

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ВАРИАНТАМИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

[Н. Н. Страмбовская](#)

*ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России
(г. Чита)*

После генотипирования (ПЦР) изучены частоты аллелей и генотипов 26 SNP-маркеров у больных атеротромботическим и лакунарным вариантами ишемического инсульта и у здоровых наблюдаемых. Выявлены различные, патогенетически обоснованные ассоциации генетического полиморфизма с типом инфаркта мозга. Так для атеротромботического варианта проявили предрасположенность *AGT-704C*, *SELP-1087A*, *SELE-128Pro*, *ApoC3-3238G* аллели с риском развития заболевания от 1,52 [1,12; 2,07] до 2,87 [1,89-4,37] раза. А для лакунарного инсульта проявили ассоциацию *AGT-521T*, *SELE-128Pro*, *NOS3-786T*, *NOS1-84A*, *END-9272T* аллели, с вероятностью развития болезни от 1,11 [0,75-1,64] до 2,92 [1,96-4,34] раза.

Ключевые слова: атеротромботический инсульт, лакунарный инсульт, генетический полиморфизм, предрасположенность.

Страмбовская Наталья Николаевна — кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики НИИ молекулярной медицины, доцент кафедры нервных болезней, нейрохирургии и медицинской генетики ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», рабочий телефон: 8 (3022) 35-34-78, e-mail: strambovskaya@yandex.ru

Введение. Ишемический инсульт представляет собой мультифакториальное заболевание с гетерогенными клиническими проявлениями. В западных странах, так же как и в нашей стране, большинство ишемических инсультов относят к атеротромботическим на фоне атеросклероза магистральных артерий и лакунарным ишемическим инфарктам, развивающимся вследствие окклюзии или патологии малых (пиальных) артерий головного мозга. Небольшая часть острых ишемических мозговых катастроф развивается в результате кардиоэмболии, васкулитов, моногенных заболеваний или редкого этиологического фактора, например, диссекции артерии [1, 2]. Модифицируемые так же, как и немодифицируемые факторы риска, проявляют свою значимость при всех вариантах острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК), однако клинический

эффект этого влияния реализуется в различные формы болезни. Весьма вероятно, что интенсивно изучаемые на сегодняшний день предиктивные полиморфные генетические маркеры вносят свою лепту в развитие тех или иных вариантов ишемического нарушения мозгового кровообращения.

Цель работы: провести анализ частот генотипов и аллелей полиморфизма генов — потенциальных предикторов цереброваскулярной патологии (rs4762, rs699, rs5186, rs34340, rs1126643, rs5918, rs2243093, rs482, rs6131, rs5361, rs5355, rs1801133, rs1801131, rs1805087, rs1801394, rs662, rs5128, rs769452, rs1800790, rs1799768, rs2070744, rs41279104, rs5370, rs 55890, rs6265, rs13450612) и выявить ассоциацию генетических маркеров с развитием лакунарного и атеротромботического вариантов ишемического инсульта.

Материалы и методы. Выборка клинической группы сформирована из 237-ми больных в возрасте $60,2 \pm 9,5$ года (123 женщины, 127 мужчин) с объективно доказанным лакунарным (97 пациентов) и атеротромботическим (140 пациентов) ишемическим инсультом, подтвержденными в 98,2 % случаях методами нейровизуализации.

В контрольную группу методом сплошной выборки были включены 211 не родственных между собой человек (119 женщины и 92 мужчин) без объективных признаков цереброваскулярной патологии, средний возраст которых составил $51,5 \pm 13,7$ года.

Типирование аллельных вариантов генов проводилось методом ПЦР с детекцией продукта амплификации в окрашенном 1 % раствором бромистого этидия 2 % агарозном геле в проходящем ультрафиолетовом свете (PCR-Ehf) либо в режиме реального времени по кривым плавления (PCR-Rt) (амплификаторы «MAXYGENE», Германия; «ДТ-96», Россия) на геномной ДНК лейкоцитов периферической крови, выделенной с помощью набора реагентов «ДНК-экспресс кровь» (ООО НПФ «Литех», Москва). Использовались комплекты реагентов «КардиоГенетика тромбофилия» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва) и отдельные SNP-наборы, соответствующие заявленному полиморфизму (ООО НПФ «Литех», Москва; ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва).

Для оценки соответствия равновесию Харди-Вайнберга (HWE) и для сравнения частот генотипов и аллелей использовали критерий χ^2 . Об ассоциации аллелей или генотипов с изучаемой патологией судили по величине отношения шансов (OR 95 % CI).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Statistica 6.1 (StatSoft, USA), а также on-line калькулятора (http://gen-exp.ru/calculator_or.php). Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО ЧГМА (протокол № 2 от 06.11.2009), все респонденты подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (Сеул, октябрь 2008).

