

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-р.фіз-мат.наук, 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»
(остаточний)

Начальник НДЧ,
канд.фіз-мат.наук, снс

Д.І. Курбатов

Керівник НДР,
д-р.мед.наук, професор

О.В. Атаман

2017

Рукопис закінчено 18 грудня 2017 року

Результати роботи розглянуто науковою радою,

Протокол № 4 від 28.12.2017

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, д.мед.н., професор, завідувач кафедри фізіології і патофізіології	18.12.2017	О.В.Атаман (вступ, розділ 1)
Професор кафедри фізіології і патофізіології , д.б.н	18.12.2017	В.Ю.Гарбузова (розділи, 4.1, 4.2)
Доцент кафедри фізіології і патофізіології, к.б.н	18.12.2017	О.А. Обухова (розділ 4.3, 4.4)
Асистент медичного інституту	18.12.2017	Є.І. Дубовик (розділ 4.5, 4.6)
Студентка медичного інституту	18.12.2017	Я.А. Чумаченко (розділ 2)
Студентка медичного інституту	18.12.2017	Є.А. Гарбузова (розділи 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 124 с., 16 рис., 45 табл., 152 джерела, 10 додатків.

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ, ГЕН: *TNAP*, *BMP2*, ІШЕМІЧНИЙ АТЕРОТРОМБОТИЧНИЙ ІНСУЛЬТ, СЕРЦЕВО-СУДИННІ ЗАХВОРЮВАННЯ.

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 довжиин рестрикційних фрагментів.

Уперше досліджено розподіл алелів та генотипів за поліморфізмами А69314G гена *TNAP* і Ser37Ala гена *BMP2* у практично здорових осіб, хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом та із ГКС в українській популяції. Доведено, що поліморфізм А69314G гена *TNAP* асоційований з розвитком гострого коронарного синдрому: ризик ГКС у носіїв мінорного алеля для А69314G поліморфізму у 2,2раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем. Уперше виявлено, що вплив вивчених генетичних чинників на розвиток кардіоваскулярної патології має статеві особливості. Ризик виникнення ГКС в осіб чоловічої статі з А/G + G/G генотипом (поліморфізм гена *TNAP*) у 2,19 рази вищий, ніж у пацієнтів з А/А генотипом. Ризик розвитку ГКС у пацієнтів з ІМТ ≥ 25 кг/м², носіїв мінорного алеля за А69314G поліморфізмом гена *TNAP*, майже у 2,9 рази вищий, ніж у гомозигот за основним алелем. Уперше доведено зв'язок між А69314G поліморфізмом гена *TNAP* і розвитком ГКС у осіб, які палять. Ризик виникнення ГКС у курців, носіїв мінорного алеля (А/G + G/G), майже у 3,4 рази вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (А/А).

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів.	5
Передмова.	6
Вступ.	7
1 Огляд літератури з питання ролі алельного поліморфізму генів <i>TNAP</i> і <i>BMP2</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>BMP2</i> та структура його гена.	16
1.3 Роль генетичних чинників гена <i>TNAP</i> у механізмах звуження судин	21
2 Характеристика біологічного матеріалу дослідження	26
3 Методика проведення полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів.	33
4. Статистичні методи дослідження.	38
5 Алельний поліморфізм генів <i>MGP</i> , <i>ENPP1</i>	39
5.1 Зв'язок А69314G поліморфізму гена <i>TNAP</i> із розвитком гострого коронарного синдрому.	39
5.2 Вплив алельного поліморфізму Ser37Ala гена <i>BMP-2</i> на розвиток гострого коронарного синдрому.	67
5.3 Вплив алельного поліморфізму Ser37Ala гена <i>BMP-2</i> на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту.	77
5.4 Комплексний вплив поліморфізмів генів системи <i>MGP</i> на розвиток гострого коронарного синдрому	81
5.5 Комплексний вплив поліморфізмів генів системи <i>MGP</i> на розвиток ішемічного інсульту.	92
Висновки.	98
Перелік джерел посилання	100
Додатки.	118

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АГ – артеріальна гіпертензія

АТ – артеріальний тиск

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

ГІ – 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

Найбільш поширені недуги серцево-судинної системи (атеросклероз, артеріосклероз Менкебергівського типу, гострий коронарний синдром, ішемічний інсульт) є полігенними (мультифакторіальними) хворобами, тобто такими у виникненні і розвитку яких важливу етіологічну роль відіграють як спадкові чинники, так і фактори ризику зовнішнього середовища. У роботі для досягнення поставленої мети використано підхід, який полягає у з'ясуванні зв'язків між одонуклеотидними поліморфізмами генів і розвитком зазначених вище серцево-судинних недуг. Новизною є те, що для дослідження взято гени, з функціонуванням яких пов'язують механізми кальцифікації кровоносних судин – важливого елемента атеросклеротичних бляшок і мінералізації середнього шару артеріальної стінки. Крім того, дослідження проведено на представниках української популяції, яка за генетичними параметрами може відрізнятися від інших європейських і неєвропейських популяцій.

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.

Патофізіологічною 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 РРі 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 РРі, нечисленні й суперечливі.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ З ПИТАННЯ РОЛІ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ *TNAP* І *BMP2* У РОЗВИТКУ СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

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

У 90 % пацієнтів із серцево–судинними захворюваннями виявляють ознаки кальцифікації артеріальних судин [9,10]. Зростання вмісту кальцію у стінках вінцевих артерій людей віком понад 50 років має важливе прогностичне значення щодо розвитку тяжких серцево-судинних недуг та їх ускладнень [11, 12, 15]. Відкладання солей кальцію в структурах артерій у хворих із кардіо- і цереброваскулярною патологією, на думку багатьох дослідників, є несприятливим фактором, що свідчить про високу ймовірність настання фатальних ускладнень [19, 20]. За сучасними уявленнями інтенсивність кальцифікації судин визначається балансом між про- та антикальциногенними факторами [21, 22]. Серед чинників, що захищають судинну стінку від кальцифікації, важливу роль відіграють неорганічний пірофосфат PPI, матриксний Gla-протеїн (MGP), остеопонтин, остеопротегерин, фетуїн, внутрішньоклітинні інгібітори (Smad6, Dkk1), остеокластоподібні клітини судинної стінки [23, 24].

Безперечно, важливе місце в антикальциногенному захисті тканин належить матриксному Gla-протеїну. Сьогодні відомі фактори, причетні до регуляції експресії гена MGP, і можливі механізми, через які реалізуються його антикальциногенні властивості. Це дає підстави вести мову про функціональну систему MGP, до якої можуть бути зараховані, крім самого протеїну, такі чинники, як рецептор вітаміну D (VDR) – важливий регулятор експресії MGP, ферменти, що беруть участь у посттрансляційній модифікації білка, – вітамін К-оксидоредуктаза (VKOR) і γ -глутамілкарбоксилаза (GGCX), а також можливі мішені для MGP, зокрема кістковий морфогенетичний протеїн (BMP-2).

За даними сучасної судинної біології, відкладення кальцієвих депозитів в артеріальній стінці розглядається як активний регульований процес, подібний до формування кісткової тканини [25]. Кальцифікація інтими (атеросклеротичної бляшки) схожа з процесом енхондрального скостеніння на відміну від кальцифікації медії, що нагадує інтрамембранозний остеогенез [26]. 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 [27, 28]. 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 [29], 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) [30, 31] та фактора некрозу пухлин – α (TNF- α) [31, 32]. Оксидаційний стрес активує кальцифікацію через ушкоджувальний вплив на судинну стінку активних форм кисню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окиснених ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) [26, 31, 33]. 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 [34]. 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 АГП, 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) [26, 31, 35]. 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 [36]. 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 [37]. Активований Runx 2/Cbfa 1 діє на остеобластоподібні клітини ендотелію [38] 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) [39].

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, остеонектину. За даними деяких авторів, Osterix може також активувати експресію Runx 2/Cbfa 1 [40, 41].

Дослідженнями К. А. Hruska et al. та К. 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 [35, 42]. 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) [26, 43, 44]. OPG вважається розчинною формою, своєрідною «приманкою», рецептора активатора ядерного фактора каппа-B (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 [44, 45]. Тому активація RANKL-рецепторів вважається необхідною умовою кальцифікації атеросклеротичної бляшки [46]. 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 [44]. За даними S. Jono et al., підвищений рівень OPG у сироватці крові корелює з наявністю й тяжкістю ураження коронарних артерій [48]. Показаний прямий зв'язок між рівнем OPG і серцево-судинною смертністю літніх жінок [49]. М. Schoppert 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. [50]. 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 [51, 52]. Одним із важливих антикальциногенних факторів є матриксний Glaбілок – MGP. В артеріальній стінці MGP синтезується гладком'язовими клітинами (ГМК) медії та інтими, а в місцях атеросклеротичних уражень – і макрофагами [53]. Антикальциногенна активність білка виявляється лише після попереднього γ -карбоксилювання деяких залишків глютамінової кислоти за участі залежного від вітаміну К ферменту γ -глютамінкарбоксилази [54, 55]. Доведено, що у мишей із генетично зумовленим дефіцитом MGP активується ендохондральний механізм осифікації судин і розвивається масивна кальцифікація артерій [56]. Провідним механізмом антикальциногенної дії MGP є його здатність зв'язувати BMP-2, тим самим пригнічуючи диференціювання мезенхімних клітин у клітини остеогенної лінії [57]. За рахунок своїх хелаторних властивостей MGP може зв'язувати іони кальцію у середовищі, отже, зменшувати інтенсивність його відкладання та стабілізувати фібрили еластину [58, 59]. Наявність Gla-вмісних білків у судинній стінці було вперше доведено J. B. Lian et al. [60], 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. [61] 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 [62], активацією остеокластоподібних клітин судинної стінки [33], ацидифікацією позаклітинного матриксу за рахунок активації ферменту карбоангідрази II [33, 63]. Експериментально доведено, що у тварин з поєднаним дефіцитом OPN і MGP кальцифікація аорти розвивається швидше та інтенсивніше, ніж за умови відсутності одного MGP [64]. 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 [65]. 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 PPI [12, 65]. PPI 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 PPI, створює навколо високу концентрацію неорганічного фосфату (Pi), що істотно пришвидшує відкладення солей кальцію [12, 66, 67].

Ураховуючи це, можна стверджувати, що концентрація PPI в позаклітинному середовищі залежить від активності трьох ектоферментів: ENPP1, який генерує PPI, і TNAP [68], що його гідролізує, а також трансмембранного білка ANKH, який переміщує PPI у позаклітинний простір. Провідним шляхом, завдяки якому PPI чинить інгібіторний вплив на кальцифікацію, є порушення нуклеації та ріст кристалів оксіапатиту. Крім того, PPI здатний пригнічувати трансдиференціювання судинних ГМК у хондроцити та посилювати утворення остеопонтину [12]. К. Johnson et al. зазначили, що PPI відіграє роль у стабілізації фенотипу ГМК. Судинні ГМК, не здатні генерувати PPI, зазнають osteo/хондрогенної метаплазії [69]. Зменшення рівня PPI 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 [70, 71]. Також було доведено, що особи, які перебувають на хронічному гемодіалізі, мають знижений рівень у плазмі PPi і зазвичай артеріальну кальцифікацію [72]. Деякі науковці зазначають, що окиснені ЛПНЩ та оксистероли мають здатність посилювати ферментативну активність TNAP у стінці судин [73, 74]. Це безпосередньо призводить до того, що TNAP вивільнює неорганічний фосфат (Pi) із органічних фосфоровмісних сполук та гідролізує PPi, що сприяє розвитку кальцифікації. Якщо компенсаторне збільшення активності ENPP1 і ANKH-залежної секреції PPi 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 BMP2 та структура його гена

Дані про те, що MGR зв'язується з BMP-2 і припиняє його функціональні ефекти, значно розширюють наші уявлення про механізми функціонування MGR. BMP-2 є дуже важливим фактором морфогенезу в кістках [75], але, крім того, він здатен індукувати експресію низки остеогенних генів у судинних ГМК [76]. BMP-2 виявляють у клітинах, що містяться в ділянках атеросклеротичних уражень, його експресія може бути індукована оксидативним стресом, запаленням і гіперглікемією [77, 78, 79]. Отже, слід думати, що антагонізм MGR стосовно BMP-2 повинне бути чинником, що попереджає чи зменшує остеогенні ефекти BMP-2 в судинній стінці.

Кісткові морфогенетичні протеїни (ВМР) є багатофункціональними факторами росту, які належать до β -суперсімейства факторів росту (TGF- β). Ця група білків експресується у ході розвитку кінцівок, ендохондрального окостеніння, ранніх періодів переломів та відновлення хряща. Активність ВМР була вперше виявлена в 1965 році Urist et al., які повідомили про наявність у демінералізованій кістковій тканині остеогенних протеїнів, що мають здатність до індукції остеогенезу при ектопічному пересадженні [80]. У подальших своїх працях вчені показали, що остеогенна активність кістки пов'язана з протеїноподібним компонентом матриксу, який був названий кістковим морфогенетичним протеїном [81].

ВМР-2 синтезується у вигляді препропротеїну, що складається із 396 амінокислотних залишків і має молекулярну масу 44,7 kDA. Під час посттрансляційної модифікації ВМР-2 зазнає протеолітичного розщеплення у ділянці KREKR²⁸²↓QAKHKQ під дією пропротеїнконвертази 6 [82], в результаті якого утворюються пропептид із 282 амінокислотних залишків, функція якого на сьогодні є невідомою, і зрілий пептид (мономер) із 114 амінокислотних залишків (молекулярна маса 12,91 kDA).

На стадії протеїну ВМР-2 надходить у просвіт ендоплазматичного ретикула і піддається глікозилюванню у положенні Asn56 [83]. Scheufler et al. [84] вивчали функціонування ВМР-2 в *E.coli* і довели, що протеїн, який не піддавався глікозилюванню, виявляв високу біологічну активність як *in vitro*, так і *in vivo*. Таким чином, глікозилювання не є обов'язковою умовою для виконання протеїном своїх функцій. Подальші зміни структури ВМР-2 пов'язані з димеризацією мономерів і утворенням функціонально активного гомодимерного комплексу (молекулярна маса 26 kDA), стабільність якого суттєво більша ніж стабільність окремих мономерів. Нативний ВМР-2 являє собою гомодимер, субодиниці якого ковалентно пов'язані між собою одним дисульфідним зв'язком у 78-му положенні цистеїну. Мономери розміщені антипаралельно і під кутом 40° один до одного. Димеризація створює опуклі та

увігнуті сторони молекули, що необхідно для вільного пересування протеїну в екстрацелюлярному просторі та взаємодії з відповідними рецепторними білками.

BMP-2 експресується в клітинах опорно-рухової (остеобласти, остеокласти), серцево-судинної (типові кардіоміоцити, гладенько-м'язові клітини), нервової (астроцити), репродуктивної (клітини Лейдіга), респіраторної (епітеліоцити бронхів), ендокринної (В-клітини підшлункової залози, тироцити, фетальні клітини щитоподібної залози), сечостатевої (залозистий епітелій простати), імунної систем (СД14 моноцити, NK-CD56, В-лімфобласти) та шлунково-кишкового тракту (одонтобласти, ентероцити), а також клітинами різноманітних остеотропних раків та в атеросклеротичній бляшці [85, 86, 87].

Сигнальні шляхи за участі BMP мають важливе значення для реалізації цілої низки ембріональних процесів. У дослідженнях Zhang et al. миші, в яких була повністю заблокована дія BMP-2, помирали під час раннього ембріогенезу [88].

BMP-2 має важливе значення в розвитку і функціонуванні серцево-судинної системи. Wang et al. довели участь протеїну в розвитку ембріонального серцевого м'яза [89]. Дослідженнями Liberman et al. показано, що у ГМК коронарних артерій BMP-2 підвищує експресію RUNX2, що призводить до кальцифікації ГМК судинної стінки [90]. Експресія ж самого BMP-2 у клітинах кровоносних судин, за даними Csiszar et al., може посилюватись у відповідь на запалення та високий внутрішньосудинний тиск [91]. Chen et al. виявили, що у пацієнтів із цукровим діабетом гіперглікемія посилює рівень експресії гена BMP-2, стимулюючи, таким чином, кальцифікацію гладенько-м'язових клітин судин [92].

Ураховуючи вплив BMP-2 на процеси диференціювання клітин, у тому числі й ГМК судинної стінки, постає питання про його можливу роль у

процесах кальцифікації. Сьогодні доведено, що під впливом BMP-2 у мезенхімних клітинах адвентиції через рецептор-опосередкований механізм утворюється фактор транскрипції Msx2, який посилює експресію генів, що кодують так звані Wnt-продукти (Wnt3a і Wnt7a). Ці білки після секреції надходять у мережу vasa vasorum і чинять паракринний ефект на клітини, розміщені в середній оболонці артерій, – остеопрогенітори медії [93]. Під їх впливом активується β -катеніновий шлях, і, як результат, – посилення експресії генів, що відповідають за диференціювання клітин-остеопрогеніторів у так звані кальцифікуючі судинні клітини – CVCs (calcifying vascular cells) [93].

При кальцифікації атеросклеротичних бляшок і стулок аортального клапана у відповідь на дію остеогенного стимулу BMP-2 відбувається активація іншого фактора транскрипції – Runx2/Cbaf1 [94].

Із наведених спостережень випливає, що MGP, блокуючи дію BMP-2, підтримує контрактильний фенотип ГМК і попереджає їх диференціювання у напрямі клітин, причетних до хондро/остеогенезу. За відсутності MGP ГМК судин втягуються в різні шляхи мезенхімного диференціювання і можуть перетворюватися в клітини, подібні до хондроцитів чи остеобластів, та продукувати матрикс, який сприяє відкладанню солей кальцію у вигляді кристалів гідроксіапатиту.

При культивуванні судинні ГМК втрачають ознаки свого контрактильного фенотипу і набувають рис модифікованих ГМК (міграція, проліферація, синтез компонентів сполучної тканини), характерних для ГМК атеросклеротичних бляшок. Із часом судинні ГМК *in vitro* утворюють багатоклітинні вузли, які через 30 днів спонтанно кальцифікуються. З моменту появи перших ознак цього процесу в ГМК зростає експресія гена MGP і деяких остеогенних білків (остекальцину, кісткового сіалопротейну) [95, 96]. З другого боку, є дані про те, що при моделюванні кальцифікації судинних ГМК біків експресія MGP у цих клітинах, навпаки, зменшується [97]. Вона повертається до вихідного рівня, якщо процес мінералізації інгібувати за допомогою бісфосфонатів.

Оскільки експресія MGP у процесі кальцифікації може як зменшуватися, так і зростати, було зроблено припущення про два можливі варіанти розвитку подій. Перший із них полягає в тому, що чинники, які пригнічують експресію гена MGP, можуть сприяти розвитку мінералізації судинної стінки. Другий – у разі ініціювання кальцифікації іншими механізмами може посилюватися експресія адаптивних білків, які обмежують цей процес. До таких білків автори віднесли MGP [98].

Таким чином, VDR, GGCX, VKOR і BMP-2 здійснюють процеси, що забезпечують функціонування MGP у тканинах організму і, зокрема, в стінках кровоносних судин. Складовими цього процесу є: 1) регуляція експресії гена MGP, що здійснюється іонами кальцію, вітамінами D і A, цілим рядом цитокінів і гормонів; 2) експресія гена MGP, завдяки якій у клітинах синтезується цей білок; 3) посттрансляційна модифікація молекул MGP, яка полягає в γ -карбоксилюванні залишків глютамінової кислоти протеїну і потребує участі вітаміну K та ферментів, що його відновлюють; 4) секреція MGP клітинами в позаклітинний простір; 5) власне функціональні ефекти MGP, серед яких: а) зв'язування з іонами кальцію та кристалами гідроксіапатиту; б) взаємодія з компонентами позаклітинного матриксу; в) зв'язування з BMP-2; г) участь у регуляції апоптозу. У кінцевому підсумку зазначені ефекти зумовлюють антикальциногенну дію MGP, що виявляє себе інгібуванням мінералізації м'яких тканин в умовах, коли концентрація іонів кальцію і фосфатів у крові та міжклітинній рідині перевищує поріг, необхідний для осадження солей і початку кристалізації. У разі розладів вищенаведених процесів порушуються функції MGP аж до повного їх випадання, що може спричиняти кальцифікацію судинної стінки – важливого компонента як атеросклеротичних уражень, так і артеріосклерозу Менкеберга. Яке це має значення для подальшого розвитку подій, зокрема для виникнення тяжких ускладнень (інфарктів, інсультів, утворення аневризми та їх розриву), ще необхідно вивчати, досліджуючи зв'язок MGP та різних варіантів його гена з хворобами людини.

1.3 Роль генетичних чинників гена *TNAP* 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.

На сьогодні відомо, що геном людини кодує чотири гени лужної фосфатази. Їх назви відповідають чотирьом переважним місцям розподілу в тканинах. Тканинна неспецифічна лужна фосфатаза (*TNAP*) специфічно не виражена в будь-яких конкретних тканинах, саме тому вона називається тканинонеспецифічною, але доведена її висока експресія в печінці, кістках і нирках. Плацентарна лужна фосфатаза (placental alkaline phosphatase – PLAP), лужна фосфатаза в зародкових клітинах (germ cell alkaline phosphatase – GCAP) і кишкова лужна фосфатаза (intestinal alkaline phosphatase – IAP) виявляють більш обмежене поширення в тканинах [99, 100, 101].

Білок TNAP був відкритий у 1923 році Robert Robison, який довів, що цей ензим відіграє важливу роль у скелетній мінералізації за рахунок генерації неорганічного фосфату (Pi) в кристалах гідроксіапатиту [99, 102]. У 1932 році він припустив, що існує додатковий, ще на той час невідомий, фактор, який також регулює мінералізацію [102]. У 1984 році J. L. Meyer установив, що цим фактором виявився саме неорганічний пірофосфат (PPi), який є фізіологічним субстратом для ферменту TNAP [103].

Провідною функцією TNAP є участь у мінералізації кісток [104, 105] шляхом вивільнення неорганічного фосфату (Pi) з органічних фосфоровмісних сполук. Pi – важливий субстрат для утворення кристалів оксіапатиту. Основною реакцією, що каталізує TNAP, є гідроліз PPi [104–106].

TNAP – гомодимерний білок із розміром дещо більше 50 кДа. Він складається із 507 амінокислотних залишків [101, 107]. Кожен мономер містить 479 залишків та чотири сайти зв'язування з іонами металів. Структура TNAP людини подібна до структури плацентарної лужної фосфатази [108 – 110]. У молекулах цих ферментів було виявлено чотири функціональні ділянки [111].

Каталітичний домен знаходиться в центрі білка. T. Suzuki et al. зазначають, що TNAP є переносником іонів цинку в клітину, тому кожен каталітичний сайт містить три іон-зв'язувальних ділянки: дві – для іонів цинку (Zn^{2+}) і одну – для магнію (Mg^{2+}), необхідні для каталітичної активності ферменту. Іони Zn^{2+} взаємодіють зі специфічними ділянками молекули білка і транспортуються у клітину [112, 113]. Автори встановили, що концентрація іонів Zn^{2+} у позаклітинному середовищі корелює з активністю ферменту TNAP, а отже, і з рівнем мінералізації.

N-кінцевий домен складається із 25 амінокислотних залишків і містить алостеричний центр та α -спіраль, що взаємодіє із сусіднім мономером, таким чином стабілізуючи молекулу димеру [95, 114].

Crown-домен містить 60 амінокислотних залишків та знаходиться поблизу інтерфейсу гомодимеру, створюючи умови для взаємодії між двома мономерами. Також цей домен містить ділянки для неконкурентного гальмування та алостеричної регуляції активності білка [113, 115, 116]. На цій ділянці відбувається зв'язування TNAP із колагеном [116].

Кальцій-зв'язувальний домен складається із 76 амінокислотних залишків і знаходиться у дистальних відділах димеру. Ця ділянка містить дві β -нитки, що пронизують β -пластину в центрі домену і дві α -спіралі, по одній із кожного боку β -пластини. Значення кальцій-зв'язувального сайту ще цілком не вивчене [166]. Проте Jose Luis Milla'n та Michael P. Whyte зазначають, що підвищення концентрації іонів Ca^{2+} у позаклітинному середовищі,

призводить до активації TNAP. Цей процес відбувається за рахунок того, що іони Ca^{2+} заміщують іони Mg^{2+} у каталітичному домені. При подальшому підвищенні позаклітинної концентрації іонів кальцію відбувається інактивація TNAP, оскільки іони Ca^{2+} конкурентно заміщують іони Zn^{2+} , що власне і пригнічує нормальне функціонування фермента [110, 117].

