

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

ДУБОВИК ЄВГЕН ІВАНОВИЧ

УДК 616.831-005.1-06:616.12-005.4:575.113.2(043.5)

**ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ
ЦИКЛУ ВІТАМІНУ К ДЛЯ РОЗВИТКУ ІШЕМІЧНОГО
АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІНСУЛЬТУ**

Спеціальність 14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Суми – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Сумському державному університеті МОН України (м. Суми).

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

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Досенко Віктор Євгенович,
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України (м. Київ), завідувач відділу
загальної та молекулярної патофізіології;

доктор медичних наук, професор
Сидорчук Лариса Петрівна,
Вищий державний навчальний
заклад України «Буковинський державний
медичний університет» МОЗ України
(м. Чернівці), завідувач кафедри сімейної медицини.

Захист відбудеться «12» травня 2017 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 55.051.05 при Сумському державному університеті (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Сумського державного університету (40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2).

Автореферат розісланий «3» квітня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат медичних наук

О.С. Погорелова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ішемічний інсульт належить до найбільш частих і тяжких форм цереброваскулярних захворювань. За результатами широко-масштабних епідеміологічних досліджень, смертність від інфаркту головного мозку становить 12-15 % від показника загальної смертності (Banerjee et al., 2016; Barker-Collo et al., 2015; Soler et al., 2010; Wu et al., 2013). В Україні за 1 рік реєструється більше ніж 100 тис. нових випадків ішемічного інсульту, 40 тис. з яких закінчується смертю пацієнта впродовж першого року. Інші вмирають у наступні 3 роки або назавжди залишаються інвалідами (Зозуля І.С. та співавт., 2011; Ревенько І.Л., 2011). Вражаючим є й той факт, що ця хвороба почала все частіше уражати осіб середнього та молодого віку і на сьогодні є причиною третини випадків інвалідності серед працездатного населення (Курнацький В. М. та співавт., 2011; Міщенко Т. С., 2015; Тарарощенко М. В. та співавт., 2015).

Найпоширенішим серед інсультів ішемічного генезу є гостре порушення мозкового кровообігу, спричинене церебральним атеросклерозом. Так, за повідомленнями різних авторів, на частку атеротромботичного інсульту припадає від 60 до 75 % усіх випадків ішемічних інсультів (Banerjee et al., 2016; Kim et al., 2014; Smith et al., 2009; Tsai et al., 2013).

Серед причин ішемічного атеротромботичного інсульту вагомого значення сьогодні надають процесам кальцифікації судинної стінки та порушенням функціонування системи гемостазу (Dong, 2016; Fisher, 2013; Margueritta et al., 2014; Pugliese et al., 2015; Zoppo et al., 2013). Відомо, що низка білків, які забезпечують функціонування системи коагуляції крові (фактори згортання II, VII, IX, X), антикоагулянтної системи (протеїни C, S, Z) та запобігають ектопічній мінералізації судинної стінки (матриксний Gla-протеїн, Gla-rich-протеїн, остеокальцин), проходить у рамках посттрансляційної модифікації фази активації у циклі вітаміну K (Oldenburg et al., 2008; Margueritta et al., 2014). Завдяки цьому залишки глютамінової кислоти в амінокислотних послідовностях вище наведених протеїнів перетворюються на залишки γ -карбоксивітамінової кислоти, переводячи таким чином білки з неактивної в активну форму. Функціонування самого циклу вітаміну K неможливе без вітамін-K-епоксидредуктази (VKORC1) та γ -глютамілкарбоксілази (GGCX) – ферментів, дія яких спрямована на постійне відновлення окиснених форм вітаміну K та перенесення карбоксильних залишків під час γ -карбоксивітамінування (Matagrín et al., 2013; Rishavy et al., 2012). Останнє дає можливість припустити, що дефекти функціонування цих ензимів можуть стати відправною точкою у спотвореній реалізації молекулярного каскаду активації вітамін-K-залежних білків, що в кінцевому підсумку стане причиною тромбозів і кальцифікації стінки судин та одного з їх найтяжчих ускладнень – інфаркту головного мозку.

Потужність та успіх сучасної науки багато в чому визначаються складністю й технологічністю методів, які вчений використовує для вирішення поставлених завдань. Сучасна методична база медико-біологічної науки дозволяє заглиблюватись у вивчення структури генетичної інформації та

молекулярних процесів її реалізації. Секвенування геному людини та відкриття явища однонуклеотидного поліморфізму генів привели до нових можливостей щодо вивчення впливу генетичного коду на кількісні зміни експресії та подальше біологічне функціонування білків, а також спрямували зусилля науковців на пошук зв'язку однонуклеотидних варіацій із розвитком патологічних процесів і хвороб.

За останнє десятиріччя світова наукова література поповнилася великою кількістю праць, спрямованих на розкриття генетичної складової ішемічного інсульту. Серед них низка робіт, що присвячені пошуку зв'язку поліморфізму поодиноких нуклеотидів генів деяких факторів згортання крові (Favaretto et al., 2012; They-They et al., 2012), білків антикоагулянтної системи (Reiner et al., 2008; Staton et al., 2005), а також генів *VKORC1* (Ragia et al., 2013; Zhang et al., 2014) та *GGCX* (Shyu et al., 2010) з розвитком ІАТІ та факторами його ризику. В Україні проведене лише одне дослідження з вивчення ролі деяких поліморфізмів генів *VKORC1* та *GGCX* у розвитку ішемічного інсульту (Garbuzova et al., 2010). Праці, спрямовані на пошук асоціації G-1639A-, C1173T-поліморфних ділянок гена *VKORC1* та поліморфного локусу Arg406Arg гена *GGCX* із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в нашій країні, відсутні. Останнє й спонукало нас до проведення власних досліджень.

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-дослідної теми «Зв'язок алельного поліморфізму «генів ектопічної кальцифікації» з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень» (номер державної реєстрації 0115U000688).

Мета дослідження – з'ясування ролі поліморфізму генів циклу вітаміну К у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту у пацієнтів із різними факторами ризику.

Задачі дослідження:

1 Провести визначення частоти алелів і генотипів поліморфних варіантів G-1639A та C1173T гена *VKORC1* і Arg406Arg гена *GGCX* у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом та осіб групи порівняння.

2 Вивчити зв'язок алельного поліморфізму G-1639A гена *VKORC1* із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту.

3 Визначити асоціацію поліморфного сайту C1173T гена *VKORC1* з ішемічним інсультом атеротромботичного генезу.

4 Проаналізувати вплив однонуклеотидного поліморфізму Arg406Arg гена *GGCX* на патогенез ІАТІ.

5 Дослідити статеві відмінності у зв'язку поліморфних варіантів G-1639A та C1173T гена *VKORC1* і Arg406Arg гена *GGCX* з інфарктом головного мозку.

6 Провести дослідження асоціації SNP генів *VKORC1* (G-1639A та C1173T) та *GGCX* (Arg406Arg) з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту з урахуванням різних факторів ризику.

7 З'ясувати поєднаний вплив поліморфізмів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного інсульту атеротромботичного генезу.

Об'єкт дослідження – патогенез ішемічного атеротромботичного інсульту.

Предмет дослідження – роль поліморфізму поодиноких нуклеотидів генів циклу вітаміну К у розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

Методи дослідження – клінічні, молекулярно-генетичні, методи статистичного оброблення та аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше серед представників української популяції проведено визначення частот алелів та розподілу генотипів за поліморфними варіантами G-1639A і C1173T гена *VKORC1* та Arg406Arg гена *GGCX*. Виявлено, що існує достовірна різниця у співвідношенні різних алельних варіантів за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* між хворими з ішемічним атеротромботичним інсультом та особами без цього захворювання.

Уперше встановлено зв'язок між поліморфними локусами G-1639A (ген *VKORC1*) і Arg406Arg (ген *GGCX*) та ішемічним атеротромботичним інсультом. Показано, що у носіїв мінорного А-алеля (поліморфізм G-1639A) ризик розвитку інфаркту головного мозку у 2,1 раза вищий, ніж у гомозигот за основним G-алелем, а у гомозигот Т/Т (поліморфізм Arg406Arg) ймовірність настання ІАТІ в 3,1 раза вища, ніж у носіїв основного С-алеля. Поряд із цим поліморфний сайт C1173T гена *VKORC1* не асоційований із ризиком розвитку цієї хвороби.

