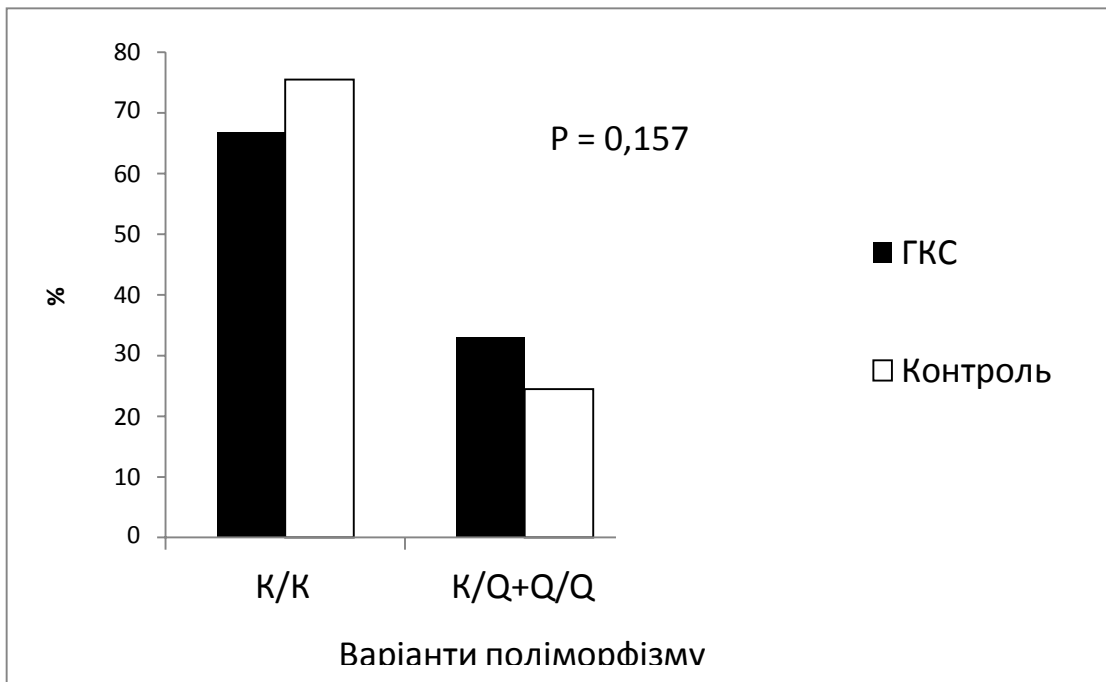


Рисунок 4.7 – Частота алельних варіантів гена *ENPP1* за поліморфізмом K121Q у хворих із ГКС (чорні стовпчики) і в контрольній групі (білі стовпчики). Р – статистична значущість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Можна бачити, що у пацієнтів із ГКС співвідношення гомозигот за основним алелем (K/K) та носіїв мінорного алеля (K/Q + Q/Q) становило 66,9 і 33,1 %, а в осіб контрольної групи – 75,5 і 24,5 % відповідно. Відмінності у розподілі різних варіантів генотипу між хворими із ГКС та здоровими пацієнтами не виходили за межі статистичної значущості ($\chi^2 = 2,002$; Р = 0,157).

4.5 Аналіз зі статтю алельного поліморфізму K121Q гена *ENPP1* на розвиток гострого коронарного синдрому

Розподіл алельних варіантів гена *ENPP1* за поліморфізмом K121Q у хворих із ГКС різної статі наведено в табл. 4.2. З одержаних результатів

впливає, що серед хворих із ГКС співвідношення генотипів (К/К і К/К + Q/Q) у осіб жіночої статі становило 65,4 і 34,6 %, а у чоловіків – 64,7 і 32,6 % відповідно. Отже, частота генотипів за досліджуваним поліморфізмом гена *ENPP1* у хворих із ГКС пацієнтів різної статі достовірно не відрізнялась ($\chi^2 = 0,037$; $P = 0,848$).

Таблиця 4.2 – Частота генотипів за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у хворих із ГКС жінок і чоловіків

<i>Генотип</i>		<i>Жінки</i>	<i>Чоловіки</i>
К/К	n	17	62
		65,4 %	67,4 %
К/К + Q/Q	n	9	30
		34,6 %	32,6 %
Разом	n	26	92
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,037$; $P = 0,848$			

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

Розподіл частот алельних варіантів поліморфізму K121Q за статтю у досліджуваних групах пацієнтів подано у табл. 4.3. З наведених даних бачимо, що розподіл K121Q поліморфних варіантів у жінок хворих із ГКС та в контролі є недостовірним. Так, співвідношення генотипів (К/К і К/К + Q/Q) в осіб контрольної групи становило 78,1 і 21,9 %, а серед хворих із ГКС – 65,4 і 34,6 % відповідно ($\chi^2 = 1,166$; $P = 0,280$). У чоловіків розподіл алельних варіантів K121Q поліморфізму також не відрізнявся під час порівняння хворих із ГКС та групи контролю. Частота генотипів за вивченим поліморфізмом у контрольній групі дорівнювала 74,4 і 25,6 %, а серед хворих із ГКС – 67,4 і 32,6 % відповідно. Отже, в осіб чоловічої статі також не виявлено достовірного

зв'язку K121Q поліморфізму гена *ENPP1* з розвитком ГКС ($\chi^2 = 0,987$; $P = 0,320$).

Таблиця 4.3 – Зв'язок K121Q поліморфізму гена *ENPP1* із розвитком гострого коронарного синдрому (ГКС) в осіб жіночої та чоловічої статей

Стать	Генотип		Контроль	ГКС
Жінки	К/К	n	25	17
			78,1 %	65,4 %
	К/Q + Q/Q	n	7	9
			21,9 %	34,6 %
	Разом	n	32	26
			100 %	100 %
$\chi^2 = 1,166$; $P =$				
Чоловіки	К/К	n	58	62
			74,4 %	67,4 %
	К/Q + Q/Q	n	20	30
			25,6 %	32,6 %
	Разом	n	78	92
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,987$; $P = 0,320$				

Примітка. Див. табл. 4.2

У таблиці 4.4 подано дані генотипування за K121Q поліморфізмом у жінок і чоловіків – окремо у хворих із ГКС та пацієнтів, які не мали цієї недуги.

Таблиця 4.4 – Частота генотипів за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 у жінок і чоловіків у контрольній групі та у хворих із ГКС

<i>Групи пацієнтів</i>	<i>Генотип</i>		<i>Жінки</i>	<i>Чоловіки</i>
Контрольна група	К/К	n	25	58
			78,1 %	74,4 %
	К/Q + Q/Q	n	7	20
			21,9 %	25,6 %
	Разом	n	32	78
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,174; P =$				
Хворі з ГКС	К/К	n	17	62
			65,4 %	67,4 %
	К/Q + Q/Q	n	9	30
			34,6 %	32,6 %
	Разом	n	26	92
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,037; P = 0,848$				

Примітка. Див. табл. 4.2

Одержані результати свідчать про відсутність статистично значущих відмінностей між розподілом алельних варіантів за досліджуваним поліморфізмом в осіб жіночої та чоловічої статей у контрольній групі. Так, практично здорових жінок з К/К генотипом було 78,1 %, а з К/Q + Q/Q генотипом – 21,9 %. Серед чоловіків співвідношення алельних варіантів за досліджуваним поліморфізмом становило 74,4 і 25,6 % відповідно. Отже, в осіб контрольної групи не виявлено достовірної різниці в розподілі генотипів за K121Q поліморфізмом у пацієнтів різної статі ($\chi^2 = 0,174; P = 0,677$). У хворих із ГКС спостерігалися подібні результати. Серед хворих із ГКС різні

варіанти генотипів (K/K і K/Q + Q/Q) у осіб жіночої статі зустрічалися у 65,4 і 34,6 %, а у чоловіків – 67,4 і 32,6 % відповідно ($\chi^2 = 0,037$; P = 0,848).

Нарешті, ще один аналіз дає підстави для висновку про те, що немає зв'язку між статтю пацієнтів і розвитком ГКС залежно від генотипу за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Частота осіб жіночої і чоловічої статей у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1*

Генотип	Стать		Контроль	ГКС
K/K	Жінки	n	25	17
			30,1 %	21,5 %
	Чоловіки	n	58	62
			69,9 %	78,5 %
	Разом	n	83	79
			100 %	100 %
$\chi^2 = 1,559$; P =				
K/Q + Q/Q	Жінки	n	7	9
			25,9 %	23,1 %
	Чоловіки	n	20	30
			74,1 %	76,9 %
	Разом	n	27	39
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,071$; P = 0,791				

Примітка. Див. табл. 4.2

Так, серед гомозигот за основним алелем (K/K) практично здорових осіб жіночої статі виявлено 30,1 %, а чоловіків – 69,9 %; хворих із ГКС жінок було 21,5 %, а чоловіків – 78,5 % ($\chi^2 = 1,559$; P = 0,212). Співвідношення осіб жіночої і чоловічої статі у носіїв мінорного алеля (K/Q + Q/Q) в групі контролю становило 25,9 і 74,1 %, а серед хворих із ГКС – 23,1 і 76,9 %

відповідно ($\chi^2 = 0,071$; $P = 0,791$). Отже, не виявлено достовірного зв'язку між статтю досліджуваних індивідуумів та розвитком ГКС як у гомозигот за основним алелем К/К, так і в носіїв мінорного алеля К/К + К/К.

4.6 Вплив алельного поліморфізму К121Q гена *ENPP1* на розвиток гострого коронарного синдрому з різними фактора ризику

Аналіз за показником індексу маси тіла. Розподіл алельних варіантів гена *ENPP1* за поліморфізмом К121Q у хворих із ГКС з нормальною та підвищеною величинами індексу маси тіла (ІМТ) подано в табл. 4.6. Із наведених результатів випливає, що у хворих із ГКС частота генотипів (К/К і К/К + К/К) в осіб з $ІМТ < 25 \text{ кг/м}^2$ дорівнювала 52,4 і 47,6 %, а серед пацієнтів з $ІМТ \geq 25 \text{ кг/м}^2$ – 70,1 і 29,9 % відповідно. Отже, не існує достовірної різниці у розподілі генотипів за досліджуваним поліморфізмом серед хворих із ГКС з різними величинами ІМТ ($\chi^2 = 2,450$; $P = 0,118$).

Таблиця 4.6 – Частота генотипів за К121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у хворих із ГКС з нормальною та підвищеною величинами ІМТ

Генотип		$ІМТ < 25 \text{ кг/м}^2$	$ІМТ \geq 25 \text{ кг/м}^2$
К/К	n	11	68
		52,4 %	70,1 %
К/К + К/К	n	10	29
		47,6 %	32,6 %
Разом	n	21	97
		100 %	100 %
$\chi^2 = 2,450$; $P = 0,118$			

Примітка. Див. табл. 4.2.

