

Abstract

Ye. I. Dubovyk,
V. Yu. Harbuzova,
A. V. Ataman,
*Sumy State University, 2 Rimsky-
Korsakov str., Sumy, Ukraine,
40007*

**ANALYSIS OF ASSOCIATION OF VITAMIN K EPOXIDE
REDUCTASE COMPLEX SUBUNIT 1 (VKORC1) GENE
HAPLOTYPES WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC
STROKE**

Introduction. Ischemic atherothrombotic stroke (IAS) is a multifactorial disease which development is determined by environmental and genetic factors. In recent years, a large number SNPs of various potential candidate-genes have been investigated to establish their association with IAS. However, haplotype analysis is considered more effective than single nucleotide polymorphism analysis to search for genetic determinants of widespread diseases or human features. Thus, the purpose of the present study was the conduction of a case-control study on representatives of the North-Eastern region of Ukraine in order to assess the possible association of vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*VKORC1*) gene haplotypes with IAS.

Materials and methods. The study group included 170 unrelated Ukrainian patients with a mean age of 64.7 ± 0.73 years who had IAS. The control group consisted of 124 individuals with the absence of cardio-vascular pathologies. *VKORC1* promoter G-1639A (rs9923231) and first intron C1173T (rs9934438) polymorphisms genotyping was performed using PCR-RFLP (polymerase chain reaction with following restriction fragment length polymorphism analysis) method. Most statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Science software (SPSS, version 17.0, Chicago, IL, USA). Linkage disequilibrium (LD) and haplotype frequencies were analyzed by Arlequin (version 3.1, Bern, University of Berne, Switzerland). All statistical tests were two-sided, $P < 0.05$ was considered significant.

Results. The data obtained in present work demonstrated that *VKORC1* G-1639A but not C1173T polymorphism was associated with IAS in Ukrainian population. It has been shown that the risk for IAS in patients with A/A and G/A genotypes was higher than for individuals with G/G genotype (OR = 1.905; $P = 0.009$). Haplotype analysis demonstrated, that -1639G/1173T and -1639A/1173C haplotypes frequencies in stroke subjects was significant higher than in matched control (OR = 3.813, $P = 0.010$ and OR = 2.189, $P = 0.011$, respectively). In contrast, -1639G/1173C haplotype frequency was higher in the control group (OR = 0.548, $P < 0.001$). Frequency of -1639A/1173T haplotype in both groups was similar ($P = 0.218$).

Conclusion. *VKORC1* -1639G/1173T and -1639A/1173C haplotypes is related to increased risk for IAS, while -1639G/1173C is a protective factor for IAS in Ukrainian population.

Keywords: *VKORC1*, gene polymorphism, haplotype, ischemic stroke.

Corresponding author: janitor@ukr.net

Резюме

Є. І. Дубовик,
В. Ю. Гарбузова,
О. В. Атаман,

Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова,
2, м. Суми, Україна, 40007

ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ГАПЛОТИПІВ ГЕНА ВІТАМІН К-ЕПОКСИД РЕДУКТАЗИ (VKORC1) З ІШЕМІЧНИМ АТЕРОТРОМБОТИЧНИМ ІНСУЛЬТОМ

Метою представленої роботи було встановлення можливого зв'язку гаплотипів гена *VKORC1*, утвореними за поліморфізмами G-1639A та C1173T, з ризиком розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТИ).

Матеріали і методи. Для дослідження була використана венозна кров 170 хворих з ІАТИ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) та 124 осіб без інфаркту головного мозку (контрольна група). Визначення G-1639A (rs9923231) поліморфізму промотора та C1173T (rs9934438) поліморфізму першого інтрона гена *VKORC1* проведено за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів. Аналіз нерівноважного зчеплення та розрахунок частоти гаплотипів здійснений за допомогою програми Arlequin (версія 3.1).

