

Гарбузова В.Ю. Дослідження частоти однонуклеотидного поліморфізму BSM1 гена рецептора вітаміну D у хворих з гострим коронарним синдромом. – В.Ю.Гарбузова, Г.Ф. Ткач, Є.І. Дубовик.- Український морфологічний альманах. – 2013. –Т.– 11. – №1. – С. 11–14.

УДК 616.831-005.1/.6:548.33

Гарбузова В.Ю., Ткач Г.Ф., Дубовик Є.І.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЧАСТОТИ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО
ПОЛІМОРФІЗМУ BSM1 ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВІТАМІНУ D У
ХВОРИХ З ГОСТРИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ**

Наукова лабораторія молекулярно-генетичних досліджень

(науковий керівник – д.мед.н., проф. О.В.Атаман)

Сумський державний університет

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЧАСТОТИ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО
ПОЛІМОРФІЗМУ BSM1 ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВІТАМІНУ D У
ХВОРИХ З ГОСТРИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ**

Гарбузова В.Ю., Ткач Г.Ф., Дубовик Є.І.

Наведені результати визначення BsmI (rs1544410) поліморфізму гена рецептора вітаміну D (VDR) у 118 хворих з гострим коронарним синдромом (ГКС) і 234 здорових індивідумів (контрольна група). Встановлено, що у хворих з ГКС співвідношення гомозигот b/b, гетерозигот і гомозигот B/B становить 37,3%, 44,1% і 28,6% (у контролі – 44,9%, 44,4% і 10,7%, $P=0,091$ за χ^2 -критерієм). У представників чоловічої статі виявлений статистично достовірний зв'язок між BsmI поліморфізмом гена VDR і ГКС.

Ключові слова: рецептор вітаміну D, поліморфізм генів, гострий коронарний синдром.

Наукова лабораторія молекулярно-генетичних досліджень Сумського державного університету (м.Суми)

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА BSMI ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

Гарбузова В.Ю., Ткач Г.Ф. Дубвик Е.И.

Представлены результаты определения BsmI (rs1544410) полиморфизма гена рецептора витамина D (VDR) у 118 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и 234 здоровых индивидуумов (контрольная группа). Установлено, что у больных с ОКС соотношение гомозигот b/b, гетерозигот и гомозигот B/B составляет 37,3%, 44,1% и 28,6% (в контроле – 44,9%, 44,4% и 10,7%, $P=0,091$ по χ^2 -критерию). У лиц мужского пола выявлена статистически значимая связь между BsmI полиморфизмом гена VDR и ОКС.

Ключевые слова: рецептор витамина D, полиморфизм генов, острый коронарный синдром.

Научная лаборатория молекулярно-генетических исследований Сумского государственного университета (г.Сумы)

STUDY THE FREQUENCY OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM BSMI OF VITAMIN D RECEPTOR GENE IN ACUTE CORONARY SYNDROME PATIENTS

Garbuzova V.Yu., Tkach G.F., Dubovyk Ye.I.

BsmI polymorphism (rs1544410) of vitamin D receptor (VDR) gene in 118 patients with acute coronary syndrome (ACS) and in 234 healthy people was determined. It was shown that in the patients with OCS distribution of b/b homozygotes, heterozygotes and B/B homozygotes was 37,3%, 44,1%, 28,6% (in control – 44,9%, 44,4%, 10,7%, $P=0,091$ by χ^2 -test). In the individuals of male sex statistically significant association between the BsmI polymorphism of the VDR gene and ACS was revealed.

Key words: vitamin D receptor, gene polymorphism, acute coronary syndrome.

Scientific laboratory of molecular and genetic research Sumy State University

Вступ. Причини більшості серцево-судинних захворювань ідентичні та пов'язані з атеросклерозом. Серед основних механізмів ішемічного некрозу тканин серцевого м'язу – розвиток атеросклеротичної бляшки, яка при досягненні певного критичного рівня ускладнюється дегенеративними змінами, що ведуть до тромбоутворення. Одним з проявів дегенерації бляшки є її кальцифікація. Відомо, що відкладання солей кальцію в інтимі і медію артерій відбувається тільки тоді, коли порушується баланс між про- і антикальциногенними чинниками. До останніх відносять низку білків, серед яких особливе місце посідає матриксний Gla-протеїн (MGP) [12]. У регуляції експресії гена MGP провідну роль відіграє рецептор вітаміну D (VDR) [1]. Кількісні і якісні характеристики VDR, які залежать від структури гена, можуть мати стосунок до функціонування MGP, а отже і до кальцифікації кровоносних судин.