Відомим є той факт, що TNAP проявляє свою активність лише у гомодимерному стані, тому в молекулі білка існує інтерфейс, який містить у собі залишки основного і N-кінцевого доменів, зв'язуючи між собою два мономери TNAP [111, 116].

Усі лужні фосфатази людини проявляють широку субстратну специфічність. Вони каталізують гідроліз моноефірів фосфорної кислоти, вивільнюючи фосфат, реакції трансфосфорилування за наявності високої концентрації акцепторів фосфату [113]. Лужна фосфатаза має найбільшу активність у середовищі з $\text{pH} > 9$, що характерне для поверхні остеокластів у кістковій тканині [118]. М. F. Houlaerts et al. указують на той факт, що при зменшенні pH до 7,4, ферментативна активність TNAP значно знижується [117].

TNAP бере участь у диференціюванні остеобластів, у процесі росту й розвитку скелета та ендохондрального скостеніння, мінералізації тканин [119, 120].

Ген *TNAP* знаходиться на короткому плечі 1-ї хромосоми [99, 121]. Це відрізняє його від сімейства лужних фосфатаз, оскільки гени трьох інших ферментів містяться в 2-ї хромосомі [99]. *TNAP* містить 12 екзонів та 11 інтронів [122]. Перші два екзони (Ia, Ib) є некодуючими.

Кожен екзон має свою власну послідовність промотору, і, таким чином, наявність екзонів Ia та Ib в мРНК є взаємовиключною. мРНК мають різні 5'-нетрансльовані послідовності, а одержані послідовності білка ідентичні [123, 124]. Транскрипція з верхнього промотору (Ia) використовується у

диференціюванні остеобластів, а з нижнього промотору (1b) – в печінці та нирках. Одинадцять наступних екзотів трансльованій формують 507 амінокислотних залишків *TNAP* [99].

Регуляція експресії гена *TNAP* здійснюється глюкокортикоїдами, вітаміном D, IL-1 β , IGF1, TGF β [125].

На сьогодні відомо близько 3500 тисяч одонуклеотидних поліморфізмів гена *TNAP* людини. Найбільш дослідженими з яких є A69314G (P292P) (rs3200255), T787C (rs3200254) і T1565C (rs34605986) [126–131].

Досліджуваний поліморфізм гена *TNAP* A69314G (rs3200255) міститься в 9-му екзоні. Суть алельного поліморфізму A69314G (P292P) полягає у тому, що в 69314-й позиції гена *TNAP* (9-й екзон) азотиста основа аденін заміщена на гуанін [131]. Це не викликає заміни проліну на будь-яку іншу амінокислоту у 292-му положенні молекули *TNAP*, так звана «мовчазна мутація».

У сучасній літературі найбільш дослідженим є зв'язок поліморфізмів гена *TNAP* із розвитком гіпофосфатазії, що виражається в порушенні обміну речовин кісток і характеризується дефектною мінералізацією скелета та біохімічною недостатністю активності ферменту тканиної неспецифічної лужної фосфатази [110, 111, 121, 127, 130, 131, 132]. K. Fedde et al. дослідили, що видалення *TNAP* у мишей призводить до моделі інфантильної гіпофосфатазії, це характерно для рахіту, остеомалаяції, спонтанних переломів кісток та підвищення рівня P P_i [133].

За сучасними уявленнями, оптимальна кількість P P_i у позаклітинному середовищі підтримується за рахунок збалансованої активності ENPP1 і *TNAP*. Пригнічення функції ENPP1 призводить до зниження рівня P P_i , що є причиною мінералізації кісток і м'яких тканин. У свою чергу, втрата функції *TNAP* унеможливає генерацію P P_i , в результаті чого підвищується кількість P P_i . Це призводить до демінералізації кісткової тканини. Таким чином, ENPP1 і *TNAP* є найважливішими, безпосередньо антагоністичними регуляторами

кісткової мінералізації за рахунок підтримки оптимального рівня РРі у позаклітинному середовищі [134, 135].

Цікавим є доведений L. Hesse et al. факт, що миші, позбавлені як *ENPP1*, так і *TNAP*, виявляють у сутності клінічні дані, що свідчать про нормальний рівень *ENPP1* [136].

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 «T» 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 %).

3 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, сольобілізації 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 NucleoS™-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 NucleoS™.; 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 A69314G поліморфізму 9-го екзона гена TNAP (rs3200255).* Ампліфікація ділянки гена *TNAP*, що містить A69314G поліморфізм, проводилася за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) 5' ССТААТТСТGGGCCСАСААА 3' і зворотного (antisense) 5' ССТТССАССАGСААGААGАА 3'. Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містить 1 мкл 10-кратного PCR-буфера, 1,5 ммоль сульфату магнію, 200 мкм суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пМ кожного із праймерів та 1,0 ОД Таq-полімерази («Thermo Scientific», США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагмента 9-го екзона складалася із 30 циклів: денатурації – 94 °С (50 с), гібридизації праймерів – 60,0 °С (45 с) та елонгації – 72 °С (1 хв).

Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37 °С упродовж 18 годин із 3 ОД рестриктази *VcnI* (*NciI*) («Thermo Scientific», США) у Tango-буфері такого складу: 10 мМ трис-НСІ (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ хлориду калію та 0,1 мг/мл альбуміну. Наявність у 69314-й позиції гена *TNAP* аденіну перешкоджає рестрикції, а при заміні аденіну на гуанін рестриктаза *VcnI* (*NciI*) розщеплює ампліфіковану ділянку (довжина – 308 пар основ) на два фрагменти: 185 і 123 пари основ (рис. 2.1).

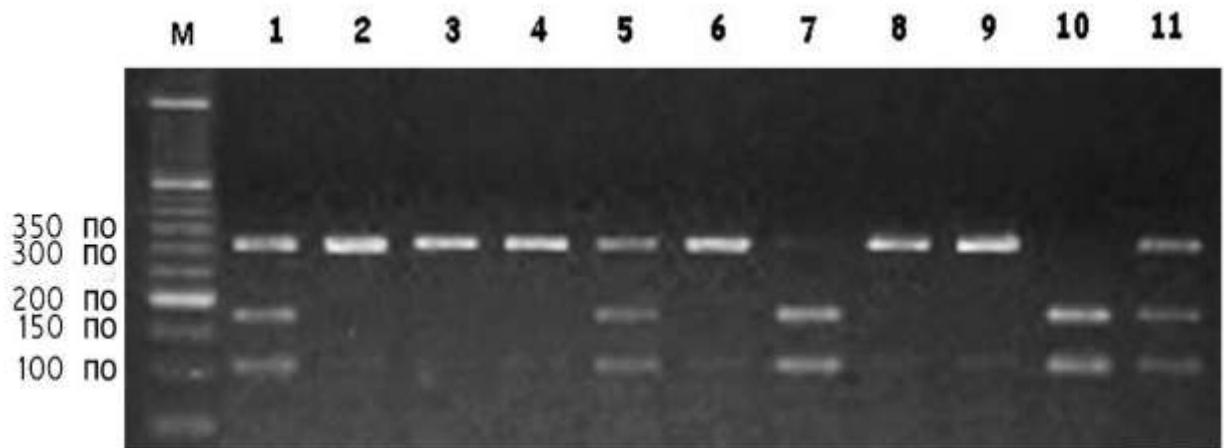


Рисунок 3.1 – Результати рестрикційного аналізу A69314G поліморфізму гена *TNAP*. М – маркер молекулярної маси (по – пари нуклеїнових основ); доріжки 2,3,4,6,8,9 відповідають А/А-генотипу; доріжки 1,5,11 – А/Г-генотипу; 7,10 – Г/Г-генотипу.

3) *Визначення алельного поліморфізму 2-го екзону гена BMP-2 Ser37Ala (rs2273073).*

Ділянку гена ампліфікували за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'-СТСАСGTCGGTCCTGTC С-3' і зворотного (antisense) – 5'-СССТGCTССАТGCСТСАС-3'. Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного РСR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 250 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази, об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента складалася із 30 циклів: денатурація – 94 °С (50 с), гібридизація праймерів – 60 °С (60 с) та елонгація – 72 °С (1 хв). Пізніше 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37 °С упродовж 20 годин із 2 ОД рестриктази *Hpy99I* у буфері NEBuffer 4 такого складу: 20 мМ трис-ацетат (рН

7,9), 10 mM ацетату магнію 50 mM ацетату калію та 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 1676-й позиції гена BMP-2 містився тимін, ампліфікат, який складався із 393 пар основ, розщеплювався рестриктазою *Hru99I* на два фрагменти: 253 і 140 пар основ. У разі заміни тиміну на гуанін сайт рестрикції для *Hru99I* втрачався і утворювався один фрагмент розміром 393 пари основ (рис. 2.2). Горизонтальний електрофорез (0,13 А; 210 V) проводили впродовж 35 хв.

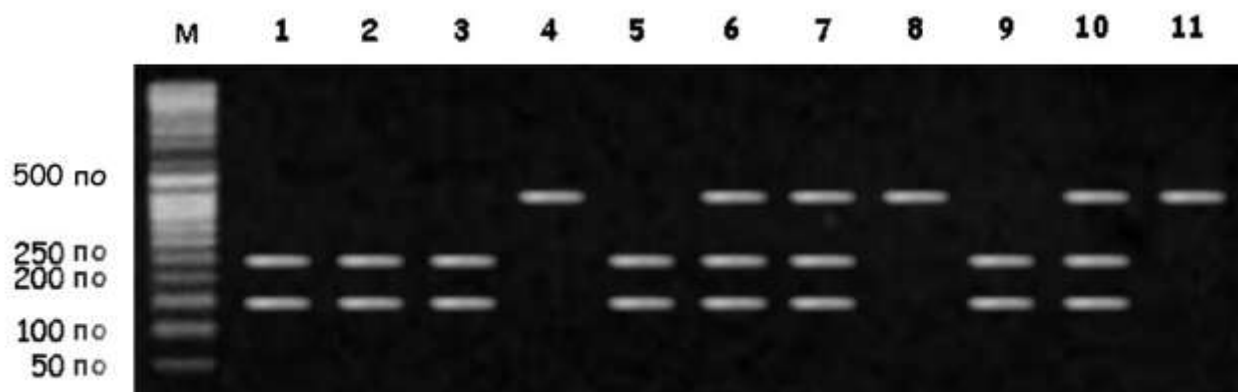


Рисунок 3.2 – Результати рестрикційного аналізу Ser83Ala поліморфізму гена BMP-2. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 1,2,3,5,9 відповідають Ser/Ser-генотипу; доріжки 6, 7, 10 – Ser/Ala-генотипу; 4, 8, 11 – Ala/Ala-генотипу

4. СТАТИСТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Перед перевіркою статистичних гіпотез відповідно до вимог ГОСТ 11.006-74 проведено аналіз нормальності розподілу величин у вибірках шляхом визначення коефіцієнтів асиметрії та ексцесу за допомогою критеріїв Уїлкі-Хана-Шапіро та Ліллієфорса за алгоритмами, що реалізовані у програмі SPSS-17. Визначення достовірності відмінностей між двома вибірками проводили за допомогою критерію Стюдента (t). На основі величини t й кількості ступенів свободи ($l = n_1 + n_2 - 2$) за таблицею розподілу Стюдента знаходили вірогідність відмінностей двох вибірок (P). Відмінність вважали достовірною, якщо вірогідність випадкової різниці не перевищувала 0,05 ($p < 0,05$). Для оцінки відмінностей у середніх тенденціях та незалежних вибірках використовували непараметричні критерії, а саме: критерій Вілконсона–Манна–Уїтні (критерій U) та точний метод Фішера для чотирьохпольної таблиці (ТМФ). Використання непараметричних критеріїв дозволило з'ясувати істотні відмінності в тих випадках, коли критерій t їх не виявляв [137, 138].

Для дослідження значущості відмінностей між середніми значеннями декількох груп даних (групи з різними генотипами) використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA – analysis of variance) із критерієм Фішера [139]. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. Значення $p < 0,05$ вважали статистично значимими.

З метою прогнозування ризику виникнення певної події (ГКС, ІАТІ, ДАХ, ГКК та ін.) використовували метод логістичної регресії. Вибір головних предикторів розвитку ускладнень атеросклеротичного процесу серед вивчених поліморфізмів здійснювали методом “Random Forest” (випадковий ліс) [140, 141, 142].

І нарешті для виявлення та характеристики міжгенних взаємодій використовували метод MDR (multifactor dimensionality reduction) [143].

5 АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ *TNAP*, *VMP2*

5.1 Зв'язок А69314G поліморфізму гена *TNAP* із розвитком гострого коронарного синдрому

На сьогодні відомо близько 3500 однонуклеотидних поліморфізмів гена *TNAP*. Поліморфізм А69314G є «мовчазною» мутацією: заміна аденіну на гуанін у 9-му екзоні не призводить до заміни проліну на будь-яку іншу амінокислоту в 292-му положенні молекули білка. *TNAP* є одним із прокальциногенних факторів, який за рахунок розщеплення молекули неорганічного пірофосфату (PPi) збільшує концентрацію неорганічного фосфату (Pi) в позаклітинному просторі, створюючи умови для посилення процесів мінералізації в тканинах. Враховуючи це, генетичні поліморфізми гена *TNAP* можуть бути асоційовані з розвитком кальцифікації у судинній стінці.

Частоту трьох можливих поліморфних варіантів генотипу, а також перевірку відповідності розподілу основного (А) і мінорного (G) алелів рівновазі Харді – Вайнберга подано в табл. 5.1.

Таблиця 5.1 – Частота алельних варіантів і алелів за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* у контрольній групі та у хворих із ГКС

	<i>Контрольна група</i>	<i>Хворі із ГКС</i>
Гомозиготи А/А, n (%)	92 (83,6)	82 (69,5)
Гетерозиготи А/G, n (%)	16 (14,6)	30 (25,4)
Гомозиготи G/G, n (%)	2 (1,8)	6 (5,1)
А-алель	0,91	0,82
G-алель	0,09	0,18
χ^2	1,58	2,03
P	> 0,05	> 0,05

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

Як впливає з наведених даних, розподіл А- і G-алелів у контрольній групі і у хворих із ГКС не має статистично достовірних відхилень від очікуваних за генетично-популяційним законом величин ($P > 0,05$).

Оскільки в групах порівняння виявлена незначна кількість осіб гомозигот за мінорним алелем G/G, то для подальшого аналізу носіїв мінорного алеля було об'єднано в одну групу A/G + G/G.

На рисунку 5.1 наведено результати аналізу частот окремих генотипів за поліморфізмом A69314G у пацієнтів контрольної групи та у хворих із гострим коронарним синдромом. В осіб із ГКС співвідношення гомозигот за основним алелем (A/A) та носіїв мінорного алеля (A/G + G/G) становило 69,5 і 30,5 %, тоді як у контрольній групі ці показники дорівнювали 83,6 і 16,4 % відповідно. Отже, існує статистична відмінність у розподілі різних варіантів генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* серед хворих із ГКС та здорових осіб ($\chi^2 = 6,302$, $P = 0,012$).

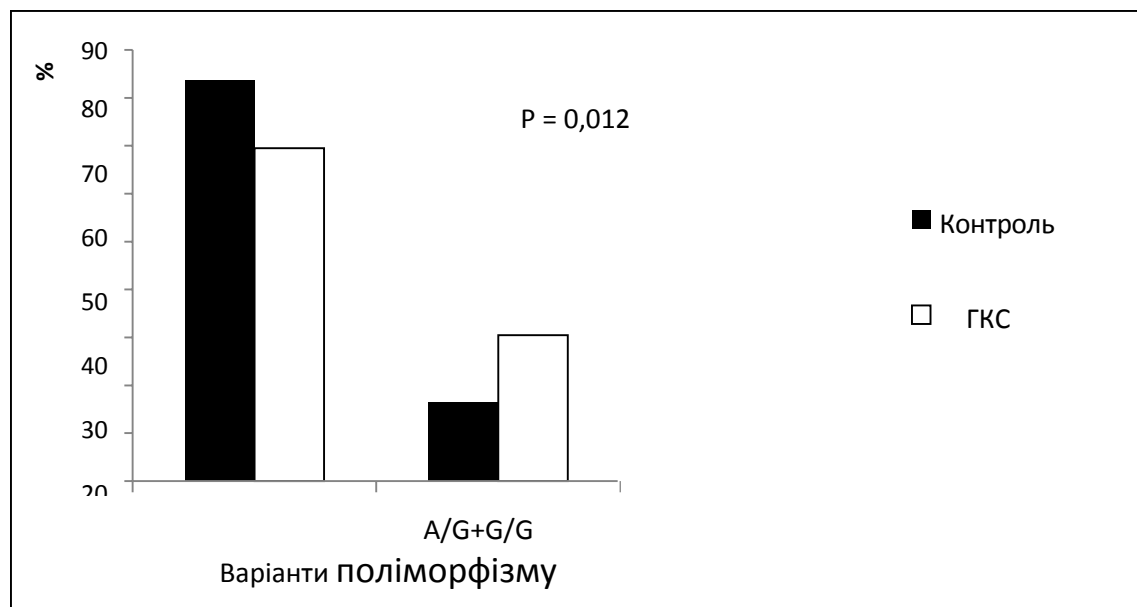


Рисунок 5.1 – Частота алельних варіантів гена *TNAP* за поліморфізмом A69314G у хворих із ГКС (білі стовпчики) і в контрольній групі (чорні стовпчики). P – статистична значущість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Методом логістичної регресії було підтверджено цей висновок: ризик виникнення ГКС в осіб, які були носіями мінорного алеля A/G + G/G, у 2,24 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем A/A (табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP*

Показник	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
ГКС	A/G + G/G	0,808	0,326	6,139	0,013	2,244	1,184	4,253

Примітка: порівняння проводилося відносно гомозигот за основним алелем (A/A); CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда; P – статистична значущість; OR – відношення ризику; CI – довірчий інтервал

Аналіз за статтю. Розподіл алельних варіантів гена *TNAP* за поліморфізмом A69314G у хворих із ГКС різної статі наведено в табл. 5.3. З одержаних результатів випливає, що серед хворих із ГКС жінок з A/A генотипом було 69,2 %, а з A/G + G/G генотипом – 30,8 %. Частота генотипів (A/A і A/G + G/G) у хворих із ГКС чоловіків становила 69,6 і 30,4 % відповідно. Отже, не існує достовірної різниці у співвідношенні генотипів за досліджуваним поліморфізмом у хворих із ГКС різної статі ($\chi^2 = 0,001$; P = 0,974).

Розподіл алельних варіантів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* за статтю у досліджуваних групах пацієнтів наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.3 – Частота генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у хворих із ГКС жінок та чоловіків

<i>Генотип</i>		<i>Жінки</i>	<i>Чоловіки</i>
A/A	n	18	64
		69,2 %	69,6 %
A/G + G/G	n	8	28
		30,8 %	30,4 %
Разом	n	26	92
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,001; P = 0,974$			

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

Таблиця 5.4 – Зв'язок A69314G поліморфізму гена *TNAP* із розвитком ГКС в осіб жіночої та чоловічої статей

<i>Стать</i>	<i>Генотип</i>		<i>Контроль</i>	<i>ГКС</i>
Жінки	A/A	n	27	18
			84,4 %	69,2 %
	A/G + G/G	n	5	8
			15,6 %	30,8 %
	Разом	n	32	26
			100 %	100 %
$\chi^2 = 1,892; P = 0,169$				
Чоловіки	A/A	n	65	64
			83,3 %	69,6 %
	A/G + G/G	n	13	28
			16,7 %	30,4 %
	Разом	n	78	92
			100 %	100 %
$\chi^2 = 4,372; P = 0,037$				

Примітка. Див. табл. 5.3.

Як впливає з наведених даних, в осіб жіночої статі не виявлено достовірної відмінності між співвідношенням алельних варіантів (A/A і A/G + G/G) даного поліморфізму серед практично здорових осіб та хворих із ГКС. Так, серед хворих із ГКС жінок з генотипом A/A було 69,2 %, а з генотипом A/G + G/G – 30,8 %. В осіб жіночої статі контрольної групи співвідношення генотипів за вивченим поліморфізмом становило: 84,4 і 15,6 % відповідно і не відрізнялося від групи хворих ($\chi^2 = 1,892$; P = 0,169). Розподіл генотипів (A/A і A/G + G/G) серед хворих із ГКС осіб чоловічої статі становив 69,6 і 30,4 %, а у контролі – 83,3 і 16,7 % відповідно. Показник P, розрахований за χ^2 - критерієм Пірсона дорівнював 0,037, що свідчить про існування різниці у розподілі генотипів за A69314G поліморфізмом серед здорових і хворих із ГКС чоловіків.

Застосування методу логістичної регресії дало можливість підтвердити цей висновок (табл. 5.5). У результаті проведених розрахунків було встановлено, що ризик виникнення ГКС в осіб чоловічої статі з A/G + G/G генотипом у 2,19 раза вищий, ніж у гомозигот з A/A генотипом.

Таблиця 5.5 – Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* в осіб різної статі

Показник	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
Чоловіки	A/G +G/G	0,783	0,379	4,265	0,039	2,187	1,041	4,598
Жінки	A/G +G/G	0,875	0,646	1,835	0,175	2,400	0,676	8,517

Примітка. Дивись табл. 5.2

У таблиці 5.6 подано результати генотипування за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у жінок і чоловіків – окремо у хворих із ГКС та у пацієнтів контрольної групи. Із отриманих результатів можна бачити, що серед осіб контрольної групи жінок з A/A генотипом було 84,8 %, а з A/G +

G/G генотипом – 15,6 %. Розподіл алельних варіантів серед практично здорових осіб чоловічої статі становив 83,3 і 16,7 % відповідно. Таким чином, у контрольній групі не було виявлено достовірного зв'язку між поліморфними варіантами досліджуваного гена та статтю пацієнтів ($\chi^2 = 0,018$; $P = 0,893$). Серед хворих із ГКС спостерігалися подібні результати. Так, пацієнтів із ГКС жіночої статі, гомозигот за основним алелем (A/A), було 69,2 %, а носіїв мінорного алеля (A/G + G/G) – 30,8 %. Розподіл алельних варіантів у хворих із ГКС чоловіків був 69,6 і 30,4 %. Отже, у пацієнтів із ГКС також не виявлено достовірної відмінності в розподілі генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* в осіб різної статі ($\chi^2 = 0,001$; $P = 0,947$).

Таблиця 5.6 – Частота генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у жінок і чоловіків у контрольній групі та у хворих із ГКС

Групи пацієнтів	Генотип		Жінки	Чоловіки
Контрольна група	A/A	n	27	65
			84,8 %	83,3 %
	A/G + G/G	n	5	13
			15,6 %	16,7 %
	Разом	n	32	78
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,018$; $P = 0,893$				
Хворі з ГКС	A/A	n	18	64
			69,2 %	69,6 %
	A/G+G/G	n	8	28
			30,8 %	30,4 %
	Разом	n	26	92
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,001$; $P = 0,947$				

Примітка. Див. табл. 5.3

Нарешті, ще один аналіз дає підстави для висновку про те, що немає зв'язку між статтю пацієнтів та розвитком ГКС залежно від генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* (табл. 5.7). Так, серед гомозигот за основним алелем (A/A) у контролі жінок було 29,3 %, а чоловіків – 70,7 %. Співвідношення осіб жіночої та чоловічої статей у хворих із ГКС з A/A генотипом становило 22,0 і 78,0 %. Отже, у гомозигот за основним алелем не виявлено достовірного зв'язку між статтю досліджуваних індивідумів та розвитком ГКС ($\chi^2 = 1,237$; $P = 0,266$). У носіїв мінорного алеля (A/G + G/G) спостерігаються подібні результати: осіб контрольної групи жіночої статі було 27,8 %, а чоловічої – 72,2 %. Серед хворих із ГКС жінок – 22,2 %, а чоловіків – 77,8 %. Таким чином, в осіб з генотипом A/G + G/G не виявлено достовірного зв'язку між статтю пацієнтів та розвитком ГКС ($\chi^2 = 0,203$; $P = 0,653$).

