

## ПОЛИМОРФИЗМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ (eNO-СИНТАЗЫ) И МОЗГОВОЙ ИНСУЛЬТ В КЫРГЫЗСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

*И.К. Молдоташев, Н.Т. Кудайбергенова, А.А. Алдашев*

Приведены результаты молекулярно-генетического тестирования T786C, 4a/4b, Glu298Asp полиморфизмов гена eNOS у 108 больных кыргызской национальности, перенесших мозговой инсульт МИ было показано, что нет существенной связи между развитием ишемического инсульта ИИ и полиморфными вариантами гена eNOS, однако наличие мутаций ассоциируется с осложненным течением МИ с речевыми нарушениями.

*Ключевые слова:* полиморфизм гена NOS; инсульт; кыргызская популяция.

Доказано, что в возникновении мозгового инсульта (МИ) значительную роль играет наследственная предрасположенность [1, 2]. Многочисленные исследования, проведенные в различных странах, позволили определить ряд ге-нов-кандидатов, имеющих возможную связь с развитием МИ [3–5]. Изучаются гены ренин-ангиотензиновой системы (РАС), **NO-синтазы**, гены системы гемостаза, гены, связанные с обменом гомоцистеина и липидов, а также гены апоптоза [6, 7]. Полученные результаты в различных популяциях противоречивы и до сих пор не удалось выявить конкретные полиморфные варианты генов, либо генные мутации, ответственные за МИ. Одну из важных ролей в регуляции сосудистого тонуса, нейрональной передаче и реализации иммунного ответа играет оксид азота – NO [8, 9]. Поэтому представлялось интересным изучить полиморфные варианты эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) – **фермента, определяющего функцию эндотелия** и состояние микроциркуляторного русла.

С этой целью мы исследовали три полиморфизма гена eNOS (T786C, 4a/4b, Glu298Asp)

у лиц кыргызской национальности, перенесших МИ.

**Материал и методы исследования.** Молекулярно-генетическое тестирование T786C, 4a/4b, Glu298Asp полиморфизмов гена eNOS проводилось у 108 больных с перенесенным МИ в период 2008–2009 гг.

*Критерии исключения:* пациенты с поражением головного мозга несосудистого генеза, возраст > 70 лет, пациенты с выраженными когнитивными и психическими нарушениями, невозможность самостоятельного передвижения вне помещения, отсутствие способностей к самообслуживанию, нарушение глотания, тазовые нарушения, наличие тяжелых заболеваний печени и почек, выраженная сердечная недостаточность, нарушения ритма и проводимости.

Для изучения ассоциаций T786C, 4a/4b, Glu298Asp полиморфизмов гена eNOS мы распределяли больных по группам в зависимости от высоты проживания, по степени тяжести нарушений двигательной активности, по наличию речевых нарушений и по уровню АД.

**Группы больных:** В зависимости от высоты проживания больные (с перенесенным МИ в течение последних двух лет проживали постоянно) разделены на две группы: 1-я группа (n = 68) – в условиях низкогогорья (Чуйская область, 760–1000 м над уровнем моря). 2-я группа (n = 40) – в условиях высокогорья (Нарынская область, 2000–2500 м н. у. м.).

В зависимости от наличия двигательных нарушений по Скандинавской шкале инсульта (СШИ) (Lindenstrom et al., 1991) больные с перенесенным МИ были разделены на группы А и Б: группа А (n = 90) – СШИ от 0 до 4 балла, группа Б (n = 18) – СШИ более 4 баллов.

По наличию речевых нарушений больные с перенесенным МИ были разделены на группы С и Д: Группа С (n=36) – МИ, осложненный речевыми нарушениями, группа Д (n=72) – МИ без речевых нарушений.

В зависимости от уровня адаптированного САД (аСАД) больные с перенесенным МИ были разделены на группы: группа Е (n = 52) – аСАД до 140 мм рт. ст., группа F (n = 55) – аСАД > 140 мм рт. ст.

**Методика определения T786C, 4a/4b, Glu298Asp полиморфизмов гена eNOS.** ДНК выделялась из клеток венозной крови методом фенолхлороформной экстракции с использованием набора Nucleon ВАСС3 ( “Amersham Pharmacia Biotech”, Швеция). Определение T786C, 4a/4b, Glu298Asp полиморфизмов гена eNOS осуществлялось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров. Продукты амплификации разделялись с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с этидиумом бромида. Сканирование геля и анализ полученных результатов осуществляли на имидж-денситометре GelDoc-It (UVP, США). Для сравнения генотипов и аллелей проводился статистический анализ с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона. Статистически значимыми считали значения при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Частота встречаемости генотипов и аллелей 4a/4b, C786T полиморфизмов гена eNOS у больных, перенесших МИ, в зависимости от высоты проживания не различалась. Однако гомозиготный мутантный TT генотип Glu298Asp полиморфизма гена eNOS встречался достоверно чаще у больных во 2-й группе (13,9 % против 4,2 в 1-й и 2-й группах соответственно,  $p < 0,04$ ), недостоверно чаще обнаруживался GT генотип. По частоте встречаемости аллелей носительство T аллеля достоверно чаще наблюдалось у больных 2-й группы

(0,20 % против 0,36 % в 1-й и 2-й группах соответственно,  $p < 0,01$ ).

