

УДК: 616.831-005.4-005.6-03-055:575.113.2

Т.Б. Олешко,

Д.Ю. Свириденко,

В.Ю. Гарбузова

Сумський державний університет

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

## АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ Lys198Asn ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА ЕНДОТЕЛІНУ-1 (EDN-1) З ІШЕМІЧНИМ АТЕРОТРОМБОТИЧНИМ ІНСУЛЬТОМ В ОСІБ РІЗНОЇ СТАТІ

**Резюме.** Наведено результати визначення частоти алейних варіантів гена EDN-1, що є одним із ключових білків-регуляторів судинного тонуусу у 170 хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) і 124 здорових осіб (контрольна група). Установлено, що співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем за Lys198Asn (rs5370) поліморфізмом 5 екзона гена EDN-1 у хворих на ІАТІ становить 48,2; 39,4 і 12,4 %, а в контрольній групі - відповідно 63,7; 32,3 і 4,0 % ( $P = 0,008$  за  $\chi^2$ -критерієм). У жінок, які є носіями гетерозиготного Lys/Asn генотипу, ризик виникнення інсульту більший майже у 2,6 раза ( $P = 0,020$ ;  $OR = 2,571$ ), а в чоловіків гомозигот за мінорним алелем (Asn/Asn) - в 3,5 раза ( $P = 0,034$ ;  $OR = 3,534$ ).

### Вступ

Вивчення впливу генетичних факторів на розвиток найпоширеніших мультифакторіальних захворювань є однією з найактуальніших проблем теоретичної та практичної медицини. Існують численні докази генетичної залежності цілого ряду механізмів, причетних до уражень кровоносних судин, що призводять до цереброваскулярної патології.

У патогенезі ішемічного ураження головного мозку важливу роль відіграє порушення функції ендотелію [5, 6]. Під дисфункцією ендотелію розуміють дисбаланс у системі продукції та функціонування численних судинних чинників, які призводять до порушень гомеостазу судинної стінки [2-5]. Одним із найважливіших факторів, які призводять до ендотеліальної дисфункції, є ендотелін-1 (ET-1) [7, 8]. Зважаючи на його потужний вазоконстрикторний потенціал, який у 10 разів сильніший ніж в ангіотензину II [9], необхідно дослідити молекулярно-генетичні аспекти його впливу, а саме однонуклеотидні поліморфізми гена EDN-1.

### Мета дослідження

Вивчення аналізу асоціації Lys198Asn поліморфізму гена EDN-1 із ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ) в осіб різної статі.

### Матеріал і методи

Для аналізу використано венозну кров 170 хворих на ІАТІ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік -  $64,7 \pm 0,73$  роки), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні №5. Контрольна група складалася із 124

© Т.Б. Олешко, Д.Ю. Свириденко, В.Ю. Гарбузова, 2016

пацієнтів (36,3 % жінок і 63,7 % чоловіків), середній вік склав  $76,7 \pm 0,93$  роки. Контрольна група і група хворих на ІАТІ не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ( $P = 0,294$  за  $\chi^2$ -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 МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [10], 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, Хельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етнічні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю 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 наступним забором венозної крові на генетичний аналіз.

Визначення Lys198Asn (rs5370) поліморфізму гена EDN-1 проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним 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  $\chi^2$ -критерієм. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

#### Обговорення результатів дослідження

Генотипування хворих на ІАТІ та пацієнтів контрольної групи за Lys198Asn поліморфізмом

гена EDN-1 дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена, а також порівняти їх між групами загалом і статтю.

Встановлено, що у хворих на ІАТІ співвідношення гомозигот за основним алелем (Lys/Lys), гетерозигот (Lys/Asn) і гомозигот за мінорним алелем (Asn/Asn) становить 48,2; 39,4 і 12,4 %, а в контрольній групі - відповідно 63,7; 32,3 і 4,0 % (рис.). При цьому відмінності частоти зазначених генотипів між групою хворих з ІАТІ та контрольною групою були статистично достовір-

