



## Аналіз асоціації поліморфізмів генів FGB та eNOS3 із ризиком розвитку інтракраніального геморагічного та атеротромботичного ішемічного інсультів

**В. І. Цимбалюк, І. Г. Васильєва, М. Р. Костюк, Н. Г. Чопик, О. С. Галанта, О. І. Цюбко, Н. П. Олексенко, А. Б. Дмитренко, Т. А. Макарова, І. М. Шуба**

*ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України», вул. Платона Майбороди, 32, Київ 04050, Україна*

Європейська організація інсульту (ESO) спільно з Європейським альянсом боротьби з інсультом (SAFE) щодо дій на період 2018–2030 років одним із підпунктів пріоритетів для досліджень та розробок визначила врахування полігенетичних профілів людини. Поліморфізми генів NO-синтази 3 (eNOS3) та бета фібриногена (FGB) мають клінічне значення для розвитку серцево-судинних захворювань, а їх розподіл – етнічні особливості.

**Мета:** дослідити асоціацію поліморфізмів T-786C, G894T, 4b/4a VNTR гена eNOS3 та поліморфізму C-148T гена FGB із ризиком розвитку ішемічного атеротромботичного та інтракраніального геморагічного інсультів серед українців.

**Матеріали та методи.** У роботі було обстежено 102 хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт та 56 хворих на інтракраніальний геморагічний інсульт. До групи порівняння включено 102 особи. Наявність однонуклеотидних замін визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшою рестрикцією, а поліморфізм змінного числа tandemних повторів (VNTR) гена eNOS3 – алельспецифічною ПЛР.

**Результати.** Поліморфізм C-148T гена FGB асоціювався із ризиком розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту, як показали домінантна (OR = 2,276; 95 % CI:1,298–4,152) та мультиплікативна (OR = 2,322; 95 % CI:1,322–4,080) моделі обрахунку. Поліморфізм 4b/4a VNTR гена eNOS3 асоціювався із ризиком розвитку

## An analysis of association FGB and eNOS3 genes polymorphisms with intracranial hemorrhagic and atherothrombotic ischemic stroke

**Vitalii I. Tymbaliuk, Iryna G. Vasylieva, Mykhaylo R. Kostiuk, Natalia G. Chopyk, Olena S. Galanta, Olha I. Tsiubko, Natalia P. Oleksenko, Anzhela B. Dmytrenko, Tetiana A. Makarova, Iryna M. Shuba**

*Romodanov Neurosurgery Institute of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, NAMSU, 32, Platona Maiborody St., Kyiv 04050, Ukraine*

European Stroke Organisation (ESO) in cooperation with the Stroke Alliance for Europe (SAFE) prepared a 2018 – 2030 European Stroke Action Plan. One of priority items of this plan is taking to account human polygenetic risk profiles. NO-synthase3 (eNOS3) and beta-fibrinogen (FGB) polymorphisms are clinically significant for cardiovascular diseases and ethnically different.

**Objective:** to estimate the association of polymorphisms T-786C, G894T 4b/4a of eNOS3 gene and C-148T polymorphism of FGB gene with a risk of ischemic atherothrombotic stroke and intracranial hemorrhagic stroke of Ukrainian people.

**Materials and methods.** 102 patients with atherothrombotic ischemic stroke, 56 patients with intracranial hemorrhagic stroke and 102 healthy control subjects were included in the study. Single nucleotide polymorphisms were detected by polymerase chain reaction followed by restriction enzymes digestion and VNTR polymorphism gene was determined by allele-specific PCR method.

**Results.** The study revealed association of C-148T polymorphism eNOS3 gene in dominant (OR = 2,276; 95 % CI:1,298–4,152) and multiplicative (OR = 2,322; 95 % CI:1,322–4,080) models of analysis with a risk of ischemic atherothrombotic stroke. Intracranial hemorrhagic stroke manifestation associated with VNTR 4b/4a of eNOS3 gene polymorphism in codominant

інтракраніального геморагічного інсульту, як показали кодомінантна (OR=2,509; 95 % CI:1,049-4,080), домінантна (OR = 2,977; 95 % CI:1,344-6,596) та мультиплікативна (OR=3,037; 95 % CI:1,529-6,030) моделі обрахунку. Комбінація генотипів 894GT та 4b/4a гена eNOS3 із генотипом -148CT гена FGB збільшувала, а комбінація генотипу -148CC гена FGB із генотипом -786CC гена eNOS3 зменшувала ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.

**Висновки.** Генетичне дослідження до маніфестації хвороби, особливо при спадковому обтяженні, може стати суттєвим інструментом у розробці індивідуальних профілактичних заходів, направлених на попередження розвитку гострих порушень мозкового кровообігу.

**Ключові слова:** поліморфізм, бета фібриноген, NO-синтаза 3, ішемічний інсульт, геморагічний інсульт.

**Для цитування:** Цимбалюк ВІ, Васильєва ІГ, Костюк МР, Чопик НГ, Галанта ОС, Цюбко ОІ, Олексенко НП, Дмитренко АБ, Макарова ТА, Шуба ІМ. Аналіз асоціації поліморфізмів генів FGB та eNOS3 із ризиком розвитку інтракраніального геморагічного та атеротромботичного ішемічного інсультів. Журнал Національної академії медичних наук України. 2019;25(4):389-96. DOI: 10.37621/JNAMSU-2019-4-389-396.

