

DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-8-471-474

## Ассоциативная роль полиморфизма гена eNOS (4a/4b) в развитии артериальной гипертензии у больных ревматоидным артритом

А.А. Чернова, С.Ю. Никулина, Ю.А. Толстокорова

ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Россия

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования:** изучить вклад полиморфизма гена eNOS (4a/4b) в развитие артериальной гипертензии (АГ) у больных ревматоидным артритом (РА).

**Материал и методы:** обследовано 143 больных РА, среди которых были выделены группа пациентов без АГ (n=50) и группа пациентов с РА в ассоциации с АГ (n=93). Здоровых добровольцев (n=151) также разделили на 2 группы, сопоставимые по возрасту и полу с основными группами. В работе использован спектр клинических, лабораторных, инструментальных методов. Также проводили молекулярно-генетическое исследование. У всех участников исследования отбирали образцы крови. Выделение ДНК проводили стандартным фенол-хлороформным методом. Генотипирование по гену eNOS выполнялось методом ПЦР-ПДРФ анализа (полимеразная цепная реакция — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). ПЦР проводилась с набором праймеров к соответствующим районам генома. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 4% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

**Результаты исследования:** в ходе молекулярно-генетического исследования наблюдали статистически значимое преобладание гомозиготного генотипа 4a/4a и аллели 4a полиморфизма гена eNOS в группе пациентов с РА в ассоциации с АГ в сравнении с данными показателями у пациентов с РА без АГ. Оцененный по отношению шансов риск развития РА в ассоциации с АГ у носителей генотипа 4a/4a гена eNOS выше в 3,635 раза по сравнению с носителями генотипов 4a/4b и 4b/4b. Аллель 4a значительно чаще встречалась в группе пациентов с РА в ассоциации с АГ, чем в контрольной группе (ОШ=3,458 [95% ДИ 1,571–4,575]; p<0,05). В группе пациентов с РА без АГ в сравнении с контрольной группой здоровых добровольцев статистически достоверных значений не было выявлено.

**Заключение:** гомозиготный генотип 4a/4a и аллель 4a полиморфизма 4a/4b гена eNOS являются предикторами развития РА в ассоциации с АГ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ревматоидный артрит, сердечно-сосудистая патология, артериальная гипертензия, молекулярно-генетическое исследование, однонуклеотидный полиморфизм, ассоциация генов.

**ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:** Чернова А.А., Никулина С.Ю., Толстокорова Ю.А. Ассоциативная роль полиморфизма гена eNOS (4a/4b) в развитии артериальной гипертензии у больных ревматоидным артритом. РМЖ. Медицинское обозрение. 2020;4(8):471–474. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-8-471-474.

## Association of eNOS (4a/4b) gene polymorphism with the development of arterial hypertension in patients with rheumatoid arthritis

A.A. Chernova, S.Yu. Nikulina, Yu.A. Tolstokorova

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim:** to study a contribution of eNOS (4a/4b) gene polymorphism in the development of arterial hypertension (AH) in patients with rheumatoid arthritis (RA).

**Patients and Methods:** 143 patients with RA were examined, among which a group of patients without AH (n=50) and a group of patients with RA in association with AH (n=93) were selected. Healthy volunteers (n=151) were also divided into 2 groups, comparable in age and gender to the main groups. A range of clinical, laboratory, and instrumental methods were used in this study. We also conducted molecular genetics. Blood samples were taken from all patients in the study. DNA was isolated using the phenol-chloroform DNA extraction method. Genotyping for the eNOS gene was performed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction — Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis. PCR was performed with a set of primers to the corresponding genome regions. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 4% polyacrylamide gel followed by staining with ethidium bromide.

**Results:** during the molecular genetics, there was a statistically significant prevalence of 4a/4a homozygous genotype and 4a alleles of eNOS gene polymorphism in patients with RA in association with AH versus these parameters in patients with RA without AH. The estimated risk concerning odds ratio of RA occurrence in association with AH in carriers of 4a/4a genotype in the eNOS gene was 3.635 times higher versus

carriers of 4a/4b and 4b/4b genotypes. 4a allele was significantly more common in the group of patients with RA in association with AH versus the control group (OR=3.458 [95% CI 1.571–4.575];  $p<0.05$ ). There were no statistically significant values in the group of patients with RA without AH versus the control group with healthy volunteers.

