УДК 616.831-005.1-005.4-005.6-055:575.113.2

Т.Б. Олешко,

Т.М. Олешко,

В.С. Юрченко,

О.А. Обухова,

В.Ю.Гарбузова

Сумський державний університет

СТАТЕВІ ОСОБЛИВОСТІ C+70G ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА EDNRA З РОЗВИТКОМ ІШЕМІЧНОГО АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІНСУЛЬТУ

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

Резюме*. Представлено результати визначення зв'язку C+70G (rs5335) поліморфізму гена ендотелінового рецептора типу А (EDNRA) у 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (IATI) і 124 осіб без ознак серцево-судинної патології (контрольна група). Установлено, що співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем за C+70G поліморфізмом у хворих з IATI становить 24,1; 57,6 і 18,2 %, а в контрольній - 29,0; 50,0 і 21,0 % відповідно (P = 0,426 за χ^2-критерієм). При розподілі кожної з груп на підгрупи за статтю не виявлено статистично значимих відмінностей як у контрольній групі (P = 0,965), так і у групі хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (P = 0,173)*

Вступ

Ішемічний атеротромботичний інсульт є однією із найпоширеніших форм цереброваскулярних порушень та займає лідируючі позиції у захворюваності і смертності населення усього світу, тому становить важливу медико-соціальну проблему. Патофізіологічною основою розвитку ішемічного ушкодження головного мозку є ендотеліальна дисфункція (ЕД), яка визначається як дизбаланс між продукцією вазоконстрикторних, протромботичних, проліферативних факторів, з одного боку, та судинорозширюючих, ангіопротективних та антипроліферативних факторів - з іншого, що порушує метаболізм судинної стінки [1, 10]. Основним чинником, що призводить до розвитку ЕД, є ендотелін-1 (EDN1). Його вазоконстрикторний ефект, який в 10 разів переважає ефект ангіотензину II, вважається найпотужнішим серед відомих на сьогодні ендогенно синтезованих речовин [6, 12, 13]. EDN1 реалізує свої ефекти посередництвом специфічних ендотелінових рецепторів типу А і В (EDNRA і EDNRB), асоційованих з G-білком, при взаємодії з якими виникають протилежні ефекти. EDNRA має більшу афінність до ендотеліну-1, відіграє ключову роль у вазоконстрикції, прогресуванні ендотеліальних порушень, тому залучений до розвитку серцево-судинних захворювань та, зокрема, ішемічного інсульту [7, 8, 9]. Саме тому ген рецептора ендотеліну типу А ймовірно вважати важливим геном-кандидатом, що може бути причетним до механізмів виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту.

Одним з немодифікованих факторів ризику інсульту є стать. За даними Американської асоціації інсульту та інших джерел, у всіх вікових групах захворюваність на інсульт більша у чоловіків, але смертність від цієї недуги переважає серед жіночого населення [3,11]. Зважаючи на те, що функціональні ефекти EDNRA залежать від структурних особливостей його гена, цікавим є вивчення спільного впливу статі і даного генетичного фактора на патогенез інсульту. Розв`язанню даної проблеми можуть слугувати результати молекулярно-генетичних досліджень, що спрямовані на вивчення зв`язку поліморфних варіантів гена EDNRA та ішемічного атеротромботичного інсульту (IATI) з урахуванням статевих особливостей.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Представлену 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.

Мета дослідження

Провести аналіз асоціації алельного поліморфізму C+70G гена EDNRA з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб різної статі.

© Т.Б. Олешко, Т.М. Олешко, В.С. Юрченко, О.А. Обухова, В.Ю.Гарбузова, 2017

Матеріал і методи

Для аналізу використано венозну кров 170 хворих з ІАТІ (42,4 % жінок і 57,6 % чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік - 64,7 ± 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 становив 76,7 ± 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 ± 0,93 роки) був істотно вищим, ніж другої (P < 0,001).

Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [1, 3, 4], на підставі 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 етнічні 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. Усі 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 подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх шляхом електрофорезу в агарозному гелі.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstedt", Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморожували і зберігали при температурі - 20 °С. ДНК з неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт C+70G поліморфізму, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sence) - 5' TAGAAGCACTCC TCGGTACTCC 3' і зворотного (antisense) - 5' TCG TAGATGTTGTGGGTGGATA 3'. Праймери було синтезовано фірмою "Metabion" (Німеччина). Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Taq-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагмента, що містив досліджувану поліморфну ділянку, складалася з 35 циклів: денатурації - 94 °С (50 с), гібридизації праймерів - 60°С (40 с) і елонгації - 72 °С (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°С протягом 20 годин з 3 ОД рестриктази NmuCl ("Thermo Scientific", США) у буфері В такого складу: 10 мМ тріс-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl2, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 211-й позиції 8-го екзона гена EDNRA містився цитозин, ампліфікат, який складався з 174 пар нуклеотидів (п.н.), розщеплювався рестриктазою NmuCl на два фрагменти - 116 і 58 пар нуклеотидів. У випадку заміни цитозину на гуанін сайт рестрикції для NmuCl втрачався і утворювався один фрагмент розміром 174 пари нуклеотидів (рис. 1).

Ампліфікати вивченого фрагмента гена EDNRA після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 25 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою трансілюмінатора ("Біоком", Росія).

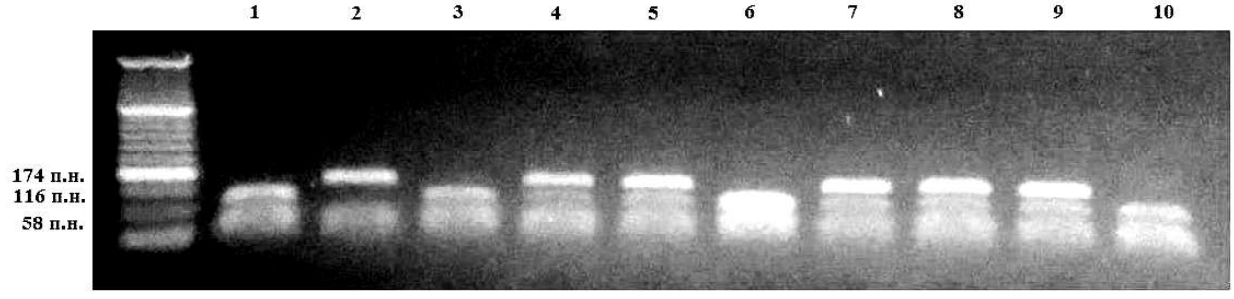

Рис. 1. Результати рестрикційного аналізу C+70G поліморфізму гена EDNRA: доріжки 1,3,6,10 відповідають C/C генотипу; 4,5,7,8,9 - C/G генотипу; 2 - G/G гентипу.

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2-критерієм. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним.

Обговорення результатів досліджень

Генотипування хворих на IATI та пацієнтів контрольної групи за поліморфізмом C+70G гена EDNRA дало змогу встановити частоту, з якою трапляються окремі варіанти цього гена, а також порівняти їх за статтю і між групами загалом.

Частоту трьох можливих поліморфних варіантів генотипу за C+70G поліморфізмом гена EDNRA, а також перевірку відповідності розподілу основного (C) і мінорного (G) алелів рівновазі Харді-Вайнберга подано у таблиці 1. Як випливає з наведених даних, частота C- і G-алелів у контрольній групі не має статистично достовірних відхилень від очікуваних за генетично-популяційним законом величин ($P > 0,05$), чого не можна сказати про групу хворих з IATI ($P < 0,05$).

На рисунку 2 наведено результати аналізу частот окремих генотипів за поліморфізмом C+70G в осіб контрольної групи і у хворих на IATI.

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 на IATI і особами контрольної групи не виявлено.

