

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

© Дельва М.Ю.
УДК 616.831-005.1-056.5

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ -174 G/C ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 ПРИ НЕЛАКУНАРНЫХ ИНСУЛЬТАХ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗНОЙ МАССОЙ ТЕЛА И ЕГО АССОЦИАЦИИ С КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ЗАБОЛЕВАНИЯ*

Дельва М.Ю.

ВГУЗУ „Украинская медицинская стоматологическая академия”, г. Полтава

Нами вивчено розподілення однонуклеотидного поліморфізму (ОНП) -174 G/C гену інтерлейкіну-6 (IL-6) та визначено його асоціації з особливостями клінічного перебігу і функціональними наслідками нелакунарних інсультів у 33 пацієнтів з нормальною масою тіла та у 37 пацієнтів з абдомінальним ожирінням (АО) II ст. В дослідження було включено пацієнтів з відносно однаковими показниками віку (від 56 до 65 років), клінічної важкості захворювання при госпіталізації (від 5 до 10 балів згідно шкали NIHSS), розмірів церебрального ураження (від 10 до 20 см³), без цукрового діабету та вираженої супутньої патології. При нелакунарних інсультах у пацієнтів з АО II ст. достовірно частіше зустрічається -174 С алель гену IL-6, у порівнянні з пацієнтами, що мають нормальну масу тіла (65% проти 45%, $p < 0,05$). У пацієнтів з нормальною масою тіла G/G генотип -174 G/C гену IL-6 достовірно асоціюється з більш важким клінічним перебігом гострого періоду захворювання, згідно шкали NIHSS, а також з підвищеною ймовірністю розвитку «інвалідизуючих» функціональних станів (значення модифікованої шкали Ренкіна більше 2) через 12 тижнів після нелакунарного інсульту. При АО II ст. не спостерігається будь яких закономірностей клінічного перебігу нелакунарних інсультів та формування постінсультних «інвалідизуючих» функціональних наслідків в залежності від ОНП -174 G/C гену IL-6.

Ключові слова: ішемічний нелакунарний інсульт, абдомінальне ожиріння, інтерлейкін-6, ген, -174 G/C однонуклеотидний поліморфізм.

Данное исследование является фрагментом плановой научно-исследовательской работы кафедры нервных болезней с нейрохирургией и медицинской генетикой ВГУЗУ „Украинская медицинская стоматологическая академия” „Оптимизация и патогенетическое обоснование методов диагностики и лечения сосудистых и нейродегенеративных заболеваний нервной системы с учетом клинико-гемодинамических, гормональных, метаболических, генетических и иммуно-воспалительных факторов” (номер государственной регистрации 0111U006303).

Вступление

В последние годы в научной литературе появились сообщения о непосредственном и существенном влиянии ожирения, как отдельного феномена, на клиническое течение и функциональные исходы ишемических инсультов. В частности, при условии одинаковых нейровизуализационных морфометрических характеристик церебральных инфарктов, у лиц с абдоминальным ожирением (АО) ишемические инсульты характеризуются более тяжелым клиническим течением, более медленным регрессом неврологической симптоматики, более частым развитием разнообразных осложнений и, как следствие, более длительным периодом госпитализации и заметно худшим функциональным восстановлением [1].

Среди основных факторов, которые определяют клиническую тяжесть инсультов, весомое значение

занимает интенсивность локального и системного постшемического воспалительного ответа. Провоспалительный цитокин – интерлейкин-6 (ИЛ-6) является одним из ключевых регуляторов интенсивности постшемического воспалительного ответа через влияние на процессы синтеза и секреции острофазовых протеинов, хемокинов, молекул адгезии и т. д. Высокие уровни ИЛ-6 сыворотки крови в первые сутки после развития ишемического инсульта ассоциируются с вторичным постшемическим прогрессированием церебрального поражения и являются независимым прогностическим маркером как тяжести острого инсульта и вероятности развития ранних неврологических осложнений, так и долгосрочного функционального исхода [10].

Степень подъема ИЛ-6 крови при инсультах наиболее тесно коррелирует с объемом церебрального поражения [10]. Однако нами показано (работа нахо-

* Цитування при атестації кадрів: Дельва М.Ю. Однонуклеотидный полиморфизм -174 G/C гена интерлейкина-6 при нелакунарных инсультах у пациентов с разной массой тела и его ассоциации с клинико-функциональными характеристиками заболевания // Проблемы экологии і медицини. – 2013. – Т. 17, № 3-4. – С. 3 –8.

дится в печати), что при условно одинаковых размерах церебральных инфарктов у пациентов с АО I-II степени (ст.) уровни ИЛ-6 достоверно увеличены как в 1-е, так и на 10-е сутки после развития инсульта, по сравнению с пациентами с нормальной массой тела. До сегодняшнего времени остается неизвестным источник значительного повышения уровня ИЛ-6 крови в остром периоде инсультов у пациентов с АО. У лептиндефицитных мышей с ожирением при экспериментальном ишемическом инсульте наблюдалась выраженная элевация уровня ИЛ-6 плазмы крови по сравнению с мышами контрольной группы. При этом содержание ИЛ-6 в мозге мышей с ожирением было ниже, чем в мозге мышей с нормальной массой тела, с чего авторы сделали предположение, что именно жировая ткань при ожирении является источником высокой концентрации ИЛ-6 плазмы крови при инсульте [11].

В последние годы, рядом работ было показано, что степень повышения концентрации ИЛ-6 при ишемических инсультах в большой степени детерминирована генетическими факторами. Экспрессия ИЛ-6 регулируется преимущественно на транскрипционном уровне, промотор гена ИЛ-6 (*IL-6*) содержит несколько однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), которые существенно влияют на транскрипцию гена. ОНП в промоторной зоне гена *IL-6* с заменой цитозина на гуанин в позиции 174 (-174 G/C) ассоциируется с изменениями концентрации ИЛ-6. При этом существуют противоречивые данные об этой ассоциации при ишемических инсультах, также как и об ассоциациях между генотипом -174 G/C гена *IL-6* и клинико-функциональными особенностями ишемических инсультов [3, 12]. Противоречивость этих результатов может отображать как комплексность регуляторных процессов при постинсультном воспалительном ответе вообще, так и многогранность физиологии ИЛ-6 в частности, а также может быть следствием неоднородности исследованных групп пациентов, гетерогенности ишемических инсультов и т.д.