**Conclusion:** 4a/4a homozygous genotype and 4a allele of the eNOS 4a/4b gene polymorphism are predictors of RA development in association with AH.

**KEYWORDS:** rheumatoid arthritis, cardiovascular pathology, arterial hypertension, molecular genetics, single-nucleotide polymorphism, genetic association.

**FOR CITATION:** Chernova A.A., Nikulina S.Yu., Tolstokorova Yu.A. Association of eNOS (4a/4b) gene polymorphism with the development of arterial hypertension in patients with rheumatoid arthritis. *Russian Medical Inquiry*. 2020;4(8):471–474. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-8-471-474.

## ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное ревматическое заболевание, характеризующееся хроническим эрозивным артритом и системным поражением других тканей и органов [1]. Наиболее важное место занимают патологические изменения сердечно-сосудистой системы [2]. Кардиоваскулярный риск у пациентов с РА значительно увеличен по сравнению с общей популяцией [3, 4]. Установлено, что артериальная гипертензия (АГ) при РА имеет мультифакториальный генез, обусловленный результатом взаимодействия полигенной составляющей и факторов внешней среды [5]. Выявление различных факторов, которые могут ассоциироваться с развитием АГ у больных РА, представляет интерес для исследования.

Выбор полиморфизма гена в данном исследовании строился на генно-кандидатном подходе, основанном на функции гена в патогенезе заболевания [6]. Так, при обзоре литературных данных было выявлено, что в 2007 г. уже проводилось исследование с целью изучения влияния гена *eNOS* (4a/b) на восприимчивость к РА. В исследование включили 145 здоровых лиц и 190 пациентов с РА. Результаты показали, что наличие полиморфизма 4a/b гена *eNOS* может выступать в качестве фактора риска развития РА [7]. Позднее была выявлена взаимосвязь гена *eNOS* и развития ишемической болезни сердца и АГ [8, 9].

Однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) 4a/b гена *eNOS* локализован на длинном плече 7 хромосомы, локус 7q36.1. Предполагаемым механизмом реализации действия полиморфизма является запуск пула воспалительных цитокинов, которые реализуют патогенетические особенности системного воспаления при РА, способствующие развитию ангиогенеза. Субклиническое воспаление, локализованное в сосудистой стенке, рассматривается как важное звено патогенеза АГ [10, 11].

Литературные данные о влиянии гена *eNOS* (4a/b) на развитие АГ у больных РА немногочисленны. Целью нашего исследования явилось изучение вклада полиморфизма гена *eNOS* (4a/4b) в развитие АГ у больных РА.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Набор пациентов проводился в ревматологическом отделении КГБУЗ «КМКБ № 20 им. И.С. Берзона» (г. Красноярск). Было обследовано 143 больных РА. От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Среди обследованных была выделена группа пациентов с РА без АГ

( $n=50$ ; 35%) и группа пациентов с РА в ассоциации с АГ ( $n=93$ ; 65%). Для каждой основной группы была сформирована контрольная группа. Здоровых добровольцев ( $n=151$ ) без ревматических и сердечно-сосудистых заболеваний разделили на 2 контрольные группы, сопоставимые по возрасту и полу с основными группами: контрольная группа 1, служившая контролем для группы пациентов с РА и АГ, и контрольная группа 2, служившая контролем для группы пациентов с РА без АГ. Всем пациентам были проведены клинические, лабораторные, инструментальные исследования.

Молекулярно-генетическое исследование проводили на базе Российско-итальянской лаборатории медицинской генетики «MAGI» КрасГМУ и лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИТПМ — филиала ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). У всех обследуемых были взяты образцы венозной крови в количестве 5–10 мл. Выделение ДНК проводили стандартным фенол-хлороформным методом. Генотипирование по гену *eNOS* выполнялось методом ПЦР-ПДРФ анализа (полимеразная цепная реакция — полиморфизм длин рестриционных фрагментов). ПЦР проводилась с набором праймеров к соответствующим районам генома. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 4% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Excel, Statistica for Windows 10.0, IBM SPSS 20.