Таблиця 5.7 – Частота осіб різної статі у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP*

Генотип	Стать		Контроль	ГКС
A/A	Жінки	n	27	18
			29,3 %	22,0 %
	Чоловіки	n	65	64
			70,7 %	78,0 %
	Разом	n	92	82
			100 %	100 %
$\chi^2 = 1,237$; $P = 0,266$				
A/G + G/G	Жінки	n	5	8
			27,8 %	22,2 %
	Чоловіки	n	13	28
			72,2 %	77,8 %
	Разом	n	18	36
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,203$; $P = 0,653$				

Аналіз за показником індексу маси тіла. Розподіл алельних варіантів гена *TNAP* за поліморфізмом A69314G у хворих із ГКС з нормальною та підвищеною величиною ІМТ подано в табл. 5.8. Співвідношення генотипів A/A і A/G + G/G у групі хворих із ГКС з нормальним ІМТ становило 76,2 і 23,8 %. В осіб з підвищеною величиною ІМТ (≥ 25 кг/м²) воно дорівнювало 68,0 і 32,0 % відповідно. Достовірної різниці у розподілі генотипів за досліджуваним поліморфізмом серед хворих із ГКС з різними величинами ІМТ не виявлено ($\chi^2 = 0,541$; P = 0,462).

Таблиця 5.8 – Частота генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у хворих із ГКС із нормальною та підвищеною величинами ІМТ

Генотип		ІМТ < 25 кг/м ²	ІМТ \geq 25 кг/м ²
A/A	n	16	66
		76,2 %	68,0 %
A/G + G/G	n	5	31
		23,8 %	32,0 %
Разом	n	21	97
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,541$; P = 0,462			

Примітка. Див. табл. 5.3.

У таблиці 5.9 наведено величини ІМТ у групах порівняння залежно від генотипу пацієнтів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP*.

Аналізуючи одержані дані, можна зробити висновок, що не існує достовірної різниці між величинами ІМТ в осіб з різними варіантами генотипів (A/A і A/G + G/G) як у осіб контрольної групи (P = 0,650), так і у хворих із ГКС (P = 0,882). Під час порівняння показника ІМТ у пацієнтів контрольної групи та хворих із ГКС носіїв різних генотипів, достовірної різниці також не

виявлено. Так, в осіб з А/А генотипом, хворих із ГКС, величина ІМТ дорівнювала $(28,42 \pm 0,49)$ кг/м², а у практично здорових індивідумів – $(27,22 \pm 0,44)$ кг/м² ($P = 0,069$). В осіб з генотипом А/Г + Г/Г, хворих із ГКС, ІМТ становив $(28,55 \pm 0,72)$ кг/м², а у контролі – $(26,72 \pm 1,08)$ кг/м² ($P = 0,156$). Поділ кожної із двох груп – дослідної і контрольної – на дві підгрупи залежно від величини ІМТ (< 25 і ≥ 25 кг/м²) дав можливість проаналізувати вплив поліморфних варіантів гена *TNAP* на розвиток ГКС в осіб з нормальною і підвищеною величиною цього показника.

Таблиця 5.9 – Показники ІМТ у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* ($M \pm m$)

Показник		А/А	А/Г + Г/Г	F	P ₁
ІМТ, кг/м ²	Контроль	27,22 ± 0,44 (n = 92)	26,72 ± 1,08 (n = 18)	0,449	0,650
	ГКС	28,42 ± 0,49 (n = 82)	28,55 ± 0,72 (n = 36)	0,004	0,882
	P ₂	0,069	0,156		

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

Як випливає з табл. 5.10, у пацієнтів з ІМТ < 25 кг/м² не виявлено достовірного зв'язку між різними варіантами генотипів за поліморфізмом А69314G досліджуваного гена і розвитком ГКС ($\chi^2 = 0,027$; $P = 0,869$).

Так, співвідношення генотипів (А/А і А/Г + Г/Г) у контрольній групі становило 78,1 і 21,9 %, а серед хворих із ГКС – 76,2 і 23,8 %. У пацієнтів з ІМТ ≥ 25 кг/м² отримано протилежні результати. Серед практично здорових осіб з надмірною вагою розподіл генотипів за досліджуванним поліморфізмом дорівнював 85,9 і 14,1 %, а у групі хворих із ГКС – 68,0 і 32,0% відповідно.

Отже, в осіб з $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$, існує достовірний зв'язок A69314G поліморфізму гена *TNAP* із розвитком ГКС ($\chi^2 = 7,558$; $P = 0,006$).

Таблиця 5.10 – Зв'язок A69314G поліморфізму гена *TNAP* із розвитком ГКС в осіб із нормальним і збільшеним індексами маси тіла

	<i>Генотип</i>		<i>Контроль</i>	<i>ГКС</i>
IMT < 25 кг/м ²	A/A	n	25	16
			78,1 %	76,2 %
	A/G + G/G	n	7	5
			21,9 %	23,8 %
	Разом	n	32	21
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,027$; $P = 0,869$				
IMT $\geq 25 \text{ кг/м}^2$	A/A	n	67	66
			85,9 %	68,0 %
	A/G + G/G	n	11	31
			14,1 %	32,0 %
	Разом	n	78	97
			100 %	100 %
$\chi^2 = 7,558$; $P = 0,006$				

Примітка. Див. табл. 5.3

За допомогою методу логістичної регресії було підтверджено цей висновок. У результаті проведених розрахунків виявлено, що ризик виникнення ГКС в осіб з $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$, носіїв мінорного алеля A/G + G/G, майже у 2,9 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем A/A (табл. 5.11).

Таблиця 5.11 – Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* в осіб із нормальним і підвищеним ІМТ

Показник	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
ІМТ < 25 кг/м ²	A/G +G/G	0,110	0,667	0,027	0,869	1,116	0,302	4,128
ІМТ ≥ 25 кг/м ²	A/G +G/G	1,051	0,391	7,210	0,007	2,861	1,328	6,162

Примітка. Див. табл. 5.2

Як у хворих із ГКС, так і в контролі, не було залежності між досліджуваним SNP і рівнем ІМТ (табл. 5.12). У контрольній групі осіб з ІМТ < 25 кг/м² з А/А генотипом було 78,1 %, а з А/Г + Г/Г генотипом – 21,9 %. Співвідношення поліморфних варіантів у здорових індивідуумів з ІМТ ≥ 25 кг/м² дорівнювало 85,9 і 14,1 % відповідно. Таким чином, у осіб контрольної групи не виявлено достовірного зв'язку між розподілом алельних варіантів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* і величиною ІМТ ($\chi^2 = 1,002$; P = 0,317). Частота алельних варіантів (А/А і А/Г + Г/Г) у пацієнтів із ГКС з ІМТ < 25 кг/м² дорівнювала 76,2 і 23,8 %, а з ІМТ ≥ 25 кг/м² – 68,0 і 32,0 % відповідно. Отже, серед хворих із ГКС також не виявлено достовірного зв'язку між A69314G поліморфними варіантами гена *TNAP* і величиною ІМТ ($\chi^2 = 0,541$; P = 0,462).

При розподілі пацієнтів з різними варіантами генотипів (А/А і А/Г + Г/Г) отримано такі результати (табл. 5.13). Серед гомозигот за основним алелем співвідношення осіб з ІМТ < 25 кг/м² та ІМТ ≥ 25 кг/м² в контролі становило 27,2 і 72,8 %, а у хворих із ГКС – 19,5 і 80,5 % відповідно. Таким чином, у осіб з генотипом А/А не існує достовірного зв'язку між величиною ІМТ і ризиком виникнення ГКС ($\chi^2 = 1,413$; P = 0,235).

Таблиця 5.12 – Вплив поліморфних A69314G варіантів гена *TNAP* на ІМТ в осіб контрольної групи та у хворих із ГКС

Групи пацієнтів	Генотип		ІМТ < 25 кг/м ²	ІМТ ≥ 25 кг/м ²
Контрольна група	A/A	n	25	67
			78,1 %	85,9 %
	A/G + G/G	n	7	11
			21,9 %	14,1 %
	Разом	n	32	78
			100 %	100 %
$\chi^2 = 1,002; P = 0,317$				
Хворі з ГКС	A/A	n	16	66
			76,2 %	68,0 %
	A/G+G/G	n	5	31
			23,8 %	32,0 %
	Разом	n	21	97
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,541; P = 0,462$				

Примітка. Див. табл. 5.3

У носіїв мінорного алеля A/G + G/G було одержано дещо інші дані. Так, осіб із цим генотипом у контролі з ІМТ < 25 кг/м² було 38,9 %, а з ІМТ ≥ 25 кг/м² – 61,1 %. Пацієнтів з генотипом A/G + G/G, хворих із ГКС, з різними величинами ІМТ було відповідно 13,9 і 86,1 %. Отже, в осіб з A/G + G/G генотипом виявлено достовірний зв'язок між ІМТ і розвитком ГКС: у пацієнтів з ІМТ ≥ 25 кг/м², ГКС розвивається достовірно частіше ($\chi^2 = 4,339$; $P = 0,037$).

Таблиця 5.13 – Частота осіб із нормальним і підвищеним ІМТ у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за А69314G поліморфізмом гена *TNAP*

<i>Генотип</i>	<i>ІМТ</i>		<i>Контроль</i>	<i>ГКС</i>
А/А	ІМТ < 25 кг/м ²	n	25	16
			27,2 %	19,5 %
	ІМТ ≥ 25 кг/м ²	n	67	66
			72,8 %	80,5 %
	Разом	n	92	82
			100 %	100 %
$\chi^2 = 1,413; P = 0,235$				
А/Г + Г/Г	ІМТ < 25 кг/м ²	n	7	5
			38,9 %	13,9 %
	ІМТ ≥ 25 кг/м ²	n	11	31
			61,1 %	86,1 %
	Разом	n	18	36
			100 %	100 %
$\chi^2 = 4,339; P = 0,037$				

Примітка. Див. табл. 5.3

Аналіз за показниками артеріального тиску. Частоту алельних варіантів гена *TNAP* за поліморфізмом А69314G у хворих із ГКС з нормальною величиною артеріального тиску та артеріальною гіпертензією подано в табл. 5.14. З одержаних результатів бачимо, що у хворих із ГКС, які мали нормальні значення артеріального тиску, співвідношення генотипів А/А і А/Г + Г/Г становило 73,9 і 26,1 %, а пацієнтів з АГ – 66,7 і 33,3 % відповідно. Отже, не існує достовірної різниці у розподілі алельних варіантів за вивченим поліморфізмом у хворих із ГКС з артеріальною гіпертензією та пацієнтів з нормальними показниками артеріального тиску ($\chi^2 = 0,695; P = 0,404$).

Таблиця 5.14 – Частота генотипів за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* у хворих із ГКС з нормальним тиском та артеріальною гіпертензією

Генотип		Артеріальна гіпертензія (-)	Артеріальна гіпертензія (+)
А/А	n	34	48
		73,9 %	66,7 %
А/Г + Г/Г	n	12	24
		26,1 %	33,3 %
Разом	n	46	72
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,695; P = 0,404$			

Примітка: див. табл. 5.3

У таблиці 5.15 наведено показники АТ сист., АТ діаст., АТ пул. та АТ сер. у осіб контрольної групи і хворих із ГКС залежно від варіантів генотипу за А69314G поліморфізмом гена *TNAP*. Аналізуючи одержані дані, можна зробити висновок, що у практично здорових осіб з різними варіантами генотипів (А/А і А/Г + Г/Г) не існує достовірної різниці в показниках АТ сист. ($P = 0,490$), АТ діаст. ($P = 0,467$), АТ пул. ($P = 0,436$) і АТ сер. ($P = 0,436$). У пацієнтів із ГКС значення АТ сист. ($P = 0,774$), АТ діаст. ($P = 0,641$), АТ пул. ($P = 0,962$) і АТ сер. ($P = 0,690$) також достовірно не відрізнялися незалежно від генотипів за досліджуваним поліморфізмом.

Інші результати одержані, коли аналіз проводився між групами порівняння. У носіїв всіх генотипів різні види артеріального тиску були достовірно вищими у хворих із ГКС. Так, у гомозигот за основним алелем А/А хворих із ГКС АТ сист. дорівнював ($140,5 \pm 2,0$) проти ($124,3 \pm 1,1$) мм рт. ст.

у контролі ($P < 0,001$); АТ діаст. ($89,2 \pm 1,1$) мм рт. ст. проти ($80,0 \pm 0,8$) мм рт. ст.; АТ пул. ($51,3 \pm 1,3$) мм рт. ст. проти ($44,3 \pm 0,8$) мм рт. ст. ($P < 0,001$); АТ сер. ($106,3 \pm 1,4$) мм рт. ст. проти ($94,8 \pm 0,8$) мм рт. ст. відповідно ($P < 0,001$).

Таблиця 5.15 – Показники артеріального тиску (АТ) у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* ($M \pm m$)

Показники		A/A	A/G + G/G	F	P ₁
АТ сист.	Контроль	124,3 ± 1,1 (92)	126,1 ± 2,2 (18)	0,944	0,490
	ГКС	140,5 ± 2,0 (82)	141,5 ± 2,9 (36)	1,107	0,774
	P ₂	< 0,001	0,001		
АТ діаст.	Контроль	80,0 ± 0,8	81,4 ± 1,8	0,109	0,467
	ГКС	89,2 ± 1,1	90,1 ± 1,6	0,091	0,641
	P ₂	< 0,001	0,002		
АТ пул.	Контроль	44,3 ± 0,8	44,7 ± 2,1	0,517	0,436
	ГКС	51,3 ± 1,3	51,4 ± 1,7	0,878	0,962
	P ₂	< 0,001	0,022		
АТ сер.	Контроль	94,8 ± 0,8	96,3 ± 1,7	0,517	0,436
	ГКС	106,3 ± 1,4	107,3 ± 1,9	0,627	0,690
	P ₂	< 0,001	0,001		

Примітка. Див. табл. 5.9

У носіїв мінорного алеля A/G + G/G за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* спостерігалися подібні результати: АТ сист. у хворих із ГКС становив ($141,5 \pm 2,9$) мм рт. ст., тоді як у контролі – ($126,1 \pm 2,2$) мм рт. ст. ($P = 0,001$). Величина АТ діаст. у групах порівняння дорівнювала ($90,1 \pm 1,6$) і ($81,4 \pm 1,8$) мм рт. ст. відповідно ($P = 0,002$). У здорових осіб і хворих із ГКС показники АТ пул. становили ($51,4 \pm 1,7$) і ($44,7 \pm 2,1$) мм рт. ст. ($P = 0,022$), а величина

АТ сер. – $(107,3 \pm 1,9)$ мм рт. ст. проти $(96,3 \pm 1,7)$ мм рт. ст. відповідно ($P = 0,001$).

Аналіз за фактом паління. Частоту генотипів за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* у хворих із ГКС тих, які палять, і тих, які не палять, подано в табл. 5.16. Із наведених результатів випливає, що серед хворих із ГКС тих, які не палять, з А/А генотипом було 73,4 %, а з А/Г + Г/Г генотипом – 26,6 %. Частота генотипів (А/А і А/Г + Г/Г) у хворих із ГКС курців становила 64,8 і 35,2 % відповідно. Таким чином, не існує достовірної різниці у співвідношенні генотипів за досліджуваним поліморфізмом серед хворих із ГКС курців і тих, які не палять ($\chi^2 = 1,027$; $P = 0,311$).

Таблиця 5.16 – Частота генотипів за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* у хворих із ГКС курців і тих, які не палять

Генотип		Не палять	Палять
А/А	n	47	35
		73,4 %	64,8 %
А/Г + Г/Г	n	17	19
		26,6 %	35,2 %
Разом	n	64	54
		100 %	100 %
$\chi^2 = 1,027$; $P = 0,311$			

Примітка. Див. табл. 5.2.

Розподіл генотипів за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* у курців і тих, які не палять, подано в табл. 5.17. Серед тих, які не палять, – осіб контрольної групи з А/А генотипом – 82,7 %, а з А/Г + Г/Г генотипом – 17,3 %, серед хворих із ГКС – 73,4 і 26,6 % відповідно. Таким чином, в осіб, які не палять, не виявлено достовірного зв'язку між А69314G поліморфізмом і розвитком

ГКС ($\chi^2 = 1,831$; $P = 0,176$). Серед курців практично здорових осіб – гомозигот за основним алелем А/А – виявлено 86,2 %, а з генотипом А/Г+ Г/Г – 13,8 %. У хворих із ГКС співвідношення поліморфних варіантів становило 64,8 і 35,2 % відповідно. Отже, у курців було виявлено достовірний зв'язок між досліджуваним поліморфізмом і розвитком ГКС ($\chi^2 = 4,310$; $P = 0,038$).

Таблиця 5.17 – Зв'язок А69314G поліморфізму гена *TNAP* із розвитком ГКС у курців і тих, які не палять

	Генотип		Контроль	ГКС
Ті, які не палять	А/А	n	67	47
			82,7 %	73,4 %
	А/Г + Г/Г	n	14	17
			17,3 %	26,6 %
	Разом	n	81	64
			100 %	100 %
$\chi^2 = 1,831$; $P = 0,176$				
Курці	А/А	n	25	35
			86,2 %	64,8 %
	А/Г + Г/Г	n	4	19
			13,8 %	35,2 %
	Разом	n	29	54
			100 %	100 %
$\chi^2 = 4,310$; $P = 0,038$				

Примітка. Див. табл. 5.3

Застосування методу логістичної регресії дало можливість підтвердити цей висновок (табл. 5.18).

У результаті проведених розрахунків було встановлено, що ризик виникнення ГКС у курців – носіїв мінорного алеля (А/Г + Г/Г) – майже у 3,4 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем А/А.

Таблиця 5.18 – Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* в осіб, які палять і не палять

Показник	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
Не палять	A/G +G/G	0,549	0,408	1,809	0,179	1,731	0,778	3,851
Палять	A/G +G/G	1,222	0,609	4,021	0,045	3,393	1,026	11,199

Примітка. Див. табл. 5.2

Не відрізнялася частота генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у курців і тих, які не палять, у кожній з груп порівняння: у контролі та у хворих із ГКС (табл. 5.19).

Таблиця 5.19 – Частота генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у курців і тих, які не палять, у контрольній групі та у хворих із ГКС

Групи пацієнтів	Генотип		Паління (-)	Паління (+)
Контрольна група	A/A	n	67	25
			82,7 %	86,2 %
	A/G + G/G	n	14	4
			17,3 %	13,8 %
	Разом	n	81	29
			100 %	100 %
$\chi^2 = 0,190; P = 0,663$				
Хворі із ГКС	A/A	n	47	35
			73,4 %	64,8 %
	A/G + G/G	n	17	19
			26,6 %	35,2 %
	Разом	n	64	54
			100 %	100 %
$\chi^2 = 1,027; P = 0,311$				

Примітка. Див. табл. 5.3

У контрольній групі осіб, які не палять, з генотипом А/А було 82,7 %, з генотипом А/Г + Г/Г – 17,3 %; а тих, які палять, з різними варіантами генотипів (А/А і А/Г + Г/Г) – 86,2 і 13,8 % відповідно. Одержані дані свідчать про відсутність статистично значущих відмінностей у розподілі алельних варіантів поліморфізму А69314G між особами, які палять, і особами, які не палять у контрольній групі ($\chi^2 = 0,190$; $P = 0,663$). Серед хворих із ГКС – тих, які не палять – з генотипом А/А було 73,4 %, з генотипом А/Г + Г/Г – 26,6 %; а курців – 64,8 і 35,2 % відповідно. Одержані результати свідчать про відсутність статистично значущих відмінностей у розподілі генотипів між курцями і тими, які не палять, у групі хворих із ГКС ($\chi^2 = 1,027$; $P = 0,311$).

Але встановлено відмінність у підгрупах пацієнтів, утворених за окремими алельними варіантами SNP (табл. 5.20).

Таблиця 5.20 – Частота осіб, які палять і не палять, у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за А69314G поліморфізмом гена *TNAP*

Генотип			Контроль	ГКС
А/А	Паління (-)	n	67	47
			72,8 %	57,3 %
	Паління (+)	n	25	35
			27,2 %	42,7 %
	Разом	n	92	82
			100 %	100 %
$\chi^2 = 4,616$; $P = 0,032$				
А/Г + Г/Г	Паління (-)	n	14	17
			77,8 %	47,2 %
	Паління (+)	n	4	19
			22,2 %	52,8 %
	Разом	n	18	36
			100 %	100 %
$\chi^2 = 4,582$; $P = 0,032$				

Примітка. Див. табл. 5.3

Серед гомозигот за основним алелем А/А співвідношення осіб, які не палять, і тих, які палять, у контрольній групі становило 72,8 і 27,2 % і достовірно відрізнялось від групи хворих із ГКС – 57,3 і 42,7 % відповідно ($\chi^2 = 4,616$; $P = 0,032$). У носіїв мінорного алеля у контролі виявлено 77, 8 % тих, які не палять, і 22,2 % курців, що достовірно відрізнялось від групи хворих із ГКС, у якій тих, які не палять, було 47,2 %, а курців – 52,8 % ($\chi^2 = 4,582$; $P = 0,032$). Таким чином, незалежно від генотипу існує достовірний зв'язок між палінням і розвитком ГКС: у тих, які палять, ГКС виникає достовірно частіше.

Аналіз за наявності ожиріння. Під час аналізу впливу поліморфних варіантів гена *TNAP* на розвиток ГКС у пацієнтів з ожирінням і без ожиріння не було виявлено зв'язку між А69314G поліморфізмом гена *TNAP* і ожирінням у хворих із ГКС (табл. 5.21). Серед пацієнтів із ГКС, які мають ожиріння, гомозигот за основним алелем (А/А) було 65,0 %, а носіїв мінорного алеля (А/Г + Г/Г) – 35,0 %, а серед хворих із ГКС без ожиріння – 71,8 і 28,2 % відповідно. Таким чином, відмінності у розподілі різних варіантів генотипу між хворими із ГКС з ожирінням і без ожиріння не виходили за межі статистичної значущості ($\chi^2 = 0,576$; $P = 0,448$).

Таблиця 5.21 – Вплив поліморфних 69314G варіантів гена *TNAP* на ожиріння у хворих на ГКС

Генотип		Ожиріння (+)	Ожиріння (-)
А/А	<i>n</i>	26	56
		65,0%	71,8%
А/Г+Г/Г	<i>n</i>	14	22
		35,0%	28,2%
Разом	<i>n</i>	40	78
		100%	100%
$\chi^2 = 0,576$; $P = 0,448$			

Примітка. Див. табл. 5.3

Під час аналізу впливу алельних варіантів за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* на ІМТ залежно від ступеня ожиріння у хворих із ГКС достовірно статистичної значущості виявлено не було ($\chi^2 = 2,467$, $P = 0,481$) (табл. 5.22).

Таблиця 3.22 – Вплив поліморфних А69314G варіантів гена *TNAP* на ІМТ залежно від ступеня ожиріння у хворих із ГКС

<i>Генотип</i>		Нема	I ст., ІМТ = 25–30	II ст., ІМТ = 30–40	III ст., ІМТ ≥ 40
A/A	n	16	40	23	3
		76,2 %	70,2 %	62,2 %	100 %
A/G + G/G	n	5	17	14	0
		23,8 %	29,8 %	37,8 %	0 %
Разом	n	21	57	37	3
		100 %	100 %	100 %	100 %
$\chi^2 = 2,712$; $P = 0,438$					

Примітка. Див. табл. 5.3.

Аналіз за показниками вмісту ліпідів у плазмі крові. У таблиці 5.23 наведено дані про індекс атерогенності (ІА), вміст загального холестеролу (ХС), холестеролу у складі ліпопротеїнів різної густини (ХС-ЛПНЩ, ХС-ЛПДНЩ і ХС-ЛПВЩ), тригліцеридів у плазмі крові хворих із ГКС з різними варіантами генотипів (A/A і A/G + G/G).

Одержані результати свідчать про те, що у пацієнтів з різними А69314G поліморфними варіантами гена *TNAP* не виявлено достовірної різниці у показниках загального ХС ($P = 0,137$), ХС-ЛПНЩ ($P = 0,136$), ХС-ЛПДНЩ ($P = 0,739$), ХС-ЛПВЩ ($P = 0,859$), тригліцеридів ($P = 0,739$), а також у величині індексу атерогенності ($P = 0,351$).

