

УДК 616.831-005.1/6:548.33]:616-074

## ЧАСТОТА АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА ВІТАМІН-К-ЕПОКСИДРЕДУКТАЗИ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ КОРОНАРНИЙ СИНДРОМ

*Дубовик Є. І., Гарбузова В. Ю.\*, Просол Д. А., Шимко К. А.  
Сумський державний університет,  
вул. Римського-Корсакова, 2, Суми, Україна  
(отримано 29.10.2013, опубліковано 15.12.2013)*

Наведено результати визначення T2255C (rs2359612) поліморфізму гена вітамін-К-епоксидредуктази (VKORC1) у 118 хворих на гострий коронарний синдром (ГКС) і 234 здорових індивідумів (контрольна група). Встановлено, що у хворих із ГКС співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем становить 27,1, 41,5 і 31,4 % (у контролі – 37,2, 42,7, 20,1 %,  $P = 0,038$  за  $\chi^2$ -критерієм). Таким чином, існує зв'язок між T2255C-поліморфізмом і розвитком ГКС: ризик розвитку ГКС у гомозигот за мінорним алелем (C/C) у 2,1 раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (T/T).

**Ключові слова:** вітамін-К-епоксидредуктаза, алельний поліморфізм, гострий коронарний синдром.

\* vikgarbuzova@yandex.ru

### Вступ

Вітамін-К-епоксидредуктаза (VKOR) – інтегральний трансмембранний протеїн, який каталізує відновлення 2,3-епоксиду вітаміну К (КО) і вітаміну К до вітаміну К-гідрохінону (КН<sub>2</sub>). Молекула VKOR (молекулярна маса 18,2 кДа) складається із 163 амінокислотних залишків [1]. Ген VKORC1 у людини представлено однією копією, яка міститься в короткому плечі 16-ї хромосоми (16p11.2) на мінус-ланцюзі. У гені закодовано 163 амінокислотні залишки зрілого білка. Довжина гена – 5126 нуклеотидів, він складається із 3 екзонів, розділених двома інтронами [2]. На сьогодні описано понад 117 поліморфізмів поодиноких нуклеотидів у гені VKORC1 людини. Більшість із них вивчається з огляду на роль вітамін-К-епоксидредуктази у метаболізмі кумаринових антикоагулянтів. Дані про роль алельного поліморфізму гена VKORC1, зокрема T2255C поліморфізму, у розвитку серцево-судинних захворювань нечисленні і суперечливі. Більшість опублікованих праць, присвячено дослідженню зв'язку генотипів VKORC1 із розвитком ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда, інсульту та венозної тромбоемболії серед населення Західної Європи [3-4]. Що стосується впливу T2255C-поліморфізму на розвиток гострого коронарного синдрому (ГКС) в українській популяції, то ця проблема вивчається вперше.

Наведену роботу виконано в рамках науково-дослідної теми "Роль алельного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб", № держреєстрації 0110 U 005038.

**Мета дослідження** – встановити частоту алельних варіантів гена вітамін-К-епоксидредуктази у хворих на ГКС.

### Матеріали і методи

У роботі використано венозну кров 118 хворих на ГКС (22 жінок і 78 % чоловіків) віком від 40 до 73 років (середній вік –  $55,9 \pm 0,89$  року), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні № 5.

Діагноз гострого інфаркту міокарда та нестабільної стенокардії встановлювали на підставі даних клінічних, електрокардіографічних та біохімічних досліджень згідно із рекомендаціями експертів ВОЗ, а також відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів [5; 6; 7]. Критерієм залучення до дослідження була наявність типового ангінозного болювого 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 у 33,5 % хворих, гострого інфаркту міокарда – 66,5 % хворих.

Контрольна група складалася із 234 пацієнтів, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, зняття ЕКГ і вимірювання артеріального тиску. Контрольна група і група хворих на ГКС відрізнялися за віком: середній вік першої ( $66,0 \pm 0,95$ ) року був істотно вищим, ніж другої ( $P < 0,001$ ). Остання обставина збільшувала надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ГКС у пацієнтів контрольної групи у майбутніх періодах їхнього життя.

