

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет

ОЛЕШКО ТЕТЯНА БОГДАНІВНА

УДК 616.831-005.4-005.1:575.113.2:616-018.74(043.3)

**ЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ЕНДОТЕЛІНУ ТА
ЕНДОТЕЛІНОВОГО РЕЦЕПТОРА З МЕХАНІЗМАМИ ОСНОВНИХ
ПРОЯВІВ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ**

Спеціальність 14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Суми – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Сумському державному університеті МОН України.

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор
Гарбузова Вікторія Юрївна,
Сумський державний університет
МОН України, професор кафедри фізіології
і патофізіології з курсом медичної біології.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Досенко Віктор Євгенович,
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України (м. Київ), завідувач відділу
загальної та молекулярної патофізіології;

доктор медичних наук, професор
Вастьянов Руслан Сергійович,
Одеський національний медичний університет
МОЗ України (м. Одеса), завідувач кафедри
загальної та клінічної патологічної фізіології.

Захист відбудеться 02 лютого 2018 року о 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 55.051.05 при Сумському державному університеті (40000, м. Суми, вулиця Покровська, 9/1).

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Сумського державного університету (40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2).

Автореферат розісланий 28 грудня 2017 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат медичних наук

О. С. Погорелова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Судинні захворювання головного мозку є однією з найбільш важливих і складних проблем клінічної медицини, що обумовлено їх значною поширеністю, високою інвалідністю та смертністю.

У структурі судинних захворювань головного мозку саме ішемічний інсульт є однією з найпоширеніших клінічних форм гострого порушення мозкового кровообігу. За даними міжнародних мультицентрових досліджень, співвідношення ішемічних і геморагічних інсультів становить 80–90 % та 10–20 % відповідно (Carty C. L. et al., 2012; Kadojić D. et al., 2012; Zhao Y. H. et al., 2013; Rasulova K. A. et al., 2014). Тому серед хворих із наслідками порушення мозкового кровообігу і вираженим ступенем інвалідності переважають особи, які перенесли його ішемічний варіант (Ершов В. И. и соавт., 2011; Бугрова С. Г., 2011; Зозуля І. С. та співавт., 2012).

В Україні кожного року діагностується 3 млн випадків цереброваскулярних захворювань (ЦВЗ) (Саєнко Я. А. та співавт., 2013). Захворюваність на мозковий інсульт у нашій країні істотно перевищує аналогічні показники в розвинених країнах світу і становить 31 % у нозологічній структурі всіх форм цереброваскулярних хвороб. Частота виникнення інсульту в Україні, за даними різних авторів, варіює від 110 до 130 тис. випадків упродовж року (Коценко Ю. И. и соавт., 2012; Статинова Е. А. та співавт., 2014; Тяглый С. В. и соавт., 2014). Кожні 5 хвилин в однієї особи в нашій країні розвивається інсульт і кожні 12 хвилин один із хворих помирає від інсульту. Статистичні дані свідчать, що 30–40 % пацієнтів з інсультом в Україні вмирають упродовж одного місяця і близько половини – впродовж одного року, 20–40 % стають інвалідами і лише менше 20 % повертаються до повноцінного життя (Чуйко Н. Я., 2013). Аналіз динаміки захворюваності на інсульт в Україні за останні 10 років свідчить про несприятливу тенденцію до її зростання, що набула значної інтенсивності за останні 2 роки (Зозуля А. І. та співавт., 2014). Близько 10 % інсультів виникають в осіб, молодших за 50 років (Janssen A. W. et al., 2011).

Невпинне зростання кількості хворих з цереброваскулярними захворюваннями вимагає покращень існуючих методик діагностики, попередження розвитку та лікування цієї патології. Існують численні докази генетичної залежності цілого ряду механізмів, причетних до уражень кровоносних судин, що призводять до цереброваскулярної патології. Тому вивчення впливу генетичних факторів на розвиток найпоширеніших мультифакторіальних захворювань є однією з найактуальніших проблем теоретичної та практичної медицини.

У патогенезі ішемічного ураження головного мозку важливу роль відіграє порушення функції ендотелію (Blum A. et al., 2012; Rajendran P. et al., 2013). Ендотеліальна дисфункція (ЕД) визначається як дисбаланс між продукцією вазоконстрикторних, протромботичних, проліферативних факторів, з одного боку, та вазодилатуючих, ангіопротективних та антипроліферативних

факторів, з іншого, що призводить до порушень гомеостазу судинної стінки (Avogaro A. et al., 2011). Серед вазоактивних речовин, які продукують клітини ендотелію, важливими є NO та ендотелін-1 (EDN1). Порушення рівноваги між синтезом цих двох факторів є ознакою ЕД (Majumder K. et al., 2015). ЕД вважається раннім маркером атеросклерозу, що передує ангіографічним або ультразвуковим доказам атеросклеротичного процесу (Davignon J. et al., 2004). Відомо, що сироваткова концентрація EDN1 корелює з інтенсивністю набряку мозку в пацієнтів з ішемічним інсультом (Moldes O. et al., 2008). ЕД є ранньою патофізіологічною ознакою і предиктором судинної патології та ішемічного інсульту (Мостбауер Г. В., 2012). У пацієнтів із гострим ішемічним інсультом доведено наявність дисфункції ендотелію протягом перших 24 годин після госпіталізації, яка прогресивно збільшується протягом 1-го тижня госпіталізації (Свиридова Н. К., 2015).

Розвитку ЕД в найбільшій мірі сприяє ендотелін-1 – біологічно активний пептид ендотеліального походження, що є одним із найважливіших регуляторів функціонального стану ендотелію та одним із найпотужніших ендогенних вазоконстрикторів, відомих на сьогодні (Kohan D. E. et al., 2011; Mazzuca M. Q. et al., 2012; Parida A. et al., 2013; Verweij N. et al., 2013). Крім судинозвужувального, для EDN1 також характерні прозапальний, мітогенний та проліферативний ефекти, стимуляція утворення вільних радикалів та активація тромбоцитів (Саєнко Я. А. та співавт., 2013; Чуйко Н. Я., 2013). На основі цих біологічних ефектів ендотелін-1 залучений як важливий фактор у розвитку судинної дисфункції та серцево-судинних захворювань. Доведено, що рівень EDN1 підвищується у хворих в гострому періоді ішемічного інсульту (Топузова М. П., 2013).

Ендотелін-1 реалізує свої ефекти за допомогою взаємодії зі специфічним рецептором типу А (EDNRA), асоційованим з G-білком. У результаті їх взаємодії виникають стійка вазоконстрикція і проліферація гладком'язових клітин а, отже, це сприяє виникненню та прогресуванню ЕД (Parida A. et al., 2013; Plooy C. S. et al., 2015). На сьогодні з'ясовано, що на ранній стадії інсульту підвищується рівень EDN1, активуються EDNRA гладком'язових клітин судин мозку, внаслідок чого виникає спазм судин (Koyma Y., 2013). Таким чином, ендотелін-1 та ендотеліновий рецептор типу А є одними з ключових ланок, від яких залежить розвиток багатьох серцево-судинних захворювань та ішемічного інсульту зокрема (Mazzuca M. Q. et al., 2012; Koyma Y., 2013).

Функціонування ендотеліну-1 та ендотелінового рецептора типу А, безумовно, визначається структурними особливостями їх генів. Тому дослідження ролі однонуклеотидних поліморфізмів генів *EDN1* і *EDNRA* у розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту має велике теоретичне й практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Представлена дисертаційна робота є частиною планових комплексних науково-дослідних тем кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології

Сумського державного університету «Роль поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб» (номер державної реєстрації 0114U006297) та «Зв'язок алельного поліморфізму генів ектопічної кальцифікації з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень» (номер державної реєстрації 0115U000688).