Результати. Отримані дані демонструють, що G-1639A поліморфізм гена *VKORC1* пов'язаний з розвитком ІАТИ в українській популяції. Встановлено, що у носіїв мінорного А-алеля ризик розвитку ішемічного інсульту був більшим, ніж в осіб з G/G генотипом (OR = 1,905; P = 0,009). Разом з цим виявлено, що гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C у хворих з ІАТИ зустрічались достовірно частіше, ніж в контролі (OR = 3,813; P = 0,010 та OR = 2,189; P = 0,011, відповідно), а частота гаплотипу -1639G/1173C була вищою серед представників відносно здорових осіб (OR = 0,548; P < 0,001). Різниця в частоті гаплотипу -1639A/1173T серед груп порівняння виявлена не була (P = 0,218).

Висновок. Гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C пов'язані зі збільшенням ризику ІАТИ, а гаплотип -1639G/1173C є протективним фактором щодо настання ішемічного інсульту.

Ключові слова: *VKORC1*, поліморфізм генів, гаплотип, ішемічний інсульт.

Резюме

Є. І. Дубовик,
В. Ю. Гарбузова,
А. В. Атаман,

Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова,
2, м. Суми, Україна,
40007

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ГАПЛОТИПОВ ГЕНА ВИТАМИН К-ЭПОКСИД РЕДУКТАЗЫ (VKORC1) С ИШЕМИЧЕСКИМ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

Целью представленной работы было установление возможной связи гаплотипов гена *VKORC1*, образованными полиморфизмами G-1639A и C1173T, с риском развития ишемического атеротромботического инсульта (ИАТИ).

Материалы и методы. Для исследования была использована венозная кровь 170 больных с ИАТИ (42,4 % женщин и 57,6 % мужчин) и 124 индивидуумов без инфаркта головного мозга (контрольная группа). Определение G-1639A (rs9923231) полиморфизма промотора и C1173T (rs9934438) полиморфизма первого интрона гена *VKORC1* выполнено с помощью метода полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов. Анализ неравновесного сцепления и расчет частоты гаплотипов осуществлен с помощью программы Arlequin (версия 3.1).

Результаты. Полученные данные показывают, что G-1639A полиморфизм гена *VKORC1* связан с развитием ИАТИ в украинской



популяції. Установлено, що у носителей минорного А-аллеля риск развития ишемического инсульта был больше, чем у лиц с G/G генотипом (OR = 1,905; P = 0,009). Вместе с этим установлено, что гаплотипы -1639G /1173T и -1639A/1173C у больных с ИАТИ встречались достоверно чаще, нежели в контроле (OR = 3,813; P = 0,010 и OR = 2,189; P = 0,011, соответственно), а частота гаплотипа -1639G/1173C была выше среди представителей относительно здоровых лиц (OR = 0,548; P <0,001). Разница в частоте гаплотипа -1639A/1173T среди групп сравнения обнаружена не была (P = 0,218).

Вывод. Гаплотипы -1639G/1173T и -1639A/1173C связаны с увеличением риска ИАТИ, а гаплотип -1639G/1173C является прогностическим фактором относительно наступления развития ишемического инсульта.

Ключевые слова: VKORC1, полиморфизм генов, гаплотип, ишемический инсульт.

Автор, відповідальний за листування: janitor@ukr.net

Вступ

Значна кількість білків для своєї активації потребує посттрансляційної модифікації. Одним з видів такого перетворення є заміна в пептидних послідовностях протеїнів залишків глутамінової кислоти на γ -карбоксиглутамінові (γ -карбоксилювання). Біохімічна система, що реалізує вказану модифікацію, називається циклом вітаміну К [1]. Під час функціонування даного циклу постійно відбувається окиснення вітаміну К гідрохінону до вітаміну К-2,3-епоксиду. Тому для підтримання безперервної роботи усієї системи має реалізовуватись зворотнє відновлення вітаміну К-2,3-епоксиду до вітаміну К гідрохінону. Фермент, що каталізує таку реакцію, має назву вітаміну К-епоксид редуктаза (VKORC1).

