

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА В РАЗВИТИИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО И СРЕДНЕГО ВОЗРАСТА

Овсянникова А.Н., Машин В.В., Белова Л.А., Саенко Ю.В., Васицкий Н.Р.,
Абрамова В.В.

ГОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия (432017, Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42), e-mail: anna-ovs73@mail.ru

Проведен анализ генетических факторов риска острой ишемии мозга путем исследования полиморфизмов генов системы гемостаза, ассоциированных с повышенным риском развития тромбофилии у больных ишемическим инсультом молодого и среднего возраста. Для исследования были выбраны описанные в литературе полиморфизмы генов-кандидатов ишемического поражения головного мозга: мутация 20210G>A гена FII, мутация 1691G>A гена FV, мутация 10976G>A гена FVII, мутация –455G>A гена FGB, мутация -675 5G>4G гена PAI-1, мутация 807C>T гена ITGA2, мутация 1565T>C гена ITGB3. Установлено, что генетическая предрасположенность к тромбофилическим состояниям играет существенную роль в развитии ишемического инсульта у людей молодого и среднего возраста. Так, у каждого из обследованных нами пациентов с ишемическим инсультом указанных групп выявлен «мутантный» генотип хотя бы в одном из исследованных генов системы гемостаза. Анализ полученных результатов показал статистически значимое преобладание мутантных аллелей в генах FGB, PAI-1, ITGA2, ITGB3. Наиболее часто встречаемыми полиморфными вариантами исследованных генов в группе больных с ишемическим инсультом по сравнению с группой контроля являются следующие: генотип G/A гена F5 (Лейденская мутация), генотип G/A гена фибриногена, генотип 5G/4G гена-ингибитора активатора плазминогена.

Ключевые слова: гены-кандидаты, факторы риска, ишемический инсульт, тромбофилия.

ANALYSIS OF POLIMORPHISM OF HEMOSTASIS SYSTEM GENES IN OCCURRENCE OF ACUTE BRAIN ISCHEMIA IN YOUNG AND MIDDLE AGE PATIENTS

Ovsyannikova A.N., Mashin V.V., Belova L.A., Saenko Y.V., Vasitsky N.R.,
Abramova V.V.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation (432017, 42, Lva Tolstogo street),
e-mail: anna-ovs73@mail.ru

By studying of genetic polymorphism of hemostasis system associated with increased risk of thrombophilia in young and middle age patients with ischemic stroke, analysis of genetic risk factors of acute brain ischemia was carried out. Polymorphisms of candidate genes of ischemic lesion are described in literature: gene FII mutation 20210G>A, gene FV mutation 1691G>A, gene FVII mutation 10976G>A, gene FGB mutation -455G>A, gene PAI-1 mutation -675 5G>4G, gene ITGA2 mutation 807C>T, gene ITGB3 mutation 1565T>C were selected for research. Concluded that genetic susceptibility to thrombophilic conditions plays a large role in ischemic stroke in young and middle age patients. In every patient with ischemic stroke in indicated groups we have studied mutant genotype was detected at least in one of examined genes of hemostasis system. Data analysis revealed statistically significant prevalence of mutant alleles in genes FGB, PAI-1, ITGA2, ITGB3. In group of patients with ischemic stroke in comparison with control group most frequent polymorphic variants of examined genes are: gene F5 genotype G/A (Leyden mutation), fibrinogen gene genotype G/A, gene-inhibitor of activator of plasminogen genotype 5G/4G.

Keywords: candidate genes, risk factors, ischemic stroke, thrombophilia.

Острые нарушения мозгового кровообращения являются важнейшей медико-социальной проблемой во всех экономически развитых странах, занимая лидирующие позиции по заболеваемости, смертности и инвалидизации населения во всем мире. По данным НИИ неврологии РАМН, ежегодно инсульт поражает около 6 млн человек в мире, в России – более 400 тысяч. Основную часть этих случаев, как в нашей стране, так и в других развитых странах мира составляет ишемический инсульт. Летальность в остром периоде инсульта в

России достигает 35 %, увеличиваясь на 12–15 % к концу первого года после перенесенного инсульта [1]. Наряду с высокой смертностью нарушения мозгового кровообращения являются ведущей причиной инвалидизации у взрослых, обуславливая до 80 % частичной и до 10 % полной нетрудоспособности [8]. В последние годы отмечается рост распространенности заболеваний острыми нарушениями мозгового кровообращения, при этом увеличивается распространенность инсульта, особенно среди лиц трудоспособного возраста – до 65 лет [3]. Таким образом, церебральный инсульт несет тяжелые моральные, социальные и экономические последствия.