Таблиця 1

Частота алельних варіантів і алелів за C+70G поліморфізмом гена EDNRA у контрольній групі та у хворих з IATI

	Контрольна група	***Хворі з IATI***
Гомозиготи C/C, n (%)	36 (29,0)	41 (24,1)
Гетерозиготи C/G, n (%)	62 (50,0)	98 (57,6)
Гомозиготи G/G, n (%)	26 (21,0)	31 (18,2)
C-алель	0,54	0,53
G-алель	0,46	0,47
χ^2	0,01	4,19
P	> 0,05	< 0,05

Примітка: n – кількість пацієнтів; χ^2 і P відображають відхилення у кожній групі від рівноваги Харді - Вайнберга

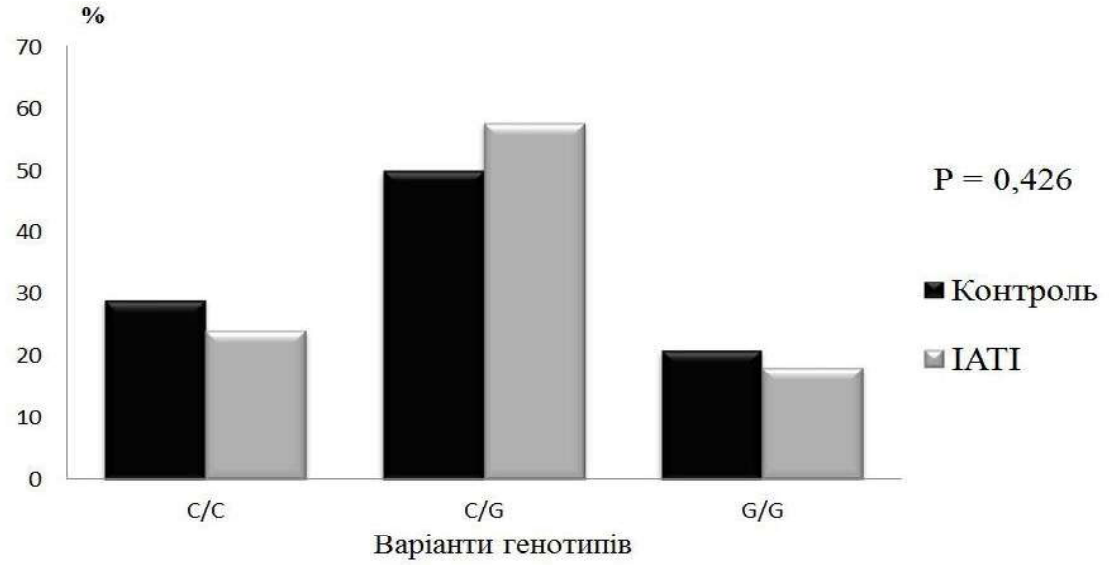

Рис. 2. Частота алельних варіантів гена EDNRA за C+70G поліморфізмом у хворих з IATI (сірі стовпчики) і в контрольній групі (чорні стовпчики). P - статистична значущість відмінності показників за χ^2-критерієм Пірсона

Порівнюючи дані про частоту варіантів поліморфізму C+70G у осіб різної статі окремо в контрольній групі і у хворих з IATI, ми одержали результати, відтворені в таблиці 2. Розподіл генотипів у групах порівняння не був статистично достовірним як серед жінок ($\chi^2 = 0,093$;P1 = 0,954), так і серед чоловіків ($\chi^2 = 2,894$;P1 = 0,235).

У жінок контрольної групи генотип C/C виявлено у 13 (28,9 %) осіб, генотип C/G - 22 (48,9 %), генотип G/G - 10 (22,2 %), а у чоловіків відповідно 23 (29,1 %), 40 (50,6 %), 16 (20,3 %). Порівняння отриманих даних засвідчує про відсутність статистично значимих відмінностей у розподілі алельних варіантів поліморфізму C+70G між чо-

Таблиця 2

Розподіл осіб різного генотипу за C+70G поліморфізмом гена EDNRA у жінок і чоловіків контрольної групи та хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом

Генотип	Жінки (n)		Чоловіки (n)	
	Контроль	ІАТІ	Контроль	ІАТІ
C/C	13	19	23	22
C/G	22	36	40	62
G/G	10	17	16	14
	$P_1 = 0,954$		$P_1 = 0,235$	
	$P_2 = 0,965$; $P_3 = 0,173$; $P_4 = 0,249$; $P_5 = 0,505$; $P_6 = 0,167$			