VKORC1 – це інтегральний трансмембранний протеїн (18 кДа), що складається із 163 амінокислот та широко експресується у багатьох органах і тканинах (печінка, слинні залози, легені, мозок, кістки, серце тощо) [2]. Вона є важливим чинником активації вітаміну К-залежних білків (vitamin K dependent proteins (VKDPs)), що проходять посттрансляційну модифікацію в циклі вітаміну К. На сьогодні відомо, що до групи VKDPs належить ряд факторів згортання крові (протромбін, фактор VII, IX, X), білки антикоагулянтної системи (протеїн С, S та Z), білки, що причетні до регуляції мінералізації кісток та м'яких тканин (матриксний Gla-протеїн (MGP), Gla-Rich протеїн (GRP), остеокальцин) [3,4], а також білок, що бере участь в реакціях формування тромбоцитарного тромбу та диференціюванні гладко-м'язових клітин судин

(growth arrest-specific 6 (GAS6)) [5]. Таким чином, можна припустити, що дисфункція VKORC1 може вести до зниження активності вітаміну К-залежних білків, а, отже, вести до тромботичних ускладнень, кальцифікації судинної стінки та порушення в ній процесів проліферації. Вказані зміни є важливими складовими розвитку атеросклеротичного ураження мозкових артерій, що часто призводить до ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТИ).

ІАТИ – це мультифакторіальне захворювання, розвиток якого визначається поєднанням впливом факторів зовнішнього середовища та спадкових факторів. З моменту відкриття гена VKORC1 у 2004 [6,7], була опублікована низка робіт, присвячених вивченню ролі його однонуклеотидних поліморфізмів з розвитком кардіоваскулярних та цереброваскулярних хвороб [8–12]. Серед них кілька досліджень, в яких показана асоціація G-1639A, C1173T та T2255C поліморфних локусів з розвитком ішемічного інсульту в китайській популяції [13–15]. Проте, результати подібних робіт, виконаних в інших етнічних групах, на разі лишаються дискусійними [16–20]. Вивчення ролі поліморфізмів G-1639A та C1173T гена VKORC1 та його гаплотипів у розвитку ішемічного інсульту серед населення України та інших слав'янських народів реалізовано не було. Останнє спонукало нас до проведення власного дослідження серед представників української популяції з метою встановлення можливого зв'язку поліморфізмів G-1639A та C1173T та утвореними ними гаплотипами з ризиком розвитку ІАТИ.



Матеріал і методи.

Для дослідження була використана венозна кров 170 хворих з ІАТІ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік $64,7 \pm 0,73$ роки), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні №5. Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, результатами МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [21], на підставі даних анамнезу, особливостей клінічного перебігу хвороби, результатів ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови та ЕКГ. Пацієнти з кардіоемболічним ішемічним інсультом та ішемічним інсультом нез'ясованої етіології виключалися із дослідної групи.

Група порівняння складалася із 124 осіб, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми, вимірювання артеріального тиску та проведення загальноприйнятого неврологічного огляду. Контрольна група і група хворих з ІАТІ не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ($P=0,294$ за χ^2 -критерієм), однак середній вік першої ($76,7 \pm 0,93$ роки) був істотно вищим, ніж другої ($P < 0,001$).

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації та схвалено Комісією з біоетики медичного інституту Сумського державного університету. Перед включенням у дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду.

Визначення G-1639A (rs9923231) поліморфізму промотора та C1173T (rs9934438) поліморфізму першого інтрона гена *VKORC1* проведено за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі.

Венозну кров для генотипування набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл із додаванням калієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 мМ) в якості антикоагулянта ("Sarstedt", Німеччина). Кров заморожували та зберігали при температурі -20°C . ДНК з неї виділяли із використанням наборів GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт rs9923231 поліморфізму, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого

(sense) – $5'$ - GCCAGCAGGAGAGGGAAATA - $3'$, зворотного (antisense) – $5'$ - AGTTTGGAC-TACAGGTGCCT - $3'$. 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 пМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Taq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента, що містив ділянку промотора, складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – $61,0^\circ\text{C}$ (45 с) і елонгація – 72°C (50 с). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 годин із 5 ОД рестриктази *MspI* (*HpaII*) (ThermoFisher Scientific, США). Якщо в -1639 позиції гена *VKORC1* містився гуанін, ампліфікат, який складався з 290 пар основ, розщеплювався рестриктазою *MspI* на два фрагменти – 168 і 122 пар основ. У разі заміни гуаніну на аденін сайт рестрикції для *MspI* втрачався і в гелі візуалізувався один фрагмент завдовжки 290 пар основ.

