



VILNIAUS UNIVERSITETO  
MEDICINOS FAKULTETO  
ŽMOGAUS IR MEDICININĖS GENETIKOS KATEDROS

MAGISTRO DARBAS

*ABO KRAUJO GRUPIŲ SISTEMOS, VITAMINĄ D PRIJUNGANČIO BALTYMO  
POLIMORFIZMO KLASTERINĖ ANALIZĖ LYGINANT VĖŽIU, KORONARINE ARTERIJŲ  
LIGA SERGANČIŲJŲ IR ILGAAMŽIŲ GRUPIŲ DUOMENIS*

Magistrantė

MILDA JUKNEVIČIENĖ

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas

Prof. habil. dr. VAIVA LESAUSKAITĖ

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Žmogaus ir medicininės  
genetikos katedros vedėjas

prof. (HP) dr. ALGIRDAS UTKUS

leidžiama gintis

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

## TURINYS

PADĖKA .....	4
SANTRUMPŲ SAŖAŠAS .....	5
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	9
1.1. Ilgaamžiškumas .....	9
1.2. Piktybiniai navikai ir senėjimas .....	9
1.2.1. Kancerogenezė .....	10
1.2.2. Prostatos vėžys .....	11
1.2.3. Šlapimo pūslės vėžys .....	12
1.2.4. Inkstų vėžys .....	13
1.3. Išeminė širdies liga (koronarinė arterijų liga) .....	13
1.3.1. Aterosklerozinės plokštelės formavimasis .....	14
1.4. AB0 kraujo grupių sistema .....	15
1.4.1. AB0 kraujo grupių sistema ir piktybiniai navikai .....	16
1.4.2. AB0 kraujo grupių sistema, koronarinė arterijų liga ir senėjimas .....	16
1.5. Vitaminą D prijungiantis baltymas .....	17
2. TYRIMO EIGA .....	20
3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS .....	21
3.1. Darbo apimtis .....	21
3.2. AB0 kraujo grupių sistemos tyrimas .....	22
3.2.1. Tyrimui naudota įranga .....	22
3.2.2. Tyrimui naudoti reagentai .....	22
3.2.3. Tyrimo metodika .....	22
3.3. DNR gryninimo iš periferinio kraujo tyrimas .....	23
3.3.1. Tyrimui naudota įranga .....	23
3.3.2. Tyrimui naudoti reagentai .....	23
3.3.3. Tyrimo metodika .....	23
3.3.4. DNR koncentracijos ir švarumo įvertinimas bekiuvečiu spektrofotometru .....	24
3.3.4.1. Tyrimui naudota įranga .....	24
3.3.4.2. Tyrimui naudoti reagentai .....	25
3.3.4.3. Tyrimo metodika .....	25
3.4. Tikro laiko PGR kiekybinės analizės metodas .....	25
3.4.1. Tyrimui naudota įranga .....	26

3.4.2.	Tyrimui naudoti reagentai.....	27
3.4.3.	Tyrimo metodika.....	27
3.5.	Klasterinė analizė.....	28
3.6.	Rezultatų statistinė analizė.....	29
4.	TYRIMO REZULTATAI.....	30
4.1.	AB0 kraujo grupių dažnio tyrimo rezultatai tirtose grupėse.....	30
4.1.1.	AB0 kraujo grupių dažnio rezultatai tirtose bendrose kraujo donorų, ilgaamžių ir vėžiu sirgusių grupėse.....	30
4.1.2.	AB0 kraujo grupių dažnio tyrimo rezultatai pagal amžių tirtose vėžiu sirgusių vyrų ir moterų grupėse.....	32
4.2.	AB0 kraujo grupių sistemos kraujo grupių šansų santykio analizės rezultatai.....	34
4.3.	AB0 kraujo grupių sistemos tirtų ligonių, kraujo donorų ir ilgaamžių grupių klasterinės analizės rezultatai.....	38
4.4.	Vitamino D prijungiančio baltymo genotipavimo rezultatai.....	40
5.	REZULTATŲ APTARIMAS.....	41
6.	IŠVADOS.....	44
	SANTRAUKA.....	45
	SUMMARY.....	47
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	49
	1 PRIEDAS.....	62
	2 PRIEDAS.....	63
	3 PRIEDAS.....	67

## PADĖKA

Noriu padėkoti magistro baigiamojo darbo vadovei prof. habil. dr. Vaivai Lesauskaitei ir Kardiologijos instituto darbuotojams už duotus patarimus, atsakymus į iškilusius klausimus ir galimybę atlikti darbą šiame institute. Dėkoju prof. habil. dr. Donatui Stakišaičiui už suteiktą pagalbą atliekant tyrimą, patarimus, konsultavimą bei galimybę kartu išleisti publikaciją.

## SANTRUMPŲ SAŖAŠAS

25(OH)D – 25 hidroksivitaminas D.

A – adeninas.

Asp – apsarto rūgštis.

C – citozinas.

CAS – kompleksinė prisitaikymo sistema (angl. *Complex adaptive system*).

DNR – deoksiribonukleorūgštis.

G – guaninas.

Gc – grupei specifinis komponentas.

Gc1f – Gc1 greitasis (angl. *Fast*).

Gc1s – Gc1 lėtasis (angl. *Slow*).

Glu – glutamo rūgštis.

ILG – ilgaamžiai.

IV – inkstų vėžys.

KAL – koronarinė arterijų liga.

KD – kraujo donorai.

Lys – lizinas.

MTL – mažo tankio lipoproteinas.

NVI IS – Nacionalinio vėžio instituto informacinė sistema.

PGR – polimerazės grandininė reakcija.

PI 95 % - pasikliautinumo intervalas 95 %.

PV – prostatės vėžys.

SPV – šlapimo pūslės vėžys.

ŠS – šansų santykis.

T – timinas.

Thr – treoninas.

VDPB – vitaminą D prijungiantis baltymas.

VDPB-maf – vitaminą D prijungiančio baltymo kompleksas su makrofagus aktyvuojančiu faktoriumi.

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas.

## IVADAS

**Problematika ir aktualumas.** Aterogenezės, kancerogenezės ryšys su senėjimo procesu yra žinomas (1, 2). Kartu su ilgėjančia vidutine gyvenimo trukme daugėja susirgimų navikais ir ateroskleroze bei jos komplikacijomis. Tačiau amžius nėra vienintelis veiksnys, kuris daro įtaką šių susirgimų raidai. Šie procesai yra lemti daugelio veiksnių (3, 4).

Lietuvoje mirtingumas nuo širdies ir kraujotakos ligų yra vienas iš didžiausių visoje Europoje (4). Šiai ligų grupei priklauso aterosklerozė ir jos sukeltos ligos. Aterogenezei įtaką daro daugiau nei 200 veiksnių (5).

Navikiniai susirgimai – tai antra pagal mirtingumo dažnį ligų grupė Lietuvoje. Lietuvoje vėžiu serga apie 3 % gyventojų (6). Didėjantis diagnozuotų vėžio atvejų skaičius yra susijęs su ilgėjančia gyvenimo trukme. Senėjimas ir vėžio raida yra biologiškai susiję ir tai yra viena iš navikų biologijos tyrimų sričių (7).

Lietuvos statistikos departamento duomenimis, asmenų iki 60 metų yra apie 75 %, 80 metų ir vyresni asmenys sudaro apie 5,5 % visos populiacijos. Moterų populiacijoje yra daugiau nei vyrų (atitinkamai apie 54 % ir apie 46 %), o ypač ryškus skirtumas yra 80 metų ir vyresnių amžiaus grupėje, kur moterys sudaro apie 73 %. Pastarasis skirtumas yra susijęs su aiškiai trumpesne vyrų gyvenimo trukme Lietuvos populiacijoje, kurią lemia ir sergamumas ateroskleroze bei piktybiniais navikais (6, 8, 9, 10).

Ilgaamžiškumą lemia atsparumas kancerogenezei ir aterogenezei. Yra žinomi ilgaamžiškumą lemiantys genai (11), tačiau ilgo gyvenimo fenomenas yra neabejotinai daugelio veiksnių sąveikos išraiška. Pavyzdžiui, vitamino D mažesnė koncentracija kraujyje yra susijusi su didesne išeminės širdies ligos bei vėžio rizika (12, 13). Vienas iš veiksnių apsprendžiančių vitamino D koncentraciją kraujyje yra vitamino D prijungiančio baltymo (VDPB) izoformos (14). Lietuvos populiacijoje tyrinėtas VDPB (15), Cerumen tipo (16), beta-aminoizosviesto rūgšties polimorfizmo ryšys su koronarine širdies liga ir ilgaamžiškumu (17). Lietuvos populiacijoje sergantiems vainikinių arterijų ateroskleroze dažniau nustatoma B kraujo grupė ir aiškiai rečiau 0 kraujo grupė, o ilgaamžių grupei būdinga patikimai dažnesnė 0 kraujo grupė (18, 19). Kitose populiacijose (kiniečių) pastebėtas vėžinių ligų ryšys su 0 ir A kraujo grupėmis (20), o B kraujo grupė tarp sergančių navikais dažnesnė Austrijos populiacijoje (21).

Magistro darbui pasirinkta atlikti AB0 kraujo grupių sistemos klasterinę analizę Lietuvos populiacijoje lyginant sergančių prostatos, inkstų, šlapimo pūslės vėžiu, sveikų donorų, ilgaamžių bei sergančiųjų koronarine arterijų liga asmenų grupės, klasterinės analizės metodu siekiant įvertinti analizuojamų duomenų struktūrą, jų matematinį panašumą ir

sudaryti grupes (klasterius) (22). Šis metodas padės įvertinti skirtumus (panašumus) ir genetinius atstumus tarp tiriamųjų grupių. Gauti rezultatai parodys klasterių tarpusavio hierarchiją, sudarant visų klasterių tarpusavio priklausomybę ir nustatant optimalų klasterių skaičių (23). Klasterine analize pagrįstą AB0 kraujo grupių sistemos ir moterų sergančių, vainikinių arterijų ateroskleroze, kraujo donorų bei ilgaamžių duomenų grupavimas jau tyrinėtas Lietuvoje (18, 19), bet netyrinėtas tarp sergančių piktybiniais navikais, sąryšyje su ilgaamžiškumu.

**Darbo hipotezė:** AB0 kraujo grupių dažnis ilgaamžių grupėje, koronarine arterijų liga ir urogenitalinės sistemos (prostatos, šlapimo pūslės, inkstų) vėžiu sergančių grupėse Lietuvos populiacijoje skiriasi. Ilgaamžiškumui būdinga atsparumas kancerogenezei ir aterogenezei, kuriam reikšmės turi ir paveldimi determinantai. Klasterinės analizės metodas gali būti taikomas šių sąsajų nagrinėjimui sąryšyje su ilgaamžiškumu.

**Darbo tikslas.** Įvertinti asmenų, sergančių vėžiu, asociaciją su AB0 kraujo grupių sistema, ją palyginti su ilgaamžių bei koronarine arterijų liga sergančiųjų grupėmis, tiriamąsias grupes sugrupuoti klasterizavimo metodu ir ištirti vitamino D prijungiančio baltymo polimorfizmą.

#### **Uždaviniai**

1. Atlikti asmenų, sergančiųjų urogenitalinės sistemos vėžiu, koronarine arterijų liga bei ilgaamžių asmenų klasterinę analizę pagal AB0 kraujo grupių sistemą.
2. Įvertinti AB0 kraujo grupių sistemos dažnį urogenitalinės sistemos vėžio ir ilgaamžių populiacijose.
3. Įvertinti urogenitalinės sistemos vėžio ir ilgaamžių asociaciją su AB0 kraujo grupių sistema.
4. Ištirti vitamino D prijungiančio baltymo izoformų dažnį ilgaamžių grupėje.

**Darbo naujumas.** Darbo originalumą sudaro AB0 kraujo grupių ir ilgaamžiškumo klasterinė analizė sąryšyje su jų pasiskirstymu sergančių vėžiu ir vainikinių arterijų ateroskleroze sergančiųjų grupėse Lietuvos populiacijoje. Urogenitalinės sistemos vėžys buvo pasirinktas dėl priklausomybės nuo amžiaus (vyresniame amžiuje nustatoma daugiau atvejų) bei dėl to, kad prostatos vėžys yra dažniausiai aptinkamas navikinis susirgimas vyrų grupėje (6). Darbe tirta AB0 kraujo grupių sistemos variantų asociacija su sergančiųjų urogenitalinės sistemos vėžiu (prostatos, inkstų ir šlapimo pūslės) grupėse bei ilgaamžių ir sveikų kraujo donorų grupėse. AB0 kraujo grupių sistemos duomenų klasterinė analizė parodys genetines distancijas tarp lyginamųjų grupių. Taip pat Lietuvos ilgaamžių grupei bus nustatytas vitamino D prijungiančio baltymo izoformų dažnis.

Atliekant baigiamąjį magistro darbą buvo tiriama AB0 kraujo grupių sistema, gryninant DNR iš periferinio kraujo bei genotipavimas tikro laiko (PGR) metodu. Analizuota urogenitalinės sistemos vėžio, koronarinės arterijų ligos bei ilgaamžiškumo asociacija su AB0 kraujo grupių sistema. Gauti duomenys apdoroti statistiniais metodais. Sergantieji vėžiu, koronarine arterijų liga bei ilgaamžiai buvo palyginti sugrupuojant klasterinės analizės principu, pagal AB0 kraujo grupių sistemą.



## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Ilgaamžiškumas

Populiacijos senėjimas yra fenomenas susijęs su daugeliu skirtingų veiksnių, lemiančių prailgėjusią gyvenimo trukmę, ir ilgaamžių skaičiaus augimą (24, 25). Jungtinių tautų organizacijos duomenimis Pasaulio populiacijos tyrimai (2015 metų) atskleidė, kad Europa pagal gyventojų amžių yra labiausiai pasenęs kontinentas, kurio 24 % populiacijos yra vyresni nei 60 metų gyventojai. Tai tiesiogiai susiję su širdies ir kraujotakos ligų bei vėžio susirgimų dažniu (26).

Senėjimas yra pagrindinis ligų, susijusių su amžiumi rizikos veiksnys. Šis mechanizmas gali būti suvokiamas dviprasmiškai: kaip nepertraukiamas ryšys, kuris sieja senėjimą ir lėtines amžines ligas (dažniausiai vėžį ir širdies kraujagyslių ligas) arba, kad ilgaamžiškumas nėra susijęs su rizikos veiksniais, lemiančiais su amžiumi susijusias ligas (pvz., vėžį ir aterosklerozę) (27).

Ilgaamžiškumas yra apibūdinamas kaip požymių ir genetinių variantų derinio visuma. Pastarieji gali būti suklasifikuoti į dvi grupes. Pirmoji – variantai esantys genuose gali daryti įtaką daugiau nei vienam pasireiškiančiam fenotipui, dėl skirtingo poveikio audiniams ir skirtingų veikimo mechanizmų (pvz., APOE e4) (28). Antroji – variantai, kurie veikia skirtingas genų funkcijas priklausomai nuo amžiaus: genai gali pakeisti savo įtaką dėl senstant besikeičiančių mechanizmų remodeliavimo ir kitų veiksnių, kurie sudaro naują vidinę aplinką (metabolizmo, hormonų pokyčiai) (29).

Lietuvos populiacijoje atlikti ilgaamžių tyrimai – nustatytas ilgaamžiškumo ryšys su apoA-I, apoB, apoE kiekiu kraujyje, Cerumen tipu (16), VDPB genetinėmis variantais (15), AB0 kraujo grupėmis (18, 19), cholesterol–esterius pernešančio baltymo (angl. *Cholesteryl ester transfer protein*, CETP) polimorfizmu I405V (30).

### 1.2. Piktybiniai navikai ir senėjimas

Piktybiniai navikai – tai antra pagal mirtingumo dažnį ligų grupė Lietuvoje, pirmoje vietoje širdies ir kraujagyslių susirgimai. Lietuvoje vėžiu serga apie 3 % gyventojų (6). Didėjantis diagnozuotų vėžio atvejų skaičius yra susijęs su ilgėjančia gyvenimo trukme, žalingais įpročiais, viršsvoriu, virusinėmis ligomis ir kitais veikiančiais veiksniais. Senėjimas ir vėžio raida yra biologiškai susiję ir tai yra viena iš navikų biologijos tyrimų sričių (7).

Vėžys – tai liga, kurią sukelia supiktybėjusių ląstelių sankaupa (navikas). Pagal naviko augimo pobūdį, jo plitimą, įtaką organizmui navikai gali būti piktybiniai ir nepiktybiniai. Kai kurie nepiktybiniai navikai gali virsti piktybiniais. Ligos eiga, jos gydymas labai susiję su piktybinio naviko tipu, navikinių ląstelių diferenciacijos laipsniu bei vėžinio proceso išplitimu. Vėžio išplitimui apibūdinti onkologijoje vartojama sąvoka „vėžio stadijos“. Paprastai skiriamos 4 vėžio stadijos (31).

### 1.2.1. Kancerogenezė

Šiuo metu egzistuoja daug kancerogenezės mechanizmų teorijų. Pagal šias teorijas, vėžio vystymąsi organizme gali sukelti: virusai, chromosomų aberacijos (delecijos, insercijos, duplikacijos), somatinės ar susikaupusios dauginės mutacijos (taškinės mutacijos), imuninė sistema, negyjančios žaizdos, nemutageniniai mechanizmai ir audinių organizacinė sritis (angl. *Tissue organization field*). Somatinių mutacijų teorija yra pagrindinė kancerogenezės teorija. Ji teigia, kad vėžio formavimasis yra veikiamas dauginių atsitiktinių mutacijų svarbiuose genuose, kurie kontroliuoja somatinių ląstelių augimą ir diferenciaciją. Tačiau yra stebimi mutacijų teorijos neatitikimai (nukrypimai) – kartais stebima lėtesnė vėžinių ląstelių proliferacija palyginus su somatinių ląstelių proliferacija, pastebėta spontaniškas vėžio regresija (32) bei, kad kai kurie vėžio tipai nėra susiję su kokia nors mutacija (33).

Neseniai buvo suformuota nauja teorija. Paremta kompleksine prisitaikymo sistema (angl. *Complex adaptive system*, CAS) arba kitaip vadinama chaoso teorija (34). J. Holandas (angl. *J. Holland*) panaudojo CAS nuolat kintančiai kompleksinių sistemų prigrimčiai apibūdinti (35). CAS turi tris pagrindinius bruožus: pirmas – kiekviena sistema yra daugelio aktyvių elementų tinklas, kurie tarpusavyje sąveikauja; antras – adaptavimasis prie naujos aplinkos yra būtina sąlyga išgyvenamumui; trečias – CAS turi savybių, kurios apibūdinamos kaip „avarinės“ (savaimė atsirandanti tiesioginė sistemos evoliucija). Chaoso teorijoje CAS pavyzdys yra subrendusios kamieninės ląstelės. Jei šių ląstelių aplinkoje streso lygis (dėl kancerogenų, toksinogenų ar netoksinogenų), trikdančias normalų ląstelinį ciklą, padidėja, suaugusių kamieninių ląstelių genomai pakinta ir pakeičia prisitaikymo mechanizmą. Tai – slenkstinė riba į chaosą. Jei kamieninės ląstelės negali prisitaikyti prie naujos stresinės mikroaplinkos, prasideda jų krizė. Subrendusių kamieninių ląstelių genomai kinta ieškodamas prisitaikymo prie aplinkos sukuriant atsparias dukterines ląsteles. Taip sužlugdoma visa veikianti sistema. Suformuojamos dukterinės (vėžinės) ląstelės yra labiau atsparios stresui. Tuo tarpu transpozonų elementai („parazitinė“ deoksiribonukleorūgštis (DNR)) gali palengvinti genomo chaotišką būseną (34).

Kancerogenezei būdingos savybės: apoptozės slopinimas, nereguliuojamas augimas, nejautrumas augimą slopinantiems veiksniams, nepertraukiama angiogenezė, beribis replikacijos potencialas, metastazavimas, energijos metabolizmo reprogramavimas, genominis nestabilumas ir imuninio sunaikinimo išvengimas (36).

Senėjimo procesas yra siejamas su daugeliu molekulinį, ląstelinių ir fiziologinių procesų, kurie daro įtaką kancerogenezei. Vėžys gali būti traktuojamas kaip su amžiumi susijusi liga. Senėjimo procesas gali būti sukeltas prarandant telomerų galus, inhibuojant nuo ciklinų priklausančią kinazę 2a (CDKN2a), kaupiantis DNR pažaidoms ar veikiant per vėžio supresijos mechanizmus (retinoblastomos 1 ir p53 baltymus). Šių mechanizmų sutrikdymas padeda vėžinėms ląstelėms apeiti apoptozę (7).

Lietuvoje buvo atlikti tyrimai tiriant pre-mRNR brendimą (angl. *Splicing*) ir kaip jis susijęs su ląstelės išgyvenamumu, esant deguonies trūkumui. Tyrimas atskleidė, kad šie procesai yra susiję su vėžinės ląstelės formavimusi (37)

### 1.2.2. Prostatos vėžys

Nacionalinio vėžio instituto duomenimis Lietuvoje prostatos vėžys yra dažniausia vyrų onkologinė liga. Per metus nustatoma apie 2000 naujų atvejų. Taip pat yra pastebėta tendencija, kad sergamumas šia liga nuolat auga. Lietuvoje 2012 metais prostatos vėžys, sergančiųjų vėžiu vyrų grupėje, buvo nustatytas dažniausiai – net 29 %, iš jų 32,8 % buvo jau antrosios stadijos (6). Tuo tarpu Jungtinėse Amerikos Valstijose šios lokalizacijos vėžys yra nustatomas kas penktam vyrui (38). Prostatos vėžys paprastai aptinkamas vyrams, kurie yra vyresni nei 50 metų, o jaunesniems – pasitaiko retai. Taip pat priešinės liaukos vėžys, kitaip negu kitų organų vėžys, gali ilgus metus tūnoti prostatoje nesukeldamas jokių simptomų. Daugumoje atvejų prostatos navikas auga labai lėtai. Tik nedidelei vyrų daliai prostatos vėžys vystosi sparčiai, kai kuriais atvejais išplisdamas į kitus organus, ypač į kaulus (6, 39).

Yra žinoma keletas rizikos veiksnių darančių įtaką prostatos vėžio raidai. Vyrai, kurių artimi giminės (tėvas, brolis, dėdė) serga ar sirgo prostatos vėžiu, turi didesnę riziką susirgti priešinės liaukos vėžiu (39). Taip pat, jei kelerios šeimos moterys sirgo krūties vėžiu, ypač jei jos susirgo būdamos jaunesnės nei 40 metų amžiaus, tai yra tikimybė, jog šeimos palikuonys paveldi mutavusį geną (*BRCA1*, *BRCA2* genai). Šios šeimos vyrai gali turėti padidėjusią prostatos vėžio riziką (40). Stebima skirtinga prostatos vėžio sergamumo tendencija ir tarp etninių grupių, pavyzdžiui, afroamerikiečiai gerokai dažniau serga šia liga nei baltieji amerikiečiai (41, 42), o tarp azijiečių vyrų prostatos vėžys – reta liga (43). Tai sietina ir su mityba. Gausus riebaus gyvulinės kilmės maisto bei nepakankamas šviežių

daržovių, vaisių vartojimas didina prostatos vėžio riziką, o tai didina ir aterosklerozės riziką (38).

Pasaulio sveikatos organizacijos iniciatyva rugsėjo 15-oji paskelbta Pasauline kovos su prostatos vėžiu diena. Lietuvoje nuo 2006 m. sėkmingai vykdoma priešinės liaukos vėžio ankstyvosios diagnostikos programa. Pagal šią programą vyrams nuo 50 iki 75 metų ir vyrams nuo 45 metų, jei jų tėvai ar broliai sirgo prostatos vėžiu, 1 kartą per 2 metus nemokamai atliekamas prostatos specifinio antigeno tyrimas (44, 45).

### 1.2.3. Šlapimo pūslės vėžys

Šlapimo pūslės vėžys gana paplitusi onkologinė liga. Lietuvoje šlapimo pūslės vėžiu kasmet susergera apie 400 žmonių. Vėžio registro duomenimis, 2012 metais šlapimo pūslės vėžiu sergančiųjų grupė sudarė 4 % nustatytų piktybinių navikų. Didžioji dalis buvo I stadijos. Vyrai šia liga beveik tris kartus dažniau serga nei moterys (6). Tai labiau pagyvenusių (vyresnių nei 50 metų) žmonių liga. Retai kada šia liga serga jaunesni nei 40 metų žmonės. Baltosios rasės žmonės šlapimo pūslės vėžiu serga dažniau už juodaodžius. Daugeliu atvejų ligos atsiradimo priežastys neaiškios (46).

Yra trys šlapimo pūslės vėžio tipai. Kiekvienas tipas priklauso nuo ląstelių, kurios supiktybėjo. Pirmiausiai yra skiriama pereinamųjų (angl. *Transitional*) ląstelių karcinoma – tai vėžys, kuris prasideda vidiniame (angl. *Innermost*) šlapimo pūslės sienelės audinio sluoksnyje. Tai dažniausias šlapimo pūslės vėžio tipas. Kitas tipas yra suragėjusių (angl. *Squamous*) ląstelių karcinoma, šiuo atveju supiktybėja ragėjančios ląstelės, kurios yra plonos ir plokščios bei susiformuoja po ilgai trunkančios infekcijos ar dirginimo. Trečiasis tipas – adenokarcinoma. Ji išsivysto iš sekrecinių ląstelių. Tai labai retas vėžio tipas dar vadinamas išoriniu šlapimo pūslės vėžiu. Šio tipo navikai gali išplisti ir įsiskverbti į šlapimo pūslės raumeninį sluoksnį ar gretimus organus ir limfinius mazgus.

Tam tikri rizikos veiksniai didina galimybę susirgti šlapimo pūslės vėžiu, jiems priskiriama rūkymas, šeiminė istorija, genų pokyčiai, ilgalaikis darbas su dažais, metalais ar naftos produktais, radioterapinis gydymas dubens srityje ar tam tikrų priešvėžinių vaistų vartojimas, vandens, kuriame yra didelė koncentracija arseno ar kuris buvo veikiamas chloridais, naudojimas, šlapimo pūslės *Schistosoma haematobium* sukelta infekcija, ilgai naudoti šlapimo takų kateteriai. Vyresnis amžius taip pat yra šio vėžio rizikos veiksnys (47).

Nustatyti ir diagnozuoti šlapimo pūslės vėžį yra taikomi tyrimai, kurių metu tiriamas šlapimas ir pati šlapimo pūslė. Jei vėžys nustatomas ankstyvoje stadijoje, tai jį galima išgydyti. Skiriamos 4 stadijos (47, 48).

#### 1.2.4. Inkstų vėžys

Tai vėžio tipas, kuomet vėžys formuojasi inkstų audinyje. Šis vėžys skiriamas į tris tipus: inkstų ląstelių vėžys (dažniausias suaugusiems), pereinamųjų ląstelių vėžys inkstų geldelėse bei šlapimtakyje ir Vilmsio (angl. *Wilms*) vėžys (dažniausiai atsirandantis vaikystėje).

Inkstų ląstelių vėžys – tai liga, kuomet pakitusios ląstelės formuojasi inkstų kanalėlių ląstelėse. Kitaip dar vadinamas inkstų adenokarcinoma.