З'ясовано, що вплив поліморфних локусів G-1639A гена *VKORC1* та Arg406Arg гена *GGCX* на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту залежить від статі, індексу маси тіла пацієнта, а також наявності чи відсутності у нього таких модифікованих факторів ризику, як артеріальна гіпертензія та звичка паління.

Установлено, що гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C за G-1639A- і C1173T-поліморфізмами гена *VKORC1* підвищують ймовірність розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту, а гаплотип -1639G/1173C має протективне значення. Також показано, що поєднання в однієї особи артеріальної гіпертензії та наявності мінорного А-алеля в -1639-му положенні промотору гена *VKORC1* є значущим предиктором високого ризику розвитку інфаркту головного мозку.

Практичне значення одержаних результатів. Дисертаційна робота є фундаментальним дослідженням. Одержані у роботі результати та висновки розширюють і поглиблюють наукові уявлення про роль генетичного поліморфізму білків циклу вітаміну К у розвитку атеросклерозу та його ускладнень, зокрема ішемічного атеротромботичного інсульту.

Алелі та генотипи за поліморфними варіантами G-1639A (ген *VKORC1*) і Arg406Arg (ген *GGCX*), для яких був установлений зв'язок з ішемічним атеротромботичним інсультом, можуть бути маркерами для оцінювання індивідуального ризику розвитку цього захворювання в осіб із різними модифікованими та немодифікованими факторами ризику атеросклерозу.

Результати наукових досліджень, викладених у дисертації, впроваджено у науково-дослідну роботу і навчальний процес на кафедрах патофізіології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), Івано-Франківського національного медичного університету, Вінницького національного медичного

університету ім. М. І. Пирогова, Одеського національного медичного університету, Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава), ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», на кафедрі фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету МОН України.

Особистий внесок дисертанта. Автором самостійно проведені патентно-інформаційний пошук, огляд та аналіз наукової літератури за темою дисертаційного дослідження, сформульовані мета і завдання роботи, розроблений та обґрунтований план досліджень. Дисертантом особисто виконано молекулярно-генетичні дослідження в науковій лабораторії молекулярно-генетичних досліджень Сумського державного університету МОН України (науковий керівник – проф. О. В. Атаман, завідувач лабораторії – проф. В. Ю. Гарбузова). Здобувачем статистично опрацьовано та проаналізовано одержані результати, написано всі розділи дисертації та сформульовано висновки, а також підготовлено матеріали до публікації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації повідомлено й обговорено на 8th International Student Medical Congress in Košice, Slovakia (22–24 June 2016); 4th International Scientific Conference of Students and Young Scientists “Topical Issues of Clinical and Theoretical Medicine”, Sumy, Ukraine (21–22 April 2016); 20th International Medical Congress of Students and Young Scientists, Ternopil, Ukraine (25–27 April 2016); International Medical Congress of Silesia 2016, Katowice, Poland (28–29 April 2016); 27th European Students’ Conference “Facing Antimicrobial Resistance – Research Revolution wanted”, Berlin, Germany (September 28 – October 1 2016); VII Національному конгресі патофізіологів України за міжнародні участі: «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», м. Харків (5–7 жовтня 2016 р.); науково-практичній конференції за міжнародної участі «Ендокринна патологія у віковому аспекті», м. Харків (24–25 листопада 2016 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров’я», м. Полтава (25 листопада 2016 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, з яких 6 статей (1 – у зарубіжному виданні, що обліковується наукометричною базою Scopus, 5 – у фахових виданнях, що входять до переліку ВАК України), 8 тез доповідей у матеріалах конгресів та конференцій. Три наукові праці опубліковано за одноосібної участі автора.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 167 сторінках (основний обсяг становить 137 сторінок). Вона складається із вступу, чотирьох розділів: огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, а також висновків і списку використаних джерел. Останній містить 260 найменувань (11 – кирилицею, 249 – латиницею). Роботу ілюстровано 63 таблицями та 25 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження

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

Групу контролю становили 124 особи, в яких відсутність гострої серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми, вимірювання артеріального тиску та проведення загальноприйнятого неврологічного огляду.

Роботу виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження», Наказу МОЗ України № 690 (від 23.09.2009 р.) та схвалено Комісією з біоетики Медичного інституту Сумського державного університету. Перед залученням до дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду.

Групи порівняння не відрізнялись між собою за співвідношенням осіб різної статі ($P = 0,294$), середніми показниками ІМТ ($P = 0,279$), кількістю осіб із надмірною вагою ($P = 0,197$) та кількістю курців ($P = 0,403$). Поряд із цим середні значення маси тіла, зросту, систолічного АТ, діастолічного АТ, концентрації глюкози крові, а також кількість осіб з артеріальною гіпертензією у хворих з ІАТІ були істотно вищими, ніж у контролі ($P < 0,05$). При цьому середній вік представників контрольної групи ($76,7 \pm 10,2$ року) був значущо вищим, ніж у пацієнтів з інсультом ($P < 0,001$). Останнє збільшувало надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ІАТІ в цих осіб у подальших періодах їх життя.

Молекулярно-генетичні дослідження. Виділення ДНК із цільної крові проводили з використанням наборів GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США). Алельний поліморфізм G-1639A (rs9923231) промотору гена *VKORC1*, C1173T (rs9934438) першого інтрона гена *VKORC1*, Arg406Arg (rs2592551) дев'ятого екзона гена *GGCX* вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції із подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Використовували праймери, синтезовані фірмою "Metabion" (Німеччина), та ферменти (Taq-полімераза і рестриктази) фірми "ThermoFisher Scientific" (США). Режими PCR, які для кожного поліморфізму склалися із 33 циклів, наведені в таблиці 1. Реакцію проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 (ThermoFisher Scientific,

США). Для рестрикційного аналізу поліморфізму G-1639A гена *VKORC1* використовували рестриктазу *MspI* (*HpaII*), поліморфного локусу C1173T гена *VKORC1* – рестриктазу *StyI* (*Eco130I*), поліморфного сайту Arg406Arg гена *GGCX* – рестриктазу *MbiI*.

Таблиця 1 – Методика проведення PCR

Ген, поліморфізм	Нуклеотидна послідовність праймерів	Режим ампліфікації		
		D	H	E
<i>VKORC1</i> , G-1639A	П: 5'-GCCAGCAGGAGAGGGAAATA-3' З: 5'- AGTTTGGACTACAGGTGCCT-3'	94°C, 50 с	61°C, 45 с	72°C, 50 с
<i>VKORC1</i> , C1173T	П: 5'-AAGATGAAAAGCAGGGCCTAC-3` З: 5'- CCGAGAAAGGTGATTTCCAA-3`	94°C, 50 с	60°C, 50 с	72°C, 55 с
<i>GGCX</i> , Arg406Arg	П: 5'- GGA CT TAGAAAGGAACGGATGA-3` З: 5`- CTTGAGAAAAGGCAAAGCAGAC-3`	94°C, 50 с	61,5°C, 45 с	72°C, 60 с

Примітка: П – прямий праймер; З – зворотний праймер; D – денатурація; H – гібридизація праймерів; E – елонгація

Статистичний аналіз результатів дослідження було проведено здебільшого з використанням програми SPSS (версія 17.0, США). Перевірку безперервних даних на нормальність розподілу здійснювали за допомогою тесту Шапіро – Вілка. Визначення достовірності відмінностей між двома вибірками проводили за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах а також відповідності цього розподілу рівновазі Харді – Вайнберга застосовували χ^2 -критерій Пірсона. Достовірність відмінностей середніх величин у групах із різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшою поправкою Бонфероні.

Для встановлення ризику розвитку ІАТІ розраховували відношення шансів (OR) та 95% довірчий інтервал (CI) для домінантної, рецесивної, наддомінантної та адитивної моделей успадкування. Їх релевантність оцінювали за допомогою інформаційного критерію Акайке. Такі фактори ризику ІАТІ, як вік, стать, ІМТ, паління та АГ були застосовані як коваріати під час мультиваріабельного логістичного регресійного аналізу.

