

© М. Ю. Дельва

УДК 616. 831-005. 1-056. 5

М. Ю. Дельва

ОДНОНУКЛЕОТИДНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ -308 G/A ГЕНУ ФАКТОРУ НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ- α ПРИ НЕЛАКУНАРНИХ ІНСУЛЬТАХ У ПАЦІЄНТІВ РІЗНИХ ВАГОВИХ КАТЕГОРІЙ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)

Дане дослідження є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри нервових хвороб з нейрохірургією та медичною генетикою ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» «Оптимізація та патогенетичне обґрунтування методів діагностики і лікування судинних та нейродегенеративних захворювань нервової системи з урахуванням клініко-гемодинамічних, гормональних, метаболічних, генетичних та імунно-запальних чинників», № державної реєстрації 0111U006303.

Вступ. Останнім часом в науковій літературі з'явилися повідомлення про безпосередній та значимий вплив ожиріння, як окремого феномену, на клінічний перебіг та функціональні наслідки ішемічних інсультів. Зокрема, за умови однакових нейровізуалізаційних морфометричних характеристик церебральних інфарктів, у осіб з абдомінальним ожирінням (АО) ішемічні інсульти мають більш важкий клінічний перебіг, частіше ускладнюються неврологічними та соматичними порушеннями і, як наслідок, мають триваліший термін госпіталізації та більш виражений постінсультний функціональний дефіцит [1, 15].

На сьогодні беззаперечно доведено, що церебральні постішемічні імунно-запальні механізми можуть приймати певну участь в подальшому ураженні тканини мозку та значимо впливати на клінічний перебіг інсультів [12]. Серед інших факторів кінцевий розмір церебрального ушкодження визначається також і ступенем постішемічної системної та локальної (церебральної) запальної відповіді [16].

Фактор некрозу пухлини- α (ФНП- α) – важливий чинник постішемічних системних та церебральних імунно-запальних реакцій [17]. Він індукуює експресію адгезивних молекул гліальними та ендотеліальними клітинами, приймає участь в ушкодженні гемато-енцефалічного бар'єру, посилює нейтрофільну інфільтрацію церебральної паренхіми, тощо [5].

За умови ідентичних розмірів церебральних інфарктів, у пацієнтів з АО I-II ступеня (ст.) маркери інтенсивності постішемічної запальної відповіді, в тому числі і рівні ФНП- α крові, достовірно збільшуються в 1-у та 10-у доби після нелакунарного інсульту, в порівнянні з пацієнтами, що мають нормальну масу тіла (робота знаходиться в друці).

З позицій генетичної регуляції рівень продукції прозапальних цитокінів в значній мірі залежить від мутацій, розташованих в некодуючих частинах гену (промоутері, інтроні) – функціональних однонуклеотидних поліморфізмів (ОНП). Функціональні ОНП

гену не позначаються на структурі білка, але змінюють швидкість транскрипції матричної РНК та, відповідно, впливають на швидкість синтезу білка.

Ген ФНП- α (*TNF- α*) розташований на короткому плечі шостої хромосоми. Відомо декілька функціональних ОНП цього гену. Одиначна нуклеотидна заміна гуаніну на аденін в положенні 308 (промоутерна ділянка) гену *TNF- α* викликає значимі зміни рівня продукції ФНП- α . Зокрема, алель А гену -308 G/A *TNF- α* асоціюється з достовірно зниженими рівнями ФНП- α в крові як в умовно здорових осіб [4], так і у пацієнтів з посиленою системною запальною відповіддю після хірургічної ревазуляризації міокарда [2]. В літературі ми не зустріли повідомлень про зв'язок ОНП -308 G/A гену *TNF- α* з показниками ФНП- α крові при ішемічних інсультах

Можливо ОНП -308 G/A гену *TNF- α* є одним з факторів більш важкого клінічного перебігу нелакунарних інсультів і більш інтенсивної постішемічної системної запальної відповіді у пацієнтів з АО.

Мета дослідження: вивчити розподіл ОНП -308 G/A гену *TNF- α* та визначити його асоціації з клінічним перебігом та функціональними наслідками нелакунарних інсультів у пацієнтів різних вагових категорій.