Возможно ОНП -174 G/C гена *IL-6* является одним из факторов более тяжелого клинического течения нелакунарных инсультов и более интенсивного постинсультного системного воспалительного ответа у пациентов с АО.

Цель исследования: изучить распределение ОНП -174 G/C гена *IL-6* и определить его ассоциации с клиническим течением и функциональными последствиями нелакунарных инсультов у пациентов разных весовых категорий.

Материалы и методы исследования

В исследование включено 70 пациентов обоих полов (33 пациента с нормальной массой тела и 37 пациентов с АО II ст.) с нелакунарными (атеротромботическими и кардиоэмболическими) подтипами ишемических гемисферальных инсультов, госпитализированных в неврологическое отделение 1-й ГКБ г. Полтава в течение 1-х суток после начала заболевания.

Нелакунарный подтип инсульта был верифицирован с помощью методов нейровизуализации.

Известно, что клинические особенности ишемических инсультов и процессы постинсультного функционального восстановления определяются многочисленными факторами, среди которых наиболее важными являются возраст пациента, клиническая

тяжесть инсульта при госпитализации (согласно шкалы инсультов Американского Национального института здоровья (NIHSS)), размер церебрального поражения, наличие предшествующих инсультов и сопутствующей патологии [14]. Поэтому, с целью максимальной возможной унификации вышеперечисленных состояний, были отобраны пациенты с относительно одинаковыми показателями возраста (от 56 до 65 лет), клинической тяжести заболевания при госпитализации (от 5 до 10 баллов согласно шкалы NIHSS), размеров церебрального поражения (от 10 до 20 см³). Все пациенты не имели сахарного диабета и выраженной сопутствующей патологии (онкологические заболевания, судорожный синдром, болезни системы крови, выраженная сердечная, почечная, печеночная или дыхательная недостаточность, прогрессирующая деменция, алкоголизм и т.д.). Кроме того, у пациентов в анамнезе не было эпизодов острой неврологической симптоматики (согласно медицинской документации), а данные нейровизуализации отрицали наличие ранее перенесенных ишемических нелакунарных инсультов.

Объем инфарктов мозга вычисляли на T-2 магнитно-резонансных томографических или компьютерно-томографических изображениях по формуле эллипсоида.

Масса тела пациентов измерялась механическими весами при госпитализации. В некоторых случаях вес устанавливался со слов родственников пациентов. С помощью сантиметровой ленты измеряли окружность талии (посредине расстояния между краем реберной дуги и гребнем бедренной кости) и окружность бедер (на уровне больших отростков бедренных костей). На основании антропометрических данных высчитывали индекс массы тела (ИМТ) – соотношение массы тела (в килограммах (кг)) к квадрату роста пациента (в метрах (м)). Характер распределения подкожной жировой клетчатки определяли соотношением окружности талии к окружности бедер (ОТ/ОБ). Нормальная масса тела считалась при значениях ИМТ 18,5-24,9 кг/м². АО II ст. фиксировалось при значениях ИМТ более 35 кг/м² и при условии ОТ/ОБ более 0,9 у мужчин и более 0,85 у женщин.

В стационаре пациенты получали максимально унифицированную фармакотерапию (антиагреганты при атеротромботических инсультах, антикоагулянты при кардиоэмболических инсультах, а также гипотензивные и метаболические препараты, нейропротекторы, и т. д.), лечебную физкультуру, массаж. После выписки из стационара пациенты принимали гипотензивные и антиагрегантные препараты и продолжали реабилитационные мероприятия в амбулаторных условиях (лечебная физкультура, логопедические занятия и т.д.).

Анализ клинического течения инсультов проводили по шкале NIHSS на 10-е сутки пребывания в стационаре. С целью изучения постинсультных функциональных дефектов определяли уровень функциональной независимости с помощью модифицированной шкалы Рэнкина (МШР). Исследование показателей МШР проводилось при выписке из стационара и через 12 недель после развития инсульта. По значениям МШР условно разделяли функциональные состояния пациентов на: «неинвалидирующие» (МШР ≤ 2) – незначительна функциональная несостоятельность, пациент может самостоятельно себя об-

служивать и «инвалидизирующие» состояния (МШР>2) –пациент требует постоянной посторонней помощи в повседневной жизни.

Молекулярно-генетический анализ образцов крови был выполнен в лаборатории ООО «Гентрис ЛТД» г. Полтава (лиц. Министерства здравоохранения Украины АГ №597065). ДНК выделялась из лейкоцитов с помощью ионообменной смолы Челекс-100 [13]. Определение аллельного состояния гена *IL-6* по ОНП -174 G/C (rs1800795) проводили, как описано в работе испанских ученых [4]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия). Для амплификации фрагмента гена *IL-6*, который содержит полиморфный сайт 174 G/C, использованы олигонуклеотидные праймеры – прямой IL6174F: TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT и обратный IL6174R: AATAGGTTTTGAGGGCCATG. Рестрикцию продуктов амплификации осуществляли с использованием эндонуклеазы *LwaI* (*SfaNI*) (MBI Fermentas, Литва). Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в 1xTBE. В качестве маркера молекулярной массы была использована ДНК pUC19, гидролизованная эндонуклеазой *MspI* (MBI Fermentas, Литва). Визуализацию продуктов амплификации и рестрикции осуще-

ствляли путем покраски геля бромистым этидием и фотографированием на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета программ Statistika Excel. Проверку статистических гипотез о равенности частот аллелей в группах пациентов разных весовых категорий, равенность фактических распределений генотипов, а также фактического и теоретического (согласно равновесию Харди-Вайнберга) рядов проводили с помощью критерия χ^2 . Достоверность различия частот встречаемости определенных функциональных последствий в зависимости от генотипа вычисляли с помощью точного критерия Фишера. Количественные результаты (показатели шкалы NIHSS) представлены в виде средней арифметической (M) и средней ошибки средней величины (m). При анализе количественных признаков оценка достоверности различия между группами проводилась с использованием непараметрического U критерия Манна-Уитни. Значения $p < 0,05$ были приняты как статистически достоверные.