Различия в распределении частот аллелей и генотипов гена *eNOS* между группами оценивали посредством критерия  $\chi^2$ . В случае четырехпольных таблиц сопряженности сравнение выборок по частотам генотипов и аллелей применяли точный двусторонний критерий Фишера. Относительный риск заболевания по конкретной аллели или генотипу вычисляли как отношение шансов (ОШ). ОШ указано с 95% доверительным интервалом (ДИ). Различия считали статистически значимыми при  $p<0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При распределении генотипов и аллелей полиморфизма гена *eNOS* наблюдается статистически значимое преобладание гомозиготного генотипа 4a/4a и аллели 4a в группе пациентов с РА в ассоциации с АГ в сравнении с лицами контрольной группы 1 (табл. 1).

Оцененный по отношению шансов риск развития РА в ассоциации с АГ у носителей генотипа 4a/4a гена *eNOS* выше в 3,635 раза ( $p<0,05$ ) по сравнению с носителями ге-

**Таблица 1.** Частоты генотипов и аллелей полиморфизма гена *eNOS* в группе больных РА и АГ и в контрольной группе

**Table 1.** Frequency of genotypes and alleles of *eNOS* gene polymorphism in the group of patients with RA and AH and in the control group

Генотипы и аллели Genotypes and alleles	Здоровые добровольцы, п (%) Healthy volunteers, п (%)	Больные РА в ассоциации с АГ, п (%) RA patients in association with AH, п (%)	Больные РА без АГ, п (%) Patients with RA without AH, п (%)
<b>Генотипы:</b> Genotypes:	n=151	n=93	n=50
<b>4a/4a</b>	34 (23)	28 (30)	11 (22)
<b>4a/4b</b>	79 (52)	47 (51)	27 (54)
<b>4b/4b</b>	38 (25)	18 (19)	12 (24)
<b>Аллели:</b> Alleles:	2n=302	2n=186	2n=100
<b>4a</b>	149 (49,4)	105 (56,8)	47 (47,4)
<b>4b</b>	153 (50,6)	81 (43,2)	53 (52,6)

**Примечание.** АГ – артериальная гипертензия; РА – ревматоидный артрит; п – количество исследованных лиц; 2n – количество хромосом у исследованных лиц.

**Note.** AH – arterial hypertension; RA – rheumatoid arthritis; n is the number of patients, 2n is the number of chromosomes in the patients.

нотипов *4a/4b* и *4b/4b*. Аллель *4a* статистически значимо ( $p < 0,05$ ) чаще встречалась в группе пациентов с РА в ассоциации с АГ, чем в контрольной группе (табл. 2).

Результаты исследования подтвердили вклад полиморфизма *4a/b* гена *eNOS* в развитие АГ у пациентов с РА восточносибирской популяции. Тем самым полученные результаты подтверждают основной предполагаемый механизм действия полиморфизма, связанного с дисфункцией эндотелия, недостаточным образованием NO, системным воспалением в сосудистой стенке, приводящим к развитию АГ у больных РА. В любом случае пациенты с длительным РА (более 2 лет) должны рассматриваться как пациенты высокого риска по развитию сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), даже при отсутствии клинических признаков. Это требует обсуждения и уточнения как диагностических подходов, так и мероприятий по первичной профилактике ССЗ при РА.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что гомозиготный генотип *4a/4a* и аллель *4a* полиморфизма *4a/4b* гена *eNOS* являются предикторами развития РА в ассоциации с АГ. Полученные данные могут быть применимы для определения индивидуальной тактики ведения группы пациентов с РА в ассоциации с АГ. Важнейшими аспектами тактики ведения пациентов с РА и АГ являются решения о целесообразности и выборе медикаментозной терапии, для чего понадобится проведение проспективных исследований, которые позволят более точно определить особенности лечения АГ и преимущества различных классов антигипертензивных препаратов для профилактики сердечно-сосудистых осложнений у больных РА. Также не вызывает сомнений, что мультифакториальная природа АГ

