© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 617.723/.735/.747-007.17-092:[612.6.05:577.21

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЭНДОТЕЛИНА-1 (*Lys198Asn*) У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ВИТРЕОХОРИОРЕТИНАЛЬНОЙ ДИСТРОФИЕЙ В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ

С.В. Серебренникова, **А.А. Петров**, **Ю.А. Витковский**, доктор медицинских наук, профессор
Читинская государственная медицинская академия
E-mail: ssv1903@mail.ru

Представлены результаты исследования полиморфизма гена эндотелина-1 (Lys198Asn) у больных с периферической витреохориоретинальной дистрофией (ПВХРД) русской и бурятской национальности в Забайкальском крае. Выявлено, что в представленных этнических группах частота аллели Asn выше среди пациентов с ПВХРД, чем у здоровых (p<0,05). Аллель Asn гена EDN1Lys198Asn чаще выявляли у пациентов с разрывами и отслойками сетчатки, чем с другими типами ПВХРД (p<0,05). Распределение частоты аллельных вариантов Lys и Asn в русской и бурятской этнических группах не различалось.
Ключевые слова: *полиморфизм, аллель, эндотелин-1 (Lys198Asn), периферическая витреохориоретинальная дистрофия*

ENDOTHELIN-1 (LYS198ASN) GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH PERIPHERAL VITREORETINAL DEGENERATION IN TRANSBAIKALIA

S.V. Serebrennikova, A.A. Petrov, Yu.A. Vitkovsky
State medical academy, Chita, Russian Federation

The results of the study of endothelin-1(Lys198Asn) polymorphism in Transbaikalia region in patients of russian and buryat nationality with peripheral vitreoretinal degeneration are presented. In patients the frequency of Asn-allele is higher than in healthy cases (p<0,05). In patients with peripheral breaks of retinal and retinal detachment the rate of Asn-allele is higher than in cases with other type of peripheral vitreoretinal degeneration (p<0,05). Prevalence of Lys-allele and Asn-allele in russian and buryat population did not differ.
Key words: *polymorphism, allele, endothelin-1 (Lys198Asn), peripheral vitreochoreoretinal degeneration*

ВВЕДЕНИЕ

Периферическая витреохориоретинальная дистрофия (ПВХРД) – группа заболеваний, которая характеризуется различными дегенеративными изменениями сетчатки крайних отделов глазного дна и встречается у пациентов с различными видами рефракции. Наличие опасных видов ПВХРД является основной причиной развития отслойки сетчатки, частота которой в общей популяции достигает 10–15 случаев на 100 тыс. населения [3, 9]. Отслойка сетчатки остается значимой медико-социальной проблемой, поскольку большинство пациентов с данной патологией – люди трудоспособного возраста [3].

Основными патогенетическими факторами формирования и прогрессирования ПВХРД являются ретинальная гипоксия и снижение метаболизма сетчатки вследствие ухудшения гемодинамики и микроциркуляции в глазу, а также растяжения ее склеральной капсулы [3, 9]. Большое значение в указанных процессах играют факторы, регулирующие тонус сосудов: эндотелин, оказывающий вазоконстрикторное действие на сосуды, и вазодилататор – оксид азота. Возможно, нарушение баланса эндогенных регуляторов ангиогенеза и вазотоников способно привести к нарушению микроциркуляции в глазу.

Эндотелин-1 (ЭТ-1) – самый мощный вазоконстрикторный фактор, основными активаторами синтеза которого является гипоксия и локальная ишемия. ЭТ-1 усиливает продукцию цитокинов и тем самым инициирует локальный воспалительный процесс [2, 5, 6, 8, 12]. Поскольку ЭТ-1 действует преимущественно местно, логично предположить, что повышение его образования и поступления в кровь и слезную жидкость может быть причиной возникновения и усугубления тяжести течения глазных заболеваний.

Достоверные маркеры для оценки предрасположенности человека к развитию ПВХРД, а также для определения прогноза заболевания сегодня отсутствуют, что объясняет повышенный интерес к изучению генетических факторов риска развития данной патологии. Количество и типы генов, изменяющих течение болезни, могут быть не одинаковыми в различных этнических группах [1, 4, 13], поэтому важно выявить генетические критерии для прогнозирова-

ния течения и прогрессирования ПВХРД среди населения в этническом аспекте.

