

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»**

Обухова Ольга Анатоліївна



УДК 616.831-005.1-056.7:577.112.85.161.2

**РОЗПОДІЛ ПОЛІМОРФІЗМІВ VDR-ГЕНА В УКРАЇНСЬКОГО НАСЕЛЕННЯ
ТА ПОШУК ЇХ ЗВ'ЯЗКУ ІЗ РОЗВИТКОМ АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО
ІНСУЛЬТУ**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2014

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Сумському державному університеті МОН України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Атаман Олександр Васильович,
Сумський державний університет,
завідувач кафедри фізіології і
патофізіології з курсом медичної біології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
Федота Олена Михайлівна,
Харківський національний університет
імені В.Н. Каразіна,
професор кафедри загальної практики –
сімейної медицини.

доктор медичних наук, професор
Абраменко Ірина Вікторівна,
ДУ «Національний науковий центр радіаційної
медицини НАМН України»,
головний науковий співробітник лабораторії
молекулярної біології відділу клінічної імунології.

Захист відбудеться «25» вересня 2014 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.562.02 ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (03115, м. Київ, проспект Перемоги 119-121, корпус ЛДК, 4-й поверх, конференц-зал).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (04050, м. Київ, вул. Мельникова, 53).

Автореферат розісланий «_____» серпня 2014 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Г.В. Стефанович

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ураження судин головного мозку становлять одну з найактуальніших проблем сучасної медицини і є одним із провідних чинників, що викликають смерть та інвалідизацію населення планети. У 2006 році ВООЗ визнала інсульт як глобальну неінфекційну епідемію, жертвами якої є переважно люди похилого і старечого віку (Mathers C.D., Loncar D., 2006; Roger V.L. et al., 2011). Наслідки гострих розладів мозкового кровообігу є тяжкими: одна третина хворих помирає протягом року, переважно у перший місяць, друга залишається глибоко інвалідизованою і лише третя відновлюється частково або повністю. В Україні щорічно реєструють близько 100 000 випадків інсульту, і смертність від них, на жаль, є вищою, ніж в країнах Заходу (Menon R., 2010, Roger V.L. et al., 2011). Кожен четвертий інсульт у нашій країні є повторним. Більше третини його випадків припадає на людей працездатного віку (Мищенко Т.С., 2010). Серед гострих порушень мозкового кровообігу, що ведуть до фатальних наслідків, найбільша частка припадає на ішемічні інсульти, зумовлені атеросклеротичними ураженнями судин (Roger V.L. et al., 2011; Scarborough P. et al., 2011). За даними літератури, атеротромботичний механізм інсульту лежить в основі 30-40% випадків загибелі мозкової тканини – інфаркту мозку (Mathers C.D., Loncar D., 2006; Scarborough P. et al., 2011).

Розвиток тромбозу в уражених атеросклерозом судинах пов'язують з дегенеративними змінами атероматозних бляшок, серед яких процесам кальцифікації надають особливо великого значення (Price P.A., 1998; Zittermann A., Koerfer R., 2008; Shanker J. et al., 2011; Szeto F.L. et al., 2012). Відкладання солей кальцію у структури судинної стінки – ектопічна кальцифікація – відбувається внаслідок порушення балансу між прокальциногенними і природними антикальциногенними чинниками організму. До перших відносять вітамін D, а до других – систему матричного *Gla*-протеїну (MGP). Посилений вплив вітаміну D, так само як і зменшення активності MGP, можуть бути чинниками, що сприяють кальцифікації атеросклеротичних бляшок і розвитку тромбів на їхній поверхні (Price P.A. et al., 2000; Ortlepp J.R. et al., 2001; Norman P.E., Powell J.T., 2005; Cozzolino M. et al., 2011).

Внутрішньоклітинний білок, що є рецептором до вітаміну D (VDR), може відігравати важливу роль у наведених вище процесах. З одного боку, через нього здійснюються не тільки фізіологічні впливи гормонально активної форми вітаміну D – 1,25-діоксивітаміну D, а й цілий ряд токсичних ефектів D-гіпервітамінозу (Miyamoto K. et al., 1997; Sutton A.L., MacDonald P.N., 2003; Pike J. W., 2004; Cozzolino M. et al., 2011). З другого боку, VDR входить до системи MGP, оскільки саме через нього опосередковується регуляторний вплив багатьох чинників, що посилюють експресію гена *MGP* (Farzaneh-Far A. et al., 2001; Proudfoot D., Shanahan C.M., 2006; Wang X., et al., 2009). Кількісні і якісні характеристики VDR, від яких залежить функціональна здатність і активність цього білка, визначаються структурою та інтенсивністю експресії відповідного гена. Серед факторів, що впливають на характеристики гена *VDR* важливе значення має його однонуклеотидний поліморфізм. Вивчення алельного поліморфізму гена *VDR*

розпочалося наприкінці 90-х – на початку 2000-х років (Miyamoto K. et al., 1997; Selvaraj P. et al., 2000). Так, було встановлено асоціацію поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* з цукровим діабетом (Chang T.J. et al., 2000; Motohashi Y. et al., 2003), порушеннями опорно-рухового апарату (Barr R. et al., 2009; Tanriover M.D. et al., 2010), патологією нирок (Yokoyama K. et al., 1998; Vigo G.E. et al., 2000; Selvaraj P. et al., 2005), онкологічними захворюваннями (Curran J.E. et al., 1999; Kim H.S. et al., 2001; Schondorf T. et al., 2003), сечокам'яною хворобою (Bid H.K. et al., 2005; Chen W.Y. et al., 2005; Mossetti G. et al., 2003; Nishijima S. et al., 2002).

Що стосується зв'язку алельного поліморфізму *VDR*-гена з ураженнями кровоносних судин та їх ускладненнями, то робіт в цьому напрямі невелика кількість (Lee B.K. et al., 2001; Muray S. et al., 2003; Kammerer C.M. et al., 2004; Ortlepp J.R. et al., 2005). Саме ця обставина і спонукала нас до проведення власних досліджень ролі поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* гена *VDR* у розвитку уражень кровоносних судин, що завершуються інсультом. Вибір наведених поліморфних варіантів зумовлювався тим, що саме вони, за даними літератури, можуть мати стосунок до патогенезу серцево-судинних хвороб і патологічних процесів у людини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано відповідно до плану наукових досліджень Сумського державного університету МОН України. Вона є самостійним фрагментом науково-дослідних тем «Роль алельного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб», № держреєстрації 0110U005038, і «Зв'язок однонуклеотидного поліморфізму генів *MGP* і *VDR* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту», № 62.13.01-01.13/14.ЗП.

Мета дослідження. Визначення частоти алелів і генотипів за поліморфними варіантами *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* гена рецептора вітаміну D (*VDR*) у хворих з ішемією головного мозку та оцінка внеску поліморфних варіантів цього гена в ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

Завдання дослідження:

1. Встановити частоти алелів і генотипів поліморфних варіантів гена *VDR* – *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* у осіб контрольної групи і у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом серед мешканців Сумської області.
2. Дослідити зв'язок поліморфних варіантів гена *VDR* з ішемічним інсультом у пацієнтів, що мають різні фактори ризику атеросклерозу (чоловіча стать, гіперліпопротеїнемія, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет, збільшений індекс маси тіла, куріння).
3. Проаналізувати зв'язок алельних варіантів гена *VDR* з порушеннями ліпопротеїнового обміну і коагуляції крові у хворих з цереброваскулярною патологією.
4. Дослідити зв'язок генотипів за поліморфним варіантом G-7A гена *MGP* з розвитком ішемічного інсульту у пацієнтів з різними поліморфними варіантами гена *VDR*.

Об'єкт дослідження – генетичний поліморфізм гена *VDR*.

Предмет дослідження – участь генетичних чинників (однонуклеотидного поліморфізму гена *VDR*) у розвитку гострих порушень мозкового кровообігу.

Методи дослідження – молекулярно-генетичні методи вивчення поліморфних варіантів генів, біохімічні методи визначення показників ліпідного обміну та стану згортальної і протизгортальної систем крові, статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів.

Встановлено частоти алелів і генотипів поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* гена *VDR* у населення Сумської області і досліджено їх асоціацію з ішемічним атеротромботичним інсультом.