Для розрахунку частоти гаплотипів та аналізу нерівноважного зчеплення використовували програму Arlequin (версія 3.1). Моделювання міжлокусних взаємодій реалізовували за допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності (MDR). Усі тести були двосторонніми, значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

Результати досліджень та їх обговорення.

1. Зв'язок G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту.

Генотипування осіб груп порівняння за поліморфним локусом G-1639A гена *VKORC1* показало, що співвідношення G/G-, G/A- та A/A-генотипів у контрольній групі становило 43,5, 39,6 і 16,9 % (частота G-алеля – 0,63, A-алеля

– 0,37), а серед хворих з ІАТІ відповідно 28,8, 46,5 і 24,7 % (частота G-алеля – 0,52, А-алеля – 0,48). Порівняльний аналіз продемонстрував, що мінорний алель А достовірно частіше зустрічався серед пацієнтів з інфарктом головного мозку ($P = 0,007$; рис. 1). Поряд із цим статистично значущим виявилася також і відмінність розподілу генотипів за досліджуванним поліморфним локусом між хворими з ішемічним інсультом та особами групи контролю ($P = 0,027$).

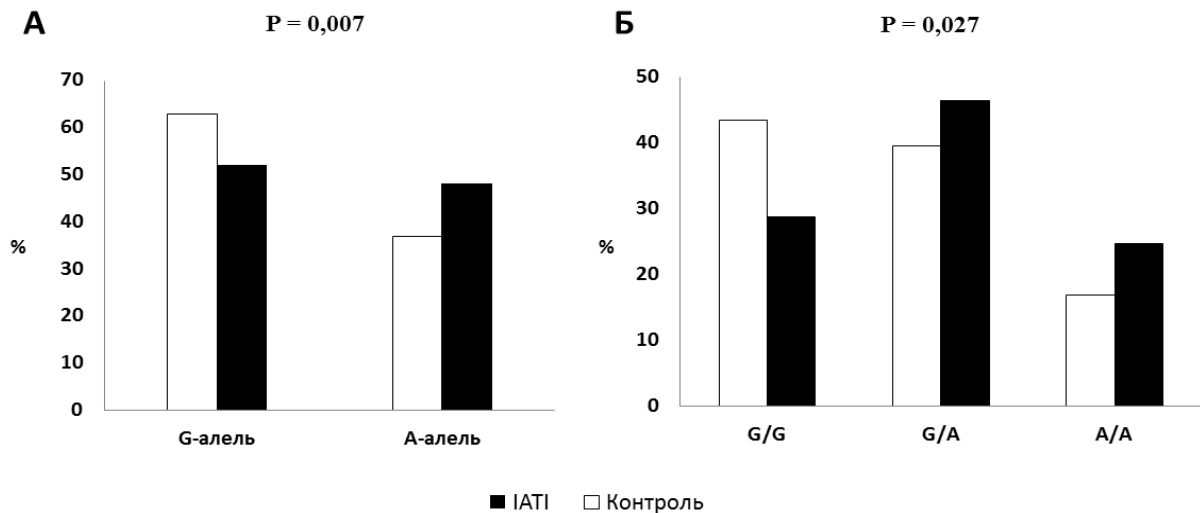


Рисунок 1 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* у хворих з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Результати аналізу зв'язку генотипів за G-1639A-поліморфізмом гена *VKORC1* з ІАТІ за допомогою логістичної регресії в рамках чотирьох моделей успадкування наведені в табл. 2. Значущий зв'язок після поправки на вік, стать, ІМТ, АГ та паління був установлений для домінантної ($P_{\text{попр}} = 0,015$) та адитивної ($P_{\text{попр}} = 0,041$ – для G/A-генотипу; $P_{\text{попр}} = 0,028$ – для A/A-генотипу) моделей. Ризик розвитку ішемічного інсульту в носіїв мінорного алеля (G/A- та A/A-генотипи) був у 2,1 (95 % CI = 1,157–3,953) раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (G/G) (відповідно до домінантної моделі). Регресійний аналіз зв'язку між G-1639A поліморфним сайтом гена *VKORC1* та ІАТІ в осіб жіночої статі показав, що після поправки на коваріати у жінок, які є носіями мінорного алеля, ризик розвитку ішемічного інсульту в 2,9 раза (CI = 1,058–7,665; $P_{\text{попр}} = 0,038$) вищий, ніж в осіб жіночої статі з G/G-генотипом (у рамках домінантної моделі). В осіб чоловічої статі із генотипом A/A ризик розвитку ІАТІ був у 2,2 раза (CI = 1,002–5,007; $P_{\text{спост}} = 0,049$) вищий, ніж у гомозигот за основним алелем цієї самої статі, проте статистична значущість OR втрачалася після поправки на інші фактори ризику атеросклерозу ($P_{\text{попр}} = 0,077$).

Після розподілу осіб груп порівняння на дві підгрупи, утворені залежно від показника ІМТ, не виявлено зв'язку G-1639A SNP з розвитком інфаркту головного мозку в осіб із нормальним ІМТ як до, так і після поправки на фактори ризику атеросклерозу. Натомість у підгрупі з ІМТ ≥ 25 кг/м² виявлено,

що в носіїв мінорного алеля після поправки на коваріати ризик розвитку ІАТІ був у 2,4 раза (95 % CI = 1,180–4,843; $P_{\text{попр}} = 0,016$), ніж у гомозигот G/G.

Таблиця 2 – Аналіз зв'язку G-1639A-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Загалом					
Домінантна	0,009	1,905 (1,172–3,097)	0,015	2,138 (1,157–3,953)	19,27
Рецесивна	0,111	1,609 (0,897–2,888)	0,142	1,780 (0,824–3,847)	23,46
Наддомінантна	0,235	1,329 (0,831–2,125)	0,226	1,434 (0,800–2,571)	24,66
Адитивна ^a	0,032	1,777 (1,050–3,006)	0,041	1,979 (1,029–3,805)	20,83
	0,017	2,204 (1,149–4,227)	0,028	2,621 (1,110–6,191)	
Жінки					
Домінантна	0,090	2,000 (0,899–4,452)	0,038	2,848 (1,058–7,665)	15,94
Рецесивна	0,479	1,429 (0,533–3,832)	0,520	1,498 (0,437–5,135)	18,31
Наддомінантна	0,307	1,477 (0,699–3,124)	0,133	2,046 (0,804–5,207)	17,78
Адитивна	0,122	1,950 (0,836–4,549)	0,049	2,888 (1,006–8,293)	17,91
	0,178	2,143 (0,706–6,501)	0,149	2,747 (0,697–10,826)	
ІМТ ≥ 25 кг/м²					
Домінантна	0,008	2,150 (1,219–3,793)	0,016	2,391 (1,180–4,843)	18,11
Рецесивна	0,118	1,743 (0,869–3,498)	0,090	2,230 (0,882–5,638)	22,61
Наддомінантна	0,196	1,451 (0,825–2,552)	0,282	1,457 (0,734–2,892)	23,47
Адитивна	0,029	1,997 (1,072–3,723)	0,054	2,107 (0,989–4,489)	19,81
	0,020	2,478 (1,155–5,317)	0,021	3,304 (1,199–9,106)	
Артеріальна гіпертензія					
Домінантна	0,002	2,585 (1,417–4,717)	0,029	2,374 (1,091–5,166)	19,72
Рецесивна	0,015	2,822 (1,255–6,501)	0,049	2,862 (1,003–8,169)	22,64
Наддомінантна	0,327	1,339 (0,747–2,399)	0,574	1,230 (0,598–2,528)	28,46
Адитивна	0,021	2,128 (1,119–4,046)	0,095	2,042 (0,844–4,720)	19,26
	0,002	4,243 (1,722–10,453)	0,029	4,029 (1,153–14,077)	
Не курці					
Домінантна	0,004	2,284 (1,300–4,013)	0,013	2,412 (1,206–4,824)	18,71
Рецесивна	0,059	2,213 (0,971–5,046)	0,071	2,629 (0,921–7,504)	23,25
Наддомінантна	0,149	1,496 (0,866–2,585)	0,219	1,522 (0,779–2,973)	24,99
Адитивна	0,018	2,051 (1,131–3,720)	0,043	2,122 (1,026–4,391)	19,57
	0,009	3,265 (1,347–7,916)	0,017	3,961 (1,283–12,231)	

Примітка: 95 % CI – 95 % довірчий інтервал; ІКА – інформаційний критерій Акайке; $P_{\text{спост}}$ – спостережуване значення P (без поправки на коваріати); OR_{спост} – спостережуване відношення шансів; $P_{\text{попр}}$ – значення P після поправки на коваріати (вік, стать, звичку палити, ІМТ та АГ); OR_{попр} – відношення шансів після поправки на коваріати.

