

# Аналіз зв'язку поліморфізму *rs2592551* гена $\gamma$ -глутамілкарбоксилази з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту

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

Сумський державний університет; e-mail: v.harbizova@ukr.net

*Представлені результати визначення поліморфізму *rs2592551* гена  $\gamma$ -глутамілкарбоксилази у 170 хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт та 124 осіб без гострої цереброваскулярної патології (контрольна група). Встановлено, що існує асоціація між цих захворюванням і наведеним поліморфним варіантом. Ризик розвитку інсульту в осіб з генотипом T/T був вищий, ніж у носіїв основного С-алеля (відношення шансів (OR) = 3,117; 95% довірчий інтервал (CI) = 1,016-9,566; P = 0,047). Після поділу пацієнтів груп порівняння на підгрупи, сформовані за наявністю деяких факторів ризику атеросклерозу, подібний зв'язок був виявлений в осіб жіночої статі та без звички куріння. Водночас гетерозиготний генотип (C/T) у жінок мав вірогідний протективний ефект щодо розвитку ішемічного інсульту, якщо порівнювати з генотипами C/C і T/T (OR = 0,460; 95% CI = 0,213-0,994; P = 0,048). Достовірність цих результатів зберігалася навіть після поправки на вік, індекс маси тіла, куріння та артеріальну гіпертензію.*

*Ключові слова:  $\gamma$ -глутамілкарбоксилаза; поліморфізм генів; ішемічний інсульт.*

## ВСТУП

Процеси ектопічної кальцифікації та розлади системи гемостазу відіграють важливу роль у розвитку гострих порушень мозкового кровообігу. Одним із найнебезпечніших різновидів судинного ураження головного мозку, з огляду на поширеність та високу смертність, є ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) [1]. Показано, що відкладення солей кальцію в атероматозній бляшці належить до основних причин її дестабілізації та розриву [2-4]. При цьому порушення балансу між активністю про- та антикоагулянтних білків стає причиною посиленого тромбоутворення [5-7]. Серед імовірних чинників розвитку вказаних змін все більшої уваги приділяється вітамін-К-залежним білкам (VKDPs; від англ. vitamin K-dependent proteins). Нині до гетерогенної групи VKDPs належать фактори згортання крові (II, VII, IX, X), білки антикоагулянтної

системи (протеїн S, C і Z), білки, що причетні до мінералізації кісток та м'яких тканин (матриксний Gla-протеїн – MGP, Gla-Rich протеїн, остеокальцин – OC) [2,8], а також білок, що бере участь в реакціях формування тромбоцитарного тромбу та диференціюванні гладенько-м'язових клітин судин (growth arrest-specific 6) [9].

Важливою умовою активації VKDPs є посттрансляційна модифікація у вигляді заміни залишків глутамінової кислоти в пептидних послідовностях білків на  $\gamma$ -карбоксиглутаматні залишки ( $\gamma$ -карбоксилування). Біохімічна системи, що відповідає за реалізацію такого перетворення, має назву цикл вітаміну К [10]. Одним з ключових ферментів у цій системі, що безпосередню каталізує реакцію  $\gamma$ -карбоксилування, є  $\gamma$ -глутамілкарбоксилаза (GGCX). Дані нещодавніх досліджень продемонстрували, що у пацієнтів з мутаціями в гені *GGCX* поряд з розладами системи гемостазу спосте-

© Є.І. Дубовик, В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, О.В. Атаман

рігається передчасний остеопороз, ураження слухового нерва, вади клапанів серця, стеноз легеневої артерії та мінералізація еластичних волокон [11]. Зазначений фенотип корелює як зі збільшенням вмісту некарбоксілованих вітамін-К-залежних факторів згортання крові, так і зі зростанням кількості некарбоксілованого MGP та ОС. Це дає змогу припустити, що порушення процесів  $\gamma$ -карбоксілювання внаслідок генетичного поліморфізму *GGCX* може стати причиною дисфункції всієї групи VKDPs, що в кінцевому рахунку призведе до прискореного росту атероматозної бляшки, її мінералізації, розриву та тромбозу.

Метою нашої роботи був пошук зв'язку між поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* та розвитком ІАТІ серед представників північно-східного регіону України з урахуванням деяких відомих факторів ризику гострих порушень мозкового кровообігу (збільшений індекс маси тіла – ІМТ, куріння, артеріальна гіпертензія – АГ, стать, порушення системи коагуляції та ліпопротеїнового – ЛП – складу плазми крові).

## МЕТОДИКА

Для дослідження була використана венозна кров 170 хворих на ІАТІ (42,4% жінок і 57,6% чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік  $64,7 \pm 9,5$  роки), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні №5.

Ішемічний характер інсульту встановлювали за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, результатами МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [12]. Пацієнти з кардіоемболічним ішемічним інсультом та ішемічним інсультом нез'ясованої етіології виключалися з дослідної групи. Клінічна характеристика хворих на ІАТІ була представлена загальноприйнятими показниками, що відображають фактори ризику

атеросклеротичного процесу та гострих розладів мозкового кровообігу: ІМТ, АГ, склад ЛП плазми крові та деякі показники коагулограми.

Групу контролю склали 124 особи, у яких відсутність гострої серцево-судинної патології підтверджували збиранням анамнестичних даних, зняттям електрокардіограми, вимірюванням артеріального тиску (АТ) та проведенням загальноприйнятого неврологічного огляду. Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації та схвалено Комісією з біоетики медичного інституту Сумського державного університету. Перед включенням у дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду.