Проаналізовано зв'язок вивчених одонуклеотидних поліморфізмів гена *VDR* на асоціацію відомих факторів ризику атеросклерозу і його ускладнень (чоловіча стать, артеріальна гіпертензія, цукровий діабет, збільшений індекс маси тіла, куріння) з ішемічним інсультом. З'ясовано, що в осіб з генотипами *F/F*, *b/b*, *a/a*, *a/A*, і *T/T* існує асоціація між наявністю артеріальної гіпертензії та розвитком ішемічного інсульту.

Виявлено зв'язок між поліморфними варіантами *ApaI* і *BsmI* та показниками ліпопротеїнового обміну (ХС-ЛПНГ, ХС-ЛПДНГ, ХС-ЛПВГ, тригліцериди, індекс атерогенності) та розвитком дисліпопротеїнемії атерогенного характеру у хворих з ішемічним інсультом. У групі хворих на інсульт чоловічої статі гомозиготи *A/A* поліморфного варіанту *ApaI* мали нижчі показники ліпопротеїнового обміну (холестерол у складі ліпопротеїдів різної густини: низької – $2,51 \pm 0,26$ ммоль/л, дуже низької – $0,59 \pm 0,06$ ммоль/л та високої – $1,16 \pm 0,06$ ммоль/л, тригліцериди – $1,30 \pm 0,14$ ммоль/л, індекс атерогенності – $3,13 \pm 0,57$), ніж пацієнти з генотипами *a/A* і *a/a*, а у гомозигот *B/B* поліморфного варіанту *BsmI* рівень холестеролу у складі ліпопротеїнів дуже низької густини ($0,53 \pm 0,06$ ммоль/л) і тригліцеридів ($1,17 \pm 0,14$ ммоль/л) був нижчим, ніж у носіїв генотипів *b/B* і *b/b*.

Встановлено, що генотипи *ff* і *B/B* поліморфних варіантів *FokI* та *BsmI* асоційовані з гіперкоагуляційним синдромом у хворих, що перенесли ішемічний інсульт. У гомозигот *ff* з ішемічним інсультом реєстрували підвищений тромбіновий час ($17,7 \pm 0,65$ сек.) і зменшення швидкості спонтанного фібринолізу ($466,8 \pm 5,5$ хв.) проти носіїв генотипів *F/F* і *F/f*, а у гомозигот *B/B* реєстрували знижений протромбіновий час ($8,69 \pm 0,35$ сек.) і тромбіновий час ($15,0 \pm 0,48$ сек.) і збільшення швидкості спонтанного фібринолізу ($489,2 \pm 8,3$ хв.) проти *b/b* і *b/B*. У пацієнтів-гомозигот за *A*-алелем поліморфного варіанту *ApaI*, ризик розвитку синдрому гіперкоагуляції крові у 2,7 рази вищий, ніж у гомозигот за *a*-алелем.

Виявлено асоціацію між ішемічним атеротромботичним інсультом та поліморфним варіантом *G-7A* гена *MGP* у осіб жіночої статі. У жінок-гомозигот за мінорним алелем *A/A*, ризик інсульту у 6,6 разів вищий, ніж у носіїв основного алеля (*G/A+G/G*). Виявлено асоціацію поліморфного варіанту *G-7A* гена *MGP* з ішемічним інсультом в осіб з мінорним алелем поліморфних варіантів *FokI* і *ApaI* гена *VDR*. Ризик виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб з генотипом *A/A* (*G-7A*) гена *MGP* у 4,9 раза вищий ніж у носіїв мінорного алеля за поліморфним варіантом *FokI* і 4,5 раза вищий за поліморфним варіантом *ApaI* гена *VDR* ніж у гомозигот за основним *G*-алелем.

Практичне значення одержаних результатів. Дисертаційна робота є фундаментальним дослідженням. Одержані результати уточнюють коло генів-кандидатів, поліморфізм яких може відігравати провідну роль у патогенезі склеротичних уражень судин мозку та їх ускладнень.

Дані про асоціацію поліморфних варіантів гена *VDR* з порушеннями ліпопротеїнового обміну і процесів коагуляції крові у хворих з інсультом можуть бути використані для прогнозування ймовірності розвитку дисліпопротеїнемії атерогенного характеру і гіперкоагуляційного синдрому у пацієнтів з гострими порушеннями мозкового кровообігу, що мають ішемічний характер.

Результати наукових досліджень, викладених у дисертації, впроваджено в науково-дослідну роботу і навчальний процес на кафедрах патофізіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, Івано-Франківського національного медичного університету, Української медичної стоматологічної академії МОЗ України (м. Полтава), кафедрі фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету МОН України.

Особистий внесок здобувача. Автором проведено збір та аналіз наукової літератури за темою дисертації, розроблено і обґрунтовано план досліджень та їх методичне забезпечення, організовано забір зразків крові для дослідження. Дисертантом проведено молекулярно-генетичні дослідження, статистичну обробку, науковий аналіз і узагальнення одержаних результатів, написано і оформлено всі розділи дисертації, обґрунтовано та сформульовано висновки, написано та підготовлено до друку наукові публікації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації повідомлено і обговорено на Всеросійській науковій конференції молодих вчених «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, РФ, 2012), V науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль 2012), I Міжнародній науково-технічній конференції «Современные проблемы физики, химии и биологии. ФизХимБио – 2012» (Севастополь, 2012), науково-практичних конференціях студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів «Актуальні питання теоретичної медицини» (Суми, 2011, 2012), науково-практичній конференції з міжнародною участю студентів та молодих вчених «Науковий потенціал молоді – прогрес медицини майбутнього» (Ужгород, 2013), VIII Всеросійській науково-практичній конференції за міжнародної участі «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, РФ, 2014), міжнародних науково-практичних конференціях студентів та молодих вчених (Суми, 2013, 2014), 79-й Всеросійській науковій конференції студентів і молодих вчених за міжнародної участі «Молодёжная наука и современность» (Курск, РФ, 2014), республіканській науково-практичній конференції «Метаболический синдром: проблемы и достижения» (Ташкент, Узбекистан, 2014).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 24 наукові роботи, з них 5 – у фахових наукових виданнях, рекомендованих ДАК МОН України, 1 – закордонна, 16 тез у матеріалах конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертацію викладено на 178 сторінках (основний обсяг становить 149 сторінок). Вона має такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів (п'ять розділів), висновки, додатки. Список літератури містить 265 джерел (16 – кирилицею, 249 – латиницею). Роботу ілюстровано 62 таблицями та 23 рисунками і 12 додатками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження

У роботі використано зразки венозної крові 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАІ) віком від 40 до 85 років (середній вік – $64,7 \pm 0,73$ роки). Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, даних МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST, на підставі анамнестичних даних і особливостей клінічного перебігу хвороби, даних ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови, ЕКГ.

Контрольна група складалася зі 124 осіб, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували вивченням анамнезу, зняттям електрокардіограми і вимірюванням артеріального тиску. Контрольна група і група хворих з ІАІ не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі, проте середній вік першої ($76,7 \pm 0,93$ роки) був істотно вищим ніж другої.

Молекулярно-генетичні дослідження. Виділення геномної ДНК проводили з використанням набору «Diatom DNA Prep 100» (ООО «Лаборатория «Изоген», Росія). Генотипування за поліморфними варіантами *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* гена *VDR* і *G-7A* гена *MGP* проводили методом полімеразної ланцюгової реакції в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Праймери для ПЛР синтезовано фірмою «Metabion» (Німеччина) (табл. 1).