У таблиці 4.7 подано величини ІМТ у групах порівняння залежно від генотипу пацієнтів за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1*. Аналізуючи одержані дані, можна зробити висновок, що немає достовірної різниці у показниках ІМТ у осіб з різними варіантами генотипів (K/K і K/Q + Q/Q) як у осіб контрольної групи ($P = 0,785$), так і у хворих із ГКС ($P = 0,593$). Під час проведення порівняння даних між контрольною групою та хворими із ГКС з різними варіантами генотипів за досліджуваним поліморфізмом, одержано інші результати. Так, у гомозигот за основним алелем K/K, хворих із ГКС, показник ІМТ дорівнював $(28,61 \pm 0,50) \text{ кг/м}^2$, а у практично здорових осіб – $(27,08 \pm 0,48) \text{ кг/м}^2$. Отже, виявлено, що в осіб з генотипом K/K, хворих із ГКС, ІМТ достовірно вищий, ніж у здорових індивідуумів ($P = 0,029$). В осіб з генотипом K/Q + Q/Q, хворих із ГКС, ІМТ становив $(28,15 \pm 0,69) \text{ кг/м}^2$, а в контролі – $(27,34 \pm 0,75) \text{ кг/м}^2$. Таким чином, у носіїв мінорного алеля K/Q + Q/Q достовірної відмінності у величинах ІМТ серед хворих із ГКС та групою контролю виявлено не було ($P = 0,429$).

Таблиця 4.7 – Показники ІМТ в групах порівняння залежно від варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* ($M \pm m$)

Показники		K/K	K/Q + Q/Q	F	P1
ІМТ, кг/м^2	Контроль	$27,08 \pm 0,48$ (n = 83)	$27,34 \pm 0,75$ (n = 27)	0,172	0,785
	ГКС	$28,61 \pm 0,50$ (n = 79)	$28,15 \pm 0,69$ (n = 39)	0,051	0,593
	P2	0,029	0,429		

Примітка: F – критерій Фішера; P1 і P2 – значущість відмінностей між генотипами за даними однофакторного дисперсійного аналізу (P1) і контролем та ГКС за t-критерієм Стьюдента (P2). У дужках – кількість пацієнтів

Поділ кожної з двох груп – дослідної і контрольної – на дві підгрупи залежно від величини ІМТ (< 25 і $\geq 25 \text{ кг/м}^2$) дав можливість проаналізувати вплив поліморфних варіантів гена *ENPP1* на розвиток ГКС в осіб із нормальним та підвищеним значенням цього показника.

Як впливає з табл. 3.1.8, у пацієнтів з ІМТ < 25 кг/м² виявлено достовірну відмінність у розподілі генотипів за поліморфізмом К121Q серед осіб контрольної групи та хворих із ГКС. Пацієнтів з ІМТ < 25 кг/м² у контролі з К/К генотипом було 81,2 %, а з К/Q + Q/Q генотипом – 18,8 %. Співвідношення алельних варіантів у хворих із ГКС з ІМТ < 25 кг/м² становило 52,4 і 47,6 % відповідно ($\chi^2 = 5,014$; P = 0,025). Таким чином, у пацієнтів з ІМТ < 25 кг/м² існує достовірний зв'язок між К121Q поліморфізмом гена *ENPP1* та розвитком ГКС: серед хворих із ГКС більше носіїв мінорного алеля (К/Q + Q/Q), ніж у контролі. У групі з ІМТ \geq 25 кг/м² такого зв'язку з розвитком ГКС не встановлено. Так, осіб з ІМТ \geq 25 кг/м² контрольної групи, гомозигот за основним алелем К/К виявлено 73,1 %, а носіїв мінорного алеля К/Q + Q/Q – 26,9 %. Співвідношення поліморфних варіантів в осіб з ІМТ \geq 25 кг/м², хворих із ГКС, дорівнювало 70,1 і 29,9 % відповідно ($\chi^2 = 0,187$; P = 0,665).

Таблиця 4.8 – Зв'язок К121Q поліморфізму гена *ENPP1* з розвитком ГКС в осіб із нормальним і збільшеним індексом маси тіла

	Генотип		Контроль	ГКС
ІМТ < 25 кг/м ²	К/К	n	26	11
			81,2 %	52,4 %
	К/Q + Q/Q	n	6	10
			18,8 %	47,6 %
	Разом	n	32	21
			100 %	100 %
$\chi^2 = 5,014$; P = 0,025				
ІМТ \geq 25 кг/м ²	К/К	n	57	68
			73,1 %	70,1 %
	К/Q + Q/Q	n	21	29
			26,9 %	29,9 %
	Разом	n	78	97
			100 %	100 %

$$\chi^2 = 0,187; P = 0,665$$

Примітка. Див. табл. 4.2

Застосування методу логістичної регресії дало можливість підтвердити висновок про те, що ризик виникнення ГКС в осіб з ІМТ < 25 кг/м², носіїв мінорного алеля К/К + К/К, у 3,9 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (P = 0,029) (табл. 4.9).

Таблиця 4.9 – Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 в осіб із нормальним і підвищеним ІМТ

Показник	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95 % СІ для OR нижній	95 % СІ для OR верхній
ІМТ < 25 кг/м ²	К/К+К/К	1,371	0,629	4,746	0,029	3,939	1,148	13,524
ІМТ ≥ 25 кг/м ²	К/К+К/К	0,146	0,338	0,187	0,665	1,158	0,597	2,246

Примітка. Порівняння проводилося щодо гомозигот за основним алелем (К/К); CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда; P – статистична значимість; OR - відношення ризику; СІ – довірчий інтервал.

Як у хворих із ГКС, так і в осіб контрольної групи не виявлено залежності між досліджуваним однонуклеотидним поліморфізмом і рівнем ІМТ (табл. 4.10). Частота генотипів (К/К і К/К + К/К) у контрольній групі з ІМТ < 25 кг/м² становила 81,2 і 18,8 %, з ІМТ ≥ 25 кг/м² – 73,1 і 26,9 % відповідно. Таким чином, у контролі розподіл поліморфних варіантів гена ENPP1 за вивченим SNP достовірно не відрізнявся серед пацієнтів з нормальною і підвищеною величиною ІМТ ($\chi^2 = 0,818; P = 0,366$). Хворих із ГКС, які мали показник ІМТ < 25 кг/м², гомозигот за основним алелем К/К було 52,4 %, а носіїв мінорного алеля К/К + К/К – 47,6 %. Частота алельних варіантів у пацієнтів із ГКС з ІМТ ≥ 25 кг/м² дорівнювала 70,1 і 29,9 %

відповідно ($\chi^2 = 2,450$; $P = 0,118$). Отже, у хворих із ГКС також не виявлено достовірної відмінності в розподілі генотипів за K121Q поліморфізмом серед осіб з різними показниками ІМТ.

Таблиця 4.10 – Вплив поліморфних K121Q варіантів гена ENPP1 на індекс маси тіла (ІМТ) в осіб контрольної групи та у хворих із ГКС

Групи пацієнтів	Генотип		ІМТ < 25	ІМТ ≥ 25
Контрольна група	К/К	n	26	57
			81,2 %	73,1 %
	К/Q + Q/Q	n	6	21
			18,8 %	26,9 %
	Разом	n	32	78
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,818$; $P = 0,366$				
Хворі із ГКС	К/К	n	11	68
			52,4 %	70,1 %
	К/Q + Q/Q	n	10	29
			47,6 %	29,9 %
	Разом	n	21	97
			100 %	100 %
$\chi^2 = 2,450$; $P = 0,118$				

Примітка. Див. табл. 4.2

І нарешті, під час розподілу пацієнтів на підгрупи за генотипами виявився достовірний зв'язок між величиною ІМТ та розвитком ГКС у пацієнтів з К/К генотипом (табл. 4.11). Так, у гомозигот за основним алелем К/К співвідношення осіб з ІМТ < 25 кг/м² та ІМТ ≥ 25 кг/м² у групі контролю становило 31,3 і 68,7 %, а серед хворих із ГКС – 13,9 і 86,1 % відповідно. Таким чином, в осіб з К/К генотипом з ІМТ ≥ 25 кг/м² ризик виникнення ГКС достовірно вищий, ніж в осіб з ІМТ < 25 кг/м² ($\chi^2 = 6,955$; $P = 0,008$). Носіїв

мінорного алеля K/Q + Q/Q контрольної групи з ІМТ < 25 кг/м² – 22,2 %, а з ІМТ ≥ 25 кг/м² – 77,8 %. Хворих із ГКС у цій підгрупі з різними величинами ІМТ було відповідно 25,6 і 74,4 %. Отже, в осіб із K/Q + Q/Q генотипом не виявлено достовірного зв'язку між величиною ІМТ та розвитком ГКС ($\chi^2 = 0,102$; P = 0,750).

Таблиця 4.11 – Частота осіб з нормальним і підвищеним індексами маси тіла (ІМТ) у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена ENPP1

Генотип	ІМТ		Контроль	ГКС
K/K	ІМТ < 25 кг/м ²	n	26	11
			31,3 %	13,9 %
	ІМТ ≥ 25 кг/м ²	n	57	68
			68,7 %	86,1 %
	Разом	n	83	79
			100 %	100 %
$\chi^2 = 6,955$; P = 0,008				
K/Q + Q/Q	ІМТ < 25 кг/м ²	n	6	10
			22,2 %	25,6 %
	ІМТ ≥ 25 кг/м ²	n	21	29
			77,8 %	74,4 %
	Разом	n	27	39
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,102$; P = 0,750				

Примітка. Див. табл. 4.2

Аналіз за показниками артеріального тиску. Розподіл алельних варіантів гена ENPP1 за поліморфізмом K121Q у хворих із ГКС з нормальною величиною артеріального тиску та артеріальною гіпертензією наведено в табл. 4.12. З одержаних результатів випливає, що не існує достовірної різниці у співвідношенні алельних варіантів за досліджуванним поліморфізмом серед

хворих із ГКС з артеріальною гіпертензією та з нормальними показниками артеріального тиску ($\chi^2 = 0,102$; $P = 0,749$).

Таблиця 4.12 – Частота генотипів за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 у хворих із ГКС з нормальним тиском та артеріальною гіпертензією

Генотип		Артеріальна гіпертензія (-)	Артеріальна гіпертензія (+)
K/K	n	30	49
		65,2 %	68,1 %
K/Q + Q/Q	n	16	23
		34,8 %	31,9 %
Разом	n	46	72
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,102$; $P = 0,749$			

Примітка. Див. табл. 4.2

У таблиці 4.13 подано величини АТ сист., АТ діаст., АТ пул. та АТ сер. у практично здорових осіб і у хворих із ГКС залежно від варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена ENPP1.

В осіб контрольної групи з різними генотипами значення АТ сист. ($P = 0,184$), АТ діаст. ($P = 0,630$), АТ сер. ($P = 0,781$) достовірно не відрізнялись. Щодо хворих із ГКС, то отримано подібні результати: величини АТ сист. ($P = 0,560$), АТ діаст. ($P = 0,636$), АТ сер. ($P = 0,581$) у носіїв різних генотипів також не відрізнялись.