Мета дослідження. Встановлення асоціації одонуклеотидних поліморфізмів Lys198Asn гена *EDN1* та C+70G гена *EDNRA* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту, а також аналіз впливу поліморфних варіантів досліджуваних генів на виникнення ішемії головного мозку в пацієнтів з найпоширенішими факторами ризику.

Для реалізації мети було визначено такі завдання:

1. Дослідити частоту одонуклеотидного поліморфізму Lys198Asn гена *EDN1* у хворих з ІАТІ та в осіб без ознак порушень мозкового кровообігу.
2. Визначити частоту генотипів за C+70G-поліморфізмом гена *EDNRA* у хворих з ІАТІ та осіб групи порівняння.
3. Дослідити асоціацію поліморфізмів Lys198Asn гена *EDN1* та C+70G гена *EDNRA* з виникненням ІАТІ у пацієнтів із різними факторами ризику (стать, артеріальна гіпертензія, паління, надмірна маса тіла).
4. Вивчити вплив поліморфних варіантів генів *EDN1* та *EDNRA* на основні характеристики ІАТІ.
5. З'ясувати комплексний вплив поліморфізмів Lys198Asn та C+70G на розвиток ІАТІ.

Об'єкт дослідження – поліморфізм генів *EDN1* та *EDNRA*.

Предмет дослідження – участь досліджуваних генетичних чинників (одонуклеотидних поліморфізмів генів *EDN1* та *EDNRA*) у розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

Методи дослідження: клінічні методи дослідження, що підтверджують наявність ІАТІ, лабораторні (загальний аналіз крові, біохімічні дослідження крові, глюкоза плазми крові натще), інструментальні (електрокардіографія (ЕКГ) у 12 відведеннях, вимірювання артеріального тиску (АТ), розрахунок показників індексу маси тіла (ІМТ)), молекулярно-генетичні методи вивчення одонуклеотидних поліморфізмів генів (полімеразна ланцюгова реакція з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP)), статистичні методи обробки цифрових даних та аналізу одержаних результатів.

Наукова новизна одержаних результатів.

Установлено розподіл генотипів та частоту алелів за поліморфізмами Lys198Asn гена *EDN1* та C+70G гена *EDNRA* у практично здорових осіб та хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом серед представників української популяції. Виявлено відмінність у співвідношенні генотипів за Lys198Asn-поліморфним варіантом гена *EDN1* між хворими з ІАТІ та особами контрольної групи. Доведено, що у гомозигот за мінорним алелем Lys198Asn-поліморфізму ризик розвитку ІАТІ більший у 4 рази, порівняно з гомозиготами

за основним алелем. Проте С+70G-алельний варіант гена *EDNRA* з ризиком розвитку цього захворювання не асоційований.

Виявлено, що вплив вивчених генетичних чинників на розвиток цереброваскулярної патології має статеві особливості. Ризик виникнення ІАТІ в осіб жіночої статі з Lys/Asn-генотипом (поліморфізм гена *EDNI*) більший у 2,6 раза, а в чоловіків, що є носіями Asn/Asn-генотипу, – у 3,5 раза, ніж у пацієнтів із Lys/Lys-генотипом.

Уперше проаналізовано вплив поліморфних варіантів генів *EDNI* та *EDNRA* на розвиток ІАТІ у пацієнтів із різними факторами ризику. Встановлено, що в осіб з $IMT \geq 25$ кг/м², гомозигот за мінорним алелем Lys198Asn-поліморфізму, ІАТІ виникає у 4,6 раза частіше, ніж у гомозигот за основним алелем. Ризик розвитку ІАТІ у пацієнтів з $IMT < 25$ кг/м², носіїв гетерозиготного (C/G) генотипу за С+70G-поліморфізмом, більший у 3,7 раза порівняно з гомозиготами за основним алелем. Для носіїв гетерозиготного Lys/Asn-генотипу, що страждають на артеріальну гіпертензію, ризик виникнення інсульту більший майже вдвічі, а в гомозигот за мінорним алелем (Asn/Asn) ризик збільшується в 4,1 раза порівняно з носіями Lys/Lys-генотипу. Для носіїв Asn/Asn-генотипу, які не є курцями, виявлене підвищення ризику розвитку ІАТІ у 3,4 раза.

Практичне значення одержаних результатів.

Результати, одержані в дисертаційній роботі, розширюють та поглиблюють наукові відомості про роль таких генетичних чинників, як однонуклеотидні поліморфізми генів, причетних до розвитку ендотеліальної дисфункції і таких її наслідків, як ішемічний атеротромботичний інсульт.

Дослідження даних про зв'язок Lys198Asn-поліморфного сайту гена *EDNI* та С+70G-поліморфізму гена *EDNRA* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту можуть застосовуватися для прогнозування ймовірності виникнення цього захворювання у пацієнтів із факторами ризику ендотеліальної дисфункції. Виявлення генетичної схильності до ІАТІ дозволить своєчасно проводити заходи профілактики та застосовувати індивідуальний підхід до вибору методів лікування у випадку розвитку недуги.

Результати наукових досліджень, викладених у дисертації, впроваджено у науково-дослідну роботу і навчальний процес на кафедрах патофізіології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Івано-Франківського національного медичного університету, Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, на кафедрі фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету МОН України.

Особистий внесок здобувача.

Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз наукової літератури за темою дисертації, сформульовано мету і завдання роботи, розроблено та обґрунтовано план досліджень. Молекулярно-генетичні дослідження проведено дисертантом у науковій лабораторії молекулярно-

генетичних досліджень СумДУ (науковий керівник – проф. О. В. Атаман, завідувач лабораторії – проф. В. Ю. Гарбузова). Автором статистично опрацьовано та проаналізовано одержані результати, написано всі розділи дисертаційної роботи та сформульовано висновки, а також підготовлено матеріали до публікації.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення дисертації представлено та обговорено на 8th International Student Medical Congress in Kosice, Slovakia (22–24 June 2016); 27th European Students' Conference "Facing Antimicrobial Resistance – Research Revolution wanted", Berlin, Germany (September 28 – October 1 2016); 4th International Scientific Conference of Students and Young Scientists "Topical Issues of Clinical and Theoretical Medicine", Sumy, Ukraine (21–22 April 2016); IV Eurasian congress of cardiologists, Yerevan, Armenia (10–11 October 2016); Scientific-practical conference devoted to the 100th anniversary of V. Y. Axundov, Republic of Azerbaijan, Baku (26 June 2016); 5th International Scientific Conference of Students and Young Scientists "Topical Issues of Clinical and Theoretical Medicine", Sumy, Ukraine (20–21 April 2017); VII Національному конгресі патофізіологів України за міжнародної участі: «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», м. Харків (5–7 жовтня 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні наукові дослідження та розробки: теоретична цінність та практичні результати», Братислава, Словаччина (15–18 березня 2016 р.); XX Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених, Тернопіль, Україна (25–27 квітня 2016 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «XVI читання ім. В. В. Підвисоцького», Одеса, Україна (18–19 травня 2017 р.); Республіканській науково-практичній конференції «Метаболический синдром и другие категории дисметаболизма в различных областях медицины», Ташкент, Узбекистан (13 квітня 2017 р.).

Публікації.

За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, з яких 8 статей (1 – у зарубіжному виданні, що обліковується наукометричною базою Scopus, 7 – у фахових виданнях, що входять до переліку ВАК України), 11 тез доповідей у матеріалах конгресів та конференцій, 1 патент на корисну модель. Дві наукові праці опубліковано за одноосібної участі автора.