Таблиця 1

Умови проведення PCR і рестрикційного аналізу

Ген	Полі-морфний варіант	Послідовність нуклеотидів у праймерах	T (°C) віджигу	Ферменти	Фрагменти рестрикції, п. н.
<i>VDR</i>	<i>FokI</i> rs2228570	П 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTG-3' З 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'	64,5°	<i>FokI</i>	267, 204, 63
	<i>BsmI</i> rs1544410	П 5'-AGGGAGACGTAGCAAAAGGAG-3' З 5'-TGTCCCAAGGTCACAATAAC-3'	64,0°	<i>BsmI</i>	425, 232, 193
	<i>ApaI</i> rs7975232	П 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' З 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'	64,5°	<i>ApaI</i>	501, 284, 217
	<i>TaqI</i> rs731236	П 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' З 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'	64,5°	<i>TaqI</i>	501, 294, 207
<i>MGP</i>	<i>G-7A</i> rs1800801	П 5'-CTAGTTCAGTGCCAACCCTTCCCCACC-3' З 5'-TAGCAGCAGTAGGGAGAGAGGCTCCCA-3'	64,5°	<i>NcoI</i>	500, 240, 260

Продукти ампліфікації фрагментів ДНК гена *VDR* підлягали гідролітичному розщепленню ендонуклеазами рестрикції *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* [Bid et al., 2009; Nabuchi et al., 2000; Ortlepp et al., 2003], а гена *MGP* – рестриктазою *NcoI* [Garbuzova V.Yu. et al., 2012](«Fermentas», Литва). Детекцію продуктів рестриції проводили методом горизонтального електрофорезу в 2,5% агарозному гелі (Sigma-Aldrich,

США). Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетових променях за допомогою автоматичної системи відеозчитування «Vi-Tran» в транслюмінаторі («Біоком», Росія).

Біохімічні методи визначення показників ліпідного обміну та стану згортальної і протизгортальної систем крові. Стан процесів ліпідного обміну оцінювали за загальноприйнятими показниками плазми крові, такими як загальний холестерол, холестерол у складі ліпопротеїдів різної густини: низької, дуже низької та високої (ХС-ЛПНГ, ХС-ЛПДНГ, ХС-ЛПВГ), тригліцериди. Дослідження проводилося ензиматичним колориметричним методом за допомогою наборів реактивів «Олвекс діагностикум» (Росія) (Горячковский А.М., 1994). Враховуючи концентрації зазначених ліпідів, було обчислено індекс атерогенності, збільшення якого понад три одиниці відображає наявність дисліпопротеїнемії атерогенного характеру. Стан процесів згортання крові у хворих з ІАІ і осіб контрольної групи оцінювали за загальноприйнятими показниками: протромбіновий час, тромбіновий час, вміст фібриногену у плазмі крові, інтенсивність спонтанного фібринолізу за допомогою стандартного комплексу лабораторних тестів (Меньшиков В.В., 1987).

Статистичний аналіз. Перед перевіркою статистичних гіпотез проводили аналіз розподілу величин у вибірках на відповідність закону нормального розподілу за допомогою тесту Колмогорова-Смирнова. Визначення статистичної значущості відмінностей між двома вибірками проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. У роботі застосовано визначення показника χ^2 Пірсона, однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), непараметричні тести (U-тест Манна-Вітні), метод логістичної регресії. Статистично значущими вважали тільки ті відмінності між показниками, для яких величина показника ймовірності похибки була $p < 0,05$. Розрахунки проводили з використанням програми SPSS-17.

Результати дослідження та їх обговорення

Розподіл частоти алелів і генотипів поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* гена *VDR* у практично здорових осіб і у хворих з ішемічним інсультом. Був досліджений розподіл частот алелів і генотипів однонуклеотидних поліморфізмів *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* гена *VDR* у осіб контрольної групи і у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом. Порівняння частот алелів і генотипів поліморфних варіантів гена *VDR* у хворих основної і контрольної груп дало наступні результати.

При генотипуванні за поліморфним варіантом *FokI* нами було отримано частоти генотипів у контрольній групі: F/F – 27,4%, F/f – 48,4%, f/f – 24,2%. Співвідношення алелів становило $p_F=0,52$ і $q_f=0,48$. У хворих на ІАІ розподіл генотипів становив: F/F – 23,5%, F/f – 53,5%, f/f – 22,9%; алелі розподілились порівну – $p_F=0,5$, $q_f=0,5$. Встановлено наступні частоти генотипів за поліморфним варіантом *BsmI* гена *VDR* в умовно здорових осіб: $b/b=46,0\%$, $b/B=41,9\%$, $B/B=12,1\%$. Частоти алелів становили: $p_b=0,67$ та $q_B=0,33$. Розподіл генотипів у хворих на ішемічний інсульт становив: $b/b=41,8\%$, $b/B=43,5\%$, $B/B=14,7\%$. Частота алелів в цій групі становила: $p_b=0,64$ і $q_B=0,36$. Для поліморфного варіанту *ApaI* розподіл генотипів у хворих на ішемічний інсульт склав: $a/a=26,5\%$; $a/A=50,0\%$ і

$A/A=23,5\%$, тим часом як у контрольній групі відповідні показники дорівнювали: $a/a=31,5\%$; $a/A=42,7$ і $A/A=25,8\%$. Розподіл частот алелів у хворих з ІАІ і у групі контролю склав: $p_a=0,53$ і $q_A=0,47$ та $p_a=0,51$ і $q_A=0,49$ відповідно. При генотипуванні за поліморфним варіантом *TaqI* нами було визначено частоти генотипів у контрольній групі: $T/T=43,5\%$, $T/t=45,2\%$, $t/t=11,3\%$. Частоти *T*- і *t*-алелів поліморфного варіанту в контролі склали: $p_T=0,66$ і $q_t=0,34$ відповідно. У хворих з ІАІ генотипи розподілилися таким чином: $T/T=40,0\%$, $T/t=48,2\%$ і $t/t=11,8\%$. Частоти алелів в цій групі становили: $p_T=0,64$ і $q_t=0,36$. Ми перевірили відповідність співвідношення частот алелів і генотипів поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* гена *VDR* закону Харді-Вайнберга. Різниця між очікуваними і спостережуваними частотами генотипів виявилася статистично незначущою.

Зв'язок поліморфних варіантів гена *VDR* з ішемічним інсультом у пацієнтів, що мають різні фактори ризику розвитку атеросклерозу.

Був виявлений зв'язок генотипів поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* гена *VDR* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском. Аналіз груп пацієнтів, утворених з урахуванням генотипу за поліморфним варіантом *FokI* показав, що серед носіїв генотипу *F/F* існує статистично значуща залежність між рівнем артеріального тиску і ризиком розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту. В контрольній групі було 48,5% осіб з нормальним артеріальним тиском і 51,5% осіб з підвищеним тиском, а у групі хворих з ішемічним інсультом відповідно 15% і 85%. В осіб з артеріальною гіпертензією ішемічний інсульт виявлявся частіше, ніж у пацієнтів з нормальним артеріальним тиском ($P=0,002$) (табл. 2).

Таблиця 2

Розподіл осіб різних генотипів за поліморфними варіантами гена *VDR* у контрольній групі і групі хворих з ІАІ залежно від величини артеріального тиску

Артеріальний тиск	<i>FokI</i>		<i>BsmI</i>		<i>ApaI</i>				<i>TaqI</i>	
	<i>F/F</i>		<i>b/b</i>		<i>a/a</i>		<i>a/A</i>		<i>T/T</i>	
	кон-ль	хворі	кон-ль	хворі	кон-ль	хворі	кон-ль	хворі	кон-ль	хворі
АТ(-) (n)	16 (48,5%)	6 (15,0%)	23 (41,1%)	16 (22,5%)	17 (43,6%)	7 (15,6%)	21 (42,0%)	22 (25,9%)	21 (39,6%)	15 (22,1%)
АТ(+) (n)	17 (51,5%)	34 (85,0%)	33 (58,9%)	55 (77,5%)	22 (56,4%)	38 (84,4%)	29 (58,0%)	63 (74,1%)	32 (60,4%)	53 (77,9%)
χ^2	9,629		5,055		8,046		3,768		4,396	
P	0,002		0,025		0,005		0,052		0,036	

Примітка: n – кількість осіб, кон-ль – контрольна група, АТ(-) – нормальний артеріальний тиск, АТ(+)- підвищений артеріальний тиск, P – рівень значущості.

Отримані нами дані узгоджуються з даними інших дослідників (Е.В. Ших, Н.М. Милотова, 2009), у яких повідомлялося, що у хворих на артеріальну гіпертензію з генотипами *F/F* і *F/f*, у порівнянні з пацієнтами з генотипом *f/f*, реєструвалися більш

високі значення середньодобового і середнього систолічного артеріального тиску удень.