Серед вивчених видів тисків лише АТ пул. в групі контролю у носіїв мінорного алеля K/Q + Q/Q був достовірно вищим, ніж у гомозигот за основним алелем K/K, і становив ($47,2 \pm 1,6$) мм рт. ст. проти ($43,4 \pm 0,8$) мм рт. ст. ($P = 0,024$).

Аналіз між групами порівняння показав, що хворі з ГКС – гомозиготи за основним алелем (К/К) – мали достовірно вищі показники всіх видів тисків, ніж практично здорові особи.

Таблиця 4.13 – Показники артеріального тиску (АТ) у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за К121Q поліморфізмом гена ENPP1 (M ± m)

Показники		К/К	К/Q + Q/Q	F	P1
АТ сист.	Контроль	123,9 ± 1,1 (83)	126,9 ± 2,0 (27)	0,261	0,184
	ГКС	140,0 ± 1,9 (79)	142,3 ± 3,3 (39)	4,772	0,560
	P2	< 0,001	0,001		
АТ діаст.	Контроль	80,4 ± 0,8	79,6 ± 1,4	0,590	0,630
	ГКС	89,2 ± 1,0	90,1 ± 1,8	0,054	0,636
	P2	< 0,001	< 0,001		
АТ пул.	Контроль	43,4 ± 0,8	47,2 ± 1,6	0,497	0,024
	ГКС	50,9 ± 1,1	52,1 ± 2,2	4,668	0,601
	P2	< 0,001	0,103		
АТ сер.	Контроль	94,9 ± 0,8	95,4 ± 1,5	0,017	0,781
	ГКС	106,1 ± 1,3	107,5 ± 2,1	1,350	0,581
	P2	< 0,001	< 0,001		

Примітка. Див. табл. 4.7.

Так, у хворих із ГКС з К/К генотипом показник АТ сист. дорівнював (123,9 ± 1,1) мм рт. ст. проти (140,0 ± 1,9) мм рт. ст. у контролі (P < 0,001); АТ діаст. (89,2 ± 1,0) мм рт. ст. проти (80,4 ± 0,8) мм рт. ст. (P < 0,001); АТ пул. (50,9 ± 1,1) мм рт. ст. проти (43,4 ± 0,8) мм рт. ст. (P < 0,001); АТ сер (106,1 ± 1,3) мм рт. ст. проти (94,9 ± 0,8) мм рт. ст. (P < 0,001).

У пацієнтів з генотипом К/Q + Q/Q за К121Q поліморфізмом гена *ENPP1* спостерігалися подібні результати, за винятком пульсового АТ. У здорових індивідуумів і хворих із ГКС, які були носіями мінорного алеля, показники

АТ пул. достовірно не відрізнялись і дорівнювали ($47,2 \pm 1,6$) мм рт. ст. та ($52,1 \pm 2,2$) мм рт. ст. відповідно ($P = 0,103$). В осіб з K/Q + Q/Q генотипом хворих із ГКС показник АТ сист. дорівнював ($142,3 \pm 3,3$) мм рт. ст. проти ($126,9 \pm 2,0$) мм рт. ст. у контролі ($P = 0,001$). Величина АТ діаст. у групах порівняння ($90,1 \pm 1,8$) мм рт. ст. та ($79,6 \pm 1,4$) мм рт. ст. відповідно ($P < 0,001$). Показник АТ сер. становив ($107,5 \pm 2,1$) мм рт. ст. проти ($95,4 \pm 1,5$) мм рт. ст. ($P < 0,001$). Таким чином, виявлено, що у пацієнтів із ГКС носіїв мінорного алеля величини АТ сист., АТ діаст. і АТ сер. достовірно вищі, ніж у осіб контрольної групи.

Аналіз за фактом паління. Частоту генотипів за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у хворих із ГКС тих, хто палить, і тих, хто не палить, подано в табл. 4.14.

Таблиця 4.14 – Частота генотипів за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у хворих із ГКС курців і тих, хто не палить

Генотип		Паління (-)	Паління (+)
K/K	n	45	34
		70,3 %	63,0 %
K/Q + Q/Q	n	19	20
		29,7 %	37,0 %
Разом	n	64	54
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,715; P = 0,398$			

Примітка. Див. табл. 4.2.

Із наведених результатів випливає, що серед хворих із ГКС тих, хто не палить, осіб з K/K генотипом виявлено 70,3 %, а з K/Q + Q/Q генотипом – 29,7 %. Частота генотипів (K/K і K/Q + Q/Q) у хворих із ГКС курців становила 63,0 і 37,0 % відповідно. Таким чином, не існує достовірної різниці у

співвідношенні генотипів за досліджуваним поліморфізмом у серед хворих із ГКС курців і тих, хто не палить ($\chi^2 = 0,715$; $P = 0,398$).

Розподіл генотипів за поліморфізмом К121Q гена *ENPP1* у курців і тих, хто не палить, подано в табл. 4.15.

Таблиця 4.15 – Зв'язок К121Q поліморфізму гена *ENPP1* з ГКС у курців і тих, хто не палить

	Генотип		Контроль	ГКС
Ті, хто не палить	К/К	n	62	45
			76,5 %	70,3 %
	К/Q + Q/Q	n	19	19
			23,5 %	29,7 %
	Разом	n	81	64
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,718$; $P = 0,397$				
Курці	К/К	n	21	34
			74,2 %	63,0 %
	К/Q + Q/Q	n	8	20
			27,6 %	37,0 %
	Разом	n	29	54
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,754$; $P = 0,385$				

Примітка. Див. табл. 4.2

Розподіл поліморфних варіантів (К/К і К/Q + Q/Q) серед тих, хто не палить, у контролі становив 76,5 і 23,5 %, а серед хворих із ГКС – 70,3 і 29,7 % відповідно. У курців частота генотипів за досліджуваним поліморфізмом у контрольній групі дорівнювала 74,2 і 27,6 %, а серед хворих із ГКС – 63,0 і 37,0 % відповідно. Отже, як у тих, хто не палить ($\chi^2 = 0,718$, $P = 0,397$), так і у курців ($\chi^2 = 0,754$, $P = 0,385$) не виявлено статистично значущого зв'язку між поліморфними варіантами гена *ENPP1* та розвитком ГКС.

Не відрізнялася й частота генотипів за K121Q поліморфізмом у курців і тих, хто не палить, у кожній із груп порівняння: у контролі та у хворих із ГКС (табл. 4.16).

Таблиця 4.16 – Частота генотипів за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 у курців і тих, хто не палить, у контрольній групі та у хворих із ГКС

Групи пацієнтів	Генотип		Паління (-)	Паління (+)
Контрольна група	К/К	n	62	21
			76,5 %	72,4 %
	К/Q + Q/Q	n	19	8
			23,5 %	27,6 %
	Разом	n	81	29
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,197; P = 0,657$				
Хворі із ГКС	К/К	n	45	34
			70,3 %	63,0 %
	К/Q + Q/Q	n	19	20
			29,7 %	37,0 %
	Разом	n	64	54
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,715; P = 0,398$				

Примітка. Див. табл. 4.2

У контрольній групі виявлено осіб, які не палять, з генотипом К/К 76,5 %, з генотипом К/Q + Q/Q – 23,5 %, а тих, хто палить відповідно 72,4 і 27,6 %. Порівняння отриманих даних свідчить про відсутність статистично значущих відмінностей у розподілі алельних варіантів за поліморфізмом K121Q між курцями і тими, хто не палить, у групі контролю ($\chi^2 = 0,197; P = 0,657$). Серед хворих із ГКС осіб, які не палять, з генотипом К/К було 70,3 %, з генотипом К/Q + Q/Q – 29,7 %, а курців 63,0 і 37,0 % відповідно. Отримані результати свідчать про те, що у хворих із ГКС відсутні статистично

значущі відмінності між частотою генотипів за вивченим поліморфізмом серед курців і тих, хто не палить, ($\chi^2 = 0,715$; $P = 0,398$).

Проте встановлено відмінність у підгрупах пацієнтів, утворених за окремими алельними варіантами SNP (табл. 4.17).

Таблиця 4.17 – Частота осіб, які палять і не палять, у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1*

Генотип			Контроль	ГКС
К/К	Паління (-)	n	62	45
			74,7 %	57,0 %
	Паління (+)	n	21	34
			25,3 %	43,0 %
	Разом	n	83	79
			100 %	100 %
$\chi^2 = 5,678$; $P =$				
К/Q + Q/Q	Паління (-)	n	19	19
			70,4 %	48,7 %
	Паління (+)	n	8	20
			29,6 %	51,3 %
	Разом	n	27	39
			100 %	100 %
$\chi^2 = 3,062$; $P = 0,080$				

Примітка. Див. табл. 4.2

Серед гомозигот за основним алелем К/К співвідношення курців і тих, які не палять, у групі контролю становило 74,7 і 25,3 %, а у хворих із ГКС – 57,0 і 43,0 % відповідно. Таким чином, в осіб з К/К генотипом встановлено достовірний зв'язок між фактом паління та розвитком ГКС ($\chi^2 = 5,678$; $P = 0,017$). Серед носіїв мінорного алеля К/Q + Q/Q осіб, які не палять, і тих, які палять, у контролі було 70,4 і 29,6 %, а у хворих із ГКС 48,7 і 51,3 %

відповідно. Отже, в осіб з K/Q + Q/Q генотипом достовірного зв'язку між розвитком ГКС та палінням не виявлено ($\chi^2 = 3,062$; P = 0,080).

Аналіз за наявністю ожиріння. Аналіз впливу поліморфних варіантів гена *ENPP1* на розвиток ГКС в осіб з ожирінням і без ожиріння виявив відсутність зв'язку між K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* та ожирінням у хворих із ГКС (табл. 4.18).

У пацієнтів із ГКС, які страждали на ожиріння, співвідношення гомозигот за основним алелем (K/K) і носіїв мінорного алеля (K/Q + Q/Q) становило 70,0 і 30,0 %, тоді як у пацієнтів без ожиріння ці показники дорівнювали 65,4 і 34,6 % відповідно. Відмінності у розподілі різних варіантів генотипів за досліджуванним однонуклеотидним поліморфізмом між хворими з ГКС з ожирінням і без ожиріння не виходили за межі статистичної значущості ($\chi^2 = 0,255$, P = 0,614).

Таблиця 4.18 – Вплив поліморфних K121Q варіантів гена ENPP1 на розвиток ГКС в осіб з ожирінням та без ожиріння

Генотип		Ожиріння (-)	Ожиріння (+)
K/K	<i>n</i>	51	28
		65,4 %	70,0 %
K/Q+ Q/Q	<i>n</i>	27	12
		34,6 %	30,0 %
Разом	<i>n</i>	78	40
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,255$; P = 0,614			

Примітка. Див. табл. 4.2

Аналіз розподілу генотипів у хворих із гострим коронарним синдромом з різним ступенем ожиріння свідчить про відсутність зв'язку K121Q поліморфізму гена *ENPP1* з підвищенням маси тіла ($\chi^2 = 2,467$, P = 0,481) (табл. 4.19).