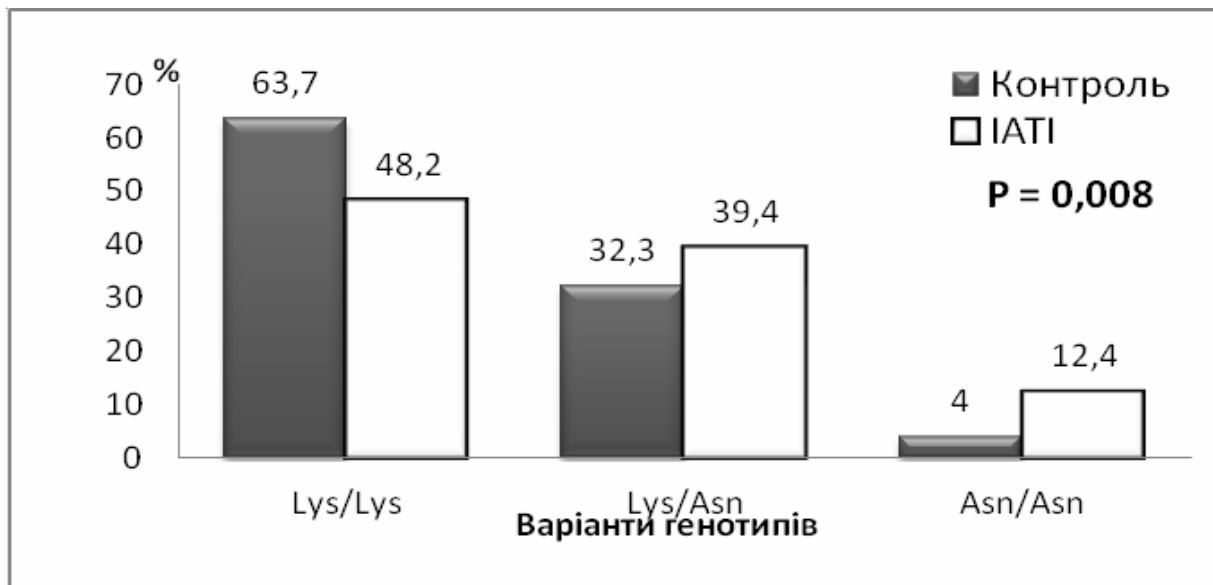


Рис. Частота різних генотипів при визначенні одонуклеотидного поліморфізму Lys198Asn гена ET-1 у практично здорових індивідумів (контроль) та хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ).  $P$  - статистична значимість відмінності показників за  $\chi^2$ -критерієм Пірсона.

ними ( $P = 0,008$  за  $\chi^2$ -критерієм).

Це також було підтверджено і методом логістичної регресії (табл. 1): у гомозигот за мінорним алелем (Asn/Asn) ризик виникнення інсульту більший у 4 рази ( $P = 0,007$ ;  $OR = 4,046$ ).

Розподіл частот алельних варіантів поліморфізму Lys198Asn за статтю в групах порівняння подано в табл. 2. Частота різних варіантів даного поліморфізму у хворих з ІАТІ та пацієнтів контрольної групи достовірно відрізняється серед жінок ( $P = 0,025$ ;  $\chi^2 = 7,416$ ). Проте достовірного зв'язку у розподілі генотипів осіб контрольної та дослідної групи серед чоловіків не виявлено.

У табл. 3 представлено порівняльні дані про частоту варіантів Lys198Asn поліморфізму гена ендотеліну-1 у жінок і чоловіків у контрольній групі і у хворих з ІАТІ. Одержані результати свідчать про відсутність статистично значимої відмінності між особами жіночої та чоловічої статі у контрольній групі, але серед пацієнтів з ІАТІ достовірність зв'язку підтвердилася ( $P = 0,043$ ).

Аналіз частоти ішемічних інсультів у жінок і чоловіків з різними варіантами генотипу за Lys198Asn поліморфізмом дав результати наведені в табл. 4. У носіїв Lys/Asn генотипу відмінність між чоловіками і жінками з ІАТІ та осо-

Таблиця 1

#### Аналіз ризику ІАТІ залежно від генотипу за Lys198Asn поліморфізмом гена ET-1

Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95 % CI для OR нижній	95 % CI для OR верхній
Lys/Asn	0,479	0,255	3,535	0,060	1,614	0,980	2,657
Asn/Asn	1,398	0,522	7,171	0,007	4,046	1,455	11,256

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

Таблиця 2

## Вплив алельного поліморфізму Lys198Asn гена EDN-1 з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб різної статі

Генотип	Жінки		Чоловіки	
	Контроль	Інсулт	Контроль	Інсулт
Lys/Lys	30 (66,7 %)	30 (41,7 %)	49 (62,0 %)	52 (53,1 %)
Lys/Asn	14 (31,1 %)	36 (50,0 %)	26 (32,9 %)	31 (31,6 %)
Asn/Asn	1 (2,2 %)	6 (8,3 %)	4 (5,1 %)	15 (15,3 %)
Разом	45 (100 %)	72 (100 %)	79 (100 %)	98 (100 %)
$\chi^2$	7,416		4,913	
P	0,025		0,086	

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках. P – статистична значимість відмінностей між порівнюваними групами за  $\chi^2$  –критерієм Пірсона.