Об'єкт та методи дослідження. В дослідженні включено 70 пацієнтів обох статей (33 пацієнти з нормальною масою тіла і 37 пацієнтів з АО II ст.) з нелакунарними (атеротромботичними та кардіо-емболічними) підтипами ішемічних гемісферальних інсультів, госпіталізованих в неврологічне відділення 1-ї МКЛ м. Полтави протягом 1-ї доби від початку захворювання.

Нелакунарний підтип інсульту був верифікований за допомогою методів нейровізуалізації.

Відомо, що особливості перебігу ішемічних інсультів та процеси постінсультного функціонального відновлення визначаються чисельними факторами, серед яких найбільш важливими є вік пацієнтів, клінічна важкість інсульту згідно шкали інсультів Американського Національного інституту здоров'я (NIHSS) при госпіталізації, розмір церебрального ураження, наявність попередніх інсультів та супутньої патології [19]. З метою максимально можливої уніфікації вищевказаних станів були відібрані пацієнти 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). Усі пацієнти не мали цукрового діабету та вираженої супутньої патології

(онкологічні захворювання, судомний синдром, хвороби системи крові, виражені серцева, ниркова, печінкова або дихальна недостатність, прогресуюча стенокардія, гострий інфаркт міокарду, судинна деменція, алкоголізм, тощо). Крім того, у пацієнтів в анамнезі не було епізодів гострої неврологічної симптоматики (згідно медичної документації), а дані нейровізуалізації заперечували наявність раніше перенесених ішемічних нелакунарних інсультів.

Об'єм інфарктів мозку обчислювали на T-2 магнітно-резонансних томографічних або комп'ютернотомографічних зображеннях за формулою еліпсоїда.

Маса тіла пацієнтів вимірювалася механічними вагами при госпіталізації, а у тяжких хворих при покращенні їх стану. В деяких випадках вага встановлювалася зі слів родичів пацієнта. За допомогою сантиметрової стрічки вимірювали окружність талії (посередині відстані між краєм реберної дуги і гребенем стегової кістки) та окружність стегон (на рівні великих відростків стегових кісток). На основі антропометричних даних вираховували ІМТ – співвідношення маси тіла (в кілограмах (кг)) до квадрату зросту пацієнта (в метрах (м)). Характер розподілу підшкірної жирової клітковини визначали співвідношенням окружності талії до окружності стегон (ОТ/ОС). Нормальна маса тіла вважалася при значенні ІМТ-18,5-24,9 кг/м². АО II ст. фіксувалося при показниках ІМТ більше 35 кг/м² та при умові ОТ/ОС>0,9 у чоловіків та>0,85 у жінок.

В стаціонарі пацієнти отримували максимально уніфіковану фармакотерапію (антиагреганти при атеротромботичних інсультах, антикоагулянти при кардіоемболічних інсультах, а також гіпотензивні та метаболічні препарати, нейропротектори, тощо), лікувальну фізкультуру, масаж. Після виписки зі стаціонару пацієнти приймали гіпотензивні та антиагрегантні препарати і продовжували реабілітаційні заходи в амбулаторних умовах (лікувальна фізкультура, логопедичні заняття, тощо).

Аналіз клінічного перебігу інсультів проводили за шкалою NIHSS на 10-у добу перебування в стаціонарі. Для вивчення постінсультних функціональних дефектів визначали рівень функціональної незалежності за допомогою модифікованої шкали Ренкіна (МШР). Дослідження показників МШР проводили на момент виписки зі стаціонару та через 12 тижнів після розвитку інсульту. За значеннями показника МШР умовно розрізняли стани пацієнтів на: «стани, що не інвалідизують» (МШР≤2): незначна функціональна неспроможність, пацієнт може самостійно себе обслуговувати та «стани, що ведуть до інвалідизації» (МШР>2) – пацієнт потребує постійної сторонньої допомоги в повсякденному житті.