Целью данной работы было изучение частоты встречаемости аллельных вариантов гена ЭТ-1 (*EDN1Lys198Asn*) у здоровых и пациентов с ПВХРД среди представителей русской и бурятской национальности в Забайкальском крае.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методом сплошной выборки обследован 71 пациент с ПВХРД (55 женщин и 16 мужчин), проживающих на территории Забайкальского края. Средний возраст больных составил 29±4,6 года. Все пациенты с ПВХРД были разделены на 2 этнические группы: 1-я – 40 пациентов (31 женщины и 9 мужчин) русской национальности, 2-я – 31 пациент (24 женщины и 7 мужчин) бурятской национальности. Данные об этнической принадлежности выясняли путем опроса, включая указания на национальную принадлежность предков до III поколения.

У пациентов русской национальности выявлены следующие типы ПВХРД: ретинальные разрывы (у 16), «классическая решетка» (у 10), дистрофия типа «след улитки» (у 6), снежковидная дистрофия (у 2), отслойка сетчатки (у 6). При обследовании пациентов бурятской национальности обнаружены: ретинальные разрывы (у 12), отслойка сетчатки (у 4), дистрофия «след улитки» (у 8), снежковидная дистрофия (у 4) и патологическая пигментация (у 3).

Контрольную группу составили обследованные (n=71; 46 женщин и 25 мужчин) без ПВХРД, в возрасте 27±5,8 года. Они также были разделены на 2 этнические группы: 1-я – 40 обследованных русской национальности (24 женщины и 16 мужчин), 2-я – 31 бурят (22 женщины и 9 мужчин).

Всем испытуемым проводилось офтальмологическое обследование, включавшее визометрию (без коррекции или с коррекцией), биомикроскопию переднего отдела глаза, биомикроофтальмоскопию (в условиях мидриаза) с помощью контактной 3-зеркальной линзы Гольдмана. Для молекулярно-генетического исследования выбрана точка мутации ЕТ-1 в позиции 198 (Lys>Asn). ДНК выделяли из цельной крови и буккального эпителия. Амплификацию проводили в термоцикле модели 110 (ООО «Биоком», Москва). В работе использованы стандартные наборы праймеров НПФ «Литех» – «SNP-экспресс». Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромида этидия.

Полученные данные подвергали статистической обработке и анализу с помощью программы Statistika for Windows Version 6,0 и электронных таблиц Microsoft Excel, версия XP. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p<0,05$. Для сравнения частоты и групп по качественному бинарному признаку применяли критерий χ^2 (Пирсона). Генотипы обследованных проверяли на соответствие закону Харди–Вайнберга. Вычисляли относительный риск (ОР) заболеваемости и отношение шансов (ОШ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования частоты полиморфизма *EDN1Lys198Asn* в этнических группах представлены в таблице. Распределение генотипов этой мутации во всех группах соответствовало соотношению Харди–Вайнберга.

У обследованных русской национальности отсутствовала значимая разница в частоте генотипов между больными и здоровыми. Относительный риск развития ПВХРД в группе русских носителей аллели Asn оказался в 3,7 раза выше, чем у носителей аллели Lys (ОШ=7,2).

Следует отметить, что из 31 пациента бурятской национальности с ПВХРД 25 (80,6%) были носителями мутантного варианта гена *EDN1Lys198Asn*, из них 10 (32,3%) – в гомозиготном состоянии. В бурятской этнической группе относительный риск развития ПВХРД среди носителей Asn-аллели гена *EDN1Lys198Asn* оказался в 4,9 раз выше, чем среди носителей Lys-аллели (ОШ=8,6).

Частота встречаемости аллели Lys и мутантной аллели Asn у пациентов с ПВХРД по сравнению со здоровыми обследованными в русской и бурятской этнических группах представлены на рисунке.

Установлено, что из 12 бурят с разрывом сетчатки 10 являлись носителями мутантной аллели Asn. В русской этнической группе из 16 пациентов с ретинальными разрывами аллель Asn обнаружена у 12.