Стаття надійшла до редакції 25 червня 2019 року  
Направлена на рецензування 5 жовтня 2019 року  
Прийнята до друку 23 листопада 2019 року

(OR = 2,322; 95 % CI:1,322-4,080), dominant (OR = 2,977; 95 % CI:1,344-6,596) and multiplicative (OR=3,037; 95 % CI:1,529-6,030) models of analysis. Combination of 894GT and 4a4b genotypes eNOS3 gene with -148CT genotype of FGB gene increased risk of ischemic stroke development, but the combination -786CC genotype of eNOS3 gene with -148CC genotype of FGB gene reduced risk.

**Conclusion:** A genetic study before disease manifestation, especially of family stroke, is critical for individual treatment for stroke prevention.

**Key words:** polymorphism, beta fibrinogen, NO-synthase 3, ischemic stroke, hemorrhagic stroke.

**For citation:** Tsymbaliuk VI, Vasylieva IG, Kostiuk MR, Chopyk NG, Galanta OS, Tsiubko OI, Oleksenko NP, Dmytrenko AB, Makarova TA, Shuba IM. Analysis of association FGB and eNOS3 genes polymorphisms with intracranial hemorrhagic and atherothrombotic ischemic stroke. Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2019;25(4):389-96. DOI: 10.37621/JNAMSU-2019-4-389-396.

The article was received on June 25, 2019  
For review, October 5, 2019  
Accepted for publication on November 23, 2019



## ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

**Цимбалюк Віталій Іванович** – головний науковий співробітник Відділення відновлювальної та функціональної нейрохірургії ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України», Президент НАМН України, д.м.н., проф., акад. НАМН України, чл.-кор. НАН України, ORCID: 0000-0001-7544-6603

**Васильєва Ірина Георгіївна** – начальник відділу нейробіохімії, к.б.н., ORCID: 0000-0003-4321-5354

**Костюк Михайло Романович** – старший науковий співробітник відділення патології судин голови та шиї, к.м.н., ORCID:0000-0002-6507-5914

**Чопик Наталія Григорівна** – провідної науковий співробітник відділу нейробіохімії, к.б.н., ORCID: 0000-0003-1024-1556

**Олексенко Наталія Павлівна** – старший науковий співробітник відділу нейробіохімії, ORCID: 0000-0002-3267-4961

**Галанта Олена Степанівна** – науковий співробітник відділу нейробіохімії, ORCID: 0000-0002-9902-9916

**Цюбко Ольга Іванівна** – науковий співробітник відділу нейробіохімії, ORCID: 0000-0003-0138-4643

**Макарова Тетяна Анатоліївна** – молодший науковий співробітник відділу нейробіохімії, ORCID: 0000-0001-5203-450X

**Дмитренко Анжела Борисівна** – молодший науковий співробітник відділу нейробіохімії, ORCID: 0000-0002-0141-3697

**Шуба Ірина Миколаївна** – старший науковий співробітник відділу нейробіохімії, ORCID:0000-0003-4385-4877



## INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Vitalii I. Tsymbaliuk** – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Cor. member of the NAS of Ukraine, Full member of the NAMS of Ukraine, President of the NAMS of Ukraine, Principal Research Fellow of the Department of Reconstructive and Functional Neurosurgery of Romodanov Neurosurgery Institute, ORCID: 0000-0001-7544-6603

**Iryna G. Vasylieva** – Cand. Sci. (Biology), Head of the Department of Neurobiochemistry, ORCID: 0000-0003-4321-5354

**Mykhaylo R. Kostiuk** – Cand. Sci. (Medicine), Senior Research Fellow of the Department of vascular pathology of the neck, head and spinal cord, ORCID:0000-0002-6507-5914

**Natalia G. Chopyk** – Cand. Sci. (Biology), Chief Researcher of the Department of Neurobiochemistry, ORCID: 0000-0003-1024-1556

**Natalia P. Oleksenko** – Senior Research Fellow of the Department of Neurobiochemistry, ORCID: 0000-0002-3267-4961


**Olena S. Galanta** – Researcher of the Department of Neurobiochemistry, ORCID: 0000-0002-9902-9916

**Olha I. Tsiubko** – Researcher of the Department of Neurobiochemistry, ORCID: 0000-0003-0138-4643

**Tetiana A. Makarova** – Junior Research Fellow of the Department of Neurobiochemistry, ORCID: 0000-0001-5203-450X

**Anzhela B. Dmytrenko** – Junior Research Fellow of the Department of Neurobiochemistry, ORCID: 0000-0002-0141-3697

**Iryna M. Shuba** – Senior Research Fellow of the Department of Neurobiochemistry, ORCID: 0000-0003-4385-4877

**Olena S. Galanta**   
ORCID: 0000-0002-9902-9916  
lenagalanta@gmail.com

## ВСТУП

Цереброваскулярні хвороби, до яких належать гострі порушення мозкового кровообігу, є другою після серцево-судинних захворювань причиною інвалідизації та смертності населення в Україні (приблизно 14 %) [1]. Згідно з проведеними з 2006 по 2015 рік дослідженнями щорічний приріст захворюваності становить 4 %. [2]. В Україні протягом перших 30 днів від початку захворювання помирають 30–40 % пацієнтів, а протягом року – 50 % [1].

Європейська організація інсульту (ESO) спільно з Європейським альянсом боротьби із інсультом (SAFE) підготувала план дій із боротьби з гострим порушенням мозкового кровообігу на період 2018–2030 роки. Одним із пріоритетних пунктів для досліджень та розробок є індивідуалізація стратегій первинної профілактики інсультів, підпунктом якої є урахування полігенетичних профілів людини [3]. Напрацювання масиву даних щодо генетичних маркерів ризику розвитку цього захворювання є актуальним напрямом діяльності наукових установ всього світу.