Визначення Т2255С (rs2359612) поліморфізму гена VKORC1 проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл із калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморожували і зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . ДНК із неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт Т2255С-поліморфізму в 2-му інтроні гена VKORC1, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'-GAACAGAGAGAGGAACCAAGGGAGTGGG-3' і зворотного (antisense) – 5'-TCTGAACCATGTGTACGCCAGGACC-3'. Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 250 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного із праймерів і 1,0 ОД Taq-полімерази, об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації була такою: денатурація –  $94^{\circ}\text{C}$  (50 с), гібридизація праймерів –  $62,5^{\circ}\text{C}$  (45 с), елонгація –  $72^{\circ}\text{C}$  (1 хв), разом 30 циклів. Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при  $37^{\circ}\text{C}$  упродовж 18 годин із 3 ОД рестриктази NcoI у буфері Tango такого складу: 33 мМ трисацетату (рН 7,9), 10 мМ ацетату магнію, 66 мМ ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 2255-й позиції гена VKORC1 містився тимін, ампліфікат, який складався із 198 пар основ, розщеплювався рестриктазою NcoI на два фрагменти: 172 і 26

пар основ. У разі заміни тиміну на цитозин сайт рестрикції для NcoI втрачався і візуалізувався один фрагмент завдовжки 198 пар основ (рис. 1).

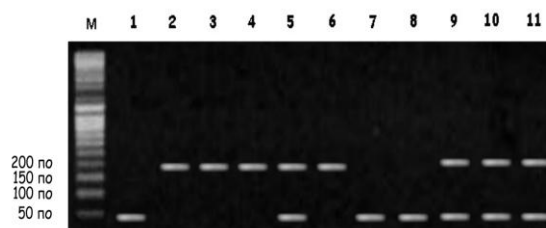


Рис. 1. Результати рестрикційного аналізу Т2255С поліморфізму гена VKORC1. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 1, 7, 8 відповідають Т/Т-генотипу; доріжки 5, 9, 10, 11 –Т/С-генотипу; 2, 3, 4, 6 – С/С-генотипу

Ампліфікати одержаного фрагмента гена VKORC1 після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили упродовж 25 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$ -критерієм. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

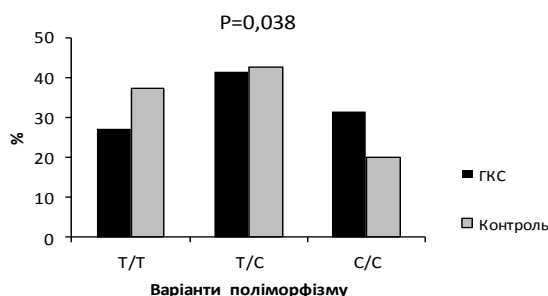
#### Результати та їх обговорення

Генотипування хворих на ГКС та пацієнтів контрольної групи за Т2255С-поліморфізмом гена VKORC1 дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена, а також порівняти їх між групами загалом і за статтю.

Порівняння частоти різних варіантів Т2255С-поліморфізму у хворих основної і контрольної груп дало такі результати: співвідношення генотипів Т/Т, Т/С і С/С у групі з ГКС становило відповідно 27,1, 41,5 і 31,4 %, а в контролі – 37,2, 42,7, 20,1 % (рис. 2). Показник  $P$ , визначений за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона, дорівнював 0,038 і свідчив про статистично достовірну різницю у розподілі алельних варіантів гена VKORC1 за поліморфізмом 2-го інтрона у хворих на ГКС і практично здорових осіб. Таким чином, існує зв'язок між Т2255С-поліморфізмом і розвитком ГКС: гомозиготи за мінорним алелем (С/С) мали більший ризик розвитку ГКС, ніж носії інших генотипів.

Цей висновок був підтверджений методом логістичної регресії: у носіїв С/С-генотипу

ризик ГКС у 2,1 рази більший, ніж у гомозигот за основним алелем (табл. 1).