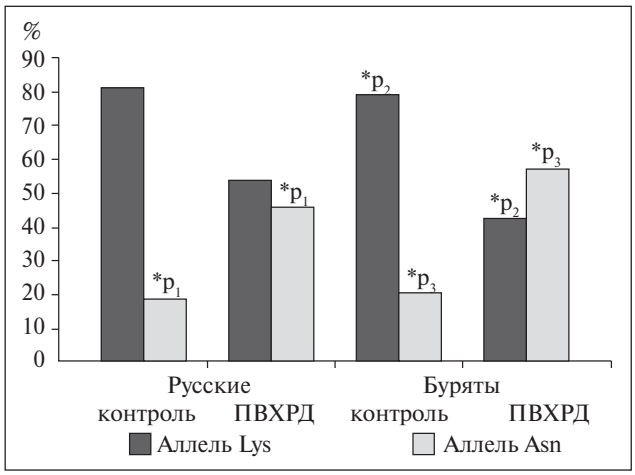
У всех 10 пациентов с отслойкой сетчатки русской и бурятской национальности выявлена мутантная аллель Asn, при этом у 4 пациентов – в гомозиготном состоянии. Аллель Asn гена *EDN1Lys198Asn* в представленных этнических группах встречалась чаще у пациентов с разрывами и отслойкой сетчатки, чем с другими типами ПВХРД ($p<0,05$).

При сравнении распространенности аллельных вариантов гена *EDN1Lys198Asn* между контрольными

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ *EDN1Lys198Asn* У ОБСЛЕДОВАННЫХ РУССКОЙ И БУРЯТСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОСТИ

Генотип	Буряты		Русские	
	ПВХРД (n=31)	контроль (n=31)	ПВХРД (n=40)	контроль (n=40)
Lys/Lys	6 (19,4) $p_1<0,001$	21 (67,7)	14 (35)	27 (67,5)
Lys/Asn	15 (48,4)	7 (22,6)	15 (37,5)	11 (24)
Asn/Asn	10 (32,2) $p_2<0,01$	3 (9,7)	11 (27,5)	2 (8)

Примечание. p_1 – достоверность различий носительства генотипа Lys/Lys у бурят с ПВХРД и в контроле, p_2 – генотипа Asn/Asn в тех же группах. В скобках – %.



*Частота аллельных вариантов гена EDN1Lys198sn среди больных с ПВХРД и здоровых русской и бурятской этнических групп, %. Примечание. *p_1<0,05 между носительством аллели Asn при ПВХРД и в контрольной группе у представителей русской национальности; *p_2<0,05 между носительством аллели Lys у бурят с ПВХРД и в контрольной группе; *p_3<0,05 – между носительством аллели Asn у бурят с ПВХРД и в контрольной группе.*

группами бурят и русских, а также между пациентами с ПВХРД исследуемых этнических групп значимая разница отсутствовала.

Таким образом, в русской и бурятской этнических группах обладатели мутантного варианта гена *EDN1Lys198Asn* в большей степени предрасположены к развитию ПВХРД.

Накоплены многочисленные подтверждения того, что носительство генетического полиморфизма ЭТ-1 ассоциировано с риском артериальной гипертензии [7, 11]. Получены сведения о том, что аллельный вариант AsnAsn связан со стенокардией напряжения [10]. Эти взаимосвязи обусловлены тем, что гомозиготное носительство аллели Asn данного полиморфного маркера сопряжено с высоким уровнем ЭТ-1 [7]. Как известно, повышенный уровень этого вазоактивного пептида приводит к усилению сосудистого тонуса и негативно отражается на течении сердечно-сосудистой патологии [2]. В патогенезе отслойки сетчатки значимое место занимает состояние микроциркуляторного русла глаза.

У пациентов с ПВХРД обнаружено повышение концентрации ЭТ-1 в слезной жидкости [5], что, возможно, связано с метаболическими нарушениями, приводящими к гипоксии, которые возникают вследствие уменьшения кровотока в тканях глаза. Это, в свою очередь, приводит к образованию ЭТ-1, который оказывает непосредственное констриктивное влияние на стенку артерий, а также активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию и пролиферацию средней оболочки мелких сосудов. Вероятно, указанные процессы носят более выраженный характер на фоне гомозиготного носительства Asn-аллели мутации *EDN1Lys198Asn*. Этим, по нашему мнению, объясняется тот факт, что среди больных с отслойкой и разрывами сетчатки превалируют носители мутантного варианта гена этого полиморфного маркера.

ВЫВОДЫ

1. Частота мутантной аллели (Asn) гена *EDN1Lys198Asn* выше среди пациентов с ПВХРД, чем среди здоровых у обследованных русской и бурятской этнических групп.