Ассоциации между 4a/4b, C786T, Glu298-Asp полиморфизмами гена eNOS и со степенью тяжести двигательных нарушений и уровнем АД не были выявлены. Инсульт, осложненный речевыми нарушениями, ассоциировался с наличием мутантного генотипа 4a ( $p > 0,05$ ), достоверные различия наблюдались по частоте встречаемости аллелей (0,1 % против 0,03 в 1-й и 2-й группах соответственно,  $p < 0,05$ ).

**Обсуждение результатов.** Известно, что Кыргызская Республика занимает одно из первых мест в мире по распространенности, заболеваемости и смертности от мозгового инсульта [10]. Развитие инсульта зависит как от внешних причин, так и от генетических особенностей индивидуума. Исследования, проведенные в различных странах, выявили ряд генов, имеющих возможную связь с развитием МИ [3–6, 8]. Среди них определенную роль отводят и полиморфным вариантам гена эндотелиальной NO-синтазы. Так, недавно Тао Н.М. и Chen G.Z. (2009) провели мета-анализ 18 исследований по изучению связи полиморфизмов гена eNOS с риском возникновения ишемического инсульта (ИИ) у 5516 пациентов и пришли к выводу о том, что необходимы дальнейшие исследования для внесения ясности в вопрос о связи Glu298Asp полиморфизма гена eNOS с ИИ [11]. В то же время Saudi S. и соавт. (2010), изучив взаимосвязь полиморфизмов гена eNOS (-786 T>C, 4a/b, Glu298Asp) у 329 больных, перенесших ИИ, пришли к заключению, что эти генетические вариации локуса eNOS являются генетическими риск-факторами развития ИИ [12]. Разноречивые данные получены о связи гена eNOS с риском развития ИИ в зависимости от расы, национальности и пола. Так, Howard T. и соавт. (2005), изучив пять полиморфизмов гена eNOS (-1468 T>A, -922G>A, -786T>C, G894T, интрон 4a/b), выявили существенную связь между -922 G>A и -786 T>C SNP с ИИ у афроамериканцев [13]. Casas J. и соавт. (2006) наблюдали увеличение риска развития ИИ в китайской популяции у носителей генотипа Glu298Asp. В японской и белой популяции такого не было, а у афроамериканцев в небольшой группе молодых женщин (110 пациентов и 206 контроль) выявили увеличение риска ИИ у носителей 786 T>C варианта гена eNOS [14]. По данным Grewal R.P. и соавт. (2007) оказалось, что интрон 4c аллель гена eNOS может быть генетическим маркером ИИ у афроамериканцев [15]. Oksala N.K. и соавт. (2008), обследовав

довав 486 больных с ИИ в течение 7,6 лет установили сильную зависимость между курением, женским полом и **iNOS R5/4 генотипом с риском смерти**, что может иметь прогностическое значение [16].

В кыргызской популяции, по нашим данным, не установлена тесная зависимость между возникновением ИИ и полиморфизмом гена eNOS. Однако относительно малое число наблюдений (108 пациентов) не позволяет делать однозначный вывод, и поэтому необходимы дальнейшие исследования в этом направлении. К тому же, по мнению **Lanktree M.B. и соавт. (2010)**, в результате технологических достижений в настоящее время ученые перешли от изучения ассоциации генов-кандидатов к исследованию ассоциации геномов [17]. В восьми недавних геномических исследованиях не был определен единственный локус генома, ответственный за МИ. Авторы пришли к выводу о том, что для полной характеристики вклада генома в развитие инсульта необходим мультидисциплинарный подход с учетом эпидемиологии, клинических данных, генетики и молекулярной биологии.

В нашем исследовании не было выявлено ассоциации между полиморфизмом гена eNOS со степенью двигательных нарушений и уровня АД. В то же время наличие речевых нарушений ассоциировалось с наличием мутантного генотипа 4a, достоверные различия наблюдались у них и по частоте встречаемости аллелей. Эти данные могут быть использованы для прогнозирования более тяжелого течения МИ, т. е. сопровождающегося речевыми нарушениями. Нами также обнаружено, что гомозиготный мутантный ТТ генотип **Glu298Asp полиморфизма гена eNOS** достоверно чаще встречался у лиц, проживающих в низкогорье. Носительство ТТ аллеля также существенно чаще наблюдалось в этой группе больных.