Молекулярно-генетичний аналіз зразків крові було здійснено в лабораторії ООО «Гентрис ЛТД» ліц. МОЗ України АГ №597065 м. Полтава. ДНК було виділено з лейкоцитів за допомогою іонообмінної смоли Челекс-100 [18]. Визначення

алельного стану гену *TNF-α* за одонуклеотидною заміною -308G/A (rs1800629) проводили згідно наведеної методики [3]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали на ампліфікаторі Терцик («ДНК-технологія», Росія) з наступною рестрикцією продуктів ампліфікації ендонуклеазою *Nco I* (MBI Fermentas, Литва). Для ампліфікації фрагмента гену *TNF-α*, що містить поліморфний сайт 308G/A використані олігонуклеотидні праймери – прямий TNFA308F: GGGACACACAAGCATCAAGG та зворотний TNFA308R: AATAGGTTTTGAGGGCCATG. Продукти рестрикції аналізували за допомогою електрофорузу в 6% поліакриламідному гелі в 1xTBE. В якості маркера молекулярної маси була використана ДНК *pUC19*, гідролізована ендонуклеазою *MspI* (MBI Fermentas, Литва). Візуалізацію продуктів ампліфікації та рестрикції здійснювали шляхом фарбування геля бромистим етидієм і фотографуванням на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі.

Статистична обробка отриманих результатів проводилася з використанням пакету програм Statistika Excel. Перевірку статистичних гіпотез про рівність частот алелей в групах пацієнтів з різною масою тіла, рівність фактичних розподілів генотипів, а також фактичного та теоретичного ряду проводили за допомогою критерію χ^2 . Достовірність різниці частоти функціональних наслідків різного ступеня в залежності від генотипу визначали за допомогою точного критерію Фішера. Кількісні результати (показники NIHSS) представлені у вигляді середньої арифметичної (M) та середньої помилки середньої величини (m). При аналізі кількісних ознак оцінка достовірності різниці між групами проводилася з використанням непараметричного U критерію Манна-Уїтні. Значення $p<0,05$ були прийняті як статистично достовірні.

Результати досліджень та їх обговорення.

Рестрикційний фрагмент розміром 142 пар нуклеотидів (п. н.) відповідає алелю 308A гену *TNF-α*, два рестрикційні фрагменти розміром 126 та 16 п. н. відповідають алелю 308G гену *TNF-α* (рис.)

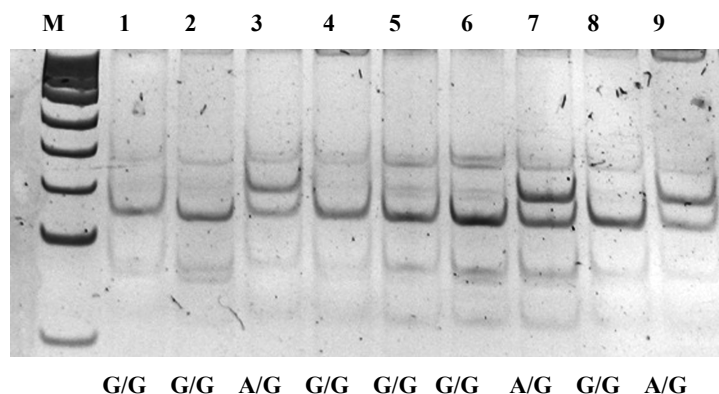


Рис. Електрофореграма продуктів ПЛР послідовності ДНК, що генотипована за ОПН -308 G/A гену *TNF-α*: М – маркер молекулярної маси ДНК *pUC19*, що гідролізована ендонуклеазою *MspI*.; 1-7 – ДНК пацієнтів з нелакунарними інсультами та з різними генотипами.

Таблиця 1

Частоти алелей -308 G/A гену TNF-α у пацієнтів різних вагових категорій з нелакунарними інсультами

Група пацієнтів	Всього	Генотип		Частоти алелей	Статистика
		G/G	G/A+A/A		
з нормальною масою тіла	33	25	8	$p_G=0,88$; $p_A=0,12$	$\chi^2=0,16$; $df=1$; $\chi^2_{st}=3,84$; $p>0,05$.
з АО II ст.	37	32	5	$p_G=0,92$; $p_A=0,08$	
загалом	70	57	13	$p_G=0,9$; $p_A=0,1$	

Примітка: n – кількість пацієнтів; p_G , p_A – частоти алелей G і A; χ^2 і χ^2_{st} – фактичне і порогове значення критерію; df – число ступенів свободи; p – рівень значимості.

Таблиця 2

Структура популяції пацієнтів з нелакунарними інсультами за ОНП -308 G/A гену TNF-α незалежно від маси тіла

Розподіл генотипів	Генотип, %			Статистика
	G/G	G/A	A/A	
фактичний	81,5	17,1	1,4	$\chi^2=0,21$; $df=2$; $\chi^2_{st}=5,99$; $p>0,05$
теоретичний	81,0	18,0	1,0	

Примітка: χ^2 і χ^2_{st} – фактичне і порогове значення критерію; df – число ступенів свободи; p – рівень значущості.