Результаты и их обсуждение

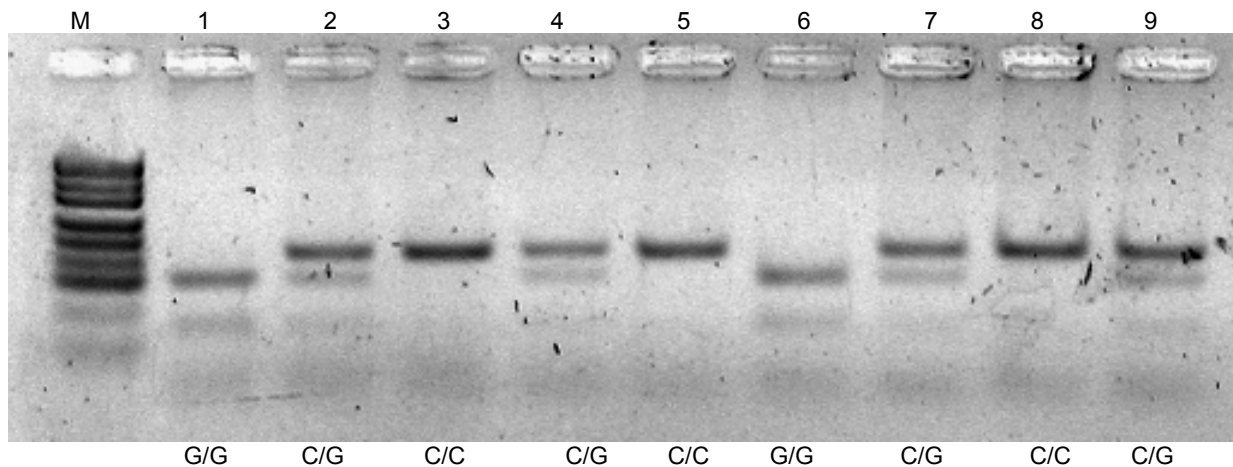


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР последовательности ДНК, генотипированная по ОНП -174 G/C гена *IL-6*: М – маркер молекулярной массы ДНК pUC19, гидролизованной эндонуклеазой *MspI*.; 1–9 – ДНК пациентов с нелакунарными инсультами и разными генотипами.

Рестрикционный фрагмент размером 164 пар нуклеотидов отвечает аллелю 174 С, два рестрицион-

ные фрагменты размером 112 и 52 пар нуклеотидов отвечают 174 G аллелю гена *IL-6*.

Таблица 1
Частоты аллелей -174 G/C гена *IL-6* у пациентов разных весовых категорий с нелакунарными инсультами

Группа пациентов	Всего	Генотип			Частоты аллелей	Статистика
		G/G	G/C	C/C		
с нормальной массой тела	33	13	10	10	$p_G=0,55; p_C=0,45$	$\chi^2=4,57;$ $df=1;$ $\chi^2_{st}=3,84;$ $p<0,05$
с АО II ст.	37	6	14	17	$p_G=0,35; p_C=0,65$	

n – количество пациентов; p_G и p_C – частоты аллелей G и C; χ^2 и χ^2_{st} – фактическое и пороговое значения критерия; df – число степеней свободы; p – уровень значимости.

Как видно из таблицы 1, при нелакунарных инсультах у пациентов с нормальной массой тела мажорным аллелем -174 G/C гена *IL-6* является G аллель, а у пациентов с АО II ст. – C аллель. При этом различие имеет статистическую достоверность. В литературе существуют разноречивые данные относительно связи ОНП -174 G/C гена *IL-6* с риском развития инсультов. В смешанной популяции пациентов США с церебро- и кардиоваскулярной патологией 174

C аллель ассоциировался с увеличением в 1,5 раза вероятности наличия «немых» инфарктов мозга на МРТ [7]. А среди пациентов-итальянцев с инсультом в анамнезе 174 G аллель был мажорным (частота 66,5%), тогда как у лиц контрольной группы частота этого аллеля составляла только 47,3% [5]. По данным австрийских же исследователей отсутствует какая либо связь между ОНП -174 G/C гена *IL-6* и риском развития ишемических инсультов [6].

Достоверное увеличение частоты аллеля 174 С у пациентов с АО II ст. может быть проявлением его селективности относительно развития инсультов в этой весовой категории, а может быть (что более вероятно) проявлением общепопуляционных законо-

мерностей – аллель С ассоциируется с ожирением. В частности, во французском и шведском наблюдениях 174 С аллель гена *IL-6* достоверно чаще встречался как у лиц с избыточной массой тела, так и у лиц с ожирением [15].

Таблица 2

Соотношение генотипов -174 G/C гена *IL-6* у пациентов разных весовых категорий с нелакунарными инсультами

Группы пациентов	G/G		G/C		C/C		Статистика
	n	%	n	%	n	%	
с нормальной массой тела	11	39,4	10	30,3	10	30,3	$\chi^2=8,73$; df=2; $\chi^2_{st}=5,99$; p<0,05.
с АО II ст.	6	16,2	14	37,8	17	46,0	

n – количество пациентов; χ^2 и χ^2_{st} – фактическое и пороговое значения критерия; df – число степеней свободы; p – уровень значимости.

Таблица 2 демонстрирует достоверное увеличение частоты C/C гомозигот, как и гетерозигот и, соответственно, уменьшение удельного веса G/G гомозигот при нелакунарных инсультах у пациентов с АО II ст., по сравнению с пациентами с нормальной массой тела. При анализе данного феномена надо учитывать особенности ОНП -174 G/C гена *IL-6* при ожирении. В частности, во французской популяции носители C/C генотипа достоверно чаще имели признаки АО [2], а у представителей немецкого этноса гомозиготное состояние С аллеля почти в 2 раза чаще ассоциирова-

лась с ожирением [8]. По данным шведских ученых у практически здоровых лиц с ИМТ более , чем 25 кг/м² генотип C/C встречался более чем в 2 раза чаще, а генотип G/C – почти в 2 раза чаще по сравнению с лицами, у которых показатель ИМТ был меньше 25 кг/м² [15]. На основании этих наблюдений авторы сделали предположение, что генетически детерминированная индивидуальная разница в продукции ИЛ-6 может быть каким-то образом ассоциированной с регуляцией массы жировой ткани.

Таблица 3

Структура популяции пациентов разных весовых категорий с нелакунарными инсультами по ОНП -174 G/C гена *IL-6*

Группы пациентов	Распределение генотипов	Генотип, %			Статистика	
		G/G	G/C	C/C		
с нормальной массой тела	фактическое	39,4	30,3	30,3	$\chi^2=15,31$; p<0,05.	df=2; $\chi^2_{st}=5,99$.
	теоретическое	29,7	49,7	20,6		
с АО II ст.	фактическое	16,2	37,8	46,0	$\chi^2=2,78$; p>0,05.	
	теоретическое	12,4	45,4	42,2		

% – доля в процентах; χ^2 и χ^2_{st} – фактическое и пороговое значения критерия; df – число степеней свободы; p – уровень значимости.