Rūkymas ir piktnaudžiavimas tam tikrais nuskausminamaisiais vaistais ilgą laiką gali padidinti riziką susirgti inkstų vėžiu. Taip pat vėžio išsivystymui gali daryti įtaką viršsvoris, aukštas kraujo spaudimas, anksčiau nustatyti vėžio atvejai šeimoje, tam tikras genetinis polinkis (Hippel – Lindau liga ar paveldima papiliarinė inkstų ląstelių karcinoma) (49).

Vėžio registro duomenimis, Lietuvoje per metus suserga apie 700 pacientų inkstų vėžiu. 2012 metais šio tipo vėžio sergančiųjų grupė sudarė 4 % visų susirgimų piktybiniais navikais. Nuo jo mirė 3 % sergančiųjų (6).

#### 1.3. Išeminė širdies liga (koronarinė arterijų liga)

Koronarinės arterijų ligos (KAL) metu pažeidžiamos širdies vainikinės arterijos. KAL yra lėtinė, daugelio veiksnių lemta liga. Ja sergant arterijos sienelėje formuojasi aterosklerozinės plokštelės, o procesas vadinamas aterogeneze (50).

Standartizuotas mirtingumo nuo išeminės širdies ligos rodiklis 2010 m. Lietuvoje buvo 2 kartus didesnis nei Europos Sąjungoje. Vyrų iki 65 metų mirtingumas Lietuvoje buvo 4,5 karto, o Europos Sąjungoje – 4 kartus didesnis nei moterų. Širdies ir kraujagyslių ligos yra pagrindinė mirties priežastis Lietuvoje, lemianti beveik dvigubai daugiau mirčių nei Europos Sąjungoje. Tyrimai rodo, kad koronarinė širdies liga Lietuvoje jaunėja (5, 51). Nacionalinio JAV širdies, plaučių ir kraujo instituto duomenimis, Jungtinėse Amerikos Valstijose dažniausiai moterų ir vyrų mirties priežastis yra koronarinė arterijų liga (apie 370000 žmonių) (50).

Aterogenezei įtaką daro daugiau nei 200 veiksnių (5). Tam tikri veiksniai gali padidinti riziką sirgti ateroskleroze. Kuo daugiau veikiančių veiksnių nustatoma, tuo didesnė aterosklerozės rizika. Rizikos veiksnius galima kontroliuoti ir taip atitolinti KAL progresavimą. Dažniausi rizikos veiksniai – padidėjęs cholesterolio kiekis kraujyje (didelis mažo tankio lipoproteinų ir mažas didelio tankio lipoproteinų kiekis), aukštas kraujo

spaudimas ( $\geq 140/90$  mmHg), rūkymas, rezistentiškumas insulinui, diabetas, viršsvoris ar nutukimas, metabolinis sindromas, per mažas fizinis aktyvumas, netinkamas maitinimasis, vyresnis amžius (vyrams  $>45$  metai, moterims  $>55$  metai), šeiminė KAL istorija. Aterosklerozės viena iš dažniausių priežasčių yra šeiminė hipercholesterolemija ar kitos genetinės hiperlipidemijos (monogeninės ligos). C reaktyvusis baltymas yra rizikos veiksnys miokardo infarktui ir KAL. Moterims trigliceridai gali padidinti riziką susirgti KAL. Aterosklerozės viena iš priežasčių gali būti padidėjusi apolipoproteino B koncentracija kraujyje (mažo tankio lipoproteinuose (MTL) jo yra daugiausiai), mažas apolipoproteino A-1 kiekis kraujyje (52, 53).

### 1.3.1. Aterosklerozinės plokštelės formavimasis

Aterosklerozė yra daugiažidininė liga, dažniausiai paveikianti kraujagyslių regionus, esančius prie arterijų išsišakojimų. Prieš susiformuojant aterosklerozinei plokštei, šiems regionams būdingi endotelio ir genų raiškos pokyčiai, subendotelinių dentritinių ląstelių atsiradimas ir prisitaikančiosios intimos sustorėjimas. Plokštelė pradeda formotis pažeistos kraujagyslės sienelės vietoje. Šis procesas gali prasidėti dar vaikystėje ir trukti ilgus metus (54). Bėgant laikui plokštelė gali sukietėti ar plyšti.

Aterosklerozinės plokštelės formavimasis apima keletas etapų (55). Pirmiausiai, dėl padidėjusio ląstelių pralaidumo MTL kaupiasi vidiniame arterijų sluoksnyje. MTL infiltracija ypač paspartėja, kai jų kiekis padidėjęs. Tada mažo tankio lipoproteinai modifikuojami oksidacijos ir agregacijos būdu (56). Taip MTL tampa stimulu, sukeliančiu imuninį atsaką, ko pasekoje indukuojamos endotelinės kartu su lygiųjų raumenų ląstelėmis ekspresuoti adhezijos molekulės ir augimo faktoriai. Jie sąveikauja su monocitų paviršiuje esančiais receptoriais ir stimuliuoja monocitų susitelkimą, migraciją bei diferenciaciją į makrofagus ir dendritines ląsteles (57). Šios ląstelės atlieka cholesterolio kaupimo funkciją ir virsta putotosiomis ląstelėmis (58). Putotosios ląstelės tampa signalu parodančiu lipoproteinų sukeltą uždegimą arterijų sienelėje. MTL sankaupos kraujagyslių sienelėje matomos kaip geltonos spalvos riebalinė dėmė (59). Daugelis riebalinių dėmių neprogresuoja toliau, tačiau kitos progresuoja į aterosklerozines plokšteles (60). Dėl aterogeninio proceso proliferuoja ir diferencijuojasi lygiųjų raumenų ląstelės, daugėja kologeno ir riebalinė dėmė virsta aterosklerozine plokštele (61). Tokia nestabili plokštelė susiaurina arterijų spindį bei gali plyšti ir tuo įtakoti trombo formavimąsi ir šėminės ligos požymių pasireiškimą (62).

Lietuvos populiacijoje atlikti vainikinių arterijų aterosklerozės tyrimai ieškant ryšio su cirkuliuojančiomis mikro RNR (63), N-karboksimetilizinu (64), VDPB polimorfizmu

(15), *RTN4* ir *FBXL17* genais (65), AB0 kraujo grupių sistema (18, 19), alfa 1 proteinazių inhibitoriumi, apoB, apoA-I (16, 66), apoE (16), beta aminoizobutyryne rūgštimi (17). Taip pat buvo atlikti tyrimai nustatant kokią įtaką daro genetiniai bei aplinkos veiksniai (gyvenimo būdas, kraujo biocheminiai rodikliai) (67).

#### 1.4. AB0 kraujo grupių sistema

AB0 kraujo grupių sistema buvo atrasta 1901 metais K. Landsteiner. Tai – pirmoji žinoma žmogaus kraujo grupių sistema (68). Jos paveldėjimas buvo pirmasis įrodymas apie tam tikrų požymių perdavimo egzistavimą žmogaus organizme (69).

AB0 kraujo grupių sistemą koduoja *ABO* genas, esantis 9q34.2 pozicijoje. Šio geno pavadinimas yra alfa 1-3-N-acetilgalaktosaminiltransferazė ir alfa 1-3-galaktosiltransferazė. *ABO* genas koduoja baltymą, susijusį su kraujo grupės pasireiškimu. 0 kraujo grupė susiformuoja, kai koduojamos DNR 258 pozicijoje įvyksta guanino delecija šalia baltymo N-galo. To pasėkoje įvyksta rėmelio poslinkio mutacija ir beveik visiškai kitokio baltymo transliacija (70). Ant raudonųjų kraujo kūnelių paviršiaus, AB0 kraujo grupė turi specifinius karbohidrato antigenus: A, B ir H. A, B ir AB kraujo grupę turinčių žmonių kraujyje vyksta glikoziltransferazės raiška, kuri paverčia H antigeną į A antigeną (prijungiant uridin-difosfato-n-acetilgalaktosaminą (UDP-GalNAc)) arba į B antigeną (prijungiant uridin-difosfato galaktozę (UDP-Gal)) (71). Abi šios grupės yra paremtos H antigenu – jei H antigenas yra nemodifikuojamas, tuomet įtakojama 0 kraujo grupės formavimasis, nes nei A, nei B antigenas negali prisijungti prie eritrocitų (72). AB0 kraujo grupių sistemoje gali susidaryti 6 genotipai ir 4 fenotipai. Fenotipas parodo, kokių antigenų raiška vyksta ant raudonųjų kraujo kūnelių paviršiaus, o genotipas – geną, kuris įtakoja antigenus (73).

AB0 kraujo grupių sistema yra paveldima autosominiu kodominantiniu būdu. Kodominantinis paveldėjimas – tai paveldėjimas, kuomet dviejų skirtingų geno alelių raiška vyksta kartu ir kiekvieno alelio raiška įtakoja skirtingų baltymų susidarymą. A ir B aleliai yra kodominantiniai ir dominantiniai 0 alelio atžvilgiu, o 0 alelis – recesyvusis (72).

Manoma, kad europiečių ir lietuvių AB0 kraujo grupių sistemos dažnis yra panašus: 0 (I) kraujo grupę turi 40,1 %, A (II) – 43,7 %, B (III) – 11,1%, AB (IV) – 5,0 % (74).

Kraujo grupė gali būti nustatyta naudojant serologinius testus. Jie yra patikimi identifikuojant asmens kraujo grupės tipą (pvz., kraujo grupė A), kuris yra reikalingas atliekant kraujo donorystę. Taip pat galima naudoti molekulinis genetinius tyrimus nustatant asmens AB0 genotipą (pvz., A0 ar AA). Tai yra naudinga atliekant tyrimus, kuomet norima

nustatyti AB0 kraujo grupių sistemos ryšį su tam tikra liga, taip pat šis metodas naudojamas teismo medicinoje (75).

Vis dėl to, nepaisant akivaizdžios klinikinės svarbos (pvz., kraujo perpylimas), AB0 kraujo grupių sistemos antigenų fiziologinė funkcija lieka neaiški. Žmonės paveldėję 0 kraujo grupę neekspresuoja nei A, nei B antigenų ir yra sveiki ar net pasižymi atsparumu ar polinkius tam tikroms ligoms (20, 76).

#### 1.4.1. AB0 kraujo grupių sistema ir piktybiniai navikai

Pastebėta, kad AB0 antigenai gali pradėti veikti kaip vėžio žymenys – jų raiška sumažėja esant tam tikroms ligoms (pvz., mieloidinės leukemijos atveju). Taigi, gali atrodyti, kad asmens kraujo grupė pasikeitė (77).

Daugelis asociacijų buvo nustatyta tarp tam tikro AB0 fenotipo ir padidėjusios rizikos sirgti specifine liga taip pat ir vėžiu (20, 76). A kraujo grupę turintys asmenys dažniau serga skrandžio vėžiu (76), ši kraujo grupė siejama su didesniu mirtingumu nuo šlapimo pūslės vėžio (78). Kita tyrėjų grupė rado, kad kasos vėžys dažniau išsivysto turintiems B kraujo grupę (79). Taip pat B kraujo grupė siejama su didesne šlapimo pūslės ir inkstų vėžio metastazavimo į limfinius mazgus bei išplitimo į minkštuosius audinius rizika (69). Tuo tarpu 0 kraujo grupę turintiems asmenims būdinga mažesnė rizika išsivystyti vėžiui kaip ir tromboembolinei ligai (80, 81). Be to, 0 kraujo grupė susijusi su mažesne inkstų vėžio metastazavimo į limfinius mazgus rizika (82). 0, A ir B kraujo grupę turintys vyrai geriau reaguoja į gydymą nuo prostatos vėžio bei ilgiau išgyvena po jo (83, 84). Taipogi, 0 kraujo grupę turintiems vyrams mažiau nustatoma komplikacijų susijusių su venų tromboemboline liga po prostatektomijos (85).

#### 1.4.2. AB0 kraujo grupių sistema, koronarinė arterijų liga ir senėjimas

Pastebėtas tiesioginis ryšys tarp A kraujo grupės ir plazmos lipidų kiekio, siejamo su aterosklerozės raida (86, 87, 88). Be to, 0 kraujo grupė yra apsaugantis nuo aterogenezės faktorius (87, 88).

Lietuvoje atlikti tyrimai rodo, kad B kraujo grupę turintiems jaunesniems nei 45 metai vyrams, dažniau nustatoma KAL, nei turintiems 0 kraujo grupę (89). Taipogi, tarp sergančių vainikinių arterijų ateroskleroze moterų B kraujo grupė nustatoma dažniau, o 0 kraujo grupė rečiau negu sveikų kraujo donorų ir ilgaamžių moterų populiacijose (18, 19).



Ištirus šimtamečių japonų populiaciją, rasta priklausomybė su B kraujo grupe. Ši mokslininkų grupė teigia, kad japonų populiacijoje B kraujo grupę turintys asmenys dažniau išgyvena su amžiumi susijusias ligas nei jų išvengia, todėl B kraujo grupė nėra ilgaamžiškumo žymuo (90).

Lietuvoje atlikti tyrimai ieškant ryšio tarp ilgaamžiškumo ir AB0 kraujo grupių sistemos parodė, kad dažniausiai ilgaamžių grupėje nustatyta A kraujo grupė (18, 19).

### 1.5. Vitaminą D prijungiantis baltymas

Vitaminą D prijungiantis baltymas (VDPB) yra glikoproteinas, kitaip literatūroje dar vadinamas grupei specifinis komponentas (angl. *Group specific component*, Gc). Jis yra apie 52 kD dydžio ir priklauso albuminų genų šeimai (91). Disulfidiniai tilteliai padeda sudaryti dvigubas kilpas, kurios suformuoja tris labai konservatyvius domenus (92). VDPB koduoja GC genas, kuris yra 4q13.3 pozicijoje. Geną sudaro 15 egzonų. Vitaminą D prijungiantis baltymas yra daugiafunkcis glikobaltymas, randamas plazmoje, ascitiniame skystyje, smegenų likvoroje ir ant daugelio tipų ląstelių paviršiaus. Jis atsakingas už vitamino D ir jo plazmos metabolitų pernešimą į audinius, makrofagų aktyvaciją, aktino prisijungimą ir riebiųjų rūgščių prisijungimą (93, 94). VDPB veikia per jungimosi vietą, sudarytą iš hidrofobinių liekanų, leidžiančių sąveikauti su vitamino D<sub>3</sub> ligandu. Taip pat vitaminą D prijungiantis baltymas gali veikti per ląstelinį receptorių (93).

11 egzone nustatyti du „missense“ mutacijų tipo variantai. Šie variantai yra vieno nukleotido polimorfizmai (VNP) – rs7041 ir rs4588, įtakoiantys vitamino D metabolizmą (95). Alternatyvaus brendimo (angl. *Splicing*) metu susidarantys transkriptų variantai koduoja skirtingas izoformas – Gc1f, Gc1s ir Gc2 (1 lentelė) (94). Rs7041 atveju koduojamos DNR 1296 pozicijoje įvyksta timino (T) pokytis į guaniną (G), ko pasekoje pasikeičia ir baltymo struktūra – 432 pozicijoje apsarto rūgštis (Asp) pakeičiama į glutamo rūgštį (Glu). Rs4588 atveju DNR lygmenyje 1307 pozicijoje citozinas (C) pasikeičia adeninu (A), o baltymo lygmenyje – 436 pozicijoje treoninas (Thr) virsta lizinu (Lys). Atitinkama dviejų VNP kombinacija įtakoja skirtingų izoformų susidarymą (95).

**1 lentelė.** VDPB izoformos ir galimi fenotipai

GC genas		
VNP	Genotipas	Fenotipas
rs7041 T (Asp) rs4588 C (Thr)	Gc1f	Gc1f-1f Gc1f-1s
rs7041 G (Glu) rs4588 C (Thr)	Gc1s	Gc1f-2 Gc1s-1s Gc1s-2
rs7041 G (Glu) rs4588 A (Lys)	Gc2	Gc2-2

VDPB analizė parodė, kad baltymas yra sudarytas iš vienos polipeptidinės grandinės. Skirtumai tarp Gc1 greitojo (angl. *Fast*, Gc1f) ir Gc1 lėtojo variantų (angl. *Slow*, Gc1s) atsiranda potransliaciniame lygmenyje, taip pat juos įtakoja ir karbohidrato pokyčiai. Gc1 ir Gc2 skirtumai yra susiję su pirminėmis jų baltymo struktūromis (96).

Vitaminą D prijungiančio baltymo paplitimas geografiniu atžvilgiu skiriasi. Baltaodžių populiacijose Gc1f alelio dažnis yra mažesnis, o Gc1s alelis paplitęs dažniau. Taip pat tarp baltaodžių dažniau paplitęs Gc2 alelis nei tarp juodaodžių. Gc1f alelis yra dažnesnis tarp juodaodžių amerikiečių nei tarp juodaodžių afrikiečių (97). VDPB fenotipų dažnis Lietuvos populiacijoje (tirta 306 kraujo donorai): Gc1s-1s – 38,2 %, Gc1s-1f – 9,8 %, Gc1s-2 – 38,9 %, Gc1f-1f – 0,3 %, Gc1f-2 – 5,5 %, Gc2-2 – 7,2 % (15). Gc alelių dažnių skirtumai skirtingose geografinėse zonose yra susiję su odos pigmentacija ir gaunamos saulės šviesos intensyvumu (91). Nors kiti šaltiniai teigia, kad VDPB bei vitamino D koncentracija plazmoje priklauso nuo VDPB fenotipo ir šis ryšys išlieka nepriklausomai nuo metų sezono, buvimo saulės spinduliuose, odos storio, vitamino D papildų naudojimo, rūkymo įpročių bei kūno masės indekso (14, 98).

Nustatyta, kad Gc genotipai yra susiję su skirtingais cirkuliuojančio VDPB kiekiais ir, kad jie yra priklausomi nuo bendro cirkuliuojančio 25 hidroksivitamino D (25(OH)D) kiekio (99). Gc1f alelis siejamas su sumažėjusiu, o Gc2 – su didesniu VDPB kiekiu, tiek baltaodžių, tiek juodaodžių populiacijose (97). Buvo nustatyta koreliacija tarp Gc izoformų ir moteriškos lyties asmenų – Gc2-2 fenotipą turinčios moterų kraujyje vitamino D koncentracija buvo mažiausia, o Gc1s-1s fenotipą turinčių – didžiausia (14).

Vitamino D trūkumas siejamas ir su lėtinėmis ligomis. Tyrimai parodė, kad ypač lėtinė obstrukcinė plaučių liga ir sunkūs jos variantai siejami su rs7041 polimorfizmu (100). VDPB gali būti neaiškios kilmės placentos disfunkcijos veiksnys, kai placentos disfunkcija susijusiai su idiopatinio vaisiaus augimo sutrikimu ir gali būti pasirenkamas žymeniu šios ligos nustatymui (101). Gc1f-1f fenotipas siejamas su metaboliniu sindromu, išsivystančiu

moterims esant policistiniam kiaušidžių sindromui ir esant mažesniai 25(OH)D kiekiui kraujo serume (102).

#### 1.5.1. Vitaminas D, piktybiniai navikai, aterosklerozė ir senėjimas

Vitaminą D prijungiantis baltymas sudaro kompleksą su makrofagus aktyvuojančiu faktoriumi (VDPB-maf). Susiformavęs kompleksas yra stiprus vėžio augimo inhibitorius. Jis veikia netiesiogiai, padidėjus imuniniam atsakui aktyvuojami makrofagai ir inhibuojama neoangiogenezė, kuri svarbi vėžio vystymuisi. Neseniai buvo nustatytas tiesioginis VDPB-maf veikimo mechanizmas neaktyvinant makrofagų. Šis kompleksas per urokinazės plazminogeno aktyvatoriaus receptorių (angl. *Urokinase plasminogen activator receptor*) slopina vėžinių ląstelių proliferaciją ir metastazavimą (103). Be to, biologiškai aktyvi vitamino D forma (1,25-dihidroksivitamino D) inhibuoja vėžinių ląstelių proliferaciją, angiogenezę bei indukuoja apoptozę ir diferenciaciją (104).

Tyrimai rodo ryšį tarp vitamino D koncentracijos kraujyje ir prostatos vėžio. VDPB vieno nukleotido polimorfizmų (rs4588 ir rs7041) analizė parodė, kad jie yra susiję su padidėjusia prostatos vėžio rizika (105). Tuo tarpu ryšio tarp vitamino D koncentracijos kraujyje ir vyrų gaunamo saulės kiekio nenustatyta (105, 106). Esant žemai 25(OH)D koncentracijai ir aukštam serumo VDPB kiekiui mažėja rizika susirgti prostatos vėžiu (107, 108, 109). Tačiau didelis cirkuliuojantis VDPB kiekis nėra siejamas su sumažėjusia prostatos vėžio rizika juodaodžių vyrų populiacijoje (nepriklausomai nuo 25(OH)D kiekio) (110). Esant didesnei 25(OH)D koncentracijai kraujyje nustatyta mažesnė rizika susirgti šlapimo pūslės vėžiu vyrų grupėje (111). Kiti tyrėjai teigia, kad VDPB galėtų būti ankstyvos šlapimo sistemos vėžio diagnostikos ir stebėjimo žymeniu (112). Taip pat pastebėta patikima asociacija tarp didesnio cirkuliuojančio VDPB kiekio kraujyje ir mažesnės inkstų vėžio rizikos (113).

Skiriamas terapiniais tikslais vitaminas D<sub>3</sub> palaiko reikiamą vitamino D kiekį kraujo serume, gerina baltymų homeostazės ir lėtina senėjimo procesus (114). Žema 25(OH)D koncentracija kraujo serume įtakoja didesnę nuo širdies ir kraujagyslių ligų, vėžio bei nuo infekcijos priklausomą mirtingumą (12, 13, 114). Lietuvos ilgaamžių populiacijos tyrimai parodė, kad ilgaamžių grupėje aiškiai dažniau nustatomas Gc2-2 vitamino D prijungiančio baltymo variantas, lyginant su sergančiais vainikinių arterijų aterosklerozė. Tyrimai Lietuvoje atskleidė – sergantieji KAL dažniau turėjo Gc1s-1s fenotipą ir Gc1s alelį. Taip pat, Gc1s – didina, o Gc2 mažina KAL riziką (15).

Vitamino D trūkumas siejamas su arterijos intimos – vidinio sluoksnio suplonėjimu bei koronarine kalcifikacija, miokardo infarktu ir širdies sutrikimais. Tai sietina su vitamino D dalyvavimu uždegiminiuose, ląstelių proliferacijos, diferenciacijos procesuose ir su ekspresuojamu vitamino D receptoriumi. Pastarojo raiška nustatoma ant daugelio ląstelių paviršiaus, įskaitant miocitus, kraujagyslių raumeninio sluoksnio ląsteles ir endotelio ląsteles (115).

## 2. TYRIMO EIGA

Pradedant magistro praktinius darbus pirmiausia buvo pasirašytas Nacionalinio vėžio instituto darbuotojų, doktorantų ir kitų asmenų paskirtų į institutą praktikai, stažuotei ar kitai veiklai atlikti konfidencialumo pasižadėjimas.

Magistro studijų metu, 2016 metų pradžioje buvo publikuotas straipsnis „*Investigation of Vitamin D-Binding Protein Polymorphism Impact on Coronary Artery Disease and Relationship with Longevity: Own Data and a Review*“, kurio rengime dalyvavau ir esu bendraautorė (15, 3 priedas). Šiame straipsnyje pateikti VDPB polimorfizmo tyrimo duomenys ilgaamžių, kraujo donorų bei koronarine arterijų liga sergančiųjų asmenų Lietuvos populiacijoje. Publikacijos duomenys naudojami darbe, kur ilgaamžių imtis padidinta, jų kraujo ėminius pavyzdžius renkant magistrantūros metu.

Darbe naudoti urogenitalinės sistemos vėžiu sergančiųjų asmenų, kurie buvo gydyti 2005–2015 metais Nacionalinio vėžio instituto Onkourologijos skyriuje. Duomenys gauti iš informacinės sistemos (NVI IS) duomenų bazės (klinikos vadovas dr. Albertas Ulys). Duomenys tirti šių vėžio lokalizacijų asmenų grupėse: prostatos, inkstų ir šlapimo pūslės vėžiu sergantieji. Atrenkant pacientus buvo naudoti šie duomenų kriterijai: lytis, kraujo grupė, amžius, diagnozės pirmo karto nustatymo data, ligos kodai (pagal tarptautinę ligų klasifikaciją (TLK-10). Duomenys pateikti taip, kad nebūtų atskleista asmens informacija, kuri leistų identifikuoti pacientą. Gauti duomenys buvo apdorojami bei suskirstomi į pogrupius. Šiose grupėse buvo atlikta statistinė duomenų analizė.

Baigiamojo magistro darbo praktinė – laboratorinė dalis buvo atliekama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje. Tyrimui vykdyti gautas Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas (protokolo Nr. BE-2-10).

ABO kraujo grupės ir VDPB polimorfizmo variantai buvo tiriami ligoniams, kuriems atlikta kataraktos operacija. Pacientų atrankos kriterijai – amžius  $\geq 80$  metų, ligos istorija (nesergantys navikais). Ši ilgaamžių grupė renkama bendradarbiaujant su LSMU ligoninės

Kauno klinikų Akių ligų klinikos gydytojais. Klinikoje iš ligonių gautas raštiškas informuoto asmens sutikimas (1 priedas), prieš tai jiems suteikus informaciją apie vykdomą tyrimą (2 priedas). Iš paciento buvo imamas kraujo mėginys kraujo grupei nustatyti, bei iš likutinio kraujo gryninama DNR, matuojama jos koncentracija ir švarumas. Mėginiams, kurių DNR koncentracija buvo per aukšta, buvo gaminami darbiniai tirpalai (10 ng/μl). Vieno nukleotido polimorfizmai toliau buvo analizuojami tikro laiko PGR metodu, naudojant tam pritaikytą laboratorijos metodiką (skirtą *TaqMan* pradmenų ir zondų mišinio analizei) bei analizei PGR aparatą. Gauti tyrimų duomenys apdoroti statistinės analizės metodais.

**Ilgaamžių atrinkimo metodika.** Pagal Pasaulio sveikatos organizacijos duomenis ilgaamžis yra 90 metų ir vyresnis žmogus, o senas žmogus yra tarp 75 ir 90 metų. Šiame tyrime ilgaamžių (seniausių žmonių) (angl. *Oldest old*) grupę sudaro 80 metų ir vyresni asmenys (116). Ši grupė buvo pavadinta ilgaamžių, nes tai senų žmonių grupė, esanti sveika pagal savo amžių.

### 3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

#### 3.1. Darbo apimtis

Kontrolinė kraujo donorų grupė sudaro 595 asmenys (amžius tarp 19 ir 52 metų), atsitiktinai atrinktais iš Nacionalinio kraujo centro. Ši grupė suskirstyta pagal AB0 kraujo grupių sistemą.

Koronarine arterijų liga sergančiųjų grupę sudaro 464 asmenys, sugrupuoti pagal amžių ( $\leq 45$  metai ir  $> 45$  metai) ir AB0 kraujo grupių sistemą.