Примітка. Подано частоту генотипу в абсолютних одиницях і відсотках. P – статистична значимість відмінностей між порівнюваними групами за χ^2 –критерієм Пірсона. P_1 – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем та ІАТІ у осіб різної статі; P_2 – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами різної статі у контролі; P_3 – значимість відмінностей у розподілі генотипів між особами різної статі у хворих з ІАТІ; P_4 – значимість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом C/C у контрольній групі і групі з ІАТІ; P_5 – значимість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом C/G у контрольній групі і групі з ІАТІ; P_6 – значимість відмінностей у частоті осіб різної статі з генотипом G/G у контрольній групі і групі з ІАТІ

ловіками та жінками контрольної групи (χ^2= 0,071; P_2 = 0,965). Серед жінок з ІАТІ було 19 (26,4 %) з генотипом C/C, 36 (50,0 %) з генотипом C/G і 17 (23,6 %) з генотипом G/G, а серед чоловіків - 22 (22,4 %), 62 (63,3 %) і 14 (14,3 %) відповідно. Одержані результати вказують на відсутність статистично значимих відмінностей у осіб різної статі хворих на ІАТІ (χ^2 = 3,514; P_3 = 0,173). Таким чином, і у хворих на ІАТІ, і у осіб без цереброваскулярної патології поліморфні варіанти гена EDNRA не асоційовані зі статтю (табл. 2).

Не було достовірних відмінностей у частоті осіб чоловічої та жіночої статі, роподілених на підгрупи за генотипами досліджуваного поліморфізму. Так, серед носіїв генотипу C/C у контрольній групі було 13 (36,1 %) жінок і 23 (63,9 %) чоловіків, а у групі хворих на ІАТІ - 19 (46,3 %) жінок і 22 (53,7 %) чоловіків. Частота осіб різної статі, що є гомозиготами за основним алелем, у даних групах порівняння достовірно не відрізняється (χ^2 = 0,826; P_4 = 0,249). Серед осіб із C/G генотипом у контролі було 22 (35,5 %) осіб жіночої та 40 (64,5 %) осіб чоловічої статі, а у групі пацієнтів з інсультом їх кількість становила 36 (36,7 %) та 62 (63,3 %) відповідно. Відмінності у частоті осіб різної статі за даним генотипом у групах порівняння також відсутні (χ^2= 0,026; P_5 = 0,505). Щодо носіїв G/G генотипу, то в контрольній групі кількість жінок дорівнює 10 (38,5 %) і 16 (61,5 %) чоловіків, а серед хворих 17 (54,8 %) і 14 (45,2 %) відповідно. Частота осіб, що є гомозиготами за мінорним алелем, у контрольній і дослідній групі не входить у межі статистичної значимості (χ^2= 1,521; P_6 = 0,167) (табл. 2).

Висновок

У виконаній нами роботі вперше проаналізовано асоціацію C+70G поліморфізму гена EDNRA з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в українській популяції, та не виявлено зв'язку досліджуваного генетичного чинника з ІАТІ як у групах загалом, так і у осіб різної статі.

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні вивчення зв'язків факторів ризику ІАТІ з різними варіантами генотипу за C+70G поліморфізмом гена EDNRA. При цьому повинен враховуватися вплив генетичних чинників на фактори, що збільшують ризик розвитку ішемічних інсультів (артеріальна гіпертензія, порушення ліпопротеїнового складу плазми крові, зміни у системі гемостазу, куріння тощо).