^a Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння G/A-генотипу з G/G-генотипом, другий рядок – порівняння A/A-генотипу з G/G-генотипом.

Вивчення зв'язку G-1639A-поліморфного сайту гена *VKORC1* з ішемічним інсультом в осіб без артеріальної гіпертензії показало, що статистично значущі результати були відсутніми як без урахування інших факторів ризику атеросклерозу, так і після поправки на стать, вік, індекс маси тіла та звичку палити ($P > 0,05$). Застосування логістичної регресії для аналізу в підгрупі з АГ дало змогу встановити, що після врахування коваріат ризик настання ІАТІ у гомозигот А/А був у 4 (95 % CI = 1,153–14,077; $P_{\text{попр}} = 0,029$) рази вищий, ніж у гомозигот за основним G-алелем.

Вивчення асоціації різних генотипів за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* з розвитком ІАТІ серед осіб, які не мають звички палити, показало, що в осіб із G/A- та А/А-генотипами ризик настання ішемічного інсульту був у 2,4 раза (95 % CI = 1,206–4,824; $P_{\text{спост}} = 0,013$) вищим, ніж у гомозигот за основним алелем. Зв'язку даного поліморфного локусу з інфарктом головного мозку в курців виявлено не було ($P > 0,05$).

2. Асоціація С1173Т-поліморфізму гена VKORC1 із розвитком ішемічного інсульту атеротромботичного генезу.

Співвідношення гомозигот С/С, гетерозигот С/Т та гомозигот Т/Т за поліморфним сайтом С1173Т гена *VKORC1* в контрольній групі становив 47,6, 37,9 і 14,5 % відповідно (частота С-алеля – 0,67, Т-алеля – 0,33). Розподіл вказаних генотипів у хворих з ІАТІ склав відповідно 37,1, 43,5 та 19,4 % (частота С-алеля – 0,59, Т-алеля – 0,41). Статистичне опрацювання цих даних показало, що характер розподілу алелів та генотипних варіантів за поліморфізмом С1173Т в осіб груп порівняння був схожим ($P = 0,057$ та $P = 0,178$ відповідно; рис. 2).

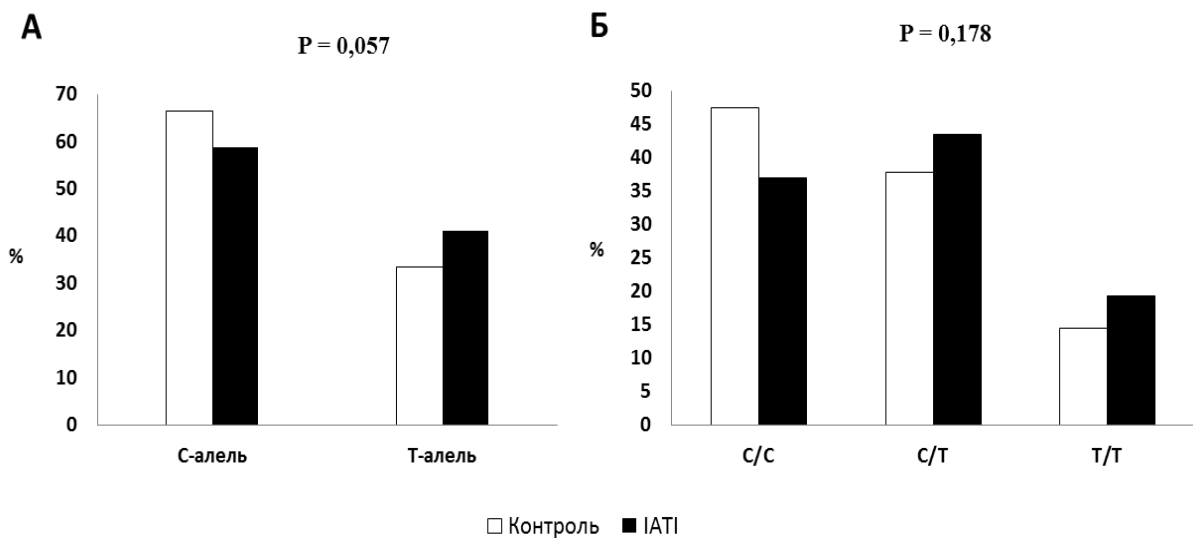


Рисунок 2 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за С1173Т-поліморфізмом гена *VKORC1* у хворих з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Застосування бінарної логістичної регресії у межах жодної моделі не виявило достовірного зв'язку досліджуваного поліморфізму з розвитком ІАТІ ($P > 0,05$; табл. 3). Не було встановлено асоціації поліморфного локусу С1173Т

гена *VKORC1* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту і після поділу осіб груп порівняння на підгрупи за статтю, ІМТ, наявністю АГ та звички палити ($P > 0,05$).

Таблиця 3 – Аналіз зв'язку С1173Т-поліморфізму гена *VKORC1* з ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Домінантна	0,071	1,542 (0,963–2,467)	0,054	1,914 (0,989–3,449)	18,96
Рецесивна	0,275	1,418 (0,757–2,657)	0,701	1,165 (0,535–2,538)	21,00
Наддомінантна	0,333	1,263 (0,787–2,026)	0,055	1,811 (0,989–3,318)	21,28
Аддитивна ^а	0,135	1,475 (0,886–2,455)	0,078	2,058 (0,912–3,926)	20,76
	0,117	1,717 (0,874–3,373)	0,260	1,620 (0,700–3,749)	

Примітка. Див. табл. 2.

^а Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння С/Т-генотипу з С/С-генотипом; другий рядок – порівняння Т/Т-генотипу з С/С-генотипом.

3. Вплив Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* на розвиток атеротромботичного підтипу інфаркту головного мозку.

Вивчення розподілу різних алельних варіантів за поліморфним локусом Arg406Arg гена *GGCX* показало, що серед осіб контрольної групи співвідношення генотипів С/С, С/Т та Т/Т складає 56,5, 40,3 і 3,2 % (частота С-алеля – 0,77, Т – 0,23); у пацієнтів дослідної групи дане співвідношення становить 51,8, 38,8 та 9,4 % відповідно (частота С-алеля – 0,71, Т – 0,29). Застосування χ^2 -критерію показало, що ні розподіл алелів, ні генотипів в осіб обох груп порівняння статистично значущо не відрізнявся ($P = 0,140$ і $P = 0,113$ відповідно; рис. 3).

