

УДК 616.831-005.1-005.6-06:616.12-008.331.1:575.113

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

Сумський державний університет

Наведено результати визначення С+70G (rs5335) поліморфізму гена рецептора ендотеліну типу А (EDNRA) у 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ) і 124 осіб контрольної групи. Встановлено, що у хворих з ІАТІ співвідношення гомозигот за основним алелем (С/С), гетерозигот (С/Г) і гомозигот за мінорним алелем (Г/Г) становить 24,1 %, 57,6 % і 18,2 %, а у контролі - 29,0 %, 50,0 % і 21,0 % відповідно ($P = 0,426$ за χ^2 -критерієм). При порівнянні частоти ішемічних інсультів у осіб з нормальним та підвищеним артеріальним тиском з різними варіантами генотипу за досліджуваним поліморфізмом встановлено, що у носіїв С/Г генотипу відмінність між досліджуваними групами у хворих з ІАТІ та осіб контрольної групи є статистично значимою ($P = 0,002$). Стосовно гомозигот як за основним, так і за мінорним алелем достовірної різниці не виявлено.

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

Роботу виконано в рамках теми наукових досліджень з держбюджетним фінансуванням «Зв'язок алельного поліморфізму "генів ектопічної кальцифікації" з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень», № держ. реєстрації 0115U000688.

Вступ

Артеріальна гіпертензія (АГ) виявляється у 20-30 % дорослого населення планети та вважається одним з основних модифікованих факторів ризику серцево-судинних захворювань, які є основною проблемою охорони здоров'я двадцять першого століття [5,15]. На сьогодні з'ясовано, що тривале підвищення діастолічного артеріального тиску на 5 мм. рт. ст. пов'язано зі збільшенням ймовірності виникнення коронарних подій на 21 %, а мозкового інсульту на 34 % [12]. Серед судинних порушень головного мозку, до розвитку яких може бути причетна АГ, важливу нішу займає ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ). Патологічним підґрунтям ІАТІ є дисфункція ендотелію, що характеризується зсувом у баланс вазорегуляції у бік констрикції, активації прозапальних та протромботичних властивостей судинної стінки [3].

У розвитку ендотеліальної дисфункції доведено роль гіпертонічного ушкодження судин. Важливим регулятором метаболізму судинної стінки є ендотелін-1 [1]. Взаємодіючи з специфічними ендотеліновими рецепторами типу А (EDNRA) ендотелін-1 реалізує свій потужний судинозвужувальний ефект, також сприяє проліферації клітин, адгезії, фіброзу, стимуляції утворення вільних радикалів і тромбозу, що свідчить не лише про вплив на кров'яний тиск, а і про ключову роль у прогресуванні ендотеліальних порушень [6,8,11,13,14]. Цікавим є той факт, що в артеріях пацієнтів з артеріальною гіпертензією значно збільшується експресія ендотелінових рецепторів типу А [5], що підвищує інтерес до їх вивчення. Оскільки функціональні ефекти білка залежать від структурних особливостей гена, що його кодує, то актуальності набирає дослідження однонуклеотидних поліморфізмів гена EDNRA. Зважаючи на те, що ген рецептора ендотеліну типу А є геном-кандидатом у виникненні і подальшому розвитку судинних порушень,

цікаво дослідити асоціацію його найбільш вивчених поліморфізмів з цереброваскулярними захворюваннями у осіб з різними факторами ризику, зокрема з артеріальною гіпертензією.

Мета дослідження

Вивчити зв'язок С+70G поліморфізму гена EDNRA з ІАТІ в осіб з нормальним та підвищеним артеріальним тиском.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження були 170 пацієнтів з ішемічним атеротромботичним інсультом (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 осіб (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 ($P < 0,001$).

Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, даних комп'ютерної томографії головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [4,9,10], на підставі анамнестичних даних і особливостей клінічного перебігу хвороби, даних ультразвукової доплерографії магістральних артерій голови та ЕКГ. 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 етнічні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964, з подаль-

шими 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 заборою венозної крові на генетичний аналіз.

Основним методом дослідження для визначення C+70G (rs5335) поліморфізму гена *EDNRA* була полімеразна ланцюгова реакція (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх шляхом електрофору в агарозному гелі.

