

Abstract

T. B. Oleshko,
S. R. Mishchenko,
V. S. Yurchenko,
O. A. Obukhova,
V. Yu. Harbuzova,
*Sumy State University, Medical
Institute, 2 Rymkogo-Korsakova
str., Sumy, Ukraine*

STUDY OF ASSOCIATION OF C+70G POLIMORPHIC SITE OF EDNRA GENE WITH DEVELOPMENT OF ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE IN SMOKERS AND NON-SMOKERS

Ischemic stroke is one of the key problems of healthcare. It is known that endothelial dysfunction (ED) plays a key role in pathogenesis of ischemic atherothrombotic stroke (IAS). Endothelin-1, a potential endogenous vasoconstrictor, is mostly responsible for development of ED. It is generally assumed that smoking is the most significant external factor that causes ED. Endothelin-1 realizes its effects through intercommunication with specific type A receptor. Therefore, endothelin type A receptor refers to key factors that influence the development of many cardiovascular diseases and ischemic stroke in particular.

Purpose. To study association of C+70G polymorphic site of *EDNRA* gene with development of ischemic atherothrombotic stroke in smokers and non-smokers.

Materials and Methods. For analysis, we used venous blood of 170 patients with IAS (42.4 % were women and 57.6 % were men) aged 40 to 85 years (average age – 64.7 ± 0.73 years) who were on the records in the outpatient department of Sumy Clinical Hospital № 5. The control group consisted of 124 patients (36.3 % were women and 63.7 % were men), average age was 76.7 ± 0.93 years. The groups were matched in sex ($P = 0.294$ 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. It was demonstrated that among non-smokers, equilibration of homozygotes by basic allele (C/C), heterozygote (C/G) and homozygotes by minor allele (G/G) in control group comprised 30.1 %, 48.4 %, 21.5 %, and among IAS patients – 26.7 %, 55.0 %, 18.3 % correspondingly ($P = 0.629$, $\chi^2 = 0.927$). In the group of smokers genotype distribution according to studied polymorphism also didn't significantly differ (25.8 %, 54.8 %, 19.4 % in the control in comparison with 18.0 %, 64.0 %, 18.0 % for IAS patients; $P = 0.657$, $\chi^2 = 0.840$).

Conclusion. C+70G-polymorphic loci of *EDNRA* gene was not associated with development of IAS neither among smokers nor in the group of non-smokers.

Keywords: endothelin type A receptor, gene polymorphism, ischemic stroke, smoking.

Corresponding author: t.oleshko@med.sumdu.edu.ua

Резюме

Т. Б. Олешко,
С. Р. Міщенко,
В. С. Юрченко,

О. А. Обухова,
В. Ю. Гарбузова,

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

ВИВЧЕННЯ АСОЦІАЦІЇ C+70G ПОЛІМОРФНОГО САЙТА ГЕНА EDNRA З РОЗВИТКОМ ІШЕМІЧНОГО АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІНСУЛЬТУ У КУРЦІВ І ОСІБ, ЩО НЕ КУРЯТЬ

Наведено результати визначення C+70G (rs5335) поліморфізму гена рецептора ендотеліну типу А (EDNRA) у 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ) і 124 осіб контрольної групи. Показано, що серед осіб, які не курять співвідношення гомозигот за основним алелем (С/С), гетерозигот (С/Г) і гомозигот за мінорним алелем (Г/Г) у контрольній групі становило 30,1 %, 48,4 %, 21,5 %, а серед хворих з ІАТІ - 26,7 %, 55,0 %, 18,3 % відповідно ($P = 0,629$, $\chi^2 = 0,927$). У групі курців розподіл генотипів за вивченим поліморфізмом також достовірно не відрізнявся (25,8 %, 54,8 %, 19,4 % у контролі проти 18,0 %, 64,0 %, 18,0 % для хворих з ІАТІ; $P = 0,657$, $\chi^2 = 0,840$).

Ключові слова: рецептор ендотеліну типу А, поліморфізм генів, ішемічний інсульт, куріння.