Результаты и обсуждение. В результате молекулярно-генетического исследования были определены все аллели и генотипы выбранного полиморфизма генов, частоты которых не отклонялись от равновесия Харди-Вайнберга (HWE, $p > 0,05$) как в группах больных инсультом, так и у здоровых исследуемых. При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов каждого из SNP между клиническими и контрольной группами для AGTR1-1166A>C, GpIa-807C>T, GpIIIa-1565T>C, GpI β a-434C>T, P2RY12-H1>H2 (C139T, T74C, G52T, ins801), SELE-554Leu>Phe, MTHFR-677C>T, MTHFR-1298A>C, MTR-2756A>G, MTRR-66A>G, PON1-78A>G, ApoE-3100T>C, BDNF-196G>A, CNTF-103G>A значимых различий выявлено не было.

Для пациентов, имеющих объективные признаки атеротромботического варианта

ишемического инсульта, ассоциацию с ним показали AGT-704T>C, SELP-1087G>A, SELE-128Ser>Pro, ApoC3-3238C>G однонуклеотидные точковые замены (табл. 1).

Таблица 1

Частота аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма у больных атеротромботическим вариантом ишемического инсульта и в контрольной группе

Генотипы/ аллели	Частота аллеля (P), частота генотипа (%)		χ^2 , P	OR* (95 % CI)
	здоровые (n = 211)	больные АИ (n = 140)		
<i>AGT-704T>C</i>				
-704TT	30,3	19,9	6,61; 0,01	1,52 (1,12; 2,07)
-704TC	45,3	45,4		1,0 (0,65; 1,55)
-704CC	24,4	34,8		1,65 (1,03; 2,65)
-704T	0,57	0,43	7,22; 0,007	0,66 (0,48; 0,89)
-704C	0,43	0,57		1,52 (1,12; 2,07)
<i>SELP-1087G>A</i>				
-1087GG	79,6	68,1	7,38; 0,03	0,55 (0,33-0,90)
-1087GA	17,9	24,8		1,51 (0,89-2,56)
-1087AA	2,5	7,1		2,99 (1,00-8,95)
-1087G	0,89	0,8	8,56; 0,003	0,53 (0,35-0,82)
-1087A	0,11	0,2		1,88 (1,23-2,87)
<i>SELE-128Ser>Pro</i>				
-128SerSer	81	52,5	31,04; < 0,0002	0,26 (0,16-0,42)
-128 SerPro	16,4	43,3		3,89 (2,34-6,47)
-128 ProPro	2,6	4,3		1,64 (0,49-5,47)
-128Ser	0,9	0,74	25,57; 0,00007	0,35 (0,23-0,53)
-128Pro	0,1	0,26		2,87 (1,89-4,37)
<i>ApoC3-3238C>G,SstI</i>				
-3238CC	82,7	66,7	11,54; 0,003	0,42 (0,25-0,70)
-3238CG	15,3	29,8		2,33 (1,37-3,94)
-3238GG	2,0	3,5		1,81 (0,48-6,87)
-3238C	0,9	0,82	10,97; 0,0009	0,48 (0,30-0,74)
-3238G	0,1	0,18		2,1 (1,35-3,29)

Примечание: df* = 1 — степень свободы для анализа частот аллелей, df* = 2 — степень свободы для анализа частот генотипов

Известно, что полиморфизм Р-селектина (thr715pro), как и полиморфизм Е-селектина (ser128arg), вызывает повышенную экспрессию одноименных молекул, в том числе и на атеросклеротических бляшках, и это позволяет предполагать роль селектинов в развитии атеросклероза и коронарных заболеваний сердца [3, 6]. Ассоциации между

полиморфизмом гена аполипопротеина С3 (APOC3) и нарушениями липидного и углеводного обмена являются устоявшимися — генотип GG полиморфизма С3238G (известного также как «S2» или «SstI») приводит к увеличению содержания триглицеридов, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП)-холестерина, аполипопротеина В и снижению уровня липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) [5], т. е. при неблагоприятных внешнесредовых факторах генетически нарушенный липидный обмен содействует раннему атерогенезу, а повышенная экспрессия селектинов — миграции лейкоцитов в атероматозные образования и поддержанию там воспаления, что и способствует прогрессированию атеросклероза, в том числе и в стратегически важных для мозга магистральных артериях шеи. Полиморфизм AGT, обусловленный точечными нуклеотидными мутациями в кодонах гена, приводящими к аминокислотным заменам T174M и M235T при одиночном наследовании, имеет небольшое практическое значение — повышение артериального давления, тем не менее, при условии одновременного генетического анализа других звеньев ренин-ангиотензин-альдостеронового каскада может быть весьма информативным [1].