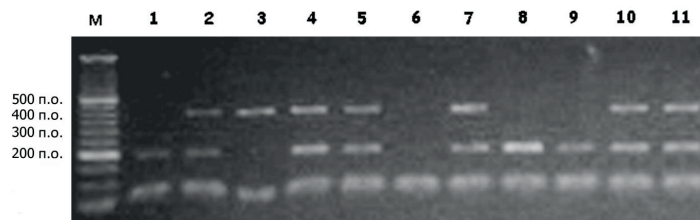
Для встановлення впливу факторів ризику атеросклерозу на розвиток ІАТІ в осіб з різними генотипами за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* представників обох груп було поділено на підгрупи за статтю, ІМТ (ІМТ < 25 кг/м<sup>2</sup> та  $\geq 25$  кг/м<sup>2</sup>) та звичкою куріння. Оскільки кількість осіб з АГ у групі пацієнтів з ІАТІ істотно відрізнялася від відповідного показника в контрольній групі ( $P = 0,006$ ), представників обох груп за наявністю чи відсутністю АГ не розподіляли.

Визначення поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX* проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Венозну кров для генотипування набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл із додаванням калієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 ммоль/л) як антикоагулянта ("Sarstedt", Німеччина). Кров заморожували та зберігали при  $-20$  °С. ДНК з неї виділяли із використанням наборів GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт поліморфізму *rs2592551*, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого

– 5'- GGACTTAGAAAGGAACGGATGA-3', зворотного – 5'- CTTGAGAAAAGGCAAAG CAGAC-3'. Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буферу, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль/л кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази (ThermoFisher Scientific, США), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація ділянки, що містила фрагмент 9-го екзона гена *GGCX*, складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 61,5°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 20 год з 5 ОД рестриктази *Mbi*I у буфері Tango такого складу: 33 ммоль/л тріс-ацетату (рН 7,9), 10 ммоль/л ацетату магнію, 66 ммоль/л ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 8527-й позиції гена *GGCX* містився цитозин, ампліфікат, який складався з 381 пари основ (п.о.), розщеплювався рестриктазою *Mbi*I на два фрагменти – 189 і 192 п.о. У разі заміни цитозину на тимін сайт рестрикції для *Mbi*I втрачався, а в гелі візуалізувався один фрагмент завдовжки 381 п.о. (рисунок).

Ампліфікати вивченого фрагмента гена *GGCX* після рестрикції розділяли в 1,5 %-му агарозному гелі, що містив бромистий етидй. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140В) проводили протягом 30 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).



Результати рестрикційного аналізу поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX*. М – маркер молекулярної маси (п.о. – пари нуклеїнових основ); доріжки 1,8,9 відповідають С/С-генотипу; доріжки 2,4,5,7,10,11 – С/Т-генотипу; доріжка 3 – Т/Т-генотипу; доріжка 6 – проба без ДНК пацієнта

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах а також відповідності цього розподілу рівновазі Харді – Вайнберга застосовували  $\chi^2$ -критерій Пірсона. Достовірність відмінностей середніх величин у групах з різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступною поправкою Бонфероні. Для встановлення ризику розвитку ІАТІ розраховували відношення шансів (OR) та 95% довірчий інтервал (CI) для доміантної, рецесивної, наддоміантної та адитивної моделей успадкування. Їх релевантність оцінювали за допомогою інформаційного критерію Акайке. Такі фактори ризику ІАТІ, як вік, стать, ІМТ, куріння та АГ були застосовані як коваріати під час мультиваріабельного логістичного регресійного аналізу. Всі тести були двобічними, значення  $P < 0,05$  вважали статистично значущими.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Клінічна характеристика 170 пацієнтів з ІАТІ та 124 осіб контрольної групи представлена у табл. 1. Не знайдено статистичної значимої різниці між групами порівняння під час аналізу за співвідношенням осіб різної статі ( $P = 0,294$ ), кількістю курців ( $P = 0,403$ ) та середніми значеннями ІМТ ( $P = 0,279$ ). Водночас середні значення систолічного і діастолічного АТ та концентрації глюкози крові у хворих на ІАТІ були істотно вищими,

Таблиця 1. Клінічна характеристика хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт

Показник	Контроль (n = 124)	Хворі на інсульт (n = 170)	P
Вік, роки	76,7 ± 10,2	64,7 ± 9,5	<0,001
Стать, жінки/чоловіки	45/79	72/98	0,294
Курці, n (%)	31 (25,0)	50 (29,4)	0,403
Індекс маси тіла, кг/м <sup>2</sup>	27,6 ± 5,0	28,2 ± 4,3	0,279
Артеріальний тиск, мм рт.ст.			
систоличний	152,6 ± 23,4	167 ± 29,2	<0,001
діастолічний	86,3 ± 12,4	95,4 ± 15,6	<0,001
Вміст глюкози натще, ммоль/л	5,29 ± 0,7	5,92 ± 1,5	<0,001

Примітка: категоріальні змінні порівнювали за допомогою  $\chi^2$ -тесту, кількісні – за допомогою t-тесту

ніж у групі контролю ( $P < 0,001$ ). При цьому середній вік представників контролю (76,7 ± 10,2 роки) був вищим, ніж у пацієнтів з інсультом ( $P < 0,001$ ). Остання обставина збільшувала надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ІАТІ в осіб контрольної групи в майбутньому. Розподіл генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* у дослідній групі (частота мінорного алеля 0,294) та в контролі (частота мінорного алеля 0,231) відповідав рівновазі Харді – Вайнберга ( $P > 0,05$ ).