2. Аллель (Asn) гена *EDN1Lys198Asn* встречается чаще у пациентов разрывами и отслойкой сетчатки, чем с другими типами ПВХРД в рассматриваемых этнических группах.

3. Распределение частоты аллельных вариантов гена *EDN1Lys198Asn* среди представителей русской и бурятской национальности не различается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова А.И., Витковский Ю.А., Логунов Н.А. Полиморфизм гена p21 как фактора риска первичной открытоугольной глаукомы среди населения Забайкальского края // Забайкальский мед. вестн. – 2009; 2: 19–21. – Режим доступа: http: // www. medacadem.chita.ru/zmv
2. Гомазков О.А. Эндотелин в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты // Кардиология. – 2001; 41 (2): 50–8.
3. Поздеева О.Г., Тарасова Л.Н. Гипоксия тканей и состояние клеточных мембран при разных типах течения периферических витреохориоретинальных дистрофий // Офтальмохирургия. – 2005; 4 (8): 43–7.
4. Серебренникова С.В., Витковский Ю.А. Полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтазы (C786T) у больных с периферическими витреохориоретинальными дистрофиями сетчатки в Забайкальском крае // Забайкальский мед. вестн. – 2012; 1: 17–21. – Режим доступа: http: // www. medacadem.chita.ru/zmv
5. Серебренникова С.В., Голубина Л.А., Витковский Ю.А. Содержание эндотелина-1 в плазме крови и слезной жидкости у больных с периферической витреохориоретинальной дистрофией в Забайкальском крае // Забайкальский мед. вестн. – 2012; 2: 17–9. – Режим доступа: http: // www. medacadem.chita.ru/zmv
6. Цыбиков Н.Н., Шовдра О.Л., Пруткина Е.В. Уровень эндотелина-1, нейронспецифической енолазы и аутоантител к ним при диабетической ретинопатии // Забайкальский мед. вестн. – 2010; 1: 17–9. – Режим доступа: http: // www. medacadem.chita.ru/zmv
7. Barden A., Herbison C., Beilin L. Association between the endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism blood pressure and plasma endothelin-1 levels in normal and pre-eclamptic pregnancy // J. Hypertens. – 2001; 19 (10): 1775–82.
8. Chakravarthy U., Archer D. Endothelin: a new vasoactive ocular peptid // Br. J. Ophthalmol. – 1998; 76 (2): 107–8.
9. Karazhaeva M., Saxonova E., Klebanov G. Flavonoid antioxidants in complex treatment of patients with dystrophic retinal detachment // Ophthalmology. – 1999; 237: 27–33.
10. Lee J., Cheong S., Kim J. Association of endothelin-1 gene polymorphisms with variant angina in Korean patients // Clin. Chem. Lab. Med. – 2008; 46 (11): 1575–80.
11. Porov A., Schulz E., Hinz J. Impact of endothelin-1 Lys198Asn polymorphism on coronary artery disease and endorgan damage in hypertensives // Coron. Artery Dis. – 2008; 19 (7): 429–34.
12. Salvatore S., Vingolo E. Endothelin-1 role in human eye: a review // J. Ophthalmol. – 2010; 2: 34–5.
13. Stow L., Jacobs M. Endotelin-1 gene regulation // FASEB J. – 2010; 25 (1): 16–28.

значительно возрастает стоимость медицинского обслуживания больных ВМД. Так, в США затраты на оказание помощи больным НВ ВМД в 1994 г. составили 1504$ на пациента в год, в 2006 г. – 3263$, т.е. стоимость лечения выросла почти в 2 раза [5].

В настоящее время существуют возможности первичной профилактики ВМД для лиц из группы риска, а также возможность предотвратить переход неэкссудативной ВМД в экссудативную. В структуре как первичной профилактики ВМД, так и профилактики НВ ВМД большое значение имеют модифицируемые факторы риска ВМД – курение, ожирение, солнечное излучение, а также нутрицептивная поддержка – витамины, антиоксиданты, полиненасыщенные жирные кислоты и каротиноиды [15].