Особлива увага вчених приділяється визначенню ролі поліморфізмів генів, відповідальних за підтримку нормального тону судин та роботу системи коагуляції.

За норми ендотелій судин продукує протизгортаючі фактори та вазодилататори. При цьому клітини гладких м'язів не отримують сигналів до поділу та судина не потовщується. Під впливом пошкоджуючих агентів порушується цілісність ендотеліального шару та активується система коагуляції, синтезуються тромбогенні фактори та вазоконстриктори.

Основним фактором у підтримці судинного тону є оксид азоту (NO), який синтезується NO-синтазами за рахунок окислення L-аргініну. NO пригнічує білки родини транскрипційного фактору «каппа-бі» (NF- $\kappa$ B), що, своєю чергою, знижує експресію клітинами ендотелію судин молекул адгезії та запалення [4]. Ендотеліальна NO-синтаза (eNOS), яка конститутивно експресується клітинами ендотелію судин, є основним продуцентом оксиду азоту. Робота ферменту залежить не тільки від зовнішніх сигналів, а й від варіантів первинної структури ДНК гена, які обумовлюють його функціональні властивості. Клінічно значущими на сьогодні визнані поліморфізм G894T (rs1799983), T-786C (rs2070744) та поліморфізм змінного числа тандемних повторів (VNTR) у четвертому інтроні 4b/4a (rs61722009) ендотеліальної синтази 3 (eNOS3). В інтроні 4 гена eNOS3 розташований мінісателіт 4b/4a, який має два алеля. Аallel 4a містить чотири тандемних повтори, кожен з яких складається з 27 пар нуклеотидів, а аallel 4b – п'ять [5].

Важливим компонентом системи гемостазу є фібриноген – розчинний глікопротеїн плазми крові, який відіграє основну роль у першій фазі утворення тромбу, перетворюючись на нерозчинний фібрин. Порушення вмісту циркулюючого фібриногена може виявитись набутим або спадковим. Однією з причин спадкового порушення є зміна первинної структури ДНК через однонуклеотидні заміни. Для дослідження ми обрали одну із замін, яка суттєво впливає на синтез бета-ланцюга фібриногена. Заміна C-148T (rs1800787) гена бета фібриногена (FGB) підвищує рівень експресії гена та призводить до збільшення рівня фібриногена у плазмі крові [6].

Відомо, що розподіл вищезначених поліморфних генотипів має етнографічні особливості і наразі їх вклад у розвиток гострих порушень мозкового кровообігу серед українців лишається предметом дискусії. Тому метою дослідження стало з'ясування асоціації поліморфізмів генів бета фібриногена та ендотеліальної NO-синтази 3 із ризиком розвитку ішемічного атеротромботичного та інтракраніального геморагічного інсульту серед українців.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі було обстежено 102 хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт (65 чоловіків та 37 жінок) та 56 хворих на інтракраніальний геморагічний інсульт (39 чоловіків та 17 жінок), які перебували на лікуванні у відділенні патології судин голови та шиї або у відділенні нейрореабілітації державної установи «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України». До групи порівняння було включено 102 особи (62 чоловіки та 40 жінок), що не страждали на серцево-судинні захворювання, не мали близьких родичів, які перенесли гостре порушення мозкового кровообігу та показники ліпідного профілю яких перебували в межах норми. Середній вік пацієнтів –  $53,4 \pm 9,1$  рік, а осіб групи порівняння –  $54,5 \pm 8,2$  роки. Всі обстежені особи проживали на території України та належали до етнічної групи Caucasian. Дослідження проведено з дотриманням етичних принципів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини як об'єкта дослідження», конференції з гармонізації належної клінічної практики (ICH-GCP), дизайн погоджено з комісією з питань біоетики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України».

Критерії включення до групи випадків: наявність письмової інформованої згоди на участь у дослідженні, вік до 65 років та підтверджений за допомогою магнітнорезонансної томографії тип ГПМК.

Молекулярні дослідження проводилось у державній установі «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України» у відділі нейробіохімії (Сертифікат визнання вимірювальних можливостей № ПТ-321/19 від 30.07.2019 р. до 29.07.2021 р.).

Геномну ДНК виділяли зі зразків крові сорбентним методом з використанням набору «ДНК-сорб-Б» (AmpliSens, Росія). Однонуклеотидні поліморфізми G894T (rs1799983), T-786C (rs2070744) та C-148T (rs 1800787) гена FGB типували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшою рестрикцією ампліфікованих фрагментів, а поліморфізм 4b/4a гена eNOS3 визначали аallel-специфічною ПЛР. Для виконання роботи використовували тест-набори, розроблені Укр ПП ЛПБ LabNeogen P.C. (Україна) та рестриктази MspI, BanII та HindIII виробництва Thermo Fisher Scientific (США).

Частоти розподілу генотипів у групах перевіряли на відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга за допомогою електронного ресурсу WpCalc Equilibrium Hardy-Weinberg [<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg>].