У табл. 2 наведені частоти, з якими зустрічались окремі варіанти за досліджуванним поліморфізмом гена *GGCX* у пацієнтів з ІАТІ та осіб контрольної групи, а також показані результати порівняння їх між групами загалом та за наявністю чи відсутністю деяких факторів ризику атеросклерозу. Встановлено, що різниця в розподілі різних алельних варіантів (C/C, C/T і T/T) між дослідною та контрольною групою не була статистично значущою ( $P = 0,113$ ). При цьому аналіз відповідного розподілу в підгрупах за гендерною ознакою виявив достовірну різницю в осіб жіночої статі ( $P = 0,016$ ) та її відсутність серед чоловіків ( $P = 0,307$ ). Дослідження частоти генотипів за вивченим поліморфізмом у групах порівняння не показало істотних відмінностей після розподілу на підгрупи з нормальним і

підвищеним ІМТ ( $P = 0,361$  та  $P = 0,202$  відповідно). І нарешті, порівняння частоти різних генотипів за поліморфізмом локусом *rs2592551* серед некурців продемонструвало близьку до рівня статистичної значущості відмінність між пацієнтами з ІАТІ та особами контрольної групи ( $P = 0,056$ ). Різницю в розподілі генотипів між групами порівняння серед осіб, які курять, не встановлено ( $P = 0,572$ ).

Результати аналізу асоціації генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* з ризиком настання ІАТІ в рамках чотирьох моделей успадкування представлені в табл. 3. Статистично значущий зв'язок у загальній групі був встановлений для рецесивної ( $P_{\text{спост.}} = 0,047$ ) та адитивної ( $P_{\text{спост.}} = 0,046$ ) моделей. Ризик розвитку ІАТІ в осіб з генотипом T/T був у 3,1 (95% довірчий інтервал (CI) = 1,016-9,566) раза вищий, ніж у носіїв основного алеля (C/C і C/T) (відповідно до рецесивної моделі) та у 3,2 (95% CI = 1,018-9,946) раза вищий, ніж у носіїв C/C-генотипу (відповідно до адитивної моделі). Проте статистична значущість цих показників зникла після поправки на вік, стать, звичку куріння, ІМТ та АГ.

Відсутність серед жінок контрольної групи носіїв T/T-генотипу завадила провести розрахунок ризику розвитку ІАТІ для носіїв цього алельного варіанта в рамках рецесивної та адитивної моделей успадкування. Проте

Таблиця 2. Розподіл генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* у пацієнтів з ішемічним атеротромботичним інсультом

Група	n	Генотип						P
		C/C (%)	(95% CI)	C/T (%)	(95% CI)	T/T (%)	(95% CI)	
Загалом								
Контроль	124	70 (56,5)	(47,7-65,2)	50 (40,3)	(31,7-49,0)	4 (3,2)	(0,1-6,3)	0,113
Інсульт	170	88 (51,8)	(44,3-59,3)	66 (38,8)	(31,5-46,2)	16 (9,4)	(5,0-13,8)	
Стать								
Жінки								
Контроль	45	23 (51,1)	(36,5-65,7)	22 (48,9)	(34,3-63,5)	0 (0)	(-)	0,016
Інсульт	72	41 (56,9)	(45,5-68,4)	22 (30,6)	(19,9-41,2)	9 (12,5)	(4,9-20,1)	
Чоловіки								
Контроль	79	47 (59,5)	(48,7-70,3)	28 (35,4)	(24,9-46,0)	4 (5,1)	(0,2-9,9)	0,307
Інсульт	98	47 (48,0)	(38,1-57,9)	44 (44,9)	(35,1-54,8)	7 (7,1)	(2,0-12,2)	
Індекс маси тіла (ІМТ)								
ІМТ < 25 кг/м <sup>2</sup>								
Контроль	38	19 (50,0)	(31,1-65,9)	17 (44,7)	(28,9-60,6)	2 (5,3)	(0-12,4)	0,361
Інсульт	41	20 (48,8)	(33,5-64,1)	15 (36,6)	(21,8-51,3)	6 (14,6)	(3,8-25,5)	
ІМТ ≥ 25 кг/м <sup>2</sup>								
Контроль	85	51 (60,0)	(49,6-70,4)	32 (37,6)	(27,4-48,0)	2 (2,4)	(0-5,6)	0,202
Інсульт	129	68 (52,7)	(44,1-61,3)	51 (39,5)	(31,1-48,0)	10 (7,8)	(3,1-12,4)	
Куріння								
Некурці								
Контроль	93	52 (55,9)	(45,8-66,0)	40 (43,0)	(33,0-53,1)	1 (1,1)	(0-3,17)	0,056
Інсульт	120	65 (54,2)	(45,3-63,1)	45 (37,5)	(28,8-46,2)	10 (8,3)	(3,4-13,3)	
Курці								
Контроль	31	18 (58,0)	(40,7-75,4)	10 (32,3)	(15,8-48,7)	3 (9,7)	(0-20,1)	0,572
Інсульт	50	23 (46,0)	(32,2-59,8)	21 (42,0)	(28,3-55,7)	6 (12,0)	(2,3-21,0)	

