

ВИВЧЕННЯ АСОЦІАЦІЇ BsmI ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВІТАМІНУ D З ІНДЕКСОМ МАСИ ТІЛА У ХВОРИХ З ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ

О.А. Обухова

Сумський державний університет

Вступ

Рецептор вітаміну D (VDR) є представником суперсімейства ядерних рецепторів, який функціонує як класичні рецептори ендокринної системи. Гормональна система вітаміну D, основними компонентами якої є кальцитріол ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) і рецептор вітаміну D (VDR), відіграє важливу роль не тільки в регуляції функціональних і метаболічних процесів в організмі, а й у розвитку багатьох недуг, серед яких серцево-судинні хвороби [2]. Існують численні клінічні й експериментальні докази того, що високі дози вітаміну D спричиняються до уражень артерій і серцевих клапанів [1, 3, 4, 5]. Рецептори вітаміну D широко представлені в організмі і виявлені не менш ніж у 35 органах і тканинах, причому не тільки в таких класичних органах-мішенях для вітаміну D, як кишечник, нирки і кістковий апарат, але й мозку, серці, підшлунковій і парацитоподібних залозах, шкірі, статевій системі, легенях, жировій тканині, міокарді та інших органах і тканинах [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. З активацією цих рецепторів пов'язують цілу низку ефектів, що можуть мати стосунок до здатності вітаміну D індукувати артеріосклеротичні зміни [14, 15].

З огляду на зазначене постає питання про можливу роль VDR не тільки в біологічній дії кальцитріолу, а й у патогенезі судинних уражень та їх тяжких наслідків, таких як інфаркт міокарда, ішемічний інсульт, аневризма аорти. Один з підходів до розв'язання цієї проблеми полягає в дослідженні зв'язку поліморфізму гена VDR з розвитком серцево-судинних хвороб.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням "Визначення ролі поліморфізму пооди-

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

ноких нуклеотидів у розвитку склеротичних уражень кровоносних судин" (№ 91.01.01.11-12).

Мета дослідження – провести аналіз асоціації BsmI поліморфізму гена VDR, з індексом маси тіла (ІМТ) у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ).

Матеріали і методи дослідження

У роботі використано венозну кров 170 хворих з ІАТІ (42,4% жінок і 57,6% чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік – $64,7 \pm 0,73$ роки), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні №5.

Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, даних МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [16], на підставі анамнестичних даних і особливостей клінічного перебігу хвороби, даних ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови, ЕКГ.

Контрольна група складалася зі 124 пацієнтів, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми і вимірювання артеріального тиску. Контрольна група і група хворих з ІАТІ не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ($P=0,294$ за χ^2 -критерієм), проте середній вік першої ($76,7 \pm 0,93$ роки) був істотно вищим, ніж другої ($P < 0,001$).

Визначення BsmI поліморфізму гена VDR (rs1544410) проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виявленні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморожували і зберігали при температурі -20°C . ДНК з неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт BsmI поліморфізму, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – $5\text{'-AGGGAGACGTAGCAAAAGGAG-3'}$ і зворотного (antisense) – $5\text{'-TGTCCCAAGGTCACAATAAC-3'}$. Праймери було синтезовано фірмою "Metabion" (Німеччина). Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу,

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

1,5 мМ сульфату магнію, 250 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагмента промотора складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 60°C (45 с) і елонгація – 72°C (1 хв). Пізніше 6 мкл продукту ампліфікації фрагмента промотора інкубували при 37°C протягом 20 годин з 2 ОД рестриктази BsmI ("Ферментас", Литва) у буфері R такого складу: 10 мМ трис-НСІ (рН 8,5), 10 мМ хлориду магнію 100 мМ хлориду калію і 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 58980 позиції гена VDR містився гуанін, ампліфікат, який складався з 425 пар основ, розщеплювався рестриктазою BsmI на два фрагменти – 232 і 193 пари основ. У разі заміни гуаніну на аденін сайт рестрикції для BsmI втрачався і утворювався один фрагмент розміром 425 пар основ (рис. 1).