Інформативним виявилось вивчення частот осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском у групах порівняння залежно від варіантів генотипу за поліморфним варіантом *BsmI* гена *VDR* (табл. 2). Так, серед носіїв генотипу *b/b* у контрольній групі виявлено 41,1% осіб з нормальним тиском і 58,9% з підвищеним, а у групі хворих з ІАІ відповідно 22,5% і 77,5%. Статистичний аналіз отриманих даних виявив, що серед носіїв генотипу *b/b* хворі з ІАІ мають статистично значущо вищу частоту артеріальної гіпертензії, ніж пацієнти контрольної групи ($P=0,025$). При аналізі груп пацієнтів, утворених з урахуванням генотипу за поліморфним варіантом *ApaI* гена *VDR*, отримані наступні дані (табл. 2). Серед носіїв генотипу *a/a* в контрольній групі було 43,6% осіб з нормальним і 56,4% осіб з підвищеним АТ, а у групі хворих з ІАІ відповідно 15,6% і 84,4%. Статистичний аналіз наведених даних вказує на те, що у гомозигот *a/a* існує статистично значима залежність між рівнем АТ і ймовірністю розвитку ІАІ: в осіб з артеріальною гіпертензією ІАІ виявлявся частіше, ніж у пацієнтів з нормальним АТ ($P=0,005$). Серед осіб з генотипом *a/A* у контролі було 42,0% осіб з нормальним АТ і 58,0% з підвищеним АТ, а у групі пацієнтів з ІАІ їхня кількість становила відповідно 25,9% і 74,1%. Тому частота осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском з генотипом *a/A* у групах порівняння є статистично значущою ($P=0,052$). Щодо вивчення поліморфного варіанту *TaqI*, то серед носіїв генотипу *T/T* у контрольній групі виявлено 39,6% осіб з нормальним тиском і 60,4% з підвищеним, а у групі хворих з ішемічним інсультом відповідно 22,1% і 77,9% (табл. 2). Аналіз отриманих даних виявив, що серед носіїв генотипу *T/T* хворі на ІАІ мають статистично значущо вищу частоту артеріальної гіпертензії, ніж пацієнти контрольної групи ($P=0,036$).

Асоціації між показниками індексу маси тіла, паління і цукрового діабету окремо з генотипами поліморфних варіантів гена *VDR* з розвитком ішемічного інсульту не було виявлено.

Зв'язок поліморфних варіантів гена *VDR* з порушеннями ліпопротеїнового обміну і коагуляції крові у хворих з цереброваскулярною патологією. У групі хворих на інсульт чоловічої статі гомозиготи *A/A* за поліморфним варіантом *ApaI* мали нижчі показники ліпопротеїнового обміну: холестерол у складі ліпопротеїдів різної густини: низької, дуже низької та високої (ХС-ЛПНГ, ХС-ЛПДНГ, ХС-ЛПВГ), тригліцериди, індекс атерогенності), ніж пацієнти з іншими генотипами, а у гомозигот *B/B* за поліморфним варіантом *BsmI* рівень холестеролу у складі ліпопротеїнів дуже низької густини і тригліцеридів був нижчим, ніж у носіїв генотипів *b/B* і *b/b* (табл. 3).

У хворих з ІАІ, що мали нормальні показники ліпопротеїнового обміну, генотип *A/A* поліморфного варіанту *ApaI* гена *VDR* виявлявся частіше, ніж у пацієнтів з дисліпопротеїнемією атерогенного характеру (ДАХ), у таких підгрупах: у чоловіків ($P=0,006$), у пацієнтів з нормальним артеріальним тиском ($P=0,044$), у тих, хто не має цукрового діабету ($P=0,024$), палить ($P=0,017$), має нормальні показники коагуляції крові ($P=0,019$).

Таблиця 3

Вміст ліпідів плазми крові у хворих чоловічої статі з ІАІ залежно від варіантів генотипу за поліморфними варіантами *ApaI* і *BsmI* гена *VDR* (M±m)

<i>Генотипи</i>	<i>a/a (n=24)</i>	<i>a/A (n=44)</i>	<i>A/A (n=21)</i>	F	P
Загальний холестерол	5,26±0,29	4,87±1,39	4,26±1,22 (21)	3,001	0,055
ХС-ЛПНГ	3,47±0,27	3,18±0,20	2,51±0,26	3,298	0,042
ХС-ЛПДНГ	0,87±0,08	0,70±0,05	0,59±0,06	4,320	0,016
ХС-ЛПВГ	0,92±0,05	0,99±0,04	1,16±0,06	5,281	0,007
Тригліцериди	1,91±0,17	1,53±0,10	1,30±0,14	4,320	0,016
Індекс атерогенності	5,63±0,77	4,55±0,46	3,13±0,57	3,467	0,036
<i>Генотипи</i>	<i>b/b (n = 36)</i>	<i>b/B (n = 39)</i>	<i>B/B (n = 14)</i>		
ХС-ЛПДНГ	0,79±0,06	0,72±0,05	0,53±0,06	3,114	0,049
Тригліцериди	1,74±0,13	1,58±0,11	1,17±0,14	3,114	0,049

Примітка: усі показники, крім індексу атерогенності, в ммоль/л; *n* – кількість пацієнтів, **F** – критерій Фішера.

Filus et al. (2008) з'ясували, що існує зв'язок між *FokI* поліморфізмом і деякими показниками ліпідного спектра плазми крові: у носіїв основного алеля (*F/F*, *F/f*) рівень антиатерогенного холестеролу у складі ліпородеїнів високої густини нижчий, ніж у гомозигот за мінорним алелем (*f/f*).

Біохімічні ознаки гіперкоагуляційного синдрому зареєстровані серед хворих з ІАІ, які є носіями генотипу *ff* поліморфного варіанту *FokI* гена *VDR*, і характеризуються більшими показниками тромбінового часу і зменшенням швидкості спонтанного фібринолізу. Ознаки гіперкоагуляції крові виявлені у гомозигот *B/B* за поліморфним варіантом *BsmI*, які мали достовірно менші середні величини протромбінового і тромбінового часу та збільшення швидкості спонтанного фібринолізу (табл. 4).

Таблиця 4

Показники коагуляції крові у хворих з ІАІ залежно від варіантів генотипу за поліморфними варіантами *FokI* і *BsmI* гена *VDR* (M±m)

<i>Генотипи</i>	<i>F/F (n = 40)</i>	<i>F/f (n = 91)</i>	<i>f/f (n = 39)</i>	F	P
Тромбіновий час, сек	16,4±0,59	16,1±0,33	17,7±0,65	3,107	0,047
Спонтанний фібриноліз, хв	484,6±6,5	482,4±3,6	466,8±5,5	3,135	0,046
<i>Генотипи</i>	<i>b/b (n = 71)</i>	<i>b/B (n = 74)</i>	<i>B/B (n = 25)</i>		
Протромбіновий час, сек	9,84±0,25	9,39±0,23	8,69±0,35	3,157	0,045
Тромбіновий час, сек	17,1±0,45	16,6±0,41	15,0±0,48	3,103	0,048
Спонтанний фібриноліз, хв	471,1±4,0	483,9±4,2	489,2±8,3	3,393	0,036

Примітка: *n* – кількість пацієнтів, **F** – критерій Фішера.

За даними проведеного нами регресивного аналізу щодо зв'язку між поліморфним варіантом *ApaI* і гіперкоагуляцією крові (ГКК) у хворих з ІАІ встановлено, що у гомозигот за *A*-алелем ризик розвитку ГКК у 2,7 рази вищий, ніж у гомозигот за *a*-алелем (OR=2,677, P=0,032) (табл. 5).

Таблиця 5

Аналіз ризику гіперкоагуляції крові у хворих з ІАІ залежно від генотипу за поліморфним варіантом *ApaI* гена *VDR*

	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI нижній	95% CI верхній
ГКК	<i>a/A</i>	0,110	0,369	0,089	0,766	1,116	0,541	2,302
	<i>A/A</i>	0,981	0,456	4,618	0,032	2,667	1,090	6,524

Примітка: порівнюються гомозиготи за мінорним алелем (*A/A*) з носіями основного алеля (*a/a+a/A*). CR – коефіцієнт регресії, SE – стандартна похибка, WS – статистика Вальда, P – рівень значущості, OR – відношення шансів, CI – довірчий інтервал

Зв'язок генотипів за поліморфним варіантом *G-7A* гена *MGP* з розвитком ішемічного інсульту у пацієнтів з різними поліморфними варіантами гена *VDR*.