Таблиця 5.23 – Вміст ліпідів плазми крові у хворих із ГКС залежно від варіантів генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* (M ± m)

Показники	A/A (n = 82)	A/G + G/G (n = 36)	F	P
Загальний ХС	6,52 ± 0,14	6,05 ± 0,24	3,662	0,137
ХС-ЛПНЦ	4,68 ± 0,15	4,22 ± 0,31	3,290	0,136
ХС-ЛПДНЦ	0,80 ± 0,04	0,82 ± 0,07	0,347	0,739
ХС-ЛПВЦ	1,04 ± 0,03	1,05 ± 0,04	0,502	0,859
Тригліцериди	1,75 ± 0,93	1,81 ± 0,15	0,347	0,739
Індекс атерогенності	5,78 ± 0,30	5,27 ± 0,46	0,050	0,351

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

При поділ пацієнтів на дві підгрупи залежно від величини ІА (≤ 3 і > 3) було оцінено вплив генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* на розвиток ДАХ у хворих із ГКС (табл. 5.24).

Таблиця 5.24 – Частота генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у хворих із ГКС із різними величинами індексу атерогенності

Генотип		ІА ≤ 3	ІА > 3
A/A	n	12	70
		60,0 %	71,4 %
A/G + G/G	n	8	28
		40,0 %	28,6 %
Разом	n	20	98
		100 %	100 %
$\chi^2 = 1,023$; P = 0,312			

Примітка. Див. табл. 5.3

Серед хворих із ГКС – тих, які мали $IA \leq 3$, – виявлено 60,0 % осіб з A/A генотипом, та 40,0 % з A/G + G/G генотипом. Розподіл алельних варіантів у хворих із ГКС, які мали $IA > 3$, становив 71,4 і 28,6 % відповідно. Отже, проведений аналіз не виявив статистично значущої асоціації даного варіанта SNP із розвитком ДАХ у хворих із ГКС ($\chi^2 = 1,023$; $P = 0,312$).

Аналіз за показниками коагуляції крові. Як впливає із табл. 5.25, середня величина жодного з показників коагуляції крові не залежала від A69314G поліморфізму гена *TNAP*. Отже, достовірної відмінності між значеннями ПТЧ ($P = 0,898$), ТЧ ($P = 0,902$), фібриногену ($P = 0,590$) і фібринолітичної активності ($P = 0,124$) у гомозигот за основним алелем (A/A) і носіїв мінорного алеля (A/G + G/G) виявлено не було.

Таблиця 5.25 – Деякі показники коагуляції крові у хворих із ГКС залежно від варіантів генотипу за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* ($M \pm m$)

Показники	A/A (n = 82)	A/G + G/G (n = 36)	F	P
Протромбіновий час, с	10,61 ± 0,19	10,65 ± 0,27	1,576	0,898
Тромбіновий час, с	17,83 ± 0,46	17,72 ± 0,91	0,932	0,902
Фібриноген, г/л	3,63 ± 0,14	3,76 ± 0,18	2,004	0,590
Фібринолітична активність, с	477,32 ± 4,21	465,56 ± 6,27	0,182	0,124

Примітка: n – кількість пацієнтів

Поділ хворих із ГКС на дві підгрупи за наявності і відсутності функціональних і біохімічних ознак ГКС не виявив жодного впливу досліджуваного поліморфізму гена *TNAP* на ризик розвитку гіперкоагуляційного синдрому (табл. 5.26).

Таблиця 5.26 – Зв'язок А69314G поліморфізму гена *TNAP* із гіперкоагуляцією крові (ГКК) у хворих із ГКС

		ГКК (-)	ГКК (+)
А/А	n	66	16
		68,8 %	72,7 %
А/Г + Г/Г	n	30	6
		31,2 %	27,3 %
Разом	n	96	22
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,134; P = 0,715$			

Примітка. Див. табл. 5.3.

Серед хворих із ГКС, у яких були відсутні ознаки ГКК, гомозигот за основним алелем А/А було 68,8 %, а носіїв мінорного алеля А/Г + Г/Г – 31,2 %. Розподіл різних генотипів серед пацієнтів із ГКС з ознаками ГКК становив 72,7 і 27,3 %. Отже, не виявлено асоціації А69314G поліморфізму із синдромом гіперкоагуляції крові у хворих із ГКС ($\chi^2 = 0,134; P = 0,715$).

Аналіз за наявності цукрового діабету. Визначення концентрації глюкози натще як у осіб контрольної групи ($P = 0,916$), так і у хворих із ГКС ($P = 0,163$), показало, що величина цього показника не відрізняється у гомозигот з А/А генотипом і носіїв мінорного алеля А/Г + Г/Г (табл. 5.27).

Таблиця 5.27 – Показники глюкози крові в групах порівняння залежно від варіантів генотипу за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* ($M \pm m$)

Показники		А/А	А/Г + Г/Г	F	P
Глюкоза крові, ммоль/л	Контроль	5,3 ± 0,08 (n = 92)	5,2 ± 0,17 (n = 18)	0,007	0,916
	ГКС	8,1 ± 0,32 (n = 82)	7,4 ± 0,28 (n = 36)	4,634	0,163
	P ₂	< 0,001	< 0,001		

Примітка. Див. табл. 5.7

Інші результати одержано, коли аналіз проводився між групами порівняння. Хворі із ГКС незалежно від генотипу мали достовірно вищий показник концентрації глюкози крові: носії А/А генотипу – $(8,1 \pm 0,32)$ ммоль/л проти $(5,3 \pm 0,08)$ ммоль/л у осіб контрольної групи ($P < 0,001$), носії мінорного алеля (А/Г + Г/Г) – $(7,4 \pm 0,28)$ ммоль/л проти $(5,2 \pm 0,17)$ ммоль/л у практично здорових індивідуумів ($P < 0,001$).

У пацієнтів із ГКС не виявлено залежності між генотипом за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* і розвитком цукрового діабету (табл. 5.28). Серед хворих із ГКС, які не страждали на цукровий діабет, – осіб із А/А генотипом – 67,0 %, а з А/Г + Г/Г генотипом – 33,0 %. Розподіл алельних варіантів досліджуваного гена серед хворих із ГКС, що страждали на ЦД, становив 76,7 і 23,3 % відповідно. Отже, у хворих із ГКС не виявлено достовірного зв'язку між поліморфними А69314G варіантами гена *TNAP* і розвитком цукрового діабету ($\chi^2 = 0,977$; $P = 0,323$).

Таблиця 5.28 – Зв'язок А69314G поліморфізму гена *TNAP* із цукровим діабетом (ЦД) у хворих із ГКС

		ЦД (-)	ЦД (+)
А/А	n	59	23
		67,0 %	76,7 %
А/Г + Г/Г	n	29	7
		33,0 %	23,3 %
Разом	n	88	30
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,977$; $P = 0,323$			

Примітка. Див. табл. 5.3.

Вплив SNP на основні характеристики ГКС

Серед пацієнтів з ангінозною формою ГКС співвідношення генотипів А/А і А/Г + Г/Г становило 68,9 та 31,1 %, а серед осіб з іншими формами ГКС – 73,3 та 26,7 % відповідно. Статистично достовірної різниці у розподілі алельних варіантів у досліджуваних групах не виявлено ($\chi^2 = 0,120$; $P = 0,729$). Під час детального аналізу впливу А69314G поліморфізму на варіанти клінічного перебігу у хворих із ГКС (ангінозний, астматичний, абдомінальний, аритмічний та безбольовий) статистичної значущості виявлено не було ($\chi^2 = 3,264$; $P = 0,515$) (табл. 5.28).

Таблиця 5.28 – Вплив поліморфних А69314G варіантів гена *TNAP* на варіанти клінічного перебігу у хворих із ГКС

		<i>Варіанти клінічного перебігу</i>				
<i>Генотип</i>		Ангі- нозний	Астма- тичний	Абдомі- нальний	Аритміч- ний	Безбольо- вий
А/А	n	71	4	1	4	2
		68,9 %	80,0 %	33,3 %	80,0 %	100,0 %
А/Г + Г/Г	n	32	1	2	1	0
		31,1 %	20,0 %	66,7 %	20,0 %	0 %
Разом	n	103	5	3	5	2
		100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
$\chi^2 = 3,264$; $P = 0,515$						

Примітка. Див. табл. 5.3.

Щодо аналізу за клінічними проявами гострого коронарного синдрому, то розподіл алельних варіантів за А69314G поліморфізмом гена *TNAP* у групах пацієнтів статистично достовірно не відрізняється ($\chi^2 = 4,015$; $P = 0,134$). Співвідношення алельних варіантів гена *TNAP* за поліморфізмом А69314G (А/А і А/Г + Г/Г) у пацієнтів із нестабільною стенокардією становило 53,8 і 46,2 %, у хворих з не-Q-інфарктом міокарда відповідні показники

дорівнювали 71,4 і 28,6 %, а з Q- та QS-інфарктами – 75,4 і 24,6 %. І нарешті, ми дослідили асоціацію між генотипом хворих за даним SNP і розвитком ускладнень (табл. 5.30). Співвідношення гомозигот за основним алелем і носіїв мінорного алеля (A/A і A/G + G/G) у групах пацієнтів, із ГКС без ускладнень, було 68,1 і 31,9 %, а тих, що мали ускладнення – 75,0; 25,0 % відповідно і достовірно не відрізнялося ($\chi^2 = 0,431$; P = 0,511).

Таблиця 5.30 – Частота генотипів за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у хворих із ГКС з ускладненнями і без ускладнень

Генотип		Ускладнення (-)	Ускладнення (+)
A/A	n	64	18
		68,1 %	75,0 %
A/G + G/G	n	30	6
		31,9 %	25,0 %
Разом	n	94	24
		100 %	100 %
$\chi^2 = 0,431$; P = 0,511			

Примітка. Див. табл. 5.3.

Аналіз впливу A69314G поліморфних варіантів гена *TNAP* на різні ускладнення у хворих із ГКС (аритмії, серцева недостатність, тромбоемболії, розриви серця та його частин, кровотечі) свідчить, що у хворих із ГКС з різними клінічними варіантами ускладнень не було виявлено достовірної відмінності у розподілі генотипів A/A і A/G + G/G за досліджуваним поліморфізмом ($\chi^2 = 5,027$; P = 0,413) (табл. 5.31).

Таблиця 5.31 – Вплив поліморфних A69314G варіантів гена *TNAP* на ускладнення у хворих із ГКС

Ускладнення							
Генотип		Немає	Аритмії	Серцева недостатність, в т.ч. шок	Тромбоемболії	Розрив серця та його частин	Крово-течі
A/A	n	64	4	11	1	2	0
		68,1%	66,7%	84,6%	50,0%	100%	0%
A/G + G/G	n	30	2	2	1	0	1
		31,9%	33,3%	15,4%	50,0%	0%	100%
Разом	n	94	6	13	2	2	1
		100%	100%	100%	100%	100%	100%
$\chi^2 = 5,027; P = 0,413$							

Примітка. Див. табл. 5.3.

Таким чином, встановлено, що поліморфізм A69314G гена *TNAP* асоційований із розвитком ГКС: ризик виникнення ГКС у носіїв мінорного алеля A/G + G/G у 2,24 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем A/A. Встановлено, що вплив A69314G поліморфізму на розвиток ГКС має статеві особливості: особи чоловічої статі, які є носіями мінорного алеля, у 2,19 раза частіше хворіють на ГКС, ніж особи з A/A генотипом. Серед вивчених факторів ризику доведений вплив ІМТ та паління на розвиток ГКС у пацієнтів з різними A69314G поліморфними варіантами гена *TNAP*. В осіб з ІМТ ≥ 25 кг/м², які є носіями мінорного алеля, ризик виникнення ГКС майже у 2,9 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем. Курці з генотипом A/G + G/G мають майже у 3,4 раза вищий ризик розвитку ГКС, ніж пацієнти з A/A генотипом.

5.2 Вплив алельного поліморфізму Ser37Ala гена *BMP-2* на розвиток гострого коронарного синдрому

Серед однонуклеотидних поліморфізмів гена *BMP-2* для дослідження був обраний Ser37Ala. Суть цього SNP полягає в тому, що в 2-му екзоні гена *BMP-2*, у позиції 1676, тимін заміщено на гуанін. Це спричиняє те, що 37-ма амінокислота молекули *BMP-2* – серин – замінюється на аланін.

Частоту трьох можливих варіантів генотипу за вивченим поліморфізмом гена *BMP-2*, а також перевірку відповідності розподілу основного і мінорного алелів рівновазі Харді-Вайнберга подано в табл. 5.32.

Перевірка розподілу генотипів за Ser37Ala поліморфізмом на відповідність закону Харді-Вайнберга показала, що і в контрольній, і в основній групах відхилення від установленної рівноваги не є статистично значимими. З'ясовано, що співвідношення алелів у обох групах істотно не відрізняється від очікуваних ($P > 0,05$).

Таблиця 5.32 – Частота алельних варіантів і алелів за Ser37Ala поліморфізмом гена *BMP-2* у контрольній групі та у хворих із ГКС

	<i>Контрольна група, n (%)</i>	<i>Хворі з ГКС, n (%)</i>
Гомозиготи Ser/Ser	106 (45,3)	59 (50,0)
Гетерозиготи Ser/Ala	94 (40,2)	38 (32,2)
Гомозиготи Ala/Ala	34 (14,5)	21 (17,8)
Ser-алель	0,65	0,66
Ala-алель	0,35	0,34
χ^2	2,96	9,34
P	> 0,05	> 0,05

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

Порівняння частоти різних варіантів Ser37Ala поліморфізму у хворих основної і контрольної груп свідчить про відсутність статистично достовірної різниці у розподілі алельних варіантів гена BMP-2 за поліморфізмом 2-го екзону у хворих із ГКС і практично здорових осіб.

Аналіз за статтю. Розподіл частоти алельних варіантів за вивченим поліморфізмом в осіб різної статі у групах порівняння подано в табл. 5.33.

При порівнянні частоти генотипів в основній і контрольній групах за поліморфізмом Ser37Ala, окремо у жінок і чоловіків, зв'язку між даним генетичним маркером і ГКС виявити не вдалося.

Таблиця 5.33 – Розподіл частоти осіб різних генотипів за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 серед жінок і чоловіків у контрольній групі та у хворих із ГКС

Генотип	Жінки (n)		Чоловіки (n)	
	контроль	ГКС	контроль	ГКС
Ser/Ser	39	11	67	48
Ser/Ala	31	11	63	27
Ala/Ala	7	4	27	17
	P ₁ =0,601		P ₁ =0,217	
	P ₂ =0,216, P ₃ =0,458, P ₄ =0,015, P ₅ =0,653, P ₆ =0,890			

Примітка: n – кількість осіб; P₁ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем і ГКС; P₂ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між жінками і чоловіками у контролі; P₃ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між жінками і чоловіками у групах із ГКС; P₄ – значимість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом Ser/Ser у контрольній групі та групі з ГКС; P₅ – значимість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом Ser/Ala у контрольній групі та групі з ГКС; P₆ – значимість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом Ala/Ala у контрольній групі та групі з ГКС

Порівняння даних про частоту генотипів поліморфізму 2-го екзону гена BMP-2 в осіб різної статі окремо в контрольній групі та у хворих із ГКС свідчить про відсутність статистично значимої відмінності у розподілі алельних варіантів гена в досліджуваних групах.

Аналіз частоти осіб у групах пацієнтів, утворених за генотипами гена BMP-2, дає можливість стверджувати, що гомозиготи за основним алелем Ser/Ser чоловічої статі більшою мірою схильні до розвитку ГКС, ніж відповідні гомозиготи жіночої статі.

Аналіз за антропометричними даними. При порівнянні показників зросту, маси тіла та ІМТ в основній і контрольній групах серед осіб жіночої та чоловічої статей залежно від генотипу пацієнтів за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 не було виявлено різниці середніх значень вивчених показників і їх залежності від варіантів генетичного поліморфізму (додаток 1).

Що стосується порівняння між групами, то тут виявлено деякі незначні відмінності антропометричних даних як у жінок, так і у чоловіків. Хворі з ГКС жінки, які є гомозиготами за основним алелем (Ser/Ser), мають достовірно вищі показники зросту ($163,64 \pm 5,42$ см проти $155,72 \pm 1,45$ см; $P = 0,049$) і маси тіла ($85,55 \pm 10,85$ кг проти $69,28 \pm 1,85$ кг; $P = 0,017$), ніж практично здорові жінки. У чоловіків із ГКС, представників усіх генотипів, показники зросту були достовірно вищими, ніж у відповідному контролі.

Результати аналізу впливу поліморфних варіантів гена BMP-2 на розвиток ГКС в осіб із нормальним і підвищеним ІМТ наведені в табл. 5.34.

При порівнянні частоти генотипів в основній і контрольній групах за поліморфізмом Ser37Ala, окремо у пацієнтів з $IMT < 25$ кг/м² і $IMT \geq 25$ кг/м², впливу між даним генетичним маркером і ГКС виявити не вдалося.

Таблиця 5.34 – Розподіл частоти осіб різних генотипів за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 у контрольній групі та у хворих із ГКС залежно від ІМТ

<i>Генотип</i>	<i>ІМТ < 25 кг/м² (n)</i>		<i>ІМТ ≥ 25 кг/м² (n)</i>	
	<i>контроль</i>	<i>ГКС</i>	<i>контроль</i>	<i>ГКС</i>
Ser/Ser	35	10	71	49
Ser/Ala	25	6	69	32
Ala/Ala	10	5	24	16
	P ₁ = 0,563		P ₁ = 0,345	
	P ₂ = 0,611, P ₃ = 0,722, P ₄ = 0,026, P ₅ = 0,185, P ₆ = 0,650			

Примітка: n – кількість осіб; P₁ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем і ГКС; P₂ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з різним ІМТ у контролі; P₃ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з різним ІМТ у групах з ГКС; P₄ – значимість відмінностей у частоті осіб з різним ІМТ з генотипом Ser/Ser у контрольній групі та групі з ГКС; P₅ – значимість відмінностей у частоті осіб з різним ІМТ з генотипом Ser/Ala у контрольній групі та групі з ГКС; P₆ – значимість відмінностей у частоті осіб з різним ІМТ з генотипом Ala/Ala у контрольній групі та групі з ГКС

Порівняння даних про частоту генотипів поліморфізму 2-го екзону гена BMP-2 в осіб, що мають різне значення ІМТ, окремо в контрольній групі та у хворих із ГКС, свідчить про відсутність статистично значимої відмінності у розподілі алельних варіантів гена серед практично здорових осіб і пацієнтів із ГКС. Аналіз частоти осіб у групах пацієнтів, утворених за генотипами гена BMP-2, дає можливість стверджувати, що гомозиготи за основним алелем Ser/Ser, які мають підвищений ІМТ, більшою мірою схильні до розвитку ГКС, ніж відповідні гомозиготи із нормальними показниками ІМТ (P=0,026).

Аналіз за показниками артеріального тиску. У додатку 2 наведено показники САТ, ДАТ, ПАТ і СрАТ у пацієнтів контрольної групи та у хворих із ГКС, що мають різні генотипи за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2. Одержані дані свідчать про те, що всі чотири різновиди АТ не відрізняються у

носіїв із різними варіантами генотипів як усередині контрольної групи, так і у хворих із ГКС. Порівняння з урахуванням статі пацієнтів дозволило виявити деякі особливості. Більшість вивчених показників залежала від генотипу серед практично здорових осіб жіночої статі: систолічний і середній артеріальний тиск був достовірно вищим у носіїв Ser/Ser генотипу, а діастолічний – у гомозигот за мінорним алелем Ala/Ala. У жінок із ГКС зафіксовані вищі показники СрАТ у гомозигот за основним алелем. У чоловіків на відміну від жінок більшість вивчених показників відрізнялася у групі хворих із ГКС. Так, у носіїв Ser/Ser генотипу величини САТ, ПАТ і СрАТ були достовірно вищими, ніж у носіїв інших генотипів (додаток 3).

При порівнянні між групами з'ясувалося, що діастолічний артеріальний тиск достовірно вищий серед носіїв Ser/Ser і Ser/Ala генотипів, СрАТ – у гомозигот за основним алелем (Ser/Ser), а ПАТ достовірно нижчий у гетерозигот (додаток 52). Деяка інша закономірність виявилася, коли аналіз проводився з урахуванням статі пацієнтів (додаток 3). У жінок із ГКС, гомозигот за основним алелем, достовірно вищими є показники ДАТ і СрАТ, а в гетерозигот ще й САТ, ніж у відповідному контролі. У чоловіків величини систолічного тиску достовірно нижчі у гетерозигот, а пульсового ще й у гомозигот за основним алелем, ніж у групі контролю. Величини ДАТ і СрАТ були достовірно вищими у носіїв Ser/Ser генотипу серед хворих, ніж серед практично здорових осіб.

Дані про вплив поліморфізму 2-го екзону гена BMP-2 на розвиток ГКС в осіб із нормальним і підвищеним артеріальним тиском наведені у табл. 5.35. Як бачимо з таблиці, ні серед осіб із нормальним артеріальним тиском, ні з підвищеним не існує достовірної різниці у співвідношенні генотипів у основній і контрольній групах.

Таблиця 5.35 – Розподіл частоти осіб різних генотипів за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 у контрольній групі та у хворих із ГКС залежно від величини АТ

<i>Генотип</i>	<i>Нормальний АТ (n)</i>		<i>Підвищений АТ (n)</i>	
	<i>контроль</i>	<i>ГКС</i>	<i>контроль</i>	<i>ГКС</i>
Ser/Ser	72	17	32	42
Ser/Ala	61	18	32	20
Ala/Ala	25	11	9	10
	P ₁ =0,381		P ₁ =0,125	
	P ₂ =0,675, P ₃ =0,072, P ₄ <0,001, P ₅ =0,053, P ₆ =0,109			

Примітка: n – кількість осіб; P₁ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем і ГКС; P₂ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з нормальним і підвищеним АТ у контролі; P₃ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з нормальним і підвищеним АТ у групах із ГКС; P₄ – значимість відмінностей у частоті осіб з нормальним і підвищеним АТ із генотипом Ser/Ser у контрольній групі та групі з ГКС; P₅ – значимість відмінностей у частоті осіб з нормальним і підвищеним АТ із генотипом Ser/Ala у контрольній групі та групі з ГКС; P₆ – значимість відмінностей у частоті осіб з нормальним і підвищеним АТ із генотипом Ala/Ala у контрольній групі та групі з ГКС

Використання χ^2 -критерію Пірсона показало, що і в контрольній групі і серед хворих із ГКС розподіл алельних варіантів вивченого поліморфізму не відрізнявся у пацієнтів з артеріальною гіпертензією і в осіб із нормальним АТ. Отже, як в основній, так і в контрольній групі генотип за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 не впливав на розвиток артеріальної гіпертензії.

При аналізі частоти осіб із нормальним та підвищеним артеріальним тиском серед носіїв різних генотипів (гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем) у контрольній групі та групі з ГКС виявлено статистично значиму залежність між рівнем АТ і ймовірністю розвитку ГКС у носіїв Ser/Ser і Ser/Ala генотипів.

Методом логістичної регресії з'ясовано, що ризик розвитку ГКС у гетерозигот Ser/Ala з підвищеним артеріальним тиском на 48 % більший, ніж у гомозигот за основним алелем Ser/Ser (табл. 5.36).

Таблиця 5.36 – Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 у пацієнтів з артеріальною гіпертензією

<i>Генотип</i> <i>n</i>	<i>CR</i>	<i>SE</i>	<i>WS</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	<i>95 % CI</i> <i>для OR</i> <i>нижній</i>	<i>95 % CI</i> <i>для OR</i> <i>верхній</i>
Ala/Ala	0,164	1,916	0,767	0,747	0,847	0,308	2,327
Ser/Ala	0,742	0,369	4,038	0,044	0,476	0,231	0,982

Примітка: порівняння проводилося відносно гомозигот за основним алелем (Ser/Ser); CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда, P– статистична значимість, OR – відношення ризику, CI – довірчий інтервал

Аналіз за фактом паління. У табл. 5.37 подано відомості про розподіл генотипів за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 залежно від факту паління. Розподіл генотипів за вивченим поліморфізмом у курців і тих, хто не палить, істотно не відрізняється серед хворих із ГКС і в контролі. При порівнянні співвідношення генотипів у контрольній і основній групах відмінностей у частоті алельних варіантів гена BMP-2 між курцями і тими, хто не палить, не виявлено.

Співвідношення між курцями і тими, хто не палить, у хворих із ГКС і в контролі статистично відрізнялось у носіїв Ser/Ser і Ser/Ala генотипів.