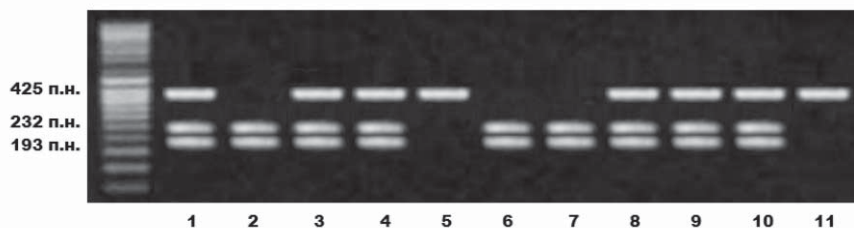


Рис. 1. Результати рестрикційного аналізу BsmI поліморфізму гена VDR: доріжки 5, 11 відповідають b/b генотипу, 1,3,4,8,9,10 – b/B генотипу, 2,6,7 – B/B генотипу.

Ампліфікати вивченого фрагмента гена VDR після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 40 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 критерієм. Величини $P < 0,05$ вважали статистично значимими.

Отримані результати та їх обговорення

Нами були дослідженні дві групи пацієнтів утворених за показником ІМТ (<25 кг/м² і ≥25 кг/м²). Генотипування хворих з ІАТІ та пацієнтів контрольної групи за BsmI поліморфізмом гена VDR дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються окремі варіан-

ти цього гена залежно від величини ІМТ, а також порівняти їх між групами загалом і за генотипами.

При порівнянні даних про частоту варіантів поліморфізму BsmI у осіб, що мають різне значення ІМТ окремо в контрольній групі і у хворих з ІАТІ одержані наступні результати. У контрольній групі було виявлено осіб з ІМТ<25кг/м², що мають генотип b/b 17 (44,7%), генотип b/B - 18 (47,4%), генотип B/B - 3 (7,9%), а осіб з ІМТ≥25кг/м² відповідно 40 (47,1%), 34 (40,0%), 11 (12,9%). Порівняння отриманих даних свідчить про відсутність статистично значимих відмінностей у розподілі алейних варіантів поліморфізму BsmI між особами з ІМТ<25кг/м² та ІМТ≥25кг/м² у контрольній групі ($\chi^2=0,955$, $P_2=0,620$) (табл. 1).

Таблиця 1

Розподіл осіб різного генотипу за BsmI поліморфізмом гена VDR у контрольній групі і групі хворих з ІАТІ залежно від величини ІМТ

Генотип	ІМТ<25кг/м ² (n)		ІМТ≥25кг/м ² (n)	
	Контроль	ІАТІ	Контроль	ІАТІ
b/b	17	17	40	54
b/B	18	16	34	58
B/B	3	8	11	17
	P ₁ =0,280		P ₁ =0,737	
	P ₂ =0,620, P ₃ =0,576, P ₄ =0,454, P ₅ =0,106, P ₆ =0,482			

Примітка: n – кількість осіб, P₁ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем і ІАТІ, P₂ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з ІМТ<25 кг/м² та ІМТ≥25кг/м² у контролі, P₃ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з ІМТ<25 кг/м² та ІМТ≥25 кг/м² у групах з ІАТІ, P₄ – значимість відмінностей у частоті осіб з ІМТ<25 кг/м² та ІМТ≥25 кг/м² з генотипом b/b у контрольній групі і групі з ІАТІ, P₅ – значимість відмінностей у частоті осіб з ІМТ<25 кг/м² та ІМТ≥25 кг/м² з генотипом b/B у контрольній групі і групі з ІАТІ, P₆ – значимість відмінностей у частоті осіб з ІМТ<25 кг/м² та ІМТ≥25 кг/м² з генотипом B/B у контрольній групі і групі з ІАТІ.

Серед хворих з ІАТІ, що мають ІМТ < 25 кг/м² було 17 (41,5%) з генотипом b/b, 16 (39,0%) з генотипом b/V і 8 (19,5%) з генотипом V/V, а серед осіб з ІМТ ≥ 25 кг/м² відповідно 54 (41,9%), 58 (44,9%) і 17 (13,2%). Одержані результати свідчать про відсутність статистично значимих відмінностей серед пацієнтів з ІАТІ, що мають різне значення ІМТ ($\chi^2=0,611$, $P=0,737$). Таким чином, і у хворих з ІАТІ, і у відносно здорових осіб поліморфні варіанти гена VDR не впливали на ІМТ (табл. 1).