Таблица 3 показывает, что распределение генотипов в группе пациентов с АО II ст. отвечает равновесию Харди-Вайнберга и статистически значимо не отклоняется от него, тогда как у пациентов с нормальной массой тела распределение генотипов достоверно смещается от равновесного состояния к недостатку гетерозигот. Возможно, в украинской попу-

ляции гетерозиготное состояние -174 G/C гена *IL-6* у пациентов с нормальной массой тела является протективным фактором относительно развития нелакунарных инсультов. Однако это предположение требует дальнейшего подтверждения на более обширной группе пациентов.

Таблица 4

Динамика клинических показателей согласно шкалы NIHSS при нелакунарных инсультах в зависимости от весовой категории и ОНП -174 G/C гена *IL-6*

Группы пациентов	Генотип	с АО II ст.			с нормальной массой тела		
		G/G	G/C	C/C	G/G	G/C	C/C
Сутки после инсульта	1-е	7,5±0,5	7,1±0,5	7,9±0,7	6,8±0,6	7,6±0,5	7,5±0,4
	10-е	5,5±0,6	5,5±0,4	5,4±0,3	4,9±0,5	3,5±0,3	3,4±0,3

* - достоверная разница в сравнении с носителями других генотипов среди пациентов с нормальной массой тела на 10-е сутки после развития инсульта (p<0,05).

Таблица 4 свидетельствует, что у пациентов с АО II ст. отсутствует какая-либо разница в клинических особенностях течения острого периода инсультов в зависимости от генотипа. У пациентов же с нормальной массой тела, при наличии ОНП 174 G/G гена *IL-6*, имеет место достоверно более тяжелое клиническое течение заболевания. Этот факт согласовывается с данными австрийского исследования о том, что носители 174 G/G генотипа имеют значительно худшие

показатели шкалы NIHSS как во время госпитализации, так и через 1 неделю после развития инсульта [6]. Хотя в индийской популяции носители генотипа 174 G/G, наоборот, характеризовались наличием достоверно более легких инсультов при госпитализации и более благоприятным течением острого периода заболевания [3], из чего авторы сделали вывод, что именно G/G генотип имеет протективные свойства

при ишемических инсультах у представителей индийского происхождения [3].

Частота развития «инвалидизирующих» состояний согласно МШР при нелакунарных инсультах в зависимости от весовой категории и генотипов -174 G/C гена IL-6

Таблица 5

Срок наблюдения		при выписке				через 12 недель после инсульта			
		с АО II ст.		с нормальной массой тела		с АО II ст.		с нормальной массой тела	
Значения МШР		≤2	>2	≤2	>2	≤2	>2	≤2	>2
Генотип	G/G	1	5	3	10	2	4	3*	10*
	G/C	3	11	4	6	6	8	8	2
	C/C	3	14	5	5	4	13	9	1

* - достоверная разница в сравнении с носителями других генотипов среди пациентов с нормальной массой тела через 12 недель после развития инсульта ($p < 0,05$).

Таблица 5 показывает, что у пациентов с нормальной массой тела наблюдается определенная структуризация частоты развития «выраженных» функциональных последствий в зависимости от генотипа: G/G гомозиготность -174 G/C гена IL-6 достоверно ассоциируется с повышенной частотой развития «инвалидизирующих» функциональных состояний. Подобная закономерность была зафиксирована и австрийскими авторами: носители 174 G/G генотипа характеризуются достоверно более частым «неудовлетворительным» восстановлением (в виде показателей МШР≥4) через 3 месяца после инсульта [6]. В то же время у пациентов индийской популяции носители G/G генотипа, наоборот, характеризовались более полным восстановлением функциональных способностей (согласно МШР и индекса Бартелла) как через 3, так и через 6 месяцев после развития инсульта [3].

Возможно, недостаточность процессов постинсультного восстановления у лиц с нормальной массой тела при гомозиготном -174 G/G состоянии гена IL-6 реализуются через степень экспрессии ИЛ-6, а возможно и через другие патофизиологические механизмы, ассоциированные с этим генотипом. Отсутствие же каких-либо закономерностей частоты формирования «инвалидизирующих» функциональных последствий в зависимости от генотипа при нелакунарных инсультах у пациентов АО II ст. можно, вероятно, объяснить слишком незначительными влияниями ОНП -174 G/C гена IL-6 на клинические особенности заболевания: липотоксичность (например, в базальном состоянии жировая ткань продуцирует более трети всего количества ИЛ-6 в организме [9]) исключает модулирующее влияние этого ОНП гена IL-6 на течение инсультов. То есть, в условиях АО II ст. провоспалительные факторы, ассоциированные с жировой тканью, вероятно нивелируют влияние генетической составляющей.

Выводы

1. При нелакунарных инсультах у пациентов с АО II ст. достоверно чаще встречается -174 С аллель гена IL-6 (достоверно повышена частота гетерозиготных состояний и гомозиготных С/С состояний), по сравнению с пациентами с нормальной массой тела.

2. У пациентов с нормальной массой тела G/G гомозиготность -174 G/C гена IL-6 достоверно ассоциируется с более тяжелым клиническим течением острого периода заболевания, а также с повышенной вероятностью развития «инвалидизирующих» функциональных состояний (МШР>2) через 12 недель после нелакунарных инсультов.

3. При АО II ст. не наблюдается каких-либо закономерностей клинического течения острого периода нелакунарных инсультов и формирования поздних «инвалидизирующих» функциональных последствий в зависимости от ОНП -174 G/C гена IL-6.