Обсяг і структура дисертації.

Дисертаційну роботу викладено на 164 сторінках (основний обсяг становить 116 сторінок). Вона складається із вступу, чотирьох розділів: огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, а також висновків та додатків. Список використаної літератури містить 261 джерело (90 – кирилицею, 171 – латиницею). У роботі наведено 13 рисунків, 33 таблиці, 16 додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження.

Загальна характеристика клінічного матеріалу. Для дослідження була використана венозна кров 170 хворих з ІАТІ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік ($64,7 \pm 0,73$) року). Ішемічний характер інсульту встановлювали за даними анамнезу та клінічної картини хвороби, результатами КТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST на підставі даних анамнезу, особливостей клінічного перебігу хвороби, результатів ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови та ЕКГ. Пацієнти з лакунарним, кардіоеMBOLІЧНИМ ішемічним інсультом та ішемічним інсультом нез'ясованої етіології виключались із дослідної групи.

Групу контролю становили 124 особи, в яких відсутність гострої серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, реєстрації електрокардіограми, вимірювання артеріального тиску та проведення загальноприйнятого неврологічного огляду.

Групи порівняння не відрізнялись між собою за співвідношенням осіб різної статі ($P = 0,294$), середніми показниками ІМТ ($P = 0,279$), кількістю осіб із надмірною вагою ($P = 0,197$) та кількістю курців ($P = 0,403$). При цьому середній вік представників контрольної групи ($(76,7 \pm 10,2)$ року) був значущо вищим, ніж у пацієнтів з інсультом ($P < 0,001$). Останнє збільшувало надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ІАТІ в цих осіб у подальших періодах їх життя.

Роботу виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження», Наказу МОЗ України № 690 (від 23.09.2009 р.) та схвалено Комісією з біоетики Медичного інституту Сумського державного університету. Перед залученням до дослідження всі учасники дали письмову інформовану згоду.

Молекулярно-генетичні дослідження. Алельний поліморфізм *Lys198Asn* гена *EDN1* і *C+70G*-поліморфного сайту гена *EDNRA* вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції із подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікацію проводили протягом 35 циклів. Режими ампліфікації ділянок ДНК, що містять досліджувані поліморфізми, та нуклеотидна послідовність праймерів ("Metabion", Німеччина) подані в таблиці 1.

Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували з відповідною рестриктазою: 2 ОД *Sac81* – *Lys198Asn*-поліморфізм; 3 ОД *NtuC1* – *C+70G*-поліморфізм. Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію.

Таблиця 1 – Режими ампліфікації

Полі-морфізм	Прай-мер	Нуклеотидна послідовність	Ампліфікація		
			D (t, час)	H (t, час)	E (t, час)
Lys198Asn	Fwd	5' TCTTGCTTTATTAGGTCGGAGACC 3'	94 °C, 60 с	61 °C, 60 с	72 °C, 45 с
	Rev	5' TTTGAACGAGGACGCTGGTC 3'			
C+70G	Fwd	5' TAGAAGCACTCCTCGGTA CTCC 3'	94 °C, 50 с	60 °C, 40 с	72 °C, 60 с
	Rev	5' TCGTAGATGTTGTGGGTGGATA 3'.			

Примітка: Fwd – прямий праймер; Rev – зворотний праймер; D – денатурація; H – гібридизація праймерів; E – елонгація

Горизонтальний електрофорез проводили в камері Helicon (0,13 А; 160 V; 35 хв – Lys198Asn-поліморфізм; 0,1 А; 140 V; 25 хв – C+70G-поліморфізм). Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

Статистичний аналіз результатів дослідження. Статистичне опрацювання одержаних результатів здійснювали за допомогою програми SPSS-17.0. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. Значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими. Значущість відмінностей між середніми значеннями декількох груп даних визначали використовуючи однофакторний дисперсійний аналіз із критерієм Фішера. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стьюдента (t). Прогнозування ризику розвитку ІАТІ проводили за допомогою методу логістичної регресії. Для виявлення та характеристики міжгенних взаємодій використовували метод MDR (Multifactor Dimensionality Reduction).

Результати досліджень та їх обговорення.

1. Вплив алельних поліморфізмів Lys198Asn гена EDN1 і C+70G гена EDNRA на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту.

Завдяки проведеному генотипуванню було виявлено, що у хворих з 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. 1 А). При цьому відмінності частоти зазначених генотипів між групою хворих з ІАТІ та контрольною групою були достовірними ($\chi^2 = 9,757$; $P = 0,008$).

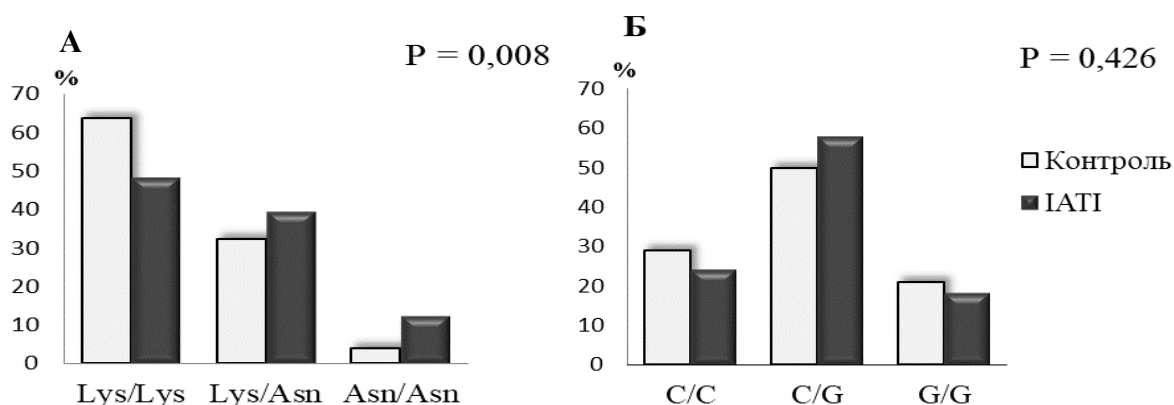


Рисунок 1 – Частота алельних варіантів гена *EDNI* за поліморфізмом Lys198Asn (А) і С+70G-поліморфізмом гена *EDNRA* (Б) у хворих з ІАТІ (чорні стовпчики) і в контрольній групі (білі стовпчики). Р – статистична значущість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Співвідношення гомозигот за основним алелем С/С поліморфізму гена *EDNRA*, гетерозигот С/Г і гомозигот за «патологічним» алелем G/G в основній групі становило 24,1; 57,6 і 18,2 %, а в контрольній – 29,0; 50,0 і 21,0 % відповідно (рис. 1 Б). Під час аналізу достовірних відмінностей у розподілі різних варіантів генотипу між хворими з ІАТІ та особами контрольної групи за С+70G-поліморфізмом не виявлено ($\chi^2 = 1,708$; $P = 0,426$). Таким чином, не існує зв'язку між вивченим генетичним чинником і розвитком ІАТІ.

У таблиці 2 наведені результати аналізу асоціації поліморфних варіантів Lys198Asn (ген *EDNI*) і С+70G (ген *EDNRA*) з розвитком ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування.