Аналіз асоціації генотипів із розвитком захворювання оцінювали за значенням співвідношення шансів (Odds

**ТАБЛИЦЯ 1 / TABLE 1**

АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ FGB ТА ENOS3 ІЗ РИЗИКОМ РОЗВИТКУ ІШЕМІЧНОГО АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІНСУЛЬТУ ЗА ВІДНОШЕННЯМ ШАНСІВ (OR; 95 % CI) / ANALYSIS OF ASSOCIATION FGB AND ENOS3 GENES POLYMORPHISMS WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE RISK WITH ODDS RATIO (OR; 95 % CI)

Поліморфізм / Polymorphism	Модель аналізу / Model	Інсульт / cases, n	Контроль / controls, n	$\chi^2$ df = 1	p	OR (95 % CI)	
eNOS3 G894T	<b>Кодомінантна / Codominant</b>						
	GG	46	57			1	
	GT	51	37	3,356	0,067	1,708 (0,962–3,034)	
	TT	5	8	0,180	0,672	0,774 (0,237–2,528)	
	<b>Домінантна / Dominant</b>						
	GG	46	57	2,543	0,124	1,542	
	GT+TT	56	45			(0,888–2,679)	
	<b>Рецесивна / Recessive</b>						
	TT	5	8	0,739	0,390	0,606	
	GG+GT	97	94			(0,191–1,989)	
	<b>Мультиплікативна / Multiplicative</b>						
	G	143	151	0,779	0,378	1,215	
	T	61	53			(0,788–1,814)	
	eNOS3 T-786C	<b>Кодомінантна / Codominant</b>					
		TT	57	43			1
TC		38	46	2,529	0,112	0,623 (0,347–1,118)	
CC		7	13	3,241	0,072	0,406 (0,149–1,105)	
<b>Домінантна / Dominant</b>							
TT		57	43	3,845	0,050	0,575	
TC+CC		45	59			(0,331–1,002)	
<b>Рецесивна / Recessive</b>							
CC		7	13	1,996	0,158	0,504	
TT+TC		95	89			(0,193–1,322)	
<b>Мультиплікативна / Multiplicative</b>							
T		152	132	4,638	0,032	0,627	
C		52	72			(0,410–0,960)	

Поліморфізм / Polymorphism	Модель аналізу / Model	Інсульт / cases, n	Контроль / controls, n	$\chi^2$ df = 1	p	OR (95 % CI)	
eNOS3 4b/4a	<b>Кодомінантна / Codominant</b>						
	4b/4b	78	88			1	
	4b/4a	20	12	2,582	0,109	1,880 (0,864–4,093)	
	4a/4a	4	2	–	–	НО	
	<b>Домінантна / Dominant</b>						
	4b/4b	78	88	3,234	0,073	1,934	
	4b/4a+4a/4a	24	14			(0,936–3,998)	
	<b>Рецесивна / Recessive</b>						
	4a/4a	4	2	–	–	НО	
	4b/4b+4b/4a	98	100				
	<b>Мультиплікативна / Multiplicative</b>						
	4b	176	188	3,668	0,056	1,215	
	4a	28	16			(0,788–1,874)	
	FGB C-148T	<b>Кодомінантна / Codominant</b>					
		CC	45	66	–	–	1
CT		45	29	7,303	0,007	2,276 (1,248–4,152)	
TT		12	7	3,371	0,067	2,514 (0,919–6,877)	
<b>Домінантна / Dominant</b>							
CC		45	66	8,715	0,004	2,322	
CT+TT		57	36			(1,322–4,080)	
<b>Рецесивна / Recessive</b>							
TT		12	7	1,451	0,229	1,810	
CC+CT		90	95			(0,682–4,801)	
<b>Мультиплікативна / Multiplicative</b>							
C		135	161	8,319	0,004	1,914	
T		69	43			(1,227–2,984)	

НО – не обраховувалось: розрахунок не проводився через недостатню для статистичної обробки кількість випадків / NC – not calculated: calculation was not carried due to small group size for statistic analysis; CI-довірчий інтервал / CI-confidence interval

Ratio) із 95 % довірчим інтервалом (CI-confidence interval) за допомогою електронного ресурсу Odds Ratio calculator [https://www.medcalc.net/statisticaltests/odds\_ratio.php].

Статистичну значимість оцінювали за критерієм  $\chi^2$  Пірсона [https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/default2.aspx].

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Розподіл генотипів усіх досліджуваних поліморфізмів, окрім VNTR гена eNOS3, статистично достовірно відповідав очікуваному за законом про рівновагу популяції Харді-Вайнберга ( $p > 0,05$ ). Низьке вивлення генотипу 4a4a заважає отриманню статистично достовірного збігу очіку-

ваного розподілу та розподілу, який спостерігається для поліморфізму VNTR гена eNOS3, що має бути перевірено на більшій кількості випадків.

Для оцінки генетичного ризику розвитку гострих порушень мозкового кровообігу було обрано усі існуючі моделі обрахунку (таблиця 1 та таблиця 2).

Аналіз виявив достовірну асоціацію між генотипом -148CT поліморфізму гена FGB та ризиком розвитку ішемічного інсульту у кодомінантній, доміантній та мультиплікативній моделі. Аналіз рецесивної моделі також підтвердив значущість гомозиготного генотипу -148TT, але через низьку його виявленість статистична значущість результату має бути підтверджена у дослідженнях з більшою кількістю випадків.