Таблиця 3

## Частота генотипів за Lys198Asn поліморфізмом гена EDN-1 у жінок і чоловіків у контрольній групі й у хворих з ішемічним інсультом

Генотип	Контроль		Інсулт	
	Жінки	Чоловіки	Жінки	Чоловіки
Lys/Lys	30 (66,7 %)	49 (62,0 %)	30 (41,7 %)	52 (53,1 %)
Lys/Asn	14 (31,1 %)	26 (32,9 %)	36 (50,0 %)	31 (31,6 %)
Asn/Asn	1 (2,2 %)	4 (5,1 %)	6 (8,3 %)	15 (15,3 %)
Разом	45 (100 %)	79 (100 %)	72 (100 %)	98 (100 %)
$\chi^2$	0.700		6.304	
P	0.705		0.043	

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках. P – статистична значимість відмінностей між порівнюваними групами за  $\chi^2$  –критерієм Пірсона.

Таблиця 4

## Частота ішемічних інсультів у жінок і чоловіків з різними варіантами генотипу за Lys198Asn поліморфізмом гена EDN-1

	Lys/Lys		Lys/Asn		Asn/Asn	
	Інсулт (-)	Інсулт (+)	Інсулт (-)	Інсулт (+)	Інсулт (-)	Інсулт (+)
Жінки	30 (38,0 %)	30 (36,6 %)	14 (35,0 %)	36 (53,7 %)	1 (20,0 %)	6 (28,6 %)
Чоловіки	49 (62,0 %)	52 (63,4 %)	26 (65,0 %)	31 (46,3 %)	4 (80,0 %)	15 (71,4 %)
Разом	79 (100 %)	82 (100 %)	40 (100 %)	67 (100 %)	5 (100 %)	21 (100 %)
$\chi^2$	0,033		3,530		0,151	
P	0,492		0,046		0,589	

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках. P – статистична значимість відмінностей між порівнюваними групами за  $\chi^2$  –критерієм Пірсона.

бами контрольної групи є статистично значимою (P = 0,046). Що стосується гомозигот як за основним так і за мінорним алелем достовірної різниці у групах порівняння не виявлено.

За даними логістичної регресії (табл. 5) виявлено збільшення ризику розвитку ІАТІ в залеж-

ності від статі. У жінок з Lys/Asn генотипом ризик розвитку інсульту більший в 2,6 раза (P = 0,020; OR = 2,571). Для носіїв гомозиготного Asn/Asn генотипу серед чоловіків ризик виникнення ІАТІ підвищується в 3,5 раза (P = 0,034; OR = 3,534).

Таблиця 5

## Аналіз ризику ІАТІ залежно від генотипу за Lys198Asn поліморфізмом гена ET-1 у жінок і чоловіків

Стать	Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95 % CI для OR нижній	95 % CI для OR верхній
Жінки	Lys/Asn	0,944	0,407	5,378	0,020	2,571	1,157	5,713
	Asn/Asn	1,792	1,111	2,603	0,107	6,000	0,681	52,900
Чоловіки	Lys/Asn	0,116	0,332	0,123	0,726	1,124	0,586	2,155
	Asn/Asn	1,262	0,597	4,472	0,034	3,534	1,097	11,385

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

Ген EDN-1 людини міститься в довгому плечі 6-ї хромосоми (6p24-p23) Довжина гена становить 6836 нуклеотидів, він складається з 5 екзонів, розділених чотирма інтронами [11, 12, 13].

Суть однонуклеотидного поліморфізму Lys198Asn полягає в тому, що в 5-му екзоні гена ендотеліну-1 у 5665-й позиції гуанін замінено на тимін. Це призводить до того, що 198-а амінокислота молекули ET-1 лізин замінюється на аспарагін.

Зміна первинної структури білкових молекул може виявляти себе різноманітними функціональними порушеннями. Стосовно ET-1 слід чекати збільшення рівня експресії даного білка, підвищення його активності, зміни ендотеліозалежних механізмів вазорегуляції в бік вазоконстрикції, що може призводити до розвитку артеріальної гіпертензії та вазоспазму церебральних судин. Чи змінюються зазначені вище ефекти ET-1 за умов Lys198Asn поліморфізму його гена, - питання, яке ще залишається без відповіді.

