

**ЧАСТОТА АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА  
МАТРИКСНОГО GLA-ПРОТЕЇНУ (MGP)  
В УКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ**

## ЗМІСТ

	стор.
<b>Вступ.....</b>	<b>3</b>
<b>Огляд літератури</b>	
Біохімія матричного Gla-протеїну .....	6
Ген MGP та його поліморфізми .....	7
Фізіологічне значення MGP. Механізми антикальциногенної дії.....	9
<b>Матеріал і методи дослідження.....</b>	<b>11</b>
<b>Результати власних досліджень та їх обговорення .....</b>	<b>14</b>
<b>Висновки .....</b>	<b>20</b>
<b>Список використаних джерел.....</b>	<b>21</b>

## ВСТУП

Велика увага вчених генетиків і медиків усього світу прикута сьогодні до проблеми різноманітності генома людини – проблеми генетичного поліморфізму. Наукове і прикладне значення цього нового напрямку науки знайшло віддзеркалення у двох міжнародних наукових проектах - "Різнманітність геному людини" ("Human Genome Diversity Project) [1], який спрямований головним чином на вирішення фундаментальних наукових проблем, пов'язаних із походженням людини, виникненням рас, етногенезом, антропологією, і "Зовнішнє середовище і геном людини" ("Environmental Genome Project") [2], задачі якого мають переважно прикладний характер і стосуються з'ясування генетичних основ індивідуальної чутливості і стійкості людини до несприятливих екзогенних факторів (екогенетика), лікарських препаратів (фармакогенетика) та ін. У ході таких досліджень виникло уявлення про існування "генів схильності" ("predisposing genes") - мутантних алелей, які сумісні з народженням і життям, але при певних несприятливих умовах можуть викликати розвиток тих чи інших захворювань, які належать до багаточисельної групи мультифакторіальних хвороб, в розвитку яких беруть участь як генетичні фактори, так і фактори зовнішнього середовища[3]. Дослідження ролі генетичних факторів в розвитку мультифакторіальних захворювань є одним із найперспективніших напрямів сучасної генетики і провідною галуззю охорони здоров'я.

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 мультифакторіальної патології [4].

Одним з генів-кандидатів, поліморфізм яких може бути пов'язаний зі спадковою схильністю до цілого ряду мультифакторіальних захворювань, є матриксний Gla-протеїн (MGP). Сьогодні вивчається зв'язок різних алельних варіантів гена MGP із серцево-судинними (атеросклерозом, інфарктом міокарда, інсультами) [5,6,7,8] і онкологічними захворюваннями [9], остеопорозом [10], сечокам'яною хворобою [11], випадінням зубів [12], інтоксикацією свинцем [13,14] та ін. Отримані дані неоднозначні, вкрай суперечливі, а для української популяції взагалі відсутні.

#### МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ :

Визначення частоти алельних варіантів гена MGP в українській популяції і порівняння отриманих даних з результатами досліджень в інших популяціях.

#### ЗАДАЧІ ДОСЛІДЖЕННЯ:

1. Визначити частоту однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена MGP у практично здорових індивідуумів – представників української популяції.
2. Порівняти розподіл алельних варіантів гена MGP в різних популяціях.

#### МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ:

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

#### НАУКОВА НОВИЗНА ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ :

Вперше на сучасному методичному рівні отримана інформація про розподіл різних алельних варіантів гена MGP в українській популяції. Доведено, що характер розподілу алелей по G<sup>-7</sup>→A поліморфізму в Україні статистично відрізняється від показників інших популяцій, що свідчить про те, що даний поліморфізм є особливим маркером для української популяції.

#### ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ :

Враховуючи асоціацію деяких алельних варіантів гена MGP з розвитком мультифакторіальних хвороб, одержані результати можуть бути покладені в основу виявлення людей, схильних до їх розвитку, з метою своєчасної профілактики цих хвороб і запобігання розвитку ускладнень.

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### Біохімія матричного Gla-протеїну

Молекула *MGP* людини (мол. маса 10 кДа) складається з 84 амінокислотних залишків, 5 з яких представлено  $\gamma$ -карбоксиглютаміною кислотою (*Gla*) (рис. 1). 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 [16]. Хоча *MGP* містить великий відсоток гідрофільних амінокислотних залишків, він майже не розчинний у воді (розчинність < 10 мкг/мл), а тому його транспорт плазмою крові може відбуватися тільки в комплексі з іншими водорозчинними білками.

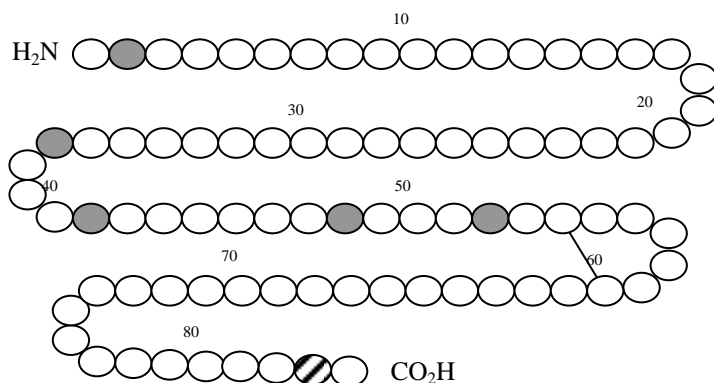


Рис.1. Схема пептидного ланцюга молекули *MGP*. Темні кружечки – залишки глутамінової кислоти, які зазнають  $\gamma$ -карбоксилювання. У положенні 83 може бути треонін або аланін (поліморфізм Tht83Ala)

Щойно синтезована молекула *MGP* складається із 103 амінокислотних залишків (84 – це зрілий білок та 19 – трансмембранний сигнальний пептид) і містить, починаючи з N-кінця, три функціональні ділянки: (1) трансмембранний сигнальний пептид (*transmembrane signal peptide*); (2) імовірний сайт, що його розпізнає  $\gamma$ -карбоксилаза (*putative recognition site for  $\gamma$ -carboxylase*); (3) домен, що містить залишки *Gla* (*Gla-containing domain*) [16].