**ТАБЛИЦЯ 2 / TABLE 2**

АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ FGB ТА ENOS3 ІЗ РИЗИКОМ РОЗВИТКУ ІНТРАКРАНІАЛЬНОГО ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ЗА ВІДНОШЕННЯМ ШАНСІВ (OR; 95 % CI) / ANALYSIS OF ASSOCIATION FGB AND ENOS3 GENES POLYMORPHISMS WITH INTRACRANIAL HEMORRHAGIC STROKE RISK WITH ODDS RATIO (OR; 95 % CI)

Поліморфізм / Polymorphism	Модель аналізу / Model	Інсульти / Cases, n	Контроль / Controls, n	$\chi^2$ df = 1	p	OR (95 % CI)
eNOS3 G894T	<b>Кодомінантна / Codominant</b>					
	GG	32	57			1
	GT	20	37	0,011	0,915	0,963 (0,480–1,930)
	TT	4	8	0,180	0,032	0,891 (0,249–3,190)
	<b>Домінантна / Dominant</b>					
	GG	32	57	0,023	0,879	0,950
	GT+TT	24	45			(0,492–1,834)
	<b>Рецесивна / Recessive</b>					
	TT	4	8	0,025	0,874	0,904
	GG+GT	52	94			(0,260–3,146)
	<b>Мультиплікативна / Multiplicative</b>					
	G	84	151	0,036	0,849	0,950
T	28	53			(0,559–1,613)	
eNOS3 T-786C	<b>Кодомінантна / Codominant</b>					
	TT	24	43			1
	TC	22	46	0,081	0,671	0,857 (0,420–1,747)
	CC	10	13	0,427	0,514	1,378 (0,526–3,613)
	<b>Домінантна / Dominant</b>					
	TT	24	43	0,007	0,933	0,972
	TC+CC	32	59			(0,503–1,879)
	<b>Рецесивна / Recessive</b>					
	CC	10	13	0,760	0,384	1,488
	TT+TC	46	89			(0,606–3,653)
	<b>Мультиплікативна / Multiplicative</b>					
	T	132	132	0,153	0,697	1,100
C	72	72			(0,682–1,775)	
FGB C-148T	<b>Кодомінантна / Codominant</b>					
	4b/4b	38	88			1
	4b/4a	13	12	4,449	0,035	2,509 (1,049–6,000)
	4a/4a	5	2	–	–	НО
	<b>Домінантна / Dominant</b>					
	4b/4b	38	88	7,592	0,006	2,977
	4b/4a+4a/4a	18	14			(1,344–6,596)
	<b>Рецесивна / Recessive</b>					
	4a/4a	5	2	4,145	0,042	4,902
	4b/4b+4b/4a	51	100			(0,919–26,149)
	<b>Мультиплікативна / Multiplicative</b>					
	4b	89	188	10,767	0,002	3,037
4a	23	16			(1,529–6,030)	
FGB C-148T	<b>Кодомінантна / Codominant</b>					
	CC	36	66		–	1
	CT	15	29	0,020	0,889	0,948 (0,451–1,995)
	TT	5	7	0,189	0,664	1,310 (0,388–4,424)
	<b>Домінантна / Dominant</b>					
	CC	36	66	0,003	0,958	1,019
	CT+TT	20	36			(0,516–2,012)
	<b>Рецесивна / Recessive</b>					
	TT	5	7	0,220	0,640	1,331
	CC+CT	51	95			(0,402–4,404)
	<b>Мультиплікативна / Multiplicative</b>					
	C	87	161	0,066	0,798	1,076
T	25	43			(0,616–1,879)	

НО – не обраховувалось: розрахунок не проводився через недостатню для статистичної обробки кількість випадків / NC – not calculated: calculation was not carried due to small group size for statistic analysis; CI-довірчий інтервал / CI-confidence interval

Різниця частоти виявлення генотипів, що містять мінорний алель поліморфізмів G894T та 4b4a гена eNOS3, була наближена до статистично достовірної серед хворих на ішемічний інсульт атеротромботичного підтипу та осіб групи порівняння. А для поліморфізму T-786C спостерігалась протилежна тенденція. Турецькі вчені, досліджуючи ішемічний інсульт, отримали аналогічні результати. Так, алель ризику С поліморфізму T-786C гена ендотеліальної NO-синтази 3 у групі пацієнтів виявлявся статистично значуще рідше, ніж у групі порівняння (OR = 0,605, CI 95 % (0,42–0,86); P < 0,006), а наявність алелю 4a у 2,7 раза збільшувала ризик розвитку ішемічного інсульту. Проте розподіл генотипів поліморфізму G894T

між групами не відрізнявся [7]. Поясненням меншої зустрічальності алелю ризику -786C у хворих на атеротромботичний інсульт може бути те, що носії цього алелю не відповідають на динамічне напруження зсуву (fluid sheer stress), яке виникає при атеротромботичному ураженні судин. На культурі клітин було показано, що на відміну від клітин-носіїв алелю -786T, у гомозиготних клітин-носіїв алелю -786C при напруженні зсуву експресія гена eNOS3 не стимулюється, але при цьому, за рахунок невідомих чинників, знижується деградація NO [8]. Автори іншої роботи показали, що напруження зсуву стимулює експресію SOD2 клітинами носіями -786C алелю, що захищає ці клітини від оксидативного стресу та, вірогідно, відтермінує розвиток кардіоваскулярних захворювань

серед його гомозиготних носів [9]. Отриманий результат потребує подальшого дослідження з метою з'ясування, чи зможе запобігти наявності варіантного алелю розвитку ішемічного інсульту в осіб, які вже мають атеротромботичне ураження судин, та чому активація SOD2 – опосередкованого антиоксидантного захисту запобігає розвитку ішемічного але не геморагічного інсульту.

Для інтракраніального геморагічного інсульту достовірним фактором ризику стала наявність мінорного алелю 4a. Варто зауважити, що поліморфізм 4b/4a гена eNOS3 асоціюється з ішемічним атеротромботичним інсультом, проте асоціація виявляється як тенденція, що не досягла статистичного значення. Механізм функціональної реалізації такого генотипу повністю невідомий. Вважається, що зайвий повтор у 27 нуклеотидів збільшує кількість мікро РНК, що інтерферують з матричною РНК та знижують рівень експресії гена [10]. Наслідком стає зниження вмісту оксиду азоту у плазмі крові та

підвищення тиску. Можливо, разом з іншими чинниками, такими як дія металопротеїназ та проапоптотичних білків, це стає причиною розриву судини. У будь-якому разі виявлення патологічного алелю 4a гена eNOS3 є приводом корекції способу життя задля запобігання розвитку захворювання.