Генотипування rs9934438 поліморфізму проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – $5'$ - AAGATGAAAAGCAGGGCCTAC - $3'$, зворотного (antisense) – $5'$ - CCGAGAAAGGTGATTTCCAA - $3'$. 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 пМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Taq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента першого інтрона гена *VKORC1* складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – $60,0^\circ\text{C}$ (50 с) і елонгація – 72°C (55 с). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 годин із 3 ОД рестриктази *StyI* (*Eco130I*). Наявність у 1173-й позиції гена *VKORC1* цитозину перешкоджало рестрикції, а при заміні цитозину на тимін рестриктаза *StyI* розщеплювала ампліфікований фрагмент довжиною 195 пар азотистих основ на два фрагменти: 125 та 70 пар основ.

Ампліфікати досліджуваних фрагментів гена *VKORC1* після рестрикції розділяли в 2,0 % агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 30 хв. Візуалізацію ДНК після елек-



трофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора (Біоком, Росія).

Основну частину статистичного аналізу проведено з використанням програми SPSS (версія 17.0). Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах, а також для перевірки відповідності цих розподілів рівновазі Харді–Вайнберга застосовували χ^2 -критерій Пірсона. З метою встановлення ризику розвитку ІАТІ розраховували відношення шансів (OR) та 95 % довірчий інтервал (CI) для трьох основних моделей успадкування: домінантна (референс – гомозиготи за основним алелем), рецесивна (референс – генотипи із основним алелем) та адитивна (гетерозиготи та гомозиготи за мінорним алелем проти гомозигот за основним алелем в якості референсного генотипу). Для розрахунку частоти гаплотипів та аналізу нерівноваженого зчеплення (linkage disequilibrium (LD)) використовували програму Arlequin (версія 3.1). Усі тести були двосторонніми, значення $P < 0,05$ вважали статистично значимими.

Результати дослідження.

Розподіл генотипів за двома поліморфізмами гена *VKORC1* (G-1639A та C1173T) у хворих з ІАТІ (частота мінорного алеля 0,476 і 0,412, від-

повідно) та в контролі (частота мінорного алеля 0,371 і 0,327, відповідно) не відхилявся від рівноваги Харді–Вайнберга ($P > 0,05$).

Частоти, з якими зустрічались різні генотипи за досліджуваними поліморфними сайтами гена *VKORC1*, та результати аналізу асоціації цих генотипів з ІАТІ в рамках трьох моделей успадкування представлені в таблиці 1. Було встановлено, що носії мінорного А-алеля за G-1639A локусом були більш схильні до розвитку ішемічного інсульту, ніж особи з генотипом G/G. Так, відповідно до домінантної моделі успадкування, в осіб з G/A та A/A генотипами ризик ІАТІ був 1,9 (95 % CI = 1,172–3,097; $P = 0,009$) рази вищий, ніж у носіїв G/G генотипу. Результати аналізу в рамках адитивної моделі показали, що ризик настання ІАТІ у гетерозигот (G/A) був у 1,8 рази (95 % CI = 1,050–3,006; $P = 0,032$), а у гомозигот за мінорним алелем (A/A) – у 2,2 рази (95 % CI = 1,149–4,227; $P = 0,017$) вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (G/G). Зв'язок генотипів за поліморфізмом C1173T гена *VKORC1* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту за результатами аналізу в різних моделях успадкування встановлений не був.