Таблиця 5.37 – Розподіл частоти осіб різних генотипів за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 у контрольній групі та у хворих із ГКС залежно від факту паління

Генотип	Ті, хто не палить (n)		Курці (n)	
	контроль	ГКС	контроль	ГКС
Ser/Ser	74	34	32	25
Ser/Ala	73	22	21	16
Ala/Ala	27	8	7	13
	P ₁ =0,346		P ₁ =0,220	
	P ₂ =0,343, P ₃ =0,262, P ₄ =0,115, P ₅ =0,022, P ₆ =0,002			

Примітка: n – кількість осіб; P₁ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем і ГКС; P₂ – значимість відмінностей у розподілі генотипів у курців і тих, хто не палять у контролі; P₃ – значимість відмінностей у розподілі генотипів у курців і тих, хто не палять у групах із ГКС; P₄ – значимість відмінностей у частоті осіб-курців і тих, хто не палять із генотипом Ser/Ser у контрольній групі та групі з ГКС; P₅ – значимість відмінностей у частоті осіб-курців і тих, хто не палять із генотипом Ser/Ala у контрольній групі та групі з ГКС; P₆ – значимість відмінностей у частоті осіб-курців і тих, хто не палять із Ala/Ala у контрольній групі та групі з ГКС

Аналіз за наявністю цукрового діабету. Визначення концентрації глюкози натще у хворих із ГКС показало, що рівень глюкози крові не залежав від поліморфізму, що вивчався. У пацієнтів із гострим коронарним синдромом не виявлено зв'язку між поліморфними варіантами гена BMP-2 і цукровим діабетом.

Аналіз за наявністю ожиріння. У ході вивчення розподілу алельних варіантів гена BMP-2 у пацієнтів із ГКС зв'язку з розвитком ожиріння для поліморфізму Ser37Ala не виявлено. Співвідношення генотипів у групах порівняння не відрізнялось і при врахуванні основних факторів ризику ГКС (стать, ІМТ, паління, АГ, ДАХ, ожиріння, ЦД, ГКС).

Вплив SNP на основні характеристики ГКС. Аналіз даних про зв'язок поліморфізму Ser37Ala гена BMP-2 з різними клінічними варіантами гострого коронарного синдрому виявив відсутність асоціації досліджуваного SNP із різними клінічними проявами хвороби. Достовірності у розподілі не встановлено і при врахуванні таких факторів ризику, як стать, ІМТ, артеріальна гіпертензія, порушення ліпідного складу і гіперкоагуляція крові, цукровий діабет та ожиріння. Лише у пацієнтів, які палять різниця у частоті алельних варіантів генотипу в групах із різними клінічними формами ГКС була статистично значимою ($P = 0,033$) (рис. 5.2). Курці з Ser/Ser генотипом достовірно частіше хворіють ангінозною формою ГКС, а з генотипом Ser/Ala – іншими формами.

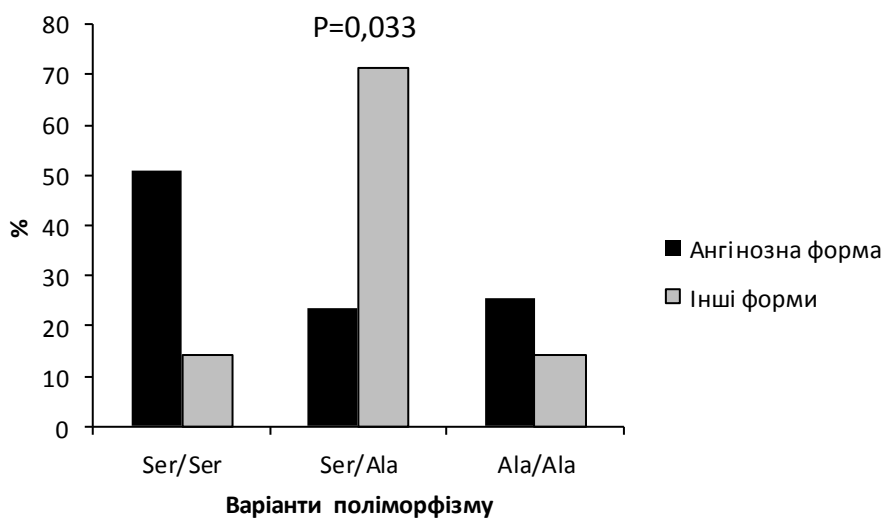


Рисунок 5.2 – Частота алельних варіантів гена BMP-2 за Ser37Ala поліморфізмом у хворих з ГКС, що палять з ангінозною формою (чорні стовпчики) і з іншими формами (сірі стовпчики). P – статистична значимість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Відмінності у співвідношенні алельних варіантів за поліморфізмом Ser37Ala серед пацієнтів із різними формами ГКС не були статистично значимими. Достовірна різниця в розподілі пацієнтів із нестабільною

стенокардією, не-Q-інфарктом міокарда, Q- та QS-інфарктами міокарда була виявлена лише серед пацієнтів без ожиріння ($P = 0,018$) (рис. 5.3).

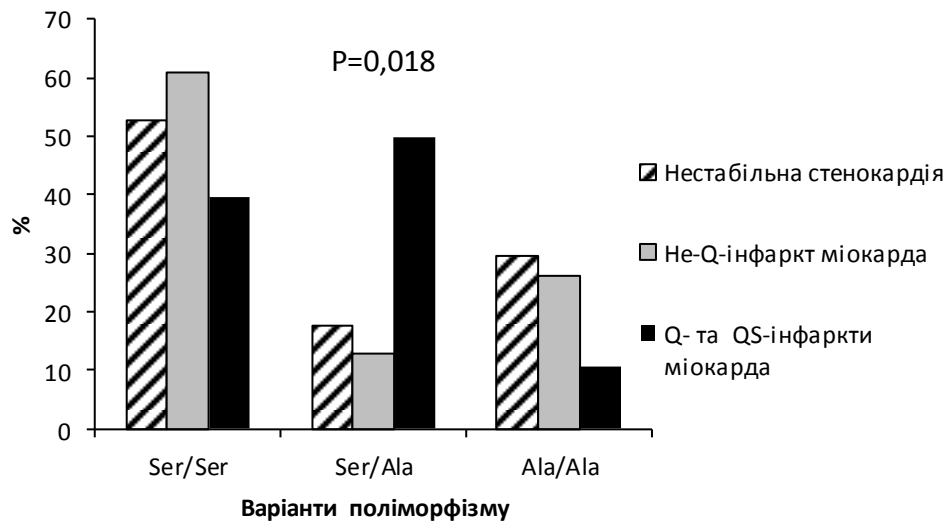


Рисунок 5.3 – Частота алельних варіантів гена BMP-2 за поліморфізмом Ser37Ala у хворих з нестабільною стенокардією (заштриховані стовпчики), не-Q-інфарктом міокарда (сірі стовпчики), Q- та QS-інфарктами міокарда (чорні стовпчики). P – статистична значимість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Нарешті, нами був вивчений зв'язок між поліморфізмом 2-го екзону гена BMP-2 і розвитком ускладнень гострого коронарного синдрому. Достовірної різниці у розподілі генотипів між пацієнтами з ускладненнями і тими, хто переніс хворобу без ускладнень, виявлено не було. Проте зв'язок із розвитком ускладнень ГКС виявився для пацієнтів чоловічої статі ($P = 0,018$) (додаток 4); хворих без ДАХ ($P = 0,038$) (додаток 5) і без ожиріння ($P = 0,016$) (додаток 6); пацієнтів, які палять ($P = 0,021$) (додаток 7).

5.3 Вплив алельного поліморфізму Ser37Ala гена BMP-2 на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту

Частоту трьох можливих варіантів генотипу за вивченим поліморфізмом гена BMP-2, а також перевірку відповідності розподілу основного і мінорного алелів рівновазі Харді-Вайнберга подано в табл. 5.38.

Таблиця 5.38 – Частота алельних варіантів і алелів за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 у контрольній групі та у хворих з ІАТІ

	<i>Контрольна група, n (%)</i>	<i>Хворі з ІАТІ, n (%)</i>
Гомозиготи Ser/Ser	55 (44,4)	65 (38,2)
Гетерозиготи Ser/Ala	49 (39,5)	64 (37,6)
Гомозиготи Ala/Ala	20 (16,1)	41 (24,1)
Ser-алель	0,64	0,57
Ala-алель	0,36	0,43
χ^2	2,47	9,13
P	> 0,05	< 0,05

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

Перевірка розподілу генотипів за Ser37Ala поліморфізмом на відповідність закону Харді-Вайнберга показала, що в основній групі відхилення від встановленої рівноваги є статистично значимими, і співвідношення алелів в обох групах відрізняється від очікуваних (P<0,05).

Показник P, визначений за χ^2 -критерієм Пірсона (P = 0,231), свідчить про відсутність статистично достовірної різниці у розподілі алельних варіантів гена BMP-2 за поліморфізмом 2-го екзону у хворих з ІАТІ і практично здорових осіб.

Аналіз за статтю. При порівнянні частоти генотипів в основній і контрольній групах за поліморфізмом Ser37Ala окремо у жінок і чоловіків зв'язку між даним генетичним маркером і ІАТІ виявити не вдалося.

Аналіз за антропометричними даними. При порівнянні показників зросту, маси тіла й ІМТ в основній і контрольній групах серед осіб жіночої і чоловічої статей залежно від генотипу пацієнтів за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 не було виявлено різниці середніх значень вивчених показників і їх залежності від варіантів генетичного поліморфізму (додаток 8). Що стосується порівняння між групами, то тут виявлено деякі незначні відмінності антропометричних даних як у жінок, так і у чоловіків. Хворі з ІАТІ жінки, які є гомозиготами за основним (Ser/Ser) і мінорним алелем (Ala/Ala), мають достовірно вищі показники зросту, а гетерозиготи ще й маси тіла, ніж практично здорові жінки. У чоловіків з ІАТІ, представників Ser/Ala генотипу, показники зросту, а у Ala/Ala ще й маси тіла були достовірно вищими, ніж у відповідному контролі.

Поділ кожної із двох груп на підгрупи залежно від величини ІМТ дав можливість заперечити вплив поліморфних варіантів гена BMP-2 на розвиток ІАТІ в осіб із нормальним і підвищеним рівнями цього показника.

Аналіз за показниками артеріального тиску. У додатку 9 наведено показники САТ, ДАТ, ПАТ і СрАТ у пацієнтів контрольної групи та у хворих з ІАТІ, що мають різні генотипи за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2. Отримані дані свідчать, що всі чотири різновиди АТ не відрізняються у носіїв з різними варіантами генотипів як усередині контрольної групи, так і у хворих з ІАТІ. Порівняння з урахуванням статі пацієнтів статистично достовірних особливостей також не виявило.

При порівнянні між пацієнтами з ІАТІ і практично здоровими особами достовірно значимої відмінності у показниках артеріального тиску не встановлено (додаток 9). Проте аналіз із урахуванням статі пацієнтів виявив

певні істотні відмінності (додаток 10). У жінок із ІАТІ гомозигот за основним алелем САТ, ДАТ і СрАТ, у гомозигот за мінорним алелем ДАТ і СрАТ, а в гетерозигот усі вивчені показники були достовірно вищими, ніж у відповідному контролі. У чоловіків вплив генетичного поліморфізму гена ВМР-2 на значення показників артеріального тиску був набагато меншим. У носіїв Ser/Ser генотипу значення САТ і СрАТ, а в гетерозигот тільки ДАТ у хворих з ІАТІ були достовірно вищими, ніж у групі контролю.

Дані про вплив поліморфізму 2-го екзону гена ВМР-2 на розвиток ІАТІ в осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском наведені у табл. 5.39.

Таблиця 5.39 – Розподіл осіб різних генотипів за Ser37Ala поліморфізмом гена ВМР-2 у контрольній групі і у хворих з ІАТІ залежно від величини АТ

<i>Генотип</i>	<i>Нормальний АТ (n)</i>		<i>Підвищений АТ (n)</i>	
	<i>контроль</i>	<i>ІАТІ</i>	<i>контроль</i>	<i>ІАТІ</i>
Ser/Ser	20	10	34	55
Ser/Ala	17	18	30	46
Ala/Ala	11	14	9	27
	P ₁ =0,189		P ₁ =0,293	
	P ₂ =0,307, P ₃ =0,067, P ₄ =0,007, P ₅ =0,367, P ₆ =0,120			

Примітка: n – кількість осіб; P₁ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем та ІАТІ; P₂ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з нормальним та підвищеним АТ у контролі; P₃ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з нормальним та підвищеним АТ у групах з ІАТІ; P₄ – значимість відмінностей у частоті осіб із нормальним та підвищеним АТ з генотипом Ser/Ser у контрольній групі та групі з ІАТІ; P₅ – значимість відмінностей у частоті осіб із нормальним та підвищеним АТ з генотипом Ser/Ala у контрольній групі та групі з ІАТІ; P₆ – значимість відмінностей у частоті осіб із нормальним та підвищеним АТ з генотипом Ala/Ala у контрольній групі та групі з ІАТІ

Як бачимо з таблиці, ні серед осіб із нормальним артеріальним тиском, ні з підвищеним не існує достовірної різниці у співвідношенні генотипів у основній і контрольній групах.

Використання χ^2 -критерію Пірсона показало, що і в контрольній групі, і серед хворих з ІАТІ розподіл алельних варіантів вивченого поліморфізму не відрізнявся у пацієнтів з артеріальною гіпертензією і в осіб з нормальним АТ. Отже, як в основній, так і в контрольній групі генотип за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 не впливав на розвиток артеріальної гіпертензії.

При аналізі частоти осіб із нормальним та підвищеним артеріальним тиском серед носіїв різних генотипів (гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем) у контрольній групі та групі з ІАТІ виявлено статистично значиму залежність між рівнем АТ і ймовірністю розвитку ІАТІ у носіїв Ser/Ser генотипу.

Аналіз за фактом паління. При порівнянні розподілу генотипів у контрольній і основній групах відмінностей у частоті алельних варіантів гена BMP-2 між курцями і тими, хто не палить, не виявлено.

Аналіз за наявністю цукрового діабету. Визначення концентрації глюкози натще у хворих з ІАТІ показало, що рівень глюкози крові не залежав від поліморфізму, що вивчався. У пацієнтів з ішемічним інсультом не виявлено зв'язку між поліморфними варіантами гена BMP-2 і цукровим діабетом. На відсутність такої залежності не впливали стать, ІМТ, наявність артеріальної гіпертензії, дисліпопротеїнемії атерогенного характеру та ознак гіперкоагуляції крові.

Аналіз за наявністю ожиріння. Під час вивчення розподілу алельних варіантів гена BMP-2 у пацієнтів з ІАТІ зв'язку з розвитком ожиріння для поліморфізму Ser37Ala не виявлено. Співвідношення генотипів у групах порівняння не відрізнялось і при врахуванні основних факторів ризику ІАТІ (стать, ІМТ, паління, АГ, ДАХ, ожиріння, ЦД, ГКК).

Вплив SNP на основні характеристики ІАТІ. Аналіз даних про зв'язок поліморфізму гена BMP-2 з різними варіантами ішемічного інсульту свідчить про відсутність асоціації досліджуваного генетичного маркера з обсягом уражень головного мозку, локалізацією атеротромботичного процесу, тяжкістю перебігу, повторюваністю і неврологічними проявами ІАТІ. Такий висновок залишається справедливим і за умов поділу пацієнтів на підгрупи за ознаками статі та з урахуванням факторів ризику.

5.4 Комплексний вплив поліморфізмів генів системи MGP на розвиток гострого коронарного синдрому

Наступним кроком нашого дослідження стало вивчення поєднаного впливу поліморфізму генів системи MGP і з'ясування їх спільного внеску в розвиток ГКС. Подібний аналіз надав можливість виявити найінформативніші комбінації поліморфних локусів, які у разі поєднаного впливу будуть мати найбільше значення у розвиток ГКС. Використовуючи сучасні підходи до статистичного аналізу, ми створили так звані класифікаційні моделі (маркери ГКС), які дозволяють прогнозувати ризик розвитку хвороби у загальній популяції, а також діагностувати недугу в необстежених пацієнтів.

Для оцінки комплексного впливу вивчених поліморфізмів генів системи MGP на розвиток ГКС були використані методи “Random Forest” із фільтрацією «шумів», метод MDR, логістична бінарна регресія з побудовою ROC-кривої.

Першим в алгоритмі аналізу даних був застосований метод “Random Forest”. Він дозволяє побудувати модель, яка відображає всі досліджувані поліморфізми (предиктори) згідно з рівнем їх важливості (ступенем внеску в розвиток ГКС та здатністю прогнозувати ризик його виникнення). З рис. 5.4

бачимо, що згідно з даним методом дослідження найбільш важливим серед усіх предикторів є G-7A поліморфізм гена MGP.

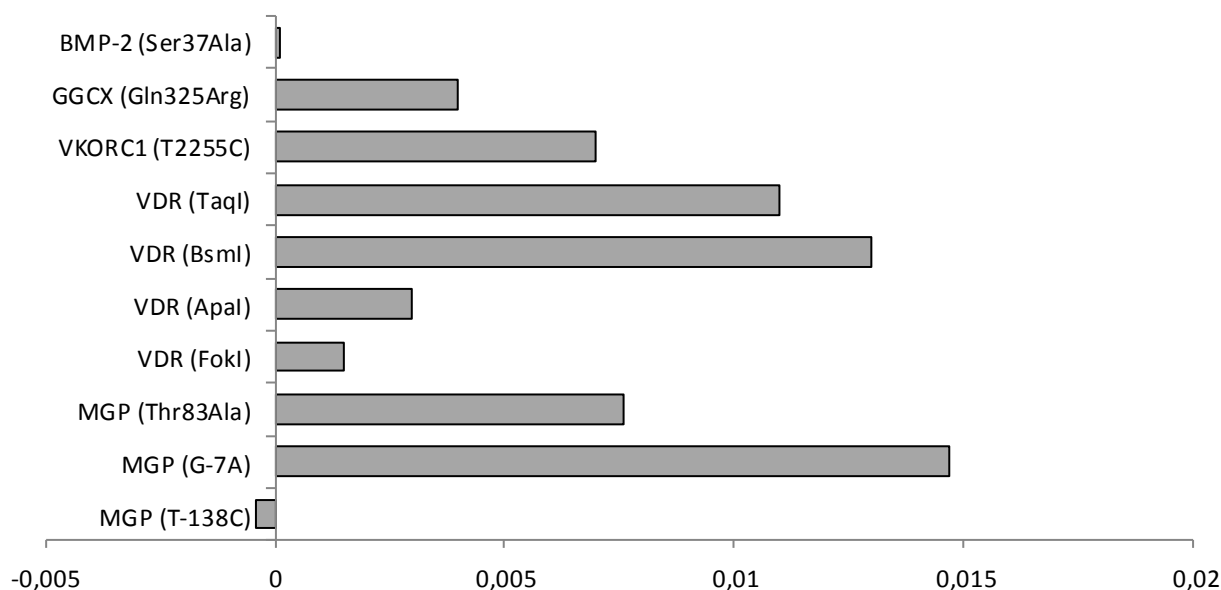


Рисунок 5.4 – Предиктори розвитку ГКС за рівнем їх значимості (метод “Random Forest”)

Для вдосконалення класифікаційної моделі на наступному кроці аналізу даних нами був використаний метод «фільтрації шуму», який дозволяє знехтувати незначними предикторами та виявити важливі прогностичні фактори [133]. Результати аналізу подані на рис. 5.5.

Як і при попередньому аналізі, підтверджено, що найбільш вагомим предиктором розвитку ГКС є G-7A поліморфізм гена MGP.

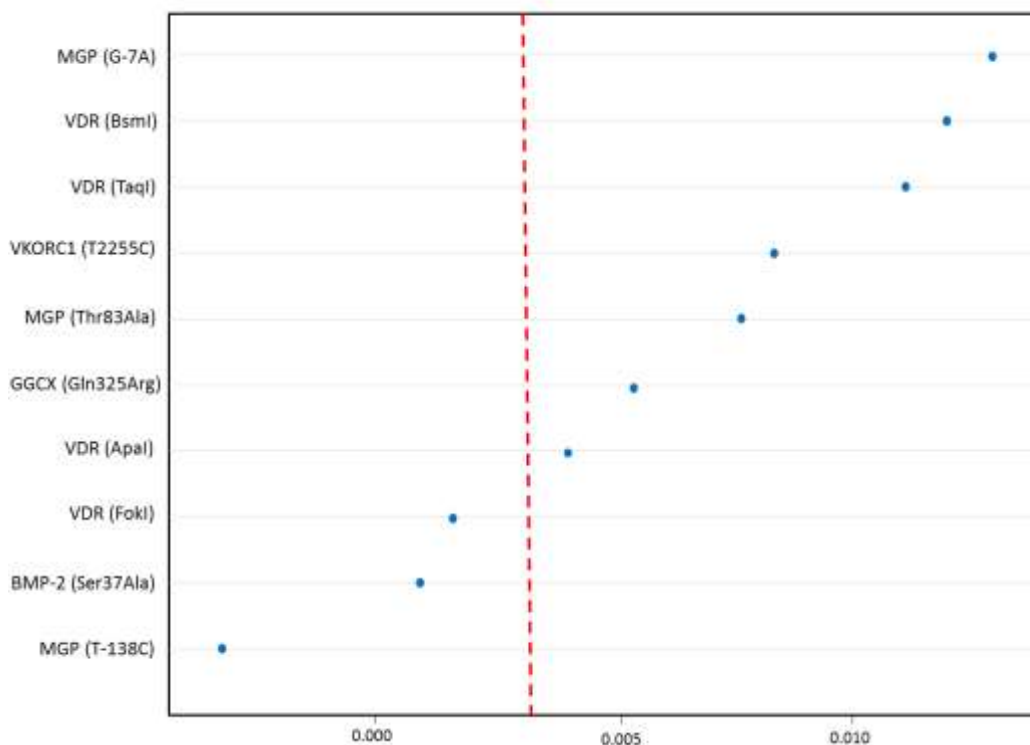


Рисунок 5.5 – Результати методу фільтрації «шумів». Важливі предиктори розміщені праворуч від пунктирної лінії

Для подальшого дослідження ми обрали лише ті поліморфні варіанти вивчених генів, які розміщені праворуч від пунктирної лінії, та внесли їх до класифікаційної моделі. Остання мала прогностичну здатність 75 % на навчальній (Training Accuracy) і 68 % - на тестованій вибірці (Testing Accuracy).

Моделювання міжгенної взаємодії досліджуваних поліморфізмів реалізували методом мультифакторної просторової редукції (MDR), який дозволив обрати комбінації поліморфних локусів, що мають найбільшу патогенетичну значимість розвитку ГКС. Статистично значимою виявилася дволокусна модель G-7A&Thr83Ala, що має класифікаційну здатність (Testing Balanced Accuracy) 63 % з крос-перевірочною здатністю 8/10 (Crossvalidation Consistency). Метод MDR усунув декілька предикторів із тих, що були виявлені

методом “фільтрації шумів”, і при цьому прогностична здатність моделі знизилася лише на 4 %.

На рис. 5.6 відображена комбінація генотипів G-7A та Thr83Ala поліморфізмів гена MGP.

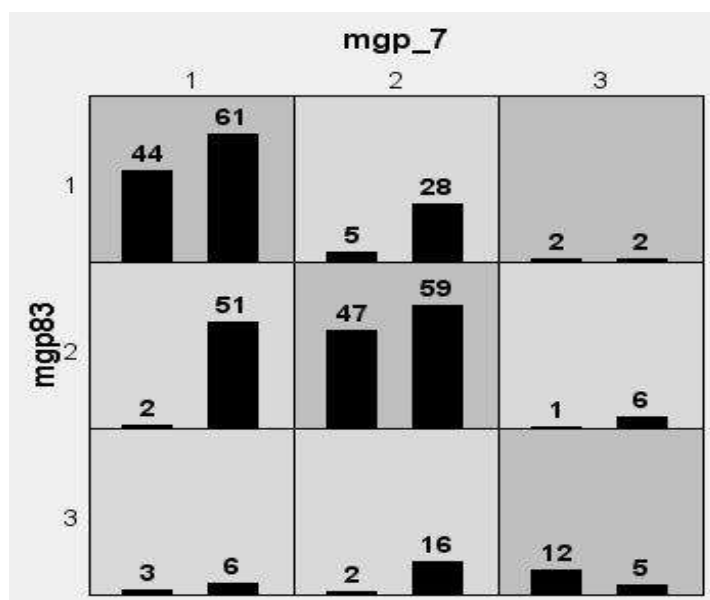


Рисунок 5.6 – Відображення комбінації генотипів за G-7A та Thr83Ala поліморфізмами, пов'язаних із високим і низьким рівнями ризику ГКС. Лівий стовпчик у межах кожної клітинки відображає кількість випадків, правий стовпчик – кількість контролю. Темно-сірі клітинки відповідають високому ризику, а світло-сірі – низькому ризику розвитку ГКС

Виявлено, що збіг генотипів в обох SNP асоціюється з високим ризиком розвитку ГКС. Привертає увагу той факт, що навіть збіг двох гомозигот за основним алелем призводить до значного збільшення ризику розвитку ГКС.