Утворений у клітинах *MGP* зазнає посттрансляційної модифікації, яка полягає в карбоксилюванні п'яти залишків глутамінової кислоти (*Glu*) з утворенням  $\gamma$ -карбоксиглютамінової кислоти (*Gla*). Зазначена реакція

каталізується ферментом  $\gamma$ -глутамілкарбоксилазою (*GGCX*) і є спряженою з окисненням відновленої форми вітаміну К (гідрохінону) в 2,3-епоксид вітаміну К (рис. 2). Таким чином, без окиснення вітаміну К не може відбуватися карбоксилювання *Glu*-залишків молекули *MGP*. У свою чергу достатня кількість вітаміну К для реакції карбоксилювання *MGP* залежить від стану зворотної реакції його відновлення, яка здійснюється за допомогою вітамін К-епоксидредуктазного комплексу (*VKOR*).

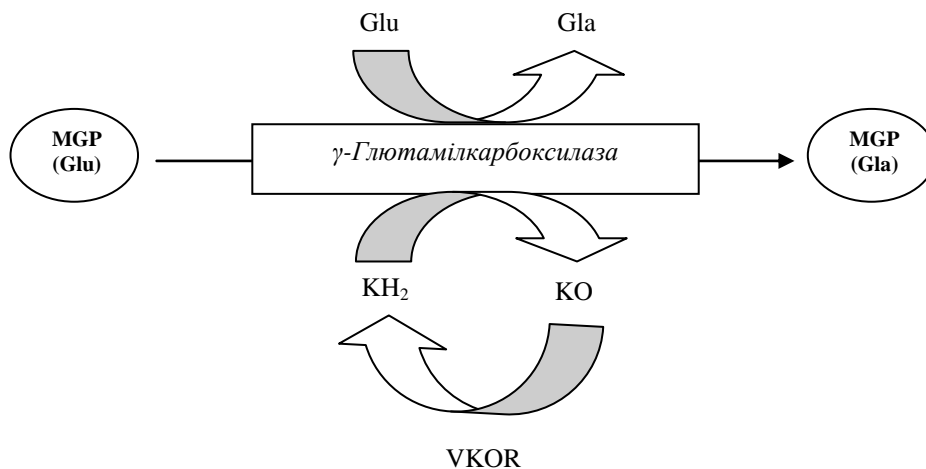


Рис.2.  $\gamma$ -карбоксилювання *MGP* і цикл вітаміну К.

$\text{KH}_2$  – відновлена форма вітаміну К (гідрохінон);  $\text{KO}$  – окиснена форма вітаміну К (епоксид); *VKOR* – вітамін К епоксидредуктаза

На додаток до  $\gamma$ -карбоксилювання, *MGP* може зазнавати й інших посттрансляційних модифікацій, зокрема, (1) специфічного протеолітичного розщеплення в С-термінальній ділянці молекули [17,18] і (2) фосфорилування трьох серинових залишків у N-кінцевому хвості [19].

Після наведених вище реакцій *MGP* накопичується у структурах апарату Гольджі і секретується в позаклітинний простір, де і виконує свої функції.

### Ген *MGP* та його поліморфізми

Ген *MGP* у людини представлено однією копією, яка міститься в короткому плечі 12-ї хромосоми (12p12.3-13.1) [16]. У ньому закодовано 84 амінокислотні залишки зрілого білка і 19 залишків трансмембранного

сигнального пептиду. Довжина гена – 3900 нуклеотидів, він складається з 4 екзонів, розділених трьома великими проміжними послідовностями (інтронами), на які припадає більш ніж 80% загальної довжини гена [16] (рис. 3). Кожна з трьох функціональних ділянок білка – трансмембранний сигнальний пептид, сайт розпізнавання  $\gamma$ -карбоксилази і домен, що містить залишки *Gla*, – кодується окремим екзоном гена *MGP* (екзони 1,3,4). Екзон 2 кодує ділянку білка, що складається з 11 амінокислотних залишків ( *$\alpha$ -helical domain*) і лежить між трансмембранним сигнальним пептидом та сайтом розпізнавання  $\gamma$ -карбоксилази. Функція цієї ділянки *MGP* поки що не відома.

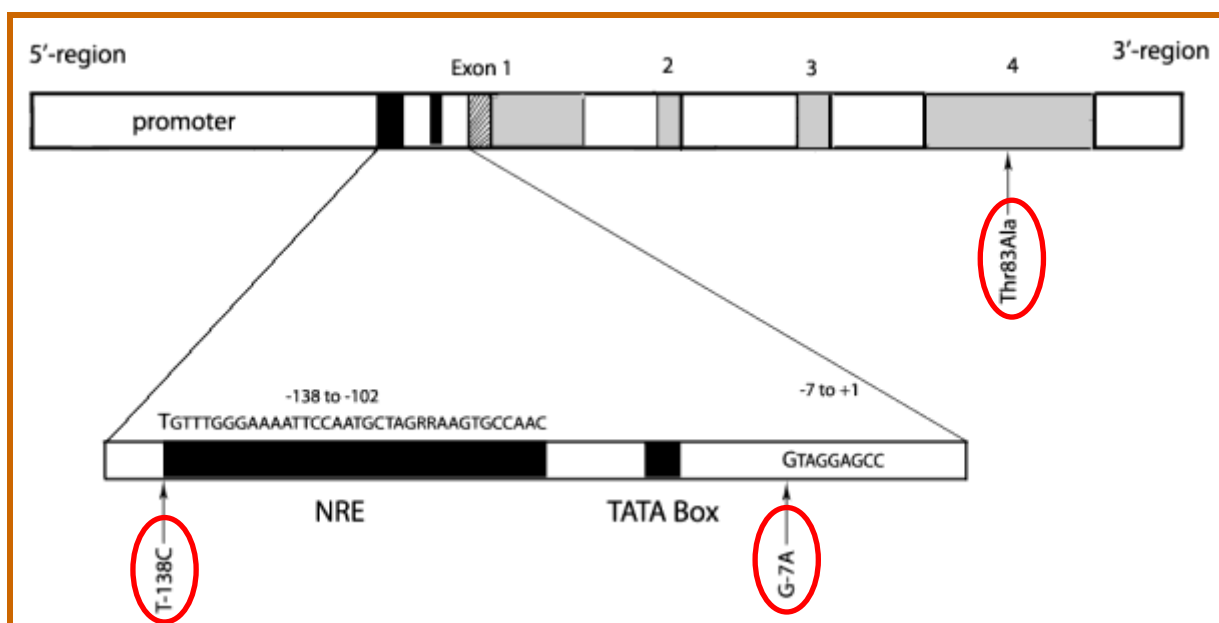


Рис.3 Структура гена *MGP*

Подібна 4-екзонна організація характерна і для гена остеокальцину (*BGP*). Вона істотним чином відрізняється від 2-екзонної організації генів, які кодують відповідні ділянки в інших відомих сьогодні вітамін К-залежних білках.