Таблиця 2 – Аналіз асоціації Lys198Asn- і С+70G-поліморфних варіантів генів *EDNI* та *EDNRA* з розвитком ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування

Ген	SNP	Модель	P	OR (95 % CI)
<i>EDNI</i>	Lys198Asn	Домінантна	0,009	1,884 (1,173–3,026)
		Рецесивна	0,018	3,354 (1,228–9,160)
		Наддомінантна	0,209	1,366 (0,840–2,221)
		Адитивна ^а	0,060	1,614 (0,980–2,657)
			0,007	4,046 (1,455–11,256)
<i>EDNRA</i>	С+70G	Домінантна	0,344	1,287 (0,763–2,172)
		Рецесивна	0,559	0,841 (0,470–1,504)
		Наддомінантна	0,194	1,361 (0,855–2,167)
		Адитивна	0,242	1,388 (0,801–2,403)
			0,896	1,047 (0,527–2,081)

SNP – однонуклеотидний поліморфізм; CI – довірчий інтервал; OR – відношення шансів.

^а Верхній рядок в адитивній моделі містить результати порівняння між Аа- та АА-генотипами, нижній рядок – між аа- та АА-генотипами

Використання методу логістичної регресії дозволило встановити збільшення ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту за наявності Lys198Asn-поліморфізму гена *EDN1*. У осіб, що є гомозиготами за мінорним алелем, ймовірність виникнення ІАТІ більша у 4 рази, порівняно з гомозиготами за основним алелем ($P = 0,07$; $OR = 4,046$).

2. Асоціація Lys198Asn-поліморфізму гена *EDN1* і C+70G-поліморфного варіанта гена *EDNRA* з ішемічним атеротромботичним інсультом у осіб з різними факторами ризику.

Ішемічний атеротромботичний інсульт є мультифакторіальним захворюванням, у розвитку якого важливу роль відіграють статеві відмінності, артеріальна гіпертензія, надлишкова маса тіла та куріння.

Результати аналізу зв'язку генотипів за Lys198Asn-поліморфізмом гена *EDN1* з основними факторами ризику ІАТІ за допомогою логістичної регресії в рамках чотирьох моделей успадкування наведені в табл. 3.

Регресійний аналіз зв'язку між поліморфним сайтом гена *EDN1* та ІАТІ в осіб жіночої статі засвідчив, що у жінок, які є носіями мінорного алеля, ризик розвитку ішемічного інсульту в 2,8 рази ($P = 0,009$; $OR = 2,800$) вищий, ніж в осіб жіночої статі з Lys/Lys-генотипом (у рамках домінантної моделі). У чоловіків, що є носіями гомозиготного Asn/Asn-генотипу, ризик виникнення ІАТІ підвищується в 3,5 рази ($P = 0,034$; $OR = 3,534$) порівняно з гомозиготами за основним алелем (адитивна модель).

Вивчення зв'язку Lys198Asn-поліморфного локуса гена *EDN1* з ішемічним інсультом в осіб без артеріальної гіпертензії показало відсутність статистично значущих результатів ($P > 0,05$). Застосування логістичної регресії для аналізу в осіб з артеріальною гіпертензією дало можливість встановити, що у гомозигот за мінорним алелем (Asn/Asn) ризик настання ІАТІ збільшується в 4,1 рази ($P = 0,033$; $OR = 4,107$) порівняно з гомозиготами за основним алелем.

Після розподілу осіб груп порівняння на дві підгрупи, утворені залежно від показника ІМТ, не виявлено зв'язку Lys198Asn-поліморфізму із розвитком інфаркту головного мозку в осіб з $ІМТ < 25$ кг/м². Натомість у осіб з $ІМТ \geq 25$ кг/м² виявлено, що у гомозигот за мінорним алелем ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту більший у 4,6 рази порівняно з гомозиготами за основним алелем ($P = 0,020$; $OR = 4,583$).

У результаті вивчення асоціації різних генотипів за поліморфізмом гена *EDN1* з розвитком ІАТІ серед осіб, що не курять, та курців одержано наступні дані. Для осіб, що не курять, найбільш прогностично значущою виявилась адитивна модель успадкування. Згідно з цією моделлю у носіїв Asn/Asn-генотипу ризик розвитку ІАТІ вищий у 3,4 рази, ніж у носіїв Lys/Lys-генотипу ($P = 0,041$; $OR = 3,379$). Стосовно курців встановлено, що в носіїв мінорного алеля (Lys/Asn-, Asn/Asn-генотипи) ймовірність виникнення інсульту більша в 3,1 рази порівняно з гомозиготами за основним алелем ($P = 0,023$; $OR = 3,115$).

Таблиця 3 – Аналіз асоціації поліморфних варіантів Lys198Asn гена EDN1 із факторами ризику ІАТІ з урахуванням різних моделей успадкування

	<i>Модель</i>	<i>P</i>	<i>OR (95 % CI)</i>
Жінки	Домінантна	0,009	2,800 (1,287–6,090)
	Рецесивна	0,207	4,000 (0,465–34,377)
	Наддомінантна	0,046	2,214 (1,013–4,841)
	Адитивна ^a	0,020	2,571 (1,157–5,713)
		0,107	6,000 (0,681–52,900)
Чоловіки	Домінантна	0,232	1,445 (0,790–2,641)
	Рецесивна	0,037	3,389 (1,077–10,662)
	Наддомінантна	0,856	0,943 (0,501–1,777)
	Адитивна	0,726	1,124 (0,586–2,155)
		0,034	3,534 (1,097–11,385)
Артеріальна гіпертензія	Домінантна	0,008	2,190 (1,215–3,950)
	Рецесивна	0,082	3,097 (0,866–11,084)
	Наддомінантна	0,106	1,639 (0,900–2,986)
	Адитивна	0,034	1,951 (1,054–3,612)
		0,033	4,107 (1,120–15,063)
ІМТ ≥ 25 кг/м ²	Домінантна	0,030	1,862 (1,060–3,270)
	Рецесивна	0,036	3,870 (1,092–13,719)
	Наддомінантна	0,353	1,316 (0,738–2,347)
	Адитивна	0,141	1,560 (0,863–2,819)
		0,020	4,583 (1,268–16,562)
Куріння (-)	Домінантна	0,085	1,618 (0,935–2,799)
	Рецесивна	0,065	2,939 (0,934–9,247)
	Наддомінантна	0,501	1,212 (0,692–2,122)
	Адитивна	0,247	1,404 (0,790–2,497)
		0,041	3,379 (1,049–10,891)
Куріння (+)	Домінантна	0,023	3,115 (1,172–8,276)
	Рецесивна	0,148	4,884 (0,571–41,781)
	Наддомінантна	0,153	2,101 (0,760–5,812)
	Адитивна	0,071	2,601 (0,921–7,347)
		0,086	6,708 (0,764–58,868)

Примітка. Див. табл. 1

Дослідження асоціації поліморфного сайту С+70G гена *EDNRA* з основними факторами ризику ІАТІ методом логістичної регресії з урахуванням різних моделей успадкування дозволило встановити відсутність достовірної асоціації зі статтю, артеріальною гіпертензією та курінням. Однак в осіб із різним ІМТ було виявлено деякі відмінності (табл. 4).

Таблиця 4 – Аналіз асоціації поліморфних варіантів С+70G гена *EDNRA* із розвитком ІАТІ в осіб з ІМТ ≥ 25 кг/м² з урахуванням різних моделей успадкування

	Модель	P	OR (95 % CI)
ІМТ ≥ 25 кг/м ²	Домінантна	0,063	3,304 (0,938–11,637)
	Рецесивна	0,854	0,906 (0,317–2,594)
	Наддомінантна	0,100	2,154 (0,863–5,377)
	Аддитивна	0,049	3,684 (1,006–13,487)
0,226		2,500 (0,568–11,011)	

Примітка. Див. табл. 1

У осіб з ІМТ ≥ 25 кг/м², що є носіями гетерозиготного генотипу (С/С), ризик розвитку ІАТІ більший майже в 3,7 рази (P = 0,049; OR = 3,684), ніж у гомозигот за основним алелем.