Також методом MDR встановлено, що найбільша частка ентропії (найбільший незалежний ефект) по відношенню до статусу «випадок-контроль» пов'язана з локусами G-7A та T2255C і дорівнює 1,26 %, 1,33 % відповідно (рис. 5.7). При цьому аналіз міжгенних взаємодій виявив, що найбільша фенотипова ентропія припадає на взаємодію локусів G-7A і Thr83Ala та становить 8 %, що демонструє виражений синергічний ефект обох поліморфізмів і вкотре доводить, що G-7A є найважливішим предиктором розвитку ГКС. Також синергія

спостерігається і між TaqI та BsmI поліморфізмами (5,66 %), хоча вони не були включені в склад найінформативнішої класифікаційної моделі.

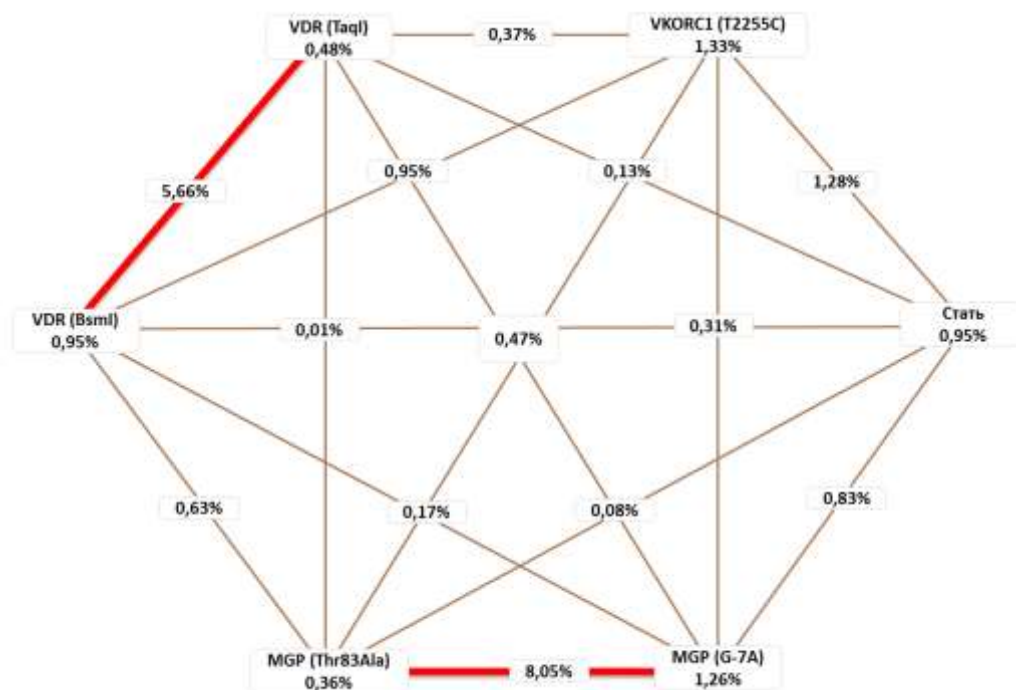


Рисунок 5.7 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжгенної взаємодії методом MDR при ГКС. Червоним позначена синергічна взаємодія, коричневим – відсутність взаємодії

Усі інші поліморфізми виявляють головні незалежні ефекти. Насамкінець, ми застосували пермутаційні (рандомізовані) тести, які показали, що отримана двокомпонентна модель є статистично значимою на рівні $p < 0,05$.

З метою підтвердження результатів MDR нами була змодельована взаємодія між G-7A та Thr83Ala поліморфізмами гена MGP за допомогою бінарної логістичної регресії (табл. 5.40).

Таблиця 5.40 – Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за G-7A та Thr83Ala поліморфізмами гена MGP

	<i>CR</i>	<i>SE</i>	<i>WS</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i> для <i>OR</i>	95% <i>CI</i> для <i>OR</i>
						нижній	верхній
Thr83Ala&G/A	0,744	0,251	8,820	0,003	2,105	1,288	3,441
Thr83Ala&A/A	0,820	1,091	0,564	0,453	0,440	0,052	3,741
Ala83Ala&G/A	1,108	0,766	2,089	0,148	0,330	0,074	1,483
Ala83Ala&A/A	1,847	0,555	11,082	0,001	6,343	2,138	18,821

Примітка: *CR* – коефіцієнт регресії; *SE* – стандартна похибка; *WS* – статистика Вальда; *P* – статистична значимість; *OR* – відношення ризику; *CI* – довірчий інтервал

Аналіз результатів виявив, що дві гетерозиготи, дві гомозиготи за мінорним алелем та гомозиготи за основним алелем асоційовані з ризиком розвитку захворювання. При цьому гетерозиготи підвищують цей ризик у 2,1, а гомозиготи за мінорним алелем – у 6,3 раза.

Аналізуючи ROC-криву, яка характеризує співвідношення між чутливістю та специфічністю моделі, з'ясуємо, що площа під кривою (*Area under the curve, AUC*) дорівнює 63 %, Це підтверджує гарну прогностичну значимість створеної моделі (рис. 5.8).

Щоб дати відповідь на запитання, чому метод MDR вибрав за найкращу двокомпонентну модель, а Random Forest показав більшу кількість предикторів, нами була побудована модель за допомогою методу “Random Forest”, яка містила лише G-7A і Thr83Ala поліморфізми гена MGP. При цьому прогностична здатність моделі не змінилася.

Ми мали ті самі 68 %, які отримали під час аналізу всіх 10 локусів. Це свідчить про те, що статистично значимим є дійсно локуси G-7A та Thr83Ala. Усі інші предиктори праворуч від пунктирної лінії – важливі, проте не досягають рівня статистичної значимості для того, щоб істотно впливати на класифікаційну здатність моделі.

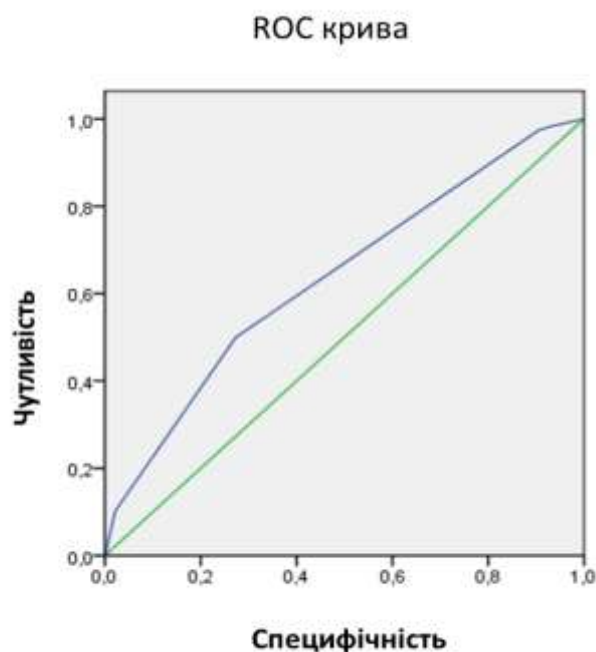


Рисунок 5.8 – Графічне зображення співвідношення між чутливістю та специфічністю за допомогою ROC-кривої (ROC – receiver operational characteristic, операційна характеристика приймача)

З метою поглибленого дослідження поєднаного впливу поліморфних варіантів окреслених у роботі генів на розвиток ГКС нами був проведений аналіз за допомогою методу MDR серед осіб різної статі. Таким чином, з'ясувалося, що у жінок найкраща двокомпонентна модель містила G-7A поліморфізм гена MGP та FokI поліморфізм гена VDR. Але ця модель мала Testing Balanced Accuracy всього лише 54 % з крос-перевірочною здатністю

8/10, що свідчить про її доволі слабку класифікаційну здатність. Проте з'ясувалося, що на відміну від даних, отриманих для загальної вибірки, серед жінок виражений синергізм мають G-7A та FokI (4,52 %), а також T2255C і FokI поліморфізми (1,89 %) (рис. 5.9). Однак пермутаційні тести показали, що ця модель не досягає рівня статистичної значимості ($P > 0,05$).

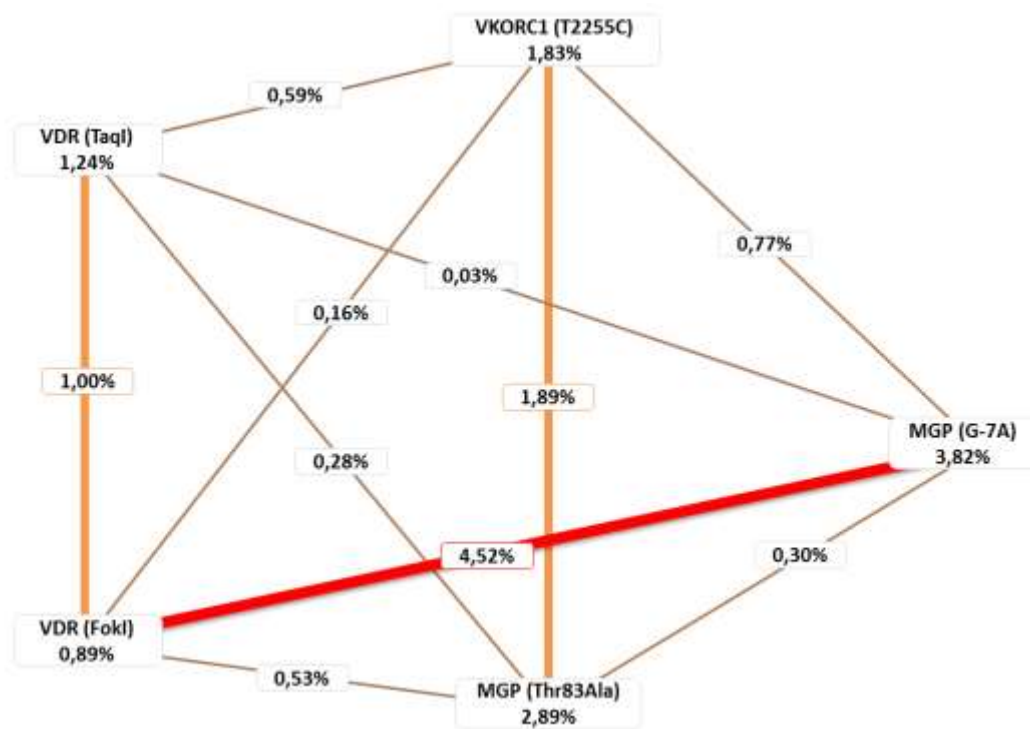


Рисунок 5.9 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжгенної взаємодії методом MDR при ГКС серед осіб жіночої статі. Червоним і оранжевим позначена синергічна взаємодія, коричневим – відсутність взаємодії

Аналіз даних серед чоловіків показав, що, як і для загальної вибірки, до найінформативнішої двокомпонентної моделі увійшли G-7A та Thr83Ala поліморфізми гена матричного Gla-протеїну. Класифікаційна здатність, порівняно з даними для обох статей підвищилася на 6 % і становила 69 %. Крос-перевірочна здатність також зросла і становила 10/10. Посилився також і ступінь синергізму між локусами G-7A та Thr83Ala (рис. 5.10). Наразі він досяг

рівня 12, 22%. Проведення рандомізованих тестів виявило, що зазначена модель серед осіб чоловічої статі досягає рівня статистичної значимості ($P < 0,05$)

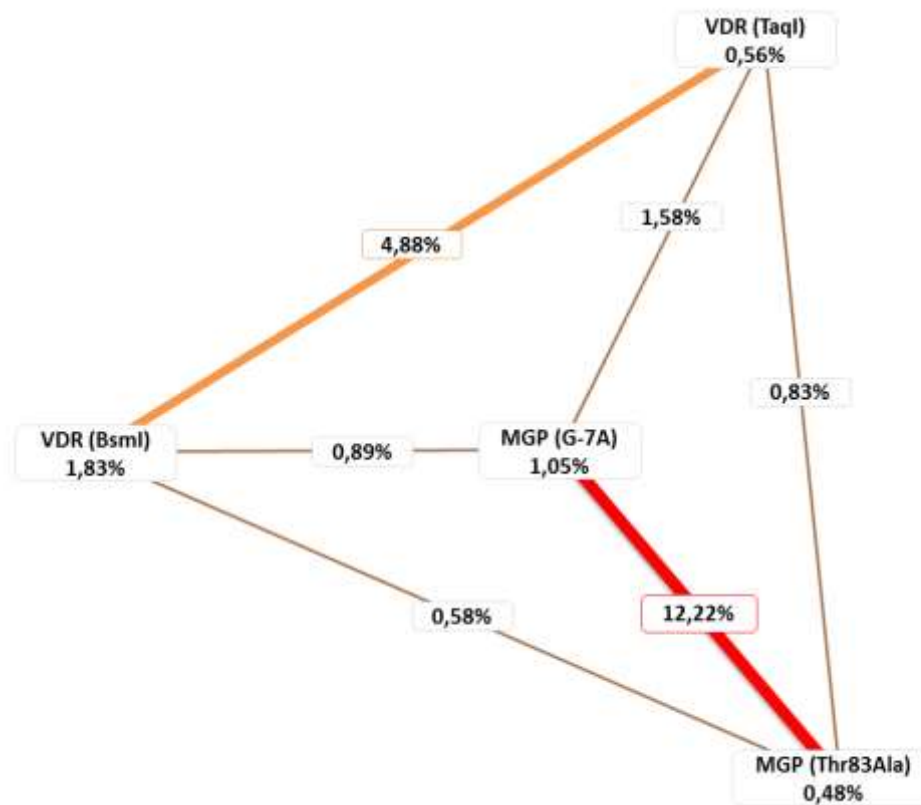


Рисунок 5.10 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжгенної взаємодії методом MDR при ГКС серед осіб чоловічої статі. Червоним і оранжевим позначена синергічна взаємодія, коричневим – відсутність взаємодії

Таким чином, аналізуючи роль алельного поліморфізму генів системи MGP у розвитку ГКС, можна зробити такі висновки:

1. Існує зв'язок між ГКС і поліморфними варіантами генів MGP (G-7A), VDR (BsmI), GGCX (Arg325Gln) і VKORC1 (T2255C). Так, ризик розвитку ГКС у носіїв мінорного алеля А/А (G-7A поліморфізм) у 2,8; В/В (BsmI поліморфізм)

у 2,1; Gln/Gln (Arg325Gln поліморфізм) і C/C (T2255C поліморфізм) удвічі більший, ніж у носіїв основних алелів.

2. Аналіз взаємодії між вивченими поліморфізмами з використанням методів математичного моделювання дозволив установити якісні та кількісні відмінності впливу генів системи MGP на розвиток ГКС. Найкращою класифікаційною моделлю визнана двокомпонентна модель, що містить поліморфізми G-7A і Thr83Ala гена MGP (прогностична здатність 63 % за методом MDR і 68 % за методом “Random forest”). Збіг в однієї особи подібних за спрямованістю варіантів генотипів за вказаними поліморфізмами асоціюється з високим ризиком розвитку ГКС: у гетерозигот він підвищується у 2,1, а у гомозигот за мінорним алелем – у 6,3 раза. Фенотипова ентропія взаємодії G-7A і Thr83Ala локусів становить 8 %, що підтверджує виражений синергічний ефект обох SNP.

3. Залежність між генотипом і ГКС має статеві особливості. Особи жіночої статі, гомозиготні за мінорним алелем A/A (поліморфізм G-7A гена MGP), у 5,6 раза частіше хворіють на ГКС, ніж жінки-носії основного алеля (G/A і G/G). У чоловіків, носіїв B/B генотипу (поліморфізм BsmI гена VDR), ризик ГКС у 2,7 раза більший, ніж у представників генотипу b/b. Найкращою класифікаційною моделлю визнана модель, що містить поліморфізми G-7A і Thr83Ala гена MGP (прогностична здатність 69 % за методом MDR). Фенотипова ентропія взаємодії зазначених локусів вища, ніж загалом у вибірці, і становить 12,22 %.

4. Виявлена асоціація досліджених поліморфізмів із факторами ризику гострого коронарного синдрому:

- ГКС виникає частіше в осіб із $IMT \geq 25$ кг/м², що мають генотип A/A (поліморфізм G-7A гена MGP) та у пацієнтів з $IMT < 25$ кг/м² із генотипом B/B (поліморфізм BsmI гена VDR), ніж у представників інших генотипів. У представників генотипу C/C (поліморфізм T2255C гена VKORC1) ризик ГКС майже в 4 рази більший, ніж у гомозигот за основним алелем (T/T);

- існує асоціація між G-7A поліморфізмом гена MGP і розвитком ГКС в осіб із підвищеним АТ: у гомозигот за мінорним алелем (A/A) з артеріальною гіпертензією частіше розвивається ГКС, ніж у носіїв інших генотипів. Ризик ГКС у 3,3 раза більший в осіб із підвищеним артеріальним тиском, що є гомозиготами за мінорним алелем за поліморфізмом Arg325Gln гена GGCX, у 2,9 раза у носіїв мінорного алеля за поліморфізмом T2255C гена VKORC1 і на 48 % у гетерозигот Ser/Ala за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2, ніж у гомозигот за основним алелем;

- виявлений вплив поліморфізмів G-7A гена MGP і BsmI гена VDR на розвиток ГКС в осіб, які не палять: у гомозигот за мінорним алелем (A/A і B/B) ризик виникнення ГКС більший;

- встановлений зв'язок поліморфних варіантів генів GGCX і VKORC1 з розвитком гострого коронарного синдрому в осіб, які мають стресову професію. Так, ризик ГКС у 4,5 раза більший у гомозигот за мінорним алелем Gln/Gln і в 4 рази більший у носіїв C/C генотипу, ніж у гомозигот за основним алелем.

5. Існує зв'язок алельних варіантів гена MGP за поліморфізмом T-138C із клінічними варіантами ГКС: у гомозигот T/T і C/C частіше виникає ангінозна форма ГКС. Виявлена асоціація між поліморфізмом FokI гена VDR і Arg325Gln гена GGCX та розвитком ускладнень: гомозиготи за мінорним алелем (f/f) і за основним алелем (Arg/Arg) частіше мають ускладнення, ніж носії інших генотипів. Такий зв'язок із розвитком ускладнень ГКС підтвердився за FokI поліморфізмом для пацієнтів чоловічої статі, хворих із $IMT \geq 25$ кг/м², пацієнтів без артеріальної гіпертензії, цукрового діабету та ожиріння, а за Arg325Gln поліморфізмом для пацієнтів з $IMT \geq 25$ кг/м², хворих із дисліпопротеїнемією атерогенного характеру та артеріальною гіпертензією.

5.5 Комплексний вплив поліморфізмів генів системи MGP на розвиток ішемічного інсульту

Першим кроком в алгоритмі аналізу даних стосовно поєданого впливу генетичних факторів на розвиток ішемічного інсульту атеротромботичного генезу був використаний метод “Random Forest”, що дозволив виявити рівень важливості досліджуваних предикторів та їх здатність прогнозувати ризик розвитку хвороби. На рис. 5.11 показано, що найбільш важливим серед усіх прогностичних факторів згідно з даним методом, є T2255C поліморфізм гена VKORC1, а G-7A поліморфізм посідає другу сходинку. Усі інші досліджувані SNP не чинять істотного впливу на розвиток ІАТІ.

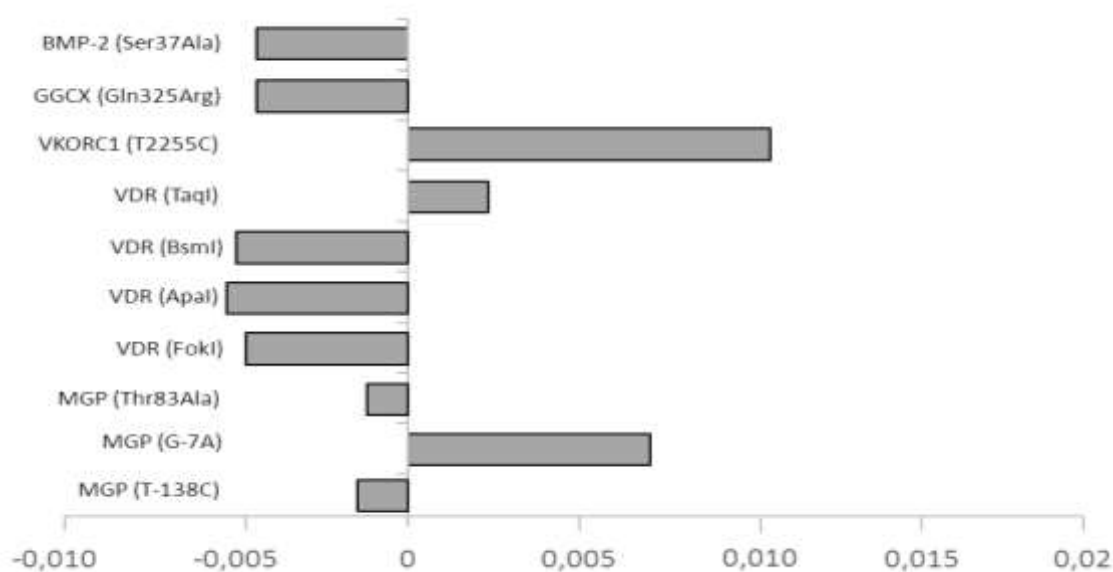


Рисунок 5.11 – Предиктори розвитку ІАТІ за рівнем їх значимості (метод “Random Forest”)

Після побудови «випадкового лісу» був застосований метод фільтрації «шуму» з метою підтвердження попереднього аналізу. Він також виявив, що

T2255C поліморфізм гена VKORC1 та G-7A поліморфізм гена MGP є статистично значимими предикторами розвитку ІАТІ (рис. 5.12).

Усі інші поліморфні варіанти досліджуваних нами генів лишилися по лівий бік від пунктирної лінії (BsmI, TaqI, Thr83Ala, Gln325Arg, ApaI, T-138C, Ser37Ala, FokI T2255C). Таким чином, для подальшого дослідження ми обрали два поліморфізми T2255C та G-7A і створили на їх основі класифікаційну модель. Остання мала прогностичну здатність 76% на навчальній вибірці, але лише 51 % – на тестованій, що свідчить про слабку прогностичну здатність створеної моделі.

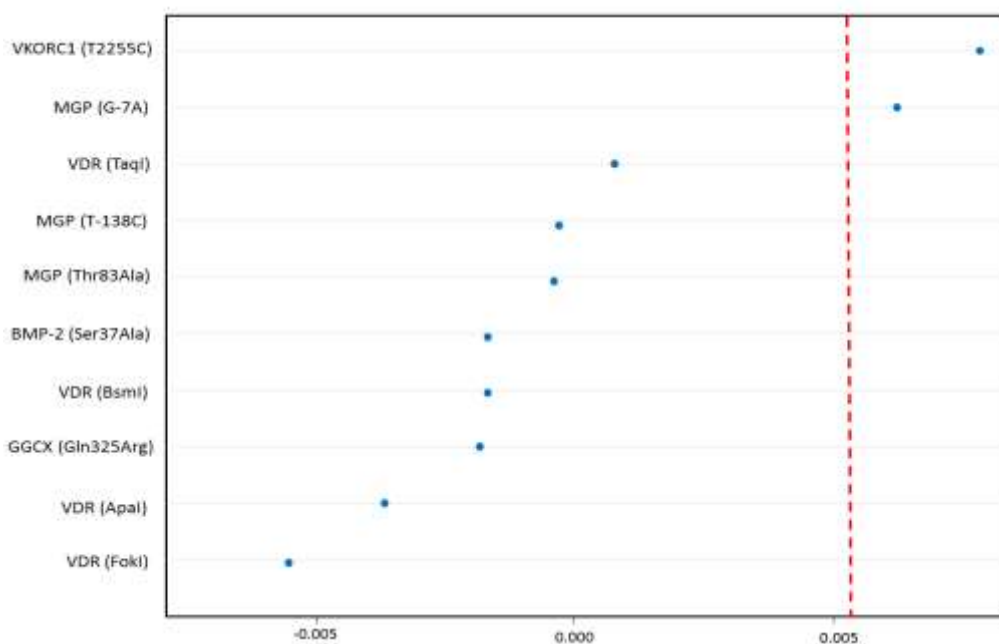


Рисунок 5.12 – Результати методу фільтрації «шумів». Важливі предиктори розміщені праворуч від пунктирної лінії

На наступному етапі ми провели моделювання взаємодії поліморфних варіантів досліджуваних генів методом мультифакторної просторової редукції. Цей метод виявив комбінації поліморфних локусів, що мають найбільшу

патогенетичну значимість розвитку ІАТІ. Найкращою з наведених виявилася дволокусна модель G-7A&T2255C, що має класифікаційну здатність 58% з крос-перевірочною здатністю 10/10. Таким чином, метод MDR найважливішими визначив ті самі предиктори, що і метод “Random Forest”. Обидва методи показали слабку класифікаційну здатність створеної моделі.