Разработка и осуществление активных государственных стратегий в отношении охраны здоровья является перспективной задачей во многих странах мира, особенно в связи с прогнозируемым дальнейшим ростом заболеваемости инсультом [4]. В настоящее время установлено, что реальное снижение заболеваемости и смертности от инсульта возможно только в результате проведения научно обоснованной первичной и вторичной профилактики. Известно, что большинство ишемических инсультов относятся к мультифакторным заболеваниям, их развитие, клиническое течение и исход во многом обусловлены комплексным влиянием факторов внешней среды и наследственной предрасположенностью. В связи с этим исследования случаев ишемического инсульта и факторов риска его развития представляют несомненный научный и практический интерес.

Одной из актуальных проблем современного здравоохранения является выяснение молекулярно-генетических основ развития сердечно-сосудистых заболеваний. В последние годы в связи с развитием методов молекулярной генетики интенсивно изучаются генетические факторы риска ишемического инсульта. При этом основным направлением генетических исследований является изучение ассоциаций генов-кандидатов с риском развития заболевания. В первую очередь это гены, продукты которых либо вовлечены в липидный гомеостаз, либо оперируют в системе свертывания крови, или влияют на физиологию стенки сосудов. В основе развития ишемического инсульта лежат два основных процесса – атеросклероз и тромбоз церебральных артерий [5]. При этом следует обратить внимание на тот факт, что атеросклеротические изменения сосудов более характерны для лиц пожилого возраста, у молодых пациентов большой вклад в формирование патологии вносят нарушения в системе коагуляции, приводящие к повышенному тромбообразованию [2].

Исходя из вышеизложенного, следует подчеркнуть, что полиморфизм генов системы гемостаза играет существенную роль в этиологии ишемического инсульта. Обнаружение биохимических или генетических маркеров тромбофилических состояний позволяет значительно повысить возможности проведения адекватного патогенетического лечения и профилактики острых нарушений мозгового кровообращения, прежде всего у лиц молодого трудоспособного возраста, что имеет важное медицинское и социальное значение.

Цель исследования: анализ генетических факторов риска острой ишемии мозга путем исследования мутаций в генах системы гемостаза у больных ИИ молодого и среднего возраста.

Материалы и методы

Обследовано 108 больных в остром периоде ишемического инсульта в возрасте от 23 до 60 лет включительно, находящихся на лечении в неврологическом отделении для больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения Государственного учреждения здравоохранения Центральной Клинической Медико-санитарной части города Ульяновска с 2012 по 2014 г. В числе обследованных было 42 женщины (38,9 %) и 66 мужчин (61,1 %). Средний возраст обследуемых пациентов составил $55,65 \pm 7,43$. В группе женщин средний возраст $56,12 \pm 6,02$, в группе мужчин $55,32 \pm 8,32$.

Все больные подверглись тщательному клинико-инструментальному обследованию, включающему в себя физикальное обследование, исследование соматического и неврологического статусов, лабораторную и клинико-инструментальную диагностику.

Оценка степени тяжести ишемического инсульта проводилась с использованием шкалы тяжести инсульта Национальных институтов здоровья США (the National Institutes of Health Stroke Scale-NIHSS) с интерпретацией результатов данной шкалы по критериям L.B. Goldstein et al. [7].

Диагноз ишемического инсульта у всех пациентов подтверждался методом нейровизуализации (всем пациентам проводилась КТ головного мозга в первые 24 часа от момента развития симптомов).

Группу контроля составили 60 практически здоровых людей славянской популяции, не имеющих цереброваскулярной патологии, по полу и возрасту сопоставимых с группой обследованных больных.

Молекулярно-генетическое исследование проводилось в лаборатории НИИ Ульяновского государственного университета. Экстракция геномной ДНК проводилась из лейкоцитов замороженной венозной крови с использованием набора Ампли Прайм ДНК-сорб-АМ. Генетические полиморфизмы определяли с использованием комплекта реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития тромбофилии методом ПЦР в режиме реального времени «КардиоГенетика Тромбофилия» (ДНК-Технология). ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе в реальном времени CFX96.

Проводился анализ полиморфизмов генов, кодирующих белки системы свертывания крови и гемостаза. Для исследования нами были выбраны описанные в литературе мутации генов-кандидатов ишемического поражения головного мозга: мутация 20210G>A гена FII, мутация 1691G>A гена FV, мутация 10976G>A гена FVII, мутация -455G>A гена FGB,

мутация -675 5G>4G гена PAI-1, мутация 807C>T гена ITGA2, мутация 1565T>C гена ITGB3.