Примітка: n – кількість осіб у підгрупі; P – статистична значущість відмінностей за  $\chi^2$ -критерієм; 95% CI – 95% довірчий інтервал

було встановлено, що в осіб жіночої статі з гетерозиготним генотипом (C/T) ризик розвитку ІАТІ був достовірно нижчим, ніж в осіб цієї статі з генотипами C/C і T/T ( $P_{\text{спост.}} = 0,048$ ; відношення шансів (OR) $_{\text{спост.}} = 0,460$ ; 95% CI = 0,213-0,994) (відповідно до наддомінантної моделі). Слід відзначити, що достовірність результатів зберігалася навіть після долучення до аналізу таких факторів ризику, як вік, ІМТ, куріння та АГ ( $P_{\text{попр.}} = 0,046$ ; OR $_{\text{попр.}} = 0,474$ ; 95% CI = 0,257-0,971).

Аналіз зв'язку різних варіантів гена *GGCX* за локусом *rs2592551* з урахуванням звички куріння показало, що генотип T/T у некурців збільшував ризик інсульту в 8,4 раза (95% CI = 1,051-66,559;  $P_{\text{спост.}} = 0,045$ ), якщо порівнювати з носіями основного алеля (відповідно до рецесивної моделі). Проте статистична значимість OR втрачалася після поправки на вік, стать, ІМТ та АГ. Зв'язок різних генотипів за досліджуваним поліморфізмом з розвитком ІАТІ в осіб чоловічої статі, курців

Таблиця 3. Аналіз зв'язку поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX* з ішемічним атеротромботичним інсультом з урахуванням чотирьох моделей успадкування

Модель	P <sub>спост.</sub>	OR <sub>спост.</sub> (95% CI)	P <sub>попр.</sub>	OR <sub>попр.</sub> (95% CI)	ІКА
<b>Загалом</b>					
Домінантна	0,426	1,208 (0,758-1,924)	0,860	0,949 (0,533-1,692)	21,86
Рецесивна	0,047	3,117 (1,016-9,566)	0,103	3,121 (0,794-12,274)	17,78
Наддомінантна	0,795	0,939 (0,585-1,508)	0,337	0,750 (0,416-1,350)	22,42
Аддитивна*	0,843	1,050 (0,648-1,702)	0,526	0,823 (0,452-1,501)	19,74
	0,046	3,182 (1,018-9,946)	0,138	2,874 (0,713-11,593)	
<b>Стать</b>					
<b>Жінки:</b>					
Домінантна	0,538	0,790 (0,374-1,670)	0,183	0,534 (0,212-1,345)	23,27
Рецесивна	0,014	–	–	–	–
Наддомінантна	0,048	0,460 (0,213-0,994)	0,046	0,474 (0,257-0,971)	20,16
Аддитивна*	0,147	0,561 (0,251-1,225)	0,095	0,450 (0,176-1,150)	14,78
	–	–	–	–	
<b>Чоловіки:</b>					
Домінантна	0,127	1,594 (0,876-2,901)	0,304	1,503 (0,691-3,268)	16,53
Рецесивна	0,571	1,442 (0,407-5,115)	0,210	2,751 (0,566-13,373)	18,55
Наддомінантна	0,204	1,484 (0,807-2,729)	0,693	1,171 (0,536-2,558)	17,25
Аддитивна*	0,155	1,571 (0,843-2,930)	0,478	1,340 (0,597-3,010)	18,51
	0,396	1,750 (0,480-6,378)	0,167	3,142 (0,619-15,934)	
<b>Індекс маси тіла (ІМТ)</b>					
<b>ІМТ &lt; 25 кг/м<sup>2</sup></b>					
Домінантна	0,914	1,050 (0,434-2,539)	0,766	0,845 (0,278-2,567)	16,51
Рецесивна	0,185	3,086 (0,583-16,336)	0,397	2,741 (0,265-28,317)	14,53
Наддомінантна	0,461	0,713 (0,289-1,756)	0,457	0,647 (0,205-2,037)	15,98
Аддитивна*	0,712	0,838 (0,329-2,138)	0,561	0,706 (0,219-2,279)	16,39
	0,232	2,850 (0,511-15,901)	0,473	2,395 (0,220-26,024)	
<b>ІМТ ≥ 25 кг/м<sup>2</sup></b>					
Домінантна	0,294	1,346 (0,773-2,343)	0,981	0,992 (0,503-1,955)	18,90
Рецесивна	0,113	3,487 (0,745-16,330)	0,132	3,964 (0,661-23,789)	16,85
Наддомінантна	0,782	1,083 (0,617-1,902)	0,477	0,778 (0,389-1,553)	19,93
Аддитивна*	0,541	1,195 (0,675-2,118)	0,666	0,857 (0,424-1,731)	18,47
	0,097	3,750 (0,787-17,863)	0,156	3,722 (0,605-22,882)	
<b>Куріння</b>					
<b>Некурці</b>					
Домінантна	0,799	1,073 (0,623-1,850)	0,330	0,715 (0,365-1,403)	22,80
Рецесивна	0,045	8,364 (1,051-66,559)	0,244	4,013 (0,388-41,537)	16,14
Наддомінантна	0,416	0,795 (0,458-1,381)	0,154	0,609 (0,308-1,204)	22,20
Аддитивна*	0,713	0,900 (0,514-1,577)	0,211	0,645 (0,324-1,283)	18,01
	0,051	8,000 (0,992-64,532)	0,316	3,354 (0,314-35,788)	
<b>Курці</b>					
Домінантна	0,293	1,625 (0,658-4,016)	0,121	2,712 (0,768-9,574)	14,53
Рецесивна	0,747	1,273 (0,294-5,506)	0,174	3,685 (0,562-24,173)	15,54
Наддомінантна	0,382	1,521 (0,594-3,891)	0,514	1,502 (0,442-5,101)	14,87
Аддитивна*	0,317	1,643 (0,621-4,350)	0,244	2,215 (0,580-8,453)	16,53
	0,563	1,565 (0,343-7,135)	0,100	5,479 (0,722-41,608)	