Деталі методики генотипування описано в одній з попередніх наших публікацій [2]. Одержані результати опрацьовували статистично із використанням пакета програм SPSS 17.0. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 –критерієм Пірсона та t-критерієм Стюдента. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним.

Результати дослідження та їх обговорення

На сьогодні відомо, що артеріальна гіпертензія є одним з важливих факторів ризику ішеміч-

ного атеротромботичного інсульту. Тому кожна з груп – дослідна і контрольна – була поділена на дві підгрупи залежно від наявності чи відсутності підвищеного артеріального тиску. Завдяки цьому ми мали можливість 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 артеріальної гіпертензії.

У групі хворих з ІАТІ співвідношення гомозигот за основним алелем (C/C), гетерозигот (C/G) і гомозигот за мінорним алелем (G/G) становило 24,1 %, 57,6 % і 18,2 %, а в контрольній – відповідно 29,0 %, 50,0 % і 21,0 % (рис. 1). При цьому статистично достовірних відмінностей у розподілі різних варіантів генотипу між хворими з ІАТІ і особами контрольної групи не виявлено ($\chi^2 = 1,708$; $P = 0,426$).

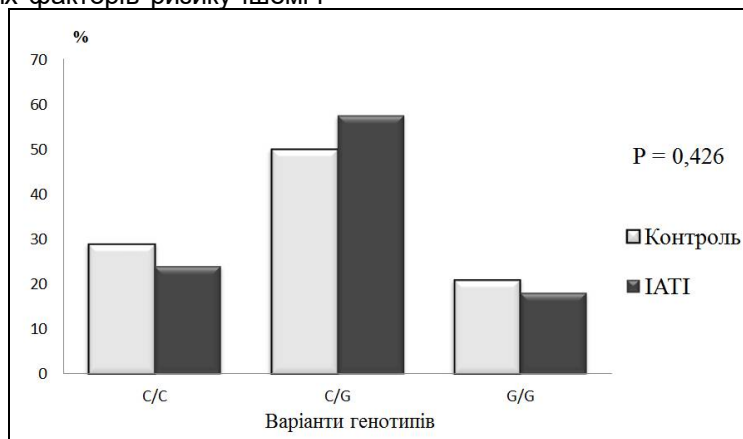


Рис. 1. Частота алельних варіантів гена *EDNRA* за C+70G поліморфізмом у хворих з ІАТІ (чорні стовпчики) і в контрольній групі (сірі стовпчики). P – статистична значущість відмінності показників за χ^2 -критерієм Пірсона.

Дані про величини артеріального тиску (АТ) у хворих з ІАТІ та у осіб контрольної групи залежно від генотипу за C+70G поліморфізмом гена *EDNRA* наведені в таблиці 1. Аналіз середніх величин всіх видів артеріального тиску (систоличного, діастолічного, пульсового і середнього) у осіб з різними генотипами контрольної групи та групи хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом статистично значимих відмінностей не показав ($P > 0,05$).

чного, діастолічного, пульсового і середнього) у осіб з різними генотипами контрольної групи та групи хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом статистично значимих відмінностей не показав ($P > 0,05$).

Таблиця 1
Артеріальний тиск (АТ) у хворих з ІАТІ і у пацієнтів контрольної групи залежно від генотипів за поліморфізмом C+70G гена *EDNRA* (мм рт. ст.) ($M \pm m$)

	C/C	C/G	G/G	P
Хворі з ІАТІ				
n	41	98	31	
Систолічний АТ	165,9±4,23	167,9±2,96	165,5±5,79	0,887
Діастолічний АТ	96,5±1,99	95,8±1,62	92,4±3,17	0,501
Пульсовий АТ	69,4±3,08	72,1±2,09	73,1±4,60	0,730
Середній АТ	119,6±2,55	119,9±1,92	116,8±3,63	0,719
Контрольна група				
n	34	61	26	
Систолічний АТ	155,4±4,07	151,6±3,00	151,4±4,59	0,716
Діастолічний АТ	87,2±2,20	85,1±1,51	88,1±2,60	0,531
Пульсовий АТ	68,2±2,98	66,5±2,42	63,3±3,35	0,570
Середній АТ	109,9±2,60	107,3±1,79	109,2±3,00	0,670

Примітки: n – кількість пацієнтів; P – статистична значимість відмінностей середніх величин.