На рис. 5.13 відображена комбінація генотипів за G-7A та T2255C поліморфізмами генів MGP та VKORC1. У разі збігу T/C і G/G, C/C і G/A генотипів, а також A/A генотипу (G-7A поліморфізм) із будь-яким з генотипів за T2255C поліморфізмом ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту зростає.

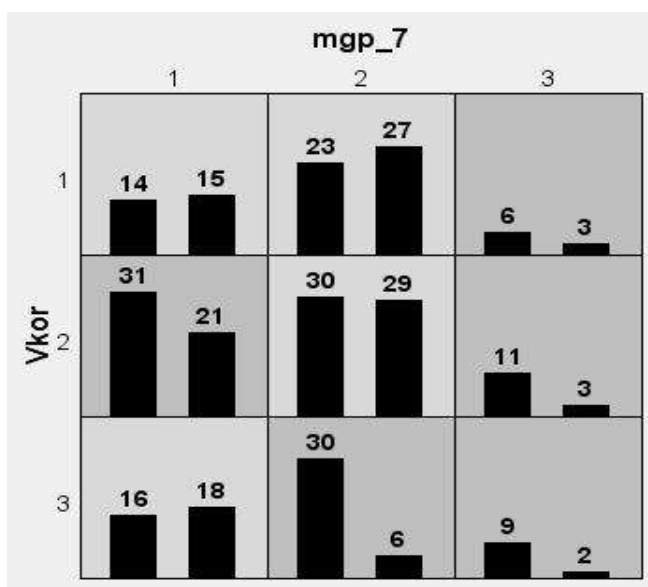


Рисунок 5.13 – Комбінації генотипів за G-7A та T2255C поліморфізмами, пов'язані з високим і з низьким рівнями ризику ІАТІ. Лівий стовпчик у межах кожної клітинки відображає кількість випадків, правий стовпчик – кількість контролю. Темно-сірі клітинки відповідають високому ризику, а світло-сірі – низькому ризику розвитку ІАТІ

Методом MDR встановлено, що найбільша частка ентропії стосовно до статусу «випадок-контроль» пов'язана з G-7A та T2255C поліморфними сайтами і дорівнює 1,54 % та 1,55 % відповідно (рис. 5.14).

Проте аналіз міжгенних взаємодій виявив, що синергічний ефект даних локусів хоча і наявний, але виражений слабо (0,80 %). Характер та сила взаємодії між іншими предикторами є ще менш значними та важливими. Насамкінець нами були проведені пермутаційні тести, які не виявили статистичної значимість створеної моделі для ІАТІ ($p > 0,05$). Отже, результати проведених аналізів показали, що важливими предикторами ІАТІ є поліморфізми G-7A (ген MGP) та T2255C (ген VKORC1). Проте створені на їх основі класифікаційні моделі виявили слабку прогностичну здатність. Подальша обробка даних із використанням бінарної логістичної регресії є в цьому разі недоцільною, оскільки застосовується лише з метою підтвердження результатів MDR-аналізу і є, порівняно з останнім, більш слабким методом.

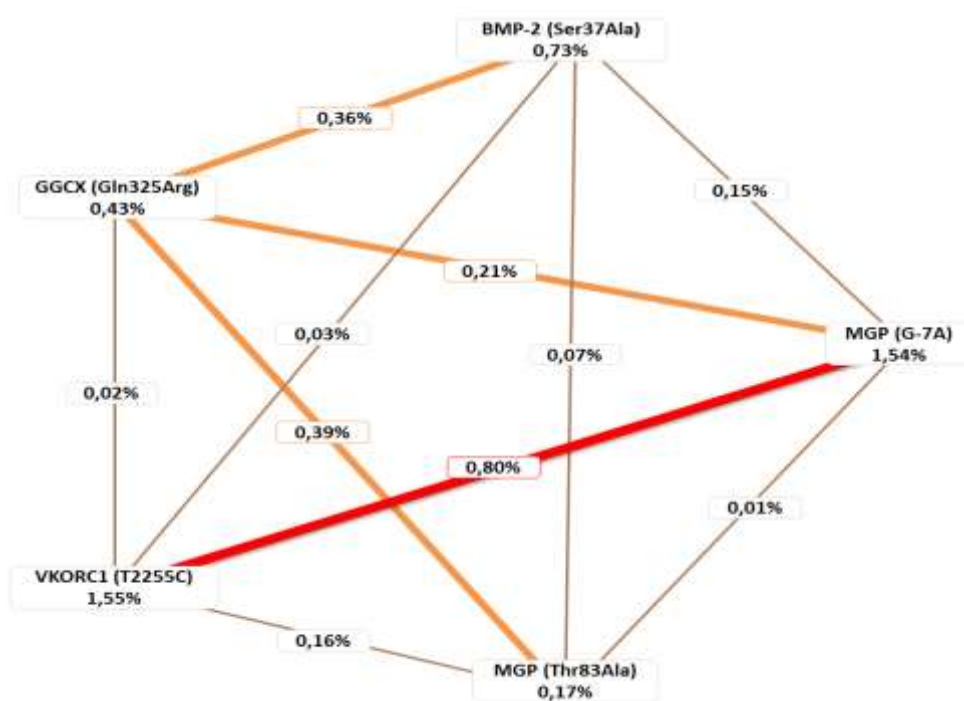


Рисунок 5.14 – Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжгенної взаємодії методом MDR при ІАТІ. Червоним і оранжевим позначена синергічна взаємодія, коричневим – відсутність взаємодії

Таким чином, ми не можемо стверджувати, що зазначені поліморфні сайти не є важливими, а лише те, що за даних умов експерименту нам не

вдалося виявити статистично значиму асоціацію між поєднаним впливом цих SNP та ризиком розвитку ішемічного інсульту.

Таким чином, досліджуючи зв'язок поліморфізму генів системи MGP з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту, можна зробити такі висновки:

6. Існує зв'язок між ішемічним атеротромботичним інсультом і поліморфними варіантами генів MGP (G-7A) та VKORC1 (T2255C). Так, у носіїв мінорних алелів A/A (G-7A поліморфізм) і C/C (T2255C поліморфізм) ризик розвитку ІАТІ відповідно у 2,6 і 2,2 раза більший, ніж у носіїв основних алелів.

7. Залежність між генотипом і ІАТІ має статеві особливості. Особи жіночої статі гомозиготні за мінорним алелем A/A (поліморфізм G-7A гена MGP), у 6,6 раза частіше хворіють на ІАТІ, ніж жінки-носії основного алеля (G/A і G/G). У чоловіків, носіїв C/C генотипу (поліморфізм T2255C гена VKORC1), ризик ІАТІ у 2,5 раза більший, ніж у представників генотипу T/T.

8. Виявлена асоціація досліджених поліморфізмів з факторами ризику ішемічного інсульту:

- у представників генотипу C/C (поліморфізм T2255C гена VKORC1) з $IMT < 25 \text{ кг/м}^2$ ризик ІАТІ майже у 4 рази більший, ніж у гомозигот за основним алелем (T/T);

- існує асоціація між BsmI-ApaI-TaqI гаплотипом гена VDR і розвитком ІАТІ в осіб із підвищеним АТ: у власників baT гаплотипу, що мають артеріальну гіпертензію, частіше розвивається ішемічний інсульт, ніж у носіїв інших гаплотипів. Ризик ІАТІ у 3,2 раза більший у осіб із нормальним артеріальним тиском, які є гетерозиготами F/f за Fok поліморфізмом гена VDR, і у 5 разів у носіїв мінорного алеля Gln/Gln за поліморфізмом Arg325Gln гена GGCX, ніж у гомозигот за основним алелем. У гетерозиготних жінок (Thr/Ala) за поліморфізмом Thr83Ala гена MGP з ІАТІ ймовірність артеріальної гіпертензії у 5 разів вища, ніж у гомозигот за основним алелем;

- виявлений вплив поліморфізмів G-7A гена MGP і T2255C гена VKORC1 на розвиток ішемічного інсульту в осіб, які не палять: у гомозигот за мінорним алелем (A/A і C/C) ризик виникнення ІАТІ більший;

- серед представників Arg/Arg генотипу за поліморфізмом Arg325Gln гена GGCX, хворих на ІАТІ і які мають підвищений артеріальний тиск, ожиріння розвивається частіше, ніж у носіїв інших генотипів. Носії генотипу C/C за поліморфізмом T2255C гена VKORC1, що не мають ожиріння, у 2,6 раза частіше хворіють на ІАТІ, ніж представники T/T генотипу.

9. Існує зв'язок алельних варіантів генів GGCX за поліморфізмом Arg325Gln і VKORC1 за поліморфізмом T2255C із повторними випадками інсульту. У гомозигот за мінорним алелем Gln/Gln жіночої статі повторний інсульт розвивається частіше, ніж у носіїв інших генотипів. Серед носіїв Gln/Gln генотипу із цукровим діабетом ризик повторного інсульту більший, ніж серед носіїв інших генотипів. У гомозигот за основним алелем (T/T) гена VKORC1 ймовірність повторних випадків інсульту більша, ніж у представників інших генотипів. Зв'язок T2255C поліморфізму гена VKORC1 із частотою повторних випадків інсульту був підтверджений для більшості факторів ризику ІАТІ. Так, у носіїв TT генотипу чоловічої статі, пацієнтів з артеріальною гіпертензією, з ІМТ < 25 кг/м², без ознак гіперкоагуляції крові, з порушенням ліпідного складу плазми крові, осіб без ожиріння і без цукрового ризик повторних інсультів більший, ніж у носіїв інших генотипів.

ВИСНОВКИ

1. Уперше на сучасному методичному рівні отримана інформація про розподіл різних алельних варіантів генів *TNAP*, *BMP2* у практично здорових представників української популяції.

2. Алельний поліморфізм генів інгібіторів та активаторів ектопічної кальцифікації є важливим чинником спадкової схильності до розвитку склеротичних уражень артеріальних судин та їх ускладнень. Існує зв'язок між гострим коронарним синдромом та поліморфним варіантом гена *TNAP* (A69314G). Ризик ГКС у носіїв мінорного алеля для A69314G поліморфізму у 2,2 ($P = 0,013$; $OR = 2,244$), ніж у гомозигот за основним алелем.

3. Доведено, що вплив A69314G поліморфізму гена *TNAP* на розвиток гострого коронарного синдрому має статеві особливості. Ризик виникнення ГКС в осіб чоловічої статі з A/G + G/G генотипом за A69314G поліморфізмом гена *TNAP* у 2,19 рази вищий, ніж в осіб із A/A генотипом ($P = 0,039$; $OR = 2,187$). Встановлено асоціацію досліджуваного поліморфізму з надмірною вагою та палінням. Так, ризик виникнення ГКС у носіїв мінорного алеля A/G + G/G з $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$ у 2,9 рази ($P = 0,007$; $OR = 2,861$), а у курців майже у 3,4 рази ($P = 0,045$; $OR = 3,393$) вищий, ніж у гомозигот за основним алелем A/A.

4. Аналіз взаємодії між вивченими поліморфізмами дозволив створити класифікаційні моделі, кращою з яких визнано двокомпонентну модель, яка включає поліморфізми G-7A і Thr83Ala гена *MGP* (прогностична здатність 63 % за методом MDR і 68 % – за методом “Random forest”). Збіг в однієї особи подібних за спрямованістю варіантів генотипів за зазначеними поліморфізмами асоціюється зі збільшенням ризику ГКС: у гетерозигот за обома поліморфізмами він підвищується у 2,1 рази, а в гомозигот за мінорними

алелями – у 6,3 раза. Фенотипова ентропія взаємодії G-7A і Thr83Ala локусів становить 8 %, що підтверджує виражений синергічний ефект обох поліморфізмів.

5. Функціональний стан природних антикальциногенних механізмів і поліморфізм генів системи MGP мають стосунок до виникнення склеротичних уражень артеріальних судин і розвитку тяжких їх ускладнень (ГКС, ІАТІ). Деякі варіанти поліморфізму генів цієї системи можуть вважатися генетичними чинниками серцево-судинної патології, що впливають як на механізми розвитку патологічних процесів, так і на фактори їх ризику.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

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. Alexopoulos N. Calcification in atherosclerosis / N. Alexopoulos, P. Raggi // *Nat. Rev. Cardiol*. – 2009. – Vol. 6. – P. 681–688.

19. Erbel R. Clinical significance of coronary calcification / R. Erbel, A. Schmermund // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol.24. – P. 172.
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. Proudfoot D. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein / D. Proudfoot, C.M. Shanahan // *Nephrology (Carlton).* – 2006. – Vol.11. – P. 455–461.
22. T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm / U. Schonbeck, G.K. Sukhova, N. Gerdes [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol.161. – P. 499–506.
23. Demer L.L. Mineral exploration: search for the mechanism of vascular calcification and beyond. The 2003 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture / L.L. Demer, Y. Tintut // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – Vol.23. – P. 1739–1743
24. Abedin M. Vascular calcification. Mechanisms and clinical ramifications / M. Abedin, Y. Tintut, L. Demer // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol.24. – P. 1161–1170.
25. Хижня Я.В. Роль загальних і місцевих чинників у розвитку кальцифікації артеріальної стінки, зумовленої гіпервітамінозом D : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.04 «Патологічна фізіологія» / Я.В. Хижня. – Харків, 2011. – 20 с.
26. Чернишова Т.І. Аналіз причин порушення мозкового кровообігу у молодих / Т.І. Чернишова // *Український вісник психоневрології.* – 2002. – №1. – С. 145–146.
27. 1,25-Dihydroxyvitamin D and coronary microvascular function / S. Capitanio, J. Sambuceti, M. Giusti [et al.] // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2012. – №14. – P. 657–661.
28. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism / C.

- Henley, M. Colloton, R.C. Cattley [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2005. – Vol.20. – P. 1370–1377.
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. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4₊T cells to enhance the development of Th2 cells / A. Boonstra, F. Barrat, C. Crain [et al.] // *J. Immunol.* – 2001. – Vol.167. – P. 4974–4980.
31. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide / S. Jono, Y. Nishizawa, A. Shioi [et al.] // *Circulation.* – 1998. – Vol.98. – P.1302–1306.
32. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase / M. Rebsamen, J. Sun, A. Norman [et al.] // *Circ Res.* – 2002. – Vol. 91. – P. 17–24.
33. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits angiogenesis in vitro and in vivo / D. Mantell, P. Owens, N. Bundred [et al.] // *Circ. Res.* – 2000. – Vol.87. – P. 214–220.
34. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the rennin-angiotensin system / C.Y. Li, J.Kong, M. Wei [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol.110, №2. – P. 229–238.
35. 1,25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds / D.Somjen, Y.Weisman, F.Kohen [et al.] // *Circulation.* – 2005. – №111. – P. 1666–1671.
36. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines / S.A.Hunt, W.T.Abraham, M.H.Chin [et al.] // *Circulation.* – 2009. – Vol.119. – P. 391–479.

37. A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis / R. Shroff, M. Egerton, M. Bridel [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – Vol.19, №6. – P. 1239–1246.
38. A C1173T Dimorphism in the VKORC1 Gene Determines Coumarin Sensitivity and Bleeding Risk / P. H. Reitsma, J. F. Heijden, A. P. Groot [et al.] // *PLoS Med.* – 2005. – Vol.2. – P. 312–316.
39. A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin-K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Gln) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women / H. Kinoshita, K. Nakagawa, K. Narusawa [et al.] // *Bone.* – 2007. – Vol.40. – P. 451–456.
40. A negative vitamin D response DNA element in the human parathyroid hormone-related peptide gene binds to vitamin D receptor along with Ku antigen to mediate negative gene regulation by vitamin D / T. Nishishita, T. Okazaki, T. Ishikawa [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol.273. – P. 10901–10907.
41. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity / H. Yuan, J. Chen, M. Lee [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2005. – Vol.14. – P. 1745–1751.
42. A Polymorphism of the human matrix γ -carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels / A. Farzaneh-Far, J. D. Davies, L. A. Braam [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol.276. – P. 32466–32473.
43. A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase / J. K. Tie, S. M. Wu, D. Y. Jin [et al.] // *Blood.* – 2000. – Vol.96. – P. 973–978.
44. Abedin M. Vascular calcification. Mechanisms and clinical ramifications / M. Abedin, Y. Tintut, L. Demer // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol.24. – P. 1161–1170.
45. Abnormal hemorheology, endothelial dysfunction and thrombogenesis in relation to hypertension in acute (ictus <12 h) stroke patients: The West Birmingham

- Stroke Project / G. Y.Lip, A. D.Blann,I. S. Faroqi [et al.] // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2001. – Vol.12. – P. 307–315.
- 46.Abnormalities of development and hemostasis in gammacarboxylase deficient mice / A. Zhu, R. Raymond, X. Zheng [et al.] // Blood. – 1998. – Vol.92. – P. 152–156.
- 47.Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice / Y. Hu, Z. Zhang, E. Torsney [et al.] // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol.113. – P. 1258–1265.
- 48.ACC/AHA guidelinesfor the management of patients with unstable angina and non ST-elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the american college of cardiology / E. Braunwald, E.M. Antman, N.H. Brooks [et al.] // American Heart Association task force on practice guidelines (committee on management of patients with unstable angina) // Circulation. – 2000. – Vol.102. – P.1193–1209.
- 49.Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification / K.E. Watson, M.L. Abrolat, L.L. Malone [et al.] // Circulation. – 1997. – Vol. 96, №6. – P. 1755–1760.
- 50.Adams J. S. Gains in bone mineral density with resolution of vitamin D intoxicification / J. S. Adams, G. Lee // Ann. Int. Med. – 1997. – Vol.127, № 3. – P. 203–206.
- 51.Additive effects of the chemokine receptor 2, vitamin D receptor, interleukin–6 polymorphisms and cardiovascular risk factors on the prevalence of myocardial infarction in patients below 65 years / J.R.Ortlepp, C.Krantz, M.Kimmel [et al.] // Int. J. Cardiol. – 2005. – Vol.105, №1. – P. 90–95.
- 52.Alan J. Flint. Obesity and cardiovascular disease risk among the young and old— is BMI the wrong benchmark /Flint J. Alan, Rimm B. Eric // Int. J. Epidemiol. – 2006. – Vol.35, №1. – P. 187–189.
- 53.Alison A.M. Ritchie. Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene – gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies / A.M.Alison, D. Marylyn // Human genomics. – 2006. – Vol.2, №5. – P. 318–328.

54. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics – 2009 Update. A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee / D.Lloyd-Jones, R.Adams, M.Carnethon [et al.] // *Circulation*. – 2009. – Vol.119, №3 – P. 480–486.
55. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics – 2011 Update. A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee / D.Lloyd-Jones, R.Adams, M.Carnethon [et al.] // *Circulation*. – 2011. – Vol.129. №5. – P. 567–573.
56. An Evolutionary and Molecular Analysis of Bmp2 Expression/ L.A. Kevin, X. Junwang, N.S. Celine [et al.] // *The journal of biological chemistry*. – 2004. – Vol.279, №16. – P. 15916–15928.
57. Anderson H. C. Matrix vesicles and calcification / H. C. Anderson // *Curr. Rheumatol. Rep.* – 2003. – Vol.5. – P. 222–226.
58. Andress D. L. Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation / D. L. Andress // *Drugs*. – 2007. – Vol.6. – P. 1999–2012.
59. Antiproliferative actions of vitamin D / T. Ylikomi, I. Laaksi, Y. R. Lou [et al.] // *Vitam. Horm.* – 2002. – Vol.64. – P. 357–406.
60. ApaI dimorphism at the human vitamin-D receptor gene locus / J.H.Faraco, N.A.Morrison, A.Baker [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol.17, №5. – P. 2150.
61. Are human vitamin D receptor polymorphisms functionally significant? In: *Vitamin D Endocrine System, Structural, Biological, Genetic and Clinical Aspects* / A.W.Norman, R.Bouillon, M. Thomasset [et al.] // University of California. – 2000. – P. 817–823.
62. Arterial Calcification: A Review of Mechanisms, Animal Models, and the Prospects for Therapy / R. Wallin, N. Wajih, G.T. Greenwood [et al.] // *Med. Res. Rev.* – 2001. – Vol.21, №4. – P. 274–301.

63. Articular-cartilage matrix gamma-carboxyglutamic acid-containing protein. Characterization and immunolocalization / R. Loeser, C.S. Carlson, H. Tulli [et al.] // *Biochem. J.* – 1992. – Vol. 282. – P. 1–6.
64. Assay for human matrix Gla protein in serum: potential applications in the cardiovascular field / L.A. Braam, P. Dissel, B.L. Gijssbers [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20, №5. – P. 1257–1261.
65. Association between two polymorphisms of the bone morphogenetic protein-2 gene with genetic susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine and its severity / H. Wang, Z. Yang, D. Liu [et al.] // *Clin. Med. J.* – 2008. – Vol. 121. – P. 1806–1810.
66. Association of bone morphogenetic protein-2 gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity in Chinese patients / H. Wang, D. Liu, Z. Yang [et al.] // *Eur. Spine J.* – 2008. – Vol. 17. – P. 956–964.
67. Association of Bone Morphogenetic Proteins With Otosclerosis / I. Schrauwen, M. Thys, K. Vanderstraeten [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2008. – Vol. 23. – P. 507–516.
68. Association of inflammatory gene polymorphisms with ischemic stroke in a Chinese Han population / N. Zhao, X. Liu, Y. Wang [et al.] // *Journal of Neuroinflammation.* – 2012. – Vol. 9. – P. 162–169.
69. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity / E. Shikata, I. Ieiri, S. Ishiguro [et al.] // *Blood.* – 2004. – Vol. 103. – P. 2630–2635.
70. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor / S.A. Ingles, R.K. Ross, M.C. Yu [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1997. – Vol. 89, №2. – P. 166–170.
71. Association of serum phosphorus and calcium phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study / G. A. Block, T. E.

- Hulbert-Shearon, N. W. Levin [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 1998. – Vol.31. – P. 607–617.
72. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis / A.M.Valdes, D.J.Hart, K.A.Jones [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol.50, №8. – P. 2497–2507.
73. Associations of blood pressure and hypertension with lead dose measures and polymorphisms in the vitamin D receptor and delta-aminolevulinic acid dehydratase genes / B.K.Lee, G.S.Lee, W.F.Stewart [et al.] // *Environ Health Perspect.* – 2001. – Vol.109, №4. – P. 383–389.
74. At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene / U.Strahle, A.Schmidt, G. Kelsy [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol.89. – P. 6731–6735.
75. Reddi A.H. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens / A.H.Reddi, A.Reddi // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – Vol.20. – P. 341–342.
76. Hruska K.A. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification / K.A. Hruska, S. Mathew, G. Saab // *Circ. Res.* – 2005. – Vol.97. – P. 105–114.
77. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice / D.A. Towler, M. Bidder, T. Latifi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol.273. – P. 30427–30434.
78. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients / F.Parhami, A.D.Morrow, J.Balucan [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol.17. – P. 680–687.
79. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes / N. Fukui, Y. Zhu, W.J. Maloney [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 2003. – Vol.85. – P. 59–66.
80. Urist M.R. Bone: formation by autoinduction / M.R. Urist // *Science.* – 1965. – Vol.150. – P. 893–899.