Таблиця 3

Співвідношення генотипів -308 G/A гену TNF-α у пацієнтів різних вагових категорій з нелакунарними інсультами

Групи пацієнтів	G/G		G/A+A/A		Статистика
	n	%	n	%	
з нормальною масою тіла	25	75,8	8	24,2	$\chi^2=0,71$; $df=1$; $\chi^2_{st}=3,84$; $p>0,05$.
з АО II ст.	32	86,5	5	13,5	

Примітка: n – кількість пацієнтів; p_G , p_A – частоти алелей G і A; χ^2 і χ^2_{st} – фактичне і порогове значення критерію; df – число ступенів свободи; p – рівень значимості.

Таблиця 4

Динаміка клінічних показників згідно шкали NIHSS при нелакунарних інсультах в залежності від вагової категорії і ОНП -308 G/A гену TNF-α

Групи пацієнтів	з АО II ст.	з нормальною масою тіла	
		G/G	G/A+ A/A
Доба після інсульту	1-а	7,5±0,3	7,6±0,9
	10-а	5,3±0,3	5,0±0,5
		7,3±0,4	8,1±0,7
		4,0±0,3	3,9±0,4

Таблиця 1 демонструє, що у пацієнтів з нелакунарними інсультами, незалежно від вагової категорії, мажорним алелем -308 G/A гену TNF-α є G-алель. Співвідношення частоти G та A алелів у пацієнтів з різною масою тіла практично не відрізняються. Абсолютно ідентичний розподіл алелей -308 G/A гену TNF-α, за даними грецьких дослідників, знайдено у пацієнтів з ішемічними інсультами: 308G та 308A алелі зустрічалися в 90% та 10% [10].

Нещодавні чисельні дослідження геномних асоціацій в різних європейських популяціях не виявили будь яких зв'язків між ОНП -308 G/A гену TNF-α та ризиком розвитку ішемічних інсультів [7, 9, 11]. Подібний результат був зафіксований і в окремому дослідженні, присвяченому вивченню асоціацій ОНП генів певних прозапальних субстанцій з ризиком розвитку ішемічних інсультів в німецькій популяції [6]. Крім того, мета-аналіз даних 23 досліджень з залученням більш ніж 17 тисяч пацієнтів, показав відсутність зв'язків між ОНП -308 G/A гену TNF-α та ризиком розвитку ішемічного інсульту в осіб європейського етносу [13]. Виходячи з цього можна припустити, що розподіл ОНП -308 G/A гену TNF-α серед пацієнтів з інсультами та в умовно здорових осіб не повинен суттєво відрізнятися. В літературі ми не знайшли даних про співвідношення алелів 308G та 308A гену TNF-α в українській популяції. У населення ж східної Європи частота 308G та 308A алелів складала: в Чехії 0,83 та 0,17 [8], в Польщі – 0,87 та 0,13 [14]. Ці результати майже однакові з нашими. Тобто, частоти алелів 308G та 308A гену TNF-α в Україні суттєво не відрізняються від інших європейських етносів.

З таблиці 2 видно, що розподіл генотипів відповідає рівновазі Харді-Вайнберга, що було виявлено і в іншому дослідженні популяції пацієнтів з ішемічними інсультами [10].

Таблиця 3 показує, що розподіл генотипів -308 G/A гену TNF-α суттєво не розрізняється в залежності від вагової категорії. Майже подібне співвідношення генотипів спостерігається і в інших європейських популяціях, зокрема, серед умовно здорових поляків співвідношення G/G та G/A генотипів склало 73,7% : 26,3% [14].

Таблиця 4 свідчить, що, як у пацієнтів з АО II ст., так і у пацієнтів з нормальною масою тіла, відсутня будь яка різниця в тяжкості клінічного перебігу гострого періоду інсультів в залежності від генотипу -308 G/A гену TNF-α. Можливо це зумовлено порівняно невеликою вибіркою пацієнтів, що не дозволяє виявити більш тонкі клінічні особливості гострих інсультів з залежності від цього ОНП.