Таблиця 2

Розподіл генотипів за С+70G поліморфізмом гена EDNRA у пацієнтів з нормальним артеріальним тиском (НАТ) і артеріальною гіпертензією (АГ) у контрольній групі і в хворих з ІАТІ

Генотип	НАТ, n		АГ, n	
	Контроль	ІАТІ	Контроль	ІАТІ
C/C	11	9	23	32
C/G	29	24	32	74
G/G	8	9	18	22
	P ₁ = 0,847		P ₁ = 0,154	
	P ₂ = 0,202; P ₃ = 0,786; P ₄ = 0,226; P ₅ = 0,002; P ₆ = 0,557			

Примітки: n – кількість осіб; P₁ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем і ІАТІ; P₂ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з НАТ та АГ у контролі; P₃ – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами з НАТ та АГ у групах з ІАТІ; P₄ – значимість відмінностей у частоті осіб з НАТ та АГ з генотипом C/C у контрольній групі і групі з ІАТІ; P₅ – значимість відмінностей у частоті осіб з НАТ та АГ з генотипом C/G у контрольній групі і групі з ІАТІ; P₆ – значимість відмінностей у частоті осіб з НАТ та АГ з генотипом G/G у контрольній групі і групі з ІАТІ.

При дослідженні частоти С+70G поліморфних варіантів гена EDNRA у осіб, що мають нормальне значення артеріального тиску та у осіб з артеріальною гіпертензією (АГ) окремо в контрольній групі і у групі хворих з ІАТІ було отримано результати представлені в таблиці 2. У групах порівняння різниця у розподілі генотипів не була статистично достовірною, як у осіб з нормальним артеріальним тиском ($\chi^2 = 0,332$; P₁ = 0,847) так і у осіб з АГ ($\chi^2 = 3,745$; P₁ = 0,154).

Серед осіб контрольної групи з нормальним артеріальним тиском (НАТ) 11 (22,9%) мають C/C генотип, 29 (60,4%) C/G генотип і 8 (16,7%) G/G генотип, а осіб з артеріальною гіпертензією, відповідно, 23 (31,5%), 32 (43,8%) і 18 (24,7%). Статистично достовірної різниці у розподілі генотипів осіб контрольної групи з різними показниками АТ не виявлено ($\chi^2 = 3,200$; P₂ = 0,202). При аналогічному порівнянні осіб з НАТ та АГ у хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом така асоціація теж не підтвердилася ($\chi^2 = 0,482$; P₃ = 0,786).

У результаті поділу осіб з нормальним та підвищеним артеріальним тиском на підгрупи за генотипами досліджуваного поліморфізму гена EDNRA було отримано наступні дані (табл. 2). Серед носіїв C/C генотипу в контрольній групі було 11 (32,4 %) осіб з НАТ і 23 (67,6 %) осіб з АГ, а у групі хворих з ІАТІ 9 (22,0 %) і 32 (78,0 %) відповідно. Відмінності у частоті осіб з різним АТ за даним генотипом у групах порівняння не були достовірні ($\chi^2 = 1,028$; P₄ = 0,226). Серед осіб з C/G генотипом у контролі 29 (47,5 %) осіб мали нормальний рівень АТ і 32 (52,5 %) підвищений, а серед хворих з інсультом їх кількість становила 24 (24,5 %) і 74 (75,5 %). Статистичний аналіз отриманих даних дозволив встановити достовірну відмінність між зазначеними групами порівняння у носіїв C/G генотипу ($\chi^2 = 8,990$; P₅ = 0,002). Що стосується носіїв G/G генотипу, то в контрольній групі з НАТ виявлено 8 (30,8 %) осіб і 18 (69,2 %) осіб з АГ, а серед хворих з ІАТІ відповідно 9 (29,0 %) і 22 (71,0 %). Таким чином різниця частоти осіб у контрольній і дослідній групах, які є гомозиготами за мінорним алелем не є достовірною ($\chi^2 = 0,020$; P₆ = 0,557).