Резюме

Т. Б. Олешко,
С. Р. Міщенко,
В. С. Юрченко,

О. А. Обухова,
В. Ю. Гарбузова,

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

ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИИАЦИИ C+70G ПОЛИМОРФНОГО САЙТА ГЕНА EDNRA С РАЗВИТИЕМ ИШЕМИЧЕСКОГО АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У КУРИЛЬЩИКОВ И ЛИЦ, КОТОРЫЕ НЕ КУРЯТ

Приведены результаты определения C+70G (rs5335) полиморфизма гена рецептора эндотелина типа А (EDNRA) у 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (ИАТИ) и 124 лиц контрольной группы. Показано, что среди лиц, которые не курят соотношение гомозигот по основному аллелю (С/С), гетерозигот (С/Г) и гомозигот по мінорному аллелю (Г/Г) в контрольной группе составило 30,1 %, 48,4 %, 21,5 %, а среди больных с ИАТИ – 26,7 %, 55,0 %, 18,3 % соответственно ($P = 0,629$, $\chi^2 = 0,927$). В группе курильщиков распределение генотипов по изученному полиморфизму также достоверно не отличалось (25,8 %, 54,8 %, 19,4 % в контроле против 18,0 %, 64,0 %, 18,0 % для больных с ИАТИ; $P = 0,657$, $\chi^2 = 0,840$).

Ключевые слова: рецептор эндотелина типа А, полиморфизм генов, ишемический инсульт, курение.

Автор, відповідальний за листування: t.oleshko@med.sumdu.edu.ua

Вступ

З огляду на лідируючі позиції у захворюваності і смертності населення усього світу, ішемічний інсульт є однією з найважливіших проблем охорони здоров'я. Достовірно відомо, що провідну роль у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту відіграє ендотеліальна дисфункція (ЕД) [2; 3]. Розвитку ЕД у найбільшій мірі сприяє ендотелін-1 – біологічно активний пептид ендотеліального походження, що є одним із найважливіших регуляторів функціонального стану ендотелію та найпотужнішим ендогенним вазоконстриктором, відомим на

сьогодні [4–9]. Вважається, що найбільш значущим екзогенним фактором, причетним до розвитку ЕД, є куріння, адже сприяє дисбалансу впливів ендотелійзалежних вазоконстрикторів і вазодилаторів, що ймовірно є результатом сукупної дії компонентів тютюну [10; 11].

Ендотелін-1 реалізує свої ефекти за допомогою взаємодії зі специфічним рецептором типу А (EDNRA). На ранній стадії інсульту підвищується рівень ендотеліну, активуються EDNRA гладком'язових клітин судин мозку, внаслідок чого виникає спазм судин [12]. Таким чином, ендотеліновий рецептор типу А відносять до



ключових факторів, що впливають на розвиток багатьох серцево-судинних захворювань та ішемічного інсульту зокрема [7; 12; 13]. Функціонування EDNRA, безумовно, визначається структурними особливостями його гена. Тому дослідження ролі однонуклеотидних поліморфізмів гена EDNRA у розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту має велике теоретичне й практичне значення.

На сьогодні досліджено більше ніж сім тисяч однонуклеотидних поліморфізмів гена EDNRA в людини. Серед них найбільш вивченим, у контексті зв'язку з серцево-судинними захворюваннями, є C+70G (rs5335) поліморфний сайт гена EDNRA. Суть даного поліморфізму полягає в трансверсії піримідину цитозину (C) на пурин гуанін (G) в 211-му положенні восьмого екзона, що відповідає 3'-нетрансльованій ділянці гена EDNRA [14; 15]. 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 [14; 16]; 3'-нетрансльована ділянка бере участь у посттрансляційних регуляторних механізмах. Генетична мінливість у даній ділянці може мати значний вплив на стабільність мРНК і таким чином – на загальну кількість функціонуючих рецепторів [16; 17].

Мета. Вивчити асоціацію C+70G поліморфного сайту гена EDNRA з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту у курців і осіб, що не курять.

Матеріали і методи. Дослідження проведено із використанням венозної крові 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), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні № 5. Контрольна група складалася зі 124 пацієнтів без ознак серцево-судинної патології (36,3 % жінок і 63,7 % чоловіків), середній вік склав $76,7 \pm 0,93$ роки. Ці групи не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ($P = 0,294$ за χ^2 -критерієм), проте середній вік першої ($76,7 \pm 0,93$ роки) був істотно вищим, ніж другої ($P < 0,001$).

Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [18; 19], на підс-

таві анамнестичних даних і особливостей клінічного перебігу хвороби, даних ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови, ЕКГ. Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, даних комп'ютерної томографії головного мозку. У групі контролю відсутність серцево-судинної патології підтверджували шляхом збирання анамнестичних даних, реєстрації електрокардіограми і 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 участю людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000) та Наказу МОЗ України №690 від 23.09.2009 р. Всі пацієнти підписали інформовану згоду на участь у дослідженнях з наступним забором венозної крові на генетичний аналіз.

Визначення C+70G (rs5335) поліморфізму гена EDNRA проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (PCR) 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]. Статистичне опрацювання одержаних результатів здійснювали з використанням пакета програм SPSS 17.0. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм Пірсона та t-критерієм Стьюдента. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним.

Результати. Враховуючи руйнівний вплив куріння на функціонування ендотелію судин та розвиток ішемічного інсульту кожну з досліджуваних груп було поділено на дві підгрупи залежно від наявності чи відсутності звички куріння. Це дозволило дослідити вплив поліморфних варіантів гена EDNRA на розвиток ІАТІ, встановити частоту окремих варіантів цього гена, здійснити порівняння між групами загалом та з урахуванням наявності чи відсутності у пацієнтів звички куріння.

Частоту трьох можливих поліморфних варіантів генотипу за C+70G поліморфізмом гена EDNRA в осіб контрольної групи і у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом наведено на рисунку 1.



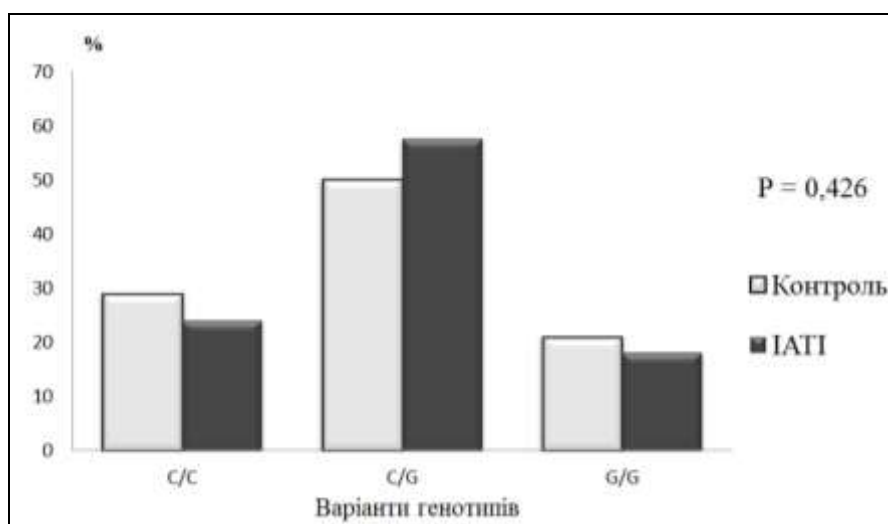


Рисунок 1 – Частота алельних варіантів гена EDNRA за C+70G поліморфізмом у хворих з IAT1 (чорні стовпчики) і в контрольній групі (сірі стовпчики). P – статистична значущість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона

Співвідношення гомозигот за основним алелем C/C, гетерозигот C/G 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. Під час аналізу статистично достовірних відмінностей у розподілі різних варіантів генотипу між хворими з IAT1 і

особами контрольної групи не виявлено (P = 0,426).

Порівняння частоти різних генотипів за C+70G-поліморфним локусом гена EDNRA серед курців та осіб, що не курять, у групі контролю і у групі хворих з IAT1 продемонстровано в таблиці 1.

Таблиця 1 – Асоціація C+70G-алельних варіантів гена EDNRA з ішемічним атеротромботичним інсультом у курців і осіб, що не курять

Генотип	Куріння (-)		Куріння (+)	
	Контроль	IAT1	Контроль	IAT1
C/C	28 (30,1 %)	32 (26,7 %)	8 (25,8 %)	9 (18,0 %)
C/G	45 (48,4 %)	66 (55,0 %)	17 (54,8 %)	32 (64,0 %)
G/G	20 (21,5 %)	22 (18,3 %)	6 (19,4 %)	9 (18,0 %)
Разом	93 (100 %)	120 (100 %)	31 (100 %)	150 (100 %)
χ^2	0,927		0,840	
P	0,629		0,657	

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках: P – статистична значущість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм Пірсона

Встановлено, що частота різних варіантів C+70G-поліморфізму у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом та пацієнтів контрольної групи істотно не відрізнялась як серед курців ($\chi^2 = 0,840$; P = 0,657), так і серед осіб, що не курять ($\chi^2 = 0,927$; P = 0,629).