3. Вплив *Lys198Asn*- і С+70G-алельних поліморфізмів генів *EDN1* та *EDNRA* на основні характеристики ішемічного атеротромботичного інсульту.

Одержані результати свідчать, що немає залежності між генотипом пацієнтів за поліморфізмами, що вивчалися, з одного боку, і ділянками артеріального басейну, атеротромботичні зміни яких призводять до ІАТІ, з іншого. Дана закономірність зберігається й після урахування статевих відмінностей та факту куріння. Однак виявлено асоціацію *Lys198Asn*-поліморфізму з артеріальним басейном ІАТІ в осіб з ІМТ < 25 кг/м² ($\chi^2 = 16,998$; P = 0,002). Також виявлено достовірні відмінності у розподілі генотипів за С+70G-поліморфним сайтом з артеріальним басейном, що зазнає уражень, в осіб із нормальним артеріальним тиском ($\chi^2 = 9,488$; P = 0,050).

Проведений аналіз засвідчив відсутність асоціації досліджуваних одонуклеотидних поліморфізмів із тяжкістю перебігу ІАТІ. Її також не було виявлено з урахуванням такого фактора ризику, як стать. Установлено відмінність у розподілі генотипів за С+70G-поліморфізмом гена *EDNRA* залежно від тяжкості клінічного перебігу ІАТІ у осіб з ІМТ ≥ 25 кг/м² ($\chi^2 = 11,650$; P = 0,020). У гомозигот за мінорним алелем *Lys198Asn*-поліморфізму з артеріальною гіпертензією тяжкий перебіг ІАТІ зустрічався частіше, ніж легкий чи середньої тяжкості ($\chi^2 = 11,278$; P = 0,024). Теж було виявлено достовірну асоціацію поліморфізму гена ендотеліну-1 зі ступенем тяжкості ІАТІ у осіб, що не курять ($\chi^2 = 11,369$; P = 0,023).

Як впливає з результатів досліджень, ні *Lys198Asn*-поліморфізм гена *EDN1*, ні С+70G-поліморфізм гена *EDNRA* не впливають на частоту повторних

випадків ішемічного атеротромботичного інсульту. Наявність у хворих таких вагомих факторів ризику, як стать, ІМТ, артеріальна гіпертензія та куріння, на повторюваність інсульту не впливали.

За результатами проведеного аналізу виявлено відсутність залежності характеристики неврологічної картини ІАТІ від досліджуваних поліморфних сайтів. Урахування статевих особливостей, величини ІМТ, наявності підвищеного артеріального тиску та факту куріння істотних змін в одержані результати не внесло.

4. Поєднаний вплив *Lys198Asn*- і *C+70G*-поліморфізмів генів *EDN1* та *EDNRA* на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту.

Співпадіння гомозиготи за мінорним алелем *Lys198Asn*-поліморфізму та одного із трьох можливих генотипів за *C+70G*-сайтом асоціюється із високим ризиком розвитку ІАТІ. При цьому збіг гетерозигот за двома сайтами також призводить до значного збільшення ризику розвитку ішемічного інсульту.

Також методом MDR встановлено, що найбільша частка ентропії щодо статусу «інсульт – контроль» була пов'язана з поліморфним сайтом гена *EDN1* і становила 2,53 %, тоді як *C+70G*-локус гена *EDNRA* обумовлював 0,42 % ентропії.

Водночас аналіз міжлокусних взаємодій виявив слабкий нейтралізуючий ефект між досліджуваними SNP генів ендотелінового шляху (-0,46 %). Результати застосування пермутаційних тестів не виявили статистичної значущості для зазначеної двокомпонентної моделі ($P = 0,320$).

Зважаючи на те, що ІАТІ є мультифакторіальною патологією, наступним етапом даної роботи став аналіз поєданого впливу генетичної варіабельності та інших незалежних факторів ризику атеросклерозу на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту. У таблиці 5 наведені результати застосування мультиваріабельної логістичної регресії для аналізу впливу *Lys198Asn*- і *C+70G*-поліморфних варіантів на розвиток ішемічного інсульту в умовах поправки на інші коваріати, що характеризують дані про стать, вік, ІМТ пацієнтів, наявність або відсутність у них АГ та звички курити. Для поліморфного сайту гена *EDN1* найбільш прогностично значущою виявилась адитивна модель успадкування. У рамках цієї моделі встановлено, що ризик настання ІАТІ у власників *Asn/Asn*-генотипу у 8,1 рази ($P_{\text{попр}} = 0,001$; $OR_{\text{попр}} = 8,059$) вищий, ніж у гомозигот *Lys/Lys*.

Щодо *C+70G*-поліморфного локусу гена *EDNRA*, то статистично значущого зв'язку його генотипів із розвитком ішемічного інсульту після поправки на інші фактори ризику атеросклерозу виявлено не було в рамках жодної моделі успадкування ($P > 0,05$).

Слід зауважити, що достовірний зв'язок *Lys198Asn*-сайту гена *EDN1* із підвищеним ризиком настання ІАТІ в рамках домінантної, рецесивної та адитивної моделей успадкування був виявлений як до, так і після поправки на інші фактори ризику атеросклерозу, що вказує на те, що цей локус може бути самостійним незалежним фактором ризику ішемічного інсульту та його генетичним маркером.

Таблиця 5 – Аналіз впливу поліморфних варіантів Lys198Asn та C+70G генів EDN1 і EDNRA на розвиток ІАТІ з урахуванням інших факторів ризику атеросклерозу в рамках чотирьох моделей успадкування

Ген	SNP	Модель	P _{попр}	OR _{попр} (95 % CI)
EDN1	Lys198Asn	Домінантна	0,009	2,194 (1,214–3,964)
		Рецесивна	0,002	6,779 (1,976–23,256)
		Наддомінантна	0,433	1,276 (0,694–2,347)
		Адитивна ^a	0,131	1,628 (0,865–3,065)
			0,001	8,059 (2,295–28,302)
EDNRA	C+70G	Домінантна	0,273	1,431 (0,754–2,717)
		Рецесивна	0,702	1,148 (0,567–2,738)
		Наддомінантна	0,506	1,213 (0,687–2,141)
		Адитивна	0,304	1,424 (0,726–2,792)
			0,383	1,450 (0,629–3,343)

Примітка: SNP – однонуклеотидний поліморфізм; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал; P_{попр} – значення P після поправки на вік, стать, звичку палити, ІМТ та АГ; OR_{попр} – відношення шансів після поправки на коваріати.

^a Верхній рядок в адитивній моделі містить результати порівняння між Aa- та AA-генотипами, нижній рядок – між aa- та AA-генотипами

Після цього був реалізований аналіз поєданого впливу як поліморфних сайтів генів EDN1 та EDNRA, так і інших факторів ризику атеросклерозу на розвиток інфаркту головного мозку за допомогою методу MDR.

Серед усіх можливих моделей найбільшу прогностичну здатність на тестованій вибірці мала двокомпонентна, що включала поліморфний локус Lys198Asn гена EDN1 та артеріальну гіпертензію (Testing Balanced Accuracy – 62 %, Crossvalidation Consistency – 10/10, чутливість – 56 %, специфічність – 77 %). Комбінація носійства мінорного алеля за Lys198Asn-сайтом гена EDN1 та артеріальної гіпертензії є предиктором підвищеного ризику настання ІАТІ. Результати пермутаційних тестів продемонстрували, що зазначена модель досягає рівня статистичної значущості (P = 0,043).