Примітка: 95% CI – 95% довірчий інтервал; ІКА – інформаційний критерій Акайке; P<sub>спост.</sub> – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR<sub>спост.</sub> – спостережуване відношення шансів; P<sub>попр.</sub> – значення P після поправки на вік, стать, звичку курити, ІМТ та АГ у загальній групі; поправки на вік, звичку курити, ІМТ та АГ у підгрупах за статтю; поправки на навик, стать, звичку курити та АГ у підгрупах за ІМТ; поправки на вік, стать, ІМТ та АГ – у підгрупах за звичкою курити; OR<sub>попр.</sub> – відношення шансів після поправки на коваріати.

\* Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння С/Т-генотипу з С/С-генотипом, другий рядок – порівняння Т/Т-генотипу з С/С-генотипом

та окремо в осіб з нормальним та підвищеним ІМТ встановлений не був. Щодо визначення найкращої моделі успадкування ознаки, то в основній групі та більшості підгруп такою була рецесивна модель.

Останнім етапом нашого дослідження був аналіз впливу різних генотипів за *rs2592551* поліморфізмом на ІМТ, АТ, вміст глюкози крові натще, ЛП плазми крові та деякі показники коагулограми в пацієнтів з ішемічним інсультом. Однофакторний дисперсійний аналіз виявив залежність концентрації глюкози крові від генотипів за досліджуваним поліморфізмом ( $P = 0,040$ ; табл. 4). Застосування поправки Бонфероні показало, що нижчі значення у пацієнтів з С/Т-генотипом були близькими до рівня статистичної значущості, якщо порівнювати з генотипом С/С ( $P = 0,053$ ), і достовірно не відрізнялись від відповідного показника в носіїв варіанту Т/Т ( $P = 0,303$ ). Зв'язок різних

генотипів з усіма іншими досліджуваними показниками встановлений не був.

## ОБГОВОРЕННЯ

Одержані в представленому дослідженні результати вказують на те, що існують вірогідні відмінності в розподілі генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX* між хворими на ІАТІ та особами контрольної групи. Ці відмінності є характерними для осіб жіночої статі та без звички куріння. Також є підстави припускати, що цей поліморфний сайт може впливати на концентрацію глюкози крові у хворих з ішемічним інсультом.

Ген *GGCX* у людини розташований на короткому плечі 2-ї хромосоми (2p12) і має довжину 16815 нуклеотидів [13]. Він складається з регуляторної частини, 14 інтронів та 15 екзонів, в яких закодовано 758 амінокислотних залишків інтегрального

**Таблиця 4. Клінічна характеристика пацієнтів з ішемічним атеротромботичним інсультом з урахуванням генотипів за поліморфізмом *rs2592551* гена *GGCX*, (M ± SD)**

Показник	С/С	С/Т	Т/Т	Загалом	Р
Кількість осіб	88	66	16	170	–
Індекс маси тіла	28,5 ± 4,6	27,8 ± 3,7	28,2 ± 5,4	28,2 ± 4,3	0,586
Артеріальний тиск, мм рт. ст.					
систолічний	164,3 ± 30,0	170,7 ± 29,9	166,6 ± 20,2	170,0 ± 29,2	0,403
діастолічний	94,8 ± 15,9	95,6 ± 15,7	97,2 ± 13,4	95,4 ± 15,6	0,846
Загальний холестерин*, ммоль/л	5,11 ± 1,5	4,93 ± 1,5	5,14 ± 1,9	5,05 ± 1,5	0,758
Ліпопротеїни, ммоль/л					
високої густини*	1,03 ± 0,3	1,00 ± 0,3	1,08 ± 0,3	1,02 ± 0,3	0,630
низької густини*,	3,28 ± 1,4	3,21 ± 1,4	3,25 ± 1,8	3,26 ± 1,4	0,966
Тригліцериди*, ммоль/л	1,78 ± 0,8	1,58 ± 0,8	1,78 ± 0,7	1,70 ± 0,8	0,295
Протромбіновий час, с	9,42 ± 2,1	9,59 ± 1,9	9,29 ± 2,1	9,48 ± 2,0	0,798
Тромбіновий час, с	16,46 ± 3,6	16,70 ± 3,4	16,29 ± 4,2	16,54 ± 3,6	0,878
Фібриноген, г/л	3,93 ± 1,3	3,86 ± 1,1	4,23 ± 1,0	3,93 ± 1,2	0,553
Вміст глюкози натще, ммоль/л	6,14 ± 1,7	5,55 ± 1,2	6,24 ± 1,8	5,92 ± 1,5	0,040**

Примітка: \* n = 83 особи з С/С-генотипом, 59 осіб з С/Т-генотипом та 15 осіб з Т/Т-генотипом.