Аналіз комбінації генотипів показав, що спільний ефект двох поліморфізмів дещо відрізнявся від індивідуального ефекту кожного поліморфізму окремо (таблиці 3, 4, 5).

Наявність комбінації гетерозиготних генотипів збільшувала ризик розвитку ішемічного інсульту атеротромботичного підтипу на 20 % (таблиця 3). Збільшення ризику розвитку ішемічного інсульту при наявності мінорних алелей поліморфізмів G894T гена eNOS3 та C-148T гена FGB до цього часу не було висвітлено у доступних для аналізу наукових літературних джерелах. На нашу думку, отриманий ефект пов'язаний

### ТАБЛИЦЯ 3 / TABLE 3

АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ КОМБІНАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ C-148T ГЕНА FGB ТА G894T ГЕНА ENOS3 З РИЗИКОМ РОЗВИТКУ ІШЕМІЧНОГО АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ТА ІНТРАКРАНІАЛЬНОГО ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ЗА ВІДНОШЕННЯМ ШАНСІВ (OR; 95 % CI) / ANALYSIS OF ASSOCIATION C-148T FGB AND G894T ENOS3 GENES POLYMORPHISMS COMBINATION WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE AND INTRACRANIAL HEMORRHAGIC STROKE RISK WITH ODDS RATIO (OR;95%CI)

Група / Group	FGB C-148T	eNOS3 G894T		
		GG	GT	TT
		OR 95 % CI		
Ішемічний інсульт / Ischemic stroke	CC	1	1,826(0,822–4,059)	HO
	CT	2,360(0,999–5,578)	2,943 (1,250–6,929)*	HO
	TT	2,319(0,476–11,285)	3,478(0,943–12,830)	HO
Геморагічний інсульт / Hemorrhagic stroke	CC	1	1,316(0,540–3,250)	1,260(0,0,274 –5,803)
	CT	1,575(0,571–4,347)	0,900(0,301–2,689)	HO
	TT	2,100(0,389–11,342)	1,050(0,177–6,226)	HO

HO – не обраховувалось: розрахунок не проводився через недостатню для статистичної обробки кількість випадків / NC – not calculated: calculation was not carried due to small group size for statistic analysis; CI-довірчий інтервал / CI-confidence interval; \* p<0,05

### ТАБЛИЦЯ 4 / TABLE 4

АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ КОМБІНАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ C-148T ГЕНА FGB ТА T-786C ГЕНА ENOS3 З РИЗИКОМ РОЗВИТКУ ІШЕМІЧНОГО АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ТА ІНТРАКРАНІАЛЬНОГО ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ЗА ВІДНОШЕННЯМ ШАНСІВ (OR;95 % CI)/ ANALYSIS OF ASSOCIATION C-148T FGB AND T-786C ENOS3 GENES POLYMORPHISMS COMBINATION WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE AND INTRACRANIAL HEMORRHAGIC STROKE RISK WITH ODDS RATIO (OR;95%CI)

Група / Group	FGB C-148T	eNOS3 T-786C		
		TT	TC	CC
		OR 95 % CI		
Ішемічний інсульт / Ischemic stroke	CC	1	0,586(0,261–1,316)	0,182(0,037–0,902)*
	CT	2,300(0,916–5,772)	1,000(0,421–2,374)	2,500 (0,444–14,068)
	TT	1,143(0,362–3,613)	HO	HO
Геморагічний інсульт / Hemorrhagic stroke	CC	1	0,697(0,290–1,675)	0,525(0,144–1,953)
	CT	0,722(0,211–2,472)	0,340(0,098–1,179)	HO
	TT	0,206(0,023–1,825)	HO	HO

HO – не обраховувалось: розрахунок не проводився через недостатню для статистичної обробки кількість випадків / NC – not calculated: calculation was not carried due to small group size for statistic analysis; CI-довірчий інтервал / CI-confidence interval; \* p<0,05

ТАБЛИЦЯ 5 / TABLE 5

АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ КОМБІНАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМІВ C-148Т ГЕНА FGB ТА 4В/4А ГЕНА ENOS3 ІЗ РИЗИКОМ РОЗВИТКУ ІШЕМІЧНОГО АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ТА ІНТРАКРАНІАЛЬНОГО ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ЗА ВІДНОШЕННЯМ ШАНСІВ (OR; 95 % CI) / TABLE 5. ANALYSIS OF ASSOCIATION C-148T FGB AND 4B/4A VNTR ENOS3 GENES POLYMORPHISMS COMBINATION WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE AND INTRACRANIAL HEMORRHAGIC STROKE RISK WITH ODDS RATIO (OR;95%CI)

Група / Group	FGB C-148T	eNOS3 4b/4a		
		4b4b	4b4a	4a4a
		OR 95 % CI		
Ішемічний інсульт / Ischemic stroke	CC	1	1,135(0,364–3,539)	НО
	CT	1,998(1,027–3,856)*	3,784(1,104–12,967)*	НО
	TT	1,730(0,578–5,176)	НО	НО
Геморагічний інсульт / Hemorrhagic stroke	CC	1	2,240(0,755–6,646)	НО
	CT	0,896(0,315–2,143)	1,680(0,350–8,071)	НО
	TT	0,960(0,229–4,021)	НО	НО

НО – не обраховувалось; розрахунок не проводився через недостатню для статистичної обробки кількість випадків / NC – not calculated: calculation was not carried due to small group size for statistic analysis; CI – довірчий інтервал / CI – confidence interval; \*  $p < 0,05$

із нітруванням фібриногена пероксинітрином, яке призводить до прискореного утворення фібринового згустку, змінює його архітектуру та ускладнює лізис плазміном [11]. Утворення пероксинітриду відбувається при взаємодії NO з O<sub>2</sub>- при знаходженні їх в еквівалентній кількості. Але лімітуючим фактором та запобіжником його утворення є вищий рівень оксиду азоту при нормальному його виробництві ендотелієм [12]. Наявність поліморфізму G894T гена eNOS3 знижує цей рівень і, вірогідно, сприяє утворенню пероксинітриду. Отриманий результат може стати темою окремого дослідження.

