

УДК 616.831-005.1-005.4-005.6-06:613.84:575.113.2

Abstract

T. B. Oleshko,

D. Yu. Svyrydenko,

V. Yu. Garbuzova,

Sumy State University, 2 Rims-
kogo-Korsakova str, Sumy,
Ukraine, 40007

THE DISTRIBUTION OF ALLELIC VARIANTS LYS198ASN POLYMORPHISM OF THE ENDOTHELIN-1 GENE IN PATIENTS WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE WHO ARE SMOKERS AND NON-SMOKERS

Introduction. Smoking is one of the main risk factors of cardiovascular diseases, including stroke. According to various studies the risk of blood stroke of smokers increases by 2–4 times, with the greatest risk for developing of ischemic atherothrombotic stroke (IAS). Smoking contributes to the development of atherosclerosis, arterial blood pressure increase and small cerebral vessel constriction as a result the cerebral blood supply becomes bad. One of the most priority field is to identify candidate genes involved in the pathogenic mechanisms of disease in patients with various risk factors, including smokers. That such is the gene endothelin-1, a powerful endogenous vasoconstrictor and a marker of endothelial dysfunction. It is known that smoking adversely affects the metabolism of the vascular wall.

Purpose. To study the distribution of allelic variants on gene polymorphism Lys198Asn endothelin-1 in patients with IAS in smokers and people who do not smoke.

Materials and Methods. For analysis venous blood of 170 patients with IAS (42.4 % women and 57.6 % men) aged 40 to 85 years (average age – 64.7 ± 0.73 years) who were on the records in the outpatient department Sumy clinical Hospital № 5 was used. The control group consisted of 124 patients (36.3 % women and 63.7 % men), average age was 76.7 ± 0.93 years. The groups did not differ in the ratio of two sexes ($P = 0.294$ for the χ^2 -test), but the average age of the first group (76.7 ± 0.93 years) was significantly higher than that of the second one ($P < 0,001$). Lys198Asn (rs5370) polymorphism of EDN-1 gene was determined by polymerase chain reaction, followed by restriction fragment length analysis of the allocation of them by electrophoresis in agarose gel. Statistical analysis was performed by using the software package SPSS-17. The value of $P < 0.05$ was considered as significant. Pathogenetic variant of stroke was determined according to the TOAST criteria. Ischemic stroke character was determined with the help of history and clinical information of the disease given by CT brain study.

Results. Among the persons who do not smoke there was no significant association between polymorphisms studied and the development of ischemic atherothrombotic stroke ($P = 0.081$). The difference frequencies of different variants of Lys198Asn polymorphism in patients that smoke who suffer from ischemic atherothrombotic stroke and patients of the control group is close to accurate ($P = 0.052$). Having used logistic regression method, the following results were received. Individuals Asn/Asn genotype carriers, who do not smoke revealed increased risk of ischemic atherothrombotic stroke by 3.4 times ($P = 0.041$; OR = 3.379). However, the risk of stroke of smokers was not statistically significant.

Conclusion. In persons who do not smoke and are Asn/Asn genotype carriers the risk of ischemic atherothrombotic stroke development is higher than in 3.4 times in comparison with homozygotes for the major allele.

Keywords: endothelin-1, gene polymorphism, ischemic stroke, smoking.

Corresponding author: oleshko.tanya1989@gmail.com

Резюме

Т. Б. Олешко,
Д. Ю. Свириденко,
В. Ю. Гарбузова,

Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова,
2, Суми, Україна, 40007

РОЗПОДІЛ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ЗА LYS198ASN-ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНА ЕНДОТЕЛІНУ-1 У ХВОРИХ З ІШЕМІЧНИМ АТЕРОТРОМБОТИЧНИМ ІНСУЛЬТОМ У КУРЦІВ ТА ОСІБ, ЯКІ НЕ ПАЛЯТЬ