**Рис. 2.** Частота алельних варіантів гена VKORC1 за T2255C у хворих на ГКС (чорні стовпчики) і в контрольній групі (сірі стовпчики). P – статистична значущість відмінності показників за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона

**Таблиця 1**

Аналіз ризику ГКС залежно від генотипу за T2255C-поліморфізмом гена VKORC1 (метод логістичної регресії)

Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
C/C	0,761	0,302	6,360	0,012	2,140	1,185	3,866
T/C	0,287	0,270	1,125	0,289	1,332	0,784	2,264

Примітки: Порівняння проводилося щодо гомозигот за основним алелем (T/T); CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда; P – статистична значущість; OR – відношення ризику; CI – довірчий інтервал

При порівнянні частоти генотипів в основній і контрольній групах за поліморфізмом T2255C окремо у жінок і чоловіків зв'язку між даним генетичним маркером і ГКС виявити не вдалося (табл. 2).

**Таблиця 2**

Розподіл частоти осіб різних генотипів за T2255C-поліморфізмом гена VKORC1 серед жінок і чоловіків у контрольній групі та у хворих на ГКС

Генотип	Жінки (n)		Чоловіки (n)	
	контроль	ГКС	контроль	ГКС
T/T	37	8	50	24
T/C	29	12	71	37
C/C	11	6	36	31
	P <sub>1</sub> =0,274		P <sub>1</sub> =0,175	
	P <sub>2</sub> =0,044, P <sub>3</sub> =0,587, P <sub>4</sub> =0,080, P <sub>5</sub> =0,562, P <sub>6</sub> =0,416			

Примітки: n – кількість осіб; P<sub>1</sub> – значущість відмінностей у розподілі генотипів між контролем і ГКС; P<sub>2</sub> – значущість відмінностей у розподілі генотипів між жінками і чоловіками у контролі; P<sub>3</sub> – значущість відмінностей у розподілі генотипів між жінками і чоловіками у групах із ГКС; P<sub>4</sub> – значущість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом T/T у контрольній групі та групі з ГКС; P<sub>5</sub> – значущість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом T/C у контрольній групі та групі з ГКС; P<sub>6</sub> – значущість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом C/C у контрольній групі та групі з ГКС

Порівняння даних про частоту генотипів поліморфізму 2-го інтрона гена VKORC1 в осіб різної статі окремо в контрольній групі та у

хворих на ГКС свідчить про статистично значущу відмінність у розподілі алельних варіантів гена тільки серед практично здорових осіб. Так, співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем (T/T, T/C, C/C) серед осіб контрольної групи жіночої статі становило відповідно 48,1, 37,7, 14,3 %, а чоловічої – 31,8, 45,2, 22,9 % (P = 0,044).

Суть однонуклеотидного поліморфізму T2255C полягає в тому, що в 2-му інтроні гена VKORC1, у 2255 позиції, тимін заміщено на цитозин. Самі по собі поліморфізми в інтронах не здатні змінювати послідовність азотистих основ у змістовній частині гена і таким чином впливати на якісні характеристики синтезованого протеїну, проте, будучи зчепленими із регуляторними ділянками, можуть зменшувати або збільшувати ступінь впливу тих речовин і молекул, які беруть участь у регуляції активності транскрипції зазначеного гена і тим самим змінювати кількісні характеристики білка.

На сьогодні визначено 5 основних SNP у гені VKORC1, що досліджують із метою коригування дози оральних антикоагулянтів: T-4931C (rs719616114), G-1639A (rs9923231), C1173T (rs9934438), G1542C (rs8050894), C7566T (rs2359612). Поліморфні варіанти гена VKORC1 за даними поліморфізмами об'єднують у 2 гаплотипи. Гаплотип А включає мінорні алелі і пов'язаний зі зниженням експресії мРНК і меншою дозою варфарину порівняно з гаплотипом В, який об'єднує основні алелі [8].