Таблиця 4.19 – Вплив поліморфних K121Q варіантів гена *ENPP1* на індекс маси тіла (ІМТ) залежно від ступеня ожиріння у хворих із ГКС

<i>Генотип</i>		Немає	I ст., ІМТ = 25–30	II ст., ІМТ = 30–40	III ст., ІМТ ≥ 40
К/К	n	11	40	26	2
		52,4 %	70,2 %	70,3 %	66,7 %
К/Q + Q/Q	n	10	17	11	1
		47,6 %	29,8 %	29,7 %	33,3 %
Разом	n	21	57	37	3
		100 %	100 %	100 %	100 %
$\chi^2 = 2,467; P = 0,481$					

Примітка. Див. табл. 4.2.

Аналіз за показниками вмісту ліпідів у плазмі крові. У таблиці 4.20 наведено дані про вміст загального холестеролу (ХС), холестеролу у складі ліпопротеїнів різної густини (ХС-ЛПНГ, ХС-ЛПДНГ і ХС-ЛПВГ), а також тригліцеридів у плазмі хворих із ГКС із різними варіантами генотипів (К/К і К/Q + Q/Q) за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1*. За наявності відомих концентрацій зазначених ліпідів було обчислено індекс атерогенності (ІА), збільшення якого понад 3 одиниці дає підставу говорити про так звану дисліпопротеїнемію атерогенного характеру (ДАХ) – основний із факторів ризику атеросклерозу та більшості його ускладнень (інфаркту міокарда, ішемічного інсульту).

З одержаних результатів можна стверджувати, що в осіб з генотипом К/К показники ХС-ЛПНЦ та індекс атерогенності достовірно вищі, ніж у носіїв мінорного алеля (К/Q + Q/Q). Так, у хворих із ГКС, гомозигот за основним алелем К/К, показник ХС-ЛПНЦ дорівнював ($4,75 \pm 0,17$) ммоль/л, а з генотипом К/Q + Q/Q – ($4,12 \pm 0,26$) ммоль/л ($P = 0,039$). Індекс атерогенності у хворих із ГКС з К/К генотипом становив ($5,97 \pm 0,31$), а в осіб з генотипом К/Q + Q/Q – ($4,91 \pm 0,40$) ммоль/л ($P = 0,046$). Достовірної різниці в показниках загального ХС ($P = 0,075$), ХС-ЛПДНЦ ($P = 0,598$), ХС-ЛПВЦ ($P = 0,062$) і

тригліцеридів ($P = 0,598$) у хворих із ГКС з різними поліморфними варіантами виявлено не було.

Таблиця 4.20 – Вміст ліпідів плазми крові у хворих із ГКС залежно від варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* ($M \pm m$)

Показники	K/K (n = 79)	K/Q + Q/Q (n = 39)	F	P
Загальний ХС	6,55 ± 0,16	6,05 ± 0,24	1,078	0,075
ХС-ЛПНЩ	4,75 ± 0,17	4,12 ± 0,26	0,222	0,039
ХС-ЛПДНЩ	0,79 ± 0,04	0,83 ± 0,06	0,018	0,598
ХС-ЛПВЩ	1,01 ± 0,03	1,10 ± 0,04	0,162	0,062
Тригліцериди	1,74 ± 0,96	1,83 ± 0,14	0,018	0,598
Індекс атерогенності	5,97 ± 0,31	4,91 ± 0,40	0,924	0,046

Примітка. Усі показники, крім індексу атерогенності, ммоль/л; n – кількість пацієнтів

Поділ пацієнтів на дві підгрупи залежно від величини індексу атерогенності (ІА) (≤ 3 і > 3) дав можливість оцінити вплив генотипу за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* на розвиток ДАХ у хворих із ГКС (табл. 4.21).

Таблиця 4.21 – Частота генотипів за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у хворих із ГКС із різними величинами індексу атерогенності (ІА)

Генотип		ІА ≤ 3	ІА > 3
К/К	n	11	68
		55,0 %	69,4 %
К/Q + Q/Q	n	9	30
		45,0 %	30,6 %
Разом	n	20	98
		100 %	100 %
$\chi^2 = 1,554; P = 0,213$			

Примітка. Див. табл. 4.2

Серед хворих із ГКС, у яких $IA \leq 3$, осіб з К/К генотипом було 55,0 %, а носіїв мінорного алеля К/Q + Q/Q – 45,0 %. Частота алельних варіантів (К/К і К/Q + Q/Q) за досліджуваним поліморфізмом гена *ENPP1* у хворих із ГКС з $IA > 3$ становила 69,4 і 30,6 % відповідно. Проведений аналіз не виявив статистично значущої асоціації цього варіанта SNP із ДАХ ($\chi^2 = 1,554$; $P = 0,213$).

Аналіз за показниками коагуляції крові. Стан процесів згортання крові у хворих із ГКС оцінювали за загальноприйнятими показниками, до яких належать протромбіновий час (ПТЧ) і протромбіновий індекс (ПТІ), тромбіновий час (ТЧ), вміст фібриногену у плазмі крові, інтенсивність спонтанного фібринолізу. Із наведених результатів у табл. 4.22 випливає, що середня величина жодного з цих показників, окрім показника фібринолітичної активності, не залежала від генетичного чинника, який був предметом нашого аналізу.

Таблиця 4.22 – Деякі показники коагуляції крові у хворих із ГКС залежно від варіантів генотипу за К121Q поліморфізмом гена *ENPP1* ($M \pm m$)

Показники	К/К (n = 79)	К/Q+Q/Q (n = 39)	F	P
Протромбіновий час, с	10,43 ± 0,18	11,01 ± 0,31	5,014	0,112
Тромбіновий час, с	17,28 ± 0,48	18,85 ± 0,80	1,257	0,077
Фібриноген, г/л	3,69 ± 0,13	3,64 ± 0,20	0,002	0,817
Фібринолітична активність, с	479,37 ± 4,12	462,31 ± 6,30	1,028	0,022

Примітка: n – кількість пацієнтів

Відмінності між значеннями ПТЧ ($P = 0,122$), ТЧ ($P = 0,077$) і фібриногену ($P = 0,817$) у гомозигот за основним алелем (К/К) і носіїв мінорного алеля (К/Q + Q/Q) виявились статистично не достовірними. Що стосується фібринолітичної активності, то одержані дещо інші результати: у хворих із ГКС з генотипом К/К цей показник дорівнював ($479,37 \pm 4,12$) с, а в

осіб з генотипом K/Q + Q/Q – (462,31 ± 6,30) с. Отже, у хворих із ГКС, гомозигот за основним алелем K/K, показник фібринолітичної активності достовірно вищий, ніж у носіїв мінорного алеля (P = 0,022).

Поділ хворих із ГКС на дві підгрупи за наявністю та відсутністю функціональних і біохімічних ознак гіперкоагуляції крові (ГКК) (схильними до пришвидшеного згортання крові вважали пацієнтів, у яких ПТЧ був < 9 сек, а ПТІ > 110 %) не виявив будь-якого впливу досліджуваного генетичного маркера на ризик розвитку гіперкоагуляційного синдрому ($\chi^2 = 0,019$; P = 0,892) (табл. 4.23). Так, серед хворих із ГКС із наявністю ознак ГКК гомозигот за основним алелем K/K було 68,2 %, а носіїв мінорного алеля K/Q + Q/Q – 31,8 %. Розподіл генотипів (K/K і K/Q + Q/Q) за вивченим K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у хворих із ГКС без ознак ГКК становив 66,7 і 33,3 % відповідно.

Таблиця 4.23 – Зв'язок K121Q поліморфізму гена *ENPP1* з гіперкоагуляцією крові (ГКК) у хворих із ГКС

		ГКК (-)	ГКК (+)
K/K	n	64	15
		66,7 %	68,2 %
K/Q + Q/Q	n	32	7
		33,3 %	31,8 %
Разом	n	96	22
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,019$; P = 0,892			

Примітка. Див. табл. 4.2

Аналіз за наявністю цукрового діабету. Визначення концентрації глюкози натще показало, що величини цього показника у гомозигот за основним алелем K/K та у носіїв мінорного алеля K/Q + Q/Q достовірно не відрізнялися між собою як у хворих із ГКС (P = 0,688), так і у практично здорових осіб (P = 0,154) (табл. 4.24). Інші результати було одержано, коли

аналіз проводився між групами порівняння. Хворі з ГКС – гомозиготи за основним алелем (К/К) – мали достовірно вищий показник концентрації глюкози крові, що дорівнював ($8,0 \pm 0,32$) ммоль/л проти ($5,3 \pm 0,09$) ммоль/л в осіб контрольної групи ($P < 0,001$). У носіїв мінорного алеля (К/Q + Q/Q) хворих із ГКС, величина глюкози крові становила ($7,8 \pm 0,37$) ммоль/л проти ($5,1 \pm 0,14$) ммоль/л у практично здорових індивідуумів ($P < 0,001$).

Таблиця 4.24 – Показники глюкози крові у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 (M ± m)

Показники		K/K	K/Q + Q/Q	F	P
Глюкоза крові, ммоль/л	Контроль	$5,3 \pm 0,09$ (n = 83)	$5,1 \pm 0,14$ (n = 27)	0,343	0,154
	ГКС	$8,0 \pm 0,32$ (n = 79)	$7,8 \pm 0,37$ (n = 39)	1,956	0,688
	P2	< 0,001	< 0,001		

Примітка. Див. табл. 4.5

У пацієнтів із ГКС не виявлено залежності між генотипом за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 і розвитком цукрового діабету ($\chi^2 = 1,717$; $P = 0,190$) (табл. 3.1.25).

Таблиця 4.25 – Зв'язок K121Q поліморфізму гена ENPP1 з цукровим діабетом (ЦД) у хворих із ГКС

		ЦД (-)	ЦД (+)
K/K	n	56	23
		63,6 %	76,7 %
K/Q + Q/Q	n	32	7
		36,4 %	23,3 %
Разом	n	88	30
		100 %	100 %
$\chi^2 = 1,717$; $P = 0,190$			

Примітка. Див. табл. 4.2

Хворих із ГКС, які не страждали на цукровий діабет, з К/К генотипом було 63,6 %, а з К/Q + Q/Q – 36,4 %. Розподіл алельних варіантів (К/К і К/Q + Q/Q) у хворих із ГКС, які страждали на ЦД, становив 76,7 і 23,3 % відповідно.

Вплив SNP на основні характеристики ГКС

За клінічними проявами у хворих із ГКС виділяють ангінозний та інші варіанти гострого коронарного синдрому, до яких відносять астматичну, абдомінальну, аритмічну та безбольову форми. Розподіл алельних варіантів К121Q поліморфізму гена *ENPP1* у хворих із ГКС з ангінозною та іншими клінічними формами наведений на рис. 4.8.