Аналіз промоторної частини гена *MGP* показав, що поряд з типовими *TATA* і *CAT*-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 ретиноєвої кислоти і вітаміну D [16,20].

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) (рис. 3). 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. Останній варіант *SNP* зумовлює заміну треоніну на аланін у передостанньому 83-у залишку молекули *MGP*.

### **Фізіологічне значення MGP. Механізми антикальциногенної дії**

Основною, відомою сьогодні функцією *MGP* є його антикальциногенна дія [21]. Першою експериментальною моделлю, у якій було доведено цей ефект *in vivo* була модель *MGP*-дефіцитних мишей. Використовуючи методику генетичного нокауту, Luo et al. вивели лінію мишей, позбавлених гена *MGP* [22,23]. Протягом 2 місяців після народження такі тварини гинули від кровотеч, що виникали в результаті розриву грудної і черевної аорти. При вивченні кровоносних судин гістологічними методами в них виявляли виражену кальцифікацію аорти та її гілок. Мінералізації перш за все зазнавали еластичні мембрани медії. За цією ознакою ушкодження артерій у "генетично нокаutowаних" мишей нагадувало картину, характерну для артеріосклерозу Менкеберга у людей (медіакальцинозу).

Точні механізми, за допомогою яких *MGP* пригнічує кальцифікацію судин, до кінця не вивчені. Сьогодні розглядають 4 можливі шляхи впливу *MGP* на цей процес:

1. Зв'язування *MGP* з іонами кальцію і кристалами гідроксіапатиту.

Одна з перших гіпотез по антикальциногенному ефекту *MGP* полягала у здатності *Gla*-залишків зв'язуватись з іонами кальцію і утворювати разом з

залишками аргініну комплекси з гідроксіапатитом [21,24]. Встановлено, що декарбоксільований MGP, в якому замість Gla міститься глютамінова кислота (Glu) втрачає свою антикальцифікуючу активність.

2. Зв'язування MGP з компонентами позаклітинного матриксу, зокрема з еластином, порушення структури якого посилює кальцифікацію [25,26]. За допомогою імуногістологічних методів показано, що в нормальних артеріях людини молекули повністю карбоксільованого MGP знаходяться поблизу еластичних волокон. Локалізація MGP в цих місцях може бути механізмом, який попереджає кальцифікацію [27,28].

3. Взаємодія з кістковим морфогенетичним протеїном (BMP-2) [29-33].

Ціла низка фактів свідчить про те, що MGP бере участь у процесах диференціювання судинних ГМК, і цей вплив реалізується через взаємодію з BMP-2 [32]. BMP-2 посилює утворення в мезенхімних клітинах адвентиції транскрипційних факторів Msx-2, що підвищує експресію генів, які кодують Wnt 3a, Wnt 7a продукти, які сприяють збільшенню концентрації бета-катеніну в остеопрогеніторах медії [33]. Бета-катенін посилює експресію генів, які відповідають за диференціювання остеопрогеніторів медії у кальцифікуючі клітини (CVC), які характеризуються високою активністю лужної фосфатази і утворюють у великій кількості мінералізуючі матриксні везикули [34]. MGP, взаємодіючи з BMP-2 блокує весь цей механізм і, таким чином, підтримує контрактильний фенотип ГМК, запобігаючи їх диференціюванню в клітини, хондро/остеогенезу. Сьогодні доведено, що зв'язування MGP з BMP-2 відбувається за участю Gla-домена молекули MGP [35]. Недокарбоксільовані форми MGP не можуть бути достатньо ефективними в пригніченні ефектів BMP-2.

4. Участь в регуляції апоптозу.

Доведено посилення експресії MGP у відповідь на апоптоз [36]. Однак, питання про конкретні механізми участі MGP у цьому процесі залишається відкритим.

## МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено із використанням венозної крові 110 практично здорових донорів, у яких відсутність патологій підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, запису електрокардіограми і вимірювання артеріального тиску.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтном. Кров заморожували і зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . ДНК з неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів визначали  $\text{T}^{-138}\rightarrow\text{C}$  поліморфізм промотора (rs1800802). Для цього ампліфікували ділянку промотора вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'-AAGCATACGATGGCCAAAАСТТСТGСА-3' і зворотного (antisense) – 5'-GAACTAGCATTTGGAАСТТТТСССААСС-3'. Праймери було синтезовано фірмою "Metabion" (Німеччина). Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0,5 ОД Таq-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагмента промотора складалася з 33 циклів: денатурація –  $94^{\circ}\text{C}$  (30 с), гібридизація праймерів –  $57^{\circ}\text{C}$  (1 хв) і елонгація –  $72^{\circ}\text{C}$  (1 хв). Пізніше 6 мкл продукту ампліфікації фрагмента промотора інкубували при  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 18 годин з 3 ОД рестриктази *BseNI* ("Ферментас", Литва) у буфері В такого складу: 10 мМ трис-НСl (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 *BseMI* на два фрагменти – 118 і 24 пари основ. У разі заміни тиміну на цитозин сайт рестрикції для *BseNI* втрачався і утворювався один фрагмент розміром 142 пари основ (рис. 4А).

Послідовність нуклеотидів у специфічних праймерах для вивчення поліморфізму G<sup>-7</sup>→A (rs1800801) була такою: прямий (sense) – 5`-CTAG TTCAGTGCCAACCSTTCCCCACC-3`, зворотний (antisense) – 5`-TAGCAGCA GTAGGGAGAGAGGCTCCCA-3`. Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента, що містив стартову ділянку, складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 годин з 2 ОД рестриктази *NcoI* 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. 4Б).

Для визначення поліморфізму 4-го екзону Thr<sub>83</sub>→Ala (rs4236) гена MGP використовували пару специфічних праймерів: прямий (sense) – 5`-TCAATAGGGAAGCCTGTGATG-3` і зворотний (antisense) – 5`-AGGGGGATACAAAATCAGGTG-3`. Програма ампліфікації була такою: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с), елонгація – 72°C (1 хв), разом 33 цикли. У подальшому 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 годин з 3 ОД рестриктази *Eco477* 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. 4В).