Особый интерес представляет возможность превентивного медикаментозного лечения пациентов с высоким риском конверсии неэкссудативной ВМД в экссудативную. На этом этапе патогенеза терапия должна быть направлена на связывание свободных проангиогенных факторов в сетчатке, прежде всего VEGF (Vascular endothelial growth factor), или использование естественных антиангиогенных молекул, например PEDF (Pigment epithelium-derived factor). Проводятся клинические испытания по применению PEDF у больных ВМД с использованием аденовирусного вектора для доставки препарата в задний участок глаза [16]. Восполнение дефицита этого фактора поможет восстановить баланс про- и антиангиогенных факторов в сетчатке и предотвратить развитие НВ.

Выявление предрасположенных лиц позволит модифицировать тактику диспансерного наблюдения: увеличение частоты регулярных осмотров и выполнения ангиографии позволит выявлять НВ на самых ранних стадиях. Ранняя диагностика и раннее начало лечения гарантируют гораздо более высокую эффективность терапии и благоприятный прогноз в отношении сохранения зрительных функций [8].

Генетическое тестирование – это возможность ранней скрининговой диагностики и профилактики, возможность прогнозировать течение болезни и определить вероятность перехода неэкссудативной формы в экссудативную, выбрать оптимальную тактику ведения больного. Это первый шаг к генной терапии, уже доказавшей свою эффективность.

Продолжаются исследования генетических факторов риска развития неоваскуляризации [2, 3]. Во многих исследованиях на различных популяциях выявлена связь однонуклеотидных полиморфизмов (single-nucleotide polymorphisms – SNPs) в локусе 10q26 [12] с высоким риском ВМД. В этом регионе расположены гены *LOC387715/ARMS2* и *HTRA1*, полиморфизмы которых, вероятно, играют определенную роль в патогенезе заболевания. В нашем исследовании изучены полиморфизм rs10490924 (риск-аллель T), расположенный в кодирующей области гена *LOC387715/ARMS2* (age-related maculopathy susceptibility 2), и rs11200638 (риск-аллель A), полиморфизм промоторной области гена *HTRA1* (high-temperature requirement factor A1). Ген HTRA1 кодирует один из белков теплового шока, который относится к семейству сериновых протеаз. *HTRA1* синтезируется во многих органах и тканях, в том числе в сетчатке. Возможно, *HTRA1* регулирует сигнальный путь трансформирующего ростового фактора β (TGFβ) [17]. Полиморфизм rs11200638 расположен в промоторной области гена и поэтому может изменять уровень его экспрессии.

Ген *LOC387715/ARMS2* кодирует белок наружной митохондриальной мембраны с предполагаемой массой 12 кДа, который синтезируется в сетчатке [14]. T-аллель rs10490924 приводит к замене аминокислот в белке: аланин 69>серин (A69S-вариант) и увеличению скорости деградации *LOC387715/ARMS2* мРНК в клетке.

Ген *CFH* кодирует фактор H системы комплемента, являющийся естественным ингибитором и классического, и альтернативного пути системы комплемента. Полиморфизм rs1061170 встречается более чем у половины больных ВМД и признан важным генетическим фактором риска развития болезни [4].

Целью настоящего исследования была разработка способа оценки риска НВ-формы ВМД с учетом генетических и клинических факторов риска.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 255 пациентов с НВ ВМД (основная группа) и 119 испытуемых контрольной группы. Диагноз ВМД и стадию заболевания устанавливали согласно рекомендациям AREDS (Age-RelatedEyeDiseaseStudy) [1].

В контрольную группу были включены пациенты, не страдающие ВМД, проходившие профилактическое обследование в Медицинском центре Хадассах. Критерии включения в группу контроля: возраст старше 60 лет; прозрачные среды, не препятствующие офтальмоскопии; отсутствие множественных мелких или средних друз или перераспределения пигмента на глазном дне, характерных для ВМД (1-я категория по классификации AREDS). Исследование одобрено этическим комитетом университета, каждый испытуемый подписал бланк информированного согласия.

Средний возраст в контрольной группе был меньше, чем в основной (соответственно (70,8 ±8,2 и 78,1±7,6 года; $p<0,05$; непарный двусторонний t-тест). Группы были сопоставимы по половой структуре.

Все исследуемые генотипированы по следующим однонуклеотидным полиморфизмам (SNPs):

1) rs11200638 в гене *HTRA1*, расположенный в промоторной области данного гена;

2) rs10490924 в гене *LOC387715/ARMS2*, локализован в кодирующем регионе гена;

3) rs1061170 в гене *CFH*.