Для інтракраніального геморагічного інсульту ні окремі генотипи поліморфізмів G894T гена eNOS3 та C-148T гена FGB, ні їхні комбінації не асоціювались із ризиком захворювання.

При дослідженні комбінованого ефекту поліморфізмів T-786C гена eNOS3 та C-148T гена FGB було отримано протилежний результат (таблиця 4). Комбінація генотипів -786CC гена eNOS3 та -148CC гена FGB продемонструвала статистично значущий протекторний вплив. Поясненням може бути знижений ризик тромбоутворення у носіїв генотипу -148CC, який у комбінації нечутливості носіїв -786CC генотипу до напруження зсуву знижує ризик розвитку ішемічного інсульту атеротромботичного підтипу.

Неочікуваний ефект було отримано при аналізі асоціації комбінації поліморфізму у тандемних повторях варіабельної кількості 4b/4a гена eNOS3 та C-148T гена FGB із розвитком порушень мозкового кровообігу (таблиця 5). У монолокусному аналізі наявність мінорного алелю 4a гена eNOS3 достовірно асоціювалась із ризиком розвитку інтракраніального геморагічного інсульту, а -148T гена FGB – ішемічного атеротромботичного. Комбінація генотипів, що мають мінорні алелі, на 30 % збільшує ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту і, навпаки, знижує ризик для інтракраніального геморагічного (статистично реєструється як тенденція).

Можна вважати, що при зниженні рівня оксиду азоту у плазмі крові зменшується антиапоптотична дія NO. В осіб, схильних до тромбозу судин через наявність поліморфізму C-148T гена FGB [13] і які вже мають атеросклеротичні бляшки, може відбуватися прискорений апоптоз гладенько-м'язових клітин серцевини бляшки [14]. Це дестабілізує її та може спровокувати тромбоз судини й ішемічний інсульт. Вочевидь, цей феномен відображається і в збільшенні ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту при комбінації генотипів 894GT гена eNOS3 та -148CT гена FGB.

Результати роботи показали, що існують генетичні особливості розвитку різних типів інсультів. Позитивна динаміка зниження смертності від серцево-судинних захворювань в європейських країнах певною мірою обумовлена вжиттям заходів з їх первинної та вторинної профілактики. Тому генетичне обстеження до маніфестації хвороби, надто у разі спадкового обтяження, є необхідним заходом попередження розвитку гострих порушень мозкового кровообігу.

## ВИСНОВКИ

1 Наявність алеля ризику -148T поліморфізму C-148T гена FGB асоціюється з ризиком розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту, як показали домінантна та мультиплікативна моделі обрахунку.

2 Наявність алеля ризику 4a поліморфізму VNTR 4b/4a гена eNOS3 асоціюється з ризиком розвитку інтракраніального геморагічного інсульту, як показали кодомінантна, домінантна та мультиплікативна моделі обрахунку.

3 Комбінація генотипів 894GT та 4b/4a гена eNOS3 із генотипом -148CT гена FGB збільшує, а комбінація генотипу -148CC гена FGB із генотипом -786CC гена eNOS3 зменшує ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ / REFERENCES