Після рестрикції ампліфікати розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 25 хв ( $T^{-138} \rightarrow C$ ), 40 хв ( $G^{-7} \rightarrow A$ ) та 20 хв ( $Thr_{83} \rightarrow Ala$ ). Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

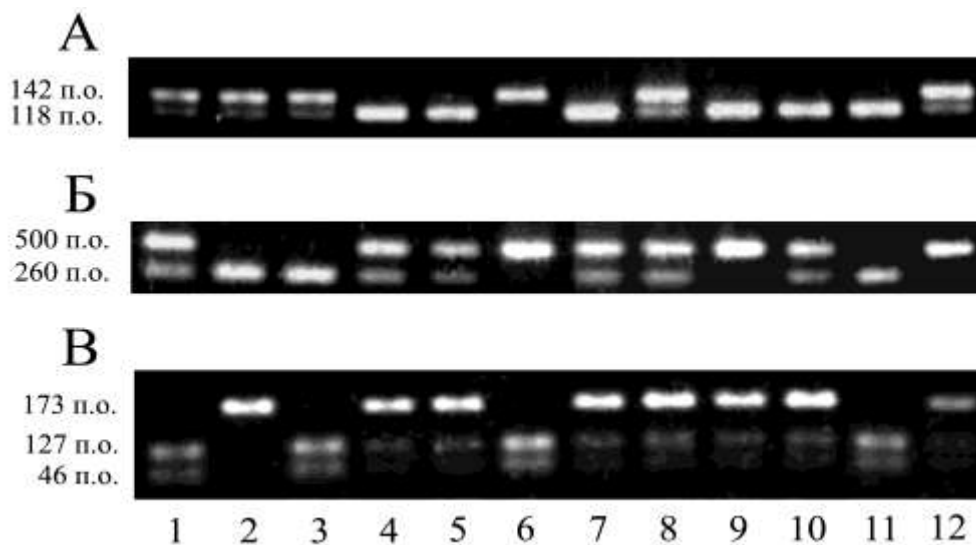


Рис. 4. Результати рестрикційного аналізу однонуклеотидних поліморфізмів гена MGR: А -  $T^{-138} \rightarrow C$  поліморфізм (доріжки 4, 5, 9, 10, 11 відповідають Т/Т-генотипу, 1, 2, 3, 8, 12 – Т/С-генотипу, 6 - С/С-генотипу); Б -  $G^{-7} \rightarrow A$  поліморфізм (доріжки 2, 3, 11 відповідають G/G-генотипу, 1, 4, 5, 7, 8, 10 – G/A-генотипу, 6, 9, 12 – A/A-генотипу); В -  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  поліморфізм (доріжки 1, 3, 6, 11 відповідають Thr/Thr-варіанту, 4, 5, 7–10, 12 – Thr/Ala-варіанту, 2 – Ala/Ala-варіанту).

Одержані результати опрацьовували статистично з використанням програми Excel 2000. При цьому достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$ -критерієм. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

## РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування по кожному із трьох сайтів гена MGP дало можливість виділити три групи особин: (1) гомозиготи за основним алелем, (2) гетерозиготи та (3) гомозиготи за мінорним алелем.

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

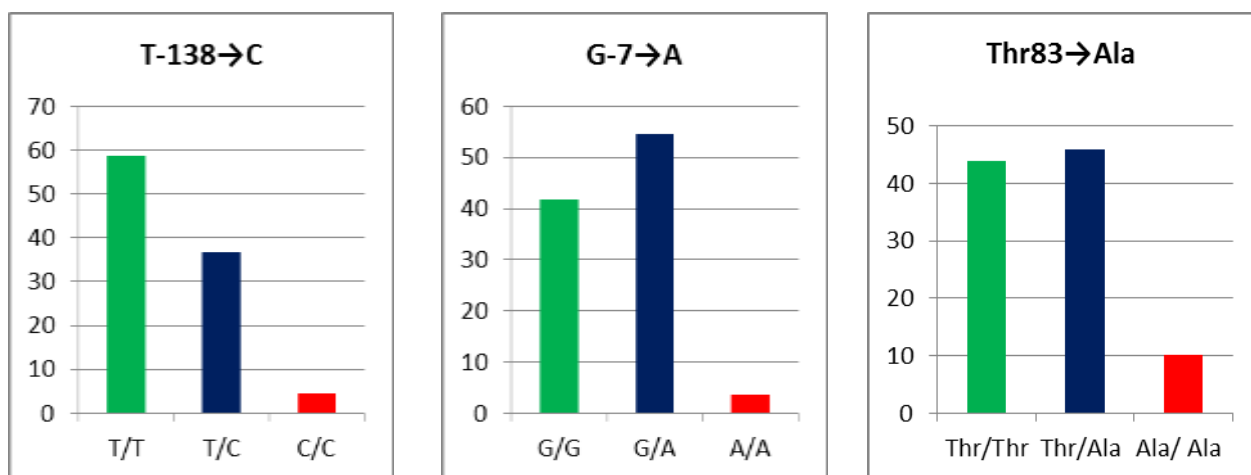


Рис.5 Розподіл алельних варіантів гена MGP

Отримані в роботі дані було порівняно з результатами досліджень в інших популяціях: французькій [5], північноірландській [5], італійській [37], нідерландській [38], північноамериканській [8], мексиканській [39], японській [6,11], індійській [13] (табл.1).

Аналіз частоти алельних варіантів гена MGP по  $T^{138} \rightarrow C$  поліморфізму (рис. б) 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