Urogenitalinės sistemos vėžiu sergančiųjų asmenų grupės buvo šios: 1) sergantieji prostatos vėžiu ( $n = 2200$ ), 2) sergantieji inkstų vėžiu ( $n = 2650$ ) ir 3) sergantieji šlapimo pūslės vėžiu ( $n = 1530$ ). Analizuojant AB0 kraujo grupių pasiskirstymą tirtose ligonių grupėse, duomenys dar buvo suskirstyti į pogrupius pagal amžių ( $< 60$  metų ir  $\geq 60$  metų). Inkstų ir šlapimo pūslės vėžiu sergančių grupės buvo suskirstytos ir pagal lytį. Inkstų vėžiu sergančių moterų grupę sudaro 1097 tiriamosios, vyrų – 1553 tiriamieji, šlapimo pūslės vėžiu sergančiųjų moterų buvo 329, vyrų – 1201. Visi sergantieji tirtų lokalizacijų vėžiu buvo suaugę, t.y. vyresni nei 18 metų amžiaus.

Darbe analizuotą ilgaamžių grupę sudarė 154 asmenys (36 iš jų papildomai buvo įtraukti po kataraktos operacijos, o 118-os duomenys buvo panaudoti iš publikacijos (amžius tarp 85 ir 102 metų)) (15). Gavus pasirašytą informuoto sutikimo formą, sergantiesiems

katarakta buvo paimamas kraujas, nustatoma kraujo grupė (serologiniu metodu), iš kraujo mėginio išgryninama DNR ir tikro laiko PGR metodu genotipuojamas VDPB polimorfizmas.

### 3.2. AB0 kraujo grupių sistemos tyrimas

AB0 kraujo grupių sistema buvo nustatoma serologiniu metodu. Serologinio tyrimo metu identifikuojami antikūnai serume. Žmogaus kraujyje yra kelių tipų antigenai (pvz., A ir B) ir antikūnai (pvz., A ir B). Antigenai yra randami eritrocitų paviršiuje, o antikūnai – serume. Priklausomai nuo kraujyje esančių antigenų yra išskiriamos keturios kraujo grupės (AB0 kraujo grupių sistema) (117). Skirtingos technikos yra naudojamos ištirti antikūnus. Šis tyrimas paremtas agliutinacijos reakcija – vykstant antikūnų ir antigenų sąveikai korpuskuliniai antigenai sulimpa ir susidaro nuosėdos – agliutinatai, kurie matomi plika akimi (117, 118).

#### 3.2.1. Tyrimui naudota įranga

1. Vienkartinė horizontali „Hydrex“ plokštelė (Hydrex Diagnostics, Lenkija).
2. 3 ml vienkartinės Pastero pipetės (Nerbe Plus, Vokietija).

#### 3.2.2. Tyrimui naudoti reagentai

1. IgM seroklonai Anti-A (ABO1) (BioRad Medical Diagnostics, Vokietija).
2. IgM seroklonai Anti-B (ABO2) (BioRad Medical Diagnostics, Vokietija).

#### 3.2.3. Tyrimo metodika

1. Ant vienkartinės plokštelės užlašinami du lašai seroklonų.
2. Kraujo mėginys papipetuojamas ir užlašinamas vienas lašas ant seroklonų suspensijos (seroklonų ir kraujo santykis 2:1).
3. Plokštelė švelniai purtoma, kol įvyksta agliutinacija.
4. Vertinami rezultatai (2 lentelė).

**2 lentelė.** Agliutinacijos rezultatų vertinimas: agliutinacija neįvyko (-) ar agliutinacija įvyko (+)

Eritrocitų sąveika su		Eritrocitų fenotipas
Anti-A	Anti-B	
-	-	O
+	-	A
-	+	B
+	+	AB

### 3.3. DNR gryninimo iš periferinio kraujo tyrimas

Žmogaus genomo gryninimas yra labai svarbus žingsnis molekulinės biologijos mokslo srityje. Atrasta keletas metodų, leidžiančių išgryninti DNR iš kraujo. Buvo pasirinktas „*Thermo Scientific GeneJET*“ genominės DNR gryninimo rinkinys. Šiame rinkinyje naudojamos kvarcinės (angl. *Silica-based*) kolonėlės (membranos), paremtos DNR molekulių adsorbicija kolonėlėje. Tai greitas ir efektyvus metodas išgryninti aukštos kokybės ( $A_{260/280} \geq 1,7$ , daugiau nei 30 kb dydžio) DNR (119).

#### 3.3.1. Tyrimui naudota įranga

1. *Eppendorf* tipo mėgintuvėliai 1,5–2 ml.
2. Automatinės pipetės „*Eppendorf research*“ 100  $\mu$ l–1000  $\mu$ l (*Eppendorf AG*, Vokietija).
3. Centrifuga „*Eppendorf Centrifuge 5424*“ (*Eppendorf AG*, Vokietija).
4. Antgaliai 10–100  $\mu$ l, 100–1000  $\mu$ l.
5. Purtyklė „*IKA MS 3 basic*“ (*IKA*, JAV).
6. Purtanti, šildanti vandens vonelė „*GFL 1083*“ (*GFL*, Vokietija).

#### 3.3.2. Tyrimui naudoti reagentai

1. 96 % etilo alkoholis (A.B. Stumbras, Lietuva).

#### 3.3.3. Tyrimo metodika

1. Įpilama 400  $\mu$ l Lysis buferio ir 20  $\mu$ l proteinazės K į 200  $\mu$ l kraujo mėginio.
2. Sumaišoma ir inkubuojama 10 min. 56 °C temperatūroje. Retkarčiais suvartoma.
3. Įpilama 200  $\mu$ l etanolio (96–100 %) ir sumaišoma.

4. Parengtas mišinys perkeliamas ant kolonėlės, kuri įstatyta į surenkamąjį mėgintuvėlį. Centrifuguojama 1 min. 6000 x g. Pakeičiamas surenkamasis į 2 ml mėgintuvėlį.
5. Įpilama 500 µl plovimo buferio I (pirmą kartą naudojant buferis praskiedžiamas etanoliu). Centrifuguojama 1 min. 8000 x g. Išpilamas skystis iš surenkamojo mėgintuvėlio.
6. Įpilama 500 µl plovimo buferio II (pirmą kartą naudojant buferis praskiedžiamas etanoliu). Centrifuguojama maksimaliu greičiu 3 min. Pakeičiamas surenkamasis į 1,5 ml mėgintuvėlį.
7. Įpilama 200 µl eliucijos buferio. Inkubuojama 2 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama 1 min. 8000 x g. Išmetama kolonėlė.
8. Išmatuojama išgrynintos DNR koncentracija bei švarumas. Užšaldoma -20 °C.

#### 3.3.4. DNR koncentracijos ir švarumo įvertinimas bekiuvečiu spektrofotometru

DNR koncentracija ir švarumas yra svarbus kriterijus tolimesniems su genetinė medžiaga susijusiems tyrimams. Atliekant tikro laiko PGR metodą yra būtina žinoti tiriamųjų mėginių koncentracijas. DNR absorbuoja 230 nm, 260 nm ir 280 nm ilgio ultravioletinius spindulius. 260/280 rodmuo turi būti ~1,8, tada DNR yra laikoma švaria. Jei šis rodmuo yra žemesnis, tai mėginyje yra padidėjęs baltymų, fenolių ar kitų komponentų kiekis, kurie yra absorbuojami ties 280 nm ilgio banga. Taip pat DNR laikoma tinkama tyrimui, jei 260/230 rodmuo yra ~2,0–2,2.

Dvigrandės DNR koncentracija yra paskaičiuojama pagal formulę:  $CDNR (\mu\text{g/ml}) = D_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{praskiedimas} (120)$ .

##### 3.3.4.1. Tyrimui naudota įranga

1. Automatinės pipetės „Eppendorf research“ 0,5 µl–10 µl. (Eppendorf AG, Vokietija).
2. Antgaliai 0,5 µl–10 µl.
3. Bekiuvetis spektrofotometras „NanoDrop2000“ (Thermo Scientific, JAV).
4. Maišyklė „IKA MS 3 basic“ (IKA, JAV).
5. Popierinės servetėlės.



### 3.3.4.2. Tyrimui naudoti reagentai

1. 1 x TE buferis (Carl Roth GmbH + Co, Vokietija).

### 3.3.4.3. Tyrimo metodika

1. Išimamas iš šaldytuvo (tirpalas turi būti kambario temperatūros) matuojamas DNR tirpalas.
2. Maišykle švelniai pamaišomas.
3. Užlašinamas 1  $\mu$ l 1 x TE tirpalas ir sukalibruojamas (angl. *Blank*) aparatas (matuojant koncentraciją ir švarumą, šį procesą reikia pakartoti kas 30 min.). Aparatas nuvalomas.
4. Įvedamas mėginio kodas į tam skirtą langelį, tuomet užlašinama 1  $\mu$ l DNR mėginio.

### 3.4. Tikro laiko PGR kiekybinės analizės metodas

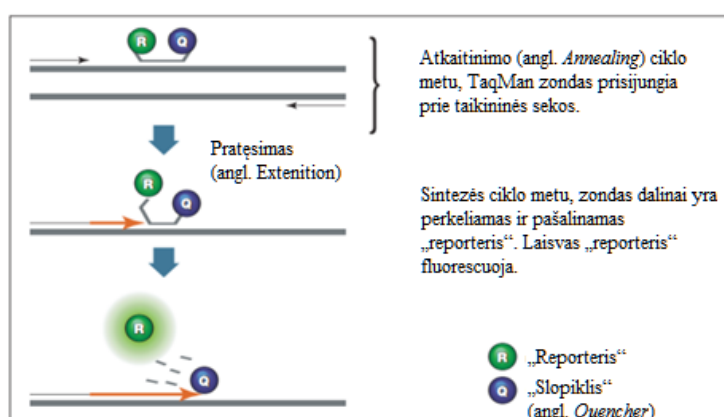
Tikro laiko PGR metodas yra plačiai naudojamas molekulinės biologijos tyrimų laboratorijose. Metodas paremtas polimerazės grandine reakcija, taikoma amplifikuoti ir tuo pačiu metu nustatyti DNR molekulę ar apskaičiuoti jos kiekį (121). Šio baigiamojo darbo metu atliekamas genotipavimas.

Vykdamas tikro laiko PGR metodą yra dauginama DNR. Tai įvyksta kiekvieno ciklo eigoje (vieno ciklo metu DNR pagausėja du kartus). Ciklų metu yra parenkama skirtinga temperatūra (ji yra didinama ir sumažinama) ir ciklai yra kartojami apie 40 kartų. Viename cikle vyksta trys etapai:

1. Denatūracija. Pirmiausiai yra atskiriamos mėginio DNR grandinės, vėliau tarnaujančios kaip matrica DNR sintezei.
2. Hibridizacija – „atkaitinimas“ (angl. *Annealing*). Pradmenys prisijungia prie jiems komplementarių grandinės sričių.
3. Sintezė. Pradedant nuo pradmenų prisijungimo vietos sintetinama nauja DNR grandinės kopija (122).

Tyrimo metu naudojama TaqMan® mišinys. Fluorescencinėmis žymėmis žymėtų oligonukleotidų (*TaqMan*) veikimas paremtas zondais. Zondais žymėti pradmenys naudojami gausinti DNR sekai. Gausinimas paremtas hidrolize, veikiant termostabilių DNR polimerazių 5' egzonukleaziniam aktyvumui (Taq). PGR metu pradmuo su fluorescuojančia žyme

specifiškai jungiasi prie gausinamos sekos fragmento. DNR sekos sintezės metu žymuo yra nuskeliamas termostabilios DNR polimerazės 5' egzozonukleazinio aktyvumo. Nuskėlus žymenį, fluorofortas (angl. *Fluorophore*), vadinamas „reporteriu“ (angl. *Reporter*) nutolsta nuo „slopiklio“ (angl. *Quencher*), kuris, būdamas greta, slopina fluorescenciją. Kol abu fluorescenciniai dažai yra prisitvirtinę skirtinguose zondo galuose, fluorescencija nevyksta („slopiklis“ slopina „reporterio“ emisiją). Prasidėjus PGR amplifikacijai, DNR polimerazė suskaldo zondą (dėl savo 5'→3' egzozonukleazinio aktyvumo) ir atsiskyres „reporteris“ sukelia fluorescencinį signalą, kurio intensyvumas proporcingas amplifikuoto produkto kiekiui. Signalo stiprumas didėja proporcingai gausinamų fragmentų kiekiui (1 pav.) (123).



1 pav. TaqMan mišinio veikimas (123)

#### 3.4.1. Tyrimui naudota įranga

1. Šaldiklis -20 °C, 4 °C (Tritec, Hannover, Vokietija).
2. Tikro laiko termocikleris „*Applied Biosystems 7900 Fast Real-Time PCR System*“ (Applied Biosystems, JAV).
3. Centrifuga „*Eppendorf Centrifuge 5424*“ (Eppendorf AG, Vokietija).
4. Vertikalaus srauto laminaras „*Airstream Class II biohazard Safety Cabinet*“ (ESCO, Singapūras).
5. Reguliuojamos temperatūros centrifuga „*Eppendorf 5430 R*“ (Eppendorf AG, Vokietija).
6. Reguliuojama purtyklė „*IKA MS3 Basic Shaker vortex*“ (IKA, Vokietija).
7. Automatinės pipetės „*Eppendorf research*“ (0,5–10 μl, 10–100 μl, 100–1000μl) (Eppendorf AG, Vokietija).

### 3.4.2. Tyrimui naudoti reagentai

1. *TaqMan* universalus pagrindinis mišinys II be UNG (angl. *MasterMix – II, no UNG 2 x*) (Applied Biosystems, USA).
2. Be DN – azių sterilus vanduo (Applied Biosystems, USA).
3. Pradmenys (20 x):
  - a. rs7041 (Applied Biosystems, USA);
  - b. rs4588 (Applied Biosystems, USA).

### 3.4.3. Tyrimo metodika

1. Atsirenkami mėginiai.
2. Kiekvienam polimorfizmui gaminami atskiri pagrindiniai mišiniai (angl. *Master Mix*). Laminare imamas 1 ml mėgintuvėlis, į kurį pilamas:
  - a. *TaqMan* universalus pagrindinis mišinys II be UNG (vienam šulinėliui reikalinga 5 µl);
  - b. Be DN-azių sterilaus vandens (vienam šulinėliui reikalinga 3 µl);
  - c. Pradmens (20 x) (vienam šulinėliui reikalinga 0,5 µl).
3. Imama 96 šulinėlių plokštelė. Į vieną šulinėlį pilama 8,5 µl supurtyto pagrindinio mišinio.
4. Pilama 2 µl supurtyto DNR mėginio (10 ng/µl) į atitinkamą šulinėlį. Paliekami 3 šulinėliai be DNR, kaip neigiama kontrolė.
5. PGR plokštelė kruopščiai užklijuojama specialia skaidria lipnia plėvele.
6. Plokštelė centrifuguojama 10 s. 10 000 aps. greičiu.
7. Nucentrifuguota plokštelė dedama į tikro laiko PGR aparatą, kur nustatomos reakcijos sąlygos:
  - a. 1 etapas – 95 °C temperatūra 10 min.;
  - b. 2 etapas – 40 ciklą:
    - i. 95 °C temperatūra 15 s.;
    - ii. 60 °C temperatūra 90 s.;
  - c. 4 etapas – 4 °C temperatūra ∞ s.
8. Analizuojami duomenys.

### 3.5. Klasterinė analizė

Klasterinė analizė priskiriama daugiamačių duomenų analizės metodams. Šios grupės metodai padeda įvertinti ar nustatyti daugiamačių duomenų struktūrą, šiuo atveju susidariusias grupes – klasterius. Klasterizavimas (angl. *Clustering*) – tai analizuojamų objektų skirstymas į skirtingus klasterius. Šių klasterių objektai panašūs tarpusavyje, tačiau objektai, esantys skirtinguose klasteriuose, yra skirtingi.

Daugiamačius duomenis klasterizuojant bei vizualizuojant, svarbu nurodyti duomenų artimumo matą. Tyrime pasirinktas artimumo matas yra Euklido metrika, priklausanti Minkovskio metrikos grupei. Šioje metrikoje, jei yra fiksuotas skaičius  $q$ , atstumas tarp dviejų objektų  $X_k = (x_{k1}, x_{k2}, \dots, x_{kn})$  ir  $X_l = (x_{l1}, x_{l2}, \dots, x_{ln})$  apskaičiuojamas pagal formulę:

$d_q(X_k, X_l) = \{\sum_{j=1}^n |x_{kj} - x_{lj}|^q\}^{\frac{1}{q}}$ . Euklido metrikoje  $q=2$  ir atstumas apskaičiuojamas pagal

formulę:  $d_2(X_k, X_l) = \sqrt{\sum_{j=1}^n |x_{kj} - x_{lj}|^2}$ .

Minkovskio metrikoje, atstumas tarp dviejų objektų  $X_k$  ir  $X_l$ , turi tenkinti tam tikras sąlygas:

- $d(X_k, X_l)$  yra neneigiamas realus skaičius,  $d(X_k, X_l) = 0$ ;
- $d(X_k, X_l) = d(X_l, X_k)$ , tai yra atstumas nuo objekto  $X_k$  iki objekto  $X_l$  yra lygus atstumui nuo objekto  $X_l$  iki objekto  $X_k$ ;
- $d(X_k, X_l) \leq d(X_k, X_j) + d(X_j, X_l)$ , t.y. atstumas tarp bet kurių dviejų objektų  $X_k$  ir  $X_l$  negali būti didesnis nei tarp objektų  $X_k, X_j$  ir  $X_l, X_j$  atstumų suma (trikampio nelygybė) (124).

Dažniausiai klasterizavimo algoritmai skirstomi pagal savybes – ar skirstiniai sudaro hierarchiją ar ne. Jei atlikus klasterizavimą skirstiniai sudaro hierarchiją, tuomet jų algoritmai vadinami hierarchiniais (22). Duomenims analizuoti baigiamojo darbo metu taikomas hierarchinis klasterizavimas. Skirstant objektus į klasterius paprastai yra nežinoma, kiek klasterių egzistuoja analizuojamoje populiacijoje. Į kiekvieną klasterį objektai patenka pagal panašumą. Taip pat klasterių dydis gali skirtis. Hierarchinis klasterizavimo metodas paremtas dviejų mažų klasterių jungimu į vieną didesnę – jungimo metodas, arba didesni klasteriai skaidomi į keletą mažesnių – skaidymo metodas. Taikant šiuos metodus, nustatoma bendra visų klasterių tarpusavio priklausomybių struktūra ir tik po to sprendžiama, koks klasterių skaičius optimalus (23, 124).

Klasterių sujungimui naudojamas vienietinės jungties („artimiausio kaimyno“) metodas. Vienietinės jungties atstumas  $d(X_i, Y_j)$  (čia  $X_i \in A, Y_j \in B$ ) tarp dviejų klasterių  $A$  ir

$B$  apskaičiuojamas pagal formulę:  $d(A, B) = \min_{X_i \in A, Y_j \in B} d(X_i, Y_j)$  ( $X_i$  –  $i$ -asis  $A$  objektas,  $Y_j$  –  $j$ -asis  $A$  objektas) (124).

Hierarchinio klasterizavimo rezultatai pateikiami dendrograma, kuri parodo kaip arti duomenų elementai yra vieni nuo kitų. Dendrogramos ašyse atidedami objektų numeriai ir atstumai. Objektus jungianti linija (jos aukštis) rodo, kada objektai buvo sujungti ir koks atstumas tarp jų.

Neturint išankstinės informacijos apie nagrinėjamų duomenų struktūras, gautus rezultatus lyginti sunku, todėl objektų klasterizavimui rekomenduojama taikyti keletą klasterizavimo metodų (125).

### 3.6. Rezultatų statistinė analizė

Gauti AB0 kraujo grupių sistemos rezultatai apdorojami Šapiro ir Vilko testu (angl. *Shapiro-Wilk test*), tikrinama ar duomenys yra pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį. Įvertinti fenotipų dažnio skirtumus (ar panašumus) taikomas suderinamumo Pirsono (angl. Pearson)  $\chi^2$  kriterijus. Nustatyti asociacijai taikomas šansų santykis su 95 % pasikliautinoju intervalu. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių patvirtinamas, jei reikšmingumo lygmuo  $p < \alpha$ , kur  $\alpha = 0,05$ .

Ilgamžių genotipavimo rezultatams įvertinami buvo išsikeliama hipotezė –  $H_0$  populiacija yra Hardžio ir Vainbergo pusiausvyroje (angl. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HVP). HVP nusako kiekybinę ryšį tarp alelių ir genotipų dažnių bei duomenų pasiskirstymą populiacijoje. Įvertinti ar genotipų dažniai nenukrypsta nuo Hardžio ir Vainbergo pusiausvyros (angl. *Hardy-Weinberg Equilibrium*), taikomas suderinamumo Pirsono (angl. Pearson)  $\chi^2$  kriterijus arba tikslusis Fišerio testas (angl. *Fisher's exact test*) mažoms imtims ( $n < 20$ ). Jei  $\chi^2$  kriterijaus reikšmė didesnė nei kritinė reikšmė ar reikšmingumo lygmuo mažiau nei  $\alpha$ , tuomet  $H_0$  hipotezė atmetama (23).

VNP genotipavimo rezultatai buvo apdorojami SDS 2.3 programa. Genetinės distancijos nustatomos klasterine analize naudojant laisvai prieinamą PAST3 programinį paketą. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant laisvai prieinamą programinį R paketą (versija 3.3.3) ir Microsoft Excel programą.

## 4. TYRIMO REZULTATAI

### 4.1. AB0 kraujo grupių dažnio tyrimo rezultatai tirtose grupėse

Atlikus Šapiro ir Vilko testą (angl. *Shapiro-Wilk test*), gauti rezultatai parodė, kad AB0 kraujo grupių dažnio duomenys, lyginant su kraujo donorų, ilgaamžių ir urogenitalinės sistemos vėžiu sergančiųjų grupių duomenimis, neatitinka normaliojo skirstinio ( $p > 0,05$ ).

#### 4.1.1. AB0 kraujo grupių dažnio rezultatai tirtose bendrose kraujo donorų, ilgaamžių ir vėžiu sergančiųjų grupėse

AB0 kraujo grupių pasiskirstymas tirtose grupėse pateiktas 3 lentelėje.

**3 lentelė.** AB0 kraujo grupių dažnis tirtose bendrose pagal amžių grupėse.

Tirtos grupės	n	Kraujo grupė (% / n)			
		0	A	B	AB
Kraujo donorai	595	38,2 227	39,5 235	15,1 90	7,2 43
Prostatos vėžys	2200	36,0 792	37,3 821	19,2 422†	7,5 165
Inkstų vėžys	2650	37,4 990	38,2 1012‡	17,2 457‡	7,2 191
Šlapimo pūslės vėžys	1530	36,5 559	37,6 575†,‡	19,5 299†,‡	6,4 97
Ilgaamžiai	154	39,0 60	46,7 72	10,4 16	3,9 6

† – statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su kraujo donorais ( $p < 0,05$ ).

‡ – statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su ilgaamžiais ( $p < 0,05$ ).

Tyrimas rodo, kad Lietuvos populiacijoje A kraujo grupė yra nustatoma dažniausiai, o AB kraujo grupė yra rečiausia visose tirtose grupėse.

Lyginant bendros urogenitalinės sistemos vėžiu sergančiųjų grupės (prostatos, inkstų, šlapimo pūslės vėžiu sergančiųjų grupės sujungtos į vieną) kraujo grupių dažnį su jų dažniu kraujo donorų grupėje, A kraujo grupė nustatyta patikimai rečiau (atitinkamai 37,7 % ir 39,5 %,  $p < 0,03$ ), o B kraujo grupė statistiškai patikimai dažniau bendroje vėžiu sergančiųjų grupėje (18,6 % ir 15,1 %,  $p < 0,0001$ ). Statistiškai patikimo skirtumo tarp 0, AB kraujo grupių dažnio, lyginant kraujo donorų populiaciją ir bendrą urogenitalinės sistemos vėžio grupę, nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Lyginant bendros sergančiųjų urogenitalinės sistemos vėžiu grupės kraujo grupių dažnį su jų dažniu ilgaamžių populiacijoje, nustatyta, kad A kraujo grupės dažnis mažesnis vėžiu sergančiųjų grupėje (atitinkamai 37,7 % ir 46,7 %,  $p < 0,003$ ), o B kraujo grupės dažnis urogenitalinės sistemos vėžio bendroje grupėje dažnis yra didesnis nei ilgaamžių grupėje (atitinkamai 18,6 % ir 10,4 %,  $p < 0,0002$ ). Lyginant ilgaamžių populiaciją su bendra urogenitalinės sistemos vėžio grupe, statistiškai patikimų 0 ir AB kraujo grupių dažnio skirtumų nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Lietuvos populiacijoje tarp prostatos vėžiu sergančių vyrų patikimai dažniau nustatyta B kraujo grupė, lyginant su sveikais kraujo donorais (atitinkamai 19,2 % ir 15,1 %,  $p < 0,02$ ); lyginant 0, A ir AB kraujo grupių dažnį šiose grupėse patikimų skirtumų nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Lyginant prostatos vėžiu sergančiųjų grupės 0, A, B ir AB kraujo grupių dažnį su jų dažniu ilgaamžių populiacijoje skirtumo nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Lyginant inkstų vėžiu sergančiųjų kraujo grupių dažnį su jų dažniu kraujo donorų grupėje, AB0 kraujo grupių dažniai statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p > 0,05$ ).

Inkstų vėžio grupėje, lyginant su ilgaamžių populiacija, reikšmingai rečiau nustatyta A kraujo grupė (atitinkamai 38,2 % ir 46,7 %,  $p < 0,0001$ ), o B kraujo grupė – statistiškai patikimai dažniau (atitinkamai 17,2 % ir 10,4 %,  $p < 0,03$ ); 0 ir AB kraujo grupių dažnis inkstų vėžiu sergančiųjų grupėje statistiškai patikimai nesiskyrė nuo ilgaamžių kraujo grupių dažnio ( $p > 0,05$ ).

Statistiškai patikimas kraujo grupių dažnio skirtumas nustatytas lyginant šlapimo pūslės vėžio ir kraujo donorų populiacijas: A kraujo grupė patikimai rečiau pasitaikė šlapimo pūslės vėžiu sergančių grupėje (atitinkamai 38,2 % ir 39,5 %,  $p < 0,0001$ ), o B kraujo grupės dažnis buvo patikimai didesnis nei ilgaamžių grupėje (atitinkamai 19,5 % ir 15,1 %,  $p < 0,02$ ).

Lyginant AB0 kraujo grupių sistemos kraujo grupių dažnį šlapimo pūslės vėžio ir ilgaamžių grupėse, nustatyta, kad A kraujo grupės dažnis patikimai rečiau sutinkamas šlapimo pūslės vėžio grupėje (atitinkamai 38,2 % ir 46,7 %,  $p < 0,006$ ); B kraujo grupės dažnis šlapimo pūslės vėžio grupėje yra 19,5 %, o ilgaamžių grupėje – 10,4 % ( $p < 0,005$ ); lyginant šių asmenų grupių 0 ir AB kraujo grupių dažnį, statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

4.1.2. AB0 kraujo grupių dažnio tyrimo rezultatai pagal amžių tirtose vėžiu sirgusių vyrų ir moterų grupėse

AB0 kraujo grupių sistemos kraujo grupių dažniai tirtose vyrų grupėse pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Tirtos vėžiu sergančių vyrų grupės pagal amžių.