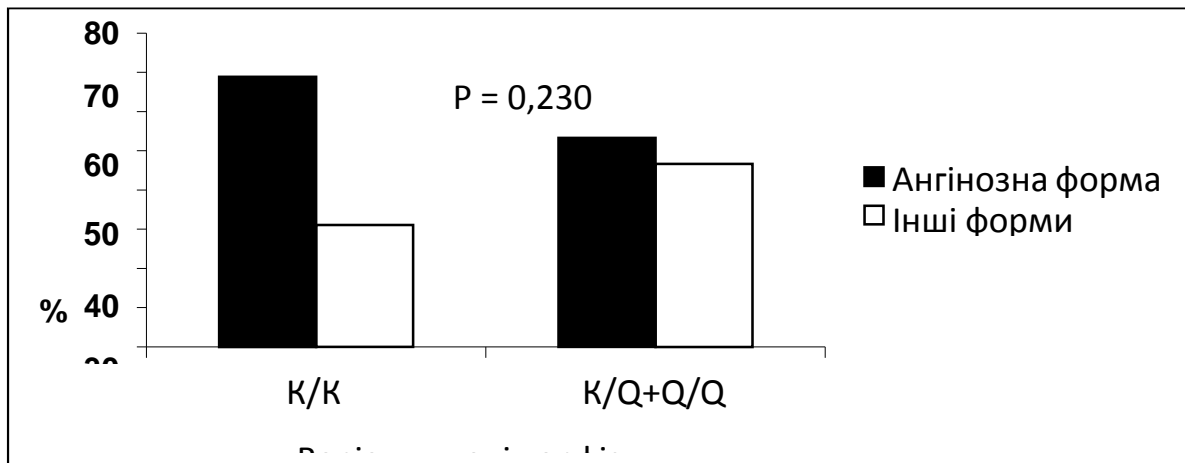


Рисунок 4.8 – Частота алельних варіантів гена *ENPP1* за поліморфізмом К121Q у хворих із ГКС з ангінозною формою (чорні стовпчики) та іншими формами (білі стовпчики). Р – статистична значущість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Так, серед пацієнтів з ангінозною формою ГКС співвідношення різних генотипів (К/К і К/Q + Q/Q) становило 68,9 та 31,1 %, а серед осіб з іншими формами ГКС – 53,3 та 46,7 % відповідно. Статистично достовірної різниці в розподілі алельних варіантів у досліджуваних групах виявлено не було ($\chi^2 = 1,440$; $P = 0,230$).

Під час більш поглибленого аналізу впливу К121Q поліморфізму на варіанти клінічного перебігу у хворих із гострим коронарним синдромом (ангінозний, астматичний, абдомінальний, аритмічний та безбольовий) нами

встановлено відсутність достовірної асоціації досліджуваного генетичного маркера з видами клінічного перебігу ГКС ($\chi^2 = 4,453$; $P = 0,348$) (табл. 4.26).

Таблиця 4.26 – Вплив поліморфних K121Q варіантів гена ENPP1 на варіанти клінічного перебігу у хворих із ГКС

Варіанти клінічного перебігу						
Генотип		Ангі- нозний	Астма- тичний	Абдомі- нальний	Аритміч- ний	Безбольо- вий
K/K	n	71	2	1	3	2
		68,9 %	40,0 %	33,3 %	60,0 %	100,0 %
K/Q + Q/Q	n	32	3	2	2	0
		31,1 %	60,0 %	66,7 %	40,0 %	0 %
Разом	n	103	5	3	5	2
		100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
$\chi^2 = 4,453$; $P = 0,348$						

Примітка. Див. табл. 4.2

До клінічних проявів гострого коронарного синдрому відносять нестабільну стенокардію, не-Q-інфаркт міокарда, Q- та QS-інфаркти міокарда. Одержані результати свідчать, що розподіл алельних варіантів за K121Q поліморфізмом гена *ENPP1* у групах пацієнтів, утворених за цією клінічною ознакою, статистично достовірно не відрізняється (рис. 4.9).

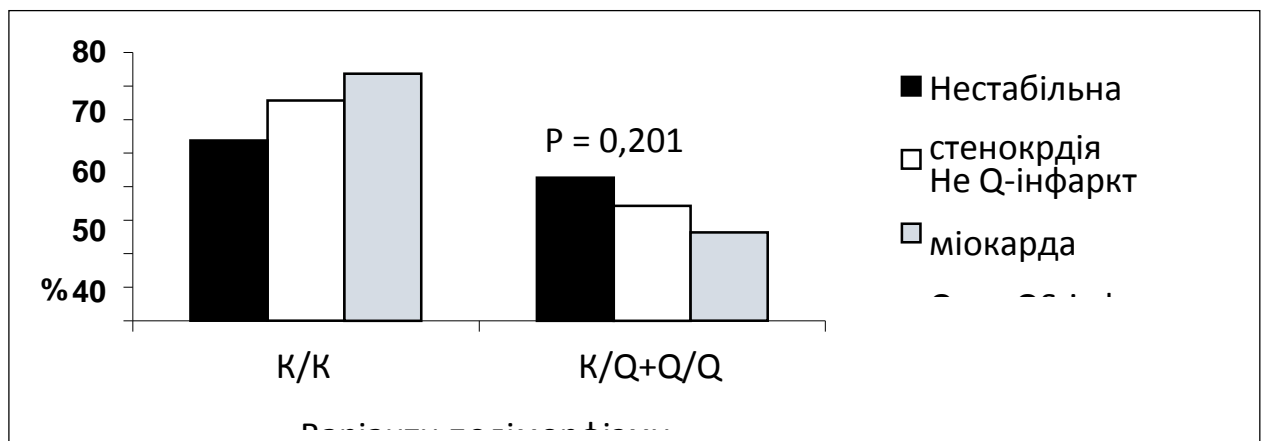


Рисунок 4.9 – Частота алельних варіантів гена *ENPP1* за поліморфізмом K121Q у хворих із нестабільною стенокардією (чорні стовпчики), не- Q- інфарктом міокарда (білі стовпчики), Q- та QS-інфарктами міокарда (сині стовпчики). P – статистична значимість відмінності показників за χ^2 - критерієм Пірсона

Співвідношення генотипів за K121Q поліморфізмом (K/K і K/Q + Q/Q) у пацієнтів із нестабільною стенокардією становило 53,8 і 46,2 %, у хворих із не-Q-інфарктом міокарда відповідні показники дорівнювали 65,7 і 34,3 %, а з Q- та QS-інфарктами – 73,7 і 26,3 %. Отже, відмінності у розподілі поліморфних варіантів за досліджуваним поліморфізмом серед пацієнтів із різними формами ГКС виявилися статистично недостовірними ($\chi^2 = 3,210$, $P = 0,201$).

І нарешті, ми дослідили зв'язок між генотипом хворих за K121Q поліморфізмом та розвитком ускладнень ГКС, до яких належать аритмії, серцева недостатність, тромбоемболії, розриви серця та його частин, кровотечі (табл. 4.27).

Таблиця 4.27 – Частота генотипів за K121Q поліморфізмом гена ENPP1 у хворих із ГКС з ускладненнями та без ускладнень

Генотип		Ускладнення (-)	Ускладнення (+)
K/K	n	63	16
		67,0 %	66,7 %
K/Q + Q/Q	n	31	8
		33,0 %	33,3 %
Разом	n	94	24
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,001; P = 0,974$			

Примітка. Див. табл. 4.2

Співвідношення гомозигот за основним алелем і носіїв мінорного алеля (K/K і K/Q + Q/Q) у групах пацієнтів, що перенесли ГКС без ускладнень становило 67,0 і 33,0%, а тих, які мали ускладнення – 66,7 і 33,3 % відповідно і достовірно не відрізнялося ($\chi^2 = 0,001; P = 0,974$).

Під час детального аналізу впливу поліморфних K121Q варіантів гена ENPP1 на ускладнення у хворих із ГКС (аритмії, серцева недостатність,

тромбоемболії, розриви серця та його частин, кровотечі) достовірного зв'язку також не виявлено ($\chi^2 = 3,477$; $P = 0,627$) (табл. 4.28).

Таблиця 4.28 – Вплив поліморфних K121Q варіантів гена *ENPP1* на ускладнення у хворих із ГКС

Ускладнення							
Генотип		Немає	Аритмії	Серцева недостатність, в т.ч. шок	Тромбоемболії	Розрив серця та його частин	Крово-течі
К/К	n	63	4	7	2	2	1
		67,0 %	66,7%	53,8 %	100 %	100 %	100,0 %
К/Q + Q/Q	n	31	2	6	0	0	0
		33,0 %	33,3%	46,2 %	0 %	0 %	0 %
Разом	n	94	6	13	2	2	1
		100 %	100%	100 %	100 %	100 %	100 %
$\chi^2 = 3,477$; $P =$							

Примітка. Див. табл. 4.2

Таким чином, у результаті проведеного аналізу зв'язку K121Q поліморфізму гена *ENPP1* із розвитком ГКС та факторами його ризику встановлено, що вивчений поліморфізм не асоційований із виникненням ГКС. Проте доведений зв'язок K121Q поліморфних варіантів з деякими факторами ризику ГКС. Так, ризик виникнення захворювання в осіб з ІМТ < 25 кг/м², які є носіями мінорного алеля (К/Q + Q/Q), у 3,9 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (К/К). Доведений достовірний зв'язок між фактом паління та розвитком ГКС у пацієнтів з генотипом К/К. Виявлено асоціацію K121Q поліморфізму з порушеннями ліпопротеїнового обміну та коагуляції крові у хворих із гострим коронарним синдромом: у гомозигот за основним алелем К/К фібринолітична активність, концентрація ХС-ЛПНЩ та індекс атерогенності достовірно вищі, ніж у осіб з іншими генотипами.

ВИСНОВКИ

1. Уперше на сучасному методичному рівні отримана інформація про розподіл різних алельних варіантів генів MGP, ENPP1 у практично здорових представників української популяції.

2. У хворих з гострим коронарним синдромом А/А варіант гена MGP (поліморфізм G-7A) виявляється в 3,4 раза частіше, ніж у здорових донорів, що свідчить про його асоціацію зі збільшенням ризику розвитку гострого коронарного синдрому в українській популяції.

3. Установлено, що в осіб з ІМТ $< 25 \text{ кг/м}^2$, носіїв мінорного алеля K/Q +Q/Q гострий коронарний синдром виникає в 3,9 раза ($P = 0,029$; OR = 3,939) частіше, ніж у гомозигот за основним алелем K/K. Серед пацієнтів з генотипом K/K установлений зв'язок розвитку ГКС із надмірною вагою ($P = 0,008$). У гомозигот за основним алелем K/K, тих, які палять, ГКС виникає достовірно частіше, ніж у тих, які не палять ($P = 0,017$).