Литература

1. Литвиненко Н.В. Клініко-нейровізуалізаційні характеристики гострого періоду нелакунарних гемісферальних інсультів у осіб з ожирінням / Н.В. Литвиненко, М.Ю. Дельва, І.І. Дельва // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2011. – Т. 11, № 4 (36), ч. 1. – С. 55-58.
2. Berthier MT. The interleukin 6 -174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men / MT. Berthier, AM. Paradis, A. Tchernof [et al.] // Journal of Human Genetics. – 2003. – V. 48 (1). – P. 14-19.
3. Chakraborty B. Interleukin-6 gene -174 G/C promoter polymorphism predicts severity and outcome in acute ischemic stroke patients from north India / B. Chakraborty, D. Chowdhury, G. Vishnoi [et al.] // Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2012. – [Epub ahead of print].
4. Fernández-Real JM. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects / JM. Fernández-Real, M. Broch, J. Vendrell [et al.] // Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2000. – V. 85(3). – P.1334-1339.
5. Flex A. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke / A. Flex, E. Gaetani, P. Papaleo [et al.] // Stroke. – 2004. – V. 35 (10). – P. 2270–2275.
6. Greisenegger S. The (-174) G/C polymorphism in the interleukin-6 gene is associated with the severity of acute cerebrovascular events / S. Greisenegger, G. Endler, D. Haering [et al.] // Thrombosis Research. – 2003. – N. 110. – P. 181–186.
7. Jenny NS. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174G/C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease / NS. Jenny, RP. Tracy, MS. Ogg [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2002. – N. 22. – 2066–2071.
8. Klipstein-Grobusch K. Interleukin-6 g.-174G>C promoter polymorphism is associated with obesity in the EPIC-Potsdam Study / K. Klipstein-Grobusch, M. Mohlig, J. Spranger [et al.] // Obesity. – 2006. –N. 14. – P. 14-18.
9. Mohamed-Ali V. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo / V. Mohamed-Ali, S. Goodrick, A. Rawesh [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1997. – N. 82. – P. 4196–4200.
10. Smith CJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome / CJ. Smith, HC. Emsley, CM. Gavin [et al.] // BMC Neurology. – 2004. – N. 4. – P. 2.
11. Terao S. Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice / S. Terao, K. Yilmaz, K. Stokes // Stroke. – 2008. – V. 39(3). – P. 943-950.
12. Tso RA. Interleukin-6 174G/C Polymorphism and Ischemic Stroke: A Systematic Review / RA. Tso, JG. Merino, S. Warach // Stroke – 2007. – V. 38 (1). – P. 3070-3075.
13. Walsh PS. Chelex 100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material / PS. Walsh, DA. Metzger, R. Higuchi // BioTechniques. – 1991. – N. 10. – P. 506-513.
14. Weimar C. Predicting functional outcome and survival after acute ischemic stroke / C. Weimar, A. Ziegler, IR. König [et al.] // Journal of Neurology. – 2002. – V. 249 (7). – P. 888-895.

English version: SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF -174G/C INTERLEUKIN-6 GENE IN PATIENTS OF DIFFERENT WEIGHT CATEGORIES WITH NON-LACUNAR STROKES AND ITS ASSOCIATIONS WITH CLINICAL AND FUNCTIONAL STROKE OUTCOMES*

Delva M. Yu.

Ukrainian Medical Stomatological Academy (Poltava, Ukraine)

We studied the single nucleotid polymorphisms (SNP) distribution of -174 G/C interleukin-6 gene (IL-6) and determined its associations with functional outcomes after non-lacunar stroke in 33 patients with normal body weight and in 37 patients with abdominal obesity (AO) II class. The study has involved patients of similar age (56 to 65 years), with the similar clinical disease severity on admission (5-10 points according to NIHSS scale), with relatively similar cerebral lesion volumes (from 10 to 20 cm³), without diabetes mellitus and severe co-morbidity. Abdominally obese patients II class with non-lacunar strokes have significantly more common 174 C allele of the IL-6 gene compared with patients with normal body weight (65% versus 45%, p<0,05). In patients with normal body weight G/G genotype of -174 G/C gene IL-6 was significantly associated with more severe acute stroke an increased rate of late "disabling" functional states (values of modified Rankin scale more then 2 points) in 12 weeks after stroke. AO II class hasn't any patterns of clinical and functional outcomes distribution depending on SNP -174 G/C gene IL-6.

Key words: ischemic non-lacunar stroke, abdominal obesity, interleukin-6, gene, -174 G/C single nucleotide polymorphism.

This study is a fragment of the planned research activity of neurological department with neurosurgery and medical genetics "Ukrainian Medical Stomatological Academy" "Optimization and pathogenetic substantiation of diagnostic and treatment methods of neurovascular and neurodegenerative diseases with regard to clinical and hemodynamic, hormonal, metabolic, genetic and immunoinflammatory factors" (state registration number 0111U006303).

Introduction

In recent years in scientific literature has emerged a lot of scientific reports which prove independent and significant influences of obesity on acute ischemic strokes and functional outcome. In particular, in previous works we demonstrated that obese patients (especially with abdominal obesity) had a more severe strokes, more frequent development of various post-stroke complications and, consequently, longer hospital stay and worse functional outcome [1].

Among the key factors that may determine the clinical severity of stroke, great importance has the intensity of local and systemic post-ischemic inflammatory response. Proinflammatory cytokine - interleukin-6 (IL-6) is one of the key regulators of post-ischemic inflammatory response intensity through the influence on the synthesis and secretion of acute-phase proteins, chemokines, adhesion molecules, etc. High serum IL-6 level in the first days after ischemic stroke onset is associated with the progression of secondary post-ischemic cerebral injury and is an independent predictor of acute stroke severity as well as early neurological complications and long-term functional outcome [10].

The degree of IL-6 blood elevation at acute stroke is closely correlated with the cerebral lesion volumes [10]. However, we had defined (the article in press), that under conditions of similar cerebral lesions volumes, abdominally obese patients (I-II obesity class) have significantly

increased IL-6 blood levels at 1st as well as at 10th day after stroke onset compared with normal weight patients.

But the source of a significant IL-6 serum in abdominally obese patients under conditions of acute ischemic stroke still remains unknown.

Leptin deficient obese mice, compared with wild-type ones, have significantly elevated serum IL-6 after experimental ischemic stroke. Because brain tissue level of IL-6 was decreased in post-ischemic obese mice compared with wild-type animals, authors suggested that in acute stroke just adipose tissue is a major source of serum IL-6 [11].