У таблиці 2 представлено порівняльні дані про співвідношення генотипів за C+70G-поліморфізмом гена EDNRA у курців та осіб, що не курять у контрольній групі і групі хворих з IAT1.

Таблиця 2 – Частота генотипів за С+70G-поліморфізмом гена EDNRA у курців і тих, що не курять серед хворих з ІАТІ і осіб контрольної групи

Генотип	Контроль		ІАТІ	
	Куріння (-)	Куріння (+)	Куріння (-)	Куріння (+)
C/C	28 (30,1 %)	8 (25,8 %)	32 (26,7 %)	9 (18,0 %)
C/G	45 (48,4 %)	17 (54,8 %)	66 (55,0 %)	32 (64,0 %)
G/G	20 (21,5 %)	6 (19,4 %)	22 (18,3 %)	9 (18,0 %)
Разом	93 (100 %)	31 (100 %)	120 (100 %)	50 (100 %)
χ^2	0,393		1,597	
P	0,822		0,450	

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках: P – статистична значущість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм Пірсона

Серед представників контрольної групи розподіл генотипів за С+70G-поліморфізмом у курців та у осіб, що не курять, не був статистично значущим. Показник P, визначений за χ^2 -критерієм Пірсона, дорівнював 0,822. У хворих на ІАТІ було виявлено подібну тенденцію, яка проявлялась у відсутності достовірного зв'язку

між розподілом генотипів у курців та осіб, що не курять ($\chi^2 = 1,597$; P = 0,450).

Вивчення розподілу частот осіб, які не курять, і курців у досліджуваних групах окремо за С+70G-генотипами дозволило отримати наступні результати (табл. 3).

Таблиця 3 – Частота осіб, які не курять, і курців серед хворих з ІАТІ та осіб контрольної групи залежно від варіантів генотипу за С+70G-поліморфізмом гена EDNRA

Генотип	Показник	Контроль	ІАТІ
C/C	Куріння (-)	28 (77,8 %)	32 (78,0 %)
	Куріння (+)	8 (22,2 %)	9 (22,0 %)
	Разом	36 (100 %)	41 (100 %)
$\chi^2 = 0,001$; P = 0,596			
C/G	Куріння (-)	45 (72,6 %)	66 (67,3 %)
	Куріння (+)	17 (27,4 %)	32 (32,7 %)
	Разом	62 (100 %)	98 (100 %)
$\chi^2 = 0,490$; P = 0,302			
G/G	Куріння (-)	20 (76,9 %)	22 (71,0 %)
	Куріння (+)	6 (23,1 %)	9 (29,0 %)
	Разом	26 (100 %)	31 (100 %)
$\chi^2 = 0,259$; P = 0,420			

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках: P – статистична значущість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 -критерієм Пірсона



За результатами проведеного аналізу виявлено, що достовірної різниці між курцями і особами, що не курять, у досліджуваних групах не було виявлено серед носіїв жодних з можливих

Висновки

C+70G-поліморфний локус гена *EDNRA* не

Перспективи подальших досліджень

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні вивчення зв'язку різних одонуклеотидних поліморфізмів гена *EDNRA* з гострими порушеннями мозкового кровообігу. При цьому має враховуватися вплив як генетич-

генотипів (C/C-генотип – $\chi^2 = 0,001$; P = 0,596; C/G-генотип – $\chi^2 = 0,490$; P = 0,302; G/G-генотип – $\chi^2 = 0,259$; P = 0,420).

асоційований з розвитком ІАТІ ні серед курців, ні в групі осіб, що не курять.

них чинників, так і факторів, що збільшують ризик розвитку ішемічних інсультів (артеріальну гіпертензію, порушення ліпопротеїнового складу плазми крові, зміни у системі гемостазу тощо).