Суть алейного поліморфізму С+70G полягає в тому, що в 211 положенні восьмого екзону відбувається транс версія піримідину цитозину на пурин гуанін. Точкова заміна нуклеотидів може змінювати хімічну структуру ДНК, але її значення залишається не вивченим. Існує припущення, що ефект даного поліморфного варіанту 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 [7, 16].

На сьогодні проведено небагато аналогічних досліджень у інших популяціях. Група вчених на чолі з Т. Rahman досліджували вплив С+70G поліморфізму гена EDNRA на розвиток артеріальної гіпертензії. Для цього провели аналіз генотипів 1425 осіб. Серед них 37,4 % були носіями C/C генотипу і мали підвищений артеріальний тиск, 37,9 % були носіями гетерозиготного генотипу і 42,4 % осіб з артеріальною гіпертензією були гомозиготами за мінорним алелем. Було встановлено, що у носіїв мінорного алеля ризик розвитку гіпертонії більший у 1,19 рази порівняно з носіями C/C генотипу (P = 0,05; OR = 1.19)[13]. У іншому дослідженні, проведеному L. Zhangetal, у 747 осіб китайської популяції, з яких 381 ввійшли в групу хворих з ішемічним інсультом, а 366 – в групу контролю. Виявлено, що у чоловіків, які є гомозиготами за основним алелем, ризик розвитку інсульту був достовірно нижчим, ніж у носіїв мінорного алеля (P = 0,016), проте даний зв'язок не підтвердився у жінок [17].

Висновки

Поліморфізм С+70G гена EDNRA не асоційований з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту. Серед хворих на ІАТІ з генотипом C/G підвищений артеріальний тиск визначається частіше, ніж у осіб без гіпертензії з таким генотипом.

Перспективи подальших досліджень полягають у подальшому дослідженні однонуклеотидних поліморфізмів гена EDNRA з урахуванням інших факторів ризику ішемічних інсультів, зокрема змін у системі гемостазу і порушень ліпопротеїнового складу плазми крові.

Література

1. Амбросова Т. Н. Эндотелиальная дисфункция при гипертонической болезни / Т. Н. Амбросова // Международный медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 16-21.
2. Олешко Т. Б. Статеві особливості C+70G поліморфних варіантів гена EDNRA з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту / Т. Б. Олешко, Т. М. Олешко, В. С. Юрченко [та ін.] // Клінічна та експериментальна патологія. – 2017. – Т. XVI, № 1 (59). – С. 105-109.
3. Шишкин А.Н. Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия / А.Н.Шишкин, М.Л. Лындина // Артериальная гипертензия. – 2008. – Т. 14, № 4. – С. 315-319.
4. Adams H.P. 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.
5. Benjafield A. V. Association of EDNRA, but notWINK4 or FKBP1B, polymorphisms with essential hypertension / A. V. Benjafield, K. Katyk, B. J. Morris // Clin Genet. – 2003. – Vol. 64. – P. 433-438.
6. Böhm F. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease / F. Böhm, J. Pernow // Cardiovascular Research. – 2007. – Vol. 76. – P. 8-18.
7. Darrah R. EDNRA variants associate with smooth muscle mRNA levels, cell proliferation rates, and cystic fibrosis pulmonary disease severity / R. Darrah, E. McKone, C. O'Connor [et al.] // Physiological genomics. – 2010. – Vol. 41 (1). – P. 71-77.
8. Ellis K.L. Association between endothelin type A receptor haplotypes and mortality in coronary heart disease / K.L. Ellis, A. P. Pilbrow, H.C. Potter [et al.] // Personalized Medicine. – 2012. – Vol. 9 (3). – P. 1-9.
9. Kadojić D. Epidemiology of stroke / D. Kadojić, M. Dikanović, M. Bitunjac [et al.] // Periodicum Biologorum. – 2012. – Vol. 114 (3). – P. 253-257.
10. Kim B. J. Ischemic Stroke Subtype Classification: An Asian Viewpoint / B. J. Kim, J. S. Kim // Journal of Stroke. – 2014. – Vol. 16(1). – P. 8-17.
11. Koyama Y. Endothelin systems in the brain: involvement in pathophysiological responses of damaged nerve tissues / Y. Koyama // BioMolecular Concepts. – 2013. – Vol. 4, Iss. 4. – P. 335-347.
12. Kraja A. T. Genetics of Hypertension and Cardiovascular Disease and Theirinterconnected Pathways: Lessons from Large Studies / A. T. Kraja, S. C. Hunt, D. C. Rao [et al.] // Curr. Hypertens. Rep. – 2011. – Vol. 13 (1). – P. 46-54.
13. Rahman T. Common genetic variation in the type Aendothelin-1 receptor is associated with ambulatory blood pressure: a family study / T. Rahman, M. Baker, D. H. Hall [et al.] // Journal of Human Hypertension. – 2008. – Vol. 22. – P. 282-288.
14. Rankinen T. Effect of Endothelin 1 Genotype on Blood Pressure Is Dependent on Physical Activity or Fitness Levels / T. Rankinen, T. Church, T. Rice [et al.] // Hypertension. – 2007. – Vol. 50. – P. 1120-1125.
15. Takeuchi F. Blood Pressure and Hypertension Are Associated With 7 Loci in the Japanese Population / F. Takeuchi, M. Isono, T. Katsuya [et al.] // Circulation. – 2010. – Vol. 121. – P. 2302-2309.
16. Wróbel-Dudzinska D. 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 / D. Wróbel-Dudzinska, E. Kosior-Jarecka, U. Łukasik [et al.] // Journal of Ophthalmology. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-12.
17. Zhang L. Effect of SNP Polymorphisms of EDN1, EDNRA, and EDNRBGene on Ischemic Stroke / L. Zhang, R. Sui // Cell Biochem. Biophys. – 2014. – Vol. 70. – P. 233-239.