\*\* P = 0,053 при порівнянні С/С- та С/Т-генотипів; P = 0,303 при порівнянні С/Т- і Т/Т-генотипів; P = 0,999 при порівнянні С/С- та Т/Т-генотипів (за результатами поправки Бонфероні)

трансмембранного глікопротеїну [14].

Однонуклеотидний поліморфізм *rs2592551* розташований у 9-му екзоні гена *GGCX* та являє собою заміну цитозину на тимін, що однак не призводить до заміни амінокислоти у 406-й позиції поліпептидного ланцюга зрілого білка (інша назва цього локусу – Arg406Arg). За останні роки опублікована низка праць, в яких чітко продемонстровано вплив цього поліморфного локусу на дозування варфарину в японській [15], північно-американській популяціях [16] та серед китайських пацієнтів з миготливою аритмією [17]. Механізм, що лежить в основі такого впливу, наразі не з'ясований. Пропонується, що заміна цитозину на тимін, яка призводить до зміни триплету CGC на CGT, хоча і не викликає зміни структури протеїну, проте може впливати на швидкість його трансляції, а отже, і змінювати сумарну активність *GGCX* у клітині. Також не відкидається можливість того, що цей генетичний локус може знаходитись в нерівноважному зчепленні з іншими поліморфними сайтами гена *GGCX*.

З моменту відкриття гена *GGCX* [18] дослідження його однонуклеотидних поліморфізмів ведуться у декількох напрямках. Найбільша увага прикута до вивчення їх ролі у дозуванні оральних антикоагулянтів, зокрема варфарину [19-21]. Нещодавній широкомасштабний мета-аналіз продемонстрував, що поліморфний локус *rs11676382* гена *GGCX* є достовірним предиктором дози варфарину [22], натомість дані іншого подібного мета-аналізу не виявили такої залежності для сайтів *rs699664* та *rs12714145* [23].

З іншого боку, в останні роки з'явилася незначна кількість праць, присвячених вивченню ролі генетичного поліморфізму *GGCX* у розвитку серцево-судинних патологій. Результати широкогеномного аналізу, виконаного в 2016 р. у Тайвані на виборці із 8566 осіб, показали достовірний зв'язок поліморфного локусу *rs6738645* гена *GGCX* з розвитком ішемічної хвороби серця [24].

При цьому дослідження, проведені в нідерландській та японській популяціях, не виявило асоціації різних гаплотипів генів *VKORC1* та *GGCX* з розвитком венозного тромбозу [25,26]. Зв'язок цих гаплотипів із вмістом вітамін-К-залежних факторів згортання крові знайдений також не був.

У 2010 р. Shyu та співавт. вивчали зв'язок поліморфізму генів *GGCX* (*rs699664*), *VKORC1* (*rs9923231*) та *NQO1* (*rs1800566*) з розвитком ІАТІ. Дослідники виявили протективний ефект зазначених поліморфізмів відносно ризику розвитку ішемічного інсульту. Синергізм досліджуваних локусів був більш вираженим у пацієнтів, які не були курцями та не вживали спиртних напоїв [27]. Подібний протективний ефект щодо розвитку ішемічного інсульту також був знайдений нами в представленому дослідженні у жінок з гетерозиготним генотипом за поліморфним локусом 9-го екзона гена *GGCX*. Натомість, у попередній нашій праці зв'язок поліморфізму *rs699664* з розвитком ІАТІ в цій самій виборці виявлений не був [28].

Щодо знайденого нами впливу поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX* на концентрацію глюкози крові у пацієнтів з ІАТІ, то дана обставина може бути пояснена причетністю *GGCX* до регуляції функціонування ОС. Останній, як сьогодні відомо, поряд зі своїми класичними функціями посилює секрецію інсуліну  $\beta$ -клітинами підшлункової залози та сприяє утилізації глюкози периферичними тканинами [29]. Дослідження останніх років продемонстрували, що *GGCX* через  $\gamma$ -карбоксилювання пригнічує ендокринну функцію ОС [30], опосередковано впливаючи таким чином і на вміст глюкози плазми крові, і на концентрацію інсуліну. Певна річ, що припущення щодо зв'язку поліморфного локусу *rs2592551* з концентрацією глюкози крові потребує як експериментальних, так і клінічних доказів, а тому зумовлює необхідність продовжувати дослідження в цьому напрямі.

Підсумовуючи, можна сказати, що представлене дослідження є першим повідом-



ленням про аналіз асоціації поліморфізму *rs2592551* гена *GGCX* з ішемічним інсультом. Одержані результати показали, що у представників української популяції існує зв'язок між частотою генотипів за поліморфізмом *rs2592551* і розвитком ІАТІ. Ці відмінності зокрема є характерними для осіб жіночої статі та без звички куріння. Показано, що пацієнти з генотипом Т/Т мали більшу ймовірність розвитку ІАТІ, ніж носії основного С-алеля. Водночас гетерозиготний генотип (С/Т) в осіб жіночої статі мав достовірний протективний ефект щодо розвитку ішемічного інсульту.

*Роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням «Зв'язок алейного поліморфізму “генів ектопічної кальцифікації” з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень», № держреєстрації 0115U000688.*

**Е.И. Дубовик, В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, А.В. Атаман**

#### АНАЛІЗ СВЯЗИ

#### ПОЛИМОРФИЗМА *rs2592551* ГЕНА $\gamma$ -ГЛУТАМИЛКАРБОКСИЛАЗЫ С РАЗВИТИЕМ ИШЕМИЧЕСКОГО АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Представлены результаты определения полиморфизма *rs2592551* гена  $\gamma$ -глутамилкарбоксилазы у 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом и 124 лиц без острой цереброваскулярной патологии (контрольная группа). Установлено, что существует связь между этим заболеванием и указанным полиморфным вариантом. Риск развития инсульта у лиц с генотипом Т/Т был выше, чем у носителей основного С-аллеля (отношение шансов (OR) = 3,117; 95% доверительный интервал (CI) = 1,016-9,566; P = 0,047). После разделения пациентов групп сравнения на подгруппы, сформированные по наличию некоторых факторов риска атеросклероза, подобная связь была выявлена у лиц женского пола и без привычки курения. В то же время гетерозиготный генотип (С/Т) у женщин имел достоверный протективный эффект в отношении развития ишемического инсульта, если сравнивать с генотипами С/С и Т/Т (OR = 0,460; 95% CI = 0,213-0,994; P = 0,048). Достоверность этих результатов сохранялась даже после поправки на возраст, индекс массы тела, курение и артериальную гипертензию.

Ключевые слова:  $\gamma$ -глутамилкарбоксилаза; полиморфизм генотипов; ишемический инсульт.

**Ye.I. Dubovyk, V.Yu. Harbuzova, O.A. Obukhova, A.V. Ataman**

#### ANALYSIS OF $\gamma$ -GLUTAMYL CARBOXYLASE GENE *rs2592551* POLYMORPHISM ASSOCIATION WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE

The results of  $\gamma$ -glutamyl carboxylase gene *rs2592551* polymorphism determining in 170 patients with ischemic atherothrombotic stroke and 124 subjects without acute cerebrovascular disease (control group) have been evaluated. Obtained results revealed that *rs2592551* polymorphism was related to ischemic stroke in Ukrainian population. The risk for this disease in patients with T/T genotype was higher than in major C-allele carriers (odds ratio (OR) = 3.117; 95% confidence interval (CI) = 1.016-9.566; P = 0.047). After dividing patients into subgroups, formed by the presence of certain risk factors for atherosclerosis, similar association has been established for women and non-smokers. At the same time, the heterozygous genotype (C/T) in females had significantly protective effect against ischemic stroke development when compared to C/C and T/T genotypes (OR = 0.460; 95 % CI = 0.213-0.994; P = 0.048). Statistical significance of these results persisted even after adjustment for age, body mass index, smoking and hypertension.

Key words:  $\gamma$ -glutamyl carboxylase; gene polymorphism; ischemic stroke.

*Sumy State University, Ukraine*

#### REFERENCES

1. Soler EP, Ruiz VC. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences. *Curr Cardiol Rev.* 2010;6(3):138-49. doi: 10.2174/157340310791658785
2. Margueritta S, Asmar E, Naoum J, Arbid E. Vitamin K Dependent Proteins and the Role of Vitamin K2 in the Modulation of Vascular Calcification: A Review. *Oman Med J.* 2014;29(3):172-7. doi: 10.5001/omj.2014.44
3. Pugliese G, Iacobini C, Fantauzzi CB, Menini S. The dark and bright side of atherosclerotic calcification. *Atherosclerosis.* 2015;238:220-30.
4. Stanford W. Coronary artery calcification as an indicator of preclinical coronary artery disease. *Radiographics.* 1999;19:1409-19.
5. Cortellaro M, Baldassarre D, Cofrancesco E, Tremoli E, Colombo A, Boschetti C, Paoletti R. Relation between hemostatic variables and increase of common carotid intima media thickness in patients with peripheral arterial disease. *Stroke.* 1996;27:450-4. doi: 10.1161/01.STR.27.3.450
6. He M, Wen Z, He X, Xiong S, Liu F, Xu J, Li J, Xie Q, Jian Z, Chen F, Xiao B, Pu X, He S. Observation on tissue factor pathway and some other coagulation parameters during the onset of acute cerebrocardiac thrombotic diseases. *Thromb Res.* 2002;107(5):223-8.