4. Поліморфний варіант K121Q асоційовані із порушеннями ліпопротеїнового обміну та коагуляції крові у хворих з ГКС. В осіб з K/K генотипом показники фібринолітичної активності ($P = 0,022$), рівень ХС-ЛПНЩ ($P = 0,039$) та індекс атерогенності ($P = 0,046$) достовірно вищі, ніж у носіїв інших генотипів.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Медико-демографічний атлас України: екологічні передумови міжрегіональних варіацій захворюваності та смертності населення, 2008 рік / В. П. Войтенко, А. В. Пісарук, Н. М. Кошель та ін. – К. : Фенікс, 2010. – Вип. 11. – 40 с.
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. Ischemic Heart Disease. 130 Questions & Answers / R. Ferrari, M. Lettino, C. Seconi et al. – 2-nd Edition. – Paris : Fransa Servier, 2006. – 305 p.
4. Пархоменко А. Н. Новые аспекты патогенеза и лечения больных с нестабильной стенокардией и мелкоочаговым инфарктом миокарда / А. Н. Пархоменко, Я. М. Лутай // Український медичний часопис. – 2000. – № 4. – С. 17–26.
5. Атаман О. В. Патолофізіологія : підручник : в 2 т. Т. 2. Патолофізіологія органів і систем / О. В. Атаман. – Вінниця : Нова книга, 2016. – 444 с.
6. Multimarker approach to risk stratification in non–ST elevation acute coronary syndromes / M. S. Sabatine, D. A. Morrow, J. A. de Lemos et al. // Circulation. – 2002. – Vol.105. – P. 1760–1763.
7. Schmermund A. Unstable Coronary Plaque and Its Relation to Coronary Calcium / A. Schmermund, R. Erbel // Circulation. – 2001. – Vol. 104. – P. 1682–1687.
8. Талаева Т. В. Сосудистая кальцификация: реальность и гипотезы / Т. В. Талаева, В. В. Братусь // Здоров'я України. Кардіологія. Наука – практиці. – 2014, лютий. – С. 56–60.
9. Coronary Calcium as a Predictor of Coronary Events in Four Racial or Ethnic Groups / R. Detrano, A. D. Guerci, J. J. Carr et al. // The New England Journal of Medicine. – 2008. – Vol. 358. – P. 1336–1345.

10. Coronary Artery Calcium Score and Risk Classification for Coronary Heart Disease Prediction / T. S. Polonsky, R. L. McClelland, N. W. Jorgensen et al. // *Journal of the American Medical Association*. – 2010. – Vol. 303, № 16. – P. 1610–1616.
11. Absence of Coronary Artery Calcification and All-Cause Mortality / M. Blaha, M. J. Budoff, L. J. Shaw et al. // *Cardiovascular imaging*. – 2009. – Vol. 2, № 6. – P. 692–700.
12. Towler D. A. Inorganic Pyrophosphate. A Paracrine Regulator of Vascular Calcification and Smooth Muscle Phenotype / D. A. Towler // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2005. – Vol. 25. – P. 651–654.
13. Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes / T. Clement, V. Salone, B. Charpentier et al. // *Bio-medical materials and engineering*. – 2014. – Vol. 24. – P. 3–16.
14. 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.
15. Renal calcium stones: insights from the control of bone mineralization / S. H. Moochhala, J. A. Sayer, G. Carr, N. L. Simmons // *Exp. Physiol*. – 2007. – Vol. 93, №1. – P. 43–49.
16. Inhibition of osteoblast mineralization by phosphorylated phage-derived apatite-specific peptide / J. Ramaswamy, H. K. Nam, H. Ramaraju et al. // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 73. – P. 120–130.
17. Counter-regulatory phosphatases TNAP and NPP1 temporally regulate tooth root cementogenesis / L. E. Zweifler, M. K. Patel, F. H. Nociti et al. // *International Journal of Oral Science*. – 2014. – Vol. 1. – P. 1–15.
18. Abnormal Mechanical Loading Induces Cartilage Degeneration by Accelerating Meniscus Hypertrophy and Mineralization After ACL Injuries In Vivo / G. Du, H. Zhan, D. Ding et al. // *Am. J. Sports Med*. – 2016. – DOI : 10.1177/0363546515621285.

19. Alexopoulos N. Calcification in atherosclerosis / N. Alexopoulos, P. Raggi // *Nat. Rev. Cardiol.* – 2009. – Vol. 6. – P. 681–688.
20. Coronary calcification identifies the vulnerable patient rather than the vulnerable Plaque / A. Mauriello, F. Servadei, G. B. Zoccai et al. // *Atherosclerosis.* – 2013. – Vol. 229, № 1. – P. 124–129.
21. Aortic stenosis, atherosclerosis and skeletal bone: is there a common link with calcification and inflammation? / M. Dweck, J. H. Khaw, G. K. Sng et al. // *Eur Heart J.* – 2013. – Vol. 34 (21). – P. 1567–1574.
22. Лутай М. И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез / М. И. Лутай // *Український кардіологічний журнал.* – 2004. – № 1. – С. 22–34.
23. Coronary calcium: the good, the bad and the uncertain / T. M. Doherty, R. C. Detrano, S. L. Mautner et al. // *Am. Heart J.* – 1999. – Vol. 137 (5). – P. 806–814.
24. Терновой С. К. Неинвазивная диагностика атеросклероза и кальциноза коронарных артерий / С. К. Терновой, В. Е. Синицин, Н. В. Гагарина. – М. : Атмосфера, 2003. – С. 144.
25. Becker C. R. Assessment of coronary arteries with CT / C. R. Becker // *Radiol Clin N Am.* – 2002. – Vol. 40. – P. 773–782.
26. Otsuka F. Do vulnerable and ruptured plaques hide in heavily calcified arteries? / F. Otsuka, A. V. Finn, R. Virmani // *Atherosclerosis.* – 2013. – Vol. 229 (1). – P. 34–37.
27. Севергина Л. О. Морфогенез нестабильной атеросклеротической бляшки и ее роль в развитии острого коронарного синдрома / Л. О. Севергина // *Архив патологии.* – 2005. – № 3. – С. 51–54.
28. Некроз и кальцификация коронарных артерий при хронической форме ишемической болезни сердца / В. С. Жданов, С. П. Веселова, И. П. Дробкова и др. // *Терапевт. архив.* – 2010. – Т. 82, № 12. – С. 16–18.
29. Гагарина Н. В. Кальциноз коронарных артерий: методы диагностики, клинические результаты, практическая значимость / Н. В. Гагарина,

- В. Е. Синицин, С. К. Терновой // Медицинская визуализация. – 2000. – № 3. – С. 23–28.
30. Calcified carotid atherosclerotic plaque is associated less with ischemic symptoms than is noncalcified plaque on MDCT / K. R. Nandalur, E. Baskurt, K. D. Hagspiel et al. // *Am. J. Roentgenol.* – 2005. – Vol. 184 (1). – P. 295–298.
31. Multidetector row CT of the brain and carotid artery: a correlative analysis / L. Saba, R. Montisci, R. Sanfilippo, G. Mallarini // *Clin. Radiol.* – 2009. – Vol. 64. – P. 767–778.
32. Лутай М. И. Кальциноз венечных артерий, аорты, клапанов сердца и ишемическая болезнь сердца: патофизиология, взаимосвязь, прогноз, стратификация риска Часть 2. Кальциноз венечных артерий: диагностика, интерпретация данных, взаимосвязь с другими диагностическими методами выявления ишемической болезни сердца / М. И. Лутай, И. П. Голикова // *Український кардіологічний журнал.* – 2015. – № 1. – С. 92–102.
33. Abedin M. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications / M. Abedin, Y. Tintut, L. Demer // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1161–1170.
34. Особенности кальциноза коронарного и некоронарного сосудистого русла у больных мультифокальным атеросклерозом / А. Н. Коков, В. Л. Масенко, Е. Б. Малюта и др. // *Радиология. Практика.* – 2013. – № 1. – С. 29–36.
35. Механизмы формирования кальцификации артерий / Ф. Т. Агеев, И. В. Баринова, Е. М. Середенина и др. // *Кардиологический вестник.* – 2012. – Т.7, № 2. – С. 57–63.
36. Inflammation and the Osteogenic Regulation of Vascular Calcification: A Review & Perspective / J.-S. Shao, S.-L. Cheng, J. Sadhu, D. A. Towler // *Hypertension.* – 2010. – Vol. 55, № 3. – P. 579–592.
37. Vattikuti R. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective / R. Vattikuti, D. A. Towler // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2004. – Vol. 286 (5). – P. 686–696.

38. Demer L. L. Vascular calcification. Pathobiology of a multifaceted disease / L. L. Demer, Y. Tintut // *Circulation*. – 2008. – Vol. 117. – P. 2938–2948.
39. Calcification in atherosclerosis: Bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads / T. M. Doherty, K. Asotra, L. A. Fitzpatrick et al. // *PNAS*. – 2003. – Vol. 100 (20). – P. 11201–11206.
40. Jednacz E. Atherosclerosis in Juvenile Idiopathic Arthritis / E. Jednacz, L. Rutkowska-Sak // *Mediators of Inflammation Volume*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–5.
41. O'Brien K. D. Pathogenesis of Calcific Aortic Valve Disease A Disease Process Comes of Age (and a Good Deal More) / K. D. O'Brien // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2006. – Vol. 26. – P. 1721–1728.
42. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis / J. J. Kaden, C. E. Dempfle, R. Grobholz et al. // *Cardiovasc Pathol*. – 2005. – Vol. 14. – P. 80–87.
43. Fuster V. Early identification of atherosclerotic disease by noninvasive imaging / V. Fuster, F. Lois, M. Franco // *Nat. Rev. Cardiol*. – 2010. – Vol. 7. – P. 327–333.
44. Аронов Д. М. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза / Д. М. Аронов, В. П. Лупанов // *Атеросклероз и дислипидемии*. – 2011. – № 1. – С. 48–56.
45. Hruska K. A. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Calcification / K. A. Hruska, S. Mathew, G. Saab // *Circ. Res*. – 2005. – Vol. 97. – P. 105–114.
46. Karsenty G. Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation / G. Karsenty // *Endocrinology*. – 2001. – Vol. 142 (7). – P. 2731–2733.
47. Transgenic Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Vascular Endothelium Results in Generalized Arterial Calcification / A. Y. Savinov, M. Salehi, M. C. Yadav et al. // *J. Am. Heart. Assoc*. – 2015. – Vol. 4. – DOI : 10.1161/JAHA.115.002499.
48. Шишкова В. Н. Клиническая взаимосвязь остеопороза и атеросклероза / В. Н. Шишкова // *Фарматека. Остеопороз*. – 2012. – № 1 (12). – С. 17–21.