References (список літератури)

- Oleshko TB, Obukhova OA, Oleshko TM, Matlai OY, Sotnykov DD, Harbuzova VYu. [Rol odnonukleotydnoho polymorfyzma C+70G hena retseptora endotelyna-A v razvytyu yshemycheskoho aterotrombotycheskoho ynsulta]. *Wiadomości Lekarskie*. 2017; T. LXX. № 4: 725–730.
- Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. [The vascular endothelium and human diseases]. *International Journal of Biological Sciences*. 2013; 9 (10): 1057–1069.
- Blum A, Vaispapir V, Keinan-Boke L, Soboh S, Yehuda H, Tamir S. [Endothelial dysfunction and procoagulant activity in acute ischemic stroke]. *Journal of Vascular and Interventional Neurology*. 2012; 4 (1): 33–39.
- Gluba A, Banach M, Mikhailidis DP, Rysz J. [Genetic determinants of cardiovascular disease: the renin-angiotensin-aldosterone system, paraoxonases, endothelin-1, nitric oxide synthase and adrenergic receptors]. *in vivo*. 2009; 23: 797–812.
- Verweij N, Mahmud H, Leach IM, de Boer RA, Brouwers FP, Yu H, Asselbergs FW, Struck J, Bakker SJL, Gansevoort RT, Munroe PB, Hillege HL, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Sillje HHW, van der Harst P. [Genome-wide association study on plasma levels of midregional-proadrenomedullin and C-terminal-pro-endothelin-1]. *Hypertension*. 2013; 61: 602–608.
- Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. [Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin]. *Physiol. Rev*. 2011; 91: 1–77.
- Mazzuca MQ, Khalil RA. [Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease]. *Biochem. Pharmacol*. 2012; 84 (2): 147–162.
- Böhm F, Pernow J. [The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease]. *Cardiovascular Research*. 2007; 76: 8–18.
- Parida A, Nayak V. [Endothelins: their current status and future prospects]. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 2013; 23 (2): 94–97.
- Eshchenko KN, Zhadan AV, Shustval NF. [Serdechno-sosudystaia systema y kurennye]. *Diabet i sertse*. 2013; 4 (170): 12–17.
- Zubayrova LD, Zubayrov DM. [Kurennye kak faktor ryska serdechno-sosudystykh zaboлевanyi]. *Kazanskyi medytsynskyi zhurnal*. 2006; 87(5): 369–374.
- Koyama Y. [Endothelin systems in the brain: involvement in pathophysiological responses of damaged nerve tissues] *Bio-Molecular Concepts*. 2013; 4 (4): 335–347.
- Masaki T, Sawamura T. [Endothelin end endothelial dysfunction]. *Proc. Jpn. Acad*. 2006; B. 82: 17–24.
- Wróbel-Dudzińska D, Kosior-Jarecka E, Aukasik U, Kocki J, Witczak A, Mosiewicz J, Garnowski T. [Risk factors in normal-tension glaucoma and high-tension glaucoma in relation to polymorphisms of endothelin-1 gene and endothelin-1 receptor type A gene]. *Journal of Ophthalmology*. 2015; 1–12.
- Buck D, Diefenbach K, Penzel T, Malzahn U, Roots I, Fietze I. [Genetic polymor-



- phisms in endothelin-receptor-subtype-a-gene as susceptibility factor for obstructive sleep apnea syndrome]. *Sleep Medicine*. 2010; 11: 213–217.
16. Darrah R, McKone E, O'Connor C, Rodgers C, Genatossio A, McNamara S, Gibson R, Elborn JS, Ennis M, Gallagher CG, Kalsheker N, Aitken M, Wiese D, Dunn J, Smith P, Pace R, Londono D, Goddard KAB, Knowles MR, Drumm ML. [EDNRA variants associate with smooth muscle mRNA levels, cell proliferation rates, and cystic fibrosis pulmonary disease severity]. *Physiol. Genomics*. 2010; 41: 71–77.
17. Okan G, Yildiz Z, Gökdemir G, Yorulmaz E, Vural P, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M. [G-231A and G+70C polymorphisms of endothelin receptor type-A gene could affect the psoriasis area and severity index score and endothelin 1 levels]. *E-Ijd Basic Research*. 2015; 60 (2): 211.
18. 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.
19. Kadojić D, Dikanović M, Bitunjac M, Vuletić V, Čengić L, Bijelić BR. [Epidemiology of stroke]. *Periodicum Biologorum*. 2012; 114 (3): 253–257.

(received 12.12.2017, published online 09.01.2018)

(одержано 12.12.2017, опубліковано 09.01.2018)