In recent years, a number of investigations had shown that the degree of increase in IL-6 concentration in patients with ischemic stroke is largely determined by genetic factors. Expression of IL-6 is mainly regulated at the transcriptional level, gene promoter of IL-6 comprises several single nucleotide polymorphisms (SNP), which significantly affects the gene transcription. SNP in the promoter region of IL-6 gene as substitution of cytosine to guanine at position 174 (-174 G/C) is associated with changes in IL-6 blood concentration. There are conflicting scientific data about these associations with ischemic stroke, as well as about associations between genotype - 174 G/C and clinical and functional features of ischemic stroke [3, 12]. Inconsistency of above mentioned results may reflect the regulatory processes' complexity in post-stroke inflammatory response, diversity of IL-6 physiolo-

* * To cite this English version: Delva M. Yu.. Single nucleotide polymorphism of -174g/c interleukin-6 gene in patients of different weight categories with non-lacunar strokes and its associations with clinical and functional stroke outcomes / / Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 3-4. - P. 8 -12.

gy, may be a consequence of heterogeneity of the studied patients groups, as well as ischemic strokes, etc. Perhaps, the -174 G/C SNP of the IL-6 gene is one of the factors that could determine more severe non-lacunar strokes and more intensive post-ischemic inflammatory response in abdominally obese patients.

Purpose of the study was to indentify the distribution of -174 G/C SNP of the IL-6 gene and to determine associations between this SNP and clinical features, as well as functional outcomes of non-lacunar strokes in patients of different weight categories.

Materials and methods

In the study we have recruited 70 subjects of both genders (33 patients with normal body weight and 37 patients with class 2 abdominal obesity) with acute ischemic non-lacunar (atherothrombotic and cardioembolic subtypes) hemispheric strokes. All patients were admitted to Poltava city hospital not later than 24 hours after stroke onset.

Non-lacunar stroke subtype was verified by neurovisualization.

Peculiarities of acute ischemic stroke and post-stroke functional outcome are determined by numerous factors, among which the most important are the patient's age, stroke severity at admission (according to National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)), the size of the cerebral lesion, previous strokes, and co-morbidities [14]. Therefore, to unify above mentioned conditions we had selected patients with relatively similar age (from 56 to 65 years), similar disease's severity at admission (from 5 to 10 points according to NIHSS), similar cerebral lesion size (from 10 to 20 cm³). Patients didn't have diabetes mellitus and severe co-morbidities that could influence of neurological and functional recovery (oncological diseases, convulsive syndrome, hematological diseases, cardiac, liver, kidney and respiratory insufficiencies, progressive angina pectoris, acute myocardial infarction, vascular dementia, alcoholism, etc). Moreover, patients didn't have acute neurological episodes (according to medical records) and didn't have neuroimaging signs of previously unrecognized non-lacunar strokes.

Cerebral lesion volume was estimated by calculating the approximate volume of an ellipsoid on computed tomography brain scans or T-2 weighted magnetic resonance imaging brain scans.

Patient's body weight was determined with mechanical weights during hospitalization. In severe cases, body weight was measured after patient improvement, or according to patient's relatives. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Body weight categories were formed on the basis of BMI: normal body weight - BMI 20.0-24.9 kg/m², obesity class II – BMI >35.0 kg/m². Waist-to-hip ratio (WHR) was calculated as a measure of abdominal obesity. Waist circumference was measured with a soft

tape midway between the lowest rib and the iliac crest. Hip circumference was measured over the widest part of the gluteal region. According to World Health Organization criteria, WHR >0.9 in men and >0.85 in women were denoted abdominal obesity.

In hospital stroke patients received uniform therapy (antiplatelet drugs for atherothrombotic stroke, anticoagulant drugs for cardioembolic stroke, hypotensive, metabolic, nootropic drugs, etc), physiotherapy, and massage. After hospital discharge patients took antihypertensive, antiplatelet drugs and continued outpatient rehabilitation services (physiotherapy, speech therapy, etc.).

The picture of stroke clinical has been analyzed by NIHSS score at the 10th day of hospital stay. Post-stroke functional outcomes were evaluated by modified Rankin scale (mRS). We had dichotomized functional outcome: favorable – mRS ≤2 (patient able to look after own affairs without assistance) versus unfavorable – mRS>2 (patient requires assistance in daily life).

Molecular genetic analysis was performed in a laboratory «Gentrees LTD» (Poltava). DNA was extracted from white blood cells using ion exchange resin Chelex-100 [13]. Determination of allelic status of -174 G/C SNP of the IL-6 gene (rs1800795) was performed as it had been described by Spanish scientists [4]. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in the thermocycler Tertsik (DNA-Technology, Russia).

To amplify the fragment of IL-6 gene, which contains the polymorphic site 174 G/C, oligonucleotide have been used primers – direct IL6174F: TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT and reverse IL6174R: AATAGGTTTTGAGGCCATG. Restriction of the amplification products was performed using endonuclease *L*wel (*Sfa*NI) (MBI Fermentas, Lithuania). Restriction materials were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel in 1xTBE. As molecular weight marker it had been used DNA pUC19, which was hydrolysed by endonuclease *M*spl (MBI Fermentas, Lithuania). Visualization of amplification and restriction products was performed by gel dyeing with ethidium bromide and photographing in ultraviolet light transilluminator.

Statistical processing of the results was performed by means of software package Statistika Excel. Distributions of allele frequencies in different weight body groups, equality of the actual distribution of genotypes, as well as the actual and theoretical ones (according to Hardy-Weinberg equilibrium) were analyzed using the criterion χ^2 . Comparison of functional outcomes rates depending on the genotype was calculated using Fisher's exact test. Quantitative data (NIHSS score) is shown as mean (*M*), standard error of mean (*m*). Data from patients were analyzed using the Mann-Whitney *U* test for the comparison of continuous variables. P-value less 0.05 was taken to indicate statistical significance.