Наведено результати визначення частоти алельних варіантів гена EDN-1 у 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТИ) і 124 здорових осіб (контрольна група). Серед осіб, які не палять, зв'язку між досліджуваним поліморфізмом і розвитком ІАТИ не виявлено ($P = 0,081$). Однак різниця частот різних варіантів Lys198Asn-поліморфізму у хворих з ІАТИ та пацієнтів контрольної групи близька до достовірної серед курців ($P = 0,052$). Використовуючи метод логістичної регресії, було встановлено, що в осіб, носіїв Asn/Asn-генотипу, які не палять, виявлено підвищення ризику виникнення ІАТИ у 3,4 раза ($P = 0,041$; OR = 3,379). Проте у курців ризик розвитку інсульту був статистично не достовірним.

Ключові слова: ендотелін-1, поліморфізм генів, ішемічний інсульт, паління.

Резюме

Т. Б. Олешко,
Д. Ю. Свириденко,
В. Ю. Гарбузова,

Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова,
2, Суми, Україна,
40007

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ LYS198ASN-ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЭНДОТЕЛИНА-1 У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ У КУРИЛЬЩИКОВ И ЛИЦ, КОТОРЫЕ НЕ КУРЯТ

Приведены результаты определения частоты аллельных вариантов гена EDN-1 в 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (ИАТИ) и 124 здоровых лиц (контрольная группа). Среди лиц, которые не курят, связи между исследуемым полиморфизмом и развитием ИАТИ не обнаружено ($P = 0,081$). Однако разница частот различных вариантов Lys198Asn полиморфизма у больных с ИАТИ и пациентов контрольной группы близка к достоверной среди курильщиков ($P = 0,052$). Используя метод логистической регрессии было установлено, что у лиц, носителей Asn/Asn-генотипа, некурящих выявлено повышение риска возникновения ИАТИ в 3,4 раза ($P = 0,041$; OR = 3,379). Однако у курильщиков риск развития инсульта был статистически не достоверным.

Ключевые слова: эндотелин-1, полиморфизм генов, ишемический инсульт, курение.

Автор, відповідальний за листування: oleshko.tanya1989@gmail.com

Вступ

У результаті наслідків паління в світі щорічно помирає близько 6 млн осіб [2], зокрема в Україні приблизно 120 тисяч [2, 3]. За споживанням цигарок Україна посідає 17-ге місце се-

ред усіх країн світу. В нашій країні палить кожен другий чоловік і кожна п'ята жінка. За останні роки кількість курців серед жінок в Україні зросла утричі [4].



Паління є одним з основних факторів ризику серцево-судинних захворювань, зокрема й інсульту [5]. Згідно з *M. Girot et al.* четверта частина всіх інсультів безпосередньо пов'язана з палінням [6]. За даними різних досліджень, ризик розвитку інсульту у курців збільшується в 2–4 рази, поступаючись за значенням лише миготливій аритмії і артеріальній гіпертензії. Причому в курців найбільший ризик розвитку саме ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТІ) [7]. У патогенезі ІАТІ провідну роль відіграє ендотеліальна дисфункція (ЕД), а найбільш значущим екзогенним фактором, що сприяє її формуванню, є паління [5]. ЕД характеризується дисбалансом впливів ендотеліозалежних вазоконстрикторів і вазодилаторів, що ймовірно є результатом сукупної дії компонентів тютюну [2, 8].

Останніми роками великої актуальності набуло вивчення ролі генетичних чинників у виникненні цереброваскулярних захворювань. Одним з найбільш пріоритетних напрямків є виявлення генів-кандидатів, залучених до патогенетичних механізмів захворювання, у пацієнтів з різними факторами ризику, зокрема й палінням. Саме таким є ген ендотеліну-1 (EDN-1).

На сьогодні досліджено понад 2 тисячі однонуклеотидних поліморфізмів гена EDN-1. Алейний поліморфізм Lys198Asn знаходиться у 5-му екзоні досліджуваного гена, у 5665-й позиції азотиста основа гуанін замінюється на тимін. Це призводить до того, що 198-ма амінокислота молекули ендотеліну-1 лізин замінюється на аспарагін [9, 10, 11].