Vyrų tirtos grupės	Amžius	n	Kraujo grupė (% / n)			
			0	A	B	AB
<b>Kraujo donorai</b>	Bendra grupė	595	38,2 227	39,5 235	15,1 90	7,2 43
<b>Prostatos vėžys</b>	<60 metų	741	37,8 280	37,1 275	18,5 137	6,6 49
	≥60 metų	1459	35,1 512	37,4 546	19,5 285†	8 116
<b>Inkstų vėžys</b>	Bendra grupė	1553	37,7 586	39,3 610	16,2 251	6,8 106
	<60 metų	653	37,5 245	40,6 265	14,1 92	7,8 51
	≥60 metų	900	37,9 341	38,3 345	17,7 159	6,1 55
<b>Šlapimo pūslės vėžys</b>	Bendra grupė	1201	37,7 453	36,5 438	19,7 237†	6,1 73
	<60 metų	272	41,5 113	34,2 93	17,7 48	6,6 18
	≥60 metų	929	36,6 340	37,1 345	20,4 189†	5,9 55
<b>Ilgaamžiai</b>	≥80 metų	50	48,0 24	34,0 17	16,0 8	2,0 1

† – statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su kraujo donorais ( $p < 0,05$ ).

0, A ir AB kraujo grupių dažnis, lyginant jų dažnį prostatos vėžiu sergančių abiejų tirtų grupių ir kraujo donorų grupėje nesiskyrė ( $p > 0,05$ ). Sergančių priešinės liaukos vėžiu ≥60 metų vyrų, grupėje patikimai dažniau nustatytas B kraujo grupė lyginant su sveika kraujo donorų populiacija (atitinkamai 19,5 % ir 15,1 %,  $p < 0,02$ ).

Tirtų pagal amžių abiejų inkstų vėžiu sirgusių vyrų grupių AB0 kraujo grupių dažnis statistiškai reikšmingai nesiskyrė lyginant juos su jų dažniu kraujo donorų grupėje ( $p > 0,05$ ).

Lyginant šlapimo pūslės vėžiu sirgusių ir kraujo donorų grupes, nustatyta, kad B kraujo grupės dažnis yra didesnis sergančiųjų vėžiu grupėse: bendroje amžiaus grupėje B kraujo grupės dažnis patikimai didesnis (atitinkamai 19,7 % ir 15,1 %;  $p < 0,02$ ), o vėžiu sergančiųjų ≥60 metų amžiaus grupėje nustatytas statistiškai patikimas B kraujo grupės dažnis



skirtumas (atitinkamai 15,1 % ir 20,4 % ;  $p < 0,01$ ). Vyrų, sirgusių šlapimo pūslės vėžiu, ir kraujo donorų grupėse 0, A ir AB kraujo grupių dažnis nesiskyrė ( $p > 0,05$ ).

AB0 kraujo grupių sistemos kraujo grupių dažnio rezultatai tirtose vėžiu sirgusių moterų grupėse yra pateikti 5 lentelėje.

**5 lentelė.** Tirtos moterų grupės pagal amžių.

Moterų tiriamoji grupė	Amžius	N	Kraujo grupė (% / n)			
			0	A	B	AB
Kraujo donorai	Bendra grupė	595	38,2	39,5	15,1	7,2
			227	235	90	43
Inkstų vėžys	Bendra grupė	1097	36,8	36,7	18,8	7,7
	<60 metų	359	404	402‡	206‡	85
	≥60 metų	738	34,3	40,3	18,7	6,7
Šlapimo pūslės vėžys	Bendra grupė	329	123†	145	67	24
	<60 metų	68	38,2	41,2	14,7	5,9
	≥60 metų	261	26	28	10	4
Ilgaamžės	≥80 metų	104	30,7	41,7	19,9	7,7
			80†	109	52	20
			34,6	52,9	7,7	4,8
			36	55	8	5

† – statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su kraujo donorais ( $p < 0,05$ ).

‡ – statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su ilgaamžiais ( $p < 0,05$ ).

Sergančiųjų inkstų vėžiu moterų grupėje kraujo grupių dažnis, lyginant su sveikų kraujo donorų grupės dažniu, parodė, kad sirgusių inkstų vėžiu iki 60 metų moterų grupėje 0 kraujo grupė pasitaikė patikimai rečiau (atitinkamai 34,3 % ir 38,2 %,  $p < 0,0001$ ); lyginant šias grupes tarpusavyje, statistiškai reikšmingo A, B, AB kraujo grupių dažnio skirtumų nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Lyginant inkstų vėžiu sergančių moterų ir ilgaamžių grupes, nustatyta, kad A kraujo grupė aptinkama rečiau pasitaikė tarp sirgusių vėžiu moterų (atitinkamai bendroje amžiaus grupėje dažnis lygus 36,7 % ir 52,9 %,  $p < 0,002$ ). B kraujo grupė patikimai dažniau nustatyta inkstų vėžiu sirgusių moterų grupėje, lyginant su ilgaamžių grupe (bendroje amžiaus grupėje dažnis atitinkamai lygus 18,8 % ir 7,7 %,  $p < 0,003$ ). Lyginant šias tirtųjų grupes tarpusavyje, patikimo 0 ir AB kraujo grupių dažnio nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Lyginant šlapimo pūslės vėžiu sirgusių moterų ir kraujo donorų populiacijas, nustatyta, kad sergančių vėžiu 60 metų ir vyresnių moterų grupėje 0 kraujo grupės dažnis buvo patikimai retesnis sirgusių vėžiu grupėje (30,7 % ir 38,2 %,  $p < 0,04$ ). Lyginant sveikų

kraujo donorų populiacijos ir šlapimo pūslės vėžiu sergusių moterų grupes, A, B ir AB kraujo grupių dažnio skirtumų nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Sergančių šlapimo pūslės vėžiu grupėje statistiškai patikimai dažniau nustatyta B kraujo grupė, lyginant su jos dažniu ilgaamžių grupėje (atitinkamai 18,9 % ir 7,7 %,  $p < 0,006$ ). Lyginant inkstų vėžiu sergančiųjų ir ilgaamžių grupes, O, A ir AB kraujo grupių dažnio skirtumo nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2. AB0 kraujo grupių sistemos kraujo grupių šansų santykio analizės rezultatai

AB0 kraujo grupių sistemos ir inkstų vėžio šansų santykio tyrimo duomenų rezultatai pateikti 6 lentelė.

**6 lentelė.** šansų santykio analizės rezultatai.

Tiriamosios grupės	Lytis	Amžius	Kraujo grupė			
			0	A	B	AB
			ŠS PI 95%	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %
Inkstų vėžys	Bendra grupė	Bendra grupė	0,97 0,81–1,16	0,95 0,79–1,14	1,17 0,91–1,50	1,00 0,71–1,41
	Moterys	Bendra grupė	0,95 0,77–1,16	0,89 0,72–1,09	1,30 0,99–1,70	1,08 0,74–1,58
		<60 metų	0,84 0,64–1,11	1,04 0,80–1,36	1,29 0,91–1,82	0,92 0,55–1,54
		≥60 metų	1,00 0,80–1,25	0,82 0,66–1,02	1,30 0,97–1,74	1,16 0,77–1,74
	Vyrai	Bendra grupė	0,98 0,81–1,19	1,00 0,82–1,20	1,08 0,83–1,40	0,94 0,65–1,36
		<60 metų	0,97 0,77–1,22	1,05 0,83–1,31	0,92 0,67–1,26	1,09 0,71–1,66
		≥60 metų	0,99 0,80–1,22	0,95 0,77–1,18	1,05 0,79–1,40	0,84 0,55–1,26

ŠS – Šansų santykis

PI 95 % – Pasikliautinumo intervalas

Analizuojant gautus ŠS asociacijos duomenis, patikimo ryšio tarp inkstų vėžio ir AB0 kraujo grupių sistemos nenustatyta (tiek bendroje tiriamųjų, tiek atskirai vyrų ir moterų grupėse) ( $p > 0,05$ ).

ŠS analizės rezultatai pagal AB0 kraujo grupių sistemos kraujo grupes šlapimo pūslės vėžio grupėse pateikti 7 lentelėje.

**7 lentelė.** Šansų santykio analizės rezultatai šlapimo pūslės vėžiu sirgusių grupėse.

Tiriamosios grupės	Lytis	Amžius	Kraujo grupė			
			0	A	B	AB
			ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %
Šlapimo pūslės vėžys	Bendra grupė	Bendra grupė	0,93 0,77–1,13	0,60* 0,50–0,72	1,36* 1,05–1,76	0,87 0,60–1,26
	Moterys	Iš viso	0,77 0,58–1,02	1,09 0,83–1,44	1,30 0,91–1,86	1,01 0,60–1,70
		<60 metų	1,00 0,60–1,68	1,07 0,64–1,79	0,97 0,48–1,96	0,80 0,28–2,31
		≥60 metų	0,72* 0,52–0,98	1,10 0,82–1,48	1,40 0,96–2,04	1,07 0,61–1,85
	Vyrai	Bendra grupė	0,98 0,80–1,20	0,88 0,72–1,08	1,38* 1,06–1,80	0,83 0,56–1,23
		<60 metų	1,15 0,86–1,54	0,80 0,59–1,07	1,20 0,82–1,77	0,91 0,51–1,61
		≥60 metų	0,94 0,76–1,16	0,91 0,73–1,12	1,43* 1,09–1,89	0,81 0,53–1,22

\* statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su kraujo donorais ( $p < 0,05$ ).

Tyrimas parodė, kad 60 metų ir vyresnių moterų grupėje 0 kraujo grupės ŠS lygus 0,7 (PI 95 % = 0,53–0,98,  $p < 0,04$ ), t. y. ši grupė 0,7 karto mažina riziką sirgti šlapimo pūslės vėžiu. Taip pat ir A kraujo grupė 0,6 karto mažina riziką sirgti šlapimo pūslės vėžiu Lietuvos populiacijoje (PI 95 % = 0,50–0,72,  $p < 0,0001$ ). B kraujo grupė yra šlapimo pūslės vėžio riziką didinantis veiksnys tarp moterų Lietuvos populiacijoje: ŠS bendroje tirtųjų vėžio grupėje lygus 1,36 (PI 95 % = 1,05–1,76,  $p < 0,02$ ). Taip pat B kraujo grupė didina riziką sirgti vyrų grupėje: bendroje vyrų grupėje rizika lygi 1,38 (PI 95 % = 1,06–1,80,  $p < 0,02$ ), o ≥60 metų vyrų grupėje – 1,43 (PI 95 % = 1,09–1,89,  $p < 0,01$ ). Vertinant urogenitalinės sistemos vėžiu sergančiųjų ir AB kraujo grupės duomenis, patikimų duomenų, rodančių šios kraujo grupės įtaką, negauta ( $p > 0,05$ ).

Prostatos vėžio ir AB0 kraujo grupių sistemos ŠS analizės rezultatai pateikti 8 lentelėje. Atlikus tirtų sirgusių prostatos vėžiu grupių ŠS ir PI statistinę analizę, buvo rastas statistiškai patikimas ryšys tarp B kraujo grupės ir priešinės liaukos vėžio: B kraujo grupė yra didinantis prostatos vėžio riziką veiksnys bendroje ir ≥60 metų amžiaus vyrų grupėse (atitinkamai ŠS = 1,33, PI 95 % = 1,04–1,71 ir ŠS = 1,36, PI 95 % = 1,05–1,76,  $p < 0,02$ ). Su kitomis AB0 kraujo grupėmis patikimo ryšio nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

**8 lentelė.** Šansų santykio analizės sirgusių prostatos vėžiu grupėse rezultatai.

Tiriamosios grupės	Lytis	Amžius	Kraujo grupė			
			0	A	B	AB
			ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %
Prostatos vėžys	Vyrai	Bendra grupė	0,91 0,76–1,10	0,91 0,76–1,10	1,33* 1,04–1,71	1,04 0,73–1,47
		<60 metų	0,98 0,79–1,23	0,90 0,72–1,13	1,27 0,95–1,70	0,91 0,60–1,39
		≥60 metų	0,88 0,72–1,07	0,92 0,75–1,11	1,36* 1,05–1,76	1,11 0,77–1,60

\* statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su kraujo donorais ( $p < 0,05$ ).

ŠS analizės tarp ilgaamžiškumo ir AB0 kraujo grupių sistemos rezultatai pateikti 9 lentelėje.

**9 lentelė.** Šansų santykio analizės rezultatai ilgaamžių grupėje.

Tiriamosios grupės	Lytis	Amžius	Kraujo grupė			
			0	A	B	AB
			ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %
Ilgaamžiai	Bendra grupė	Bendra grupė	1,03 0,72–1,49	1,34 0,94–1,92	0,65 0,37–1,14	0,52 0,22–1,25
	Moterys	≥80 metų	0,86 0,55–1,33	1,72* 1,13–2,61	0,47* 0,22–1,00	0,65 0,25–1,68
	Vyrai	≥80 metų	1,50 0,84–2,67	0,79 0,43–1,45	1,07 0,49–2,35	0,26 0,04–1,94

\* statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su kraujo donorais ( $p < 0,05$ ).

Ilgaamžių grupių ŠS ir PI tyrimo rezultatai rodo, kad moterims A kraujo grupė yra veiksnys, susijęs su jų ilgaamžiškumu (ŠS = 1,72, PI 95 % = 1,13–2,61,  $p < 0,0001$ ). Taip pat nustatyta, kad B kraujo grupė mažina ilgaamžiškumo tikimybę (ŠS = 0,47, PI 95 % = 0,22–1,00,  $p < 0,05$ ). Statistiškai patikimo ryšio tarp moterų ilgaamžiškumo ir 0, AB kraujo grupių nustatyti nepavyko ( $p > 0,05$ ).

10 lentelėje pateikiami ilgaamžių asociacijos su sergančiaisiais urogenitalinės sistemos ir AB0 kraujo grupių sistemos analizės rezultatai.

**10 lentelė.** Šansų santykio analizės duomenys sirgusių inkstų, šlapimo pūslės, prostatos vėžiu grupėse lyginant su ilgaamžiškumu.

Tiriamosios grupės	Lytis	Kraujo grupė			
		0	A	B	AB
		ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %	ŠS PI 95 %
Inkstų vėžys	Bendra grupė	0,93 0,67–1,30	0,70** 0,51–0,97	1,80** 1,06–3,05	1,92 0,84–4,39
	Moterys	1,10 0,72–1,68	0,52** 0,34–0,77	2,77** 1,33–5,80	1,66 0,66–4,20
	Vyrai	0,66 0,37–1,15	1,26 0,69–2,27	1,01 0,47–2,18	3,59 0,49–26,25
Šlapimo pūslės vėžys	Bendra grupė	0,90 0,64–1,27	0,44** 0,32–0,62	2,09** 1,23–3,57	1,67 0,72–3,87
	Moterys	0,90 0,56–1,43	0,64** 0,41–0,99	2,79** 1,29–6,03	1,56 0,58–4,19
	Vyrai	0,66 0,37–1,16	1,11 0,61–2,02	1,29 0,60–2,79	3,17 0,43–23,29
Prostatos vėžys	Vyrai	0,61 0,35–1,07	1,16 0,64–2,09	1,25 0,58–2,67	1,92 0,80–4,60

\*\* statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su ilgaamžiais ( $p < 0,05$ ).

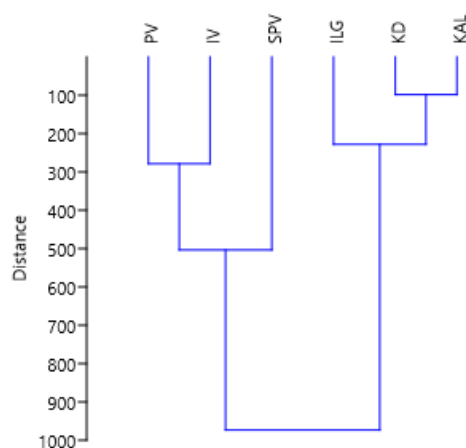
Ilgaamžių populiacijos analizė parodė patikimą ryšį tarp inkstų vėžio ir A, B kraujo grupių. A kraujo grupė bendroje ilgaamžių populiacijoje mažina riziką sirgti inkstų vėžiu (ŠS = 0,70, PI 95 % = 0,51–0,97,  $p < 0,03$ ) kaip ir ilgaamžių moterų grupėje – rizika lygi 0,52 (PI 95 % = 0,34–0,77,  $p < 0,001$ ). B kraujo grupė didina inkstų vėžio raidos riziką bendroje ilgaamžių populiacijoje – ŠS lygus 1,80 (PI 95 % = 1,06–3,05,  $p < 0,03$ ), o moterų ilgaamžių grupėje ŠS lygus 2,77 (PI 95 % = 1,33–5,80,  $p < 0,007$ ). Patikimo ryšio tarp kraujo grupių vyrų ilgaamžių populiacijos ir inkstų vėžio nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

Šlapimo pūslės vėžio asociacijos analizė parodė, kad A kraujo grupė mažina riziką sirgti vėžiu bendroje grupėje 0,44 karto (PI 95 % = 0,32–0,62,  $p < 0,0001$ ), o moterų grupėje – 0,64 karto (PI 95 % = 0,41–0,99,  $p < 0,007$ ). B kraujo grupę turintys ilgaamžiai bendrai turi du kartus didesnę riziką sirgti šlapimo pūslės vėžiu (ŠS = 2,09, PI 95 % = 1,23–3,57,  $p < 0,007$ ), o ilgaamžės moterys – 2,8 karto (PI 95 % = 1,29–6,03,  $p < 0,009$ ).

0, A, B ir AB kraujo grupių ryšio ilgaamžių grupėje su priešinės liaukos vėžio rizika nenustatyta ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3. AB0 kraujo grupių sistemos tirtų ligonių, kraujo donorų ir ilgaamžių grupių klasterinės analizės rezultatai

Klasterinė tirtųjų grupių analizė rodo, kad sergantieji urogenitalinės sistemos (prostatos, inkstų ir šlapimo pūslės) vėžiu sudarė atskirą didelį klasterį nuo antro klasterio, kurį sudarė KAL, ilgaamžių bei kraujo donorų grupės (2 pav.). Tai leidžia padaryti prielaidą, kad šios dvi grupės – struktūriškai pagal AB0 kraujo grupes skirtingos. Klasterių viduje kraujo donorai sudarė vieną klasterį su koronarine arterijų liga sergančiais. Galima galvoti, kad pastarajam rezultatui turėjo įtakos ganėtinai panašus tiriamųjų amžius. Kitame dideliame klasteryje prostatos vėžys sudarė vieną klasterį su inkstų vėžiu. 11 lentelėje parodyta Euklido metrikos atstumai, skiriančias tirtąsias grupes.



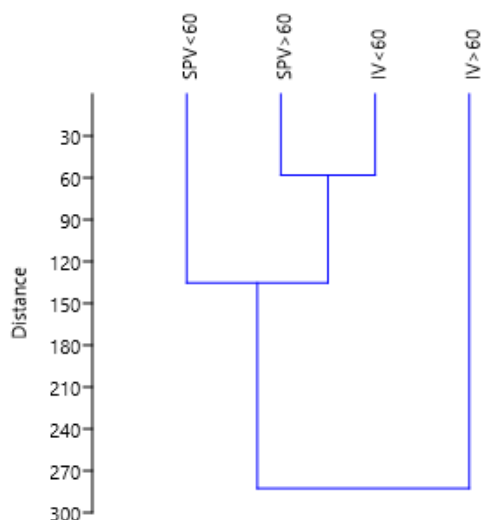
**2 pav.** Klasterinė analizė: bendra tiriamaoji grupė (KAL – koronarinė arterijų liga; PV – prostatos vėžys; IV – inkstų vėžys; SPV – šlapimo pūslės vėžys; ILG – ilgaamžiai; KD – kraujo donorai)

**11 lentelė.** Panašumo ir atstumo rodyklė: bendra tiriamaoji grupė (KAL – koronarinė arterijų liga; PV – prostatos vėžys; IV – inkstų vėžys; SPV – šlapimo pūslės vėžys; ILG – ilgaamžiai; KD – kraujo donorai).

Grupės	KD	ILG	PV	IV	SPV
KAL	98,58	188,09	970,93	1244,60	605,07
KD		268,19	887,54	1158,66	521,94
ILG			1154,94	1426,72	788,83
PV				278,54	366,82
IV					640,73

3 paveikslas vaizduoja moterų tirtą grupę, suskirstytą pagal amžiaus grupes. Atskirą klasterį sudarė  $\geq 60$  metų moterys sergančios šlapimo pūslės vėžiu,  $< 60$  metų sergančios

inkstų vėžiu ir <60 metų sergančios šlapimo pūslės vėžiu. Kitą atskirą klasterį sudarė 60 metų ir vyresnės moterys sergančios inkstų vėžiu. Galima teigti, kad klasterių susigrupavimas tokia tvarka susijęs su vėžio dažnio priklausomybe nuo amžiaus – moterys sulaukusios 60 metų ir vyresnė dažniau serga inkstų vėžiu (5 lentelė, 6). 12 lentelė rodo kokie Euklido metrikos atstumai, skiriantys tirtas grupes.

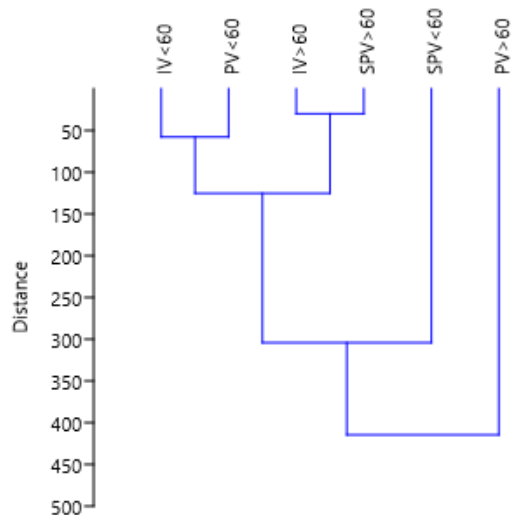


**3 pav.** Klasterinė analizė: moterų grupė, suklasifikuota pagal amžių

**12 lentelė.** Panašumo ir atstumo rodyklė: moterų grupė, suklasifikuota pagal amžių

	<b>IV&gt;60</b>	<b>SPV&lt;60</b>	<b>SPV&gt;60</b>
<b>IV&lt;60</b>	209,91	163,55	58,19
<b>IV&gt;60</b>		370,62	267,50
<b>SPV&lt;60</b>			107,22

Tirtų lokalizacijų sergančiųjų vėžiu vyrų klasterinės analizės rezultatai parodė tris klasterius (9 pav.). Vieną klasterį sudaro keturios ligonių grupės – vyrai jaunesni nei 60 metų, sergantys inkstų ir prostatos vėžiu bei  $\geq 60$  metų sergantys inkstų ir šlapimo pūslės vėžiu. Dar du atskirus prisijungusius klasterius sudarė – vyrai jaunesni nei 60 metų, sergantys šlapimo pūslės vėžiu ir  $\geq 60$  metų sergantieji prostatos vėžiu. Pastarieji du klasteriais rodo urogenitalinės sistemos vėžio ryšį su amžiumi (47). Taip pat 13 lentelėje parodyti Euklido metrikos atstumai, skiriantys tirtas grupes.



**4 pav.** Klasterinė analizė: vyrų grupė, suklasifikuota pagal amžių.

**13 lentelė.** Panašumo ir atstumo rodyklė: vyrų grupė, suklasifikuota pagal amžių.

	<b>PV&gt;60</b>	<b>IV&lt;60</b>	<b>IV&gt;60</b>	<b>SPV&lt;60</b>	<b>SPV&gt;60</b>
<b>PV&lt;60</b>	391,99	57,91	95,61	264,38	106,02
<b>PV&gt;60</b>		437,86	298,73	655,88	287,96
<b>IV&lt;60</b>			141,85	223,68	157,64
<b>IV&gt;60</b>				359,41	30,01
<b>SPV&lt;60</b>					369,17

#### 4.4. Vitamino D prijungiančio baltymo genotipavimo rezultatai

Ištyrus Lietuvos ilgaamžių populiaciją buvo nustatyta, kad genotipų dažniai bendroje ir moterų grupėse neatitinka Hardžio ir Vainbergo pusiausvyros ( $p < 0,05$ ).

14 lentelė atspindi VDPB rs4588 polimorfizmo paplitimą tirtos grupės ilgaamžių grupėje.

**14 lentelė.** Rs4588 genotipavimo rezultatai.

<b>Rs4588</b>		<b>Alelių dažnis</b>		<b>Genotipų dažnis</b>		
		<b>n</b>		<b>n</b>		
	<b>n</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>
<b>Ilgaamžiai</b>	16	0,56 18	0,44 14	0,38 6	0,38 6	0,24 4

Genotipų įvertinimas parodė, kad bendroje ilgaamžių grupėje dažniausiai buvo nustatytas G alelis (santykinis dažnis lygus 0,56) ir GG bei GT genotipai (0,38).



Genotipavus rs7041 polimorfizmą buvo nustatytas A alelio ir AC bei AA genotipų santykiniai dažniai, atitinkamai lygūs 0,44, 0,38 ir 0,24 bendroje ilgaamžių grupėje (15 lentelė).

**15 lentelė.** Rs7041 genotipavimo rezultatai.

Rs7041		Alelių dažnis n		Genotipų dažnis n		
	n	C	A	CC	AC	AA
Ilgaamžiai	16	0,56	0,44	0,38	0,38	0,24
		18	14	6	6	4

16 lentelėje pateiktas vitaminą D prijungiančio baltymo variantų dažnis.

**16 lentelė.** VDPB variantų tyrimo rezultatai.

Rs4588 Rs7041		Alelių dažnis n			Fenotipų dažnis n					
	n	Gc1s	Gc1f	Gc2	Gc1s-1s	Gc1s-1f	Gc1s-2	Gc1f-1f	Gc1f-2	Gc2-2
Ilgaamžiai	14	0,61	-	0,39	0,42	-	0,36	-	-	0,23
		17		11	6		5			3

Tarp 16 tirtų ilgaamžių dažniausiai nustatytas VDPB alelis buvo Gc1s (0,61), o Gc1f – nepavyko nustatyti. Nustatytas VDPB variantų dažnių pasiskirstymas ilgaamžių populiacijoje atitinka anksčiau tirtų ilgaamžių dažnių pasiskirstymą (15, 3 priedas). Dviejų ilgaamžių VDPB fenotipų identifikuoti nepavyko, todėl juos būtų tikslinga ištirti izoelektrinio fokusavimo metodu.

## 5. REZULTATŲ APTARIMAS

*AB0 kraujo grupių sistema, ilgaamžiškumas ir piktybiniai navikai.* Ilgaamžiškumas yra susijęs su atsparumu aterogenezei ir kancerogenezei. Ilgaamžių populiacijos tyrimai yra svarbūs išsiaiškinant genetinių veiksnių reikšmę aterogenezės, kancerogenezės biologiniams procesams.