Для пациентов, имеющих объективные признаки лакунарного варианта ишемического инсульта, наибольшую ассоциацию показали SNP, ответственные за регуляцию сосудистого тонуса: NOS3-786C>T, NOS1-84G>A, END-9272G>T, что немаловажно для функционирования мелких артерий мышечного типа, коими являются пиальные сосуды, в результате страдания которых и развиваются лакунарные инфаркты (табл. 2).

Таблица 2

Частота аллелей и генотипов изучаемого полиморфизма у больных лакунарным вариантом ишемического инсульта и в контрольной группе

Генотипы/ аллели	Частота аллеля (P), частота генотипа (%)		χ^2, P	OR* (95 % CI)
	здоровые (n = 211)	больные ЛИ (n = 97)		
<i>AGT-521C>T</i>				
–521CC	82,1	72	6,5; 0,04	0,57 (0,32; 1,0)
–521CT	16,4	28		1,96 (1,1; 3,51)
–521TT	1,5	0,0		0,29 (0,01; 5,69)
–521C	0,9	0,86	2,36; 0,12	0,66 (0,39; 1,12)
–521T	0,1	0,14		1,5 (0,89; 2,54)
<i>SELE-128Ser>Pro</i>				
–128SerSer	81	57,7	18,55; < 0,0005	0,32 (0,19–0,55)
–128 SerPro	16,4	39,2		3,28 (1,87–5,75)
–128 ProPro	2,6	3,1		1,17 (0,27–5,02)
–128Ser	0,9	0,77	14,9; 0,0002	0,41 (0,27–0,68)
–128Pro	0,1	0,23		2,41 (1,46–3,74)
<i>NOS3-786C>T</i>				
–786CC	24,9	30,9	16,41; 0,0003	1,35 (0,79–2,31)
–786CT	40,8	17,5		0,31 (0,17–0,56)
–786TT	34,3	51,5		2,04 (1,24–3,33)

–786C	0,45	0,4	1,66; 0,2	0,8 (0,56–1,13)
–786T	0,55	0,6		1,26 (0,89–1,78)
<i>NOS1-84G>A</i>				
–84GG	72,6	44,3	24,45; 0,0004	0,3(0,18–0,50)
–84GA	22,9	40,2		2,27 (1,34–3,82)
–84AA	4,5	15,5		3,9 (1,64–9,28)
–84G	0,84	0,64	29,14; < 0,0008	0,34 (0,23–0,51)
–84A	0,16	0,36		2,92 (1,96–4,34)
<i>END-9272G>T</i>				
–9272GG	54,2	57,7	7,09; 0,03	1,13 (0,69–1,84)
–9272GT	41,8	32,0		0,65 (0,39–1,09)
–9272TT	3,5	10,3		3,19 (1,17–8,65)
–9272G	0,76	0,74	0,25; 0,61	0,9 (0,61–1,34)
–9272T	0,24	0,26		1,11 (0,75–1,64)

Примечание: $df^* = 1$ — степень свободы для анализа частот аллелей, $df^* = 2$ — степень свободы для анализа частот генотипов

Так, ген эндотелина-1 кодирует белок, играющий ключевую роль в вазоспазме, он индуцирует накопление коллагена и стимулирует митогенез миофибробластов и фибробластов. Полиморфизм rs5370, приводящий к аминокислотной замене Lys198Asn, вызывает увеличение синтеза эндотелина-1 и чаще всего ассоциируется с развитием сердечнососудистой патологии, в частности с артериальной гипертензией [1, 2]. Другое очень важное вещество — оксид азота, производимый эндотелиальной синтазой, обуславливает расслабление гладких мышц сосудов и их дилатацию, предотвращает агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов к эндотелию. Поэтому функционально-значимые полиморфизмы гена *eNOS*, приводящие к уменьшенной концентрации окиси азота в кровяном русле, рассматриваются как возможные маркеры риска развития гипертонической болезни и других патологий сердечнососудистой системы. Так, показано, что носительство 786T аллеля дает высокий риск ишемической болезни сердца среди лиц азиатского происхождения [2, 4].

Заключение. Генетический полиморфизм с предиктивной направленностью в отношении цереброваскулярной патологии разнообразен в ассоциациях с различными вариантами ишемического инсульта, однако полученные данные нуждаются в подтверждении независимыми исследованиями.