На сьогодні є декілька праць, в яких вивчався зв'язок Lys198Asn поліморфізму з розвитком ІАТІ та статтю як його немодифікованого фактору ризику. У дослідженні Yamaguchi et al. взяли участь 2705 жителів Японії (1244 чоловіків і 1461 жінка), в тому числі 636 хворих з ІАТІ (372 чоловіки та 264 жінки). За даними мультифакторіального логістичного регресійного аналізу зв'язок Lys198Asn поліморфізму з ІАТІ був підтверджений у жінок з домінуючою та адитивною моделлю успадкування ( $P < 0,005$ ). Однак для чоловіків даний зв'язок не підтвердився. На думку авторів статеві відмінності в асоціації поліморфізмів з ІАТІ можуть бути пов'язані з різницею статевих гормонів. Естрогени здійснюють позитивний вплив на судинну стінку та її вазомоторну функцію, стимулюють продукцію оксиду азоту, а також пригнічують виділення ET-1 клітинами судинного ендотелію [14]. Зовсім інші результати

були отримані групою вчених на чолі з MacClellan L. R., які вивчали роль Lys198Asn поліморфізму гена EDN-1 у розвитку ІАТІ серед молодих американських жінок (середній вік хворих на ІАТІ становив  $40.0 \pm 7.9$ , а в контрольній групі  $37.9 \pm 7.5$  років). Результати розподілу генотипів контрольної групи та групи хворих з ІАТІ показали відсутність достовірного зв'язку між розвитком інсульту та цим поліморфізмом [15]. Lei Zhang дослідив вплив Lys198Asn поліморфізму на розвиток ішемічного інсульту в китайській популяції. Було встановлено, що в чоловіків носіїв мінорного алеля (Lys/Asn + Asn/Asn генотип) ризик розвитку інсульту збільшується в 1,49 раза ( $P = 0.048$ ), проте в жінок асоціації з даним поліморфізмом не виявлено [16].

### Висновки

1. Поліморфізм Lys198Asn 5-го екзона гена EDN-1 асоційований із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту.

2. У жінок із Lys/Asn генотипом ризик розвитку інсульту більший в 2,6 раза, а у чоловіків носіїв гомозиготного Asn/Asn генотипу ризик виникнення ІАТІ в 3,5 рази більший порівняно з гомозиготами за основним алелем.

### Перспективи подальших досліджень

Буде продовжено вивчення зв'язків факторів ризику ІАТІ з різними варіантами генотипу за Lys198Asn поліморфізмом гена ET-1. При цьому повинен враховуватися вплив генетичних чинників на фактори, що збільшують ризик розвитку ішемічних інсультів (гіподинамія, куріння, порушення ліпопротеїнового складу плазми крові, зміни у системі гемостазу тощо).

**Література.** 1. Олешко Т. Б. Зв'язок Lys198Asn поліморфізму гена ендотеліну-1 з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб із нормальним та підвищеним артеріальним тиском / Т. Б. Олешко, В. Ю. Гарбузова, О. В. Атаман // J. Clin. Exp. Med. Res. - 2015. - Т.3, № 4. - С. 464-

469. 2. Шишкин А. Н. Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия / А. Н. Шишкин, М. Л. Лындина // Артериальная гипертензия. - 2008. - Т. 14, № 4. - С. 315-319. 3. Коноплева Л. Ф. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и методы ее коррекции / Л. Ф. Коноплева // Therapia. - 2011. - № 3 (56). - С. 26-30. 4. Кузьмина Н. В. Функциональное состояние сосудистого эндотелия у больных гипертонической болезнью / Н. В. Кузьмина, В. К. Серкова // Український терапевтичний журнал. - 2008. - № 2. - С. 21-27. 5. The Vascular Endothelium and Human Diseases / P. Rajendran, T. Rengarajan, J. Thangavel [et al.] // Int. J. Biol. Sci. - 2013. - Vol. 9 (10). - P. 1057-1069. 6. Endothelial dysfunction and procoagulant activity in acute ischemic stroke / A. Blum, V. Vaispapis, L. Keinan-Boke [et al.] // Journal of Vascular and Interventional Neurology. - 2012. - Vol. 4(1). - p.33-39. 7. Витм F. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease / F. Витм, J. Pernow // Cardiovascular Research. - 2007. - Vol. 76. - P. 8-18. 8. Edvinsson L. Cerebrovascular endothelin receptor upregulation in cerebral ischemia / L. Edvinsson // Current Vascular Pharmacology. - 2009. - Vol. 7. - P. 26-33. 9. Эндотелий. Функция и дисфункция / З. А. Лупинская, А. Г. Зарифьян, Т. Ц. Гурович, С. Г. Шлейфер. - Б.: КPCY, 2008. - 373 с. 10. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment / H. P. Adams, B. H. Bendixen, L. J. Kappelle et al. // Stroke. - 1993. - Vol. 24. - P. 35-41. 11. Endothelin-1 gene regulation / L. R. Stow, M. E. Jacobs, C. S. Wingo, B. D. Cain // The FASEB Journal. - 2011. - V. 25. - P. 16-28. 12. Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin / D. E. Kohan, N. F. Rossi, E. W. Inscho and D. M. Pollock // Physiol. Rev. - 2011. - Vol. 91. - P. 1-77. 13. Koyama Y. Endothelin systems in the brain: involvement in pathophysiological responses of damaged nerve tissues / Y. Koyama // BioMolecular Concepts. - 2013. - Vol. 4. - I. 4. - P. 335-347. 14. Genetic risk for atherothrombotic cerebral infarction in individuals stratified by sex or Conventional Risk Factors For Atherosclerosis / S. Yamaguchi, Y. Yamada, N. Metoki et al. // International Journal Of Molecular Medicine. - 2006. - V. 18. - P. 871-883. 15. Relation of Candidate Genes that Encode for Endothelial Function to Migraine and Stroke The Stroke Prevention in Young Women Study / L. R. MacClellan, T. D. Howard, J. W. Cole et al. // Stroke. - 2009. - V. 40. - P. 550-557. 16. Zhang L. Effect of SNP Polymorphisms of EDN1, EDNRA, and EDNRB Gene on Ischemic Stroke / L. Zhang, R. Sui // Cell Biochem. Biophys. - 2014. - V. 70. - P. 233-239.