У проведених нами дослідженнях отримано частоти алелів поліморфного варіанту *G-7A* гена *MGP* в основній і контрольній групах. Співвідношення алелів в основній групі становило $p_G=0,60$ і $q_A=0,40$, в контрольній – $p_G=0,69$ і $q_A=0,31$. У результаті проведеного аналізу розподілу генотипів за *G-7A* поліморфним варіантом гена *MGP* було встановлено, що зв'язок між ішемічним атеротромботичним інсультом і поліморфним варіантом гену *MGP* (*G-7A*) наближається до статистично значущого. Співвідношення генотипів *G/G*, *G/A* і *A/A* в основній групі становило 35,9; 48,8 і 15,3%, а в контрольній відповідно – 43,5; 50,0 і 6,5% (P=0,051) (табл. 6.)

Таблиця 6

Частота генотипів за поліморфним варіантом *G-7A* гена *MGP* у контрольній групі і у хворих з ІАІ загалом і окремо за статтю

Генотипи	Загалом		Жінки		Чоловіки	
	Контроль	Хворі	Контроль	Хворі	Контроль	Хворі
<i>G/G</i> , n	54 (43,5%)	61 (35,9%)	18 (40,0%)	21 (29,2%)	36 (45,6%)	40 (40,8%)
<i>G/A</i> , n	62 (50,0%)	83 (48,8%)	25 (55,6%)	34 (47,2%)	37 (46,8%)	49 (50,0%)
<i>A/A</i> , n	8 (6,5%)	26 (15,3%)	2 (4,4%)	17 (23,6%)	6 (7,6%)	9 (9,2%)
статистики	$\chi^2=5,945$, P=0,051		$\chi^2=7,621$, P=0,022		$\chi^2=0,451$, P=0,798	

Примітка: n – кількість пацієнтів, P – рівень значущості, χ^2 -критерій Пірсона., $\chi_{кр.}=5,991$

Залежність між генотипом і ІАІ має статеві особливості. При порівнянні частот генотипів в основній і контрольній групах за поліморфним варіантом *G-7A* окремо у жінок і чоловіків отримані такі результати. Серед жінок контрольної групи генотип *G/G* мали 40,0%, *G/A* – 55,6%, *A/A* – 4,4%, а серед хворих з ІАІ відповідно –

29,2; 47,2 і 23,6%. Генотип *G/G* був виявлений у 45,6, *G/A* – 46,8 і *A/A* – у 7,6% практично здорових чоловіків, а серед хворих з ІАІ відповідно – у 40,8; 50,0 і 9,2%. Таким чином, виявлено статистично значущу асоціацію поліморфного варіанту *G-7A* гена *MGP* з ІАІ в осіб жіночої статі ($P=0,022$) і відсутність зв'язку в чоловіків ($P=0,798$) (табл. 6). Особи жіночої статі, гомозиготні за мінорним алелем *A/A*, у 6,6 рази частіше хворіють на ІАІ, ніж жінки-носії основного алеля (*G/G* і *G/A*) ($P=0,015$) (табл. 7).

Таблиця 7

Аналіз ризику ІАІ залежно від генотипу за поліморфним варіантом *G-7A* гена *MGP* в осіб жіночої і чоловічої статі

Стать	CR	SE	WS	P	OR	95% CI нижній	95% CI верхній
Жінки	1,894	0,775	5,976	0,015	6,645	1,456	30,339
Чоловіки	0,207	0,550	0,142	0,706	1,230	0,419	3,617

Примітка: порівнюються гомозиготи *A/A* з носіями основного алеля (*G/A+G/G*). CR – коефіцієнт регресії, SE – стандартна похибка, WS – статистика Вальда, P – рівень значущості, OR – відношення шансів, CI – довірчий інтервал

Проведено порівняння в основній і контрольній групах за частотами генотипів поліморфних варіантів *G-7A* гена *MGP* і *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* гена *VDR*. Був виявлений зв'язок поліморфного варіанту *G-7A* гена *MGP* з ішемічним інсультом в осіб з мінорним алелем (*F/f+f/f*) поліморфного варіанту *FokI* гена *VDR*. Ризик виникнення ІАІ в осіб з мінорним алелем за поліморфним варіантом *FokI* гена *VDR* і генотипом *A/A* поліморфізму *G-7A* гена *MGP* у 4,9 рази вищий, ніж у гомозигот за *G*-алелем (табл. 8).

Таблиця 8

Аналіз ризику ІАІ залежно від генотипу за поліморфним варіантом *G-7A* гена *MGP* в осіб з мінорним алелем за поліморфним варіантом *FokI* гена *VDR*

Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
<i>G/A</i>	0,289	0,292	0,979	0,322	1,335	0,753	2,365
<i>A/A</i>	1,586	0,588	7,272	0,007	4,884	1,542	15,465

Примітка: порівнюються гомозиготи *A/A* з носіями *G*-алеля (*G/G+G/A*). CR – коефіцієнт регресії, SE – стандартна похибка, WS – статистика Вальда, P – рівень значущості, OR – відношення шансів, CI – довірчий інтервал.

Також було виявлено зв'язок між генотипом *A/A* поліморфного варіанту *G-7A* гена *MGP* і ішемічним інсультом в осіб, що мали мінорний алель (*a/A+A/A*) поліморфного варіанту *ApaI* гена *VDR*. У гомозигот за *A*-алелем ризик розвитку ішемічного інсульту виявився у 4,5 разів вищий, ніж у гомозигот за *G*-алелем поліморфного варіанту *G-7A* гена *MGP* у групі осіб, що мають мінорний алель (*a/A+A/A*) однонуклеотидного поліморфізму *ApaI* гена *VDR* (табл. 9).

Аналіз ризику ІАІ залежно від генотипу за поліморфним варіантом G-7A гена MGP в осіб з мінорним алелем за поліморфним варіантом ApaI гена VDR

Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI нижній	95% CI верхній
G/A	0.166	0.300	0.308	0.579	1.181	0.656	2.126
A/A	1.504	0.591	6.478	0.011	4.500	1.413	14.329

Примітка: порівнюються гомозиготи A/A з носіями G-алеля (G/G+G/A). CR – коефіцієнт регресії, SE – стандартна похибка, WS – статистика Вальда, P – рівень значущості, OR – відношення шансів, CI – довірчий інтервал.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і розв'язання наукової задачі, суть якої полягає в з'ясуванні асоціації поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* гена *VDR* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту серед мешканців Сумської області, що мають різні фактори ризику гострих порушень мозкового кровообігу.

1. Аналіз частот генотипів поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* гена *VDR* у хворих на ішемічний інсульт і осіб контрольної групи показав, що співвідношення частот генотипів за поліморфним варіантом *FokI* у хворих становили *F/F* – 23,5%, *F/f* – 53,5%, *f/f* – 22,9%, в контрольній групі – *F/F* – 27,4%, *F/f* – 48,4%, *f/f* – 24,2%. Частота генотипів за поліморфним варіантом *BsmI* у хворих – *b/b* – 41,8%, *b/B* – 43,5%, *B/B* – 14,7%, в групі контролю – *b/b* – 46,0%, *b/B* – 41,9%, *B/B* – 12,1%. Розподіл генотипів за поліморфним варіантом *ApaI* у хворих – *a/a* – 26,5%, *a/A* – 50,0%, *A/A* – 23,5%, у контрольній групі – *a/a* – 31,5%, *a/A* – 42,7%, *A/A* – 25,8%. Частота генотипів поліморфного варіанту *TaqI* у хворих – *TT* – 40,0%, *T/t* – 48,2%, *t/t* – 11,8%, в контрольній групі – *T/T* – 40,0%, *T/t* – 48,2%, *t/t* – 11,8%.

2. Встановлено, що в осіб з генотипами *F/F*, *b/b*, *a/a*, *a/A*, і *T/T* поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* існує асоціація між наявністю артеріальної гіпертензії та розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту.

3. У групі хворих на інсульт чоловічої статі гомозиготи *A/A* поліморфного варіанту *ApaI* мали нижчі показники ліпопротеїнового обміну (холестерол у складі ліпопротеїдів різної густини: низької – $2,51 \pm 0,26$ ммоль/л, дуже низької – $0,59 \pm 0,06$ ммоль/л та високої – $1,16 \pm 0,06$ ммоль/л, тригліцериди – $1,30 \pm 0,14$ ммоль/л, індекс атерогенності – $3,13 \pm 0,57$), ніж пацієнти з генотипами *a/A* і *a/a*, а у гомозигот *B/B* поліморфного варіанту *BsmI* рівень холестеролу у складі ліпопротеїнів дуже низької густини ($0,53 \pm 0,06$ ммоль/л) і тригліцеридів ($1,17 \pm 0,14$ ммоль/л) був нижчим, ніж у носіїв генотипів *b/B* і *b/b*.