Не було відмінностей у частоті осіб з нормальним і збільшеним ІМТ в основній і контрольній групах, поділених на підгрупи за BsmI поліморфізмом. Так, серед носіїв генотипу b/b в контрольній групі було 17 (29,8%) осіб з ІМТ < 25 кг/м² і 40 (70,2%) осіб з ІМТ ≥ 25 кг/м², а у групі хворих з ІАТІ відповідно 17 (23,9%) і 54 (76,1%). Частота осіб з різним значенням ІМТ, що мають генотип b/b у групах порівняння достовірно не відрізняється ($\chi^2=0,561$, $P=0,454$). Серед осіб з генотипом b/V у контролі було 18 (34,6%) з ІМТ < 25 кг/м² і 34 (65,4%) з ІМТ ≥ 25 кг/м², а у групі пацієнтів з ІАТІ їх кількість становила відповідно 16 (21,6%) і 58 (78,4%). Відмінності в частоті осіб ІМТ < 25 кг/м² і ІМТ ≥ 25 кг/м² за даним генотипом у групах порівняння також відсутні ($\chi^2=2,617$, $P=0,106$). Щодо носіїв V/V генотипу, то в контрольній групі кількість осіб з ІМТ < 25 кг/м² дорівнює 3 (21,4%) і 11 (78,6%) з ІМТ ≥ 25 кг/м², а серед хворих 8 (32,0%) і 17 (68,0%) відповідно. Частота осіб-носіїв V/V генотипу серед представників з різним значенням ІМТ у контрольній і дослідній групі не виходить за межі статистичної значимості ($\chi^2=0,495$, $P=0,482$) (табл. 1).

Таким чином, можна було зробити висновок, що показник ІМТ не впливає на відсутність асоціації між BsmI поліморфізмом гена VDR та атеротромботичним варіантом ішемічного інсульту.

Висновки

1. У виконаній нами роботі вперше проаналізовано асоціацію BsmI поліморфізму гена VDR з індексом маси тіла у хворих з гострими порушеннями мозкового кровообігу і не виявлено зв'язку досліджуваного генетичного чинника з ІМТ у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом і умовно здорових осіб.

2. Перспективи подальших досліджень пов'язані з вивченням зв'язку інших одонуклеотидних поліморфізмів гена VDR (FokI, ApaI і TaqI) з ІМТ у хворих з ішемічним інсультом.

Література

1. Атаман О.В. Механізми розвитку D-зінервітамінозних уражень кровоносних судин / О.В. Атаман. – Суми: вид-во СумДУ, 2011. – 149 с.
2. Norman P.E. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries / P.E. Norman, J.T. Powell // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol.25. – P. 39-46.
3. Effects of an aging vascular model on healthy and diseased hearts / D. Jeger, R.F. da Silva, I. Lartaud [e.a.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol.293. – P. 1334-1343.
4. Maternal and postnatal vitamin D ingestion influences rat aortic structure, function and elastin content / P. Norman, I. Moss, M. Sian [e.a.] // *Cardiovasc Res.* – 2002. – Vol.55. – P. 169-174.
5. Ortlepp J.R. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis / J.R. Ortlepp, R. Hoffmann, F. Ohme [e.a.] // *Heart.* – 2001. – Vol. 85. – P. 635-638.
6. Bouillon R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications / R. Bouillon // *Endocrinology* / eds. L.J. DeGroot, J.L. Jameson. – Philadelphia: W.C.B. Saunders, 2001. – P. 1009-1028.
7. DeLuca H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D / H.F. DeLuca // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Suppl.1 – P. 1689S-1696S.
8. The role of vitamin D in cancer prevention / C.F. Garland, E.D. Garland [e.a.] // *Am. J. Public. Health.* – 2006. – Vol. 96. – P. 252-261.
9. Holick M.F. Vitamin D. Importance in the prevention of cancer, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis / M.F. Holick // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Vol. 79. – P. 362-371.
10. Holick M.F. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical application / M.F. Holick, M. Garabedian // *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* / M.J. Favus. – DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006. – P. 129-136.
11. Holick M.F. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health / M.F. Holick // *Mayo Clin. Proc.* – 2006. – Vol. 81. – P. 353-373.
12. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the rennin-angiotensin system / C.Y. Li, J. Kong [e.a.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110 (2). – P. 229-238.
13. 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds / D. Somjen, Y. Weisman, F. Kohen [e.a.] // *Circulation.* – 2005. – № 111. – P. 1666-1671.