Таблиця 5 демонструє відсутність будь-яких закономірностей розвитку «інвалідизуючих» функціональних станів в залежності від генотипу -308 G/A гену TNF-α. За іншими даними наявність генотипу -308 G/G гену TNF-α достовірно знижувала на 80% ризик розвитку «незадовільних» функціональних наслідків в осіб грецького етносу (у вигляді смерті пацієнта або значень індексу Бартел менше 16) через 6 місяці після інсульту [10]. Можливо, відмінність

Частота розвитку «інвалідизуючих» станів згідно МШР при нелакунарних інсультах в залежності від вагової категорії та генотипів -308 G/A гену *TNF-α*

	При виписці				Через 12 тижнів після інсульту			
	АО II ст.		нормальна маса		АО II ст.		нормальна маса	
	МШР <2	МШР >2	МШР <2	МШР >2	МШР <2	МШР >2	МШР <2	МШР >2
G/G	6	26	9	16	10	22	15	10
G/A+A/A	1	4	3	5	2	3	5	3

отриманих нами результатів з даними літератури пояснюється тим, що ми досліджували досить специфічну та однорідну категорію пацієнтів з відносно неважкими інсультами.

Висновки.

1. У пацієнтів з нелакунарними інсультами частоти 308G та 308A алелів гену *TNF-α* складають 0,9 та

0,1. Популяційна структура за ОНП -308G/A гену *TNF-α* у пацієнтів з нелакунарними інсультами не відхиляється від рівноваги Харді-Вайнберга.

2. Частоти алелів та генотипів за ОНП -308G/A гену *TNF-α* при нелакунарних інсультах не розрізняються у пацієнтів з АО II ст. та з нормальною масою тіла.

3. Не виявлено будь яких закономірностей в клінічному перебігу гострого періоду та в частоті розвитку «інвалідизуючих» функціональних наслідків через 12 тижнів

після нелакунарних інсультів у пацієнтів з нормальною масою тіла та з АО II ст., в залежності від ОНП -308G/A гену *TNF-α*.

Перспективи подальших досліджень. Необхідно дослідити ОНП генів інших прозапальних субстанцій у пацієнтів різних вагових категорій з нелакунарними інсультами.

Література

- 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, Вип. 4 (36), Ч. 1. – С. 55-58.
- Bittar MN. Tumor necrosis factor alpha influences the inflammatory response after coronary surgery / MN. Bittar, JA. Carey, JB. Barnard [et al.] // The Annals of thoracic surgery. – 2006. – Vol. 81(1). – P. 132-137.
- Chen Y-P. Impact of genetic variation of tumor necrosis factor-α on gestational hypertension / Y-P. Chen, T. Pfab, T. Slowinski [et al.] // Chinese Medical Journal. – 2006. – Vol. 119(9). – P. 719-724.
- Cui G. Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke / G. Cui, H. Wang, R. Li [et al.] // Journal of Neuroinflammation. – 2012. – Vol. 9(1). – P. 235-245.
- Danton GH. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke // GH. Danton, WD. Dietrich // Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. – 2003. – Vol. 62. – P. 127-136.
- Freilinger T. Genetic variation in the lymphotoxin-alpha pathway and the risk of ischemic stroke in European populations / T. Freilinger, S. Bevan, S. Ripke [et al.] // Stroke. – 2009. – Vol. 40. – P. 970-972.
- Ikram MA. Genome-wide association studies of stroke / MA. Ikram, S. Seshadri, JS. Bis [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2009. – Vol. 360. – P. 1718-1728.
- Kubistova Z. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population / Z. Kubistova, F. Mrazek, Z. Tudos [et al.] // International Journal of Immunogenetics. – 2006. – Vol. 33(4). – P. 261-267.
- Kubo M. A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C eta) increases the risk of cerebral infarction / M. Kubo, J. Hata, T. Ninomiya [et al.] // Nature Genetics. – 2007. – Vol. 39. – P. 212-217.
- Marousi S. Functional inflammatory genotypes in ischemic stroke: could we use them to predict age of onset and long-term outcome? / S. Marousi, A. Antonacopoulou, H. Kalofonos [et al.] // Stroke research and treatment. – 2011. – Vol. 2011. – P. 414-420.
- Matarin M. A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release / M. Matarin, WM. Brown, S. Scholz [et al.] // The Lancet Neurology. – 2007. – Vol. 6. – P. 414-420.
- Muir KW. Inflammation and ischaemic stroke / KW. Muir, P. Tyrrell, N. Sattar [et al.] // Current Opinion in Neurology. – 2007. – Vol. 20(3) – P. 334-342.
- Pereira TV. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor α gene on the risk of ischemic heart disease and ischemic stroke: A meta-analysis / TV. Pereira, M. Rudnicki, RF. Franco [et al.] // American Heart Journal. – 2007. – Vol. 153(5). – P. 821-830.
- Popko K. Frequency of distribution of inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF-alpha gene polymorphism in patients with obstructive sleep apnea / K. Popko, E. Gorska, O. Potapinska [et al.] // Journal of Physiology and Pharmacology. – 2008. – Vol. 59(Suppl 6). – P. 607-614.
- Razinia T. Body mass index and hospital discharge outcomes after ischemic stroke / T. Razinia, J. Saver, D. Liebeskind [et al.] // Archives of Neurology. – 2007. – Vol. 64(3). – P. 388-391.
- Rodríguez-Yranez M. Role of inflammatory markers in brain ischemia / M. Rodriguez-Yranez, J. Castillo // Current Opinion in Neurology. – 2008. – Vol. 21(3). – P. 353-357.
- Sotgiu S. Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia / S. Sotgiu, B. Zanda, B. Marchetti [et al.] // European Journal of Neurology. – 2006. – Vol. 13(5). – P. 505-513.
- 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. – Vol. 10. – P. 506-513.
- Weimar C. Predicting functional outcome and survival after acute ischemic stroke / C. Weimar, A. Ziegler, IR. Konig [et al.] // Journal of Neurology. – 2002. – Vol. 249 (7). – P. 888-895.