Література. 1.Коноплева Л. Ф. Эндотедиальная дисфункция в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и методы ее коррекции / Л. Ф. Коноплева // Therapia. - 2011. - № 3(56). - С. 26-30. 2.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. 3.Appelros P. Sex Differences in Stroke Epidemiology / P. Appelros, B. Stegmayr, A. Terént // A Systematic Review Stroke. - 2009. - Vol. 40. - P. 1082-1090. 4.Kadojic D. Epidemiology of stroke / D. Kadojic, M. Dikanovic, M. Bitunjac [et al.] // Periodicum Biologorum. - 2012. - Vol. 114 (3). - P. 253-257. 5.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. 6.Kohan D. E. Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin / D. E. Kohan, N. F. Rossi, E. W. Inscho, D. M. Pollock // Physiol. Rev. - 2011. - Vol. 91. - P. 1-77. 7.Koyama Y. Endothelin systems in the brain: involvement in pathophysiological responses of damaged nerve tissues / Y. Koyama // BioMolecular Concepts. - 2013. - Vol. 4, I. 4. - P. 335-347. 8.Masaki T. Endothelin end endothelial dysfunction / T. Masaki, T. Sawamura // Proc. Jpn. Acad. - 2006. - Ser. B. - Vol. 82. - P. 17-24. 9.Mazzuca M. Q. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease / M. Q. Mazzuca, R. A. Khalil // Biochem. Pharmacol. - 2012. - Vol. 84 (2). - P. 147-162. 10.Rajendran P. The Vascular Endothelium and Human Diseases / P. Rajendran, T. Rengarajan, J. Thangavel, Y. Nishigaki, D. Sakthisekaran, G. Sethi, I. Nishigaki // International Journal of Biological Sciences. - 2013. - № 9(10). - P. 1057-1069. 11.Rasulova K. A. Preliminary findings of tashkent hospital based study of risk factors for different ischemic stroke subtypes / K. A. Rasulova

// European Medical, Health and Pharmaceutical Journal. - 2014. - Vol. 7 (2). - P. 26-33. 12.Sapira V. Study of Endothelin-1 in Acute Ischemic Stroke / V. Sapira, I. M. Cojocaru, G. Lilios [et al.] // Rom. J. Intern. Med. - 2010. - Vol. 48 (4). - P. 329-332. 13.Zhang Y. Up-Regulation of Endothelin Receptors Induced by Cigarette Smoke - Involvement of MAPK in Vascular and Airway Hyper-Reactivity / Y. Zhang, L. Edvinsson, C. Xu // The Scientific World Journal. - 2010. - Vol. 10. - P. 2157-2166.

ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ С+70G ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА EDNRA С РАЗВИТИЕМ ИШЕМИЧЕСКОГО АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Т.Б. Олешко, Т.М. Олешко, В.С. Юрченко, О.А. Обухова, В.Ю. Гарбузова

Резюме. Представлены результаты определения связи С+70G (rs5335) полиморфизма гена рецептора эндотелина типа А (EDNRA) в 170 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (ИАТИ) и 124 человек без признаков сердечно-сосудистой патологии (контрольная группа). Установлено, что соотношение гомозигот по основному аллелю, гетерозигот и гомозигот по минорному аллелю при анализе С+70G полиморфизма у больных с ИАТИ составляет 24,1; 57,6 и 18,2 %, а в контрольной - 29,0; 50,0 и 21,0 % соответственно (Р = 0,426 по χ^2-критерию). При разделении каждой из групп на подгруппы по полу не было выявлено статистически значимых различий как в контрольной группе (Р = 0,965), так и в группе больных с ишемическим атеротромботическим инсультом (Р = 0,173).

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

SEX PECULIARITIES OF C+70G POLYMORPHIC VARIANTS OF EDNRA GENE WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE DEVELOPMENT

T.B. Oleshko, T.M. Oleshko, V.S. Yurchenko, O.A. Obukhova, V.Yu. Harbuzova

Abstract. The results of relationship determination of C+70G (rs5335) polymorphism of the endothelin receptor type A gene (EDNRA) in 170 patients with ischemic atherothrombotic stroke (IAS) and 124 individuals without symptoms of cardiovascular disease (control group) are presented in the article. It has been established that homozygote correlation by basic allele, heterozygote and homozygotes by minor allele while analyzing C+70G polymorphism in IAS patients is 24.1; 57.6 and 18.2 %, and in the control group -29.0; 50.0 and 21.0 % correspondingly (P = 0.426 at χ^2criterion). In case of division of each group into subgroups according to gender statistically significant differences in the control group (P = 0,965) and in patients with ischemic atherothrombotic stroke (P = 0,173) were not detected.

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

Higher State Educational Establishment "Sumy State University"

Clin. and experim. pathol.- 2017.- Vol.16, №1 (59).-P.105-109.

Надійшла до редакції 13.02.2017
Рецензент – проф. Л.П. Сидорчук
© Т.Б. Олешко, Т.М. Олешко, В.С. Юрченко, О.А. Обухова, В.Ю.Гарбузова, 2017