**Таблица 2.** Риск развития РА в ассоциации с АГ

**Table 2.** Risk of RA in association with AH

Генотипы и аллели Genotypes and alleles	Пациенты с РА в ассоциации с АГ против контрольной группы 1, ОШ (95% ДИ) Patients with RA in association with AH versus the control group 1, OR (95% CI)	Пациенты с РА без АГ против контрольной группы 2, ОШ (95% ДИ) Patients with RA without AH versus the control group 2, OR (95% CI)
<b>Генотип</b> <b>4a/4a</b> 4a/4a genotype	3,635 (95% ДИ 1,323–9,891); $p < 0,05$ 3,635 (95% CI 1.323–9.891); $p < 0,05$	$p > 0,05$
<b>Аллель 4a</b> 4a allele	3,458 (95% ДИ 1,571–4,575); $p < 0,05$ 3,458 (95% CI 1.571–4.575); $p < 0,05$	$p > 0,05$

**Примечание.** АГ – артериальная гипертензия; РА – ревматоидный артрит; ДИ – доверительный интервал; ОШ – отношение шансов.

**Note.** AH – arterial hypertension; RA – rheumatoid arthritis; n is the number of patients, CI – confidence interval; OR – odds ratio.

обусловлена полиморфизмами различных генов, участвующих в реализации различных молекулярных механизмов, что требует дальнейшего изучения для выявления генов, обладающих гипертензивным эффектом.

## Литература

1. Громова М.А., Мясоедова С.Е. Артериальная гипертензия, состояние сердечно-сосудистой системы и характеристика боли у больных ревматоидным артритом. *Фундаментальные исследования.* 2014;10(4):651–653.
2. Громова М.А., Мясоедова С.Е. Особенности хронического болевого синдрома при ревматоидном артрите и лечебно-диагностическая тактика. *Клиницист.* 2016;10(1):12–16. DOI: 10.17650/1818-8338-2016-10-1-12-16.
3. Мясоедова Е.Е. Распространенность и факторы риска артериальной гипертензии при ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология.* 2012;50(2):31–34.
4. Шостак Н.А., Правдюк Н.Г. Остеоартроз: детерминанты боли, подходы к лечению. *РМЖ.* 2016;24(22):1476–1480.
5. Новикова Д.С., Попкова Т.В., Насонов Е.Л. Артериальная гипертензия при ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология.* 2011;49(3):52–68.
6. Попкова Т.В., Новикова Д.С., Насонов Е.Л. Сердечно-сосудистые заболевания при ревматоидном артрите: новые данные. *Научно-практическая ревматология.* 2016;54(2):122–128.
7. Toms T.E., Panoulas V.F., Douglas K.M. et al. Statin use in rheumatoid arthritis in relation to actual cardiovascular risk: evidence for substantial under treatment of lipid associated cardiovascular risk? *Ann Rheum Dis.* 2010;4:683–688.
8. Пахомья Н.С., Урясьев О.М., Шаханов А.В. Роль полиморфизмов некоторых генов в реализации артериальной гипертензии. *Земский врач.* 2014;3–4(24):21–24.
9. Насонов Е.Л., Гусева И.А., Александрова Е.Н. Проблемы персонализированной терапии ревматоидного артрита генно-инженерными биологическими препаратами. *Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита.* М.: ИМА-ПРЕСС; 2013:489–509.
10. Ronninger M., Guo Y., Shchetynsky K. et al. The alance of expression of PTPN22 splice forms is significantly different in rheumatoid arthritis patients compared with controls. *Genome Med.* 2012;4(1):2.
11. Гусева И.А., Демидова Н.В., Сорока Н.Е. и др. Исследование полиморфизмов генов-кандидатов иммунного ответа как маркеров риска развития ревматоидного артрита и продукции аутоантител. *Научно-практическая ревматология.* 2016;54(1):21–30.