49. Komari T. Regulation of osteoblast differentiation by RUNX 2 / T. Komari // Osteoimmunology. – 2010. – Vol. 658, № 1. – P. 43–49.
50. Chen G. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation / G. Chen, C. Deng, Y. P. Li // Int. J. Biol. Sci. – 2012. – Vol. 8, № 2. – P. 272–288.
51. Камиллов Ф. Х. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция / Ф. Х. Камиллов, Е. Р. Фаршатова, Д. А. Еникеев // Fundamental research. – 2014. – № 7 (4). – С. 836–842.
52. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation / K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel et al. // Cell. – 2002. – Vol. 108. – P. 17–29.
53. Osteoprotegerin as a Predictor of Coronary Artery Disease and Cardiovascular Mortality and Morbidity Shreenidhi / M. Venuraju, A. Yerramasu, R. Corder et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 2010. – Vol. 55 (19). – P. 2049–2061.
54. Ярославцева М. В. Система остеопротегерин (OPG) – лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL) при диабетической нейроостеоартропатии и облитерирующем атеросклерозе артерий нижних конечностей / М. В. Ярославцева, И. Н. Ульянова, Г. Р. Галстян // Сахарный диабет. – 2007. – № 2. – С. 24–27.
55. Osteoprotegerin Inhibits Vascular Calcification Without Affecting Atherosclerosis in *ldlr*^(-/-) Mice / S. Morony, Y. Tintut, Z. Zhang et al. // Circulation. – 2008. – Vol. 117. – P. 411–420.
56. Sage A. P. Regulatory mechanisms in vascular calcification / A. P. Sage, J. Tintut, L. L. Demer // Nat. Rev. Cardiol. – 2010. – Vol. 7 (9). – P. 528–536.
57. Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both *Lrp5* and *p6* / S. L. Holmen, T. A. Giambernardi, C. R. Zylstra et al. // J. Bone Miner. Res. – 2004. – Vol. 19. – P. 2033–2040.
58. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease / S. Jono, Y. Ikari, A. Shioi et al. // Circulation. – 2002. – Vol. 106 (10). – P. 1192–1194.

59. Browner W. S. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women / W. S. Browner, L. Y. Lui, S. R. Cummings // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. – Vol. 86 (2). – P. 631–637.
60. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand in Monckebergs sclerosis and atherosclerosis / M. Schoppet, N. Al-Fakhri, F. Franke et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2004. – Vol. 89, № 8. – P. 4104–4112.
61. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells / U. M. Malyankar, M. Scatena, K. L. Suchland et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275 (28). – P. 20959–20962.
62. Schoppet M. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function / M. Schoppet, K. T. Preissner, L. C. Hofbauer // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – Vol. 22 (4). – P. 549–553.
63. Expression of mineralization-regulating proteins in association with human vascular calcification / C. M. Shanahan, D. Proudfoot, K. L. Tyson et al. // *Z. Kardiol.* – 2000. – Vol. 89, № 2. – P. 63–68.
64. Characterization of vitamin K-dependent carboxylase mutations that cause bleeding and non-bleeding disorders / J. K. Tie, J. D. Carneiro, D. Y. Jin et al. // *Blood.* – 2016. – Jan 12. – DOI : <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-10-677633>.
65. Schurgers L. J. Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K / L. J. Schurgers, E. C. M. Cranenburg, C. Vermeer // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 100. – P. 593–603.
66. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein / G. Luo, P. Ducy, M. D. McKee et al. // *Nature.* – 1997. – Vol. 686 (6). – P. 78–81.

67. Matrix GLA Protein Modulates Differentiation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 in C3H10T1/2 Cells / K. Bostrom, D. Tsao, S. Shen et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, No. 17. – P. 14044–14052.
68. Effect of vitamin K2 on progression of atherosclerosis and vascular calcification in nondialyzed patients with chronic kidney disease stages 3–5 / I. Kurnatowska, P. Grzelak, A. Masajtis-Zagajewska et al. // *Polskie archiwum medycyny wewnetrznej.* – 2015. – Vol. 125 (9). – P. 631–640.
69. Novel Conformation-Specific Antibodies Against Matrix γ -Carboxyglutamic Acid (Gla) Protein Undercarboxylated Matrix Gla Protein as Marker for Vascular Calcification / L. J. Schurgers, K. J. F. Teunissen, H. J. Marjo et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 1629–1633.
70. The presence of γ -carboxyglutamic acid in the proteins associated with ectopic calcification / J. B. Lian, M. Skinner, M. J. Glimcher et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1976. – Vol. 73. – P. 349–356.
71. Levy R. J. Carboxyglutamic acid (Gla) containing proteins of human calcified atherosclerotic plaque solubilized by EDTA / R. J. Levy, S. L. Howard, L. J. Oshry // *Atherosclerosis.* – 1986. – Vol. 59. – P.155–160.
72. Scatena M. Osteopontin A Multifunctional Molecule Regulating Chronic Inflammation and Vascular Disease / M. Scatena, L. Liaw, C. M. Giachelli // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P.2302–2309.
73. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification / S. A. Steitz, M. Y. Speer, M. D. McKee et al. // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 161. – P. 2035–2046.
74. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo / M. Y. Speer, M. D. McKee, R. E. Guldberg et al. // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196. – P. 1047–1055.
75. Linked deficiencies in extracellular PP(i) and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression / K. Johnson,

- J. Goding, D. Van Etten et al. // *J. Bone Miner. Res.* – 2003. – Vol. 18 (6). – P. 994–1004.
76. Zhang Y. Investigation of the role of ENPP1 and TNAP genes in chondrocalcinosis / Y. Zhang, M. A. Brown, C. Peach // *Rheumatology.* – 2007. – Vol. 46. – P. 586–589.
77. 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.
78. ENPP1 K121Q Genotype Not Associated with Coronary Artery Calcification in Korean Patients with Type 2 Diabetes Mellitus / D. J. Jeong, D. G. Lee, H. J. Kim et. al. // *Korean Diabetes J.* – 2010. – Vol. 34. – P. 320–326.
79. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1^{-/-} mice / K. Johnson, M. Polewski, van D. Etten et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 686–691.
80. Loss-of-function ENPP1 mutations cause both generalized arterial calcification of infancy and autosomal-recessive hypophosphatemic rickets / B. Lorenz-Depiereux, D. Schnabel, D. Tiosano et al. // *The American Journal of Human Genetics.* – 2010. – Vol. 86. – P. 267–272.
81. The Mutational Spectrum of ENPP1 as Arising After the Analysis of 23 Unrelated Patients with Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI) / N. Ruf, B. Uhlenberg, R. Terkeltaub et al. // *Mutation in Brief.* – 2005. – Vol. 768. – P. 1–7.
82. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients / M. Rodriguez-Garcia, C. Gomez-Alonso, M. Naves-Diaz et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2009. – Vol. 24. – P. 239–246.
83. Martinet W. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation / W. Martinet, M. M. Kockx // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 535–541.

84. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat / H. T. Kha, B. Basseri, D. Shouhed et al. // *J. Bone Miner. Res.* – 2004. – Vol. 19. – P. 830–840.
85. Stefan C. Modulation of purinergic signaling by NNP-type ectophosphodiesterases / C. Stefan, S. Jansen, M. Bollen // *Purinergic. Signal.* – 2006. – Vol. 2. – P. 361–370.
86. Goding J. W. Physiological and pathophysiological functions of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family / J. W. Goding, B. Grobden, H. Slegers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease.* – 2003. – Vol. 1638, № 1. – P. 1–19.
87. Johnson K. Inorganic pyrophosphate (PPI) in pathologic calcification of articular cartilage / K. Johnson, R. Terkeltaub // *Front Biosci.* – 2005. – Vol. 10. – P. 988–997.
88. Belli S. I. Biochemical characterization of human PC-1, an enzyme possessing alkaline phosphodiesterase I and nucleotide pyrophosphatase activities / S. I. Belli, J. W. Goding // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – Vol. 226. – P. 433–443.
89. The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities / I. D. Goldfine, B. A. Maddux, J. F. Youngren et al. // *Endocrine Reviews.* – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 62–75.
90. Stefan C. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity / C. Stefan, S. Jansen, M. Bollen // *Trends in Biochemical Sciences.* – 2005. – Vol. 30 (10). – P. 542–550.
91. Ecto-phosphodiesterase / pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family / J. W. Goding, R. Terkeltaub, M. Maurice et al. // *Immunotogtoi Reviews.* – 1998. – Vol. 161. – P. 11–26.
92. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family / H. Sakagami, J. Aoki, Y. Natori et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 23084–23093.

93. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6 / Y. Nitschke, G. Baujat, U. Botschen et al. // *The American Journal of Human Genetics*. – 2012. – Vol. 90. – P. 25–39.
94. Differential detergent resistance of the apical and basolateral NPPases: relationship with polarized targeting / J. L. Delaunay, M. Breton, J. W. Goding et al. // *J. Cell Sci*. – 2007. – Vol. 120. – P. 1009–1016.
95. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides / H. Zimmermann // *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*. – 2000. – Vol. 362. – P. 299–309.
96. Gijbers R. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1 / R. Gijbers, H. Ceulemans, M. Bollen // *Biochem. J*. – 2003. – Vol. 371. – P. 321–330.
97. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases on the move / M. Bollen, R. Gijbers, H. Ceulemans, C. Stefan // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. – 2000. – Vol. 35. – P. 393–432.
98. Biochemical analysis of ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase activity in brain membranes indicates involvement of NPP1 isoenzyme in extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates in central nervous system / A. C. Asensio, C. R. Rodríguez-Ferrera, A. Castañeyra-Perdomo et al. // *Neurochem. Int*. – 2007. – Vol. 50. – P. 581–590.
99. Zimmermann H. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases / H. Zimmermann, M. Zebisch, N. Sträter // *Purinergic Signalling*. – 2012. – Vol. 8. – P. 437–502.
100. Picher M. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways – implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis / M. Picher, L. H. Burch, R. C. Boucher // *J. Biol. Chem*. – 2004. – Vol. 279. – P. 20234–20241.

101. Picher M. Biochemical evidence for an ectoalkaline phosphodiesterase I in human airways / M. Picher, R. C. Boucher // *Amer. J. Respir. Cell Molec. Biol.* – 2000. – Vol. 23. – P. 255–261.
102. Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis / E. R. Lazarowski, R. Tarran, B. R. Grubb et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 36855–36864.
103. Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (E-NPP1/PC-1) and -3 (E-NPP3/CD203c/PD-Ibeta/B10/gp130(RB13-6)) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases / Y. Yano, Y. Hayashi, K. Sano et al. // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 207. – P. 139–147.
104. Extracellular ATP activates c-Jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes / S. Thevananther, H. Sun, D. Li et al. // *Hepatology.* – 2004. – Vol. 39. – P. 393–402.
105. ENPP1 K121Q polymorphism is not related to type 2 diabetes mellitus, features of metabolic syndrome, and diabetic cardiovascular complications in a Chinese population / M. P. Chen, F. M. Chung, D. M. Chang et al. // *The Review of Diabetic Studies.* – 2006. – Vol. 3, № 1. – P. 21–30.
106. ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve / N. Côté, D. E. Husseini, A. Pépin et al. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* – 2012. – Vol. 52. – P. 1191–1202.
107. Takahashi T. Surface alloantigens of plasma cells / T. Takahashi, L. J. Old, E. A. Boyse // *J. Exp. Med.* – 1970. – Vol. 131. – P. 1325–1341.
108. Van Driel I. R. Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. Primary structure deduced from cDNA clones / I. R. van Driel, J. W. Goding // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262. – P. 4882–4887.
109. Plasma cell membrane glycoprotein PC-1. cDNA cloning of the human molecule, amino acid sequence, and chromosomal location / M. F. Buckley, K. A. Loveland, W. J. McKinstry, O. M. Garson // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 17506–17511.