4. У хворих з ішемічним інсультом, що мали нормальні показники ліпопротеїнового обміну, генотип *A/A* поліморфного варіанту *ApaI* виявлявся частіше, ніж у пацієнтів з дисліпопротеїнемією атерогенного характеру, у таких

підгрупах: у чоловіків; у пацієнтів з нормальним артеріальним тиском; у тих, хто не має цукрового діабету; палить, має нормальні показники коагуляції крові.

5. У гомозигот ff з ішемічним інсультом реєстрували підвищений тромбіновий час ($17,7 \pm 0,65$ сек.) і зменшення швидкості спонтанного фібринолізу ($466,8 \pm 5,5$ хв.) проти носіїв генотипів F/F і F/f , а у гомозигот B/B реєстрували знижений протромбіновий час ($8,69 \pm 0,35$ сек.) і тромбіновий час ($15,0 \pm 0,48$ сек.) і збільшення швидкості спонтанного фібринолізу ($489,2 \pm 8,3$ хв.) проти b/b і b/B . У гомозигот A/A поліморфного варіанту $ApaI$, що мають інсульт, ризик гіперкоагуляційних змін крові у 2,7 разів вищий, ніж у хворих з генотипом a/a .

6. Виявлено асоціацію між IAI та поліморфним варіантом $G-7A$ гена MGP у осіб жіночої статі. У жінок-гомозигот за мінорним алелем A/A ризик інсульту у 6,6 разів вищий, ніж у носіїв основного алеля ($G/A+G/G$). Ризик виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб з генотипом A/A ($G-7A$) гена MGP у 4,9 рази вищий у носіїв мінорного алеля за поліморфним варіантом $FokI$ і 4,5 рази вищий за поліморфним варіантом $ApaI$ гена VDR , ніж у гомозигот за основним G -алелем.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Частота поліморфізму $ApaI$ гена рецептора вітаміну D у хворих з ішемічним інсультом / В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, Ю.О. Атаман, Є.І. Дубовик, та ін. // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т.7, №2. – С. 142-148. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики статті, провів молекулярно-генетичні дослідження і статистичний аналіз, сформулював висновки, підготував статтю до друку).

2. Аналіз зв'язку $FokI$ поліморфізму гена рецептора вітаміну D з ішемічним інсультом в осіб різної статі / О.А. Обухова, В.Ю. Гарбузова, Ю.О. Атаман, А.О. Бороденко, О.В. Атаман // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – вип. 3, т. 1(94). – С. 85-89. (Дисертант провів молекулярно-генетичні дослідження, виконав статистичний аналіз отриманих результатів, проаналізував можливі механізми впливу поліморфізмів гена VDR на розвиток склеротичних уражень артерій).

3. Обухова О.А. Вивчення асоціації $BsmI$ поліморфізму гена рецептора вітаміну D з індексом маси тіла у хворих з ішемічним інсультом / О.А. Обухова // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2012. – Вип.5 (113). – С. 54-61. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики статті, виконав молекулярно-генетичні дослідження і статистичний аналіз результатів, проаналізував можливі механізми впливу $BsmI$ поліморфізму гена VDR на розвиток артеріосклерозу та його ускладнень).

4. Обухова О.А. Аналіз зв'язку $BsmI$ поліморфізму гена VDR з артеріальною гіпертензією у хворих з ішемічним інсультом / О.А. Обухова // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – вип. 4, т. 1(96). – С. 150-153. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики статті, провів молекулярно-генетичні дослідження і статистичний аналіз, сформулював висновки, підготував статтю до друку).

5. Поліморфізм гена матричного Gla -протеїну у хворих з ішемічним

атеротромботичним інсультом / В.Ю. Гарбузова, О.І. Матлай, Є.І. Дубовик, Ю.О. Атаман, А.О. Бороденко, О.А. Обухова, О.В. Атаман // Фізіологічний журнал. – 2012. – Т. 58, №5. – С. 15-22. (Дисертант провів огляд літератури, порівняв отримані результати дослідження з даними літератури, підготував статтю до друку).

6. Investigation of the MGP promoter and exon 4 polymorphisms in patients with ischemic stroke in the Ukrainian population / A.V.Ataman, V.Yu.Garbusova, Yu.A.Ataman, O.A. Obukhova, O.I. Matlaj // Journal of Cell and Molecular Biology. – 2012. – Vol.10, №1. – С. 19-26. (Дисертант проаналізував літературу, провів статистичний аналіз результатів дослідження, підготував статтю до друку).

7. Аналіз асоціації поліморфних варіантів *TaqI* гена рецептора вітаміну D з ішемічним інсультом у хворих різної статі / В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, Ю.О. Атаман та ін. // Перспективи медицини та біології. – 2012. – №3. – С. 51-58. (Дисертант провів молекулярно-генетичне дослідження за *TaqI* поліморфізмом, виконав статистичний аналіз результатів дослідження, проаналізував можливі механізми впливу поліморфізмів гена *VDR* на розвиток склеротичних уражень артерій).

8. Однонуклеотидний поліморфізм *BsmI* гена рецептора вітаміну D у хворих з гострими розладами мозкового кровообігу / О.А. Обухова, В.Ю. Гарбузова, Ю.О. Атаман, В.В. Будко, О.В. Атаман // Світ медицини та біології. – 2012. – № 4. – С. 40-44. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики статті, виконав молекулярно-генетичне дослідження і статистичний аналіз, проаналізував можливі механізми впливу даного поліморфізму гена *VDR* на розвиток артеріосклерозу та його ускладнень).

9. Обухова О.А. Асоціація поліморфізму гену рецептора вітаміну D з розвитком патологічних процесів / О.А. Обухова // Актуальні питання теоретичної медицини: науково-практична конференція студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів, 20-22 квітня, 2011 р.: матер. конф. / Сумський держ. університет. – Суми, 2011. – С. 79. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики, підготував тези до друку).

10. Обухова О.А. Молекулярні аспекти будови рецептора вітаміну D / О.А. Обухова // Актуальні питання теоретичної медицини: науково-практична конференція студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів, 20-22 квітня, 2011 р.: матер. конф. / Сумський держ. університет. – Суми, 2011. – С. 78. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики, підготував тези до друку).

11. Обухова О.А. Ассоциация *FokI* полиморфизма гена *VDR* с артериальной гипертензией у больных с ишемическим атеротромботическим инсультом / О.А. Обухова // Медицинский академический журнал. Приложение. – 2012. – С. 233-234. (Дисертант провів молекулярно-генетичні дослідження, виконав статистичний аналіз, підготував тези до друку).

12. Obukhova O.A. Variants polymorphisms of genes vitamin D receptor (VDR) / О.А. Obukhova // Actual problems of fundamental and clinical medicine: науково-практична конференція студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів присвячена

20-річчю заснування мед. інституту, 10-12 квітня 2012 р.: матер. конф. / Сумський держ. ун-т, 2012. – С. 303. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики, підготував тези до друку).

13. Obukhova O.A. The association between the VDR polymorphisms and cardiovascular diseases / O.A. Obukhova // Actual problems of fundamental and clinical medicine: науково-практична конференція студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів присвячена 20-річчю заснування мед. інституту, 10-12 квітня 2012 р.: матер. конф. / Сумський держ. ун-т, 2012. – С. 302. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики, висунув гіпотезу щодо можливого впливу поліморфних варіантів гена на механізми кальцифікації судин і склеротичних їх уражень, підготував тези до друку).

14. Аналіз частоти *VsmI* поліморфізму гена рецептора вітаміну D (VDR) у хворих з гострим коронарним синдромом / О.В. Атаман, В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, Дубовик // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2012. - №2(17). – С. 157. (Дисертант виконав молекулярно-генетичні дослідження, дослідив проблематику питання і провів статистичний аналіз, сформулював висновки, підготував тези до друку).