Anksčiau atlikti tyrimai parodė, kad Lietuvos ilgaamžiai dažniau turi A kraujo grupę (18, 19). Moterims Lietuvos populiacijoje A kraujo grupė yra vienas iš ilgaamžiškumo veiksnių, o B kraujo grupė atvirkščiai – statistiškai patikimai rečiau nustatyta ilgaamžių grupėje. Tyrimai, atlikti šimtamečių japonų populiacijoje, parodė, kad B kraujo grupė dažniau

nustatoma japonų ilgaamžių populiacijoje ir ji galėtų būti vienu iš ilgaamžiškumo žymenų šioje populiacijoje (90), nors kiti mokslininkai, atlikę sąsajos analizę tarp AB0 kraujo grupių sistemos ir ilgaamžiškumo, kitose tirtose populiacijose, ryšio nenustatė (90, 126, 127, 128).

89 tyrimų metaanalizė parodė A kraujo grupės ryšį su didesne įvairių lokalizacijų piktybinių navikų rizika, o 0 grupė priešingai – su mažesne (20). Šio darbo gauti rezultatai rodo, kad Lietuvos populiacijoje 0 ir A kraujo grupė susijusi su mažesne rizika sirgti urogenitalinės sistemos vėžiu, o B kraujo grupė šią riziką didina.

Literatūros duomenys rodo, kad 0, A ir B kraujo grupę turintys vyrai geriau reaguoja į gydymą nuo prostatos vėžio bei ilgiau išgyvena (83, 84). Asmenims, turintiems 0 kraujo grupę, rečiau pasitaiko tromboembolinės komplikacijos po prostatektomijos (85). Austrų tyrėjai atskleidė, kad vyrams, turintiems A, B ar AB kraujo grupę, yra didesnė mirties nuo tromboembolijų rizika po prostatektomijos (129), taip pat austrų populiacijoje nustatyta sąsaja 0 kraujo grupės su sumažėjusia inkstų vėžio progresavimo į regioninius limfmazgius bei mažesnė abipusio inkstų vėžio rizika, bet šioje populiacijoje nerasta sąsajų su ligonio amžiumi, lytimi, kūno masės indeksu ir inkstų vėžio progresavimu. Be to, tyrimas parodė didesnę inkstų vėžio metastazavimo į limfmazgius bei naviko išplitimo į minkštuosius audinius riziką esant B kraujo grupei (82). Vokiečių tyrėjai rado, kad A kraujo grupė didina riziką sirgti šlapimo pūslės vėžiu (130) ir yra susijusi su didesniu mirtingumu nuo jo (78). O. Engel ir grupės tyrimai rodo, kad 0 kraujo grupė nedaro įtakos šlapimo pūslės vėžio raidai; to priežastis gali būti tirta pacientų grupė, kuriai buvo taikomas šlapimo pūslės pašalinimas, dėl didelio vėžio išplitimo laipsnio (130). Austrų mokslininkai nustatė didesnę šlapimo pūslės vėžio metastazavimo į limfmazgius bei naviko išplitimo į minkštuosius audinius riziką esant B kraujo grupei (21). Amerikiečių mokslininkų atliktas tyrimas atskleidė, kad AB kraujo grupė mažina riziką susirgti šlapimo pūslės vėžiu ir, galbūt, yra susijusi su geresniu išgyvenamumu (78).

***AB0 kraujo grupių sistema, koronarinė arterijų liga ir piktybiniai navikai.*** Atliktas AB0 kraujo grupių sistemos dažnio tyrimą Lietuvos populiacijoje buvo nustatyta, kad B kraujo grupė dažniau aptinkama sergantiesiems koronarine arterijų liga nei sveikai populiacijai (18, 19). Taip pat nustatyta, kad esant B kraujo grupei, jaunesniems nei 45 metai vyrams Lietuvoje, KAL nustatoma dažniau, nei turintiems 0 kraujo grupę (89). Tiriant aterosklerozinės plokštelės formavimosi veiksnius, nustatyta, kad 0 kraujo grupė yra apsaugantis nuo aterogenezės veiksnys (87, 88).

Senėjimo metu didėja lėtinių būklių rizika, pvz., didėja kraujo spaudimas, cholesterolio kiekis, auga vėžio rizika. Metaanalizė, ieškant ryšio tarp kraujo spaudimo, lipidų kiekio serume ir vėžio, parodė, kad, sergant arterine hipertenzija, inkstų ląstelių vėžio

raidos rizika išauga 2–4 kartus, nepriklausomai nuo lyties. Taip pat nustatyta, kad sergant metaboliniu sindromu, kuriam būdingas padidėjęs arterinis kraujo spaudimas, yra didesnė rizika sirgti įvairios lokalizacijos vėžiu. Padidėjęs bendras cholesterolio kiekis kraujo serume yra susijęs su didesne gaubtinės ir tiesiosios žarnos, prostatos ir sėklidžių vėžio rizika, tuo tarpu, esant didesniam cholesterolio kiekiui, yra mažesnė rizika sirgti skrandžio, kepenų ir hematopoetinio ir limfoidinio audinio vėžiu. Nustatyta, teigiama asociacija tarp trigliceridų inkstų ląstelių vėžio ir kitos lokalizacijos piktybinių navikų raida (131). Ankstesni tyrimai parodė, kad ilgaamžiškumas Lietuvos populiacija sietinas su sumažėjusia apolipoproteino A-I, apolipoproteino E koncentracija kraujyje, bei padidėjusia apolipoproteino B ir apoA-I/apoB santykiu kraujo serume (18, 19).

**Vitaminą D prijungiantis baltymas ir senėjimas.** Vitaminą D prijungiančio baltymo analizė parodė, kad rs7041 ir rs4588 polimorfizmų genotipai, atitinkamai, turintys T alelį – TT, TG bei A alelį – AA, AC, siejami su mažesne 25(OH)D koncentracija kraujyje (132). Anksčiau atlikti VDPB tyrimai sergančiųjų vainikinių arterijų ateroskleroze, vyrų grupėje ir ilgaamžių, Lietuvos populiacijos parodė, kad tarp ilgaamžių patikimai dažniau nustatytas Gc2 alelis bei Gc2-2 fenotipas (15), o sergančių vainikinių arterijų ateroskleroze grupėje statistiškai patikimai dažniau nustatytas Gc1s-1s fenitipas. Magistro baigiamajame darbe analizuota maža ilgaamžių imtis, tačiau atliktas VDPB tyrimas parodė tas pačias tendencijas – padidėjusį Gc1s-1s ir Gc2-2 fenotipų dažnį ilgaamžių grupėje (15; straipsnis pridedamas (3 priedas)). Pradėtas ilgaamžių tyrimas bus tęsiamas toliau. Tiriant tikro laiko PGR metodu iš 16 kraujo pavyzdžių 2-iems pacientams nepavyko nustatyti Gc varianto, todėl ateityje tikslinga šiuos tyrimus patikrinti ir izoelektrinio fokusavimo metodu.

Azijos mokslininkai tyrinėjo vyresnių moterų (po menopauzės pasireiškimo) populiacijos ryšį su rs7041 polimorfizmu. Tyrimai parodė, kad šis polimorfizmas yra susijęs su VDPB koncentracija kraujyje, kuri teigiamai koreliavo su bendru 25(OH)D, tuo tarpu rs7041 polimorfizmas su biologiškai aktyviu 25(OH)D koreliavo neigiamai. Be to, aukštas biologiškai aktyvaus 25(OH)D kiekis siejamas su sumažėjusia rizika sirgti kaulų osteoporozė (133). Nustatyta, kad rs7041 polimorfizmas yra didinantis prostatos vėžio riziką veiksny (134) bei siejamas su mažo tankio cholesterolio kiekio pokyčiais kraujyje (135).

Su rs7041 ir rs4588 polimorfizmais susijusių haplotipų analizė parodė, kad Gc1s alelis ir Gc1s-1s fenotipas siejamas su 25(OH)D pakankamu kiekiu, tuo tarpu Gc2 alelis, Gc1s-1f, Gc1f-2, Gc1s-2, Gc2-2 fenotipai – su 25(OH)D kiekio trūkumu kraujyje sveikų asmenų populiacijoje (132). Tyrimai rodo, kad 25(OH)D koncentracijos skirtumai lemia skirtingų VDPB fenotipų, siejami su vėžio raida (136). Vokietijos populiacijos VDPB variantų analizė rodo, jog Gc2-2 fenotipas yra krūties vėžio po menopauzės riziką mažinantis veiksnys

lyginant su Gc1s-1s genetiniu variantu (137). Tuo tarpu, Gc1f-1f fenotipas siejamas su 23–26 % mažesne riziką sirgti įvairios lokalizacijos vėžiu, lyginant su Gc1s-1s ir Gc2-2 genetinių variantų įtaka (136).

## 6. IŠVADOS

1. Sergantieji urogenitalinės sistemos (prostatos, inkstų ir šlapimo pūslės) vėžiu sudarė atskirą klasterį nuo sergančiųjų koronarine arterijų liga, ilgaamžių bei kraujo donorų.
2. Įvertinus AB0 kraujo grupių dažnių pasiskirstymą urogenitalinės sistemos vėžiu sergančiųjų grupėse, nustatyta, kad A kraujo grupė rečiau aptinkama vėžiu sergančiųjų grupėje, o B kraujo grupė dažniau, lyginant su sveika populiacija. Ilgaamžių populiacijoje, dažniau nustatoma 0 ir A kraujo grupės ir rečiau – B ir AB kraujo grupės, lyginant su sveikais kraujo donorais.
3. Įvertinus AB0 kraujo grupių sistemos asociaciją su vėžiu, nustatyta, jog sveikoje populiacijoje A kraujo grupė mažina riziką sirgti šlapimo pūslės ir inkstų vėžiu, tuo tarpu B kraujo grupė susijusi su padidėjusia rizika. Rezultatai parodė, kad A kraujo grupė didina ilgaamžiškumo tikimybę moterims, o B kraujo grupė – mažina.
4. Ištyrus 16 ilgaamžius, nustatytas VDPB (rs4588 ir rs7041) polimorfizmą T ir A aleliai. Tirti ilgaamžiai dažniausiai turėjo Gc1s-1s ir Gc1s-2 fenotipus. Gc2-2 fenotipų padidėjusio dažnio tendencija atitinka anksčiau publikuotus duomenis Lietuvos ilgaamžių populiacijoje.

## SANTRAUKA

Baigiamojo magistro darbo tema „AB0 kraujo grupių sistemos, vitaminą D prijungiančio baltymo polimorfizmo klasterinė analizė lyginant vėžiu, koronarine arterijų liga sergančiųjų ir ilgaamžių grupių duomenis“.

**Darbo tikslas.** Įvertinti asmenų, sergančių vėžiu, asociaciją su AB0 kraujo grupių sistema, ją palyginti su ilgaamžių bei koronarine arterijų liga sergančiųjų grupėmis, tiriamąsias grupes sugrupuoti klasterizavimo metodu ir ištirti vitaminą D prijungiančio baltymo polimorfizmą. **Uždaviniai.** 1) Atlikti asmenų, sergančiųjų urogenitalinės sistemos vėžiu, koronarine arterijų liga bei ilgaamžių asmenų klasterinę analizę pagal AB0 kraujo grupių sistemą; 2) Įvertinti AB0 kraujo grupių sistemos dažnį urogenitalinės sistemos vėžio ir ilgaamžių populiacijose; 3) Įvertinti urogenitalinės sistemos vėžio ir ilgaamžių asociaciją su AB0 kraujo grupių sistema; 4) Ištirti vitaminą D prijungiančio baltymo izoformų dažnį ilgaamžių grupėje. **Metodai ir medžiaga.** AB0 serologinis kraujo grupių nustatymas, DNR gryninimas (naudojant kolonėles), tikro laiko PGR metodas, klasterinė analizė. Tirtos grupės buvo: sveiki kraujo donorai (n = 595); sergantieji prostatos (n = 2200), šlapimo pūslės (n = 1530) ir inkstų (n = 2650) vėžiu asmenys; asmenys sergantieji koronarine arterijų liga (n=464); Lietuvos ilgaamžių populiacija (n = 154). **Rezultatai.** Lietuvos populiacijoje 0 kraujo grupė, inkstų ir šlapimo pūslės vėžiu sergančioms moterims, nustatyta patikimai rečiau nei kraujo donorų grupėje. A kraujo grupė nustatyta statistiškai reikšmingai rečiau inkstų ir šlapimo pūslės vėžiu sergančiųjų grupėse lyginant su jos dažniu kontrolinėje kraujo donorų populiacijoje. Urogenitalinės sistemos (prostatos, inkstų, šlapimo pūslės) vėžiu sergančiųjų grupėje patikimai dažniau pasitaikė B kraujo grupė lyginant su jos dažniu kraujo donorų ir ilgaamžių grupėse. 0 kraujo grupė yra šlapimo pūslės vėžio riziką mažinantis veiksnys vyresnių nei 60 metų moterų grupėje. Tyrimai parodė, kad A kraujo grupė yra susijusi su mažesne rizika sirgti šlapimo pūslės ir inkstų vėžiu, o B kraujo grupė su didesne urogenitalinės sistemos vėžio rizika Lietuvos populiacijoje. Moterims turinčioms A kraujo grupę tikimybė gyventi ilgau yra didesnė, nei turinčioms B kraujo grupę. Tirtų grupių klasterinė analizė pagal AB0 kraujo grupių dažnį rodo, kad sergantieji urogenitalinės sistemos (prostatos, inkstų ir šlapimo pūslės) vėžiu sudarė atskirą klasterį nuo KAL, ilgaamžių bei kraujo donorų klasterio. Rs4588 ir rs7041 polimorfizmų pasiskirstymų dažnis neatitiko Hardžio ir Vainbergo pusiausvyros ( $p < 0,05$ ) tirtų ilgaamžių grupėje. VDPB rs4588 polimorfizmo analizė parodė T alelio (0,44), GT (0,38) ir TT (0,24) genotipų dažnį bendroje ilgaamžių grupėje. Taip pat genotipavus rs7041 polimorfizmą buvo rastas, kad A alelio, AC ir AA genotipų santykinis dažnis, atitinkamai lygus 0,44, 0,38 ir 0,24. Ištyrus 16 ilgaamžių,

nustatyta, kad dažniausi fenotipai yra Gc1s-1s ir Gc1s-2. **Išvados.** 1) Sergantieji urogenitalinės sistemos (prostatos, inkstų ir šlapimo pūslės) vėžiu sudarė atskirą klasterį nuo sergančiųjų koronarine arterijų liga, ilgaamžių bei kraujo donorų; 2) Įvertinus AB0 kraujo grupių dažnių pasiskirstymą urogenitalinės sistemos vėžiu sergančiųjų grupėse, nustatyta, kad A kraujo grupė rečiau aptinkama vėžiu sergančiųjų grupėje, o B kraujo grupė dažniau, lyginant su sveika populiacija. Ilgaamžių populiacijoje, dažniau nustatoma 0 ir A kraujo grupės ir rečiau – B ir AB kraujo grupės, lyginant su sveikais kraujo donorais; 3) Įvertinus AB0 kraujo grupių sistemos asociaciją su vėžiu, nustatyta, jog sveikoje populiacijoje A kraujo grupė mažina riziką sirgti šlapimo pūslės ir inkstų vėžiu, tuo tarpu B kraujo grupė susijusi su padidėjusia rizika. Rezultatai parodė, kad A kraujo grupės didina ilgaamžiškumo tikimybę moterims, o B kraujo grupė – mažina; 4) Ištyrus 16 ilgaamžius, nustatytas VDPB (rs4588 ir rs7041) polimorfizmą T ir A aleliai. Tirti ilgaamžiai dažniausiai turėjo Gc1s-1s ir Gc1s-2 fenotipus. Gc2-2 fenotipų padidėjusio dažnio tendencija atitinka anksčiau publikuotus duomenis Lietuvos ilgaamžių populiacijoje.

**Raktiniai žodžiai:** AB0 kraujo grupių sistema, vitaminą D prijungiantis baltymas, vėžys, ilgaamžiai, klasterinė analizė.

## SUMMARY

The topic of the Master's thesis is "The Cluster Analysis of the AB0 Blood Group System, Vitamin D Binding Protein Polymorphism Comparing the Data of Cancer, Coronary Artery Disease and Long-Lived Individuals".

**The aim is** to assess the association with AB0 blood group system of individuals suffering from cancer, compare it with the long-lived individuals and coronary artery disease patient groups, classify research groups as per cluster analysis and investigate polymorphism of vitamin D binding protein. **Tasks are:** 1) To perform cluster analysis for long-lived individuals and patients suffering from urinary system cancer, coronary artery disease according to AB0 blood group system; 2) To assess AB0 blood group system frequency of urogenital system and long-lived individuals; 3) To measure AB0 blood group system association with long-lived individuals and patients suffering from cancer; 4) To analyze the frequency of the vitamin D binding protein polymorphism in long-lived individuals group. **Methods and material:** serological analysis of AB0 blood group system, DNA purification using silica-based columns, real time PCR method, cluster analysis. The test groups: healthy blood donors (n = 595); prostate (n = 2200), bladder (n = 1530) and renal (n = 2650) cancer patients; patients with atherosclerosis (n = 464); group of long-lived individuals (n = 154). **Research results.** The population of Lithuanian women, who are suffering from renal and bladder cancer, have significantly lower blood group 0 frequency than the blood donors. Blood group A is statistically significantly lower among kidney and bladder cancer patients groups than between healthy Lithuanian population. Blood type B is more often found in urogenital system (prostate, renal and bladder) cancer group compared to blood donors and long-lived individuals groups. Blood type 0 is a risk reduction factor for bladder cancer in population of  $\geq 60$  year old Lithuanian women. Studies have showed that blood type A is associated with lower risk of bladder and renal cancer, and blood group B with higher risk of urinary system cancer in Lithuanian population. Results show that Lithuanian women with blood type A have higher life expectancy, than women whose blood type is B. The cluster analysis revealed that patients suffering from urinary system (prostate, renal and bladder) cancer formed separate large cluster from blood donors, long-lived individuals and coronary artery disease groups. Distribution frequency of rs4588 and rs7041 polymorphisms did not correspond to Hardy-Weinberg equilibrium ( $p < 0.05$ ). Rs4588 polymorphism of vitamin D binding protein analysis showed that the overall long-lived group were generally determined T allele (0.44), GT (0.38) and TT (0.24) genotype; as well as genotyping analysis of rs7041 polymorphism showed frequency of A allele, AC and AA genotypes, respectively 0.44, 0,38

and 0.24. Investigation of 16 long-lived individuals showed, that the most frequent vitamin D binding phenotypes are Gc1s-1s and Gc1s-2. **Findings:** 1) The clustering analysis revealed that patients suffering from urinary system (prostate, renal and bladder) cancer formed separate large cluster from blood donors, long-lived individuals and coronary artery disease groups; 2) AB0 blood group system frequency distribution showed that blood type A is rarely found in patients group suffering from urogenital system cancer, and blood type B – often, compared to healthy population. In long-lived population, most frequent blood types are 0 and A, and less often are B and AB compared to healthy blood donors; 3) It is found, that blood group A is associated with reduced risk factor for bladder and renal cancer in healthy population and blood group B is associated with increased risk of cancer. Blood type A is also associated with increased life expectancy among the population of Lithuanian women, while blood type B – with decreased; 4) A study of 15 long lived individuals showed rs4588 and rs7041 polymorphisms of vitamin D binding protein T and A alleles. The examined long-lived individuals mainly had Gc1s-1s and Gc1s-2 phenotype. The increased Gc2-2 phenotypes frequency trend is consistent with previously published data for long-lived Lithuanian population.

**Key words:** AB0 blood group system, vitamin D binding protein, cancer, longevity, clustering analysis.



## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. DIX, D.; ir COHEN, P. On the role of aging in carcinogenesis. In *Anticancer Research* [interaktyvus]. 1999, vol. 19, [žiūrėta 2017 m. sausio 19 d.], p. 723–726.
2. PARKIN, D.M.; BRAY, F.I.; ir DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. In *European Journal of Cancer* [interaktyvus]. 2001, vol. 37, [žiūrėta 2017 m. sausio 20 d.], p. 4–66.
3. ANISIMOV, V.N. The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal. In *Oncology/ Hematology* [interaktyvus]. 2003, vol. 45, [žiūrėta 2017 m. sausio 19 d.], p. 277–304.
4. BUROKIENĖ, Neringa, *et al.* Risk Assessment Of Cardiovascular Diseases By Assessing Biochemical Markers Of Atherosclerosis In Lithuanian Population. In *Laboratorinė medicina* [interaktyvus]. 2015, vol. 17, no. 2 [žiūrėta 2017 m. vasario 20 d.], p. 47–52.
5. PETRULIONIENĖ, Žaneta. *Pagal koronarinę širdies liga. Rizikos veiksniai, klinikiniai simptomai ir gydymas* [interaktyvus]. Parengė Sveikatos mokymo ir ligų prevencijos centro Sveikatos mokykla. Vilnius: UAB "Vaistų žinios", 2010 [žiūrėta 2017 m. vasario 21 d.].
6. Nacionalinis vėžio institutas. *Vėžys Lietuvoje 2012 metais* [interaktyvus]. [Vilnius]: UAB „Petro ofsetas“, 2015 [žiūrėta 2017 m. sausio 20 d.]. Prieiga per internetą: [http://www.nvi.lt/wp-content/uploads/2016/04/Vezys\\_lietuvoje\\_2012.pdf](http://www.nvi.lt/wp-content/uploads/2016/04/Vezys_lietuvoje_2012.pdf).
7. FINKEL, Toren; SERRANO, Manuel; ir BLASC, Maria A. The common biology of cancer and ageing. In *Nature*. 2007, vol. 448 [žiūrėta 2017 m. sausio 20 d.], p. 767–774.
8. MASIULAITYTĖ-ŠUKEVIČ, Inga. Šiuolaikinė Lietuva (1991–dabar). In *Lietuvos statistikos departamentas* [interaktyvus]. Atnaujintas: 2017-01-30. [žiūrėta 2017 m. sausio 25 d.]. Prieiga per internetą: <http://osp.stat.gov.lt/web/guest/statistiniu-rodikliu-analize?portletFormName=visualization&hash=ed91aa59-cc77-4d09-abbd-d3a2a9b2886f>.
9. LANSKY, A.J., *et al.* Gender and the extent of coronary atherosclerosis, plaque composition, and clinical outcomes in acute coronary syndromes. In *JACC Cardiovasc Imaging* [interaktyvus]. 2012 Mar, vol. 5, no. 3 [žiūrėta 2017 m. vasario 25 d.], p. 62–72.
10. BANYS, Valdas, *et al.* Platelet function and indices in Lithuanian men with dyslipidemia: associations with inflammatory biomarkers. In *ACTA MEDICA*

- LITUANICA* [interaktyvus]. 2014, vol. 21, no. 4 [žiūrėta 2017 m. vasario 25 d.], p. 182–194.
11. [SUTPHIN, G.L., et al. Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology \(CHARGE\) Consortium Gene Expression Working Group.](#) Caenorhabditis elegans orthologs of human genes differentially expressed with age are enriched for determinants of longevity. In *Aging Cell* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2017 m. sausio 20 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28401650>.
  12. PÉREZ-LÓPEZ, F.R., et al. Vitamin D, sunlight and longevity. In *Minerva Endocrinologica* [interaktyvus]. 2011, vol. 36, no. 3 [žiūrėta 2017 m. kovo 25 d.], p. 257–266.
  13. SCHÖTTKER, B., et al. Vitamin D and mortality: meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and the United States. In *British Medical Journal* [interaktyvus]. 2014, vol. 348 [žiūrėta 2017 m. kovo 25 d.], p. 3656.
  14. LAURIDSEN, A.L.; VESTERGAARD, P.; ir NEXO, E. Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women. In *Clinical Chemistry* [interaktyvus]. 2001, vol. 47, no. 4 [žiūrėta 2017 m. kovo 25 d.], p. 753–756.
  15. STAKISAITIS, D., et al. Investigation of Vitamin D-Binding Protein Polymorphism Impact on Coronary Artery Disease and Relationship with Longevity: Own Data and a Review. In *International Journal of Endocrinology* [interaktyvus]. 2016, vol. 2016:8347379 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.].
  16. SPITSYN, V.A.; ir STAKISHAĖTIS, D.V. Interrelation of genetic dimorphism of ear wax and the level of apolipoproteins with atherogenesis and longevity in the Lithuanian population. In *Genetika* [interaktyvus]. 1993 Feb, vol. 29, no. 2 [žiūrėta 2017 m. balandžio 21 d.], p. 334–341.
  17. SPITSYN, V.A.; STAKISHAĖTIS, D.V.; ir PREĖKSHA, R.A. Genetic dimorphism in beta-aminoisobutyric acid excretion in patients with atherosclerosis of the coronary artery and in groups at risk for atherosclerosis in the Lithuanian population. In *Genetika* [interaktyvus]. 1993 Nov, vol. 29, no. 11 [žiūrėta 2017 m. vasario 21 d.], p. 1861–1870.
  18. STAKISAITIS, D., et al. Coronary atherosclerosis and blood groups of ABO system in women (own data and review). In *Medicina* [interaktyvus]. 2002, vol. 38, no. 2 [žiūrėta 2017 m. kovo 1 d.], p. 230–235.

19. MAKSUVYTIS, Arūnas. Moterų vainikinių arterijų aterosklerozės sąsajos su kraujo serumo lipidais, apolipoproteinais A-I ir B bei ABO sistemos kraujo grupėmis [interaktyvus]. Daktaro disertacija. Biomedicinos mokslai, medicina [žiūrėta 2017 m. balandžio 2 d.].
20. ZHANG, B.L., *et al.* ABO blood groups and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. In *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [interaktyvus]. 2014, vol. 15, no. 11 [žiūrėta 2017 m. kovo 1 d.], p. 4643–4650.
21. KLATTE, T., *et al.* Impact of ABO blood type on outcomes in patients with primary nonmuscle invasive bladder cancer. In *Journal of Urology* [interaktyvus]. 2014, vol. 191, no. 5 [žiūrėta 2017 m. kovo 6 d.], p. 1238–1243.
22. JAIN, A.K.; *et al.* Re: Landscape of clustering algorithms. International Conference on Pattern Recognition: konferencijos pranešimų medžiaga. In *IEEE* [interaktyvus]. 2004, [žiūrėta 2017 m. balandžio 6 d.], p. 260–263.
23. ČEKANAVIČIUS, V.; MURAUŠKAS, G. *Statistika ir jos taikymai* [interaktyvus]. II dalis. Vilnius: TEV, 2002, [žiūrėta 2017 m. balandžio 6 d.], p. 268. ISBN 9955-491-16-7.
24. GIULIANI, Cristina, *et al.* Centenarians as extreme phenotypes: An ecological perspective to get insight into the relationship between the genetics of longevity and age-associated diseases. In *Mech. Ageing Dev* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.]. Prieiga per internetą: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2017.02.007>
25. OEPPEN, J. DEMOGRAPHY: Enhanced: Broken limits to life expectancy. In *Science* [interaktyvus]. 2002, vol. 296 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 1029–1031
26. CHRISTENSEN, Kaare, *et al.* Ageing populations: the challenges ahead. In *The Lancet* [interaktyvus]. 2009, vol. 374, no. 9696 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 1196–1208.
27. KENNEDY, B.K., *et al.* Geroscience: Linking aging to chronic disease. In *Cell* [interaktyvus]. 2014, vol. 159 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 709–713
28. KULMINSKI, A.M., *et al.* Trade-off in the effect of the APOE gene on the ages at onset of cardiovascular disease and cancer across ages, gender, and human generations. In *Rejuvenation Res* [interaktyvus]. 2013, vol. 16 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 28–34
29. FRANCESCHI, C., *et al.* Immunosenescence in humans: Deterioration or remodelling?. In *Int. Rev. Immunol* [interaktyvus]. 1995, vol. 12 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 57–74.