Results and discussion

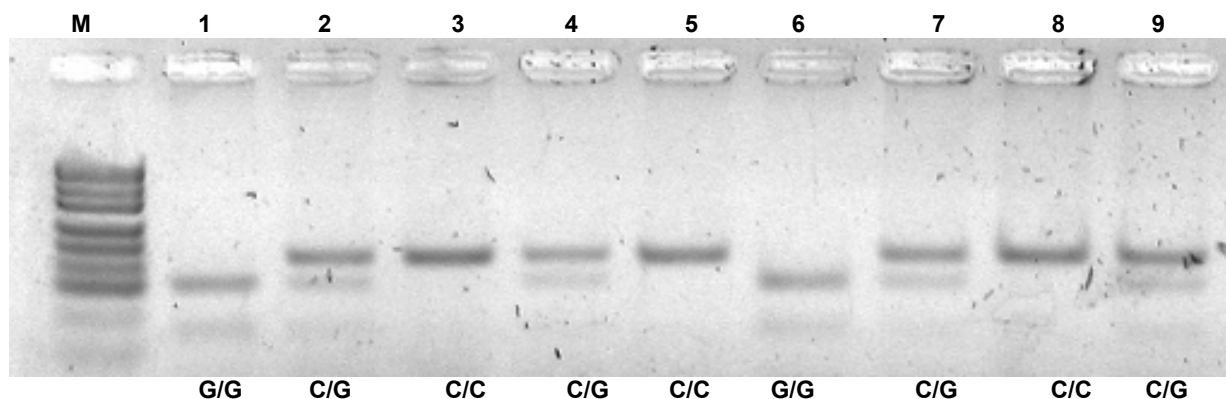


Fig. 1. Electrophoretogram of PCR products genotyped by SNP -174 G/C IL-6 gene: M - molecular weight marker DNA pUC19, hydrolyzed by endonuclease MspI.; 1-9 - DNA of patients with non-lacunar stroke and different genotypes.

Restriction fragment of 164 nucleotides pairs matches 174 C allele, the two restriction fragments of 112 and 52 nucleotides pairs matches 174 G allele of the IL-6 gene.

Table 1
Allele frequencies of SNP -174 G/C of the IL-6 gene in patients of different weight categories with non-lacunar stroke

Patients group	Totally	Genotype			Allele frequencies	Statistics
		G/G	G/C	C/C		
normal body weight	33	13	10	10	$p_G=0,55; p_C=0,45$	$\chi^2=4,57;$ $df=1;$ $\chi^2_{st}=3,84;$ $p<0,05$
abdominal obesity 2 class	37	6	14	17	$p_G=0,35; p_C=0,65$	

n – the number of patients; p_G u p_C – frequencies of G-allele and C-allele; χ^2 u χ^2_{st} – actual and threshold criterion value; df – the number of steps of freedom; p – significance level.

The table 1 shows, in normal weight patients with non-lacunar stroke G-allele is major allele, but in abdominally obese patients major allele is C-allele; and this difference has statistical significance. In literature there are contradictory data about relations between -174 G/C SNP of the IL-6 gene and risk of stroke. In mixed population of US patients with cardiovascular and cerebrovascular pathology, presence of the -174C allele was associated with risk of «silent» MRI infarcts (odds ratio 1.5) [7]. Among Italian patients with stroke history, 174 G allele was major (66.5%), whereas in the control group the

frequency of this allele was only 47.3% [5]. According to Austrian researchers, there are no links between -174 G/C SNP of the IL-6 gene and risk of ischemic stroke [6]. The significant increase of allele 174 C frequency in a abdominally obese patients may be a manifestation of its selectivity towards stroke risk, and maybe (that is more likely) a manifestation of the general population patterns – C-allele is associated with obesity. In particular, in French and Swedish populations 174 C allele of IL-6 gene was significantly more common in overweight and obese people [15].

Table 2
Ratio of -174 G/C IL-6 genotypes in patients of different weight categories with non-lacunar stroke

Patients group	G/G		G/C		C/C		Statistics
	n	%	n	%	n	%	
normal body weight	11	39,4	10	30,3	10	30,3	$\chi^2=8,73;$ $df=2;$ $\chi^2_{st}=5,99;$ $p<0,05.$
abdominal obesity 2 class	6	16,2	14	37,8	17	46,0	

n – the number of patients; χ^2 u χ^2_{st} – actual and threshold criterion value; df – the number of steps of freedom; p – significance level.

Table 2 shows the significant increase of C/C homozygotes and heterozygotes frequency and, thus reducing the proportion of G/G homozygote among abdominally obese patients with non-lacunar strokes in comparison with normal weight patients. In the analysis of this phenomenon it is necessary to take into account the peculiarities -174 G/C SNP of the IL-6 gene in obese humans. In particular, C/C genotype had significantly associations with abdominal obesity in French and German popula-

tions [2, 8]. According to Swedish scientists, there were significant odds ratios for the association of CC (2.13) and GC (1.76) genotypes with overweight (BMI>25 kg/m²) in healthy humans [15]. Genetically determined individual differences in production of IL-6 may be relevant for the regulation of body fat mass. Based on these observations, the authors concluded that genetically determined individual differences in production of IL-6 may be relevant for the regulation of body fat mass.

Table 3
Structure of the population of patients with different weight and non-lacunar strokes according to -174 G/C SNP of the IL-6 gene

Patients group	The distribution of genotypes	Genotype, %			Statistics	
		G/G	G/C	C/C		
normal body weight	actual	39,4	30,3	30,3	$\chi^2=15,31$; $p<0,05$.	df=2; $\chi^2_{st}=5,99$.
	theoretical	29,7	49,7	20,6		
abdominal obesity 2 class	actual	16,2	37,8	46,0	$\chi^2=2,78$; $p>0,05$.	
	theoretical	12,4	45,4	42,2		

% – percentages; χ^2 и χ^2_{st} – фактическое и пороговое значения критерия; df – число степеней свободы; p – уровень значимости.

Table 3 shows that the distribution of genotypes in abdominally obese patients corresponds to the Hardy-Weinberg equilibrium and doesn't significantly deviate from it. Whereas in normal body weight patients distribution of genotypes is significantly deviates from this equilibrium to a lack of heterozygotes. Perhaps, in the Ukrain-

ian population the heterozygous state of -174 G/C IL-6 genes in normal body weight patients is a protective factor regarding the non-lacunar strokes. However, this assumption needs to be further confirmed in a more extensive group of patients.

Table 4
Dynamics of the NIHSS score at acute non-lacunar strokes in patients with different weight and -174 G/C SNP of the IL-6 gene

Patients group	Genotype	Abdominal obesity 2 class			Normal body weight		
		G/G	G/C	C/C	G/G	G/C	C/C
Day after stroke	1 st	7,5±0,5	7,1±0,5	7,9±0,7	6,8±0,6	7,6±0,5	7,5±0,4
	10 th	5,5±0,6	5,5±0,4	5,4±0,3	4,9*±0,5	3,5±0,3	3,4±0,3

* - significant difference in comparison with other genotypes carriers among normal body weight patients at 10th post-stroke day (p < 0,05).