Список литературы

1. Роль генетического полиморфизма в патогенезе цереброваскулярных заболеваний / Р. Ф. Гайфуллина [и др.] // Казан. мед. журн. — 2012. — Т. 93, № 4. — С. 663–677.
2. DeBette S. Genetics of Atherothrombotic and Lacunar Stroke / S. DeBette, S. Seshadri // *Circ Cardiovasc Genet.* — 2009. — Vol. 2. — P. 191–198. — doi:10.1161/CIRCGENETICS.108.828319. — (дата обращения: 01.02.2015).
3. Homozygosity in the single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene associated with recurrent venous thromboembolism / B. Jilma [et al.] // *Arch. Intern. Med.* — 2006. — Aug 14. — Vol. 28, N 166 (15). — P. 1655–9.
4. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms with Coronary Artery

Disease: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review / H. Rai [et al.] // Published online. — 2014. — Nov 19. — doi: 10.1371/journal.pone.0113363 PMID: PMC4237457. — (дата обращения: 01.02.2015).

5. Apolipoprotein C3 Polymorphisms, Cognitive Function and Diabetes in Caribbean Origin Hispanics / Caren E. Smith [et al.] // PloS ONE. — 2009. — Vol. 4 (5). — P. e5465. — Published on-line. — May 8. — 2009. — doi : 10.1371/journal.pone.0005465 PMID. — (дата обращения: 12.01.2015).
6. Specific haplotypes of the P-selectin gene is associated with myocardial infarction / D. A. Tregouet [et al.] // Hum. Mol. Genet. — 2002. — Vol. 11. — P. 2015-2023

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC GENETIC MARKERS WITH VARIOUS OPTIONS OF ISCHEMIC STROKE

N. N. Strambovszkaya

SBEI HPE «Chita state medical academy» of Ministry of Health (Chita c.)

After genotyping (PCR) frequencies of alleles and genotypes of 26 SNP-markers at patients with atherothrombotic and lacunar options of ischemic stroke and at healthy patients are studied. Various, pathogenetically reasonable associations of genetic polymorphism with cerebrovascular accident are revealed. So AGT-704C, SELP-1087A, SELE-128Pro, ApoC3-3238G alleles with risk of development of a disease from 1,52 [1,12; 2,07] to 2,87 [1,89-4,37] to showed for atherothrombotic option predisposition. And AGT-521T, SELE-128Pro, NOS3-786T, NOS1-84A, END-9272T of allele, with probability of disease progress from 1,11 [0,75-1,64] to 2,92 [1,96-4,34] times showed association for lacunar stroke.

Keywords: atherothrombotic stroke, lacunar stroke, genetic polymorphism, predisposition.

About authors:

Strambovszkaya Natalya Nikolaevna — candidate of medical science, head of molecular genetics laboratory of scientific research institute of molecular medicine, assistant professor of nervous illnesses, neurosurgery and medical genetics chair at SBEI HPE «Chita state medical academy» of Ministry of Health, office phone: 8 (3022) 35-34-78, e-mail: strambovszkaya@yandex.ru

List of the Literature:

1. Role of genetic polymorphism in pathogenesis of cerebrovascular diseases / R. F. Gayfullina [etc.] // Kazan. medical journal. — 2012. — V. 93, № 4. — P. 663-677.
2. Debette S. Genetics of Atherothrombotic and Lacunar Stroke / S. Debette, S. Seshadri // Circ Cardiovasc Genet. — 2009. — Vol. 2. — P. 191-198. — doi:10.1161/CIRCGENETICS.108.828319. — (дата обращения: 01.02.2015).
3. Homozygosity in the single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene associated with recurrent venous thromboembolism / B. Jilma [et al.] // Arch. Intern. Med. — 2006. — Aug 14. — Vol. 28, N 166 (15). — P. 1655-9.
4. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms with Coronary Artery Disease: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review / H. Rai [et al.] // Published online. — 2014. — Nov 19. — doi: 10.1371/journal.pone. 0113363 PMID: PMC4237457. — (access date: 01.02.2015).
5. Apolipoprotein C3 Polymorphisms, Cognitive Function and Diabetes in Caribbean Origin Hispanics / Caren E. Smith [et al.] // Plops ONE. — 2009. — Vol. 4 (5). — P. e5465. — Published on-line. — May 8. — 2009. — doi : 10.1371/ journal.pone.0005465 PMID. — (access date: 12.01.2015).

6. Specific haplotypes of the P-selectin gene is associated with myocardial infarction / D. A. Tregouet [et al.] // Hum. Mol. Genet. — 2002. — Vol. 11. — P. 2015-2023.