110. The plasma cell membrane glycoprotein, PC- 1, is a threonine-specific protein kinase stimulated by acidic fibroblast growth factor / Y. Oda, M.-D. Kuo, S. S. Huang, J. S. Huang // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, № 25. – P. 16791–16795.
111. Association between the ENPP1 K121Q polymorphism and risk of diabetic kidney disease: a systematic review and meta-analysis / D. A. Sortica, M. P. Buffon, B. M. Souza et al. // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 1–13.
112. Glucocorticoid hormones increase the activity of plasma membrane alkaline phosphodiesterase I in rat hepatoma cells / G. G. Rousseau, A. Amar-Costesec, M. Verhaegen, D. K. Granner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – Vol. 77, № 2. – P. 1005–1009.
113. Expression of the nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase PC-1 is induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) and modulated by activation of the protein kinase A and C pathways in osteoblast-like osteosarcoma cells / J. L. Solan, L. J. Deftos, J. W. Goding, R. A. Terkeltaub // *J. Bone Miner. Res.* – 1996. – Vol. 11. – P. 183–192.
114. Interleukin 1 β suppresses transforming growth factor-induced inorganic pyrophosphate (PPi) production and expression of the PPi-generating enzyme PC-1 in human chondrocytes / M. Lotz, F. Rosen, G. McCabe et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 10364–10368.
115. Regulation of purified hepatic PC-1 (phosphodiesterase-I/nucleotide pyrophosphatase) by threonine auto(de)phosphorylation and by binding of acidic fibroblast growth factor / M. Uriarte, W. Stalmans, S. Hickman, M. Bollen // *Biochem. J.* – 1995. – Vol. 306. – P. 271–277.
116. Abhishek A. Pathophysiology of articular chondrocalcinosis – role of ANKH / A. Abhishek, M. Doherty // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 96–104.
117. ENPP1 K121Q polymorphism and obesity, hyperglycaemia and type 2 diabetes in the prospective DESIR Study / D. Meyre, N. Bouatia-Naji, V. Vatin et al. // *Diabetologia.* – 2007. – Vol. 50. – P. 2090–2096.

118. Haplotype structure of the ENPP1 gene and nominal association of the K121Q missense single nucleotide polymorphism with glycemic traits in the Framingham Heart Study / E. S. Stolerman, A. K. Manning, J. B. McAteer et al. // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 1971–1977.
119. No evidence of association of ENPP1 variants with type 2 diabetes or obesity in a study of 8,089 U. K. Caucasians / M. N. Weedon, B. Shields G. Hitman et al. // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 3175–3179.
120. Common variants in the ENPP1 gene are not reproducibly associated with diabetes or obesity / H. N. Lyon, J. C. Florez, T. Bersaglieri et al. // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 3180–3184.
121. Association of the ENPP1 K121Q polymorphism with susceptibility to type 2 diabetes in different populations: evidence based on 40 studies / S. T. Tang, X. R. Shen, H. Q. Tang et al. // *Endocr. J.* – 2014. – Vol. 61, № 11. – P.1093–1103.
122. Association of the *ENPP1* K121Q polymorphism with type 2 diabetes and obesity in the Moroccan population / Y. El Achhab, D. Meyre, N. Bouatia-Naji et al. // *Diabetes Metab.* – 2009. – Vol. 35, № 1. – P. 37–42.
123. Seo H. J. The K121Q polymorphism in ENPP1 (PC-1) is not associated with type 2 diabetes or obesity in Korean male workers / H. J. Seo, S. G. Kim, O. J. Kwon // *J. Korean Med. Sci.* – 2008. – Vol. 23, № 3. – P. 459–464.
124. Association of the distal region of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 gene with type 2 diabetes in an African-American population enriched for nephropathy / K. L. Keene, J. C. Mychaleckyj, S. G. Smith et al. // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 1057–1062.
125. The ENPP1 K121Q polymorphism is associated with type 2 diabetes in European populations / J. B. McAteer, S. Prudente, S. Bacci et al. // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 1125–1130.
126. Studies of the relationship between the ENPP1 K121Q polymorphism and type 2 diabetes, insulin resistance and obesity in 7,333 Danish white subjects /

- N. Grarup, S. A. Urhammer, J. Ek et al. // *Diabetologia*. – 2006. – Vol. 49. – P. 2097–2104.
127. A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance / A. Pizzuti, L. Frittitta, A. Argiolas et al. // *Diabetes*. – 1998. – Vol. 48. – P. 1881–1884.
128. Li Y. Y. ENPP1 K121Q polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Chinese population: a meta-analysis including 11 855 subjects / Y. Y. Li // *Metabolism. Clinical and Experimental*. – 2012. – Vol. 61. – P. 625–633.
129. Wang C. H. Evaluation of the ENPP1 and PLIN single nucleotide polymorphisms with type 2 diabetes in a Taiwanese population: evidence for replication and gene-gene interaction / C. H. Wang, W. S. Ke, E. Lin // *Journal of Investigative Medicine*. – 2012. – Vol. 60, № 8. – P. 1169–1173.
130. ENPP1/PC-1 K121Q polymorphism and genetic susceptibility to type 2 diabetes in North Indians / J. S. Bhatti, G. K. Bhatti, S. S. Mastana et al. // *Mol. Cell Biochem*. – 2010. – Vol. 345. – P. 249–257.
131. The ENPP1 K121Q polymorphism is not associated with type 2 diabetes and related metabolic traits in an Iranian population / H. Saberi, N. Mohammadtaghvaei, S. Gulkho et al. // *Mol Cell Biochem*. – 2011. – Vol. 350. – P. 113–118.
132. Association of K121Q polymorphism in ENPP1 (PC-1) with BMI in Caucasian and African-American adults / N. Matsuoka, A. Patki, H. K. Tiwari et al. // *International Journal of Obesity*. – 2006. – Vol. 30. – P. 233–237.
133. The role of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 in diabetic nephropathy / D. A. Sortica, D. Crispim, G. P. Zaffari et al. // *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. – 2011. – Vol. 55 (9). – P. 677–685.
134. Lin C. C. Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 K173Q polymorphism is associated with diabetic nephropathy in the Taiwanese population / C. C. Lin, C. T. Wu, L. S. H. Wu // *Genetic testing and molecular biomarkers*. – 2011. – Vol. 15, № 4. – P. 239–242.

135. Association of ENPP1 (PC-1) K121Q polymorphism with obesity-related parameters in subjects with metabolic syndrome / J. L. González-Sánchez, C. Zabena, M. T. Martínez-Larrad et al. // *Clin. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 68, № 5. – P. 724–729.
136. ENPP1 variants and haplotypes predispose to early onset obesity and impaired Gglucose and insulin metabolism in German obese children / Y. Böttcher, A. Körner, T. Reinehr et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2006. – Vol. 91, № 12. – P. 4948–4952.
137. The Q121 variant of ENPP1 may protect from childhood overweight/obesity in the Italian population / A. Morandi, L. Pinelli, A. Petrone et al. // *Obesity.* – 2009. – Vol. 17, № 1. – P. 202–206.
138. ENPP1/PC-1 gene K121Q polymorphism is associated with obesity in European adult populations: evidence from a meta-analysis involving 24324 subjects / R. Q. Wang, D. H. Zhou, B. Xi et al. // *Biomed. Environ. Sci.* – 2011. – Vol. 24, № 2. – P. 200–206.
139. Association of genetic variation in ENPP1 with obesity-related phenotypes / C. P. Jenkinson, D. K. Coletta, M. Flechtner-Mors et al. // *Obesity.* – 2008. – Vol. 16. – P. 1708–1713.
140. Further evidence for the role of ENPP1 in obesity: association with morbid obesity in Finns / K. Valli-Jaakola, E. Suviolahti, C. Schalin-Jäntti et al. // *Obesity.* – 2008. – Vol. 16. – P. 2113–2119.
141. Gender differences in the relationship of ENPP1/PC-1 variants to obesity in a Turkish population / S. Tanyolaç, R. W. Mahley, U. Hodoglugil, I. D. Goldfine // *Obesity.* – 2008. – Vol. 16. – P. 2468–2471.
142. Stefanović V. Plasma cell membrane glycoprotein 1 (PC-1): a marker of insulin resistance in obesity, uremia and diabetes mellitus / V. Stefanović, S. Antić // *Clinical Laboratory.* – 2004. – Vol. 50. – P. 271–278.
143. Shared ancestral susceptibility to colorectal cancer and other nutrition related diseases / S. Huhn, M. Bevier, A. Rudolph et al. // *BMC Medical Genetics.* – 2012. – Vol. 13 (94). – P. 1–12.

144. Polycystic ovary syndrome is associated with genetic polymorphism in the insulin signaling gene IRS-1 but not ENPP1 in a Japanese population / T. Baba, T. Endo, F. Sata et al. // *Life Sciences*. – 2007. – Vol. 81. – P. 850–854.
145. Association of the polymorphism of codon 121 in the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 gene with polycystic ovary syndrome in Chinese women / Y. Shi, X. Sun, Z. Chen et al. // *Saudi Medical Journal*. – 2008. – Vol. 29, № 8. – P. 1119–1123.
146. Association of ENPP1 gene polymorphisms with hand osteoarthritis in a Chuvasha population / E. K. Suk, I. Malkin, S. Dahm et al. // *Arthritis Research & Therapy*. – 2005. – Vol. 7. – P. 1082–1090.
147. Autosomal-recessive hypophosphatemic rickets is associated with an inactivation mutation in the ENPP1 gene / V. Levy-Litan, E. Hershkovitz, L. Avizov et al. // *The American Journal of Human Genetics*. – 2010. – Vol. 86. – P. 273–278.
148. Impact of ENPP1 and MMP3 gene polymorphisms on aortic calcification in patients with type 2 diabetes in a Korean population / J. E. Lee, Y. K. Choi, H. A. Seo et al. // *Diabetes research and clinical practice*. – 2010. – Vol. 88. – P. 87–96.
149. Lazarevic G. PC-1 (ENPP1) K121Q polymorphism in overweight and obese type 2 diabetic coronary heart disease patients / G. Lazarevic, M. Milojkovic, I. Tasic // *Acta Cardiologica*. – 2008. – Vol. 63, № 3. – P. 323–330.
150. Shaker O. G. Association of genetic variants of MTHFR, ENPP1, and ADIPOQ with myocardial infarction in Egyptian patients / O. G. Shaker, M. F. Ismail // *Cell Biochem. Biophys*. – 2014. – Vol. 69. – P. 265–274.
151. Impact of ENPP1 genotype on arterial calcification in patients with end-stage renal failure / P. Eller, K. Hochegger, G. M. Feuchtner et al. // *Nephrol. Dial. Transplant*. – 2008. – Vol. 23. – P. 321–327.
152. The K121Q polymorphism in the plasma cell membrane glycoprotein 1 gene predisposes to early myocardial infarction / G. Endler, C. Mannhalter, H. Sunder-Plassmann et al. // *J. Mol. Med*. – 2002. – Vol. 80. – P. 791–795.