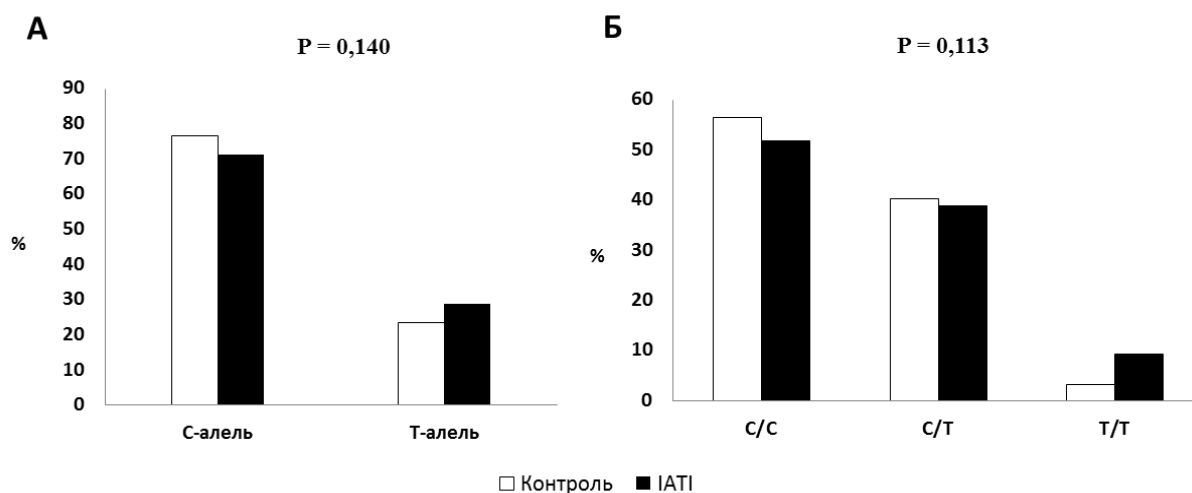


Рисунок 3 – Частота алелів (А) та генотипів (Б) за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* у хворих з ІАТІ (чорні стовпчики) та в контрольній групі (білі стовпчики). P – статистична значущість відмінностей показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Результати аналізу асоціації генотипів за Arg406Arg-поліморфним локусом гена *GGCX* з ІАТІ за допомогою логістичної регресії показали значущий зв'язок для рецесивної ($P_{\text{спост}} = 0,047$) та адитивної ($P_{\text{спост}} = 0,046$) моделей (табл. 4). Ризик розвитку ІАТІ у гомозигот за мінорним алелем (Т/Т) був у 3,1 (95 % CI = 1,016–9,566) раза вищий, ніж у носіїв основного алеля (С/С і С/Т) (відповідно до рецесивної моделі) та у 3,2 (95 % CI = 1,018–9,946) раза вищий, ніж у гомозигот за основним алелем (С/С) (відповідно до адитивної моделі). Проте статистична значущість цих показників зникла після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ та артеріальну гіпертензію ($P > 0,05$).

Таблиця 4 – Аналіз зв'язку Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX* з ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування

Модель	$P_{\text{спост}}$	OR _{спост} (95 % CI)	$P_{\text{попр}}$	OR _{попр} (95 % CI)	ІКА
Загалом					
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
Адитивна ^a	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)	
Жінки					
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
Адитивна	0,147	0,561 (0,251–1,225)	0,095	0,450 (0,176–1,150)	14,78
	–	–	–	–	
Без артеріальної гіпертензії					
Домінантна	0,112	0,500 (0,213–1,176)	0,038	0,314 (0,105–0,940)	13,91
Рецесивна	0,924	1,146 (0,069–18,913)	0,757	1,683 (0,062–45,373)	16,48
Наддомінантна	0,103	0,487 (0,205–1,158)	0,030	0,287 (0,093–0,884)	13,77
Адитивна	0,103	0,484 (0,203–1,158)	0,031	0,287 (0,093–0,892)	15,76
	0,915	0,857 (0,051–14,451)	0,961	1,088 (0,036–32,600)	

Примітка. Див. табл. 2.

^a Перший рядок в адитивній моделі відображає порівняння С/Т-генотипу з С/С-генотипом; другий рядок – порівняння Т/Т-генотипу з С/С-генотипом.

Відсутність серед жінок контрольної групи гомозигот за мінорним алелем завадила провести розрахунок ризику розвитку ІАТІ для носіїв Т/Т-генотипу в рамках рецесивної та адитивної моделей успадкування. Проте було встановлено, що в осіб жіночої статі з гетерозиготним генотипом ризик розвитку ІАТІ є достовірно нижчим, ніж у гомозигот за основним та мінорним алелями (OR_{спост} = 0,460; 95 % CI = 0,213–0,994; $P_{\text{спост}} = 0,048$) (відповідно до наддомінантної моделі). Необхідно відзначити, що достовірність результатів

зберігалася навіть після долучення до аналізу таких факторів ризику, як вік, ІМТ, паління та артеріальна гіпертензія ($OR_{\text{попр}} = 0,474$; 95 % CI = 0,257–0,971; $P_{\text{попр}} = 0,046$). Регресійний аналіз серед чоловіків показав, що жоден із генотипів за Arg406Arg-поліморфним сайтом гена *GGCX* не впливав на ризик розвитку ІАТІ в осіб цієї статі ($P > 0,05$).

Результати аналізу зв'язку поліморфного сайту Arg406Arg гена *GGCX* із розвитком ішемічного інсульту в осіб із нормальним АТ за допомогою бінарної логістичної регресії не показали асоціації зазначеного SNP з ризиком розвитку ІАТІ ($P_{\text{спост}} > 0,05$). Проте після поправки на стать, вік, ІМТ та звичку палити з'ясувалося, що у гетерозигот ризик настання ішемічного інсульту був нижчим ($OR_{\text{попр}} = 0,287$; 95 % CI = 0,093–0,884; $P_{\text{попр}} = 0,030$), ніж у гомозигот за основним та мінорним алелями (відповідно до супердомінантної моделі). В осіб з АГ зв'язок Arg406Arg-поліморфізму з розвитком ІАТІ виявлений не був. Не знайдено асоціації цього поліморфного локусу з ішемічним інсультом і після поділу осіб груп порівняння на підгрупи за ІМТ та звичкою палити ($P > 0,05$).

4. *Аналіз поєданого впливу поліморфізмів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту.*

Вважається, що гаплотипний аналіз є більш ефективним у пошуку генетичних детермінант поширених мультифакторіальних хвороб, ніж аналіз поліморфізму поодиноких нуклеотидів (Akey et al., 2001). Також відомо, що для створення гаплотипів слід використовувати лише ті поліморфні сайти, що знаходять у нерівноважному зчепленні. Тому спочатку нами був проведений розрахунок LD між усіма досліджуваними поліморфними варіантами, у результаті чого міцне нерівноважне зчеплення було виявлено лише між парою локусів G-1639A/C1173T гена *VKORC1* ($D = 0,809$; $r^2 = 0,518$). Це спонукало нас до проведення розрахунку частот гаплотипів за зазначеними SNP та пошуку їх зв'язку з ішемічним інсультом. Було виявлено, що гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C у дослідній групі зустрічалися достовірно частіше, ніж у контролі, та значущо збільшували ризик розвитку інсульту ($OR = 3,813$; 95 % CI = 1,268–11,298; $P = 0,010$ та $OR = 2,189$, 95 % CI = 1,185–4,045; $P = 0,011$ відповідно). Натомість частота гаплотипу -1639G/1173C була вищою серед представників групи контролю, що свідчило про його протективну роль щодо настання ІАТІ ($OR = 0,548$; 95 % CI = 0,393–0,765; $P < 0,001$).

За допомогою методу скорочення багатофакторної розмірності був проведений аналіз поєданого впливу поліморфних сайтів генів циклу вітаміну К та інших відомих факторів ризику атеросклерозу на розвиток ІАТІ та створення на основі їх класифікаційної моделі. Серед усіх можливих моделей найбільшу прогностичну здатність мала та, що включала поліморфний сайт G-1639A гена *VKORC1* та артеріальну гіпертензію (крос-перевірна здатність – 10/10; прогностична здатність 61 %). Таким чином, було встановлено, що поєднання в одній особі АГ та носійства мінорного А-алеля за вказаним поліморфним локусом є значимим предиктором високого ризику настання ішемічного атеротромботичного інсульту.

Для того щоб пояснити одержаний у нашому дослідженні зв'язок поліморфізмів генів циклу вітаміну К із розвитком ішемічного атеротромбо-

тичного інсульту необхідно насамперед з'ясувати сутність цих нуклеотидних замін та їх можливий вплив на функціонування тих білків, до структури генів яких вони належать.

Поліморфний сайт Arg406Arg розміщений у 9-му екзоні гена *GGCX* та являє собою заміну цитозину на тимін у позиції 8527, що однак не приводить до заміни амінокислоти у 406-му положенні поліпептидного ланцюга зрілого білка. Можемо припустити, що заміна цитозину на тимін, яка призводить до зміни кодуючого кодону CGC на CGT, хоча і не викликає зміни структури протеїну, проте впливає на швидкість його трансляції, а отже, змінює сумарну активність *GGCX* у клітині.

Поліморфний сайт C1173T розташований у першому інтроні гена *VKORC1* та призводить до заміни цитозину на тимін у 1173-й позиції. Низкою досліджень продемонстровано, що зазначений SNP знаходиться у міцному LD із G-1639A-поліморфним локусом гена *VKORC1* (D'Andrea et al., 2005; Zhang et al., 2014; Wang et al., 2006), що було показано і в нашій роботі. Поліморфізм G-1639A знаходиться у другому нуклеотиді E-боксу (CA/GGGTG) промотору гена *VKORC1* та спричинює заміну гауніну на аденін в -1639-му положенні. Така нуклеотидна конверсія призводить до перебудови E-боксу (з CGGGTG на CAGGTG), що дозволяє приєднуватися до нього репресивним білкам (Wang et al., 2008). Таким чином, вказаний поліморфний варіант призводить до змін активності промотору *VKORC1* і спричинює пригнічення утворення мРНК *VKORC1* та експресії ферменту.