Картина міжфакторної взаємодії характеризувалася слабкою синергією статі із Lys198Asn-сайтом (0,38 %), із C+70G-локусом (0,28 %) та із АГ (0,37 %). При цьому між двома досліджуваними поліморфізмами (–0,46 %) та окремо між кожним із них і АГ відзначався нейтралізуючий ефект (–0,56 % – для сайту Lys198Asn; –0,30 % – для локусу C+70G).

Для того щоб пояснити одержаний у нашому дослідженні зв'язок поліморфізмів генів ендотелінового шляху із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту необхідно насамперед з'ясувати сутність цих нуклеотидних замін та їх можливий вплив на функціонування тих білків, до

структури генів яких вони належать.

Lys198Asn (rs5370) поліморфізм гена *EDN1* являє собою заміну пурину гуаніну (G) на піримідин тимін (T) у 5665-му положенні гена, що відображається на 61-му нуклеотиді 5-го екзона і призводить до амінокислотної заміни лізину на аспарагін у 198-му кодоні білка (Wróbel-Dudzinska D. et al., 2015). Відомо, що наявність мінорного алеля за даним поліморфним сайтом асоційована з більш високим рівнем ендотеліну-1 у плазмі крові (Aggarwal P. K. et al., 2009; Okan G. et al., 2015; Palahniuk H. O., 2016;), а генотип Lys/Lys асоційований з його найменшим рівнем (Пахомя Н. С. і співавт., 2014). Експериментально встановлено, що однакова концентрація ендотеліну-1 потенціувала фенілефрин-індуковану вазоконстрикцію сильніше у носіїв мінорного алеля (Mansur A. et al., 2015).

Суть алельного поліморфізму C+70G (rs5335) полягає в трансверсії піримідину цитозину (C) на пурин гуанін (G) в 211-му положенні восьмого екзона, що відповідає 3'-нетрансльованій ділянці гена *EDNRA* (Buck D. et al., 2010; Wróbel-Dudzinska D. et al., 2015). Точкова заміна нуклеотидів може змінювати хімічну структуру ДНК, але її значення залишається невивченим. Існує припущення, що ефект даного поліморфного варіанта є кількісним, а не якісним: впливає на рівень експресії гена *EDNRA* у відповідь на ті чи інші регуляторні впливи і не призводить до заміни амінокислоти у структурі білка (Darrah R. et al., 2010; Wróbel-Dudzinska D. et al., 2015). 3'-нетрансльована ділянка бере участь у посттрансляційних регуляторних механізмах. Генетична мінливість в даній ділянці може мати значний вплив на стабільність мРНК і таким чином на загальну кількість функціонуючих рецепторів (Darrah R. et al., 2010; Okan G. et al., 2015).

Вищенаведене дозволяє припустити, що збільшення експресії ендотеліну-1 у носіїв мінорного алеля за Lys198Asn-поліморфним сайтом може бути ключовим механізмом у процесах вазорегуляції, призводити до порушення метаболізму судинної стінки і ендотеліальної дисфункції.

Таким чином, алельний поліморфізм генів, що відіграють неабияку роль у виникненні і прогресуванні ендотеліальної дисфункції, є важливим чинником спадкової схильності до багатьох судинних захворювань, зокрема ішемічного атеротромботичного інсульту. Поглиблення знань про генетичну складову у розвитку ІАТІ дасть можливість заздалегідь попередити його виникнення шляхом прогнозування та покращити методи лікувальної тактики завдяки використанню індивідуального підходу.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення отриманих результатів дослідження, а також вирішення актуального наукового завдання, що полягає у з'ясуванні асоціації поліморфних сайтів Lys198Asn гена *EDN1* і C+70G гена *EDNRA* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб з різними факторами його ризику.

1. Визначені частоти мінорних алелів за поліморфними варіантами генів *EDN1* і *EDNRA* в осіб без ішемічного інсульту знаходяться у відповідності до більшості європейських популяцій і становлять 0,2 для Lys198Asn-поліморфізму і 0,46 для C+70G-поліморфного сайту. Існує достовірна різниця у розподілі алельних варіантів між групою хворих з ІАТІ та особами групи контролю за поліморфізмом Lys198Asn гена *EDN1* ($P = 0,008$), проте дані співвідношення варіантів генотипів у групах порівняння за C+70G-поліморфізмом гена *EDNRA* істотно не відрізняються ($P = 0,426$).

2. Однонуклеотидний поліморфізм гена *EDN1* є самостійним незалежним фактором ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту – у гомозигот за мінорним алелем ймовірність настання ІАТІ значущо вища, ніж у гомозигот за основним алелем ($OR_{\text{попр}} = 8,059$; $P_{\text{попр}} = 0,001$).

3. Вплив поліморфного сайту гена *EDN1* на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту має статеві особливості. Ризик розвитку інсульту вищий у жінок, що є носіями мінорного Asn-алеля, ніж у носіїв основного Lys-алеля ($OR = 2,800$; $P = 0,009$), та у чоловіків – гомозигот за мінорним алелем, порівняно з гомозиготами за основним алелем ($OR = 3,534$; $P = 0,034$).

4. Установлено, що ризик розвитку ІАТІ більший у гомозигот за мінорним алелем (Asn/Asn) з $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$, ніж у гомозигот за основним алелем ($OR = 4,583$; $P = 0,020$); у гетерозигот C/G з $IMT < 25 \text{ кг/м}^2$, ніж у носіїв C/C-генотипу ($OR = 3,684$; $P = 0,049$); у пацієнтів з артеріальною гіпертензією – носіїв гетерозиготного Lys/Asn-генотипу ($OR = 1,951$; $P = 0,034$) і у гомозигот за мінорним алелем (Asn/Asn) ($OR = 4,107$; $P = 0,033$) порівняно з гомозиготами за основним алелем; у носіїв Asn/Asn-генотипу, які не курять, порівняно з носіями Lys/Lys-генотипу ($OR = 3,379$; $P = 0,041$).

5. Установлено залежність характеристик ІАТІ від Lys198Asn- і C+70G-поліморфних варіантів генів *EDN1* та *EDNRA*. Для носіїв Asn/Asn-генотипу з $IMT < 25 \text{ кг/м}^2$ характерно частіше одночасне ураження передньої, середньої, задньої мозкових артерій та артерій вертебробазиллярного басейну ($P = 0,002$). Виявлено асоціацію G/G-генотипу з переважним ушкодженням вертебральних та базиллярних артерій в осіб із нормальним артеріальним тиском ($P = 0,050$). Клінічний перебіг ІАТІ середньої тяжкості спостерігається частіше у гомозигот за мінорним алелем G/G з $IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$ ($P = 0,020$). В осіб з артеріальною гіпертензією та у осіб, що не курять, і є носіями Asn/Asn-генотипу ІАТІ частіше має тяжкий перебіг ($P = 0,024$ і $P = 0,023$ відповідно).