Таблиця 1 – Аналіз розподілу генотипів за G-1639A та C1173 поліморфізмами гена *VKORC1* у хворих з ІАТІ та контрольній групі

SNP	Модель	Генотип	ІАТІ (n, %)	Контроль (n, %)	P	OR	95 % CI
G-1639A	Адитивна	G/G	49 (28,8)	54 (43,6)			
		G/A	79 (46,5)	49 (39,5)	0,032	1,777	1,050–3,006
		A/A	42 (24,7)	21 (16,9)	0,017	2,204	1,149–4,227
	Домінантна	G/G	49 (28,8)	54 (43,6)			
		G/A+A/A	121 (71,2)	70 (56,4)	0,009	1,905	1,172–3,097
		Рецесивна	G/G+G/A	128 (75,3)	103 (83,1)		
		A/A	42 (24,7)	21 (16,9)	0,111	1,609	0,897–2,888
C1173T	Адитивна	C/C	63 (37,1)	59 (47,6)			
		C/T	74 (43,5)	47 (37,9)	0,135	1,475	0,886–2,455
		T/T	33 (19,4)	18 (14,5)	0,117	1,717	0,874–3,373
	Домінантна	C/C	63 (37,1)	59 (47,6)			
		C/T+T/T	107 (62,9)	65 (52,4)	0,071	1,542	0,963–2,467
		Рецесивна	C/C+C/T	137 (80,6)	106 (85,5)		
		T/T	33 (19,4)	18 (14,5)	0,275	1,418	0,757–2,657

Примітка: n – кількість осіб; OR – відношення шансів; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Наступним кроком нашого дослідження став аналіз на нерівноважене зчеплення між полі-

морфізмами промотора (G-1639A) та першого інтрона (C1173T) гена *VKORC1*. Результати роз-



рахунків показали, що два вказані поліморфні локуси знаходяться у міцному LD ($D' = 0,809$, $r^2 = 0,518$). Така обставина дозволила нам визначити частоту гаплотипів, які утворюють досліджувані SNP, та провести аналіз їх асоціації з ІАТІ (табл. 2). Встановлено, що гаплотипи –1639G/1173T та –1639A/1173C у дослідній групі зустрічались достовірно частіше, ніж в контролі, та значимо збільшували ризик розвитку інсуль-

ту (OR = 3,813; 95 % CI = 1,268–11,298; P = 0,010 та OR = 2,189, 95 % CI = 1,185–4,045; P = 0,011, відповідно). Натомість, частота гаплотипу –1639G/1173C була вищою серед представників групи контролю, що вказувало на його протективну роль щодо настання ІАТІ (OR = 0,548, 95 % CI = 0,393–0,765; P < 0,001). Різниця в частоті гаплотипу –1639A/1173T серед груп порівняння виявлена не була (P = 0,218).

Таблиця 2 – Аналіз розподілу гаплотипів G-1639A/C1173T у хворих з ІАТІ та контрольних осіб

Гаплотип	ІАТІ		Контроль		P	OR	95 % CI
	2n	Частота	2n	Частота			
G-T	20	0,059	4	0,016	0,010	3,813	1,268–11,298
A-C	42	0,124	15	0,061	0,011	2,189	1,185–4,045
G-C	158	0,464	152	0,613	<0,001	0,548	0,393–0,765
A-T	120	0,353	77	0,310	0,281	1,211	0,854–1,717

Примітка: n – кількість осіб; OR – відношення шансів; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал

Обговорення результатів.

Отримані в представленому дослідженні результати демонструють, що G-1639A поліморфізм гена *VKORC1* пов'язаний з розвитком ІАТІ в українській популяції. Встановлено, що у пацієнтів з A/A та G/A генотипами ризик розвитку ішемічного інсульту був вищим, ніж у гомозигот за основним алелем (G/G генотип). Зв'язок між поліморфізмом C1173T гена *VKORC1* та розвитком ІАТІ був відсутнім.

На сьогодні вважається, що гаплотипний аналіз є більш ефективним у пошуці генетичних детермінант поширених мультифакторіальних хвороб, ніж аналіз поліморфізму поодиноких нуклеотидів [22]. Це спонукало нас до проведення розрахунку частот гаплотипів та пошуку їх зв'язку з ішемічним інсультом. Було виявлено, що особи з –1639G/1173T та –1639A/1173C гаплотипами мали підвищений ризик розвитку ІАТІ, натомість –1639G/1173C гаплотип був пов'язаний зі зменшенням ризику даної недуги.