**АНАЛІЗ СВ'ЯЗИ LYS198ASN ПОЛІМОРФНИХ  
ВАРІАНТОВ ГЕНА ЕНДОТЕЛІНА-1 (EDN-1) С  
ІШЕМІЧЕСКИМ АТЕРОТРОМБОТИЧНИМ  
ІНСУЛЬТОМ У ЛІЦ РАЗНОГО ПОЛА**

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

**Резюме.** Приведены результаты определения частоты

аллельных вариантов гена ЭТ-1, являющегося одним из ключевых белков-регуляторов сосудистого тонуса в 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (ИАТИ) и 124 здоровых людей (контрольная группа). Установлено, что соотношение гомозигот по основному аллелю, гетерозигот и гомозигот по минорному аллелю по Lys198Asn (rs5370) полиморфизму 5 экзона гена EDN-1 у больных ИАТИ составляет 48,2; 39,4 и 12,4 %, а в контрольной группе - соответственно 63,7; 32,3 и 4,0 % (P = 0,008 по  $\chi^2$ -критерию). У женщин, которые являются носителями гетерозиготного Lys/Asn генотипа, риск возникновения инсульта больше почти в 2,6 раза (P = 0,020; OR = 2,571), а у мужчин гомозигот по минорному аллелю (Asn/Asn) - в 3,5 раза (P = 0,034; OR = 3,534).

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

**ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN  
LYS198ASN POLYMORPHIC VARIANTS OF  
ENDOTHELIN-1 GENE (EDN-1) AND ISCHEMIC  
ATHEROTHROMBOTIC STROKE IN PERSONS OF  
DIFFERENT SEX**

*T.B. Oleshko, D.Yu. Svyrydenko, V.Yu. Garbuzova*

**Abstract.** The results of frequency determination of ET-1 gene allele variants, that is one of key vascular tone regulators are given in 170 patients with ischemic atherothrombotic stroke (IAS) and 124 healthy people (control group). It has been established that homozygote correlation by basic allele, heterozygote and homozygotes by minor allele while analyzing Lys198Asn (rs5370) polymorphism of the 5th ET-1 gene exon in IAS patients is 48.2 %, 39.4 % and 12.4 %, and in the control group - correspondingly 63.7 %, 32.3 % and 4.0 % (P=0.008 at  $\chi^2$ -criterion). Women who are carriers of the heterozygote Lys/Asn genotype risk of stroke greater nearly 2.6 times (P = 0,020; OR = 2,571), and in men by minor allele homozygotes (Asn/Asn) - 3.5 times (P = 0,034; OR = 3,534).

**Key words:** endothelin-1, gene polymorphism, ischemic stroke.

**HSEE of Ukraine "Sumy State University"**

*Clin. and experim. pathol. - 2016. - Vol. 15, №1 (55). - P.99-103.*

*Надійшла до редакції 26.02.2016*

*Рецензент – проф. Л.П. Сидорчук*

*© Т.Б. Олешко, Д.Ю. Свириденко, В.Ю. Гарбузова, 2016*