Вищенаведене дозволяє припустити, що пригнічення відновлення вітаміну-К-епоксиду в носіїв -1639A- та 1173T-алелів за поліморфними сайтами гена *VKORC1* та зменшення сумарної активності γ -глутамілкарбоксилази у носіїв мінорного T-алеля за поліморфізмом Arg406Arg гена *GGCX* може призводити до недостатності γ -карбоксилювання вітамін-К-залежних білків і таким чином знижувати їх активність. Група зазначених протеїнів є дуже гетерогенною та включає в себе білки, що задіяні в різноманітних процесах як усередині клітин, так і в позаклітинному середовищі живих організмів.

З одного боку, зменшення активності вітамін-К-залежних факторів згортання крові (II, VII, IX, X) може призводити до пригнічення коагуляції крові, а отже, і до зменшення ризику тромбоутворення; а редукція активності GAS6 та періостину може пригнічувати тромбогенез і ріст атеросклеротичної бляшки, що в кінцевому підсумку буде зменшувати ризик ІАТІ.

З другого боку, недостатність γ -карбоксилювання протеїнів C, S, Z, MGP, GRP та остеокальцину у носіїв мінорних алелів за досліджуваними в нашій роботі поліморфізмами генів циклу вітаміну К може призводити до пригнічення активності перелічених білків. Наслідком цього може бути підвищений ризик тромбоутворення, мінералізації артерій та атеросклеротичної бляшки, що є важливими складовими патогенезу ішемічного атеротромботичного інсульту.

Узагальнювальна схема, в якій відображені можливі шляхи впливу різних алелів за поліморфними сайтами генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту, наведена на рис. 4.

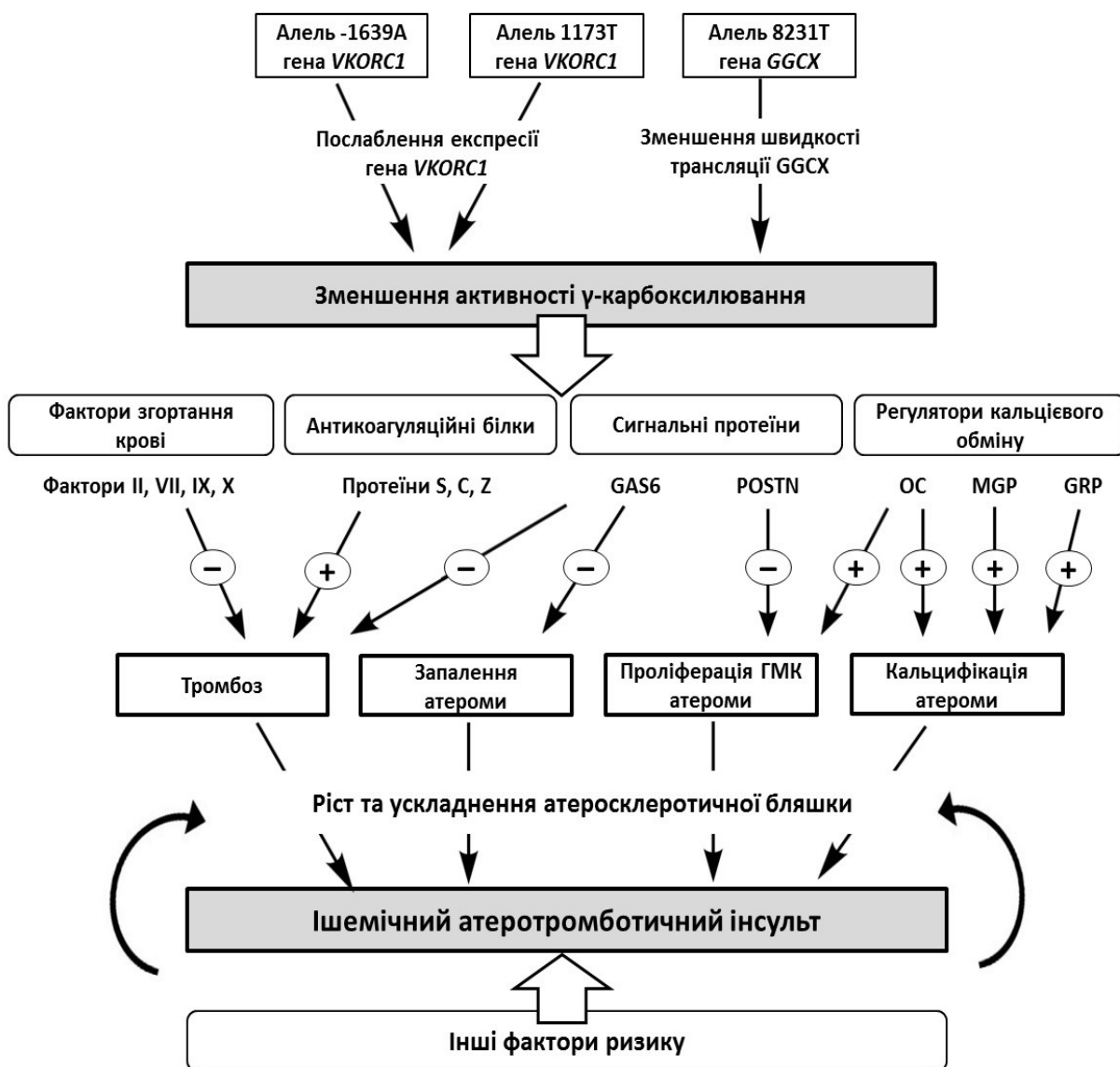


Рисунок 4 – Можливий вплив поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту. GAS6 – білок, що специфічно затримує ріст 6; POSTN – періостин; OC – остеокальцин; MGP – матриксний Gla-протеїн; GRP – Gla-rich-протеїн; ГМК – гладкі м'язові клітини

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нові результати, що вирішують наукове завдання, суть якого полягає у виявленні зв'язку поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб, що мають різні фактори його ризику.

1. Визначені частоти мінорних алелів за поліморфними варіантами генів циклу вітаміну К в осіб без ішемічного інсульту знаходяться у відповідності до більшості європейських популяцій і становлять 0,37 для G-1639A, 0,33 – для C1173T-поліморфізмів гена *VKORC1*, та 0,23 – для Arg406Arg-поліморфізму гена *GGCX*. Існує різниця в розподілі алельних варіантів між хворими з ІАТІ та особами групи контролю за поліморфізмом G-1639A гена *VKORC1* ($P = 0,027$),

тоді як співвідношення різних варіантів генотипу за поліморфізмами С1173Т (ген *VKORC1*) та Arg406Arg (ген *GGCX*) достовірно не відрізняється між групами порівняння ($P = 0,178$ і $P = 0,113$ відповідно).

2. Однонуклеотидний поліморфізм G-1639A промоторної ділянки гена *VKORC1* є вагомим предиктором ішемічного атеротромботичного інсульту та незалежним фактором його ризику. У носіїв мінорного А-алеля ймовірність настання ІАТІ значущо вища, ніж у гомозигот за основним G-алелем ($OR_{\text{попр}} = 2,138$; $P_{\text{попр}} = 0,015$).

3. Поліморфний сайт С1173Т першого інтрона гена *VKORC1* не асоційований із ризиком розвитку ішемічного інсульту атеротромботичного генезу ($P_{\text{попр}} = 0,054$).

4. Існує зв'язок між поліморфізмом Arg406Arg дев'ятого екзона гена *GGCX* та ішемічним атеротромботичним інсультом. Ризик розвитку ІАТІ у гомозигот за мінорним Т-алелем вищий, ніж у носіїв основного С-алеля ($OR_{\text{спост}} = 3,117$; $P_{\text{спост}} = 0,047$).