14. Kawashima H. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates Ca-ATPase in a vascular smooth cell line / H. Kawashima // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1988. – Vol. 150. – P. 1138-1143.

15. Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells / J.R. Wu-Wong, M. Nakane, J. Ma [e.a.] // *Atherosclerosis*. – 2006. – Vol. 186. – P. 20-28.

16. Adams H.P. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment / H.P. Adams, B.H. Bendixen, L.J. Kappelle [e.a.] // *Stroke*. – 1993. – Vol. 24. – P. 35-41.

Резюме

Обухова О.А. Вивчення асоціації BsmI поліморфізму гена рецептора вітаміну D з індексом маси тіла у хворих з ішемічним інсультом.

Представлені результати визначення зв'язку BsmI (rs1544410) поліморфізму гена рецептора вітаміну D (VDR) у 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ) і 124 здорових індивідумів (контрольна група). Встановлено, що у хворих з ІАТІ розподіл різних варіантів генотипів в групі з ІМТ<25кг/м² становить: b/b – 41,5%, b/B – 39,0%, B/B – 19,5%, тоді як серед осіб з ІМТ≥25кг/м² відповідно 41,9%, 44,9% і 13,2% (P=0,737 за χ²-критерієм). Відмінності в розподілі генотипу (b/b, b/B, B/B) між досліджуваними групами не були статистично достовірними.

Ключові слова: рецептор вітаміну D, поліморфізм генів, ішемічний інсульт, індекс маси тіла.

Резюме

Обухова О.А. Изучение ассоциации BsmI полиморфизма гена рецептора витамина D с индексом массы тела у больных с ишемическим инсультом.

Представлены результаты определения связи BsmI (rs1544410) полиморфизма гена рецептора витамина D (VDR) у 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (ИАТИ) и 124 здоровых индивидумов (контрольная группа) с индексом массы тела (ИМТ). Установлено, что у больных с ИАТИ распределение разных вариантов генотипов в группе с ИМТ<25кг/м² составляет: b/b – 41,5%, b/B – 39,0%, B/B – 19,5%, тогда как среди лиц с ИМТ≥25кг/м² соответственно 41,9%, 44,9% и 13,2% (P=0,737 по χ²-

критерию). Отличия в распределении разных вариантов генотипа (b/b, b/B, B/B) между исследуемыми группами не были статистически достоверными.

Ключевые слова: рецептор витамина D, полиморфизм генов, ишемический инсульт, индекс массы тела.

Summary

Obukhova O.A. Study of the associations BsmI polymorphism of vitamin D receptor gene with body mass index in patients with ischemic stroke.

The results of determine the relationship BsmI (rs1544410) polymorphism of gene receptor vitamin D (VDR) for 170 patients with atherothrombotic ischemic stroke (IATI) and 124 healthy persons (control group) with anthropometric measures of body mass index (BMI). It was shown that in the patients with IATI distribution of b/b homozygotes, heterozygotes and B/B homozygotes was – 41,5%, 39,0%, 19,5% (in control – 41,9%, 44,9%, 13,2%, P=0,903 by χ²-test). Established that differences in the distribution of genotypes of different variants (b/b, b/B, B/B) between the groups were not statistically significant.

Key words: vitamin D receptor, gene polymorphism, ischemic stroke, body mass index.

Рецензент: д.біол.н., проф. С.М. Федченко