6. Аналіз поєднаного впливу поліморфних сайтів генів ендотелінового шляху та інших відомих факторів ризику атеросклерозу на розвиток ІАТІ дав можливість створити класифікаційну модель, що включає поліморфний сайт

Lys198Asn гена *EDN1* та артеріальну гіпертензію (прогностична значущість 62 % за методом MDR, $P = 0,043$). Поєднання в однієї особи АГ та носійства мінорного Asn-алеля є значущим предиктором підвищеного ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Роль однонуклеотидного поліморфізму С+70G гена рецептора ендотеліну-А в розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту / Т. Б. Олешко и др. // *Wiadomości Lekarskie*. 2017. Том LXX. № 4. С. 725–730 (*Здобувач провела молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготувала статтю до друку*).
2. Олешко Т. Б., Свириденко Д. Ю., Гарбузова В. Ю. Аналіз зв'язку Lys198Asn поліморфних варіантів гена ендотеліну-1 (EDN-1) з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб різної статі // *Клінічна та експериментальна патологія*. 2016. Том 15. № 1 (55). С. 99–103. (*Здобувач провела молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготувала статтю до друку*).
3. Статеві особливості С+70G поліморфних варіантів гена EDNRA з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту / Т. Б. Олешко, Т. М. Олешко, В. С. Юрченко, О. А. Обухова, В. Ю. Гарбузова // *Клінічна та експериментальна патологія*. 2017. Том XVI. № 1 (59). С. 105–109. (*Здобувач провела молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготувала статтю до друку*).
4. Олешко Т. Б., Свириденко Д. Ю., Гарбузова В. Ю. Особливості асоціації Lys198Asn поліморфізму гена EDN-1 з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту залежно від індексу маси тіла // *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2016. Т. 16. № 2 (54). С. 152–156. (*Здобувач провела молекулярно-генетичні дослідження та статистичний аналіз результатів*).
5. Дослідження асоціації С+70G поліморфізму гена EDNRA з індексом маси тіла у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом / Т. Б. Олешко, В. С. Юрченко, Т. М. Олешко, В. Ю. Гарбузова // *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. 2017. № 5 (1). С. 737–743. (*Здобувач провела молекулярно-генетичні дослідження та підготувала статтю до друку*).
6. Олешко Т. Б., Гарбузова В. Ю., Атаман О. В. Зв'язок Lys198Asn поліморфізму гена ендотеліну-1 з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб із нормальним та підвищеним артеріальним тиском // *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. 2015. Т. 3. № 4. С. 464–469. (*Здобувач провела молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготувала статтю до друку*).
7. Олешко Т. Б., Свириденко Д. Ю., Гарбузова В. Ю. Асоціація С+70G алельних варіантів гена EDNRA з ішемічним атеротромботичним інсультом у

осіб з артеріальною гіпертензією та нормальним артеріальним тиском // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. 2017. Том 17. Випуск 3 (59). С. 149–152. (Здобувач провела молекулярно-генетичні дослідження, статистичний аналіз результатів та підготувала статтю до друку).

8. Олешко Т. Б., Свириденко Д. Ю., Гарбузова В. Ю. Розподіл алельних варіантів за Lys198Asn поліморфізмом гена ендотеліну-1 у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом у курців та осіб, які не палять // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. 2016. Vol. 4 (2). С. 335–340 (Здобувач провела молекулярно-генетичні дослідження та підготувала статтю до друку).

9. Олешко Т. Б., Гарбузова В. Ю., Дубовик Є. І., Атаман О. В. Спосіб прогнозування розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту // Патент на корисну модель №118841, Україна, МПК G01N 33/50 заявл. 27.03.2017; опубл. 28.08.17, бюл. № 16.

10. Oleshko T. Frequency of allelic variants Lys198Asn polymorphism of endothelin -1 (EDN-1) gene in the Ukrainian population. // 8th International Student Medical Congress in Kosice. Faculty of Medicine, Pavol Josef Safaric University, Kosice, 22-24 June 2016. P. 156.

11. Association Lys198Asn polymorphism of EDN1 gene with some risk factors of ischemic atherothrombotic stroke / T. Oleshko et al. // 27th European Students' Conference. Germany, Berlin, 28th September - 1st of October 2016. P. 259.

12. Analysis of association Lys198Asn polymorphism of EDN1 gene with risk factors of ischemic atherothrombotic stroke in the ukrainian population / T.V. Oleshko et al. // IV Eurasian congress of cardiologists. Yerevan, Armenia, 10-11 October 2016. P. 46.

13. Oleshko T., Obukhova O., Harbuzova V. Association of Lys198Asn polymorphism of endothelin-1 gene with ischemic atherothrombotic stroke. // Scientific-practical conference devoted to the 100th anniversary of V.Y. Axundov. Republic of Azerbaijan, Baku, 26 June 2016. P. 174.

14. Олешко Т. Б., Юрченко В. С., Гарбузова В. Ю. Ассоциация C+70G полиморфизма гена EDNRA с ожирением у больных с ишемическим атеротромботическим инсультом // Республиканская научно-практическая конференция «Метаболический синдром и другие категории дисметаболизма в различных областях медицины» Ташкент, Узбекистан (13 апреля 2017). С. 111–112.

15. Олешко Т. Б., Гарбузова В. Ю. Асоціація Lys198Asn поліморфних варіантів гена ендотеліну-1 (EDN-1) з ішемічним атеротромботичним інсультом в осіб різної статі // Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні наукові дослідження та розробки: теоретична цінність та практичні результати». Братислава, 15-18 березня 2016 року. С. 97–98.

16. Олешко Т. Б., Свириденко Д. Ю., Гарбузова В. Ю. Асоціація Lys198Asn поліморфних варіантів гена ендотеліну-1 (EDN-1) з деякими факторами ризику ішемічного атеротромботичного інсульту //

VII Національний конгрес патологіологів України з міжнародною участю «Патологіологія і фармація: шляхи інтеграції». НФаУ, Харків, 5-7 жовтня 2016 року. С. 174.

17. Олешко Т. Б., Свириденко Д. Ю., Олешко Т. М., Юрченко В. С. Вивчення асоціації C+70G поліморфізму гена EDNRA з артеріальною гіпертензією у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом // Науково-практична конференція з міжнародною участю «XVI читання ім. В. В. Підвисоцького». Одеса, Україна (18-19 травня 2017 р.). С. 255.

18. Олешко Т. Б. Вивчення асоціації Lys198Asn поліморфізму гена EDN-1 з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ) залежно від індексу маси тіла // XX міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених. Тернопіль, 25 - 27 квітня 2016 року. С. 274.

19. Олешко Т. Б., Свириденко Д. Ю., Юрченко В. С., Гарбузова В. Ю. Вивчення зв'язку Lys198Asn поліморфізму гена ендотеліну-1 з артеріальною гіпертензією у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом. // IV Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини», том 1. Сумський державний університет, Суми, 21–22 квітня 2016 року. С. 163–164.

20. Олешко Т. Б., Юрченко В. С., Свириденко Д. Ю. Розподіл алельних варіантів гена EDNRA за C+70G поліморфізмом у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом залежно від величини індексу маси тіла // V Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини». Сумський державний університет, Суми, 20–21 квітня 2017 року. С. 446–447.

АНОТАЦІЯ

Олешко Т. Б. Зв'язок поліморфізму генів ендотеліну та ендотелінового рецептора з механізмами основних проявів ішемічного інсульту. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Сумський державний університет МОН України, Суми, 2018.

Дисертація присвячена вивченню впливу Lys198Asn- і C+70G-поліморфних варіантів генів *EDN1* та *EDNRA* на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту (ІАТІ). Однонуклеотидний поліморфізм гена *EDN1* є самостійним незалежним фактором ризику ІАТІ. У осіб, що є гомозиготами за мінорним алелем, ризик розвитку ІАТІ більший у 4 рази, ніж у гомозигот за основним алелем ($P = 0,007$; $OR = 4,046$). Зазначений ризик зростає в осіб чоловічої статі, пацієнтів із надмірною масою тіла, артеріальною гіпертензією та без звички курити. Урахування поправки на інші коваріанти, що характеризують дані про стать, вік, ІМТ пацієнтів, наявність або відсутність у них АГ та звички курити дозволило виявити збільшення ймовірності настання ІАТІ у носіїв Asn/Asn-генотипу у 8,1 рази ($P_{\text{попр}} = 0,001$; $OR_{\text{попр}} = 8,059$), порівняно з гомозиготами за основним алелем.