Подану роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням «Зв'язок алейного поліморфізму “генів ектопічної кальцифікації” з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень», № 0115U000688.

Мета дослідження – вивчити розподіл алейних варіантів за Lys198Asn-поліморфізмом гена ендотеліну-1 у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом у курців та осіб, які не палять.

Матеріали і методи. У роботі використано венозну кров 170 хворих з ІАТІ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік – $(64,7 \pm 0,73)$ роки), які перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні № 5. Контрольна група складалася із 124 пацієнтів (36,3 % жінок і 63,7 % чоловіків), середній вік становив

$(76,7 \pm 0,93)$ року. Контрольна група і група хворих з ІАТІ не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ($P = 0,294$ за χ^2 -критерієм), однак середній вік першої групи ($(76,7 \pm 0,93)$ року) був істотно вищим, ніж другої ($P < 0,001$).

Ішемічний характер інсульту встановлювали з урахуванням даних анамнезу і клінічної картини хвороби, даних комп'ютерної томографії головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [12], на підставі анамнестичних даних, особливостей клінічного перебігу хвороби, даних ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови та ЕКГ. У контрольній групі відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання даних анамнезу, реєстрації електрокардіографії та вимірювання артеріального тиску.

Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участі людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000 р.) та Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Усі пацієнти підписали інформовану угоду на участь у дослідженнях із подальшим забором венозної крові на генетичний аналіз.

Визначення Lys198Asn (rs5370)-поліморфізму гена EDN-1 проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі. Деталі методики генотипування описано в одній з попередніх наших публікацій [1]. Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Достовірність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним.

Результати дослідження та їх обговорення
Результати розподілу генотипів за Lys198Asn-поліморфізмом гена EDN-1 у осіб, які не палять, та курців, подано в таблиці 1. Серед осіб, які не палять, достовірного зв'язку між досліджуваним поліморфізмом і розвитком ІАТІ не виявлено ($P = 0,081$). Різниця частот різних варіантів Lys198Asn-поліморфізму в осіб, які палять, хворих з ІАТІ та пацієнтів контрольної групи близька до достовірної ($P = 0,052$).

У таблиці 2 наведено порівняльні дані про співвідношення генотипів Lys198Asn-поліморфізму гена EDN-1 у курців та осіб, які не



палять, у контрольній групі і групі хворих з ІА-ТІ. Розподіл трьох можливих варіантів генотипу не відрізнявся ні в контрольній групі ($P = 0,372$),

ні серед хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом ($P = 0,908$).

Таблиця 1 – Зв'язок Lys198Asn-поліморфізму гена EDN-1 із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту у курців та осіб, які не палять

| | Генотип | Контроль, n (%) | IATІ, n (%) |
|--|---------|-----------------|-------------|
| Особи, які не палять | Lys/Lys | 56 (60,2) | 58 (48,3) |
| | Lys/Asn | 33 (35,5) | 48 (40,0) |
| | Asn/Asn | 4 (4,3) | 14 (11,7) |
| | Разом | 93 (100) | 120 (100) |
| $\chi^2 = 5,027; P = 0,081$ | | | |
| Курці | Lys/Lys | 23 (74,2) | 24 (48,0) |
| | Lys/Asn | 7 (22,6) | 19 (38,0) |
| | Asn/Asn | 1 (3,2) | 7 (14,0) |
| | Разом | 31 (100) | 50 (100) |
| $\chi^2 = 5,929; P = 0,052$ | | | |
| Примітка: n – кількість осіб; P – статистична значущість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм | | | |

Таблиця 2 – Розподіл генотипів за Lys198Asn-поліморфізмом гена EDN-1 у курців та осіб, що не палять, у контрольній групі та групі хворих з ІАТІ

| | Генотип | Особи, які не палять | Курці |
|--|---------|----------------------|-----------|
| Контроль | Lys/Lys | 56 (60,2) | 23 (74,2) |
| | Lys/Asn | 33 (35,5) | 7 (22,6) |
| | Asn/Asn | 4 (4,3) | 1 (3,2) |
| | Разом | 93 (100) | 31 (100) |
| $\chi^2 = 1,980; P = 0,372$ | | | |
| ІАТІ | Lys/Lys | 58 (48,3) | 24 (48,0) |
| | Lys/Asn | 48 (40,0) | 19 (38,0) |
| | Asn/Asn | 14 (11,7) | 7 (14,0) |
| | Разом | 120 (100) | 50 (100) |
| $\chi^2 = 0,192; P = 0,908$ | | | |
| Примітка: n – кількість осіб; P – статистична значущість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм | | | |

Таблиця 3 – Частота ішемічних інсультів у курців та осіб, які не палять, з різними варіантами генотипу за Lys198Asn-поліморфізмом гена EDN-1

| | Lys/Lys | | Lys/Asn | | Asn/Asn | |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Інсульт (-) | Інсульт (+) | Інсульт (-) | Інсульт (+) | Інсульт (-) | Інсульт (+) |
| Паління (-) | 56 (70,9 %) | 58 (70,7 %) | 33 (82,5 %) | 48 (71,6 %) | 4 (80,0 %) | 14 (66,7 %) |
| Паління (+) | 23 (29,1 %) | 24 (29,3 %) | 7 (17,5 %) | 19 (28,4 %) | 1 (20,0 %) | 7 (33,3 %) |
| Разом | 79 (100 %) | 82 (100 %) | 40 (100 %) | 67 (100 %) | 5 (100 %) | 21 (100 %) |
| χ^2 | >0,001 | | 1,069 | | 0,337 | |
| P | 0,560 | | 0,150 | | 0,502 | |
| Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках. P – статистична значущість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм Пірсона | | | | | | |

Таблиця 4 – Аналіз ризику ІАТІ залежно від генотипу за Lys198Asn-поліморфізмом гена EDN-1 у курців та осіб, які не палять

| Показник | Генотип | CR | SE | WS | P | OR | 95 % CI для OR нижній | 95 % CI для OR верхній |
|-------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|------------------------|
| Паління (–) | Lys/Asn | 0,340 | 0,294 | 1,337 | 0,247 | 1,404 | 0,790 | 2,497 |
| | Asn/Asn | 1,218 | 0,597 | 4,159 | 0,041 | 3,379 | 1,049 | 10,891 |
| Паління (+) | Lys/Asn | 0,956 | 0,530 | 3,256 | 0,071 | 2,601 | 0,921 | 7,347 |
| | Asn/Asn | 1,903 | 1,108 | 2,950 | 0,086 | 6,708 | 0,764 | 58,868 |

Примітка. Порівняння проводиться відносно Lys198Lys-генотипу; CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда; P – статистична значущість; OR – відношення ризику; CI – довірчий інтервал

Аналіз частоти ішемічних інсультів у курців та осіб, які не палять, з різними варіантами генотипу за Lys198Asn-поліморфізмом дав результати, наведені в табл. 3. У гомозигот за основним алелем не було виявлено достовірних відмінностей між хворими з ІАТІ та особами контрольної групи. Аналогічні результати одержано у носіїв гетерозиготного генотипу та осіб, які є гомозиготами за мінорним алелем.