Крім того, цікавим видавався й інший аспект проблеми, пов'язаний з тим, що кальцифікація артерій є одним з проявів гіпервітамінозу D. Оскільки в реалізації токсичної дії цієї сполуки велике, якщо не вирішальне, значення мають молекулярно-генетичні механізми, опосередковані VDR [9], то цілком імовірно, що поліморфізми відповідного гена можуть бути причетні до змін у судинній стінці, що індукуються високими дозами вітаміну D. Дані щодо частоти алельних варіантів у хворих з ГКС в українській популяції відсутні.

Мета дослідження – провести аналіз асоціації алельного поліморфізму гена VDR, BsmI, з розвитком гострого коронарного синдрому в осіб різної статі.

Матеріал і методи. У роботі використано венозну кров 118 хворих з ГКС (22,0% жінок і 78,0% чоловіків, середній вік – $55,9 \pm 0,89$ років), що перебували на лікуванні у кардіологічному відділенні Сумської міської клінічної лікарні №1. Кінцевий діагноз нестабільної стенокардії (НС) виставлено у 33,5% хворих, гострого інфаркту міокарда (ІМ) – у 66,5%

пацієнтів. Діагноз гострого ІМ і НС встановлено на підставі даних клінічних, електрокардіографічних і біохімічних обстежень, відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів [3,14]. Контрольна група складалася із 234 пацієнтів, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми і вимірювання артеріального тиску. Контрольна група і група хворих з ГКС відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі: серед хворих було більше чоловіків ($P=0,034$ за χ^2 -критерієм), проте середній вік першої ($66,0\pm 0,95$ років) був істотно вищим, ніж другої ($P<0,001$). Остання обставина збільшувала надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ГКС у пацієнтів контрольної групи в майбутніх періодах їхнього життя.

Визначення BsmI поліморфізму гена VDR (rs1544410) проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виявленні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморожували і зберігали при температурі -20°C . ДНК з неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт BsmI поліморфізму, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'-AGGGAGACGTAGCAA AAGGAG-3' і зворотного (antisense) – 5'-TGTCCCCAAGGTCACAAT AAC-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, 250 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. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагмента промотора складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 60°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Пізніше 6 мкл продукту ампліфікації фрагмента промотора інкубували при 37°C протягом 20 годин з 2 ОД рестриктази BsmI ("Ферментас", Литва) 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. Якщо в 58980 позиції гена VDR містився гуанін, ампліфікат, який складався з 425 пар основ, розщеплювався рестриктазою BsmI на два фрагменти – 232 і 193 пари основ. У разі заміни гуаніну на аденін сайт рестрикції для BsmI втрачався і утворювався один фрагмент розміром 425 пар основ (рис. 1).