15. Вивчення частоти алельних варіантів гена матричного Gla-протеїну у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом / В.Ю. Гарбузова, О.А. Обухова, Ю.О. Атаман, О. В. Атаман // науково-практична конференція, присвячена XI читанням ім. В.В. Підвисоцького, 4-25 травня 2012 р.: матер. конф. / Український науково-дослідний інститут медицини транспорту. – Одеса, 2012. – С. 25-26. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики, висунув гіпотезу щодо можливого впливу поліморфних варіантів гена на механізми кальцифікації судин і склеротичних їх уражень, підготував тези до друку).

16. Обухова О.А. Аналіз зв'язку *ApaI* поліморфізму гена VDR з індексом маси тіла у хворих з ішемічним інсультом / О.А. Обухова // Сучасні проблеми фізики, хімії та біології, 28-30 листопада 2012 р.: матер. I Міжнародної науково-технічної конференції «ФізХімБіо – 2012» / Сев. нац. техн. ун-т, 2012. – С. 177-178. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики тез, виконав молекулярно-генетичні дослідження і статистичний аналіз отриманих результатів, проаналізував можливі механізми впливу *ApaI* поліморфізму гена VDR на розвиток артеріосклерозу та його ускладнень, підготував тези до друку).

17. Обухова О. А. Оцінка зв'язку *FokI* поліморфізму гена рецептора вітаміну D з індексом маси тіла у хворих з ішемічним інсультом / О.А. Обухова, В.В. Будко, Т.В. Мазур // Матеріали XI науково-практичної конференції з міжнародною участю студентів та молодих вчених «Науковий потенціал молоді – прогрес медицини майбутнього», Ужгород 2013. – С. 58. (Дисертант провів молекулярно-генетичні дослідження, виконав статистичний аналіз, підготував тези до друку).

18. Obukhova O.A. Candidate genes of ischemic stroke / О.А. Obukhova, M. Sheikh K. // Матеріали міжнародної науково-практичних конференцій студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини», Суми 2013. – С. 116. (Дисертант підготував літературний огляд з тематики, підготував тези до друку).

19. Обухова О. А. Вивчення частоти алельних варіантів *FokI* поліморфізму гена рецептора вітаміну D (VDR) у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом / О. А. Обухова, Т. С. Мазур, А. О. Бороденко // Всеукраїнський медичний журнал молодих вчених «Хист». – 2013. – №15. – С. 185. *(Дисертант провів молекулярно-генетичні дослідження, виконав статистичний аналіз, підготував тези до друку).*

20. Обухова О.А. Связь *BsmI* полиморфизма гена рецептора витамина D с индексом массы тела у больных с ишемическим инсультом / О.А. Обухова, В.В. Будко, О.В. Атаман // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014». – г. Москва, 18-20 марта 2014 г. – с. 139-140. *(Дисертант виконав молекулярно-генетичні дослідження і статистичний аналіз отриманих результатів, проаналізував можливі механізми впливу даного поліморфного варіанту гена VDR на розвиток артерioskлерозу та його ускладнень, підготував тези до друку).*

21. Обухова О.А. Асоціація *FokI* поліморфізму гена рецептора вітаміну D у курців і тих, хто не курить, серед хворих на ішемічний інсульт / О.А. Обухова // Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, Суми 2014. – С. 152. *(Дисертант виконав молекулярно-генетичні дослідження, дослідив проблематику питання і провів статистичний аналіз, сформулював висновки, підготував тези до друку).*

22. Обухова О.А. Зв'язок *TaqI* поліморфізму гена рецептора вітаміну D з индексом маси тіла у хворих на ішемічний інсульт / О.А. Обухова, Т.С. Мазур, К.М. Шейх // Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, Суми 2014. – С. 151. *(Дисертант провів молекулярно-генетичні дослідження за *TaqI* поліморфним варіантом, виконав статистичний аналіз, проаналізував можливі механізми впливу поліморфізмів гена VDR на розвиток склеротичних уражень артерій).*

23. Обухова О.А. Ассоциация *TaqI* полиморфизма VDR-гена у курильщиков и тех, кто не курит, среди больных с ишемическим инсультом / О.А. Обухова, А.В. Атаман // Материалы 79-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодёжная наука и современность», Курск, 16-17 апреля 2014 года. – С. 23. *(Дисертант провів молекулярно-генетичні дослідження за *TaqI* поліморфним варіантом, виконав статистичний аналіз, підготував тези до друку).*

24. Обухова О.А., Ассоциация *TaqI* полиморфизма гена VDR с артериальной гипертензией у больных с ишемическим инсультом / О.А. Обухова, В.Ю. Гарбузова, О.В. Атаман // Материалы республиканской научно-практической конференции «Метаболический синдром: проблемы и достижения», Ташкент, 11 апреля 2014 год. – С. 126-127. *(Дисертант виконав молекулярно-генетичні дослідження, дослідив проблематику питання і провів статистичний аналіз, сформулював висновки, підготував тези до друку).*

АНОТАЦІЯ

Обухова О.А. Розподіл поліморфізмів VDR-гена в українського населення та пошук їх зв'язку із розвитком атеротромботичного інсульту – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика. – ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, 2014.

Дисертація присвячена дослідженню частот алелів та генотипів поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* гена рецептора вітаміну D у населення Сумської області та пошуку асоціацій генотипів із розвитком ішемічних інсультів.

Встановлено частоти алелів і генотипів поліморфних варіантів *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* гена *VDR* у представників української популяції і вперше досліджено їх асоціацію з ішемічним атеротромботичним інсультом.

З'ясовано, що в осіб з генотипами *F/F*, *b/b*, *a/a*, *a/A*, і *T/T* існує асоціація між наявністю артеріальної гіпертензії та розвитком ішемічного інсульту.

Доведено зв'язок між поліморфізмами гена *VDR* і порушеннями ліпопротеїнового обміну і коагуляції крові у хворих на ішемічний інсульт. У групі хворих на інсульт чоловіки-гомозиготи *A/A* поліморфного варіанту *ApaI* мали нижчі показники ліпопротеїнового обміну (холестерол у складі ліпопротеїдів різної густини: низької – $2,51 \pm 0,26$ ммоль/л, дуже низької – $0,59 \pm 0,06$ ммоль/л, та високої – $1,16 \pm 0,06$ ммоль/л; тригліцериди – $1,30 \pm 0,14$ ммоль/л, індекс атерогенності – $3,13 \pm 0,57$), ніж пацієнти з генотипами *a/A* і *a/a*, а у гомозигот *B/B* поліморфного варіанту *BsmI* рівень холестеролу у складі ліпопротеїнів дуже низької густини ($0,53 \pm 0,06$ ммоль/л) і тригліцеридів ($1,17 \pm 0,14$ ммоль/л) був нижчим, ніж у носіїв генотипів *b/B* і *b/b*. Додаткові чинники, а саме стать, артеріальний тиск, цукровий діабет, паління і гіперкоагуляція крові, мали вплив на зв'язок поліморфного варіанту *ApaI* з дисліпопротеїнемією атерогенного характеру.

Встановлено, що генотипи *ff* і *B/B* поліморфних варіантів *FokI* та *BsmI* асоційовані з гіперкоагуляційним синдромом у хворих, що перенесли ішемічний інсульт. Ризик розвитку синдрому гіперкоагуляції крові у 2,7 рази вищий у пацієнтів-гомозигот за *A*-алелем поліморфного варіанту *ApaI*, ніж у гомозигот за *a*-алелем.

Доведено відсутність асоціації між показниками індексу маси тіла, паління і цукрового діабету окремо з розвитком ішемічного інсульту у випадку різних варіантів генотипів поліморфних варіантів гена *VDR*.

Виявлено асоціацію між ішемічним атеротромботичним інсультом та поліморфним варіантом *G-7A* гена *MGP* у осіб жіночої статі. У жінок-гомозигот за мінорним алелем *A/A* ризик інсульту у 6,6 разів вищий, ніж у носіїв основного алеля (*G/A+G/G*). Виявлено асоціацію поліморфного варіанту *G-7A* гена *MGP* з ішемічним інсультом в осіб з мінорним алелем поліморфних варіантів *FokI* і *ApaI* гена *VDR*. Ризик виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб з генотипом *A/A* (*G-7A*) гена *MGP* у 4,9 рази вищий ніж у носіїв мінорного алеля за поліморфним варіантом *FokI* і в 4,5 рази вищий за поліморфним варіантом *ApaI* гена *VDR* ніж у гомозигот за основним *G*-алелем.