У жителей высокогорья мы можем предположить целый ряд различных факторов (высотная гипоксия, высокая встречаемость риск-факторов сердечно-сосудистых заболеваний, нерегулярное лечение и др.), которые могут приводить к частому развитию МИ, в том числе носительство мутантных аллелей в случае гетерозигот.

В то же время у жителей низкогорья наличие гомозиготного мутантного генотипа может быть генетическим риск-фактором развития МИ.

#### Выводы

1. В популяции кыргызов не было выявлено существенной связи между развитием ИИ и полиморфными вариантами гена eNOS.

2. Гомозиготный мутантный ТТ генотип **Glu298Asp** полиморфизма гена eNOS встречался достоверно чаще у больных МИ, постоянно проживающих в низкогорье, что может быть генетическим риск-фактором развития МИ.

3. Наличие полиморфизма 4a/4b гена eNOS в кыргызской популяции может быть генетическим риск-фактором развития МИ с развитием речевых нарушений.

#### Литература

1. *Скворцова В.И., Лимборская С.А., Сломинский П.А. и др.* Генетика ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2001. № 4. С. 10–18.
2. *Карпенко М.А., Шацкая Е.Г., Солнцев В.Н. и др.* Острые цереброваскулярные катастрофы у больных артериальной гипертензией: молекулярно-генетические аспекты // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2008. № 1. С. 33–38.
3. *Torshin, I.Yu.* Bioinformatics in the post-genomic era: physiology and medicine // Nova Biomedical Books. NY, USA. 2007. С. 35–67.
4. *Debette S., Seshadri S.* Advances in Genetics, Proteomics, and Metabolomics Genetics of Atherothrombotic and Lacunar Stroke // Circulation: Cardiovascular Genetics. 2009. № 2. С. 191–198.
5. *Hassan A., Markus H.S.* Genetics and ischemic stroke // Brain. 2000. № 123. V. 9. С. 1784–1812.
6. *Namara D.M., Tam S.W., Sabolinsky M.L. et al.* Endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) polymorphism African Americans with heart failure: results from the A-HeFT trial // J. Card Fail. 2009. № 15. V. 3. P. 191–198.
7. *Lembo G., Luca N., Battagli C.* A Common Variant of Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu298-Asp) Is an Independent Risk Factor for Carotid Atherosclerosis // Stroke. 2001. № 32. С. 735.
8. *Nerissa U.K., Rajendran P., Kim H. et al.* Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphism (-786TC) and Increased Risk of Angiographic Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage // Stroke. 2008. № 39. P. 1103.
9. *Munshi A., Rajeshwar K., Kaul S. et al.* VNTR polymorphism in intron 4 of the eNOS gene and the risk of ischemic stroke in a South Indian population. // Brain Res Bull. 2010. № 30; V. 82. № 5–6. P. 247–50.
10. WHO // World Health Report. 1999. Geneva: WHO. 1999.
11. *Tao H.V., Chen G.Z.* Endothelial NO-synthase gene polymorphisms and the risk of ischemic

- stroke: a meta-analysis // *Neurosci Res.* 2009. № 64. V. 3. P. 311–16.
12. *Saidi S., Mallat S.G., Almawi W.Y. et al.* Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke. // *Acta Neurol Scand.* 2010. № 121. P. 114–119.
  13. *Howard T.D., Giles W.H., Xu J. et al.* Promoter polymorphisms in the nitric oxide synthase 3 gene are associated with ischemic stroke susceptibility in young African American women // *Stroke.* 2005. № 36. P. 1848–1851.
  14. *Casas J.P., Hingorani A.D., Bautista L.E., Sharma P.* Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: Thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls // *Arch. Neurol.* 2004. № 61. P. 1652–1661.
  15. *Grewal R.P., Dutra A.V., Liao Y.C. et al.* The intron 4c allele of the NOS 3 gene is associated with ischemic stroke in African Americans // *BMC Med Genet.* 2007. № 10. P. 8–76.
  16. *Oksala N.K., Oksala A., Erkinjuntti T. et al.* Long-term survival after ischemic stroke in postmenopausal women is affected by an interaction between smoking and genetic variation in nitric oxide synthases // *Cerebrovascular Dis.* 2008. № 26. V. 3. P. 250–258.
  17. *Lanktree M.B., Dishgans M., Hegele R.F.* Advances in genomic analysis of stroke: what have we learned and where are we headed? // *Stroke.* 2010. № 41. V. 4. P. 825–832.