81. Urist M.R. Bone morphogenetic protein / M.R. Urist, B.S. Strates // *J. Dental. Res.* – 1971. – Vol.50, №6. – P. 1392–1406.
82. Posttranslational Activation of Bone Morphogenetic Protein 2 Is Mediated by Proprotein Convertase 6 during Decidualization for Pregnancy Establishment / S. Heng, S. Paule, B. Hardman [et al.] // *Endocrinology.* – 2010. – Vol.151, №8. – P. 3909–3917.
83. Expression and characterization of bone morphogenetic protein–2 in Chinese hamster ovary cells / D.I. Israel, J. Nove, K.M. Kerns [et al.] // *Growth Factors.* – 1992. – Vol.7. – P. 139–150.
84. Scheufler C. Crystal Structure of Human Bone Morphogenetic Protein-2 at 2.7 Å Resolution / C. Scheufler, W. Sebald, M. Hulsmeier // *J. Mol. Biol.* – 1999. – Vol.287. – P. 103–115.
85. BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway / M.H. Kang, J.S. Kim, J.E. Seo [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 2010. – Vol.316, №1. – P. 24–37.
86. BMP2 and BMP6 control p57Kip2 expression and cell growth arrest/terminal differentiation in normal primary human epidermal keratinocytes / F.P. Gosselet, T. Magnaldo, R.M. Culerrier [et al.] // *Cell. Signal.* – 2007. – Vol.19. – P. 731–739.
87. Langenfeld E. Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Angiogenesis in Developing Tumors / E. Langenfeld, J. Langenfeld // *Mol. Cancer Res.* – 2004. – Vol.2. – P. 141–149.
88. Zhang H. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development / H. Zhang, A. Bradley // *Devl.* – 1996. – Vol.122. – P. 2977–2986.
89. Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification / M. Liberman, R.C. Johnson, D.E. Handy [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol.413, №3. – P. 436–441.

90. Bone morphogenetic protein-2 acts upstream of myocyte-specific enhancer factor 2a to control embryonic cardiac contractility / Y.X. Wang, L.X. Qian, D. Liu [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – Vol.74, №2. – P.290–303.
91. Regulation of Bone Morphogenetic Protein-2 Expression in Endothelial Cells Role of Nuclear Factor- κ B Activation by Tumor Necrosis Factor- α , H₂O₂, and High Intravascular Pressure / A. Csiszar, E.K. Smith, A. Koller [et al.] // *Circulation.* – 2005. – Vol.111. – P. 2364–2372.
92. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells / X.N. Chen, D. Duan, D. Kalisha [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2006. – Vol.21. – P. 3435–3442.
93. Shao J.S. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta / J.S. Shao, J. Cai, D.A. Towler // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol.26, № 7. – P. 1423–1430.
94. Posttranslational Activation of Bone Morphogenetic Protein 2 Is Mediated by Proprotein Convertase 6 during Decidualization for Pregnancy Establishment / S. Heng, S. Paule, B. Hardman [et al.] // *Endocrinology.* – 2010. – Vol.151, №8. – P. 3909–3917.
95. 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.
96. Severson A.R. Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro / A.R. Severson, R.T. Ingram, L.A. Fitzpatrick // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 1995. – Vol.31. – P. 853–857.
97. Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification / K. Mori, A. Shioi, S. Jono [et al.] // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol.433. – P. 19–22.
98. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular

- calcification / C.M.Shanahan, N.R.Cary, J.R.Salisbury [et al.] // *Circulation*. – 1999. – Vol.100. – P. 2168–2176.
99. Whyte M. P. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia / M. P. Whyte // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 1192. – P. 190–200.
100. The canine alkaline phosphatases: a review of the isoenzymes in serum, analytical methods and their diagnostic application / M. Syakalima, M. Takiguchi, J. Yasuda, A. Hashimoto // *Japanese Journal of Veterinary Research*. – 1998. – Vol. 46, № 1. – P. 3–11.
101. Le Du M. H. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases / M. H. Le Du, J. L. Milla'n // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 51. – P. 49808–49814.
102. Robison R. The significance of phosphoric esters in metabolism / R. Robison. – New York : New York University Press, 1932. – P. 1883.
103. Meyer J. L. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? / J. L. Meyer // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1984. – Vol. 231. – P. 1–8.
104. Hsu H. H. Calcification of isolated matrix vesicles and reconstituted vesicles from fetal bovine cartilage / H. H. Hsu, H. C. Anderson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1978. – Vol. 75. – P. 3805–3808.
105. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization / L. Hessle, K. A. Johnson, H. C. Anderson et al. // *PNAS*. – 2002. – Vol. 99, № 14. – P. 9445–9449.
106. Role of bone-type tissue-nonspecific alkaline phosphatase and PHOSPO1 in vascular calcification / Y. V. Bobryshev, A. N. Orekhov, I. Sobenin, D. Chistiakov // *Current Pharmaceutical Design*. – 2014. – Vol. 20 (37). – P. 5821–5828.
107. Severe hypophosphatasia: characterization of fifteen novel mutations in the ALPL gene / M. Spentchian, Y. Merrien, M. Herasse et al. // *Human mutation*.

- Mutation in Brief. – 2003. – Vol. 630. – P. 1–5.
108. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution / M. H. Le Du, T. Stigbrand, M. J. Taussig et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 9158–9165.
109. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization / E. Mornet, E. Stura, A. S. Lia-Baldini et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 31171–31178.
110. Milla'n J. L. Alkaline phosphatase and hypophosphatasia / J. L. Milla'n, M. P. Whyte // *Calcif. Tissue Int.* – 2015. – DOI : 10.1007/s00223-015-0079-1.
111. Mornet E. Hypophosphatasia / E. Mornet // *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* – 2008. – Vol. 22, № 1. – P. 113–127.
112. Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells / T. Suzuki, K. Ishihara, H. Migaki et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 30956–30962.
113. Milla'n J. L. Alkaline Phosphatases Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes / J. L. Milla'n // *Purinergic Signalling.* – 2006. – Vol. 2. – P. 335–341.
114. Mammalian alkaline phosphatase catalysis requires active site structure stabilization via the N-terminal amino acid microenvironment / M. F. Hoylaerts, L. Ding, S. Narisawa et al. // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45. – P. 9756–9766.
115. Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase / A. Kozlenkov, M. H. Le Du, P. Cuniasse et al. // *Journal of Bone and Mineral Research.* – 2004. – Vol. 19. – P. 1862–1872.
116. Bossi M. Modifications in a flexible surface loop modulate the isozyme-specific properties of mammalian alkaline phosphatases / M. Bossi, M. F. Hoylaerts, J. L. Millan // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 25409–25416.
117. Functional significance of calcium binding to Tissue-nonspecific alkaline

- phosphatase / M. F. Hoylaerts, S. Van kerckhoven, T. Kiffer-Moreira et al. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 (3). – P. 1–20.
118. Kaunitz J. D. TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling / J. D. Kaunitz, D. T. Yamaguchi // J. Cell Biochem. – 2008. – Vol. 105. – P. 655–662.
119. Revisiting spatial distribution and biochemical composition of calcium-containing crystals in human osteoarthritic articular cartilage / C. Nguyen, D. Bazin, M. Daudon et al. // Arthritis Research & Therapy. – 2013. – Vol. 15. – P. 1–12.
120. Autocrine ATP release coupled to extracellular pyrophosphate accumulation in vascular smooth muscle cells / D. A. Prosdocimo, D. C. Douglas, M. Romani et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2009. – Vol. 296. – P.828–839.
121. Perinatal hypophosphatasia caused by uniparental isodisomy / A. Watanabe, S. Satoh, A. Fujita et al. // Bone. – 2014. – Vol. 60. – P. 93–97.
122. Novel ALPL genetic alteration associated with an odontohypophosphatasia phenotype / L. Martinsa, T. L. Rodriguesa, M. M. Ribeiro et al. // Bone. – 2013. – Vol. 56, № 2. – P. 1–22.
123. Kishi F. Nucleotide sequence of the human liver-type alkaline phosphatase cDNA / F. Kishi, S. Matsuura, T. Kajii // Nucleic Acids Res. – 1989. – Vol. 17, № 5. – P. 2129.
124. Sequence divergence of 5' extremities in rat liver alkaline phosphatase mRNAs / Y. Toh, M. Yamamoto, H. Endo et al. // J. Biochem. – 1989. – Vol. 105. – P. 61–65.
125. Abhishek A. Pathophysiology of articular chondrocalcinosis – role of ANKH / Abhishek, M. Doherty // Nat. Rev. Rheumatol. – 2011. – Vol. 7. – P. 96–104.
126. Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia / P. S. Henthorn, M. Raducha, K. N. Fedde et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 9924–9928.

127. Henthorn P. S. Missense mutations of the Tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in hypophosphatasia / P. S. Henthorn, M. P. Whyte // *Clinical Chemistry*. – 1992. – Vol. 38, № 12. – P. 2501–2505.
128. Associations between serum bone-specific alkaline phosphatase activity, biochemical parameters, and functional polymorphisms of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in a Japanese population / N. Sogabe, R Tanabe, M Haraikawa // *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* – 2013. – Vol. 22 (1). – P. 160–165.
129. Molecular effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism (787T > C) associated with bone mineral density / N. Sogabe, K. Oda, H. Nakamura et al. // *Biomedical Research*. – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 213–219.
130. Mornet E. Hypophosphatasia: the mutations in the Tissue nonspecific alkaline phosphatase gene / E. Mornet // *Human mutation*. – 2000. – Vol. 15. – P. 309–315.
131. Dabisch-Ruthe M. Charakterisierung des pyrophosphatmetabolismus bei pseudoxanthoma elasticum / M. Dabisch-Ruthe // *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Fakultät für Chemie Universität Bielefeld*. – 2014. – 2014, Februar. – 96 p.
132. Hypophosphatasia-associated deficiencies in mineralization and gene expression in cultured dental pulp cells obtained from human teeth / T. L. Rodrigues, B. L. Foster, K. G. Silverio et al. // *JOE*. – 2012. – Vol. 38, № 7. – P. 907–912.
133. Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia / K. Fedde, L. Blair, J. Silverstein et al. // *J Bone Miner Res*. – 1999. – Vol. 14. – P. 2015–2026.
134. Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice / H. C. Anderson, D. Harmey, N. P. Camacho et al. // *Am. J. Pathol.* – 2005. – Vol. 166. – P. 1711–1720.

135. Narisawa S. Genetically modified mice for studying TNAP function / S. Narisawa // *Subcellular Biochemistry*. – 2015. – Vol. 76. – P. 45–57.
136. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization / L. Hesse, K. A. Johnson, H. C. Anderson et al. // *PNAS*. – 2002. – Vol. 99 (14). – P. 9445–9449.
137. Зайцев В.М. Прикладная медицинская статистика / В.М.Зайцев, В.Г.Лифляндский, В.И.Маринкин. – Фолиант, 2006.–432с.
138. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах.– М.: Медицина, 1975. – 297с.
139. Кобзарь А. И. Прикладная математическая статистика / А.И. Кобзарь.– М.: Физматлит, 2006. – 327 с.
140. Breiman L. Random Forests / L. Breiman // *Machine Learning*. – 2001. – Vol.45. – P. 5–32.
141. Breiman L. Classification and Regression Trees /L.Breiman, J.H.Friedman, R.A. Olshen // Belmont, CA: Wadsworth. – 1984. – P. 368.
142. Conditional variable importance for random forests / C. Strobl, L. Boulesteix, T. Kneib [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2008. – Vol.9. – P. 307.
143. Alison A.M. Ritchie. Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene – gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies / A.M.Alison, D. Marylyn // *Human genomics*. – 2006. – Vol.2, №5. – P. 318–328.

Показники зросту, маси тіла та індексу маси тіла (ІМТ) в осіб жіночої і чоловічої статі в групах порівняння залежно від варіантів генотипу за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 (M±m)

Показник и		Ser/Ser	Ser/Ala	Ala/Ala	F	P ₁
Жінки						
Зріст, см	Контроль	155,72±1,4 5 (39)	157,97±1,6 0 (31)	159,57±2,4 7 (7)	0,895	0,413
	ГКС	163,64±5,4 2 (11)	162,45±4,8 2 (11)	163,50±8,0 6 (4)	0,133	0,876
	P ₂	0,049	0,257	0,573		
Маса тіла, кг	Контроль	69,28±1,85	70,87±2,05	72,14±6,40	0,253	0,777
	ГКС	85,55±10,8 5	82,64±14,6 0	80,75±2,98	0,291	0,751
	P ₂	0,017	0,207	0,360		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	28,729±0,8 5	28,497±0,8 6	28,244±2,3 3	0,034	0,966
	ГКС	31,94±3,68	31,39±5,93	30,35±2,99	0,169	0,846
	P ₂	0,204	0,444	0,595		
Чоловіки						
Зріст, см	Контроль	168,85±1,0 6 (67)	166,97±1,1 1 (63)	168,67±1,4 3 (27)	0,858	0,426
	ГКС	174,08±0,9 6 (26)	172,63±1,0 1 (45)	175,65±0,9 7 (21)	1,471	0,235
	P ₂	0,005	0,0005	0,0004		
Маса тіла, кг	Контроль	75,06±1,44	75,24±1,54	78,52±3,70	0,697	0,500
	ГКС	83,85±11,4 8	82,44±14,4 6	85,00±17,5 4	0,194	0,824
	P ₂	0,241	0,566	0,6871		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	26,34±0,47	26,98±0,51	27,50±1,09	0,806	0,449
	ГКС	27,66±3,49	26,65±4,55	27,39±4,54	0,030	0,970
	P ₂	0,564	0,932	0,979		

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

Показники артеріального тиску (АТ) у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 (M±m)

Показник и		Ser/Ser	Ser/Ala	Ala/Ala	F	P ₁
САТ	Контроль	139,81±2,4 (104)	138,66±2,3 3 (93)	139,41±3,6 3 (34)	0,061	0,941
	ГКС	145,59±2,3 7 (59)	137,37±2,6 7 (38)	133,57±3,6 9 (21)	4,765	0,010
	P ₂	0,115	0,749	0,289		
ДАТ	Контроль	83,7±1,1	82,3±1,2	86,7±1,7	1,301	0,274
	ГКС	91,5±1,3	88,2±1,7	88,2±1,8	2,818	0,064
	P ₂	0,0001	0,007	0,564		
ПАТ	Контроль	56,2±1,9	56,3±1,8	53,7±2,5	0,299	0,742
	ГКС	54,1±1,5	49,2±1,6	47,4±2,5	3,813	0,025
	P ₂	0,448	0,019	0,098		
СрАТ	Контроль	102,4±1,34	101,1±1,41	103,6±2,25	0,484	0,617
	ГКС	109,55±1,5 7	104,56±1,9 1	101,98±2,2 7	4,052	0,020
	P ₂	0,001	0,172	0,633		

Примітка: див. додаток 1

**Показники артеріального тиску (АТ) в осіб жіночої і чоловічої статі в
групах порівняння залежно від варіантів генотипу за Ser37Ala
поліморфізмом гена BMP-2 (M±m)**

Показники		Ser/Ser	Ser/Ala	Ala/Ala	F	P ₁
Жінки						
САТ	Контроль	145,26±4,07 (38)	128,87±2,85 (31)	139,29±9,97 (7)	4,796	0,011
	ГКС	157,27±3,46 (11)	150,00±1,34 (11)	145,00±7,07 (4)	2,950	0,072
	P ₂	0,132	0,0001	0,701		
ДАТ	Контроль	86,5±1,7	77,9±1,3	88,6±4,0	8,927	0,000
	ГКС	98,2±2,6	95,9±1,5	88,8±3,1	2,675	0,090
	P ₂	0,001	0,0001	0,973		
ПАТ	Контроль	58,8±3,3	50,9±2,4	50,7±7,7	1,843	0,166
	ГКС	59,1±3,0	54,1±2,3	56,3±4,3	0,881	0,428
	P ₂	0,962	0,458	0,619		
СрАТ	Контроль	106,05±2,57	94,89±1,56	105,48±5,56	7,851	0,001
	ГКС	117,88±2,57	113,94±0,93	107,50±4,38	3,540	0,046
	P ₂	0,0001	0,0001	0,810		
Чоловіки						
САТ	Контроль	136,67±2,87 (66)	143,55±3,03 (62)	139,44±3,89 (27)	1,428	0,243
	ГКС	142,92±2,67 (48)	132,22±3,24 (27)	130,88±4,05 (17)	4,629	0,012
	P ₂	0,127	0,027	0,152		
ДАТ	Контроль	82,1±1,3	84,6±1,5	85,0±1,9	1,094	0,337
	ГКС	90,0±1,4	85,0±2,0	85,6±2,1	2,808	0,066
	P ₂	0,0001	0,879	0,971		
ПАТ	Контроль	54,6±2,3	59,0±2,3	54,4±2,5	1,167	0,314
	ГКС	52,9±1,7	47,2±1,9	45,3±2,7	3,908	0,024
	P ₂	0,580	0,0001	0,021		
СрАТ	Контроль	100,3±1,6	104,2±1,8	103,2±2,5	1,380	0,255
	ГКС	107,64±1,75	100,74±2,29	100,69±2,57	3,956	0,023
	P ₂	0,002	0,270	0,507		

Примітка: див. додаток 1

Додаток 4

Вплив Ser37Ala поліморфізму гена BMP-2 на розвиток ускладнень ГКС у пацієнтів чоловічої статі

Генотип	Ускладнення (-), n (%)	Ускладнення (+), n (%)
Ser/Ser	41 (55,4)	7 (38,9)
Ser/Ala	17 (23,0)	10 (55,6)
Ala/Ala	16 (21,6)	1 (5,6)
$\chi^2 = 8,017; P = 0,018$		

Додаток 5

Вплив Ser37Ala поліморфізму гена BMP-2 на розвиток ускладнень ГКС у пацієнтів без ДАХ

Генотип	Ускладнення (-), n (%)	Ускладнення (+), n (%)
Ser/Ser	11 (64,7)	0 (0)
Ser/Ala	4 (23,5)	3 (100,0)
Ala/Ala	2 (11,8)	0 (0)
$\chi^2 = 6,555; P = 0,038$		

Додаток 6

Вплив Ser37Ala поліморфізму гена BMP-2 на розвиток ускладнень ГКС у пацієнтів без ожиріння

Генотип	Ускладнення (-), n (%)	Ускладнення (+), n (%)
Ser/Ser	34 (53,1)	4 (28,6)
Ser/Ala	16 (25,0)	9 (64,3)
Ala/Ala	14 (21,9)	1 (7,1)
$\chi^2 = 8,249; P = 0,016$		

Додаток

Вплив Ser37Ala поліморфізму гена BMP-2 на розвиток ускладнень ГКС у пацієнтів, які курять

Генотип	Ускладнення (-), n (%)	Ускладнення (+), n (%)
Ser/Ser	22 (51,2)	3 (27,3)
Ser/Ala	9 (20,9)	7 (63,6)
Ala/Ala	12 (27,9)	1 (9,1)
$\chi^2 = 7,760; P = 0,021$		

Показники зросту, маси тіла та індексу маси тіла (ІМТ) в осіб жіночої і чоловічої статі в групах порівняння залежно від варіантів генотипу за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 (M±m)

Показники		Ser/Ser	Ser/Ala	Ala/Ala	F	P ₁
Жінки						
Зріст, см	Контроль	157,53±2,40 (19)	155,65±1,47 (17)	153,38±2,40 (8)	0,719	0,493
	IAT1	163,70±1,11 (27)	164,59±1,03 (27)	161,94±1,20 (18)	1,272	0,287
	P ₂	0,013	0,0001	0,002		
Маса тіла, кг	Контроль	69,11±2,79	71,18±3,05	68,25±3,97	0,204	0,817
	IAT1	75,44±2,41	79,89±2,26	77,44±2,77	0,918	0,404
	P ₂	0,094	0,024	0,075		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	27,971±1,17	29,412±1,27	29,098±1,76	0,375	0,690
	IAT1	28,114±0,80	29,582±0,80	29,584±1,10	0,866	0,425
	P ₂	0,917	0,905	0,812		
Чоловіки						
Зріст, см	Контроль	169,75±1,31 (36)	165,19±1,57 (31)	165,00±2,34 (12)	3,034	0,054
	IAT1	172,79±1,28 (38)	173,38±1,31 (37)	172,17±1,21 (23)	0,185	0,832
	P ₂	0,101	0,0001	0,005		
Маса тіла, кг	Контроль	77,44±1,77	75,10±3,90	72,00±3,90	0,572	0,567
	IAT1	81,74±2,18	82,86±2,39	83,65±2,15	0,160	0,852
	P ₂	0,132	0,083	0,007		
ІМТ, кг/м ²	Контроль	27,022±0,70	27,203±1,08	26,526±1,02	0,082	0,922
	IAT1	27,337±0,64	27,550±0,64	28,276±0,79	0,397	0,673
	P ₂	0,740	0,775	0,193		

Примітка: див. додаток 1

Показники артеріального тиску (АТ) у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 (M±m)

<i>Показники</i>		<i>Ser/Ser</i>	<i>Ser/Ala</i>	<i>Ala/Ala</i>	<i>F</i>	<i>P₁</i>
САТ	Контроль	154,17±23,24 (54)	152,13±22,01 (47)	149,75±27,55 (20)	0,276	0,760
	IAT1	168,77±3,24 (65)	167,42±3,67 (64)	163,41±5,24 (41)	0,432	0,650
	P ₂	0,497	0,430	0,507		
ДАТ	Контроль	87,0±11,4	85,5±12,8	86,2±13,9	0,174	0,840
	IAT1	95,4±2,1	95,4±1,6	95,4±1,6	0,014	0,986
	P ₂	0,431	0,374	0,356		
ПАТ	Контроль	67,13±19,1	66,5±16,9	63,5±18,2	0,300	0,742
	IAT1	73,3±2,5	73,3±2,8	68,4±3,2	0,670	0,513
	P ₂	0,726	0,647	0,716		
СрАТ	Контроль	109,41±13,64	107,76±14,44	107,42±17,57	0,219	0,804
	IAT1	119,90±2,26	119,45±2,26	117,80±3,33	0,166	0,847
	P ₂	0,409	0,356	0,430		

Примітка: див. додаток 1

Показники артеріального тиску (АТ) в осіб жіночої і чоловічої статі в групах порівняння залежно від варіантів генотипу за Ser37Ala поліморфізмом гена BMP-2 (M±m)

Показники		Ser/Ser	Ser/Ala	Ala/Ala	F	P ₁
Жінки						
САТ	Контроль	150,00±6,57 (19)	147,65±4,92 (17)	148,13±5,82 (8)	0,047	0,954
	IAT1	170,56±5,27 (27)	175,93±5,55 (27)	170,56±8,76 (18)	0,260	0,772
	P ₂	0,017	0,001	0,117		
ДАТ	Контроль	87,1±2,4	86,4±2,8	81,2±3,3	0,853	0,434
	IAT1	99,1±3,2	100,0±2,6	96,7±3,7	0,262	0,770
	P ₂	0,008	0,001	0,016		
ПАТ	Контроль	62,8±5,0	61,1±4,1	61,1±5,7	0,237	0,790
	IAT1	71,5±3,7	75,9±4,4	73,9±5,6	0,276	0,760
	P ₂	0,159	0,026	0,179		
СрАТ	Контроль	108,07±3,58	106,86±3,11	103,54±3,39	0,309	0,736
	IAT1	122,90±3,62	125,31±3,21	121,30±5,25	0,256	0,775
	P ₂	0,007	0,0004	0,041		
Чоловіки						
САТ	Контроль	156,43±3,34 (35)	154,67±4,17 (30)	150,83±9,72 (12)	0,255	0,776
	IAT1	167,50±4,13 (38)	161,22±4,69 (37)	157,83±6,28 (23)	0,971	0,383
	P ₂	0,042	0,716	0,534		
ДАТ	Контроль	87,0±2,0	85,1±2,4	89,6±4,5	0,522	0,596
	IAT1	92,8±2,8	92,1±2,1	93,7±3,5	0,069	0,933
	P ₂	0,101	0,031	0,487		
ПАТ	Контроль	69,4±2,9	69,6±2,9	61,3±5,7	1,160	0,319
	IAT1	74,6±3,4	69,0±3,6	64,1±3,5	1,883	0,158
	P ₂	0,252	0,900	0,662		
СрАТ	Контроль	110,14±2,14	108,27±2,82	110,00±6,16	0,132	0,876
	IAT1	117,76±2,89	115,18±2,68	115,07±4,31	0,247	0,781
	P ₂	0,040	0,082	0,500		

Примітка: див. додаток 1