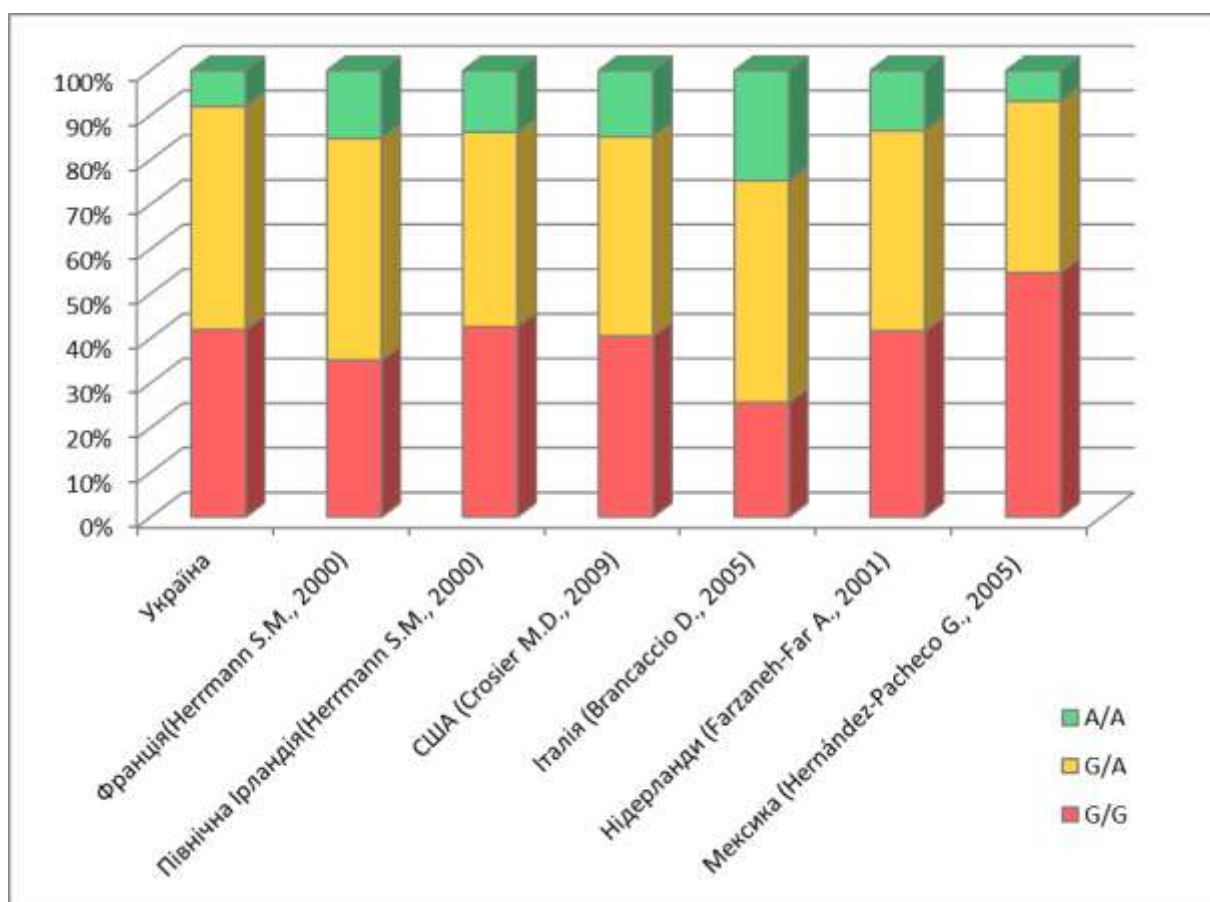


Рис. 6. Характер розподілу алелей MGP T-138C поліморфізму в різних популяціях.

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  $T^{138} \rightarrow C$  поліморфізму між мексиканцями, з одного боку, і представниками індійської і японської популяцій – з іншої, за відсутності відмінностей між двома останніми.

При порівнянні частоти поліморфізму  $G^{-7} \rightarrow A$  встановлені статистично достовірні відмінності між отриманими нами даними й результатами досліджень у Франції, Італії, США, Мексиці (рис.7). На відміну від  $T^{138} \rightarrow C$  поліморфізму, характер розподілу алелей по  $G^{-7} \rightarrow A$  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  $G^{-7} \rightarrow A$  є особливим маркером для української

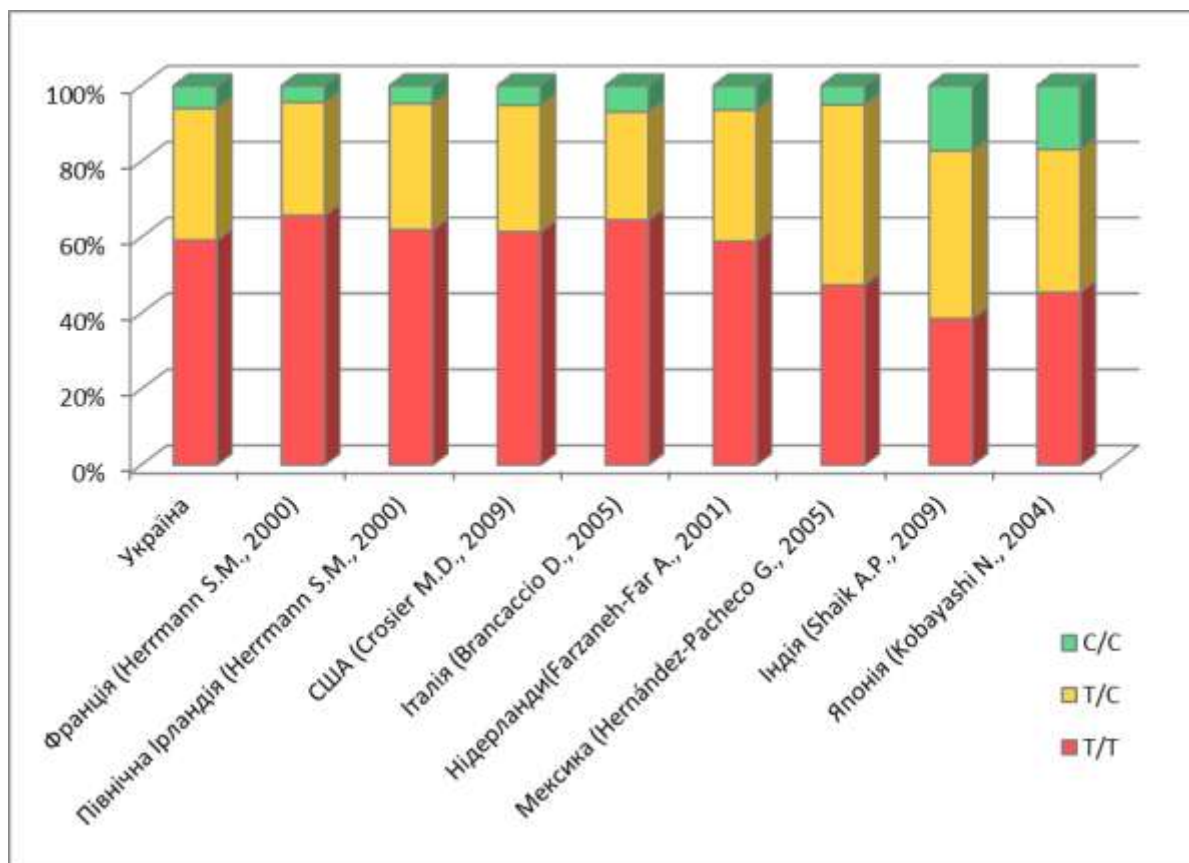


Рис. 7 Характер розподілу алелей MGP G-7A поліморфізму в різних популяціях.