Поліморфний сайт C1173T (rs9934438) розташований у першому інтроні гена *VKORC1* та призводить до заміни цитозину на тимін у 1173 позиції. Наші результати показали міцне нерівноважене зчеплення між парою локусів G-1639A/C1173T, що збігається з даними інших авторів [13, 14, 23]. Поліморфізм G-1639A (rs9923231) знаходиться у другому нуклеотиді E-боксу (CA/GGGTG) промотора гена *VKORC1*

та спричиняє заміну гауїна на аденін в –1639 положенні. Така нуклеотидна конверсія призводить до перебудови E-боксу (з CGGGTG на CAGGTG), що дозволяє приєднуватись до нього репресивним білкам [24]. Кілька досліджень продемонстрували зниження експресії мРНК вітаміну K-епоксид редуктази в тканинах тварин з G-1639G/C1173C генотипами, порівняно з носіями G-1639A/C1173T та A-1639A/T1173T генотипів [24, 25].

Вище наведене дозволяє припустити, що пригнічення відновлення вітаміну K-епоксиду в носіїв –1639A та 1173T алелів може призводити до недостатності γ -карбоксілювання протеїну C, протеїну S, протеїну Z, MGP, GRP та остеокальцину. Наслідком цього може бути підвищений ризик тромбоутворення, мінералізації артерій та атеросклеротичної бляшки. Відповідно до вище наведеного Teichert et al. показали, що T-алель за C1173T поліморфним локусом гена *VKORC1* був асоційований з підвищеним ризиком кальцифікації аорти [8]. Tavridou et al. виявили зв'язок між поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* та товщиною інтими-медії сонних артерій у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу [12]. Таку кореляцію автори пояснили більш вираженою кальцифікацією судин в осіб з –1639A алелем.

У попередній нашій роботі ми досліджували асоціацію поліморфізму T2255C гена *VKORC1* з



розвитком ІАТІ в українській популяції [26]. Було встановлено, що ризик розвитку ішемічного інсульту в осіб з С/С генотипом був значимо вищим, ніж у носіїв Т/Т генотипу. Отримані нами результати узгоджуються з даними Du et al., які повідомили про зв'язок поліморфних сайтів G-1639A і T2255C зі схильністю до кардіоваскулярних та цереброваскулярних хвороб в китайській популяції [15]. Дослідники встановили, що особи з -1639A та 2255C алелями мали підвищений ризик розвитку вказаних патологій.

З іншого боку, Zhang et al. досліджували вплив G-1639A та C1173T поліморфізмів на розвиток ішемічного інсульту в китайській популяції і повідомили, що носії -1639G (частота 0,114), або 1173C (частота 0,074) алелів більш схильні до розвитку ішемічного інсульту. Разом з тим, 1639G-1173C гаплотип був визначений фактором ризику інсульту, тоді як 1639A-1173T гаплотип мав протективний ефект [14]. Дослідники припустили, що алель -1639G, який знижує продукцію мРНК *VKORC1*, був асоційований зі зменшеною чутливістю до кумаринових антикоагулянтів та підвищеним ризиком тромбозу. Схожі результати були отримані Wang et al., які ідентифікували гаплотипний блок у гені *VKORC1*, що включає п'ять основних некодуючих SNP (G-1639A, C1173T, C1542G, T2255C і G3730A) із високим LD [13]. Автори продемонстрували, що алель 2255C, що репрезентує гаплотип G-C-G-C-A, майже удвічі збільшує ризик ішемічного інсульту, ішемічної хвороби серця та розшарування аорти в китайській популяції. Крім цього, Shyu et al. показали, що алель -1639A має захисний ефект щодо розвитку ІАТІ серед населення Тайваню [18]. Вчені пояснили, що носії мінорного А-алеля мали знижену концентрацію факторів згортання крові, що в кінцевому рахунку вело до зменшення вірогідності тромбоутворення, а, значить, і до редукції вразливості інсульту.