5. Вплив досліджуваних генетичних чинників на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту залежить від статі. Жінки, які є носіями мінорного А-алеля (G-1639A-поліморфізм гена *VKORC1*), мають вищий ризик розвитку ІАТІ, ніж особи жіночої статі з G/G-генотипом ($OR_{\text{попр}} = 2,848$; $P_{\text{попр}} = 0,038$). У жінок-гетерозигот С/Т (поліморфізм Arg406Arg гена *GGCX*) ризик настання ішемічного інсульту достовірно менший, ніж у носіїв інших генотипів ($OR_{\text{попр}} = 0,474$; $P_{\text{попр}} = 0,046$).

6. В осіб з $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$, які є носіями мінорного А-алеля за поліморфним локусом G-1639A гена *VKORC1*, ризик ІАТІ вищий, ніж у гомозигот за основним алелем ($OR_{\text{попр}} = 2,391$; $P_{\text{попр}} = 0,016$). Гомозиготи за мінорним А-алелем (G-1639A-поліморфізм гена *VKORC1*) з артеріальною гіпертензією мають вищий ризик ішемічного атеротромботичного інсульту, ніж гомозиготи G/G ($OR_{\text{попр}} = 4,029$; $P_{\text{попр}} = 0,029$). В осіб без артеріальної гіпертензії генотип С/Т (Arg406Arg-поліморфізм гена *GGCX*) призводить до зменшення ризику інфаркту головного мозку, якщо порівнювати з С/С- та Т/Т-генотипами ($OR_{\text{попр}} = 0,287$; $P_{\text{попр}} = 0,030$). Серед осіб, які не палять, носії мінорного алеля А за G-1639A-локусом гена *VKORC1* мають вищий ризик розвитку ІАТІ порівняно із гомозиготами G/G ($OR_{\text{попр}} = 2,412$; $P_{\text{попр}} = 0,013$).

7. Гаплотипи -1639G/1173Т та -1639A/1173С за поліморфізмами G-1639A і С1173Т гена *VKORC1* пов'язані з підвищеним ризиком розвитку ІАТІ ($OR = 3,813$; $P = 0,010$ і $OR = 2,189$; $P = 0,011$ відповідно), а гаплотип -1639G/1173С має протективне значення ($OR = 0,548$; $P < 0,001$). Аналіз поєданого впливу поліморфних сайтів генів циклу вітаміну К та інших відомих факторів ризику атеросклерозу на розвиток ІАТІ дав можливість створити класифікаційну модель, що включає поліморфний сайт G-1639A гена *VKORC1* та артеріальну гіпертензію (прогностична значущість 61 % за методом MDR, $P = 0,022$). Поєднання в однієї особи АГ та носійства мінорного А-алеля за зазначеним поліморфним сайтом є значущим предиктором підвищеного ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Dubovyk Ye.I., Harbuzova V.Yu., Ataman A.V. G-1639A but Not C1173T VKORC1 Gene Polymorphism Is Related to Ischemic Stroke and Its Various Risk Factors in Ukrainian Population // BioMed Research International. – 2016. – Vol. 2016, Article number 1298198. doi:10.1155/2016/1298198 (обліковується наукометричною базою Scopus) (здобувач провів молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготував статтю до друку).

2. Дубовик Є.І., Гарбузова Є.А., Атаман О.В. Статеві відмінності у зв'язку поліморфізму промотора гена вітамін К-епоксидредуктази з ішемічним атеротромботичним інсультом // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2016. – №4 (3). – С. 453–460. (здобувач провів молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготував статтю до друку).

3. Дубовик Є.І. Застосування мультіваріабельної логістичної регресії для аналізу зв'язку C1173T поліморфізму гена вітамін К-епоксидредуктази з ішемічним атеротромботичним інсультом // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2016. – №4 (56/1). – С. 111–115. (здобувач провів молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготував статтю до друку).

4. Дубовик Є.І., Гарбузова В.Ю., Атаман О.В. Аналіз поєданого впливу алельних поліморфізмів генів циклу вітаміну К на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2016. – №4 (56/2). – С. 87–91. (здобувач провів молекулярно-генетичні дослідження та, статистичний аналіз результатів).

5. Дубовик Є.І., Гарбузова В.Ю., Атаман О.В. Аналіз асоціації C1173T поліморфізму гена вітамін К-епоксидредуктази з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском // Буковинський медичний вісник. – 2016. – Т. 20, №4 (80). – С. 63–67. (здобувач провів молекулярно-генетичні дослідження та підготував статтю до друку).

6. Дубовик Є.І., Гарбузова В.Ю., Атаман О.В. Дослідження асоціації гаплотипів гена вітамін К-епоксидредуктази (VKORC1) з ішемічним атеротромботичним інсультом // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2016. – №4(4). – С. 512–516. (здобувач провів молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготував статтю до друку).

7. Dubovyk Ye., Harbuzova Ye. Lack of association between C1173T polymorphism of VKORC1 gene and ischemic atherothrombotic stroke // 8th International Student Medical Congress in Košice. University of Pavol Jozef Šafárik, Slovakia, 22-24 June 2016. – P. 145.

8. Дубовик Є.І., Гарбузова Є.А., Атаман О.В. Аналіз зв'язку C1173T поліморфізму гена вітамін К-епоксидредуктази з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб з нормальним та підвищеним індексом маси тіла // 4th

International Scientific Conference of Students and Young Scientists “Topical Issues of Clinical and Theoretical Medicine”. Sumy State University, Ukraine, 21-22 April 2016. – P. 158–159.

9. Дубовик Є. Вивчення зв'язку G-1639A поліморфізму гена вітаміну К епоксидредуктази з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб з нормальним та підвищеним артеріальним тиском // 20th International Medical Congress of Students and Young Scientists. I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ukraine, 25-27 April 2016. – P. 269.

10. Dubovyk Ye. I. Analysis of association of C1173T Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene polymorphism with ischemic atherothrombotic stroke in smokers and non-smokers // International Medical Congress of Silesia 2016. Medical University of Silesia, Katowice, Poland, 28-29 April 2016. – P. 117.

11. Harbuzova Ye., Dubovyk Ye., Obukhova O. Analysis of association of G-1639A VKORC1 gene polymorphism with ischemic stroke in Ukrainian population // 27th European Students' Conference “Facing Antimicrobial Resistance – Research Revolution wanted”. Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany, September 28 – October 1 2016. – P. 501.

12. Дубовик Є.І., Гарбузова Є.А., Атаман О.В. Зв'язок G-1639A поліморфізму гена вітаміну К-епоксидредуктази з ішемічним атеротромботичним інсультом та деякими факторами його ризику // Збірник матеріалів VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю: «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції». Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна, 5-7 жовтня 2016 р. – С 80.

13. Дубовик Є.І., Гарбузова В.Ю., Атаман О.В. Вплив поліморфізму Arg406Arg гена γ -глутамілкарбоксилази на концентрацію глюкози крові у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті». Харківський національний медичний університет, Харків, Україна, 24-25 листопада 2016 р. – С. 27–28.

14. Дубовик Є.І., Гарбузова В.Ю., Атаман О.В. Вивчення зв'язку Arg406Arg поліморфізму гена γ -глутамілкарбоксилази з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб різної статі // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров'я». Українська медична стоматологічна академія, Полтава, Україна, 9 грудня 2016 р. – С. 30–31.

АНОТАЦІЯ

Дубовик Є.І. Патогенетичне значення поліморфізму генів циклу вітаміну К для розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Сумський державний університет МОН України, Суми, 2017.

Дисертація присвячена вивченню впливу поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К (G-1639A і C1173T гена *VKORC1* та Arg406Arg гена *GGCX*) на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТІ). Встановлено, що у

представників української популяції існує зв'язок між частотою генотипів за поліморфними сайтами G-1639A (ген *VKORC1*) і Arg406Arg (ген *GGCX*) та ризиком розвитку ІАТІ. Носії мінорного А-алеля (G-1639A-поліморфізм) мають у 2,1 раза більшу ймовірність настання ішемічного інсульту, ніж гомозиготи за основним G-алелем. Зазначений ризик зростає в осіб жіночої статі, пацієнтів із надмірною вагою, артеріальною гіпертензією та без звички палити. Ризик розвитку інфаркту головного мозку в осіб з генотипом Т/Т (Arg406Arg-поліморфізм) у 3,1 раза вищий, ніж у носіїв основного С-алеля. Водночас гетерозиготний С/Т-генотип у жінок зменшує вірогідність розвитку ІАТІ, якщо порівнювати з генотипами С/С і Т/Т.