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).

Характер розподілу Thr<sub>83</sub>→Ala поліморфізму в українській популяції відрізнявся тільки в порівнянні із французькою та японською популяціями (рис.8).

З урахуванням того, що в розвитку цілої низки хвороб і патологічних процесів певну роль відіграє присутність у геномі міnorного або основного (домінуючого) алеля великий інтерес викликають дані про частоту, із якої зустрічаються ці алелі в різних популяціях (табл..1).

Так, частота міnorного алеля по T<sup>138</sup>→C поліморфізму має найвище значення в індійській (0,393) і японській (0,356) популяціях. Далі йдуть



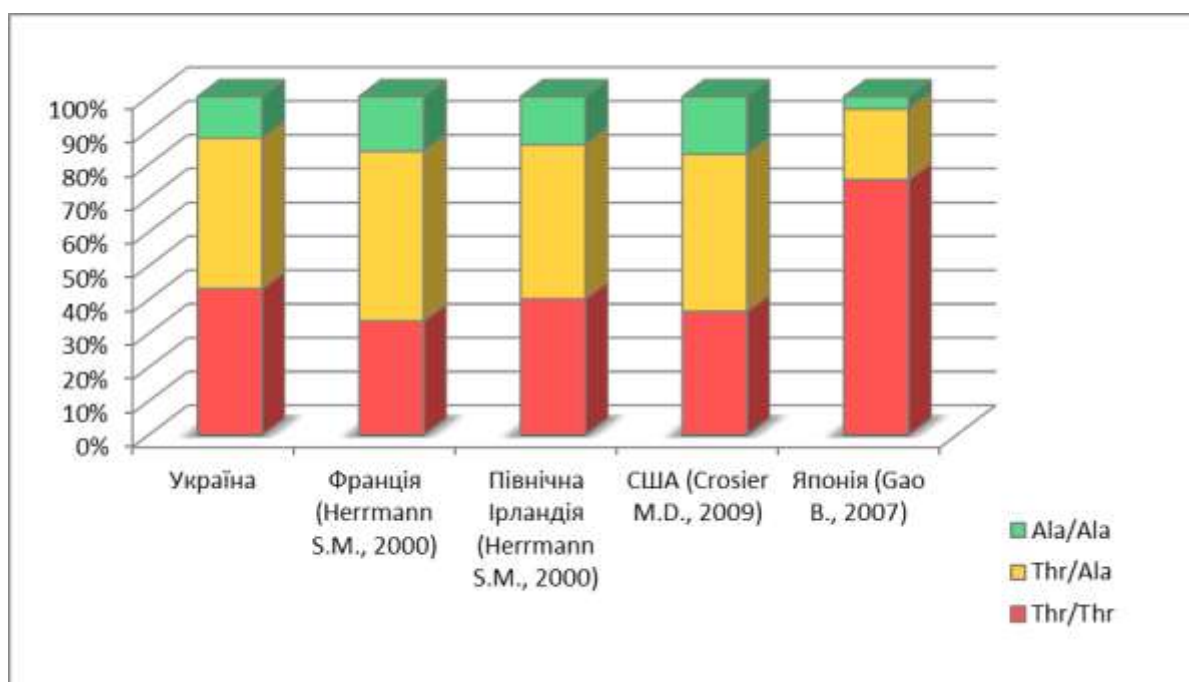


Рис. 8. Характер розподілу алелей Thr<sub>83</sub>→Ala поліморфізму в різних популяціях.

Мексика (0,289) й Україна (0,234). Найнижчі величини характерні для французької популяції (0,193).

У ряді робіт [5,6,40] установлений зв'язок між частотою домінуючого алеля по T<sup>138</sup>→C поліморфізму з розвитком деяких патологічних процесів і захворювань (зокрема, серцево-судинних). З урахуванням цього, є цікавим порівняння даного показника в досліджуваних популяціях. Так, найвище його значення характерне для представників Франції (0,817), а мінімальні величини визначаються в представників Японії (0,644) й Індії (0,697). Українська (0,766) і мексиканська (0,711) популяції займають проміжне положення.

Для G<sup>7</sup>→A поліморфізму, на відміну від T<sup>138</sup>→C, "патологічними" вважаються рецесивні гомозиготи. Найвище значення частоти мінорного алеля з цього виду поліморфізму виявлене в італійській популяції (0,495), найменше – у мексиканській (0,260). В українській популяції цей показник (0,330) має проміжне значення.

Щодо Thr<sub>83</sub>→Ala поліморфізму, то найчастіше мінорний алель зустрічається у французькій популяції (0,413), рідше за все – у японській (0,141). А в українській популяції цей показник становить 0,345.

## Поширення MGP генотипів і алелів в українській і інших популяціях

Поліморфізм	Генотип n (%)			Частота мінорного алелю	Частота мажорного алелю
	11	12	22		
<b>MGP T-138C</b>					
Україна	128(59,26)	75(34,72)	13(6,02)	0,234	0,766
Франція (Herrmann S.M., 2000)	577(65,79)	261(29,76)	39(4,45)	0,193	0,807
Північна Ірландія (Herrmann S.M., 2000)	222(62,01)	119(33,24)	17(4,75)	0,214	0,786
США (Crosier M.D., 2009)	238(61,50)	129(33,33)	20(5,17)	0,218	0,782
Італія (Brancaccio D., 2005)	168(64,62)	74(28,46)	18(6,92)	0,212	0,788
Нідерланди (Farzaneh-Far A., 2001)	92(58,87)	54(34,62)	10(6,41)	0,237	0,763
Мексика (Hernandez-Pacheco G., 2005)	120(47,43)	120(47,43)	13(5,14)	0,289	0,711
Індія (Shaik A. P., 2009)	83(38,60)	95(44,19)	37(17,21)	0,393	0,607
Японія (Kobayashi N., 2004)	46(45,54)	38(37,62)	17(16,83)	0,356	0,644
<b>MGP G-7A</b>					
Україна	94(41,96)	112(50,00)	18(8,04)	0,33	0,670
Франція (Herrmann S.M., 2000)	317(35,14)	448(49,67)	137(15,19)	0,4	0,600
Північна Ірландія (Herrmann S.M., 2000)	157(42,66)	160(43,48)	51(13,86)	0,356	0,644
США (Crosier M.D., 2009)	161(40,55)	177(44,58)	59(14,86)	0,372	0,628
Італія (Brancaccio D., 2005)	77(25,67)	149(49,67)	74(24,67)	0,495	0,505
Нідерланди (Farzaneh-Far A., 2001)	65(41,67)	70(44,87)	21(13,46)	0,359	0,641
Мексика (Hernandez-Pacheco G., 2005)	144(54,75)	101(38,40)	18(6,84)	0,26	0,740