Поряд з цим, більшість досліджень, виконаних в Європі та Північній Америці, не виявили асоціації між генетичним поліморфізмом *VKORC1* та розвитком цереброваскулярних хво-

роб. Ragia et al. не знайшли значимої різниці в розподілі генотипів за G-1639A поліморфним сайтом у грецьких пацієнтів з ішемічним інсульту та контрольній групі [17]. Відсутність зв'язку генетичного поліморфізму з інсульту автори пояснили комбінованим впливом -1639A алеля на вітамін К-залежні гемостатичні протеїни, та білки, що не причетні до регуляції реологічних властивостей крові. У роботі Hindorff et al. не встановлено достовірної асоціації гаплотипів гена *VKORC1* з інфарктом міокарда, ішемічним інсульту та венозним тромбозом серед населення США [19]. Відповідно до цього, два дослідження, виконані в Бельгії [20] та Німеччині [16] також не виявили зв'язку між гаплотипами гена *VKORC1* та різними підтипами ішемічного інсульту.

Мета-аналіз, виконаний Li et al. у 2015 році, продемонстрував, що поліморфні сайти G-1639A і T2255C гена *VKORC1* пов'язані з ризиком розвитку цереброваскулярних та кардіоваскулярних захворювань [27]. При цьому, вище наведені дані демонструють, що мінорні алелі в одних популяціях можуть бути основними алелями – в інших, що веде до різної інтерпретації результатів. Впливає, що в одних випадках генетичний поліморфізм *VKORC1* може призводити до зниження ризику тромбоутворення та атеросклерозу, а в інших випадках – підвищувати ймовірність тромбозу та атерогенезу, сприяючи розвитку серцево-судинних захворювань (як було показано в нашій роботі). Одним з пояснень цього може бути поширений дефіцит вітаміну К серед представників багатьох популяцій [28]. У такій ситуації транспортні системи забезпечують доставку філохінону до печінки з метою підтримання коагуляції крові. В той час як позапечінкові тканини, в яких синтезуються менш важливі Gla-білки, не отримують вітаміну К (відповідно до теорії сортування МакКана та Еймса [29]). У таких умовах зниження активності *VKORC1* внаслідок генетичного поліморфізму посилює дефіцит вітаміну К в позапечінкових тканинах та компенсується надходженням вітаміну К у печінці.

готи за основним G-алелем. Крім того, гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C пов'язані зі збільшенням ризику ІАТІ, а гаплотип -1639G/1173C є протективним фактором щодо настання ішемічного інсульту.

Висновки

У представників української популяції існує зв'язок між частотою генотипів за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* та ризиком ІАТІ. Носії мінорного А-алеля мають більшу ймовірність розвитку ішемічного інсульту, ніж гомози-



Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення зв'язку інших поліморфних варіантів та гаплотипів генів циклу вітаміну К з розвитком як ішемічного інсульту, так і інших поширених мультифакторіальних хвороб, зокрема гострого коронарного синдрому, артеріальної гіпертензії та цукрового діабету 2 типу.

Роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням "Зв'язок алельного поліморфізму "генів ектопічної кальцифікації" з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень", № 91.01.01.15-17

References (список літератури)