Використовуючи метод логістичної регресії, проаналізовано ризик розвитку ІАТІ залежно від

Висновки

У осіб, які не палять та є носіями Asn/Asn-генотипу, ризик розвитку ішемічного атеротро-

Перспективи подальших досліджень

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні вивчення зв'язків факторів ризику ІАТІ з різними варіантами генотипу за Lys198Asn-поліморфізмом гена EDN-1. При

генотипу за Lys198Asn-поліморфізмом гена EDN-1 у курців та осіб, які не палять. Було одержано результати, наведені в таблиці 4. У осіб, носіїв Asn/Asn-генотипу, які не палять, виявлено підвищення ризику виникнення ІАТІ у 3,4 раза (P = 0,041; OR = 3,379). Проте у курців ризик розвитку інсульту був статистично не достовірним. Це свідчить про те, що паління є вагомим фактором ризику цереброваскулярної патології, який реалізується незалежно від генотипу пацієнтів за Lys198Asn-поліморфізмом.

мботичного інсульту більший у 3,4 раза порівняно з гомозиготами за основним алелем.

цьому повинен враховуватися вплив генетичних чинників на фактори, що збільшують ризик розвитку ішемічних інсультів (порушення ліпопротеїнового складу плазми крові, гіподинамія, зміни у системі гемостазу тощо).

References (список літератури)

- Oleshko TB, Garbusova VYu, Ataman OV. [Zviazok Lys198Asn polimorfizmu hena endotelinu-1 z ishemichnym aterotrombotychnym insultom v osib iz normalnym ta pidvyshchenym arterialnym tyskom]. *J. Clin. Exp. Med. Res.* 2015;3(4):464–469.
- Eshchenko KN, Zhadan AV, Shustval NF. [Serdechno-sosudystaia systema u kurennye]. *Diabet i sertse.* 2013;4 (170):12–17.
- Dobrianska OV, Polka NS, Berdnyk OV, Yurchuk OM. [Dynamika poshyrenosti tiutiunopalinnia sered pidlitkiv] *Hihiiena naselenykh mists.* 2012;59:262–266.
- Pikas OB. Pro stan kurinnia tsyharok u suchasnykh umovakh, yoho vplyv na vynyknennia zakhvoriuvan v orhanizmi liudyny (ohliad literatury). *Bukovynskyi medychnyi visnyk.* 2015;T19,4(76):227–230.
- Nykytyn YuP, Symonova HY, Khoreva MA, Vorobev RY, Vorobeve EN, Shumakher HY, Osypova YV, Kuperman YB. [Rol dysfunktsyy endotelija v patoheneze ateroskleroza]. *Ateroskleroz.* 2011;1:60–69.
- Girot M. [Smoking and stroke]. *Presse Med.* 2009;38(7–8):1120–1125.
- Neverovskyi DV. [Kurennye y yshemycheskyi ynsult]. *Nevrolohiya, neiropsykhiatryia, psykhosomatyka.* 2010;2(4):42–47.
- Zubayrova LD, Zubayrov DM. [Kurennye kak faktor ryska serdechno-sosudytykh



- zabolevaniy]. *Kazanskyi medytsynskyi zhurnal*. 2006;87(5):369–374.
9. Rankinen T, Church T, Rice T, Markward N, Leon AS, Rao DC., Skinner JS, Blair SN and Bouchard C. [Effect of Endothelin 1 Genotype on Blood Pressure Is Dependent on Physical Activity or Fitness Levels] *Hypertension*. 2007;50:1120–1125.
 10. Pakhomia NS, Uriasev OM, Shakhanov AV, [Rol polymorfyzmov nekotorykh henov v realizatsyy arterialnoi hypertenzyi]. *Zemskyi Vrach*. 2014;3–4 (24):21–24.
 11. Feoktystova VS, Lypunova AS, Kolesnychenko MH, Leonova YA, Syrotkina OV, Boldueva SA. [Polymorfyzm henov endotelialnoi NO-syntazy, endotelina-1 y paraoksonazy-1 kak faktor ryska kardyalnoho syndroma X u zhenshchyn] *Problemy zhenskoho zdorovia*. 2012;3(7):24–29.
 12. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. [Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment]. *Stroke*. 1993;24:35–41.

(received 25.05.2016, published online 28.06.2016)

(одержано 25.05.2016, опубліковано 28.06.2016)