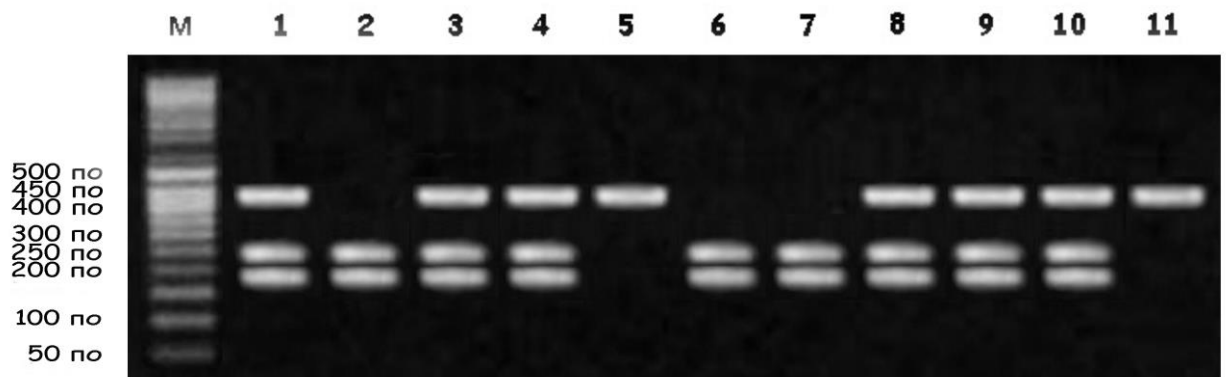


Рис.1 Результати рестрикційного аналізу BsmI поліморфізму гена VDR. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 5,11 відповідають V/V-генотипу; доріжки 1,3,4,8,9,10 – V/b-генотипу; 2,6,7 – b/b-генотипу.

Ампліфікати вивченого фрагмента гена VDR після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 40 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм. Величини $P < 0,05$ вважали статистично значимими.

Результати дослідження та їх обговорення. Генотипування хворих з ГКС та пацієнтів контрольної групи за BsmI поліморфізмом гена VDR дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються окремі варіанти цього гена, а також порівняти їх між групами загалом і за статтю.

На рис. 2 наведено частоту виявлення різних алельних варіантів даного поліморфізму у пацієнтів, що були об'єктом дослідження.

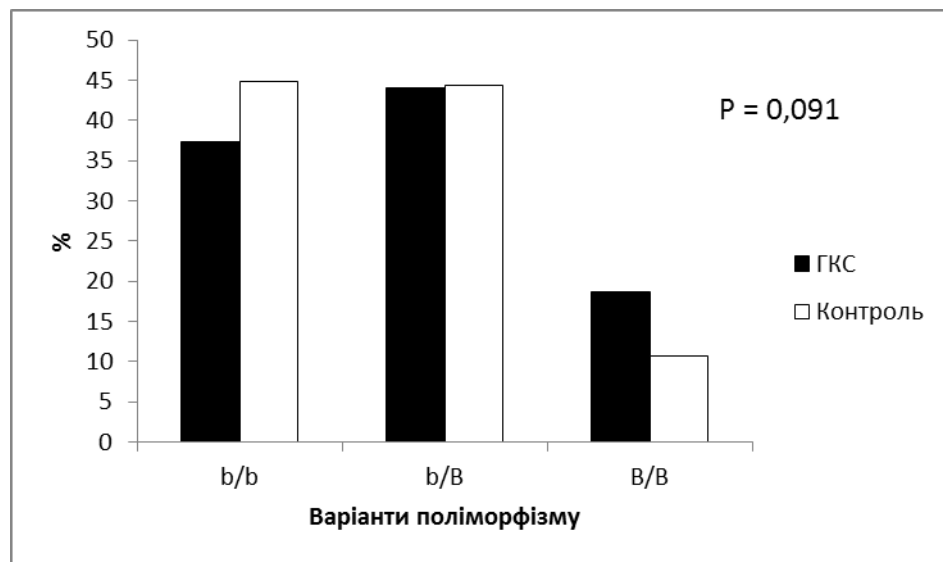


Рис.2 Частота алельних варіантів гена VDR за поліморфізмом BsmI у хворих з ГКС (чорні стопчики) і в контрольній групі (білі стопчики). P – статистична значимість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Так, встановлено, що у хворих з ГКС співвідношення гомозигот за b-алелем (b/b), гетерозигот (b/B) і гомозигот за B-алелем (B/B) складає 37,3%, 44,1% і 28,6%, а в контрольній групі – відповідно 44,9%, 44,4% і 10,7%. При цьому відмінності частоти зазначених генотипів між групою хворих з ГКС та контрольною групою були статистично недостовірними ($P=0,091$).

Розподіл частот алельних варіантів поліморфізму BsmI за статтю у хворих і в контролі подано в табл. 1. Як впливає з наведених даних,

частота різних варіантів даного поліморфізму достовірно відрізняється у хворих та практично здорових чоловіків (P=0,040). В осіб жіночої статі такі відмінності встановлені не були (P=0,953). Таким чином, виявлено статистично достовірну асоціацію BsmI поліморфізму з ГКС в осіб чоловічої статі.