Реферат

АССОЦІАЦІЯ C+70G АЛЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА EDNRA С ІШЕМІЧЕСКИМ АТЕРОТРОМБОТИЧНИМ ІНСУЛЬТОМ У ЛІЦ С АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗИЄЮ І НОРМАЛЬНИМ АРТЕРІАЛЬНИМ ДАВЛЕННЯМ

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

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

Приведены результаты определения C+70G (rs5335) полиморфизма гена рецептора эндотелина типа А (EDNRA) в 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (IATI) и 124 лиц контрольной группы. Установлено, что у больных с IATI соотношения гомозигот за основным аллелем (C/C), гетерозигот (C/G) и гомозигот за минорным аллелем (G/G) составляет 24,1 %, 57,6 % и 18,2 %, а в контроле - 29,0 %, 50,0 % и 21,0 % соответственно (P = 0,426 по χ^2 -критерию). При сравнении частоты ишемических инсультов у лиц с нормальным и повышенным артериальным давлением с разными вариантами генотипа за исследуемым полиморфизмом установлено, что у носителей C/G генотипа отличие между исследуемыми группами у больных с IATI и лиц контрольной группы является статистически значимым (P = 0,002). Относительно гомозигот как за основным, так и за минорным аллелем достоверной разницы не обнаружено.

Summary

ASSOCIATION OF C+70G ALLELIC VARIANTS OF EDNRA GENE WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE IN PERSONS WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND NORMAL BLOOD PRESSURE

Oleshko T. B., Svyrydenko D.Yu., Harbuzova V. Yu.

Key words: endothelin receptor type A, gene polymorphism, ischemic stroke.

The results of the detection of +70G (rs5335) polymorphism of the endothelin type A receptor gene (EDNRA) in 170 patients with ischemic atherothrombotic stroke (IAS) and 124 persons of control group were presented in this article. It was found that the ratio of homozygotes by major allele (C/C), heterozygotes (C/G) and homozygotes by minor allele (G/G) in the patients with IAS was 24.1%, 57.6% and 18.2% and respectively 29.0%, 50.0% and 21.0% in the in control (P = 0.426 at χ^2 -criterion). When comparing the frequency of ischemic strokes in the persons with normal and high blood pressure having different variants of genotype by the polymorphism investigated, we revealed that there was a statistically significant difference (P = 0.002) between C/G genotype carriers with IAS and control group. Regarding both homozygotes by major and minor allele the significant differences were not found.