## References

- Gromova M.A., Myasoedova S.E. Arterial hypertension, condition of a cardiovascular system and characteristic of pain at patients with a rheumatoid arthritis. *Fundamental'nyye issledovaniya*. 2014;10(4):651–653 (in Russ.).
- Gromova M.A., Myasoedova S.E. Features of the chronic pain syndrome in patients with rheumatoid arthritis and medical diagnostic tactics. *Klinitsist*. DOI: 10.17650/1818-8338-2016-10-1-12-16 (in Russ.).
- Myasoedova E.E. The prevalence and risk factors of arterial hypertension in rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2012;50(2):31–34 (in Russ.).
- Shostak N.A., Pravdyuk N.G. Osteoarthritis: pain determinants, treatment approaches. *RMJ*. 2016;24(22):1476–1480 (in Russ.).
- Novikova D.S., Popkova T.V., Nasonov E.L. Arterial hypertension in the rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2011;49(3):52–68 (in Russ.).
- Popkova T.V., Novikova D.S., Nasonov E.L. Cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis: new data. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2016;54(2):122–128 (in Russ.).
- Toms T.E., Panoulas V.F., Douglas K.M. et al. Statin use in rheumatoid arthritis in relation to actual cardiovascular risk: evidence for substantial under treatment of lipid associated cardiovascular risk? *Ann Rheum Dis*. 2010;4:683–688.
- Pakhomya N.S., Uryasev O.M., Shakhnov A.V. The role of polymorphisms of some genes in the implementation of arterial hypertension. *Zemskiy vrach*. 2014;3–4 (24):21–24 (in Russ.).
- Nasonov E.L., Guseva I.A., Aleksandrova E.N. Problems of personalized therapy of rheumatoid arthritis with genetically engineered biological agents. *Genetically engineered biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis*. M.: IMA-PRESS; 2013:489–509 (in Russ.).
- Ronninger M., Guo Y., Shchetynsky K. et al. The balance of expression of PTPN22 splice forms is significantly different in rheumatoid arthritis patients compared with controls. *Genome Med*. 2012;4(1):2.
- Guseva I.A., Demidova N.V., Soroka N.E. et al. Study of polymorphisms of candidate genes for the immune response as risk markers for the development of rheumatoid arthritis and production of autoantibodies. *Scientific and practical rheumatology*. 2016;54(1):21–30 (in Russ.).

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

**Чернова Анна Александровна** — д.м.н., профессор кафедры внутренних болезней №1 ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России; Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; ORCID iD 0000-0003-2977-1792.

**Никулина Светлана Юрьевна** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой внутренних болезней №1 ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России; Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; ORCID iD 0000-0002-6968-7627.

**Толстокурова Юлия Александровна** — клинический ординатор кафедры внутренних болезней №1 ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России; Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; ORCID iD 0000-0002-2261-0868.

**Контактная информация:** Толстокурова Юлия Александровна, e-mail: yuliyatolstokorova@mail.ru. **Прозрачность финансовой деятельности:** исследование проведено при финансировании ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (внутриуниверситетский грант). **Конфликт интересов отсутствует.** Статья поступила 10.07.2020, поступила после рецензирования 23.07.2020, принята в печать 07.08.2020.

## ABOUT THE AUTHORS:

**Anna A. Chernova** — Dr. of Sci. (Med.), Professor of the Department of Internal Medicine No. 1 Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky; 1 ul. Partizana Zheleznyaka, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022; ORCID iD 0000-0003-2977-1792.

**Svetlana Yu. Nikulina** — Dr. of Sci. (Med.), Head of the Department of Internal Medicine No. 1 Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky; 1 ul. Partizana Zheleznyaka, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022; ORCID iD 0000-0002-6968-7627.

**Yulia A. Tosltokorova** — resident physician of the Department of Internal Medicine No. 1 Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky; 1 ul. Partizana Zheleznyaka, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022; ORCID iD 0000-0002-6968-7627.

**Contact information:** Yulia A. Tosltokorova, e-mail: yuliyatolstokorova@mail.ru. **Financial Disclosure:** The study was funded by Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky (intra-university grant). **There is no conflict of interests.** Received 10.07.2020, revised 23.07.2020, accepted 07.08.2020.