Таблиця 1

Зв'язок BsmI поліморфізму гена VDR з розвитком гострого коронарного синдрому (ГКС) в осіб жіночої і чоловічої статі

<i>Стать</i>	<i>Генотип</i>	<i>Контроль</i>	<i>ГКС</i>
<i>Жінки</i>	b/b	39,0%	42,3%
	b/B	49,4%	46,2%
	B/B	11,6%	11,5%
	$\chi^2=0,096; P=0,953$		
<i>Чоловіки</i>	b/b	47,8%	35,9%
	b/B	42,0%	43,5%
	B/B	10,2%	20,6%
	$\chi^2=6,439; P=0,040$		

У табл. 2 представлено дані про частоту поліморфних варіантів BsmI у жінок і чоловіків у контрольній групі і у хворих з ГКС.

Таблиця 2

Частота генотипів за AраI поліморфізмом гена VDR у жінок і чоловіків у контрольній групі і у хворих з ГКС

	<i>Генотип</i>	<i>Жінки</i>	<i>Чоловіки</i>
<i>Контрольна група</i>	b/b	39,0%	47,8%
	b/B	49,4%	42,0%
	B/B	11,6%	10,2%
	$\chi^2=1,624; P=0,444$		
<i>Хворі з ГКС</i>	b/b	42,3%	35,9%
	b/B	46,2%	43,5%
	B/B	11,5%	20,6%

	$\chi^2=1,161; P=0,560$
--	-------------------------

Одержані результати свідчать про відсутність статистично значимих відмінностей між особами жіночої і чоловічої статі як серед пацієнтів з ГКС (P=0,560), так і в контролі (P=0,444).

Аналіз частоти осіб різної статі свідчить про те, що немає зв'язку між статтю пацієнтів і розвитком ГКС у жодній з груп, утворених з урахуванням генотипу за BsmI поліморфізмом гена VDR (табл. 3).

Таблиця 3

Частота осіб жіночої і чоловічої статі у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за BsmI поліморфізмом гена VDR

<i>Генотип</i>	<i>Стать</i>	<i>Контроль</i>	<i>ГКС</i>
b/b	жінки	28,6%	25,0%
	чоловіки	71,4%	75,0%
	$\chi^2=0,198; P=0,656$		
b/B	жінки	36,5%	23,1%
	чоловіки	63,5%	76,9%
	$\chi^2=2,885; P=0,089$		
B/B	жінки	36,0%	13,6%
	чоловіки	64,0%	86,4%
	$\chi^2=3,078; P=0,079$		

На сьогодні описано 1518 однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена VDR у людини. Серед них BsmI, локалізований у 8-му нитроні. Суть BsmI SNP полягає в тому, що у положенні 58980 гуанін заміщається на аденін. Самі собою поліморфізми в інтронах не є функціонально значимими, оскільки не змінюють послідовність азотистих основ у змістовній частині гена, проте, будучи зчепленими з регуляторними ділянками гена, можуть виступати маркерами функціональних зв'язків інших SNP з розвитком патологічних процесів і хвороб.

Зв'язок BsmI поліморфізму з різними патологічними процесами і хворобами вивчався у багатьох дослідженнях у різних популяціях. У деяких з них було встановлено асоціацію цього SNP з остеопорозом [6], патологічними переломами [4], цукровим діабетом II типу [10], раком простати [8] і молочної залози [16], хворобою Паркінсона [2]. В інших дослідженнях такого зв'язку не виявлено. Це стосується ішемічної хвороби серця [11], бронхіальної астми [13], рахіту [7], раку молочної залози [5], цукрового діабету II типу [15].

У проведених нами дослідженнях виявлений зв'язок BsmI поліморфізму з гострим коронарним синдромом в осіб чоловічої статі. Проте, остаточний висновок можна буде зробити тільки після генотипування пацієнтів по двох інших, близьких до BsmI SNP – ApaI і TaqI – і аналізу асоціації ГКС з відповідними гаплотипами.

Висновки.