Table 4 shows that in patients with abdominal obesity 2 class there is no difference in the clinical features of acute stroke, depending on the genotype. In normal body weight patients with -174 G/C SNP of the IL-6 gene there is a more severe clinical course of the disease. This fact is consistent with results of the Austrian study that 174 G/G genotype carriers have a significantly worse NIHSS

score on admission and at 1st week after stroke onset [6]. Although in the Indian population genotype 174 G/G, on the contrary, had been characterized by a significantly milder strokes at admission and more favorable course of the acute stroke [3], and authors had concluded that G/G genotype has protective effects against ischemic stroke [3]

Table 5
The rate of "disabling" states according to mRS after non-lacunar strokes depending on the weight categories and genotype of -174 G/C IL-6 gene

The observation period	Patients group	at hospital discharge				12 weeks after stroke				
		abdominal obesity 2 class		normal body weight		abdominal obesity 2 class		normal body weight		
mRS	Genotype	G/G	≤2	>2	≤2	>2	≤2	>2	≤2	>2
			G/C	1	5	3	10	2	4	3*
		C/C	3	11	4	6	6	8	8	2
			3	14	5	5	4	13	9	1

* - significant difference in comparison with other genotypes carriers in normal body weight patients at 12 weeks after stroke (p < 0,05).

Table 5 shows that in normal body weight patients there is a certain structuring of functional consequences depending on the genotype: G/G homozygous state of -174 G/C IL-6 gene was significantly associated with an increased incidence of "disabling" functional outcomes. A similar pattern was recorded by Austrian authors, carriers of 174 G/G genotype had significantly more often "poor" functional outcome (as mRS ≥ 4) at 3 months after stroke [6]. At the same time, in the Indian population, carriers of G/G genotype, by contrast, had «complete» recovery of functional ability (according mRS and index Barthel) at 3 and 6 months after stroke [3].

Perhaps the lack of post-stroke functional recovery in normal-weight and -174 G/G homozygous patients are realized through the levels of IL-6 expression, and, possibly through other pathophysiological mechanisms which are associated with this genotype. The absence of any regularity between functional outcomes rate and genotype in abdominally obese patients may be explained, at least partially, by too little effects of -174 G/C SNP of the IL-6 gene on the clinical stroke features: lipotoxicity (for

example, at the basal state, adipose tissue produces more than a third of the whole IL-6 amount in the body [9]) eliminates the modulating clinical effect of this SNP. Under conditions of abdominal obesity, proinflammatory factors associated with adipose tissue probably negate the effect of the genetic component.

Conclusions

1. Abdominally obese patients 2 class with non-lacunar strokes have significantly more common 174 C allele of the IL-6 gene (increase of heterozygous and homozygous states) compared with patients with normal body weight.

2. In patients with normal body weight G/G genotype of -174 G/C IL-6 gene was significantly associated with more severe acute stroke, and an increased rate of late "disabling" functional states (values of mRS more 2 points) in 12 weeks after non-lacunar stroke.

3. Abdominally obese patients 2 class do not have any patterns of clinical and functional outcomes distribu-

tion after non-lacunar stroke depending on -174 G/C SNP of the IL-6 gene.

References

1. Litvinenko N.V. Kliniko-neyrovizualizatsiyni charakteristiki gostrogo periodu nelakunarnich gemisferal'nich insult'iv u osib z ozhirinnyam / N.V. Litvinenko, M.Yu. Del'va, I.I. Del'va // Aktual'ni problemi suchasnoi medyzini: Visnik Ukrain's'koï medichnoi stomatologichnoi akademii. – 2011. – T. 11, № 4 (36), ch. 1. – S. 55-58.
2. Berthier MT. The interleukin 6 -174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men / MT. Berthier, AM. Paradis, A. Tchernof [et al.] // Journal of Human Genetics. – 2003. – V. 48 (1). – P. 14-19.
3. Chakraborty B. Interleukin-6 gene -174 G/C promoter polymorphism predicts severity and outcome in acute ischemic stroke patients from north India / B. Chakraborty, D. Chowdhury, G. Vishnoi [et al.] // Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2012. – [Epub ahead of print].
4. Fernández-Real JM. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects / JM. Fernández-Real, M. Broch, J. Vendrell [et al.] // Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2000. – V. 85(3). – P. 1334-1339.
5. Flex A. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke / A. Flex, E. Gaetani, P. Papaleo [et al.] // Stroke. – 2004. – V. 35 (10). – P. 2270-2275.
6. Greisenegger S. The (-174) G/C polymorphism in the interleukin-6 gene is associated with the severity of acute cerebrovascular events / S. Greisenegger, G. Endler, D. Haering [et al.] // Thrombosis Research. – 2003. – N. 110. – P. 181-186.
7. Jenny NS. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174G/C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease / NS. Jenny, RP. Tracy, MS. Ogg [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2002. – N. 22. – 2066-2071.
8. Klipstein-Grobusch K. Interleukin-6 g.-174G>C promoter polymorphism is associated with obesity in the EPIC-Potsdam Study / K. Klipstein-Grobusch, M. Mohlig, J. Spranger [et al.] // Obesity. – 2006. –N. 14. – P. 14-18.
9. Mohamed-Ali V. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo / V. Mohamed-Ali, S. Goodrick, A. Rawesh [et al.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 1997. – N. 82. – P. 4196-4200.
10. Smith CJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome / C.J. Smith, HC. Emsley, CM. Gavin [et al.] // BMC Neurology. – 2004. – N. 4. – P. 2.
11. Terao S. Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice / S. Terao, K. Yilmaz, K. Stokes // Stroke. – 2008. – V. 39(3). – P. 943-950.
12. Tso RA. Interleukin-6 174G/C Polymorphism and Ischemic Stroke: A Systematic Review / RA. Tso, JG. Merino, S. Warach // Stroke – 2007. – V. 38 (1). – P. 3070-3075.
13. Walsh PS. Chelex 100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material / PS. Walsh, DA. Metzger, R. Higuchi // BioTechniques. – 1991. – N. 10. – P. 506-513.
14. Weimar C. Predicting functional outcome and survival after acute ischemic stroke / C. Weimar, A. Ziegler, IR. König [et al.] // Journal of Neurology. – 2002. – V. 249 (7). – P. 888-895.
15. Wernstedt I. A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight / I. Wernstedt, AL. Eriksson, A. Berndtsson [et al.] // International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders. – 2004. – N. 28. – P. 1272-1279.

Матеріал надійшов до редакції 29.04.2013 р.