

## 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 МИ было показано, что нет существенной связи между развитием ИИ и полиморфными вариантами гена eNOS, однако наличие мутаций ассоциируются 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 генов-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 на 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 не сосудистого 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 постоянно проживали) разделены на две группы: 1-я группа (n = 68) – в условиях низкогорья (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 D: Группа С (n=36) – МИ, осложненный речевыми нарушениями, группа D (n=72) – МИ без речевых нарушений.

В зависимости от уровня адаптированного САД (аСАД) больные с перенесенным МИ были разделены на группы: группа E (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 486 боль-

ных 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 TT генотип Glu298Asp полиморфизма гена eNOS достоверно чаще встречался у лиц, проживающих в низкогорье. Носительство TT 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 TT 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.