У виконаній нами роботі вперше проаналізовано асоціацію BsmI поліморфізму гена VDR з гострим коронарним синдромом у представників української популяції. Виявлено зв'язок досліджуваного генетичного чинника з ГКС в осіб чоловічої статі.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з вивченням впливу окремих гаплотипів за поліморфізмами гена VDR (ApaI + BsmI + TaqI) на розвиток гострого коронарного синдрому.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гарбузова В.Ю. Матриксний Gla-протеїн (MGP) та його роль в кальцифікації судинної стінки / В.Ю. Гарбузова, О.В. Атаман // Фізіол. журнал. - 2011. - т.57, №4. - С. 96-112.
2. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Parkinson's Disease in Koreans /J-S. Kim, Y-I. Kim, C. Song, I. Yoon, J-W. Park, et al. //J Korean Med Sci. – 2005. – V. 20. – P. 495-498.

3. Bertrand M.E., Simoons M.L., Fox K.A.A. et al. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology // *Eur. Heart J.*-2002.- 23.-P.1809-1840.
4. Chatzipapas C. Polymorphisms of the Vitamin D Receptor Gene and Stress Fractures / C. Chatzipapas, S. Boikos, G.I. Drosos, K. Kazakos, et al.// *Horm Metab Res.* – 2009. – V. 41. – P. 635 – 640.
5. Chen W.Y. Associations Between Polymorphisms in the Vitamin D Receptor and Breast Cancer Risk / W.Y. Chen, E.R. Bertone-Johnson, D.J. Hunter, W.C. Willett et al. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2005. – V. 14. – P. 2335-2339.
6. Evaluation of the effects of vitamin D receptor and estrogen receptor 1 gene polymorphisms on bone mineral density in postmenopausal women / M.D. Tanriover, G.B. Tatar, T.D. Uluturk, D.D. Erden, A. Tanriover et al. // *Clin Rheumatol.* – 2010. – V. 29. – P.1285–1293.
7. Fischer Ph.R., Vitamin D Receptor Polymorphisms and Nutritional Rickets in Nigerian Children/ Ph.R. Fischer, T.D. Thacher, J.M. Pettifor, L.B. Jorde et al. // *Journal of bone and mineral research.* – 2000. – V. 15. N. 11. – P. 2206-2210.
8. Habuchi T. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population / T. Habuchi, T. Suzuki, R. Sasaki, L. Wang, et al. // *Cancer Research* – 2000. – Vol. 60. – P. 305-308.
9. Norman P.E. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries / P.E. Norman, J.T. Powell // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*- 2005.- V.25.- P. 39-46.
10. Ortlepp J.R. The VDR gene variant is associated with the prevalence of Type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease./ J.R. Ortlepp, J.

- Lauscher, R. Hoffmann, P. Hanrath, H.G. Joost.// Diabet Med. – 2001. – V. 18. – P. 842-845.
11. Pan X.M. No association between vitamin D receptor polymorphisms and coronary artery disease in a Chinese population / X.M. Pan, D.R. Li, L. Yang, E.Y. Wang et al. // DNA Cell Biol. – 2009. – V. 28. – P. 521-525.
 12. Proudfoot D. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein / D. Proudfoot, C.M. Shanahan // Nephrology (Carlton).- 2006.- V.11.- P. 455-461.
 13. Saadi A. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the chinese han population: a case-control study / A. Saadi, G. Guimin, L. Huaichen, W. Chunhua et al. // BMC Medical Genetics. – 21 July 2009 – V. 10:71 <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/10/71>
 14. Thygesen K, Alpert J., White H. et al. Universal definition of myocardial infarction // European Heart J.-2007.-28.-P.2525-2538.
 15. Vitamin D Receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 Diabetes Mellitus: a North Indian Study / H.K. Bid, R. Konwar, C.G. Aggarwal, S. Gautam, M. Saxena, et al. // Indian J Med Sci. – 2009. – V. 63, No. 5. – P.187-194.
 16. Vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI) and breast cancer risk: association replication in two case–control studies within French Canadian population / M. Sinotte, F. Rousseau, P. Ayotte, E. Dewailly, C. Diorio, et al. // Endocrine-Related Cancer. – 2008. – V. 15. – P. 975–983.