Аналіз поєднаного впливу показав, що гаплотипи -1639G/1173T та -1639A/1173C пов'язані зі збільшенням ризику ІАТІ, а гаплотип -1639G/1173C є протективним фактором щодо його розвитку. Також виявлено, що поєднання в однієї особи артеріальної гіпертензії з носійством А-алеля за поліморфізмом G-1639A пов'язане з високим ризиком настання ІАТІ.

Ключові слова: поліморфізм генів, ішемічний атеротромботичний інсульт, вітамін-К-епоксидредуктаза, γ -глутамілкарбоксилаза, фактори ризику.

АННОТАЦІЯ

Дубовик Е.И. Патогенетическое значение полиморфизма генов цикла витамина К для развития ишемического атеротромботического инсульта. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Сумский государственный университет МОН Украины, Сумы, 2017.

Диссертация посвящена изучению влияния полиморфных вариантов генов цикла витамина К (G-1639A и C1173T гена *VKORC1* и Arg406Arg гена *GGCX*) на развитие ишемического атеротромботического инсульта (ИАТИ). Установлено, что у представителей украинской популяции существует связь между частотой генотипов за полиморфными сайтами G-1639A (ген *VKORC1*) и Arg406Arg (ген *GGCX*) и риском развития ИАТИ. Вероятность наступления ишемического инсульта у носителей мінорного А-аллеля (G-1639A-поліморфізм) в 2,1 раза выше, чем у гомозигот по основному G-аллелю. Указанный риск возрастает у лиц женского пола, пациентов с избыточным весом, артериальной гипертензией и без привычки курить. Риск развития инфаркта головного мозга у лиц с генотипом Т/Т (Arg406Arg-поліморфізм) в 3,1 раза выше, чем у носителей основного С-аллеля. При этом гетерозиготный С/Т-генотип у женщин уменьшает вероятность развития ИАТИ, если сравнивать с генотипами С/С и Т/Т.

Анализ сочетанного воздействия показал, что гаплотипы -1639G/1173T и -1639A/1173C связаны с увеличением риска ИАТИ, а гаплотип -1639G/1173C является защитным фактором касательно его развития. Также выявлено, что сочетание у одного человека артериальной гипертензии с носительством А-аллеля за полиморфизмом G-1639A связано с высоким риском наступления ИАТИ.

Ключевые слова: полиморфизм генов, ишемический атеротромботический инсульт, витамин-К-епоксидредуктаза, γ -глутамилкарбоксилаза, факторы риска.

ABSTRACT

Dubovyk Ye.I. Pathogenetic value of vitamin K cycle genes polymorphisms for ischemic atherothrombotic stroke development – Manuscript copyright.

Thesis for the PhD degree in Medicine, speciality 14.03.04 – pathological physiology. – Sumy State University, 2017.

Thesis is dedicated to the study of vitamin K cycle genes polymorphic variants impact on the development of ischemic atherothrombotic stroke (IAS).

The study group included 170 unrelated Ukrainian patients with a mean age of 64.7 ± 0.73 years who had IAS. The control group consisted of 124 individuals with the absence of cardio-vascular pathologies. Genotyping of *VKORCI* (G-1639A (rs9923231) and C1173T (rs9934438)) and *GGCX* (Arg406Arg (rs2592551)) gene polymorphisms was performed using PCR-RFLP (polymerase chain reaction with following restriction fragment length polymorphism analysis) method. Most statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Science software (SPSS, version 17.0, Chicago, IL, USA). Linkage disequilibrium (LD) and haplotype frequencies were analyzed by Arlequin (version 3.1, Bern, University of Berne, Switzerland). Multifactorial dimensionality reduction was used for modelling the interactions between loci. All statistical tests were two-sided, $P < 0.05$ was considered significant.

The data showed that G-1639A polymorphism was related to IAS, regardless of adjustment for age, sex, body mass index, smoking status and arterial hypertension. The risk for IAS in -1639A allele carriers ($OR = 2.138$, $P = 0.015$) was higher than in individuals with G/G genotype. Genotypic association of G-1639A was also revealed in women after adjustment for covariates of age, BMI, smoking status and arterial hypertension under dominant ($P_{adj} = 0.038$, $OR_{adj} = 2.848$, $95\% CI = 1.058-7.665$) and additive ($P_{adj} = 0.049$, $OR_{adj} = 2.888$, $95\% CI = 1.006-8.293$) model. In men significant difference was present only in the crude additive model ($P_{obs} = 0.049$, $OR_{obs} = 2.240$, $95\% CI = 1.002-5.007$), but was lost after adjustment ($P_{adj} = 0.077$). The association between G-1639A SNP and IAS was also found to be significant in individuals with $BMI \geq 25\text{kg/m}^2$ under dominant model with or without the adjustment for gender, age, smoking and arterial hypertension ($P_{obs} = 0.008$, $P_{adj} = 0.016$, $OR_{adj} = 2.391$, $95\% CI = 1.180-4.843$). The frequencies of G-1639A genotypes were different between the cases and controls with arterial hypertension either before or after adjustment for the covariates under dominant ($P_{obs} = 0.002$, $P_{adj} = 0.029$, $OR_{adj} = 2.374$, $95\% CI = 1.091-5.166$) and recessive ($P_{obs} = 0.015$, $P_{adj} = 0.049$, $OR_{adj} = 2.862$, $95\% CI = 1.003-8.169$) model. Significant association under additive model after adjusting was revealed only for A/A genotype ($P_{adj} = 0.029$, $OR_{adj} = 4.029$, $95\% CI = 1.153-14.077$).

Analysis of C1173T genotypic association with IAS under the four common models of inheritance did not find the link with ischemic stroke either in total group or subgroups by gender, BMI and BP under different inheritance models. The association was absent both without and with adjustment ($P_{obs} > 0.05$, $P_{adj} > 0.05$).

It was also revealed that *GGCX* Arg406Arg polymorphism was related to IAS in Ukrainian population. The risk for this disease in patients with T/T genotype was higher than in major C-allele carriers ($OR_{obs} = 3.117$; $95\% CI = 1.016-9.566$; $P_{obs} = 0.047$). 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 ($P_{\text{obs}} = 0.048$; $OR_{\text{obs}} = 0.460$; 95 % CI = 0.213-0.994). Statistical significance of these results persisted even after adjustment for age, BMI, smoking and hypertension ($P_{\text{adj}} = 0.046$, $OR_{\text{adj}} = 0.474$, 95% CI = 0.257-0.971).

Haplotype analysis demonstrated that -1639G/1173T and -1639A/1173C were related to increased risk for IAS ($OR = 3.813$, $P = 0.010$ and $OR = 2.189$, $P = 0.011$, resp.), while -1639G/1173C was a protective factor for ischemic stroke ($OR = 0.548$, $P < 0.001$). It was also found that combination of the hypertension with A-allele for the G-1639A polymorphism in one person is associated with a high risk of IAS.

Key words: gene polymorphism, ischemic atherothrombotic stroke, vitamin K epoxide reductase, γ -glutamyl carboxylase, risk factors.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія.

ІАТІ – ішемічний атеротромботичний інсульт.

ІКА – інформаційний критерій Акайке.

ІМТ – індекс маси тіла.

А – аденін.

Arg – аргінін.

С – цитозин.

СІ – довірчий інтервал.

G – гуанін.

GAS6 – білок, що специфічно затримує ріст б.

GGCX – γ -глутамілкарбоксилаза.

GRP – Gla-rich-протеїн.

LD – нерівноважне зчеплення.

MDR – зменшення багатфакторної розмірності.

MGP – матриксний Gla-протеїн.

OR – відношення шансів.

PCR – полімеразна ланцюгова реакція.

SNP – однонуклеотидний поліморфізм.

T – тимін.

VKORC1 – субодиниця 1 вітамін-К-епоксидредуктазного комплексу.

Підписано до друку 24.03.2017 р.
Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 1,1. Обл. –вид. арк. 0,9. Тираж 100 пр. Зам. № 282.

Видавець і виготовлювач
Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №3062 від 17.12.2007.