Примітка: 1 - мажорний алель, 2 – мінорний алель

Вивчення алельних варіантів гена MGP в різних популяціях має важливе значення в контексті з можливою їх асоціацією з мультифакторіальними хворобами. Так, встановлений зв'язок поліморфізмів  $G^{-7} \rightarrow A$ , Thr83 $\rightarrow$ Ala з атеросклерозом стегнових артерій у французькій популяції, з інфарктом міокарда у Північній Ірландії, поліморфізмів  $T^{-138} \rightarrow C$ ,  $G^{-7} \rightarrow A$  і Thr83 $\rightarrow$ Ala з кальцифікацією коронарних артерій у чоловіків у США (табл.2).

Зв'язок однонуклеотидних поліморфізмів гена MGP з розвитком патологічних процесів і хвороб людини

Патологічний процес чи хвороба	Вид поліморфізму	Наявність зв'язку	Популяція	Посилання
Атеросклероз стегнових артерій	G-7A, Thr83Ala T-138C	+ -	Франція	5
Атеросклероз сонних артерій	G-7A, T-138C, Thr83Ala	-	Франція	5
Кальцифікація коронарних артерій	G-7A, T-138C, Thr83Ala	+ ,тільки у чоловіків	США	3
Інфаркт міокарда (ІМ)	G-7A, Thr83Ala T-138C	+ , тільки у групі хворих з низьким ризиком розвитку ІМ -	Північна Ірландія, Франція	8
Атеросклероз черевної аорти, склероз Менкеберга, кальцифікація трахеї, кальцифікація реберних хрящів	T-138C	-	Японія	6
Кальцифікація коронарних артерій Остеопороз	T-138C	- -	США	10
Смертність від серцево-судинних захворювань у пацієнтів з хронічною нирковою недостатністю	G-7A, T-138C	+	Італія	37
Хронічна інтоксикація свинцем	T-138C	-	Індія	13,14
Сечокам'яна хвороба	Thr83Ala T-138C, G-7A	+ -	Японія	11
Постменопаузальний остеопороз	CA-повтори	+ -	Японія Корея	41 42
Випадіння зубів у жінок похилого віку	CA-повтори	+	Японія	12

Звертає увагу відсутність будь-якої інформації про дослідження поліморфізму гена MGP у популяціях слав'янських народів.

Представлені у роботі дані про розподіл алельних варіантів гена матричного Gla-протеїну в українській популяції є першим кроком у вивченні їх зв'язку з розвитком поширених патологічних процесів і хвороб.

**ВИСНОВКИ :**

1. Уперше на сучасному методичному рівні отримана інформація про розподіл різних алельних варіантів гена MGP у практично здорових представників української популяції.
2. Встановлено, що співвідношення нормальних гомозигот, гетерозигот і гомозигот із мінорним алелем при аналізі T<sup>-138</sup>→C поліморфізму промотора гена MGP становить 58,7%, 36,7%, 4,6%, при аналізі G<sup>-7</sup>→A поліморфізму промотора - 41,8%, 54,5%, 3,6% , а при визначенні поліморфізму Thr<sub>83</sub>→Ala 4-го екзону – 43,9%, 45,9%, 10,2%.
3. Характер розподілу алелей по G<sup>-7</sup>→A поліморфізму в Україні статистично відрізняється від показників інших популяцій, що свідчить про те, що даний поліморфізм є особливим маркером для української популяції і не залежить від расової приналежності.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ :**

1. Harding R.M., Sajantila A. Human Genome Diversity Project. // Nature Genet.- 1998. - V.18. - P. 307-308.
2. Brown P.O, Hartwell L. Genomics and human disease--variations on variation. // Nature Genet.- 1998.- V.18. - P.91-93.
3. Cooper, R., Kaufman, J. Ward, R. Race and Genomics. // New England Journal of Medicine. - 2003. - 348 (12) - P.1166-1169.
4. Lohmueller K.E., Pearce C.L., Pike M., Lander E.S., Hirschhorn J.N. Metaanalysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease // Nat Genet. 2003. - 33. - P. 177-182.
5. Herrmann S.M., Whatling C., Brand E., Nikaud V., Garipey J., Simon A., Evans A., Ruidavets L.B., Arveiler D., Luc G., Tiret L., Henney A., Cambien F. Polymorphisms of the human matrix Gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2000.– 20.– P. 2386-2393.
6. Kobayashi N., Kitazawa R., Maeda S., Schurgers L.J., Kitazawa S. T-138C polymorphism of matrix Gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification // Kobe J. Med. Sci.– 2004.– 50.– P. 69-81.
7. Taylor B.C., Schreiner P.J., Doherty T.M., Fornage M., Carr J.J., Sidney S. Matrix Gla protein and osteopontin genetic associations with coronary artery calcification and bone density: the CARDIA study / // Hum. Genet.– 2005.– 116.- P. 525-528.
8. Crosier M.D., Booth S.L., Peter I., Dawson-Hughes B., Price P.A., O'Donnell C.J., Hoffmann U., Williamson M.K., Ordovas J.M. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification // J. Nutr. Sci. Vitaminol.– 2009.– 55.– P. 59-65.