Ураховуючи наявність серед вітамін-К-залежних протеїнів, тобто тих, які беруть участь у підтриманні кальцієвого гомеостазу та процесів коагуляції крові в організмі, подальші дослідження з вивчення однонуклеотидних поліморфізмів гена VKORC1 були спрямовані на пошук зв'язку генетичної варіабельності останнього з розвитком уражень серцево-судинної та кісткової систем.

Так, Teichert et al. установили, що представники білої раси, які є носіями T-алеля за C1173T-поліморфізмом 1-го інтрона гена VKORC1, мають значно вищий ризик розвитку кальцифікації аорти, ніж носії основного алеля [2].

Wang et al. з'ясували, що наявність C-алеля в 2255-му положенні гена VKORC1 (C2255T-поліморфізм) збільшує більше ніж у два рази

ризик розвитку інсульту та ішемічної хвороби серця і більше ніж у три рази – ризик розвитку розшарування аорти. Також вчені виявили, що пацієнти із С/С- та С/Т-генотипами мали нижчий рівень карбоксильованого остеокальцину, ніж носії Т/Т-генотипу [9]. Lemmens et al. на відміну від отриманих у японському дослідженні результатів не виявили зв'язку С1173Т-поліморфізму із розвитком ішемічної хвороби серця та інсультом серед населення Західної Європи [10].

Hindorff et al. досліджували зв'язок Т2255С-, С698Т- та G3730А- поліморфізмів гена VKORC1 із розвитком інфаркту міокарда, інсульту та венозної тромбоемболії. Отримані результати показали, що жоден із трьох вивчених SNP не був асоційований із розвитком зазначених серцево-судинних захворювань [11]. Результати щодо відсутності зв'язку Т2255С-поліморфізму VKORC1 із венозною тромбоемболією підтвердились і у дослідженні Verstuylt et al. [12]. Smadja et al. також не виявили зв'язку поліморфізму гена VKORC1 із розвитком венозної тромбоемболії, але вже для G-1639А-поліморфізму промотору [13]. Проте Lacut et al. встановили, що Т/Т-генотип за С1173Т-поліморфізмом пов'язаний зі зменшеним ризиком розвитку венозної тромбоемболії серед населення Франції [14].

Наведені у цій роботі дані свідчать про наявність прямого зв'язку між Т2255С-поліморфізмом гена VKORC1 та ГКС. Аналіз статевих відмінностей показав, що належність до жіночої чи чоловічої статі істотно не впливає на зв'язок Т2255С-поліморфізму із ГКС. Статистично значуща відмінність у розподілі алельних варіантів гена за досліджуваним поліморфізмом у осіб різної статі виявлена тільки серед практично здорових осіб. Одержані результати дозволяють стверджувати, що гомозиготи за мінорним алелем за Т2255С-поліморфізм гена VKORC1 мають достовірно вищий ризик розвитку ГКС, ніж гомозиготи за основним алелем, незалежно від такого фактора ризику, як стать.

#### Висновки

В українській популяції поліморфізм Т2255С гена VKORC1 асоційований із розвитком ГКС. У носіїв С/С-генотипу ризик ГКС у 2,1 рази більший, ніж у гомозигот за основним алелем.

#### Перспективи подальших досліджень

З урахуванням актуальності проблеми гострих коронарних подій подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення асоціації інших поліморфізмів гена VKORC1, зокрема G-1639А, С1173Т, із ГКС.

#### Список літератури

1. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): The key protein of the vitamin K cycle / J. Oldenburg, C. G. Bevens, C. R. Muller [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2006. – Vol.8 – P. 347–353.
2. Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1) Polymorphism and Aortic Calcification / M. Teichert, L. E. Visser, R. H. N. van Schaik [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol.28. – P. 771–776.
3. Common VKORC1 variants are not associated with arterial or venous thrombosis / A. Hindorff, S. R. Heckbert, N. Smith, K. D. Bennet [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2007. – Vol. 5. – P. 2025–2027.
4. VKORC1 Haplotypes Are Associated With Arterial Vascular Diseases (Stroke, Coronary Heart Disease, and Aortic Dissection) / Y. Wang, Z. Weili, Y. Zhang [et al.] // *Circulation.* – 2006. – Vol. 113. – P. 1615–1621.
5. ACC/AHA guidelines for 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.
6. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The task force on the management of acute coronary syndromes of the European society of cardiology / M. E. Bertrand, M. L. Simoons, K. A. Fox [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2002. – Vol. 23. – P. 1809–1840.
7. World Health Organization. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease // *Circulation.* – 1979. – Vol. 59. – P. 607–609.

8. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement / D. Wang, H. Chen, K. M. Momary [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112. – P. 1013–1021.
9. VKORC1 Haplotypes Are Associated With Arterial Vascular Diseases (Stroke, Coronary Heart Disease, and Aortic Dissection) / Y. Wang, Z. Weili, Y. Zhang [et al.] // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113. – P. 1615–1621.
10. Lack of association between variants in the VKORC1 gene and cerebrovascular or coronary heart disease / R. Lemmens, S. Abboud, L. Vanhees [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 12. – P. 2220–2223.
11. Common VKORC1 variants are not associated with arterial or venous thrombosis / A. Hindorff, S. R. Heckbert, N. Smith [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5. – P. 2025–2027.
12. VKORC1 genetic polymorphism and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: new findings and meta-analysis / C. Versteuyft, M. Canonico, E. Bouazi [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 7. – P. 1034–1036.
13. No clear link between VKORC1 genetic polymorphism and the risk of venous thrombosis or peripheral arterial disease / M. D. Smadja, M. A. Lorient, L. A. Hindorff [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 99. – P. 970–972.
14. Vitamin K epoxide reductase genetic polymorphism is associated with venous thromboembolism: results from the EDITH Study / K. Lacut, C. Larramendy-Gozalo [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5. – P. 2020–2024.

#### ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА ВИТАМИН-К-ЭПОКСИДРЕДУКТАЗЫ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

Дубовик Е. И., Гарбузова В. Ю., Просол Д. А., Шимко К. А.

Сумский государственный университет,  
ул. Римского-Корсакова, 2, Сумы, Украина, 40007

Представлены результаты определения T2255C (rs2359612)-полиморфизма гена витамин-К-эпоксидредуктазы (VKORC1) у 118 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и 234 здоровых индивидуумов (контрольная группа). Установлено, что у больных с ОКС соотношение гомозигот по основному аллелю, гетерозигот и гомозигот по минорному аллелю составляет 27,1, 41,5 и 31,4% (в контроле – 37,2, 42,7 и 20,1%,  $P=0,038$  по  $\chi^2$ -критерию). Таким образом, существует связь между T2255C-полиморфизмом и развитием ОКС: риск развития ОКС у гомозигот по минорному аллелю (C/C) в 2,1 раза выше, чем у гомозигот за основным аллелем.

**Ключевые слова:** витамин-К-эпоксидредуктаза, аллельный полиморфизм, острый коронарный синдром.

#### THE FREQUENCY OF ALLELIC VARIANTS OF THE VITAMIN K-EPOXIDOREDUCTASE GENE IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Dubovyk Ye. I., Garbuzova V. Yu., Prosol D. A., Shimko K. A.

Sumy State University,  
2, Rymkovo-Korsakova St., Sumy, Ukraine, 40007

T2255C polymorphism (rs2359612) of vitamin K-epoxidoreductase (VKORC1) gene in 118 patients with acute coronary syndrome (ACS) and in 234 healthy people was determined. It was shown that in patients with ACS interrelation of main homozygotes, heterozygotes and minor homozygotes were 27.1%, 41.5% and 31.4% (in control – 37.2%, 42.7%, 20.1%.  $P=0,038$  by  $\chi^2$ -test). Thus, there is an association between T2255C polymorphism and the development of ACS: the risk of ACS in homozygotes for the minor allele (C/C) is 2.1 times higher than in homozygous for the major allele.

**Key words:** vitamin K-epoxidoreductase, allelic polymorphism, acute coronary syndrome.