УДК 616. 831-005. 1-056. 5

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ -308 G/A ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ- α ПРИ НЕЛАКУНАРНЫХ ИНСУЛЬТАХ У ПАЦИЕНТОВ РАЗНЫХ ВЕСОВЫХ КАТЕГОРИЙ

Дельва М. Ю.

Резюме. Нами изучено распределение однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) -308G/A гена фактора некроза опухоли- α (*TNF- α*) у 33 пациентов с нормальной массой тела и у 37 пациентов с абдоминальным ожирением (АО) II ст. В исследование включены пациенты с относительно одинаковыми показателями возраста (от 56 до 65 лет), клинической тяжести заболевания при госпитализации (от 5 до 10 баллов по шкале NIHSS), размерами церебрального инфаркта (от 10 до 20 см³), не имеющие сахарного диабета и выраженной сопутствующей патологии. В общей популяции пациентов с нелакунарными инсультами частота 308G та 308A аллелей гена *TNF- α* составляет 0,9 и 0,1, у пациентов с АО II ст. – 0,92 и 0,08, а у лиц с нормальной массой тела – 0,88 и 0,12. Популяционная структура по ОНП -308G/A гена *TNF- α* у пациентов с нелакунарными инсультами не отклоняется от равновесия Харди-Вайнберга. Частота генотипов по ОНП -308G/A гена *TNF- α* при нелакунарных инсультах существенно не отличается у пациентов разных весовых категорий. Не выявлено каких-либо закономерностей в клиническом течении острого периода заболевания и в частоте развития «инвалидизирующих» состояний (по модифицированной шкале Рэнкина >2) через 12 недель после нелакунарных инсультов у пациентов с нормальной массой тела и с АО II ст. в зависимости от ОНП -308G/A гена *TNF- α* .

Ключевые слова: ишемический нелакунарный инсульт, абдоминальное ожирение, фактор некроза опухоли- α , ген, -308 G/A однонуклеотидный полиморфизм.

УДК 616. 831-005. 1-056. 5

ОДНОНУКЛЕОТИДНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ -308 G/A ГЕНУ ФАКТОРУ НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ- α ПРИ НЕЛАКУНАРНИХ ІНСУЛЬТАХ У ПАЦІЄНТІВ РІЗНИХ ВАГОВИХ КАТЕГОРІЙ

Дельва М. Ю.