Щодо поліморфного локусу C+70G гена *EDNRA*, то статистично значущого зв'язку його генотипів із розвитком ішемічного інсульту не виявлено.

Аналіз поєднаного впливу засвідчив, що співпадіння гомозиготи за мінорним алелем за Lys198Asn-поліморфізмом та одного із трьох можливих генотипів за C+70G-сайтом асоціюється із високим ризиком розвитку ІАТІ. При цьому збіг гетерозигот за двома сайтами також призводить до значного збільшення ризику розвитку ішемічного інсульту. Також виявлено, що поєднання в однієї особи артеріальної гіпертензії з носійством Asn-алеля за поліморфізмом гена *EDN1* пов'язане з високим ризиком настання ІАТІ.

Ключові слова: ішемічний інсульт, поліморфізм гена, ендотелін-1, рецептор ендотеліну типу А, EDN1, EDNRA.

АННОТАЦИЯ

Олешко Т.Б. Связь полиморфизма генов эндотелина и рецептора эндотелина с механизмами основных проявлений ишемического инсульта. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Сумской государственной университет МОН Украины, Сумы, 2018.

Диссертация посвящена изучению влияния Lys198Asn- и C+70G-полиморфных вариантов генов *EDN1* и *EDNRA* на развитие ишемического атеротромботического инсульта (ИАТИ). Однонуклеотидный полиморфизм гена *EDN1* является самостоятельным независимым фактором риска ИАТИ. У лиц, являющихся гомозиготами по мінорному аллелю, риск развития ИАТИ больше в 4 раза, чем у гомозигот по основному аллелю ($P = 0,007$; $OR = 4,046$). Указанный риск возрастает у лиц мужского пола, пациентов с избыточной массой тела, артериальной гипертензией и без привычки курить. Учет поправки на другие коварианты, характеризующие данные о поле, возрасте, ИМТ пациентов, наличие или отсутствие в них АГ и привычки курить, позволил выявить увеличение вероятности развития ИАТИ у носителей Asn/Asn-генотипа у 8,1 раза ($P_{\text{попр}} = 0,001$; $OR_{\text{попр}} = 8,059$) по сравнению с гомозиготами по основному аллелю.

Относительно полиморфного локуса C+70G гена *EDNRA*, то статистически значимой связи его генотипов с развитием ишемического инсульта не обнаружено.

Анализ сочетанного воздействия показал, что совпадение гомозигот по мінорному аллелю Lys198Asn-поліморфізма и одного из трех возможных генотипов по C+70G-сайту ассоциируется с высоким риском развития ИАТИ. При этом совпадение гетерозигот по двум сайтам также приводит к значительному увеличению риска развития ишемического инсульта. Также выявлено, что сочетание у одного человека артериальной гипертензии с носительством Asn-аллеля по полиморфизму гена *EDN1* связано с высоким риском развития ИАТИ.

Ключевые слова: ишемический инсульт, полиморфизм гена, эндотелин-1, рецептор эндотелина типа А, EDN1, EDNRA.

SUMMARY

Oleshko T. B. Relationship between polymorphism of endothelin and endothelin receptor genes with the mechanisms of the main manifestations of ischemic stroke. – Manuscript copyright.

Thesis for the PhD degree in Medicine, speciality 14.03.04 – pathological physiology. – Sumy State University, Sumy, 2018.

Thesis is dedicated to the study of the effect of Lys198Asn- and C+70G-polymorphic variants of *EDNI* and *EDNRA* genes impact on the development of ischemic atherothrombotic stroke (IAS).

The study group included 170 unrelated Ukrainian patients with a mean age of 64.7 ± 0.73 years who had IAS. The control group consisted of 124 individuals with the absence of cardio-vascular pathologies. Genotyping of *EDNI* (Lys198Asn (rs5370)) and *EDNRA* (C+70G (rs5335)) gene polymorphisms was performed using PCR-RFLP (polymerase chain reaction with following restriction fragment length polymorphism analysis) method. Most statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Science software (SPSS, version 17.0, Chicago, IL, USA). Multifactorial dimensionality reduction was used for modelling the interactions between loci. All statistical tests were two-sided, $P < 0.05$ was considered significant.

The single nucleotide polymorphism of the *EDNI* gene is an independent risk factor for the development of ischemic atherothrombotic stroke – in the homozygote for the minor allele, the probability of the onset of IAS is significantly higher than that of the homozygote for the main allele ($OR_{\text{correc}} = 8.059$; $P_{\text{correc}} = 0.001$).

The influence of the polymorphic site of the *EDNI* gene on the development of ischemic atherothrombotic stroke has sexual characteristics. The risk of stroke is higher in women who are carriers of the minor Asn-allele than in the carriers of the main Lys-allele ($OR = 2.800$; $P = 0.009$), and in males – the homozygote in the minor allele compared to homozygotes in the main allele ($OR = 3.534$; $P = 0.034$).

It was found that the risk of IAS development is greater in the homozygote for the minor allele (Asn/Asn) with $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ than in the homozygote for the main allele ($OR = 4.583$; $P = 0.020$); in heterozygote C/G with $BMI < 25 \text{ kg/m}^2$ than in C/C-genotype carriers ($OR = 3.684$; $P = 0.049$); in patients with arterial hypertension – carriers of the heterozygous Lys/Asn-genotype ($OR = 1.951$; $P = 0.034$) and homozygote in the minor allele (Asn/Asn) ($OR = 4.107$; $P = 0.033$) compared to homozygotes in the main allele; in the Asn/Asn carriers that do not smoke compared to Lys/Lys-genotype carriers ($OR = 3.379$; $P = 0.041$).

Dependence of IAS characteristics from Lys198Asn- and C+70G-polymorphic variants of *EDNI* and *EDNRA* genes was established. For carriers of the Asn/Asn-genotype with $BMI < 25 \text{ kg/m}^2$, simultaneous damage to the anterior, middle, posterior brain arteries and arteries of the vertebro-basilar basin is more frequent characteristic ($P = 0.002$). The association of the G/G-genotype with the predominant damage of vertebral and basilar arteries in persons with normal arterial pressure ($P = 0.050$) was revealed. The clinical course of moderate severity IAS is more frequent in the homozygote for the minor G/G-allele with $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$

($P = 0.020$). In persons with arterial hypertension and non-smokers who are carriers of the Asn/Asn-genotype, IAS is more likely to be severe ($P = 0.024$ and $P = 0.023$ respectively).

Analysis of the combined effect of polymorphic sites of endothelin route genes and other known risk factors for atherosclerosis on the IAS development allowed to create a classification model including the polymorphic site of Lys198Asn of the *EDN1* gene and arterial hypertension (prognostic significance 62% by MDR method, $P = 0.043$). The combination of hypertension and carriage of minor Asn-allele in one person is a significant predictor of an increased risk of ischemic atherothrombotic stroke.

Key words: ischemic stroke, gene polymorphism, endothelin-1, endothelin type A receptor, EDN1, EDNRA.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія.

ЕД – ендотеліальна дисфункція.

ЕКГ – електрокардіограма.

ІАТІ – ішемічний атеротромботичний інсульт.

ІМТ – індекс маси тіла.

КТ – комп'ютерна томографія.

СІ – довірчий інтервал.

EDN1 – ендотелін-1.

EDNRA – рецептор до ендотеліну типу А.

MDR – зменшення багатofакторної розмірності.

NO – оксид азоту.

OR – відношення шансів.

PCR – полімеразна ланцюгова реакція.

Підписано до друку 18 грудня 2017 р.
Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0,9. Тираж 100 пр. Зам. №

Видавець і виготовлювач
Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007
Свідоцтво суб`єкта видавничої справи ДК № 3062 від 17.12.2007.