Ключові слова: ген рецептора вітаміну D, поліморфні варіанти *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, ішемічний атеротромботичний інсульт.

АННОТАЦІЯ

Обухова О.А. Распределение полиморфизмов *VDR*-гена среди украинского населения и поиск их связи с развитием атеротромботического инсульта. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика. – ДУ «Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины», Киев, 2014.

Диссертация посвящена исследованию частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *FokI*, *BsmI*, *ApaI* і *TaqI* гена рецептора витамина D среди населения Сумской области и поиску ассоциаций генотипов с развитием ишемических инсультов.

Установлены частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов *FokI*, *BsmI*, *ApaI* и *TaqI* гена *VDR* у представителей сумской популяции и впервые исследована их ассоциация с ишемическим атеротромботическим инсультом.

У лиц с генотипами *F/F*, *b/b*, *a/a*, *a/A*, и *T/T* установлена связь между артериальной гипертензией и развитием ишемического атеротромботического инсульта.

Показана связь между полиморфными вариантами гена *VDR* и нарушениями липопротеинового обмена и коагуляции крови у больных с ишемическим атеротромботическим инсультом. У мужчин-гомозигот *A/A* полиморфного варианта *ApaI*, с ишемическим инсультом, регистрировались низкие показатели липопротеинового обмена (холестерин в составе липопротеинов разной плотности: низкой – $2,51 \pm 0,26$ ммоль/л, очень низкой – $0,59 \pm 0,06$ ммоль/л, и высокой – $1,16 \pm 0,06$ ммоль/л; триглицериды – $1,30 \pm 0,14$ ммоль/л, индекс атерогенности – $3,13 \pm 0,57$), чем у пациентов с генотипами *a/A* и *a/a*, а у гомозигот *B/B* полиморфного варианта *BsmI* уровень холестерина в составе липопротеинов очень низкой плотности ($0,53 \pm 0,06$ ммоль/л) и триглицеридов ($1,170 \pm 0,14$ ммоль/л) был ниже, чем у носителей *b/B* и *b/b* генотипов. На ассоциацию полиморфного варианта *ApaI* с дислипотеинемией атерогенного характера влияли такие факторы как пол, артериальное давление, сахарный диабет, курение и гиперкоагуляция крови. Установлено, что генотипы *f/f* и *B/B* полиморфных вариантов *FokI* и *BsmI* ассоциированы с гиперкоагуляционным синдромом у больных с ишемическим инсультом. У гомозигот *f/f* с ишемическим инсультом регистрировали повышенное тромбиновое время ($17,7 \pm 0,65$ сек.) и уменьшение скорости спонтанного фибринолиза ($466,8 \pm 5,5$ хв.) по сравнению с носителями генотипов *F/F* і *F/f*, а у гомозигот *B/B* регистрировали сниженное протромбиновое время ($8,69 \pm 0,35$ сек.) и тромбиновое время ($15,0 \pm 0,48$ сек.) и увеличение скорости спонтанного фибринолиза ($489,2 \pm 8,3$ мин.) по сравнению с больными с генотипами *b/b* і *b/B*. Риск развития синдрома гиперкоагуляции крови в 2,7 раза выше у пациентов-гомозигот по *A*-аллелю полиморфного варианта *ApaI*, чем у гомозигот по *a*-аллелю.

Доказано отсутствие связи между показателями индекса массы тела, курения и сахарного диабета отдельно с развитием ишемического инсульта в случае разных генотипов полиморфных вариантов гена *VDR*.

Выявлена ассоциация между ишемическим атеротромботическим инсультом и полиморфным вариантом G-7A гена *MGP* у лиц женского пола. У женщин-гомозигот по минорному аллелю A/A риск инсульта в 6,6 раза выше, чем у носителей основного аллеля (G/A+G/G). У лиц с генотипом A/A по полиморфному варианту G-7A гена *MGP* отмечается риск развития ишемии головного мозга, если они являются носителями минорного аллеля полиморфных вариантов *FokI* и *ApaI* гена *VDR*. Величина риска ишемического атеротромботического инсульта у лиц с генотипом A/A (G-7A) гена *MGP* в 4,9 раза выше, чем у носителей минорного по полиморфному варианту *FokI* и в 4,5 раза выше по полиморфному варианту *ApaI* гена *VDR*, чем у гомозигот по основному G-аллелю.

Ключевые слова: ген рецептора витамина D, полиморфные варианты *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, ишемический атеротромботический инсульт.

ANNOTATION

Obukhova O.A. The distribution of polymorphisms in the *VDR*-gene in Ukrainian population and search of their association with the development of atherothrombotic stroke. – Manuscript.

The dissertation for the degree of candidate of biological sciences on speciality 03.00.15 – genetics. – SI “National Scientific Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv, 2014.

The dissertation is devoted to the study of the frequencies of alleles and genotypes of *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, and *TaqI* polymorphic variants of the vitamin D receptor gene in the population of Sumy region and the search of association of these genotypes with the development of ischemic stroke.

It is the first time allelic and genotypic frequencies of polymorphic variants (*FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*) of the *VDR* gene in the Ukrainian population were studied. The influence of single nucleotide polymorphisms in vitamin D receptor gene on the clinical characteristics of ischemic stroke was investigated.

The influence of single nucleotide polymorphisms of vitamin D receptor gene on the clinical characteristics of atherothrombotic ischemic stroke was studied. It was determined that in patients who have *F/F*, *b/b*, *a/a*, *a/A*, and *T/T* genotypes, statistically significant association between hypertension and IS development exists.

There was a relationship between *VDR* gene polymorphism and impaired lipoprotein metabolism and blood coagulation in patients with ischemic stroke. Patients with stroke male homozygotes A/A polymorphic variant *ApaI* had lower rates lipoprotein metabolism (cholesterol in lipoprotein composition of different densities: low – 2.51 ± 0.26 mmol/L, very low – 0.59 ± 0.06 mmol/L, and high – 1.16 ± 0.06 mmol/L; triglycerides – 1.30 ± 0.14 mmol/L, atherogenic index – 313 ± 0.57), than patients with genotypes *a/A* and *a/a*, and in homozygotes B/B polymorphic variant *BsmI*, cholesterol as part of lipoproteins very low density (0.53 ± 0.06 mmol/L) and triglycerides (1.17 ± 0.14 mmol/L) was lower than in carriers of genotype *b/B* and *b/b*. Additional factors, such as sex, blood pressure, diabetes, smoking, and blood hypercoagulation, had an impact on association of *ApaI*

polymorphisms with atherogenic dyslipidemia. It was established that the genotypes *ff* and *B/B* polymorphisms *FokI* and *BsmI* associated with the hypercoagulable syndrome in patients with ischemic stroke. In homozygotes *ff* with ischemic stroke, elevated thrombin time (17.7 ± 0.65 sec.) and decrease in the rate of spontaneous fibrinolysis (466.8 ± 5.5 min.) were recorded in contrast to carriers of genotypes *F/F* and *F/f*, and in homozygotes *B/B* decreased prothrombin time (8.69 ± 0.35 sec.) and thrombin time (15.0 ± 0.48 sec.) and increase the speed of spontaneous fibrinolysis (489.2 ± 8.3 min.) versus *b/b* and *b/B* genotypes were recorded. The risk of developing of blood hypercoagulation syndrome was 2.7 times higher in patients homozygous for the *A*-allele polymorphism *ApaI* than in homozygotes for the *a*-allele.

It was proven that no association exists between body mass index, smoking and diabetes separately with genotypes of polymorphic variants of the *VDR* gene and ischemic stroke.

An association between ischemic stroke and polymorphic variants of G-7A for *MGP* gene in females was revealed. It was shown that women with a minor allele homozygote *A/A* have risk for stroke in 6.6 times is higher than the carriers of main allele (*G/A+G/G*). Risk of ischemic stroke in patients with genotype *A/A* polymorphism G-7A gene *MGP* in 4.9 and 4.5 times is higher than that of homozygotes for the main G-allele in patients with minor allele for *FokI* and *ApaI* polymorphic variants of gene *VDR*.

Key words: vitamin D receptor gene, polymorphic variants *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, atherothrombotic ischemic stroke.