Резюме. Нами вивчений розподіл однонуклеотидного поліморфізму (ОНП) -308G/A гену фактору некрозу пухлини- α (*TNF- α*) 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. В загальній популяції осіб з нелакунарними інсультами частота 308G та 308A алелей гену *TNF- α* складає 0,9 та 0,1, у пацієнтів з АО II ст. – 0,92 та 0,08, а у пацієнтів з нормальною масою тіла – 0,88 та 0,12. Популяційна структура за ОНП -308G/A гену *TNF- α* у пацієнтів з нелакунарними інсультами не відхиляється від рівноваги Харді-Вайнберга. Частота генотипів за ОНП -308G/A гену *TNF- α* при нелакунарних інсультах суттєво не розрізняється у пацієнтів різних вагових категорій. Не виявлено будь яких закономірностей в клінічному перебігу гострого періоду захворювання та частоті розвитку «інвалідизуючих» функціональних станів (за модифікованою шкалою Ренкіна >2) через 12 тижнів після нелакунарних інсультів у пацієнтів з нормальною масою тіла та з АО II ст. в залежності від ОНП -308G/A гену *TNF- α* .

Ключові слова: ішемічний нелакунарний інсульт, абдомінальне ожиріння, фактор некрозу пухлини- α , ген, -308 G/A однонуклеотидний поліморфізм.

UDC 616. 831-005. 1-056. 5

Single Nucleotide Polymorphism of -308G/A Tumor Necrosis Factor- α Gene in Patients of Different Weight Categories with Non-Lacunar Strokes

Delva M. Yu.

Summary. In recent years in scientific literature has been emerged a lot of scientific reports which prove independent and significant influences of obesity on acute ischemic strokes and functional outcome. 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. As known, tumor necrosis factor- α 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 cell molecules, etc. In recent years, a number of investigations had shown that the degree of increase in tumor necrosis factor- α concentration in patients with ischemic stroke is largely determined by genetic factors.

Purpose of the study was to identify the distribution of -308 G/A single nucleotide polymorphisms (SNP) of the tumor necrosis factor- α gene (*TNF- α*) (rs1800795) 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.

We examined 33 patients with normal body weight and in 37 patients with abdominal obesity (AO) II class. Non-lacunar stroke subtype was verified by neurovisualization. In the study it has been recruited 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.

Molecular genetic analysis was performed in a laboratory «Gentrees LTD» (Poltava). DNA was extracted from white blood cells. To amplify the fragment of *TNF- α* gene, which contains the polymorphic site 308 G/A, it had been used oligonucleotide primers – direct TNFA308F: GGGACACACAAGCATCAAGG and reverse TNFA308R: AATAGGTTTTGAGGGCCATG. Restriction materials were analyzed by electrophoresis in 6% polyacrylamide gel in 1xTBE. As molecular weight marker it had been used DNA pUC19, which was hydrolysed by endonuclease *MspI*. Visualization of amplification and restriction products was performed by gel dyeing with ethidium bromide and photographing in ultraviolet light transilluminator.

In the general population of patients with non-lacunar stroke the frequencies of 308G and 308A allele were 0.9 and 0.1, in abdominally obese patients – 0.92 and 0.08, and in normal body weight patients – 0.88 and 0.12 ($p>0.05$). The distribution of genotypes in the general population of patients with non-lacunar stroke corresponds to the Hardy-Weinberg equilibrium (the actual distribution – G/G – 81.5%, G/A – 17.1%, A/A – 1.4% versus theoretical distribution – G/G – 81.0%, G/A – 18.0%, A/A – 1.0%, $p>0.05$). The genotype rates of SNP-308G/A *TNF- α* gene don't differ in normal body weight (G/G – 75.8%, G/A+A/A – 24.2%) and abdominally obese patients (G/G – 86.5%, G/A+A/A – 13.5%, $p>0.05$). There were no any patterns of clinical outcomes (according to NIHSS score) on 10th post-stroke day in normal weight patients (G/G – 4.0 ± 0.3 versus G/A+ A/A – 3.9 ± 0.4 , $p>0.05$) as well as in patients with AO II class (G/G – 5.3 ± 0.3 , G/A+ A/A versus 5.0 ± 0.5 , $p>0.05$). Also there were no differences in «disabling» functional outcome rates (according to modified Rankin scale score >2) at hospital discharge and in 12 weeks after stroke depending on SNP -308 G/A gene *TNF- α* distribution.

Key words: ischemic non-lacunar stroke, abdominal obesity, tumor necrosis factor- α , gene, -308 G/A single nucleotide polymorphism.

Рецензент – проф. Литвиненко Н. В.

Стаття надійшла 23. 08. 2013 р.