7. Jood K, Ladenvall P, Tjärnlund-Wolf A, Ladenvall C, Andersson M, Nilsson S, Blomstrand C, Jern C. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke. *Stroke*. 2005;36:2077-81. DOI: 10.1161/01.STR.0000183617.54752.69
8. Viegas C, Rafael M, Enriquez J, Teixeira A, Vitorino R, Luis I, Costa R, Santos S, Cavaco S, Neves J, Macedo A, Willems B, Vermeer C, Simes D. Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):399-408. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304823
9. Laurance S, Lemarié C, Blostein M. Growth Arrest-Specific Gene 6 (gas6) and Vascular Hemostasis. *Adv Nutr*. 2012;3:196-203. doi: 10.3945/an.111.001826
10. Oldenburg J, Marinova M, Muller-Reible C, Watzka M. The Vitamin K Cycle. *Vitam Horm*. 2008;78:35-62. doi: 10.1016/S0083-6729(07)00003-9.
11. Watzka M, Geisen C, Scheer M, Wieland R, Wiegering V, Dörner T, Laws H, Gümrük F, Hanalioglu S, Ünal S, Albayrak D, Oldenburg J. Bleeding and non-bleeding phenotypes in patients with GGCX gene mutations. *Thromb Res*. 2014;134:856-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2014.07.004>
12. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41.
13. Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE.  $\gamma$ -Glutamyl carboxylase (GGCX) tag SNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *J Thromb Haemost*. 2007;5:2227-34. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02744.x
14. Tie JK, Stafford DW. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*. 2016;14:236-47. doi: 10.1111/jth.13217.
15. Cha P, Mushirola T, Takahashi A, Saito S, Shimomura H, Suzuki T, Kamatani N, Nakamura Y. High-resolution SNP and haplotype maps of the human gamma-glutamyl carboxylase gene (GGCX) and association study between polymorphisms in GGCX and the warfarin maintenance dose requirement of the Japanese population. *Hum Genet*. 2007;52:856-64. DOI 10.1007/s10038-007-0183-9
16. Schelleman H, Brensinger C, Chen J, Finkelman B, Rieder M, Kimmel S. New genetic variant that might improve warfarin dose prediction in African Americans. *Br J Clin Pharm*. 2010;70(3):393-9. DOI:10.1111/j.1365-2125.2010.03709.x
17. Kamali X, Wulasihan M, Yang Y, Lu W, Liu Z, He P. Association of GGCX gene polymorphism with warfarin dose in atrial fibrillation population in Xinjiang. *Lipids Health Dis*. 2013;2(149):1-5. doi:10.1186/1476-511X-12-149
18. Wu S, Cheung W, Frazier D, Stafford D. Cloning and Expression of the cDNA for Human  $\gamma$ -Glutamyl Carboxylase. *Science*. 1991;254:1634-6.
19. Cavallari L, Perera M, Wadelius M, Deloukas P, Taube G, Patel S, Aquino-Michaels K, Viana A, Shapiro N, Nutescu E. Association of the GGCX (CAA)16/17 repeat polymorphism with higher warfarin dose requirements in African Americans. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(2):152-8.
20. King C, Deych E, Milligan P, Eby C, Lenzini P, Grice G, Porche-Sorbet R, Ridker P, Gage B. Gamma-glutamyl carboxylase and its influence on warfarin dose. *Thromb Haemost*. 2010;104(4):750-4. doi:10.1160/TH09-11-0763.
21. Wypasek E, Branicka A, Awsiuk M, Sadowski J, Undas A. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: A potential role of CYP4F2 and GGCX polymorphisms. *Thromb Res*. 2010;134:604-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2014.06.022>
22. Sun Y, Wub Z, Li S, Qin X, Li T, Xie L, Deng Y, Chen J. Impact of gamma-glutamyl carboxylase gene polymorphisms on warfarin dose requirement: A systematic review and meta-analysis. *Thromb Res*. 2015;135:739-47.
23. Tian L, Zhang J, Xiao S, Huang J, Zhang Y, Shen J. Impact of polymorphisms of the GGCX gene on maintenance warfarin dose in Chinese populations: Systematic review and meta-analysis. *Meta Gene*. 2015;5:43-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2015.05.003>
24. Assimes T, Lee I, Juang J, Guo X, Wang T, Kim E, Lee W, Absher D, Chiu Y, Hsu C, Chuang L, Quertermous L, Hsiung C, Rotter J, Sheu W, Chen Y, Taylor K. Genetics of Coronary Artery Disease in Taiwan: A Cardiometabochip Study by the Taichi Consortium. *PLoS One*. 2016;11(3):472-9. doi:10.1371/journal.pone.0138014
25. Ikejiri M, Wada H, Sakamoto Y, Ito N, Nishioka J, Nakatani K, Tsuji A, Yamada N, Nakamura N, Ito M, Nobori T. The association of protein S Tokushima-K196E with a risk of deep vein thrombosis. *Int J Hematol*. 2010;92:302-5. DOI 10.1007/s12185-010-0671-0
26. Visser M, Roshani S, Rutten J, Vlieg A, Vos H, Rosendaal F, Reitsma P. Haplotypes of VKORC1, NQO1 and GGCX, their effect on activity levels of vitamin K-dependent coagulation factors, and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 2011;106:563-5. doi:10.1160/TH11-05-0339
27. Shyu HY, Fong CS, Fu YP, Shieh JC, Yin JH, Chang CY, Wang HW, Cheng CW. Genotype polymorphisms of GGCX, NQO1, and VKORC1 genes associated with risk susceptibility in patients with large-artery atherosclerotic stroke. *Clin Chim Acta*. 2010;411:840-5. doi:10.1016/j.cca.2010.02.071
28. Garbuzova VY, Stroy DA, Dosenko VE, Dubovyk YI, Borodenko AO, Shimko KA, Obukhova OA, Ataman OV. Association of allelic polymorphisms of genes matrix Gla-protein system with ischemic atherothrombotic stroke. *Fiziol Zh*. 2015;61(1):19-27. [Ukrainian].
29. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:137-46.
30. Ferron M, Lacombe J, Germain A, Oury F, Karsenty G. GGCX and VKORC1 inhibit osteocalcin endocrine functions. *J Cell Biol*. 2015;208(6):761-76. doi/10.1083/jcb.201409111

*Матеріал надійшов до редакції 13.09.2015*