30. BUSTAMI, J., *et al.* Cholesteryl ester transfer protein (CETP) I405V polymorphism and cardiovascular disease in eastern European Caucasians - a cross-sectional study. In *BMC Geriatr* [interaktyvus]. 2016 Jul 20, vol. 16 [žiūrėta 2017 m. balandžio 21 d.], p. 144.
31. *Apie vėžio ligą*. Nacionalinis vėžio institutas [interaktyvus]. [žiūrėta 2017 m. sausio 20 d.] Prieiga per internetą: [http://www.nvi.lt/?page\\_id=3363&lang=lt](http://www.nvi.lt/?page_id=3363&lang=lt).
32. MENG, X., *et al.* A new hypothesis for the cancer mechanism. In *Cancer and Metastasis Reviews* [interaktyvus]. 2012, vol. 31, no. 1-2 [žiūrėta 2017 m. sausio 28 d.], p. 247–268.
33. BRÜCHER, B.L.D.M.; JAMALL, I.S. Somatic Mutation Theory – Why it’s Wrong for Most Cancers. In *Cell Physiol Biochem* [interaktyvus]. 2016, vol. 38, no. 5 [žiūrėta 2017 m. sausio 28 d.], p. 1663–1680.
34. TEZ, M.; TEZ, S. CANCER IS THE CHAOTIC SEARCH FOR ADAPTATION TO PREVIOUSLY UNKNOWN ENVIRONMENTS. In *Theoretical Biology Forum* [interaktyvus]. 2016, vol. 1-2 [žiūrėta 2017 m. sausio 28 d.], p. 19–154.
35. HOLLAND, J.H. *Emergence: From chaos to order*. Oxford: Oxford University Press [interaktyvus]; 2000 [žiūrėta 2017 m. sausio 28 d.].
36. HANAHAN, D.; ir WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. In *Cell* [interaktyvus]. 2011, vol. 144, no. 5 [žiūrėta 2017 m. sausio 20 d.], p. 646–74.
37. KANOPKA, A. Cell survival: Interplay between hypoxia and pre-mRNA splicing. In [Exp Cell Res](#) [interaktyvus]. 2017 Mar 16 [žiūrėta 2017 m. sausio 28 d.].
38. *PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Prostate Cancer Treatment* [interaktyvus]. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated 7/7/2016. [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.] Prieiga per internetą: <http://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq>.
39. STEINBERG, G.D., *et al.* Family history and the risk of prostate cancer. In *Prostate* [interaktyvus]. 1990, vol. 17, no. 4 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 337–347.
40. CAVANAGH, H.; ir KATHERINE, M.A. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. In *Hereditary Cancer in Clinical Practice* [interaktyvus]. 2015, vol. 13 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 16.
41. SHENOY, D., *et al.* Do African-American men need separate prostate cancer screening guidelines?. In *BMC Urol* [interaktyvus]. 2016, vol. 16 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 19.
42. MEDHANIE, G.A., *et al.* Cancer incidence profile in sub-Saharan African-born blacks in the United States: Similarities and differences with US-born non-Hispanic

- blacks. In *Cancer* [interaktyvus]. 2017 Apr 13 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28407201>.
43. ITO, K. Prostate cancer in Asian men. In *Nat Rev Urol* [interaktyvus]. 2014 Apr, vol. 11, no. 4 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 197–212. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24595118>.
44. Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro 2002 m. rugpjūčio 14 d. įsakymu Nr.422. Prostatos piktybinių navikų (C61) diagnostikos ir ambulatorinio gydymo metodika [interaktyvus]. [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.]. Prieiga per internetą: [http://www.emedicina.lt/site/files/algoritmai/hipertenzija\\_ir\\_prostata.pdf](http://www.emedicina.lt/site/files/algoritmai/hipertenzija_ir_prostata.pdf).
45. SMAILYTĖ, Giedrė, *et al.* Prostate cancer patient's survival in Lithuania. In *ACTA MEDICA LITUANICA* [interaktyvus]. 2012, vol. 19, no. 4 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 439–444.
46. KORIR, A., *et al.* Cancer risks in Nairobi (2000-2014) by ethnic group. In *Int J Cancer* [interaktyvus]. 2017, vol. 140, no. 4 [žiūrėta 2017 m. vasario 10 d.], p. 788–797.
47. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Bladder Cancer Treatment [interaktyvus]. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated 7/7/2016 [žiūrėta 2017 m. vasario 10 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.cancer.gov/types/bladder/patient/bladder-treatment-pdq>.
48. Tamošauskienė, J.; Sruogis, A; ir Asadauskienė, J. *Apie šlaimo pūslės vėžį* [interaktyvus]. Redagavo: Pruskuvienė, G]. Vilnius: UAB „Petro ofsetas“, 2006 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.]. ISBN 9986-784-57-3. Prieiga per internetą: <http://www.nvi.lt/wp-content/uploads/2016/01/Slapimo.pdf>.
49. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Renal Cell Cancer Treatment [interaktyvus]. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated 12/23/2016. [žiūrėta 2017 m. vasario 15 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.cancer.gov/types/kidney/patient/kidney-treatment-pdq>.
50. *What Is Coronary Heart Disease?* [interaktyvus]. National institute of health: National heart, lung and blood institute. Updated: June 22, 2016 [žiūrėta 2017 m. vasaris 24 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cad>
51. RINKŪNIENĖ, Egidija, *et al.* Mirtingumo nuo širdies ir kraujagyslių ligų tendencijos Lietuvoje ir europos sąjungos šalyse. In *Medicines teorija ir praktika* [interaktyvus]. 2013, vol. 19, no. 2 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 130–136

52. YUSUF, S., *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. In *Lancet* [interaktyvus]. 2004, vol. 364 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 937–952.
53. LIM, S.S., *et al.* A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. In *Lancet* [interaktyvus]. 2012, vol. 380 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 2224–2260.
54. WENTZEL, J.J., *et al.* Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. In *Cardiovasc Res* [interaktyvus]. 2012, vol. 96 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 234–243.
55. BENTZON, J.F., *et al.* Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. In *Circulation Research* [interaktyvus]. 2014, vol. 114 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 1852–1866.
56. STEINBERG, D.; ir WITZTUM, J.L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. In *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [interaktyvus]. 2010, vol. 30 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 2311–2316.
57. SUBRAMANIAN, M.; ir TABAS, I. Dendritic cells in atherosclerosis. In *Semin Immunopathol* [interaktyvus]. 2014, vol. 36 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 93–102.
58. STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. In *J Lipid Res* [interaktyvus]. 2009, vol. 50 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 376–381.
59. NAPOLI, C., *et al.* Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. In *J Clin Invest* [interaktyvus]. 1997, vol. 100 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 2680–2690.
60. STARY, H.C., *et al.* A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. In *Arterioscler Thromb* [interaktyvus]. 1994, vol. 14 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 840–856.
61. SLUIMER, J.C., *et al.* Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. In *J Am Coll Cardiol* [interaktyvus]. 2009, vol. 53 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 1517–1527.

62. KOLODZIE, F.D., *et al.* Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. In *N Engl J Med* [interaktyvus]. 2003, vol. 349 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 2316–2325.
63. NAVICKAS, R., *et al.* Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. In *Cardiovasc Res* [interaktyvus]. 2016, vol. 111, no. 4 [žiūrėta 2017 m. kovo 12 d.], p. 322–337.
64. STANISLOVAITIENĖ, D., *et al.* N-carboxymethyllysine as a biomarker for coronary artery disease and age-related macular degeneration. In *Medicina* (Kaunas) [interaktyvus]. 2016, vol. 52, no. 2 [žiūrėta 2017 m. kovo 12 d.], p. 99–103.
65. DOMARKIENĖ, I., *et al.* RTN4 and FBXL17 Genes are Associated with Coronary Heart Disease in Genome-Wide Association Analysis of Lithuanian Families. In *Balkan J Med Genet* [interaktyvus]. 2013, vol. 16, no. 2 [žiūrėta 2017 m. kovo 12 d.], p. 17-22.
66. STAKISAITIS, D.; BASYS, V.; ir BENETIS, R. Does alpha-1-proteinase inhibitor play a protective role in coronary atherosclerosis? In *Med Sci Monit* [interaktyvus]. 2001, vol. 7, no. 4 [žiūrėta 2017 m. kovo 12 d.], p.701-711.
67. BUROKIENĖ, N., *et al.* Classical rather than genetic risk factors account for high cardiovascular disease prevalence in Lithuania: A cross-sectional population study. In *Adv Med Sci* [interaktyvus]. 2017, vol. 62, no. 1 [žiūrėta 2017 m. kovo 12 d.], p. 121-128.
68. LESKY, E. Viennese serological research about the year 1900: its contribution to the development of clinical medicine. In *The bulletin of the New York Academy of Medicine* [interaktyvus]. 1973, vol. 49 [žiūrėta 2017 m. balandžio 1 d.], p. 100–111.
69. DEAN, L. *Blood Groups and Red Cell Antigens* [interaktyvus]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2005, Chapter 5: The ABO blood group [žiūrėta 2017 m. balandžio 1 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/>
70. *ABO* [interaktyvus]. The National Center for Biotechnology Information group [žiūrėta 2017 m. balandžio 5 d.]. Updated on 2-Apr-2017. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/28>.
71. *ABO gene* [interaktyvus]. U.S. National Library of Medicine: Genetics Home Reference. February 25, 2017 [žiūrėta 2017 m. balandžio 1 d.]. Prieiga per internetą: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABO#location>.
72. DEAN, L. ABO Blood Group. In *Medical Genetics Summaries* [interaktyvus]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2012 Oct 1

- group [žiūrėta 2017 m. balandžio 10 d.] [Updated 2015 Jul 27]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100894/>.
73. LEAROYD, P.; KNIGHT, R.; ir ROGAN, P. *An introduction to blood transfusion science and blood bank practice*. 4 ed. Manchester:Great Britain, 2006 group [žiūrėta 2017 m. kovo 7 d.]. 22-30 p. ISBN 9780951269138
  74. VASAN, S.K., *et al.* ABO Blood Group and Risk of Thromboembolic and Arterial Disease A Study of 1.5 Million Blood Donors. In *Circulation* [interaktyvus]. 2016, vol. 133 group [žiūrėta 2017 m. balandžio 20 d.], p. 1449–1457.
  75. JOHNSON, P.H.; ir HOPKINSON, D.A. Detection of ABO blood group polymorphism by denaturing gradient gel electrophoresis. In *Human molecular genetics* [interaktyvus]. 1992, vol. 1, no. 5 [žiūrėta 2017 m. vasario 20 d.], p. 341–344.
  76. REID, M.E.; ir LOMAS-FRANCIS, C. *The Blood Group Antigen Facts Book* [interaktyvus]. Second ed. New York: Elsevier Academic Press, 2004 [žiūrėta 2017 m. sausio 20 d.].
  77. ROATH, S.; TODD, C.E.; ir SHAW, D. Transient acquired blood group B antigen associated with diverticular bowel disease. In *Acta haematologica* [interaktyvus]. 1987, vol. 77 no. 3 [žiūrėta 2017 m. sausio 20 d.], p. 188–190.
  78. GERSHMAN, B., *et al.* The association of ABO blood type with disease recurrence and mortality among patients with urothelial carcinoma of the bladder undergoing radical cystectomy. In *Urol Oncol* [interaktyvus]. 2016, vol. 34, no. 1:4.e1-9 [žiūrėta 2017 m. vasario 10 d.].
  79. BRIAN, M., *et al.* ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer. In *Journal of Nationall Cancer Institut* [interaktyvus]. 2009, vol. 101, no. 6 [žiūrėta 2017 m. balandžio 15 d.], p. 424–431. doi: 10.1093/jnci/djp020
  80. AMUNDADOTTIR, L., *et al.* Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. In *Nature genetics* [interaktyvus]. 2009, vol. 41, no 9 [žiūrėta 2017 m. kovo 15 d.], p. 986–990. doi:10.1038/ng.429.
  81. TRÉGOUËT, D.A., *et al.* Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. In *Blood* [interaktyvus]. 2009 May 21, vol. 113, no. 21 [žiūrėta 2017 m. kovo 15 d.], p. 5298–303. doi: 10.1182/blood-2008-11-190389.
  82. DE MARTINO, M., *et al.* Evaluation of ABO blood group as a prognostic marker in renal cell carcinoma (RCC). In *BJU Int* [interaktyvus]. 2014, vol. 113, no. 5b:E62-6



[žiūrėta 2017 m. vasario 15 d.]. Prieiga per internetą:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053513>.

83. MUTHANA, S.M., *et al.* ABO blood type correlates with survival on prostate cancer vaccine therapy. In *Oncotarget* [interaktyvus]. 2015 Oct 13, vol. 6, no. 31 [žiūrėta 2017 m. vasario 15 d.], p. 32244–32256.
84. CAMPBELL, C.T., *et al.* Serum antibodies to blood group A predict survival on PROSTVAC-VF. In *Clin Cancer Res* [interaktyvus]. 2013 Mar 1, vol. 19, no. 5 [žiūrėta 2017 m. vasario 15 d.], p. 1290–1299.
85. CLYNE, M. Prostate cancer: Non-O blood type is VTE risk factor after radical prostatectomy. In *Nat Rev Urol* [interaktyvus]. 2013 Dec, vol. 10, no. 12 [žiūrėta 2017 m. vasario 15 d.], p. 680.
86. FRANCHINI, M., *et al.* Correlation between ABO Blood Group, and Conventional Hematological and Metabolic Parameters in Blood Donors. In *Semin Thromb Hemost* [interaktyvus]. 2016, vol. 42, no. 1 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 75–86.
87. GONG, P., *et al.* Relation of ABO blood groups to the severity of coronary atherosclerosis: an Gensini score assessment. In *Atherosclerosis* [interaktyvus]. 2014, vol. 237, no. 2 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 748–753.
88. HU, X., *et al.* Association between ABO blood group and acute myocardial infarction. In *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* [interaktyvus]. 2015, vol. 43, no. 9 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 785–787.
89. STAKISHAĖTIS, D.V.; IVASHKIAVICHENE, L.I.; ir NARVILENE, A.M. Atherosclerosis of the coronary arteries and the blood group in the population of Lithuania. In *Vrach Delo* [interaktyvus]. 1991 Aug, vol. 8 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 55–57.
90. SHIMIZU, K., *et al.* Blood type B might imply longevity. In *Exp Gerontol* [interaktyvus]. 2004, vol. 39 [žiūrėta 2017 m. kovo 15 d.], p. 1563–1565.
91. SPEECKAERT, M., *et al.* Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. In *Clin. Chim. Acta* [interaktyvus]. 2006, vol. 372 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 33–42.
92. YANG, F., *et al.* Human group-specific component (Gc) is a member of the albumin family. In *Proc. Nat. Acad. Sci* [interaktyvus]. 1985, vol. 82 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 7994–7998
93. VERBOVEN, C., *et al.* A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. In *Nat. Struct. Biol* [interaktyvus]. 2002, vol. 9, no. 4 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 131–136

94. GC [interaktyvus]. The National Center for Biotechnology Information group [žiūrėta 2017 m. balandžio 5 d.]. Updated on 16 Jan 2017. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2638>
95. FU, L., *et al.* Characterization of additional vitamin D binding protein variants. In *J Steroid Biochem Mol Biol* [interaktyvus]. 2016, vol. 159 [žiūrėta 2017 m. kovo 25 d.], p. 54–9.
96. SVASTI, J., *et al.* Molecular basis for the three major forms of human serum vitamin D binding protein (group-specific component). In *Biochemistry* [interaktyvus]. 1979 Apr 17, vol. 18, no. 8 [žiūrėta 2017 m. kovo 25 d.], p. 1611-7.
97. POWE, C.E., *et al.* Vitamin D–Binding Protein and Vitamin D Status of Black Americans and White Americans. In *N Engl J Med* [interaktyvus]. 2013, vol. 369 [žiūrėta 2017 m. kovo 25 d.], p. 1991–2020.
98. ROBIEN, K., *et al.* Drug-vitamin D interactions: a systematic review of the literature. In *Nutr Clin Pract* [interaktyvus]. 2013, vol. 28, no. 2 [žiūrėta 2017 m. kovo 26 d.], p. 194–208.
99. CARPENTER, T.O., *et al.* Vitamin D binding protein is a key determinant of 25-hydroxyvitamin D levels in infants and toddlers. In *J. Bone Miner. Res* [interaktyvus]. 2013, vol. 28 [žiūrėta 2017 m. kovo 26 d.], p. 213–221.
100. JANSSENS, W., *et al.* Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene. In *Thorax* [interaktyvus]. 2010, vol. 65 [žiūrėta 2017 m. balandžio 26 d.], p. 215–220.
101. WOOKEY, A.F., *et al.* Placental Vitamin D-Binding Protein Expression in Human Idiopathic Fetal Growth Restriction. In *J Pregnancy* [interaktyvus]. 2017, vol. 2017:5120267 [žiūrėta 2017 m. balandžio 2 d.].
102. SANTOS, B.R.; LECKE, S.B.; ir SPRITZER, P.M. Genetic variant in vitamin D-binding protein is associated with metabolic syndrome and lower 25-hydroxyvitamin D levels in polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study. In *PLoS One* [interaktyvus]. 2017, vol. 12, no. 3:e0173695 [žiūrėta 2017 m. balandžio 2 d.].
103. GREGORY, K.J., *et al.* Vitamin D binding protein-macrophage activating factor directly inhibits proliferation, migration, and uPAR expression of prostate cancer cells. In *PLoS One* [interaktyvus]. 2010 Oct 18, vol. 5, no. 10:e13428 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.].
104. SAKAKI, T., *et al.* CYP24A1 as a potential target for cancer therapy. In *Anticancer Agents Med Chem* [interaktyvus]. 2014, vol. 14, no. 1 [žiūrėta 2017 m. sausio 26 d.], p. 97–108.

105. GILBERT, R., *et al.* Associations of vitamin D pathway genes with circulating 25-hydroxyvitamin-D, 1,25-dihydroxyvitamin-D, and prostate cancer: a nested case-control study. In *Cancer Causes Control* [interaktyvus]. 2015, vol. 26, no. 2 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 205–218.
106. EPSTEIN, M.M., *et al.* Seasonal variation in expression of markers in the vitamin D pathway in prostate tissue. In *Cancer Causes Control* [interaktyvus]. 2012, vol. 23, no. 8 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 1359–1366.
107. WEINSTEIN, S.J., *et al.* Circulating 25-hydroxyvitamin D, vitamin D-binding protein and risk of prostate cancer. In *Int J Cancer* [interaktyvus]. 2013, vol. 132, no. 12 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 2940–2947.
108. TRUMMER, O., *et al.* Vitamin D and prostate cancer prognosis: a Mendelian randomization study. In *World J Urol* [interaktyvus]. 2016, vol. 34, no. 4 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 607–611.
109. TAGLIABUE, E.; RAIMONDI, S; ir GANDINI, S. Meta-analysis of vitamin D-binding protein and cancer risk. In *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [interaktyvus]. 2015, vol. 24, no. 11 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.], p. 1758–1765.
110. LAYNE, T.M., *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D, vitamin D binding protein, and prostate cancer risk in black men. In *Cancer* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2017 m. sausio 30 d.].
111. MONDUL, A.M., *et al.* Serum Vitamin D and Risk of Bladder Cancer. In *Prevention and Epidemiology* [interaktyvus]. 2010, [žiūrėta 2017 m. vasario 10 d.]
112. LI, F., *et al.* Identification of urinary Gc-globulin as a novel biomarker for bladder cancer by two-dimensional fluorescent differential gel electrophoresis (2D-DIGE). In *J Proteomics* [interaktyvus]. 2012, vol. 77 [žiūrėta 2017 m. vasario 10 d.], p. 225–236.
113. MONDUL, A.M., *et al.* Vitamin D-binding protein, circulating vitamin D and risk of renal cell carcinoma. In *Int J Cancer* [interaktyvus]. 2014, vol. 134, no. 11 [žiūrėta 2017 m. vasario 15 d.], p. 2699–26706.
114. MARK, K.A., *et al.* Vitamin D Promotes Protein Homeostasis and Longevity via the Stress Response Pathway Genes *skn-1*, *ire-1*, and *xbp-1*. In *Cell Rep* [interaktyvus]. 2016 Oct 25, vol. 17, no. 5 [žiūrėta 2017 m. kovo 26 d.], p. 1227–1237.
115. GOUNI-BERTHOLD, I.; KRONE, W.; ir BERTHOLD, H.K. Vitamin D and cardiovascular disease. In *Curr Vasc Pharmacol* [interaktyvus]. 2009 Jul, vol. 7, no. 3 [žiūrėta 2017 m. kovo 20 d.], p. 414–422.

116. *Oldest Old* [interaktyvus]. Encyclopedia of Population [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.encyclopedia.com/social-sciences/encyclopedias-almanacs-transcripts-and-maps/oldest-old>.
117. SCHMIDT, P., ir OKROI, M. Also sprach Landsteiner – Blood Group 'O' or Blood Group 'NULL'. In *Infus Ther Transfus Med* [interaktyvus]. 2001, vol. 28, no. 4 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 206–8.
118. SHASTRY, S.; MURUGESAN, M.; ir BHAT, S. Mixed field agglutination: Unusual causes and serological approach. In *Asian J Transfus Sci* [interaktyvus]. 2014 Jan-Jun, vol. 8, no. 1 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 4.
119. *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* [interaktyvus]. ThermoFisher Scientific [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.].
120. WILFINGER, W.W.; MACKAY, K.; ir CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. In *BioTechniques* [interaktyvus]. 1997, vol. 22 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 474–481.
121. LOGAN, J., *et al.* Gene Validation Software for Improved Normalization. - In: Real-time PCR: Current Technology and Applications. In *Caister Academic Press* [interaktyvus]. 2009, [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 47–64.
122. BUSTIN, S.A. *Real-Time PCR* [interaktyvus]. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. University of London, London, U.K. 2005. [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.]
123. KASNAUSKIENĖ, J. *Viso žmogaus genomo analizės metodai* [interaktyvus]. Mokomoji knyga. Vilnius: Vilniaus universitetas, 2014. [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.] 156 p. ISBN 978-609-417-082-9.
124. DZEMYDA, Gintautas; KURASOVA, Olga; ir ŽILINSKAS, Julius. *Daugiamatė duomenų vizualizavimo metodai* [interaktyvus]. Vilnius, 2008, [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 10–15.
125. HAMMER, Øyvind. *PAST PAleontological STatistics Version 3.15 Reference manual* [interaktyvus]. University of Oslo: 1999-2017 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.]. Prieiga per internetą: <http://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf>
126. GARRATTY, G.; GLYNN, S.A.; ir MCENTIRE, R. ABO and Rh(D) phenotype frequencies of different racial/ethnic groups in the United States. In *Transfusion* [interaktyvus]. 2004, vol. 44, no. 5 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 703–706.

127. TSUCHIMINE, S., *et al.* ABO Blood Type and Personality Traits in Healthy Japanese Subjects. In *PLoS One* [interaktyvus]. 2015, vol. 10, no. 5: e0126983 [žiūrėta 2017 m. kovo 16 d.].
128. BRECHER, M.E.; ir HAY, S.N. ABO blood type and longevity. In *Am J Clin Pathol* [interaktyvus]. 2011 Jan, vol. 135, no. 1 [žiūrėta 2017 m. kovo 16 d.], p. 96–98.
129. OHNO, Y., *et al.* Associations between ABO blood groups and biochemical recurrence after radical prostatectomy. In *Int J Clin Exp Med* [interaktyvus]. 2015 Feb 15, vol. 8, no. 2 [žiūrėta 2017 balandžio 12 d.], p. 2642–2648.
130. ENGEL, O., *et al.* The impact of the ABO and the Rhesus blood group system on outcomes in bladder cancer patients treated with radical cystectomy. In *World J Urol* [interaktyvus]. 2015, vol. 33, no. 11 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 1769–1776.
131. RADIŠAUSKAS, Ričardas, *et al.* Hypertension, serum lipids and cancer risk: A review of epidemiological evidence. In *Medicina* [interaktyvus]. 2016, vo. 52, no. 2 [žiūrėta 2017 m. balandžio 21 d.], p. 89–98.
132. LAFI, Z.M., *et al.* Association of rs7041 and rs4588 Polymorphisms of the Vitamin D Binding Protein and the rs10741657 Polymorphism of CYP2R1 with Vitamin D Status Among Jordanian Patients. In *Genet Test Mol Biomarkers* [interaktyvus]. 2015 Nov, vol. 19, no. 11 [žiūrėta 2017 balandžio 12 d.], p. 629–636.
133. LI, C., *et al.* Bioavailable 25(OH)D but Not Total 25(OH)D Is an Independent Determinant for Bone Mineral Density in Chinese Postmenopausal Women. In *EBioMedicine* [interaktyvus]. 2017 Feb, vol. 15 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 184–192.
134. KARAMI, S., *et al.* Pesticide exposure and inherited variants in vitamin d pathway genes in relation to prostate cancer. In *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [interaktyvus]. 2013 Sep, vol. 22, no. 9 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 1557–1566.
135. GRAVE, N., *et al.* A vitamin D pathway gene-gene interaction affects low-density lipoprotein cholesterol levels. In *J Nutr Biochem* [interaktyvus]. 2016 Dec, vol. 38 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 12–17.
136. JORDE, R., *et al.* The DBP Phenotype Gc-1f/Gc-1f Is Associated with Reduced Risk of Cancer. The Tromsø Study. In *PLoS One* [interaktyvus]. 2015 May 18, vol. 10, no. 5 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. e0126359
137. ABBAS, S., *et al.* The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin D status. *Cancer in Epidemiol Biomarkers Prev* [interaktyvus]. 2008 Jun, vol. 17, no. 6 [žiūrėta 2017 m. kovo 21 d.], p. 1339–1343.

## 1 PRIEDAS

### SUTIKIMAS DALYVAUTI BIOMEDICININIAME TYRIME

Aš perskaičiau šią Informuoto asmens sutikimo formą ir supratau man pateiktą informaciją.

Man buvo suteikta galimybė užduoti klausimus ir gavau mane tenkinančius atsakymus.

Supratau, kad galiu bet kada pasitraukti iš tyrimo, nenurodydama(s) priežasčių.

Supratau, kad norėdama(s) atšaukti sutikimą dalyvauti biomediciniame tyrime, raštu turiu apie tai informuoti tyrėją/kitą jo įgaliotą biomedicininį tyrimą atliekantį asmenį.

Patvirtinu, kad turėjau užtektinai laiko apsvastyti man suteiktą informaciją apie biomedicininį tyrimą.

Supratau, kad dalyvavimas šiame tyrime yra savanoriškas.

Patvirtinu, kad sutikimą dalyvauti šiame biomediciniame tyrime duodu laisva valia.