9. Ken Taniguchi, Ping Yang, James Jett, Eric Bass, Rebecca Meyer, Yunjie Wang, Wanguo Liu. Polymorphisms in the Promoter Region of the Matrix Gla Protein Gene Are Associated with Lung Cancer Development // *Clin Cancer Res* 2000. – 8. – 1115-1120.
10. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000.- V.20.- P. 317-327.
11. Gao B., Yasui T., Itoh Y., Tozawa K., Hayashi Y., Kohri K. A polymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stones // *J. Urol.*– 2007.– V. 177.– P. 2361-2365.
12. Hirano H., Ezura Y., Ishiyama N., Yamaguchi M., Nasu I., Yoshida H., Suzuki T., Hosoi T., Emi M. Association of natural tooth loss with genetic variation at the human matrix Gla protein locus in elderly women // *J. Hum. Genet.*– 2003.– V. 48.– P. 288-292.
13. Shaik A.P., Kaiser J. Individual susceptibility and genotoxicity in workers exposed to hazardous materials like lead // *J. Hazard. Mater.*– 2009a.– V. 168.– P. 918-924.
14. Shaik A.P., Kaiser J. Polymorphisms in MGP gene and their association with lead toxicity // *Toxicol. Mech. Methods.*– 2009b.– V. 19.– P. 209-213.
15. Price P.A., Williamson M.K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein // *J. Biol. Chem.*– 1985.– V. 260.– P. 14971-14975.
16. Cancela L., Hsieh C.-L., Francket U., Price P.A. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene // *J. Biol. Chem.*– 1990.– V. 265.– P. 15040-15048.
17. Hale J.E., Williamson M.K., Price P.A. Carboxyl-terminal proteolytic processing of matrix Gla protein // *J. Biol. Chem.*– 1991.– V. 266.– P. 21145-21149.

18. Rice J.S., Williamson M.K., Price P.A. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from the calcified cartilage of the soupfin shark // *J. Bone Min. Res.*– 1994.– V. 9.– P. 567-576.
19. Price P.A., Rice J.S., Williamson M.K. Conserved phosphorylation of serines in the Ser-X-Glu/Ser(P) sequences of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from shark, lamb, rat, cow, and human // *Protein Sci.*– 1994.– V. 3.– P. 822- 830.
20. Cancela M.L., Price P.A. Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human bone cells // *Endocrinology.*– 1992.– V. 130– P. 102-108.
21. Proudfoot D., Shanahan C.M. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein // *Nephrology (Carlton).*- 2006.- V.11.- P. 455-461.
22. Luo, G., R. D'Souza, D. Hogue, and G. Karsenty. 1995. The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. // *J. Bone Miner. Res.* 10:325–334.
23. Luo, G., P. Ducy, M.D. McKee, G.J. Pinero, E. Loyer, R.R. Behringer, and G.Karsenty. 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in matrix GLA protein // *Nature.* 386:78–81.
24. Fraser J.D., Otawara Y., Price P.A. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates the synthesis of matrix  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells // *J. Biol. Chem.*– 1988.– V. 263.– P. 911-916.
25. Fraser J.D., Price P.A. Induction of matrix Gla protein synthesis during prolonged 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> treatment of osteosarcoma cells // *Calcif. Tissue Int.*– 1990.– V. 46.– P. 270-279.
26. Owen T.A., Aronow M.S., Barone L.M., Bettencourt B., Stein G.S., Lian J.B. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: Dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures // *Endocrinology.*– 1991.– V. 128.– P 1496-1504.

27. Yang H., Curinga G., Giachelli C.M. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro // *Kidney Int.*– 2004.– V. 66.– P. 2293-2299.
28. Stheneur C., Dumontier M.F., Guedes C. et al. Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes // *Biochem. J.*– 2003.– V. 369.– P. 63-70.
29. Shanahan C. M., Cary N. R., Metcalfe J. C. et al. High expression of genes for calcification regulating proteins in human atherosclerotic plaques // *J. Clin. Invest.*– 1994– V. 93.– P. 2393-2402.
30. Farzaneh-Far A., Weissberg P.L., Proudfoot D., Shanahan C.M. Transcriptional regulation of matrix gla protein // *Z. Kardiol.*– 2001.– V. 90, Suppl. 3.– P. 38-42.
31. Rannels S.R., Cancela M.L., Wolpert E.B., Price P.A. Matrix Gla protein mRNA expression in cultured type II pneumocytes // *Am. J. Physiol.*– 1993.– V. 265.– P. L270-L278.
32. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis // *Osteoporos Int.* 2003;14 Suppl 3:S35-42.
33. Young MF. Bone Matrix Proteins: More Than Markers // *Calcified Tissue International* 2002, Volume 72, Number 1, 2-4:S2-7
34. Kypta R.M., Su H., Reichard L.F. Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J. Cell Biol.*, 134, 1519-1529, 1996
35. Bostrom K., Watson K.E., Horn S., Wortham C., Herman I.M., Demer L.L. Bone morphogenetic expression in human atherosclerotic lesions // *J. Clin. Invest.*- 1993.- V.91.- P. 1800-1809.
36. Spronk H.M., Soute B.A., Schurgers L.J., Cleutjens J.P., Thijssen H.H., De Mey J.G., Vermeer C. Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2001.– V. 289.– P. 485-490.



37. Brancaccio D., Biondi M.L., Gallieni M., Turri O., Galassi A., Cecchini F., Russo D., Andreucci V., Cozzolino M. Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients // *Am. J. Nephrol.*– 2005.– 25.– P. 548-552.
38. Farzaneh-Far A., Davies J.D., Braam L.A., Spronk H.M., Proudfoot D., Chan S.W., O'Shaughnessy K.M., Weissberg P.L., Vermeer C., Shanahan C.M. A Polymorphism of the human matrix  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels // *J. Biol. Chem.*– 2001.– 276.– P. 32466–32473.
39. Hernandez-Pacheco, Guadalupe; Murguia, Luis Enrique; Rodriguez-Perez, Jose Manuel; and Fragoso, Jose Manuel (2005) "Matrix  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid Protein (MGP) G-7A and T-138C Gene Polymorphisms in Indian (Mayo and Teenek) and Mestizo Populations from Mexico," *Human Biology* - 2005: Vol. 77: Iss. 3, Article 7.
40. Sato Y., Nakamura R., Satoh M., Fujishita K., Mori S., Ishida S., Yamaguchi T., Inoue K., Nagao T., Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification // *Circ. Res.*– 2005.– V. 97.– P. 550-557.
41. Tsukamoto K., Orimo H., Hosoi T., Miyao M., Yoshida H., Watanabe S., Suzuki T., Emi M. Association of bone mineral density with polymorphism of the human matrix Gla protein locus in elderly women // *J. Bone Miner. Metab.*– 2000.–V. 18.– P. 27-30.
42. Kim J.G., Ku S.Y., Lee D.O., Jee B.C., Suh C.S., Kim S.H., Choi Y.M., Moon S.Y. Relationship of osteocalcin and matrix Gla protein gene polymorphisms to serum osteocalcin levels and bone mineral density in postmenopausal Korean women // *Menopause*– 2006.– V. 13.– P. 467-473.