- Zozulia IS, Volosovets AO, Zozulia AI. Organisation and care in acute disorders of cerebral circulation in the prehospital and hospital stages [Internet]. Ukr. Med. Chasopys 2016; 4(114). VII/VIII:24–8. Available from: <http://www.umj.com.ua> [Ukrainian].
- Pedachenko EH, Huk AP, Nykyforova AN. Neurosurgical care in cerebrovascular diseases in Ukraine. Analysis of statistical data of neurosurgical service. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2017;(1):33–9 [Russian].
- Norrving B, Barrick J, Davalos A, Dichgans M, Cordonnier C, Guekht A et al. Action Plan for Stroke in Europe 2018–2030. Eur Stroke J. 2018;3(4):309–36. DOI: 10.1177/2396987318808719.
- Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the CENICA study. J of the Am Coll of Cardiol. 2003 Mar 19; 41(16):930–7. DOI: 10.1016/S0735-1097(02)03012-7.
- AlFadhli S. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene intron-4 27bp repeat polymorphism on its expression in autoimmune diseases. Dis. Markers. 2013;34(5):349–56. DOI: 10.3233/DMA-130983.
- Maliarchuk IV, Horovenko NH, Babochkina AR, Osypenko NS. Investigation of C148T polymorphism of fibrinogen beta-chain gene on warfarin dosing. Circulation and haemostasis. 2014;1–2:115–8. [Ukrainian].
- Anliacik SO, Tokgoz S, Zamani AG, Yildri M. Investigation of the relationship between ischemic stroke and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms [G894T, intron 4 VNTR and T-786C] Turkish J. of Med. Sciences. 2019 March;49(2):589–94. DOI: 10.3906/sag-1808-57.
- Asif AR, Oellerich M, Armstrong VW, Hecker M, Cattaruzza M. T-786C polymorphism of the nos-3 gene and the endothelial cell response to fluid shear stress – a proteome analysis. J. Proteome Res. 2009 Jun;8(6):3161–8. DOI: 10.1021/pr800998k.
- Asif AR, Hecker M, Cattaruzza M. Distribution of SOD-2 expression to compensate for a genetically determined NO deficit in Endothelial cells-brief report Artheroscler Tromb Vasc Biol. 2009 Nov;29:1890–3. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.190678.
- Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Chen L et al. Effect of 27nt small RNA on endothelial Nitric-oxide synthase expression. Mol Biol Cell. 2008;19(9):3997–4005. DOI: 10.1091/mbc.E07-11-1186.
- Ponczek MB, Bijak M, Saluk J, Kolodziejczyk-Czepas J, Nowak P. The comparison of peroxynitrite action on bovine, porcine and human fibrinogens. Cent Eur J Biol. 2014 March;9(3):233–41. DOI: 10.2478/s11535-013-0259-9.
- Jourd D, Jourd F, Kutchukian PS, Musah RA, Wink DA, Grisham MB. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo. JBC. 2001 May 23;276(31):28799–805. DOI: 10.1074/jbc.M102341200.
- Zoppo J, Levy DE, Wasiewski WW, Paucioli AM, Demchuk AM, Trammel J et al. Hyperfibrinogenemia and functional outcome from acute ischemic stroke. Stroke. 2009. May;40(5):1687–91. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.527804.
- Dosenko VYe, Zahorii VYu, Moibenko OO, Parkhomenko OM. Pathophysiological aspects of endothelial NO-synthase genetic polymorphism. Fiziologichnyi Zhurnal. 2002;48(6): 86–100.[Ukrainian].



## РЕЗЮМЕ

## Анализ ассоциации полиморфизмов генов FGB и eNOS3 с риском развития интракраниального геморрагического и атеротромботического ишемического инсультов

**В. И. Цимбалюк, И. Г. Васильева, М. Р. Костюк, Н. Г. Чопик, Е. С. Галанта, О. И. Цюбко, Н. П. Олексенко, А. Б. Дмитренко, Т. А. Макарова, И. Н. Шуба**

Государственное учреждение «Институт нейрохирургии им. А. П. Ромоданова НАМН Украины», ул. Платона Майбороды, 32, Киев 04050, Украина

Европейская организация инсульта (ESO) и Европейский альянс борьбы с инсультом (SAFE) в плане действий на период 2018–2030 годы одним из приоритетов исследований и разработок обозначили учет полигенетических профилей человека. Полиморфизмы генов NO-синтазы 3 (eNOS3) и бета фибриногена (FGB) имеют клиническое значение для развития сердечно-сосудистых заболеваний, а их распределение отражает этнические особенности.

**Цель работы:** исследовать ассоциацию полиморфизмов T-786C, G894T, 4b/4a VNTR гена eNOS3 и полиморфизма C-148T гена FGB с риском развития ишемического атеротромботического и интракраниального геморрагического инсультов.

**Материалы и методы.** В работе было обследовано 102 больных с ишемическим атеротромботическим инсультом и 56 больных с интракраниальным геморрагическим инсультом. В группу сравнения были включены 102 человека. Наличие однонуклеотидных замен определяли методом полимеразной цепной

реакции (ПЦР) с последующей рестрикцией, а полиморфизм переменного числа tandemных повторов (VNTR) гена eNOS3 – алельспецифической ПЦР.

**Результаты.** Полиморфизм C-148T гена FGB ассоциировался с риском развития ишемического атеротромботического инсульта, как показали доминантная (OR = 2,276; 95 % CI:1,298–4,152) и мультипликативная (OR = 2,322; 95 % CI:1,322–4,080) модели анализа. Полиморфизм 4b/4a VNTR гена eNOS3 ассоциировался с риском развития интракраниального геморрагического инсульта, как показали кодоминантная (OR = 2,509; 95% CI:1,049–4,080), доминантная (OR = 2,977; 95 % CI:1,344–6,596) и мультипликативная (OR = 3,037; 95 % CI:1,529–6,030) модели анализа. Комбинация генотипов 894GT та 4b/4a гена eNOS3 с генотипом -148CT гена FGB увеличивала, а комбинация генотипа -148CC гена FGB с генотипом -786CC гена eNOS3 уменьшала риск развития ишемического атеротромботического инсульта.

**Выводы.** Генетическое обследование до манифестации болезни, особенно при наследственном отягощении, может стать существенным инструментом при разработке индивидуальных профилактических мероприятий, направленных на предупреждение острых нарушений мозгового кровообращения.

**Ключевые слова:** полиморфизм, бета фибриноген, NO-синтаза 3, ишемический инсульт, геморрагический инсульт.

**Для цитирования:** Цимбалюк ВИ, Васильева ИГ, Костюк МР, Чопик НГ, Галанта ЕС, Цюбко ОИ, Олексенко НП, Дмитренко АБ, Макарова ТА, Шуба ИН. Анализ ассоциации полиморфизмов генов FGB и eNOS3 с риском развития интракраниального геморрагического и атеротромботического ишемического инсультов. Журнал Национальной академии медицинских наук Украины. 2019;25(4):389–96. DOI: 10.37621/JNAMSU-2019-4-389-396.

Статья поступила в редакцию 25 июня 2019 | Направлена на рецензирование 5 октября 2019 | Принята в печать 23 ноября 2019