Leidžiu naudoti asmens duomenis ta apimtimi ir būdu, kaip nurodyta Informuoto asmens sutikimo formoje.

Patvirtinu, kad gavau Informuoto asmens sutikimo formos egzempliorių, pasirašytą tyrėjo.

Asmuo

				<i>MMMM-mm-</i>	<i>:_</i>
				<i>dd</i>	
_____	_____	_____	_____	_____	_____
vardas	pavardė	atstovavimo pagrindas	parašas	pasirašymo data	pasirašym o laikas

Patvirtinu, kad suteikiau informaciją apie biomedicininį tyrimą aukščiau nurodytam asmeniui.

Patvirtinu, kad asmeniui (ar kitam sutikimą duoti turinčiam teisę asmeniui) buvo skirta pakankamai laiko apsispręsti dalyvauti biomediciniame tyrime, atsižvelgiant į biomedicininio tyrimo pobūdį, taip pat įvertinus kitas aplinkybes, galinčias daryti įtaką priimamam sprendimui.

Aš skatinau asmenį (ar kitą sutikimą turintį teisę duoti asmenį) užduoti klausimus ir į juos atsakiau.

Tyrėjas

				<i>MMMM-mm-</i>	<i>:_</i>
				<i>dd</i>	
_____	_____	_____	_____	_____	_____
vardas	pavardė	pareigos tyrime	parašas	pasirašymo data	pasirašym o laikas

## 2 PRIEDAS

### INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA

Biomedicininio / klinikinio vaistinio preparato tyrimo pavadinimas:

**Tyrimo pavadinimas: Ilgaamžių vitaminą D prijungiančio baltymo variantų ir AB0 kraujo grupių dažnio tyrimas.**

Protokolo Nr.: 2

Užsakovas: LSMU

Adresas: A.Mickevičiaus 9, Kaunas Tel.:(837)327201El. paštas:

Vaiva.Lesauskaite@lsmuni.lt

Užsakovo atstovas: Prorektorė mokslui Vaiva Lesauskaitė

Atsakingas tyrėjas<sup>1</sup>: prof. Dalia Žaliūnienė

Tyrimo centro pavadinimas:

LSMU ligoninės Kauno klinikos Akių klinika

Adresas:Eivenių 2, Kaunas Tel.: +37065535505. El. paštas: daliazal@yahoo.com

#### **1. Kokia šio dokumento paskirtis?**

Šioje formoje pateikiama Jums skirta informacija apie biomedicininį tyrimą, aptariamos tyrimo atlikimo priežastys, mokslinio tyrimo procedūros, nauda, rizika, galimi nepatogumai ir kita svarbi informacija. Jei nuspręsite dalyvauti, prašysime Jūsų pasirašyti šią sutikimo formą, kuria sutinkate tyrimo metu vykdyti gydytojo tyrėjo ir tyrimo komandos nurodymus. Pasirašydami šį dokumentą, sutinkate dalyvauti moksliniame tyrime. Neskubėkite ir atidžiai perskaitykite šį dokumentą, jei nesupratote kokio nors žodžio ar teiginio, visus iškilusius klausimus būtinai užduokite tyrimo gydytojui ar kitiems tyrimo komandos nariams. Prieš priimdami sprendimą, galite pasitarti su šeimos nariais, draugais ar savo gydytoju.

#### **2. Kodėl atliekami biomedicininiai tyrimai?**

Svarbu suprasti, kad nors biomedicininio tyrimo metu Jums atliekami sveikatos patikrinimai ar medicininės procedūros, biomedicininis tyrimas iš esmės skiriasi nuo įprastos (kasdienės)

---

<sup>1</sup> Jeigu tyrėjo adresas nesutampa su tyrimo centro adresu – nurodykite abu

klinikinės praktikos. Įprastos (kasdienės) klinikinės praktikos tikslas yra Jus (t. y. konkretų asmenį, pacientą) išgydyti ir/ar pagerinti Jūsų sveikatos būklę. Pagrindinis biomedicininio(mokslinio) tyrimo tikslas – gauti naujų medicinos mokslo žinių, kurios ateityje padėtų kitų šia liga sergančių pacientų sveikatai. Kitaip tariant, pagrindinis šio tyrimo tikslas nėra tiesioginė nauda Jūsų sveikatai.

### **3. Kodėl atliekamas šis tyrimas?**

Šio tyrimo tikslas - nustatyti AB0 kraujo grupių, vitamino D prijungiančio baltymo (VDPB) variantų bei VDPB geno dažnį ilgaamžių grupėje.

Atsparumas ligoms, įskaitant vėžines, iš dalies priklauso nuo žmogaus genetikos. Ilgaamžiškumui bei ligoms išvengti reikšmės gali turėti kraujo grupė ir pakankama vitamino D koncentracija kraujyje.

### **4. Kokie asmenys pasirenkami dalyvauti šiame tyrime?**

Jūs pasirinktas, nes esate vyresnio amžiaus žmogus, ilgaamžis. Jūsų genų struktūra gali būti palanki pasiekti ilgą aktyvų amžių.

### **5. Kas atliekaužsako šį biomedicininį tyrimą?**

Šio klinikinio tyrimo užsakovas yra Lietuvos sveikatos mokslų universitetas.

### **6. Tikimybė patekti į skirtingas tiriamųjų grupes ir dalyvavimo šiose grupėse ypatybės.**

Šiame tyrime dalyvaus visi ilgaamžiai, atvykę kataraktos operacijai į Alių kliniką ir sutikę dalyvauti tyrime.

### **7. Kiek truks Jūsų dalyvavimas šiame tyrime?**

Bendra tyrimo trukmė – aštuoni mėnesiai. Jūs dalyvausite, kol vieną kartą duosite kraują, jei perskaitę šią formą ją pasirašysite ir sutiksite dalyvauti tyrime.

### **8. Kokiose šalyse bus vykdomas šis tyrimas?**

Tyrimas bus vykdomas tik Lietuvoje.

### **9. Kiek tiriamųjų dalyvaus numatyta šiame tyrime?**

Tikimasi, kad šiame biomedicininiame/ klinikiniame vaistiniotyrimedalyvaus 150 ilgaamžių.

### **10. Ką Jums reikės daryti?**

Prašysime Jūsų leisti šio tyrimo tikslais iš venos paimti nedidelį kiekį kraujo (5 ml).

### **11. Ar dalyvavimas biomedicininiame tyrime Jums bus naudingas? / Kokios naudos galite tikėtis dalyvaudami šiame tyrime?**

Tiriamieji tiesioginės naudos iš dalyvavimo tyrime negaus. Jų kraujo grupių ir kai kurių genetinių žymenų tyrimas pasitarnaus mokslo žinioms apie sėkmingą senėjimą.

### **12. Kokia su dalyvavimu šiame tyrime susijusi rizika ir nepatogumai?**

Sugaištas laikas. Imant kraujo mėginį tyrimams galite jausti nedidelį skausmą, dūrio vietoje galima kraujosruva (mėlynė), infekcija.



Jums dalyvaujant tyrime nebus skiriama jokių papildomų gydomųjų vaistinių preparatų. Atliekami tyrimai saugūs, todėl Jums dalyvaujant tyrime papildomos rizikos ir žalos nenumatoma. Nebus atliekamos jokios invazinės procedūros, numatomas tik kraujo paėmimas iš venos.

### **13. Jei atsitiktų kas nors negero? (Informacija apie draudimą)**

LSMU ligoninė Kauno klinikos yra apsidraudusi civilinės atsakomybės draudimu, kuris užtikrina žalos atlyginimą pacientams, jei žala atsirastų biomedicininio tyrimo metu. Susipažinti su civilinės atsakomybės draudimo sutartimi galite pas tyrėjus. Žalos atveju kreiptis į tyrėjus.

### **14. Ar galėsite nutraukti dalyvavimą tyrime?**

Jei nuspręsite pasitraukti iš tyrimo dar nepaėmus kraujo, galite tai padaryti parašę laisvos formos atsisakymo prašymą.

### **15. Kokias pasirinkimo galimybes turėsite, jeigu nesutiksite dalyvauti šiame tyrime arba atšauksite sutikimą jame dalyvauti?**

Tyrime dalyvaujate savanoriškai, todėl turite teisę atsisakyti, o pradėjęs galite bet kada iš jo pasitraukti. Jūsų sprendimas atsisakyti dalyvauti ar nutraukti dalyvavimą tyrime nedarys jokios įtakos teikiamai įprastinei sveikatos priežiūrai.

### **16. Ar dalyvaudami šiame tyrime patirsite kokių nors išlaidų?**

Dalyvaudami tyrime išlaidų nepatirsite.

### **17. Ar Jūsų asmens duomenys bus konfidencialūs?**

Biomedicininį tyrimą atliekant gauta sveikatos informacija, leidžianti nustatyti asmens tapatybę, yra konfidenciali ir gali būti teikiama tik Lietuvos Respublikos pacientų teisių ir žalos sveikatai atlyginimo įstatymo ir Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo nustatyta tvarka;

Biomedicininį tyrimą atliekant gauta sveikatos informacija nelaikoma konfidencialia ir gali būti paskelbta be tiriamojo asmens sutikimo, jeigu paskelbus tokią sveikatos informaciją nebus galima tiesiogiai ar netiesiogiai nustatyti asmens tapatybės;

Duomenų valdytojas yra LSMU ligoninė Kauno klinikos, juridinio asmens kodas 135163499, adresas: Eivenių g. 2, Kaunas LT-50161.

Biomedicininio tyrimo metu surinkti Jūsų asmens duomenys bus saugomi kaip dalis paciento medicinos duomenų įrašų tyrimo centre 5 metus po tyrimo pabaigos. Vėliau Jūsų asmens duomenys bus sunaikinti tyrimo centro nustatyta tvarka. Už dokumentų ir informacijos saugojimą atsakingas biomedicininio tyrimo centras (LSMU ligoninė Kauno klinikos).

### **18. Kas ir koku tikslu galės susipažinti su Jūsų asmens duomenimis?**

Siekiant išsaugoti Jūsų duomenų konfidencialumą Jums bus suteiktas specialus kodas, kuris bus nurodomas visuose dokumentuose, išskyrus sutikimo formą. Sąrašą, kuriame yra Jūsų vardas ir pavardė siejami su kodu, saugos pagrindinis tyrėjas. Užsakovui informacija apie tyrimo rezultatus bus perduota tik nuasmeninta.

Su duomenimis, leidžiančiais tiesiogiai nustatyti Jūsų tapatybę (nežkoduotais duomenimis) bus leidžiama susipažinti tik tyrime dalyvaujantiems tyrėjams. Kitiems suinteresuotiems asmenims (užsakovo įgaliotiems atstovams, kontroliuojančių institucijų darbuotojams) bus teikiami užkoduoti duomenys, neleidžiantys tiesiogiai nustatyti Jūsų tapatybės („užkoduoti“ reiškia, kad dokumentuose bus nurodomas ne Jūsų vardas ir pavardė, o specialus numeris, kurį susieti su Jūsų asmeniu galės tik gydytojas tyrėjas).

**19. Kiek laiko bus saugomi tyrimo metu surinkti duomenys ir kas už tai bus atsakingas?**

Biomedicininio tyrimo metu surinkti Jūsų asmens duomenys bus saugomi kaip dalis paciento medicinos duomenų įrašų tyrimo centre 5 metus po tyrimo pabaigos. Vėliau Jūsų asmens duomenys bus sunaikinti tyrimo centro nustatyta tvarka. Už dokumentų ir informacijos saugojimą atsakingas biomedicininio tyrimo centras (LSMU ligoninė Kauno klinikos).

**20. Kas įvertino šį biomedicininį tyrimą? / Į ką kreiptis, jeigu iškiltų klausimų?**

Dėl savo kaip tyrimo dalyvio teisių galite kreiptis į leidimą atlikti šį biomedicininį tyrimą išdavusį Kauno regioninį biomedicininių tyrimų etikos komitetą, Lietuvos Sveikatos mokslų universitetas, Mickevičiaus g. 9, LT-44307, Kaunas, tel. (8-37) 326889, el. paštas: [kaunorbtek@lsmuni.lt](mailto:kaunorbtek@lsmuni.lt).



## Research Article

# Investigation of Vitamin D-Binding Protein Polymorphism Impact on Coronary Artery Disease and Relationship with Longevity: Own Data and a Review

Donatas Stakisaitis,<sup>1,2</sup> Vita Lesauskaitė,<sup>3</sup> Milda Girduškaitė,<sup>1</sup> Ernestas Janulionis,<sup>4</sup> Albertas Ulys,<sup>5</sup> and Rimantas Benetis<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cancerogenesis and Cancer Epidemiology, Scientific Research Center, National Cancer Institute, Santariskiu 1, LT-08660 Vilnius, Lithuania

<sup>2</sup>Department of Biolog, Mykolas Romeris University, Ateities 21, LT-08303 Vilnius, Lithuania

<sup>3</sup>Department of Geriatrics, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, A. Mickėvičiaus 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania

<sup>4</sup>Radiation and Medical Oncology Clinics, National Cancer Institute, Santariskiu 1, LT-08660 Vilnius, Lithuania

<sup>5</sup>Oncosurgery Clinics, National Cancer Institute, Santariskiu 1, LT-08660 Vilnius, Lithuania

<sup>6</sup>Institute of Cardiology of the Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Sukileliu 17, LT-50161 Kaunas, Lithuania

Correspondence should be addressed to Donatas Stakisaitis; [dstakisaitis@yahoo.com](mailto:dstakisaitis@yahoo.com)

Received 7 January 2016; Accepted 23 March 2016

Academic Editor: Zhongjian Xie

Copyright © 2016 Donatas Stakisaitis et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of the study was to assess the effect of vitamin D-binding protein (DBP) polymorphism on coronary artery disease (CAD). DBP phenotypes were identified in the groups: control ( $n = 306$ ), men suffering from CAD ( $n = 154$ ), and long-lived individuals ( $n = 108$ ). Isoelectric focusing of DBP phenotypes in serum was performed on polyacrylamide gel. Distribution of DBP phenotypes in the study groups was found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. Gc1s-1s phenotype and Gc1s allele frequency in CAD groups were significantly higher than in control, and Gc1s allele frequency was found significantly more often in CAD compared with long-lived group ( $p < 0.05$ ). The Gc2 allele frequency in control was higher as compared with Gc2 frequency in CAD group ( $p < 0.05$ ). The Gc2-2 phenotype was more frequent in long-lived survivors than in the CAD group ( $p < 0.05$ ). It was found that the Gc1s allele significantly increased the risk of CAD with the odds ratio (OR) equal to 1.45 ( $p < 0.02$ ) and showed Gc2 to be related with a decreased risk of CAD (OR = 0.69;  $p < 0.03$ ). Authors review the role of DBP in resistance to atherosclerosis and cancer as the main longevity determinants.

## 1. Introduction

Long-lived individuals are an important antiatherogenic control group for the evaluation of genetic markers in the pathogenesis of atherosclerosis. The longevity genetic markers in the Lithuanian population were found to be the low level of apolipoprotein B (apoB) and the apolipoprotein E (apoE), the low apoB/apoA-1 ratio, and the  $\epsilon$  gene responsible for dry cerumen [1, 2]. The  $PI^*Z$  gene of the alpha-1-proteinase inhibitor was significantly more frequent in patients with coronary artery disease (CAD) than in

long-lived individuals [3], and the 0 blood group can serve as a protective antiatherogenic factor in women; in long-lived individuals, the B blood group was significantly more rare than in healthy population and in CAD patients in the Lithuanian population [4].

The aging process and mortality are associated with the insufficiency of vitamin D: the low serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) level has been linked to all-cause, cardiovascular, cancer and infection-related mortality [5]. An optimal concentration of vitamin D delaying the aging phenomenon and low 25(OH)D concentrations might be a marker for

## Research Article

# Investigation of Vitamin D-Binding Protein Polymorphism Impact on Coronary Artery Disease and Relationship with Longevity: Own Data and a Review

Donatas Stakisaitis,<sup>1,2</sup> Vita Lesauskaitė,<sup>3</sup> Milda Girdauskaitė,<sup>1</sup> Ernestas Janulionis,<sup>4</sup> Albertas Ulys,<sup>5</sup> and Rimantas Benetis<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cancerogenesis and Cancer Epidemiology, Scientific Research Center, National Cancer Institute, Santariskiu 1, LT-08660 Vilnius, Lithuania

<sup>2</sup>Department of Biolog, Mykolas Romeris University, Ateities 21, LT-08303 Vilnius, Lithuania

<sup>3</sup>Department of Geriatrics, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, A. Mickevičiaus 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania

<sup>4</sup>Radiation and Medical Oncology Clinics, National Cancer Institute, Santariskiu 1, LT-08660 Vilnius, Lithuania

<sup>5</sup>Oncosurgery Clinics, National Cancer Institute, Santariskiu 1, LT-08660 Vilnius, Lithuania

<sup>6</sup>Institute of Cardiology of the Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Sukileliu 17, LT-50161 Kaunas, Lithuania

Correspondence should be addressed to Donatas Stakisaitis; [dstakisaitis@yahoo.com](mailto:dstakisaitis@yahoo.com)

Received 7 January 2016; Accepted 23 March 2016

Academic Editor: Zhongjian Xie

Copyright © 2016 Donatas Stakisaitis et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of the study was to assess the effect of vitamin D-binding protein (DBP) polymorphism on coronary artery disease (CAD). DBP phenotypes were identified in the groups: control ( $n = 306$ ), men suffering from CAD ( $n = 154$ ), and long-lived individuals ( $n = 108$ ). Isoelectric focusing of DBP phenotypes in serum was performed on polyacrylamide gel. Distribution of DBP phenotypes in the study groups was found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. Gc1s-1s phenotype and Gc1s allele frequency in CAD groups were significantly higher than in control, and Gc1s allele frequency was found significantly more often in CAD compared with long-lived group ( $p < 0.05$ ). The Gc2 allele frequency in control was higher as compared with Gc2 frequency in CAD group ( $p < 0.05$ ). The Gc2-2 phenotype was more frequent in long-lived survivors than in the CAD group ( $p < 0.05$ ). It was found that the Gc1s allele significantly increased the risk of CAD with the odds ratio (OR) equal to 1.45 ( $p < 0.02$ ) and showed Gc2 to be related with a decreased risk of CAD (OR = 0.69;  $p < 0.03$ ). Authors review the role of DBP in resistance to atherosclerosis and cancer as the main longevity determinants.

## 1. Introduction

Long-lived individuals are an important antiatherogenic control group for the evaluation of genetic markers in the pathogenesis of atherosclerosis. The longevity genetic markers in the Lithuanian population were found to be the low level of apolipoprotein B (apoB) and the apolipoprotein E (apoE), the low apoB/apoA-1 ratio, and the *d* gene responsible for dry cerumen [1, 2]. The *PI\*Z* gene of the alpha-1-proteinase inhibitor was significantly more frequent in patients with coronary artery disease (CAD) than in

long-lived individuals [3], and the 0 blood group can serve as a protective antiatherogenic factor in women; in long-lived individuals, the B blood group was significantly more rare than in healthy population and in CAD patients in the Lithuanian population [4].

The aging process and mortality are associated with the insufficiency of vitamin D: the low serum 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) level has been linked to all-cause, cardiovascular, cancer and infection-related mortality [5]. An optimal concentration of vitamin D delaying the aging phenomenon and low 25(OH)D concentrations might be a marker for

TABLE 1: Gc gene SNPs and DBP genetic polymorphism.

SNPs of Gc gene	DBP system	
	Alleles	Genotypes/phenotypes
rs7041 T (Asp)	Gc1f	Gc1f-1f
rs4588 C (Thr)		Gc1f-1s
rs7041 G (Glu)	Gc1s	Gc1f-2
rs4588 C (Thr)		Gc1s-1s
rs7041 G (Glu)	Gc2	Gc1s-2
rs4588 A (Lys)		Gc2-2

a poor health status related to premature mortality [6]. The lower 25(OH)D levels observed in females as compared with males play a more relevant role in conditioning the severity of CAD; in males, vitamin D status was independently related to the prevalence of CAD [7]. The joint effect of low serum 25(OH)D and low DBP levels is associated with the risk of frailty, and serum DBP levels affect the 25(OH)D-frailty relationship in older men [8].

The major transporter of vitamin D metabolites in blood circulation is the multifunctional plasma vitamin D-binding protein (DBP), also known as a human group specific component (Gc) [9]. The plasma 25(OH)D and DBP levels are related to the DBP phenotype [10, 11]. The DBP has a significantly lower affinity constant for 25(OH)D as compared with the Gc1s or Gc1f isoforms [9].

The Gc gene, which encodes the DBP, maps to chromosome 4q12-q13 [12]. There are three common phenotypic alleles in the DBP, Gc1s (slow), Gc1f (fast), and Gc2, differing by combinations of two nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms (SNPs), rs4588 and rs7041, which differ by amino acid substitutions and by their glycosylation pattern in the DBP (galactose and sialic acid in both Gc1s and Gc1f; galactose only in Gc2); rs7041 (G→T) encodes for the glutamic acid to aspartic acid change, while rs4588 (C→A) encodes for the threonine to lysine change. The DBP variants Gc1s, Gc1f, and Gc2 are a haplotypic combination of rs7041 and rs4588, where Gc1s = rs7041 (G) and rs4588 (C), Gc1f = rs7041 (T) and rs4588 (C), and Gc2 = rs7041 (T) and rs4588 (A). The combination of the 3 DBP variants results in six common phenotypes [13–15] (Table 1).

Plasma samples from patients and healthy volunteers confirmed a significantly higher concentration of DBP in atherosclerotic subjects [16]. No differences in DBP phenotype frequencies of the Gc gene polymorphisms and in serum DBP levels between type 1 diabetic patients and control subjects were found, whereas the association between Gc gene polymorphism and patients with type 2 diabetes mellitus has produced conflicting results [17, 18].

The DBP serum level may be a biomarker for a vascular injury having important prognostic and diagnostic implications [19]. The DBP also plays an important role in the response to tissue injury as DBP can be converted to a macrophage-activating factor [20]. Another role of DBP in response to injury is to scavenge for vascular and extracellular actin as a result of cellular necrosis, and DBP has been shown to be present in lower circulating concentrations in inflammatory or necrotic processes [21–23]. DBP serves as a growth factor for vascular smooth muscle cells [24], and it

has been found in thrombotic plaques of coronary arteries [25].

Comparing donors, patients with CAD, and long-lived individuals, the Gc1s allele was significantly most frequent in CAD study groups. Comparing CAD patients and long-lived individuals, the Gc2-2 phenotype was significantly more frequent in the group of long-lived individuals. Authors discuss the possible mechanisms of atherogenesis and other important longevity factors in relationship with DBP polymorphism.

## 2. Materials and Methods

The DBP phenotypes have been identified in the following groups of Lithuanian population individuals: control (blood donors;  $n = 306$ ; aged 19 to 52 years); common men suffering from CAD (aged 28 to 72 years) (coronary atherosclerosis plaques were diagnosed by coronarography and during coronary bypass surgery; CAD group was formed with the exclusion criteria for type 1 and type 2 diabetes mellitus); long-lived individuals with no data of myocardial infarction ( $n = 108$ ; men aged 85 to 102 years ( $n = 38$ ), women aged 90 to 103 years ( $n = 70$ )). The study groups contained only Caucasian (white) population. The institutional and ethical approval of the study was obtained. The isoelectric focusing of DBP phenotypes was performed on thick polyacrylamide gel with ampholytes pH 3.5–5.0, 4.5–6.5, and 4.2–5.0. We assessed the combined effects of two known polymorphisms in the Gc gene (rs4588 and rs7041) composing the alleles Gc1s, Gc1f, and Gc2 on CAD risk and relationship with longevity. Statistical analysis was performed using SPSS 21.0 and the R project 2.8.1. Frequency of DBP phenotypes was calculated with reference to Hardy-Weinberg equilibrium. Categorical data are expressed as frequencies and percentages. The normal approximation method was used to calculate 95% confidence intervals for DBP allele frequencies. Chi-square test was used to test for the Hardy-Weinberg equilibrium and comparison of DBP phenotype frequencies among the groups. We calculated the relative risk (measured as an odds ratio (OR)) and the corresponding 95% confidence intervals (95% CI) to find out the association of DBP alleles with CAD and longevity. The result was considered significant at the  $p$  value  $< 0.05$ .

In the literature review we included DBP relationship with atherogenesis and cancer while resistance to cancerogenesis is an additional important determinant for longevity. The literature retrieval was accessed through PubMed (1986–2015) using the terms of vitamin D-binding protein, atherosclerosis, and longevity, including the appropriate Boolean operators “AND” and “OR.”

## 3. Results

**3.1. DBP Phenotype Frequency in the Study Groups.** The frequency of DBP phenotypes in the population (control group) was as follows: Gc1s-1s, 38.2%; Gc1s-1f, 9.8%; Gc1s-2, 38.9%; Gc1f-1f, 0.3%; Gc1f-2, 5.5%; Gc2-2, 7.2% (Table 2). The distribution of the DBP phenotypes in all study groups was found to be in the Hardy-Weinberg equilibrium.

TABLE 2: DBP phenotype frequency in the studied groups.

Groups	n	DBP phenotype					
		Gc1s-1s n (%)	Gc1s-1f n (%)	Gc1s-2 n (%)	Gc1f-1f n (%)	Gc1f-2 n (%)	Gc2-2 n (%)
Control	306	117 (38.2)	30 (9.8)	119 (38.9)	1 (0.3)	17 (5.5)	22** (7.2)
CAD	154	78† (50.6)	14 (9.1)	48 (31.2)	1 (0.7)	5 (3.2)	8 (5.2)
Long-lived	108	45 (41.7)	8 (7.4)	37 (34.3)	0	3 (2.8)	15 (13.9)*

\*Gc2-2 phenotype frequency in the long-lived compared with the CAD group ( $p < 0.02$ ).

\*\*Gc2-2 phenotype frequency in the control compared with the long-lived group ( $p < 0.04$ ).

†Gc1s-1s phenotype frequency in the CAD compared with the control group ( $p < 0.02$ ).

TABLE 3: DBP alleles frequency in the studied groups.

Groups	Total alleles n	DBP alleles frequency (%; 95% CI)			$p^*$
		Gc1s	Gc1f	Gc2	
Control	612	62.6 (58.8–66.4)	8.0 (5.9–10.1)	29.4 (25.8–33.0)	
CAD	308	70.8 (65.7–75.8)**	6.8 (4.0–9.6)	22.4 (17.7–27.0)†	<0.05
Long-lived	216	62.5 (56.0–69.0)***	5.1 (2.2–8.0)	32.4 (26.2–38.6)‡	

\*Gc1s allele frequency compared with Gc1f or Gc2 alleles frequency in the study groups.

\*\*Gc1s allele frequency in the CAD compared with the control group ( $p < 0.02$ ).

\*\*\*Gc1s allele frequency in the long-lived compared with the CAD group ( $p < 0.05$ ).

‡Gc2 allele frequency in the long-lived compared with CAD group ( $p < 0.02$ ).

†Gc2 allele frequency in the CAD compared with the control group ( $p < 0.03$ ).

The CAD group Gc1s-1s phenotype frequency was significantly higher compared with the Gc1s-1s phenotype frequency in the control group ( $p < 0.02$ ).