1. Oldenburg J., Marinova M., Muller-Reible C., and Watzka M. The Vitamin K Cycle. *Vitamins and Hormones*. 2008;78:35–62.
2. Caspers M., Czogalla K.J., Liphardt K. et al. Two enzymes catalyze vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in mouse: VKORC1 is highly expressed in exocrine tissues while VKORC1L1 is highly expressed in brain. *Thrombosis Research*. 2015;135(5):977–983.
3. Margueritta S., Asmar E., Naoum J.J., and E. J. Arbid. Vitamin K Dependent Proteins and the Role of Vitamin K2 in the Modulation of Vascular Calcification: A Review. *Oman Medical Journal*. 2014;29(3):172–177.
4. Viegas C.S., Rafael M.S., Enriquez J.L. et al. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015;35(2):399–408.
5. Laurance S., Lemarié C.A., and Blostein M.D. Growth Arrest-Specific Gene 6 (gas6) and Vascular Hemostasis. *Advances in Nutrition*. 2012;3:196–203.
6. Li T., Chang C.-Y., Jin D.-Y. et al. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*. 2004;427:541–544.
7. Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V. et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. 2008;427:537–541.
8. Teichert M., Visser L.E., van Schaik R.H.N. et al. Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1) Polymorphism and Aortic Calcification," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28(4):771–776.
9. Watzka M.N., Nebel A., Mokhtari E. et al. Functional promoter polymorphism in the VKORC1 gene is no major genetic determinant for coronary heart disease in Northern Germans. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007;97(6):998–1002.
10. Smadja D.M., Lorient M.A., Hindorf L.A. et al. No clear link between VKORC1 genetic polymorphism and the risk of venous thrombosis or peripheral arterial disease. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008;99(5):970–972.
11. Fodor D., Bondor C., Albu A. et al. Relationship between VKORC1 single nucleotide polymorphism 1173C>T, bone mineral density & carotid intima-media thickness. *Indian Journal of Medical Research*. 2013;137(4):734–741.
12. Tavridou A., Petridis I., Vasileiadis M. et al. Association of VKORC1 –1639G>A polymorphism with carotid intima-media thickness in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011;94(2):236–241.
13. Wang Y, Zhang W, Zhang Y, Yang Y et al. VKORC1 haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease, and aortic dissection). *Circulation*. 2006;113(12):1615–1621.
14. Zhang H., Yang L., Feng Q. et al. Association between VKORC1 gene polymorphisms and ischemic cerebrovascular disease in Chinese Han population. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014;53(2):166–170.
15. Du J., Zhang Z., Ge Y. et al. VKORC1 and CD-14 genetic polymorphisms associate with susceptibility to cardiovascular and cerebrovascular diseases. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(11):20444–20453.
16. Arnold M.-L., Lichy C., Werner I. et al. Single nucleotide polymorphisms in the VKORC1 gene and the risk of stroke in the Southern German population. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008;100(4):614–617.



17. Ragia G., Marousi S., Ellul J. et al. Association of Functional VKORC1 Promoter Polymorphism with Occurrence and Clinical Aspects of Ischemic Stroke in a Greek Population. *Disease Markers* 2013;35(6):641–646.
18. Shyu H.Y., Fong C.S., Fu Y..P, Shieh J.C. et al. Genotype polymorphisms of GGCX, NQO1, and VKORC1 genes associated with risk susceptibility in patients with large-artery atherosclerotic stroke. *Clin Chim Acta*. 2010;411(11-12):840–845.
19. Hindorff L.A., Heckbert S.R., Smith N. et al. Common VKORC1 variants are not associated with arterial or venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5(10):2025–2027.
20. Lemmens R., Abboud S., Vanhees L. et al. Lack of association between variants in the VKORC1 gene and cerebrovascular or coronary heart disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6:2220–2223.
21. Adams H.P., Bendixen B.H., Kappelle L.J., Biller J. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35–41.
22. Akey J., Jin L., Xiong M. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? *Eur J Hum Genet*. 2001;9:291–300.
23. D'Andrea G., D'Ambrosio R.L., Perna P. D. et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. 2005;105(2):645–649.
24. Wang D., Chen H., Momary K. M. et al. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement. *Blood*. 2008;112(4):1013–1021.
25. Yuan H.Y., Chen J.J., Lee M.T. et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(13):1745–1751.
26. Garbuzova V.Y., Story D.A., Dosenko V.E. et al. Association of allelic polymorphisms of genes matrix Gla-protein system with ischemic atherothrombotic stroke. *Fiziolohichniy zhurnal*. 2015;61(1):19–27.
27. Li Y., Zhu J., and Ding J.Q. VKORC1 rs2359612 and rs9923231 polymorphisms correlate with high risks of cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(4):14731–14744.
28. Booth S.L., Rajabi A.A. Determinants of vitamin K status in humans. *Vitamins and Hormones*. 2008;78:1–22.
29. McCann J.C., Ames B.N. Vitamin K, an example of triage theory: is micronutrient inadequacy linked to diseases of aging? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;90(4):889–907.

(received 03.11.2016, published online 29.12.2016)

(одержано 03.11.2016, опубліковано 29.12.2016)