As to the frequency of the Gc2-2 phenotype between the CAD and long-lived groups, the Gc2-2 phenotype was significantly more frequent in the long-lived group ( $p < 0.02$ ).

A significant difference of Gc2-2 phenotype frequency was found between the control and long-lived groups ( $p < 0.04$ ).

**3.2. DBP Polymorphism in CAD and Long-Lived Survivors Groups.** In the control and in patients with CAD and long-lived individuals the Gc1s allele was most frequent: it was statistically more frequent than the Gc1f and Gc2 alleles ( $p < 0.05$ ; Table 3).

The Gc1s allele frequency in the CAD group was higher than in the control group ( $p < 0.02$ ). The difference of the Gc1s allele frequency in the long-lived group compared with the CAD group was also significant, being more frequent in CAD patients ( $p < 0.05$ ).

The Gc2 allele in the control was significantly more frequent than in the CAD group ( $p < 0.03$ ). The Gc2 allele frequency in the CAD group compared with the long-lived group was statistically significant; the Gc2 allele was more frequent in the long-lived group ( $p < 0.02$ ).

The Gc1s allele was found to significantly increase the risk of CAD (OR 1.45; CI 95% = 1.08–1.95,  $p < 0.02$ ). Also, the OR showed that the Gc2 allele was related to a decreased risk of CAD (OR = 0.69; CI 95% = 0.50–0.95,  $p < 0.03$ ). No statistical significance of Gc1f allele carriers in association

with CAD was found (OR = 0.84, CI 95% = 0.49–1.43,  $p > 0.05$ ). Based on the results of OR, the Gc1s allele neither increases nor decreases longevity (OR = 1, CI 95% = 0.72–1.37,  $p > 0.05$ ). Statistically not significant results were obtained with the Gc1f carriers in long-lived survivors (OR = 0.62, CI 95% = 0.31–1.21,  $p > 0.05$ ).

The study of the association between CAD and DBP phenotypes has shown that the Gc1s-1s phenotype statistically increases the risk of coronary atherosclerosis (OR = 1.66, CI 95% = 1.12–2.45,  $p < 0.02$ ). A significant relationship between the Gc2-2 phenotype and longevity was revealed (OR = 2.08, CI 95% = 1.04–4.18,  $p < 0.04$ ). No significant statistical association of OR among the other DBP phenotypes was found both in the CAD group and in the long-lived survivors group.

#### 4. Discussion

Protection from atherosclerosis and resistance to cancer are the main longevity reasons. Long-lived survivors as the control cohort are important for evaluating the role of genetic determinants in atherogenesis, cancerogenesis, and other diseases related to mortality. Recent studies show that an optimal concentration of vitamin D is important in delaying aging-related phenomena and acts as a protective factor against atherogenesis and cancer-related mortality. According to the meta-analysis of prospective cohort studies from Europe and the United States, the lowest quintile of serum 25(OH)D concentration was associated with increased all-cause and cardiovascular mortality and an association with cancer mortality observed in subjects with a history

of cancer [6]. Several atherosclerosis-related common aging-associated diseases such as osteoporosis, hypertension, and diabetes are known to be vitamin D-dependent [26].

The atherosclerosis development is a multistep process associated with aging. Atherosclerosis and chronic inflammatory mechanisms involved in a chronic disease are in CAD coexistence [27]. Overweight and obesity resulting in clinical conditions such as the metabolic syndrome, early atherosclerosis, dyslipidemia, hypertension, and type 2 diabetes mellitus, all leading to high mortality rates in young adults, change the current increasing trend of worldwide longevity [28]. The risk factors associated with the leading causes of death from cancer (lung, renal, colorectal, breast, uterus, stomach, and liver) include also overweight/obesity [29, 30]. The further change in mortality patterns will accompany success in the reduction of the number of mortalities attributable to degenerative conditions such as CAD and cancer [31].

**4.1. DBP and Long-Lived Survivors.** The study data suggest that the multifunctional plasma protein DBP, a major transporter of vitamin D metabolites in the circulation, could be one of the genetic determinants related to longevity. There are three common codominant phenotype alleles known as Gc1s, Gc1f, and Gc2, differing by amino acid substitutions as well as glycosylation [13]. Gc2 is glycosylated with a terminal galactose, whereas Gc1s and Gc1f contain both galactose and sialic acid [32]. From widespread use in population genetics, the frequency of Gc2 is known to be highest among whites and lowest among black Africans, whereas the opposite is true for Gc1f [33]. The plasma concentration of DBP depends on the DBP phenotype being highest in Gc1-1 (Gc1s-1s, Gc1s-1f, and Gc1f-1f), intermediate in Gc1-2 (Gc1s-2, Gc1f-2), and lowest in Gc2-2 [34, 35]. The genetic variation of DBP has the potential to alter serum 25(OH)D concentrations. *In vitro* data have shown that the Gc2 allele has a significantly lower affinity constant for 25(OH)D compared to the Gc1s or Gc1f alleles [9, 36]. Individuals with two copies of the Gc2 allele (Gc2-2) have significantly lower 25(OH)D serum concentrations compared with other DBP phenotypes [10, 11, 37]. DBP concentration and DBP phenotypes were significant predictors of 25(OH)D concentration, even after adjustment for the effects of the season, sunbathing habits, skin thickness, the use of vitamin supplements, smoking, and body mass index [35].

In the study, CAD group was formed of patients with exclusion criteria of type 1 and type 2 diabetes mellitus. The meta-analysis demonstrated that the DBP polymorphism was moderately associated with an increased susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Asians, but no such association was found in European populations [17]. No differences in DBP phenotype or allele frequencies of the DBP polymorphism and in serum DBP levels between type 1 diabetic patients and control subjects were found [18].

The study data revealed the Gc2 allele and the Gc2-2 phenotype to be statistically more frequent in the long-lived group as compared with the CAD group in the Lithuanian population. A significant relationship between the Gc2-2 phenotype and longevity was revealed (OR = 2.08). In the

literature, we have found no more data related to DBP polymorphism studies in the long-lived survivors.

**4.2. Atherogenesis, Vitamin D, and Genetic Markers of Longevity.** The study data show a significant increase of the Gc1s allele and Gc1s-1s phenotype frequency in the CAD patient groups compared with the control and long-lived individuals in the Lithuanian population. The Gc2 allele could be a marker of resistance to atherogenesis: the Gc2 allele in the control and in long-lived groups was significantly more frequent than in the CAD groups.

The DBP plasma level may be a biomarker for vascular injury, which will have important prognostic and diagnostic implications [19]. Besides serving as a transporter of vitamin D, DBP also plays an important role in response to tissue injury, in which DBP can be converted to a macrophage-activating factor (DBP-MAF) stimulating macrophages [20]. Another role of DBP in response to injury is to scavenge for vascular and extracellular actin as a result of cellular necrosis, and DBP has been shown to be in lower circulating concentrations in the presence of inflammatory or necrotic diseases [21–23]. DBP both has a chemotactic function and serves as a growth factor for vascular smooth muscle cells [24]. DBP has been found in thrombotic plaques of coronary arteries [25]. Patients with acute coronary syndromes have a persistent elevation of plasma DBP over 6 months as compared to healthy volunteers [38]. Plasma samples from patients and healthy volunteers confirmed a significantly higher concentration of DBP in atherosclerotic subjects [16]. On the contrary, other investigators found decreased levels of DBP in the plasma of patients statistically correlated with the number of affected coronary arteries [39]. Human studies evaluating the relationship between 25(OH)D and apoA-I and HDL-cholesterol (HDL) mostly suggest a positive link between increasing 25(OH)D levels and plasma apoA-I and HDL, whereas high 25(OH)D levels provide enhanced atheroprotection [40]. High plasma levels of HDL have protective effects on atherosclerosis and CAD [41, 42]. HDL biomarkers (HDL, ApoA-I) and low-density-lipoprotein (LDL) cholesterol biomarkers (LDL, Apo B) were directly associated with 25(OH)D; HDL-cholesterol biomarker levels were positively associated with higher 25(OH)D levels, and such relationship was stronger than those of LDL or free cholesterol [42, 43]. 25(OH)D deficiency was associated with increased apoB among children [44]. In middle-aged and older men, the low serum 25(OH)D concentration was associated with an increased risk of death mainly in those with a lower magnesium intake [45].

Investigations in the Lithuanian population revealed that the low serum apoB level and especially low apoB/apoA-I may be longevity markers. Another longevity marker was found to be dry cerumen. A significant increase in the frequency of the *d* gene responsible for dry cerumen in long-lived individuals was found as compared with the control. The ratio apoB/apoA-I was higher in the donors with a humid ear wax (*w* gene) than in those with the dry variant [1]. The *PI\*Z* gene of the alpha-1-proteinase inhibitor was significantly more frequent in patients with coronary atherosclerosis than in long-lived survivors, and

the local as well as systemic inactivation of the alpha-1-proteinase inhibitor in the atherosclerotic process could be related to hyperlipidemia: congenital (alpha-1-proteinase inhibitor deficiency, hyperlipidemia) and acquired (related to smoking, chronic inflammatory diseases, aging) imbalance of the proteinase-antiproteinase system is considered to be one of the atherogenic factors [3]. The B blood group can be related to coronary atherosclerosis, while the O blood group can possibly serve as a protective antiatherogenic factor in women in the Lithuanian population. In the long-lived individuals, the frequency of the B group was significantly rarer than in the healthy control [4]. The Lithuanian population showed a very strong negative correlation of the apoE serum level in the control group consisting of young to long-lived individuals [2]. It has been demonstrated that apoE has a major impact on longevity, and apoE may also play a role in other pathological conditions including cancer, rheumatoid arthritis, and macular degeneration [46, 47].

**4.3. Carcinogenesis and DBP.** Aging and cancer are tightly associated phenomena. Accumulation of damage on DNA and telomeres causes both aging and cancer; moreover, the signaling pathways seem to converge on tumor suppressor protein, p53, which seems to be regulated by vitamin D. Also, telomerase reverse transcriptase might be molecular mechanisms mediating the vitamin D action in aging and cancer [26]. In elderly women, lower serum 25(OH)D concentrations appear to be an independent risk factor for cancer-specific mortality [48]. A decrease in the serum vitamin D level is one of the risk factors for the development and progression of renal cell carcinoma, and 25(OH)D may prevent carcinoma [49]. Men with higher blood serum DBP concentrations were at a significantly decreased risk of kidney cancer [50]. Men with higher 25(OH)D concentrations and serum DBP below the median (the DBP heterozygote) were associated with an elevated risk of pancreatic cancer [51]. Genotyping for rs7041 and rs4588 polymorphism showed that subjects with the DBP phenotype Gc1f-1f had 23–26% reduced risk of cancer incident as compared with the Gc1s-1s and Gc2-2 phenotypes [52]. The Gc2 allele and Gc2-2 phenotype of the DBP are associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk independent of the vitamin D status. It was hypothesized that women carrying the Gc2 allele(s) have a higher uptake of the DBP–25(OH)D complex or a better transport to the target organs, and different DBP glycosylation patterns in the Gc2 allele may explain the observed reduced breast cancer risk [37]. Inverse associations have also been shown between the serum 25(OH)D level and breast cancer development, risk for breast cancer recurrence, and mortality in women with early-stage breast cancer [53]. A prospective cohort study shows that the prostate cancer risk has been increased when circulating 25(OH)D and DBP concentrations are elevated [54]. It was noted that higher serum DBP concentrations may sequester more 25(OH)D and reduce free 25(OH)D bioavailability. A simultaneous examination of DBP phenotypes DBP and 25(OH)D levels may be important in determining the association of vitamin D with cancer risk [51]. Furthermore, female life expectancies exceed those of males by six or more years [31].

**4.4. Osteoporosis, DBP, and Aging.** Osteoporosis is a common feature of the aging process, coexisting with atherosclerosis and its risk group individuals. Many other factors, including the treatment of cancer, result in secondary osteoporosis [55]. The vast majority of efforts thus far have focused on bone loss in patients with breast and prostate cancer [56]. Furthermore, marked improvements in survival for many cancers mean that strategies to limit bone loss and reduce fracture risk must be incorporated into the care plans for nearly all cancer patients. The high frequency of prostate cancer-related metastatic bone disease has prompted considering this pathway as a therapeutic target [57].

As a candidate gene for osteoporosis, the DBP was studied. Investigators found a highly significant difference in the premenopausal bone fracture risk among women with Gc2-2 and a low risk of bone fractures, three times lower with Gc2-2 as compared with Gc1-1 [58]. The serum DBP is the precursor for the DBP-MAF [59]. It was hypothesized that differences between the DBP phenotypes concerning DBP-MAF might be either qualitative or quantitative: the differences in amino acid sequence among DBP types could theoretically result in a qualitative difference between Gc1-MAF and Gc2-MAF. Gc1 is glycosylated with both galactose and sialic acid, whereas Gc2 carries only the galactose residue [32]; this is of interest, because the conversion of DBP into the DBP-MAF involves removal of galactose and sialic acid residues from DBP by the actions of  $\beta$ -galactosidase and sialidase enzymes associated with the membranes of B- and T-lymphocytes, respectively [60]. Additionally, the higher mean plasma level of DBP with Gc1-1 compared with Gc2-2 results in a larger quantity of substrate for DBP-MAF synthesis in subjects with Gc1-1 and in that way perhaps in a higher basal level of DBP-MAF. The activated DBP in the form of DBP-MAF plays a role in bone modeling/remodeling and thereby has an effect on the risk of bone fractures. The DBP phenotype may be an important predictor of premenopausal bone fracture in whites and suggests that DBP plays an active pathophysiological role in the activity of osteoclasts [58]. Others have demonstrated that the genetic effect of the *Gc* gene on fracture risk appears only in combination with other genetic and environmental risk factors for bone metabolism [61].

## 5. Conclusion

The role of DBP polymorphism in atherogenic and cancerogenic processes, in combination with other genetic determinants and risk factors, as well as in the cohorts free of the other genetic and risk factors, and vitamin D effects in longevity mechanisms is an important aging research area.

## Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

The authors sincerely thank Tatjana Serapiniene for the statistical calculations.



## References

- [1] V. A. Spitsyn and D. V. Stakishaitis, "Interrelation of genetic dimorphism of ear wax and the level of apolipoproteins with atherogenesis and longevity in the Lithuanian population," *Genetika*, vol. 29, no. 2, pp. 334–341, 1993.
- [2] D. V. Stakishaitis, S. M. Ianchauskene, L. I. Ivashkiavichene, and R. A. Priaiksha, "Atherogenesis and serum levels of apolipoprotein E," *Kardiologija*, vol. 32, no. 6, pp. 14–16, 1992.
- [3] D. Stakisaitis, V. Basys, and R. Benetis, "Does  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor play a protective role in coronary atherosclerosis?" *Medical Science Monitor*, vol. 7, no. 4, pp. 701–711, 2001.
- [4] D. Stakisaitis, A. Maksvytis, R. Benetis, and M. Viikmaa, "Coronary atherosclerosis and blood groups of ABO system in women," *Medicina (Kaunas)*, vol. 38, supplement 2, pp. 230–235, 2002.
- [5] F. R. Pérez-López, A. M. Fernández-Alonso, P. Mannella, and P. Chedraui, "Vitamin D, sunlight and longevity," *Minerva Endocrinologica*, vol. 36, no. 3, pp. 257–266, 2011.
- [6] B. Schöttker, R. Jorde, A. Peasey et al., "Vitamin D and mortality: meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and the United States," *British Medical Journal*, vol. 348, Article ID g3656, 2014.
- [7] M. Verdoia, A. Schaffer, L. Barbieri et al., "Impact of gender difference on vitamin D status and its relationship with the extent of coronary artery disease," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 25, no. 5, pp. 464–470, 2015.
- [8] Y. Wang, Y.-J. Wang, J.-K. Zhan et al., "Vitamin D binding protein affects the correlation of 25(OH)D and frailty in the older men," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2014, Article ID 543783, 6 pages, 2014.
- [9] M. Speeckaert, G. Huang, J. R. Delanghe, and Y. E. C. Taes, "Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism," *Clinica Chimica Acta*, vol. 372, no. 1-2, pp. 33–42, 2006.
- [10] K. Robien, L. M. Butler, R. Wang et al., "Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore," *British Journal of Nutrition*, vol. 109, no. 3, pp. 493–502, 2013.
- [11] C. D. Engelman, T. E. Fingerlin, C. D. Langefeld et al., "Genetic and environmental determinants of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in hispanic and African Americans," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 93, no. 9, pp. 3381–3388, 2008.
- [12] A. Braun, A. Kofler, S. Morawietz, and H. Cleve, "Sequence and organization of the human vitamin D-binding protein gene," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1216, no. 3, pp. 385–394, 1993.
- [13] A. Braun, R. Bichlmaier, and H. Cleve, "Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types," *Human Genetics*, vol. 89, no. 4, pp. 401–406, 1992.
- [14] K. W. Colston and C. M. Hansen, "Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 9, no. 1, pp. 45–59, 2002.
- [15] K. A. Tantisira, "Vitamin D: genetics and genomic effects," in *Vitamin D and Lung: Mechanisms and Disease Associations*, A. A. Litonjua, Ed., vol. 3 of *Respiratory Medicine*, pp. 151–178, Springer Science & Business Media, 2012.
- [16] S. Rocchiccioli, G. Pelosi, S. Rosini et al., "Secreted proteins from carotid endarterectomy: an untargeted approach to disclose molecular clues of plaque progression," *Journal of Translational Medicine*, vol. 11, article 260, 2013.
- [17] G. Wang, Y. Li, L. Li et al., "Association of the vitamin D binding protein polymorphisms with the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis," *British Medical Journal Open*, vol. 4, no. 11, Article ID e005617, 2014.
- [18] D. Blanton, Z. Han, L. Bierschenk et al., "Reduced serum vitamin D-binding protein levels are associated with type 1 diabetes," *Diabetes*, vol. 60, no. 10, pp. 2566–2570, 2011.
- [19] N. F. Huang, K. Kurpinski, Q. Fang, R. J. Lee, and S. Li, "Proteomic identification of biomarkers of vascular injury," *American Journal of Translational Research*, vol. 3, no. 2, pp. 139–148, 2011.
- [20] P. T. Gomme and J. Bertolini, "Therapeutic potential of vitamin D-binding protein," *Trends in Biotechnology*, vol. 22, no. 7, pp. 340–345, 2004.
- [21] U. Meier, O. Gressner, F. Lammert, and A. M. Gressner, "Gc-globulin: roles in response to injury," *Clinical Chemistry*, vol. 52, no. 7, pp. 1247–1253, 2006.
- [22] P. White and N. Cooke, "The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 11, no. 8, pp. 320–327, 2000.
- [23] W. M. Lee and R. M. Galbraith, "The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity," *The New England Journal of Medicine*, vol. 326, no. 20, pp. 1335–1341, 1992.
- [24] M.-A. Raymond, A. Désormeaux, A. Labelle et al., "Endothelial stress induces the release of vitamin D-binding protein, a novel growth factor," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 338, no. 3, pp. 1374–1382, 2005.
- [25] C. Gasparri, A. Curcio, D. Torella et al., "Proteomics reveals high levels of vitamin D binding protein in myocardial infarction," *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, vol. 2, no. 3, pp. 796–804, 2010.
- [26] P. Tuohimaa, "Vitamin D and aging," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 114, no. 1-2, pp. 78–84, 2009.
- [27] G. Corbi, A. Bianco, V. Turchiarelli et al., "Potential mechanisms linking atherosclerosis and increased cardiovascular risk in COPD: focus on sirtuins," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 6, pp. 12696–12713, 2013.
- [28] A. Halpern, M. C. Mancini, M. E. C. Magalhães et al., "Metabolic syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: from diagnosis to treatment," *Diabetology and Metabolic Syndrome*, vol. 2, article 55, 2010.
- [29] D. Łukasiewicz, M. Chodorowska, and I. Jakubowska, "Obesity as a factor in the development of cancer in type 2 diabetes," *Polski Merkuriusz Lekarski*, vol. 38, no. 225, pp. 135–139, 2015.
- [30] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, "Global cancer statistics, 2012," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, 2015.
- [31] W. A. Stini, "Sex differences in bone loss -an evolutionary perspective on a clinical problem," *Collegium Antropologicum*, vol. 27, no. 1, pp. 23–46, 2003.
- [32] N. Yamamoto and S. Homma, "Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 19, pp. 8539–8543, 1991.
- [33] M. I. Kamboh and R. E. Ferrell, "Ethnic variation in vitamin D-binding protein (GC): a review of isoelectric focusing studies in human populations," *Human Genetics*, vol. 72, no. 4, pp. 281–293, 1986.

- [34] A. L. Lauridsen, P. Vestergaard, and E. Nexø, "Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women," *Clinical Chemistry*, vol. 47, no. 4, pp. 753–756, 2001.
- [35] A. L. Lauridsen, P. Vestergaard, A. P. Hermann et al., "Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595—early postmenopausal women," *Calcified Tissue International*, vol. 77, no. 1, pp. 15–22, 2005.
- [36] J. Arnaud and J. Constans, "Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP)," *Human Genetics*, vol. 92, no. 2, pp. 183–188, 1993.
- [37] S. Abbas, J. Linseisen, T. Slinger et al., "The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin D status," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 17, no. 6, pp. 1339–1343, 2008.
- [38] V. M. Dardé, F. de la Cuesta, F. G. Dones, G. Alvarez-Llamas, M. G. Barderas, and F. Vivanco, "Analysis of the plasma proteome associated with acute coronary syndrome: does a permanent protein signature exist in the plasma of ACS patients?" *Journal of Proteome Research*, vol. 9, no. 9, pp. 4420–4432, 2010.
- [39] S. Rocchiccioli, M. G. Andreassi, A. Cecchetti, C. Carpeggiani, A. L'Abbate, and L. Citti, "Correlation between vitamin D binding protein expression and angiographic-proven coronary artery disease," *Coronary Artery Disease*, vol. 23, no. 7, pp. 426–431, 2012.
- [40] S. Jaimungal, K. Wehmeier, A. D. Mooradian, and M. J. Haas, "The emerging evidence for vitamin D-mediated regulation of apolipoprotein A-I synthesis," *Nutrition Research*, vol. 31, no. 11, pp. 805–812, 2011.
- [41] J. E. Feig, B. Hewing, J. D. Smith, S. L. Hazen, and E. A. Fisher, "High-density lipoprotein and atherosclerosis regression: evidence from preclinical and clinical studies," *Circulation Research*, vol. 114, no. 1, pp. 205–213, 2014.
- [42] M. F. Feitosa, M. K. Wojczynski, R. Straka et al., "Genetic analysis of long-lived families reveals novel variants influencing high density-lipoprotein cholesterol," *Frontiers in Genetics*, vol. 5, article 159, 2014.
- [43] R. W. Browne, B. Weinstock-Guttman, R. Zivadinov et al., "Serum lipoprotein composition and vitamin D metabolite levels in clinically isolated syndromes: results from a multicenter study," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 143, pp. 424–433, 2014.
- [44] V. Hirschler, G. Maccallini, C. Molinari et al., "Association between vitamin D and Apo B concentrations in Argentinean Indian children," *Clinica Chimica Acta*, vol. 429, pp. 147–151, 2014.
- [45] J. Mursu, T. Nurmi, S. Voutilainen, T.-P. Tuomainen, and J. K. Virtanen, "The association between serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentration and risk of disease death in men: modification by magnesium intake," *European Journal of Epidemiology*, vol. 30, no. 4, pp. 343–347, 2015.
- [46] V. Napolioni, P. Gianni, F. M. Carpi, I. M. Predazzi, and N. Lucarini, "APOE haplotypes are associated with human longevity in a Central Italy population: evidence for epistasis with HP 1/2 polymorphism," *Clinica Chimica Acta*, vol. 412, no. 19–20, pp. 1821–1824, 2011.
- [47] F. Bonomini, F. Filippini, T. Hayek et al., "Apolipoprotein E and its role in aging and survival," *Experimental Gerontology*, vol. 45, no. 2, pp. 149–157, 2010.
- [48] G. Wong, W. H. Lim, J. Lewis et al., "Vitamin D and cancer mortality in elderly women," *BMC Cancer*, vol. 15, article 106, 2015.
- [49] T. Fujioka, Y. Suzuki, T. Okamoto, N. Mastushita, M. Hasegawa, and S. Omori, "Prevention of renal cell carcinoma by active vitamin D<sub>3</sub>," *World Journal of Surgery*, vol. 24, no. 10, pp. 1205–1210, 2000.
- [50] A. M. Mondul, S. J. Weinstein, K. A. Moy, S. Männistö, and D. Albanes, "Vitamin D-binding protein, circulating vitamin D and risk of renal cell carcinoma," *International Journal of Cancer*, vol. 134, no. 11, pp. 2699–2706, 2014.
- [51] S. J. Weinstein, R. Z. Stolzenberg-Solomon, W. Kopp, H. Rager, J. Virtamo, and D. Albanes, "Impact of circulating vitamin D binding protein levels on the association between 25-hydroxyvitamin d and pancreatic cancer risk: a nested case-control study," *Cancer Research*, vol. 72, no. 5, pp. 1190–1198, 2012.
- [52] R. Jorde, H. Schirmer, T. Wilsgaard et al., "The DBP phenotype Gc-1f/Gc-1f is associated with reduced risk of cancer. The tromsø study," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 5, Article ID e0126359, 2015.
- [53] T. Shao, P. Klein, and M. L. Grossbard, "Vitamin D and breast cancer," *The Oncologist*, vol. 17, no. 1, pp. 36–45, 2012.
- [54] S. J. Weinstein, A. M. Mondul, W. Kopp, H. Rager, J. Virtamo, and D. Albanes, "Circulating 25-hydroxyvitamin D, vitamin D-binding protein and risk of prostate cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 132, no. 12, pp. 2940–2947, 2013.
- [55] J. Banu, "Causes, consequences, and treatment of osteoporosis in men," *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 7, pp. 849–860, 2013.
- [56] M. T. Drake, "Osteoporosis and cancer," *Current Osteoporosis Reports*, vol. 11, no. 3, pp. 163–170, 2013.
- [57] I. Marech, A. Vacca, G. Ranieri, A. Gnani, and F. Dammacco, "Novel strategies in the treatment of castration-resistant prostate cancer (Review)," *International Journal of Oncology*, vol. 40, no. 5, pp. 1313–1320, 2012.
- [58] A. L. Lauridsen, P. Vestergaard, A. P. Hermann, H. J. Moller, L. Mosekilde, and E. Nexø, "Female premenopausal fracture risk is associated with Gc phenotype," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 19, no. 6, pp. 875–881, 2004.
- [59] N. Yamamoto, H. Suyama, and N. Yamamoto, "Immunotherapy for prostate cancer with Gc protein-derived macrophage-activating factor, GcMAF," *Translational Oncology*, vol. 1, no. 2, pp. 65–72, 2008.
- [60] N. Yamamoto and R. Kumashiro, "Conversion of vitamin D<sub>3</sub> binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of  $\beta$ -galactosidase of B cells and sialidase of T cells," *Journal of Immunology*, vol. 151, no. 5, pp. 2794–2802, 1993.
- [61] Y. Fang, J. B. J. Van Meurs, P. Arp et al., "Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis," *Calcified Tissue International*, vol. 85, no. 2, pp. 85–93, 2009.



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>