Результаты и обсуждения

При анализе распределения полиморфных вариантов исследуемых генов системы гемостаза в группе обследованных больных с ишемическим инсультом было выявлено статистически значимое преобладание мутантных аллелей в генах FBG, PAI-1, ITGA2, ITGB3 по сравнению с генами F2, F5, F7. При этом достоверных различий по частоте встречаемости мутантных аллелей в генах FBG, PAI-1, ITGA2, ITGB3 выявлено не было ($p > 0,05$).

Мутация G1691A (Лейденская) в гене V фактора свертывания крови. Функция коагуляционного фактора V заключается в активизации реакции образования тромбина из протромбина. Полиморфизм (1691 G> A) гена F5 обусловлен заменой нуклеотидного основания гуанина (G) на аденин (A) в положении 1691, что приводит к аминокислотной замене аргинина на глутамин в позиции 506. Замена аминокислоты придает устойчивость активной форме фактора Лейдена к расщепляющему действию регулирующего фермента, что приводит к гиперкоагуляции крови. Носители варианта A обладают повышенной склонностью к развитию сосудистых тромбозов, являющихся фактором риска венозных и артериальных тромбоэмболий, инфаркта миокарда и инсульта. Гетерозиготными носителями Лейденской мутации являются 4–6 % европейского населения, причем риск тромбообразования увеличивается в 3–7 раз при гетерозиготном и в 80 раз при гомозиготном носительстве.

При анализе Лейденской мутации (G1691A) были выявлены статистически значимые различия в общем распределении наблюдаемых генотипов между группой больных с ИИ и контрольной группой. При сопоставлении частот отдельных генотипов нами установлено, что гетерозиготное носительство Лейденской мутации (генотип G/A) достоверно чаще встречается в группе больных с ИИ-50 %, по сравнению с контрольной группой – 16,7 % ($p = 0,0293$).

Мутация G10976A в гене VII фактора свертывания крови. Ген *F7* кодирует фактор свертывания крови VII (проконвертин, F7) – К-витамин зависимый профермент, продуцирующийся в печени. Основной физиологической ролью F7 является активация фактора свертывания крови X (F10). Изменения в гене *F7* в большинстве случаев имеют протективный эффект относительно риска развития тромбоэмболии. Замена гуанина (G) на аденин (A) в позиции 10976 (генетический маркер G10976A) приводит к изменению биохимических свойств фактора VII, в котором происходит замена аминокислоты аргинин на глутамин. Снижение активности F7 в результате замены способствует уменьшению тромбообразования. Генотип A/A является причиной снижения активности фермента F7 на 72 %, по сравнению с диким типом (генотип G/G).

При сравнении наблюдаемых частот генотипов гена протромбина (F7) в группе

больных и группе контроля были выявлены статистически значимые различия в общем распределении генотипов. При сопоставлении частот отдельных генотипов выявлено статистически значимое преобладание генотипа G/G в группе контроля по сравнению с группой больных ИИ. Так, в группе контроля генотип G/G был выявлен у всех обследованных лиц-100%, тогда как в группе больных ИИ данный генотип встречался у 58,2 % больных ($p=0,0001$). В то же время выявлены статистически значимые различия по частоте встречаемости гетерозиготного носительства G10976A в гене протромбина (мутантный генотип G/A). В группе больных с ИИ данный генотип был выявлен у 33,3 % больных, тогда как в контрольной группе ни у кого из обследованных данная мутация не выявлена ($p=0,0203$). Гомозиготный мутантный генотип A/A, ассоциированный со снижением риска тромбообразования, встречался в группе больных с ИИ у 8,3 % больных, тогда как в контрольной группе ни у кого из обследованных данный генотип не выявлен. Но различия между группами не достигают уровня статистической значимости ($p>0,05$).

Мутация G455A в гене фибриногена. Ген фибриногена кодирует аминокислотную последовательность бета-цепи фибриногена, который одно из главных мест в свертывающей системе крови. Полиморфизм -148C>T гена фибриногена представляет собой нуклеотидную замену цитозина(C) на тимин (T) в промоторном участке гена. Данный полиморфизм сопровождается повышенной экспрессией гена, что приводит к увеличению содержания фибриногена в крови и повышает вероятность образования тромбов, что способствует увеличению риска тромбоза мозговых сосудов. При анализе мутации G455A гена фибриногена нами были выявлены статистически значимые различия в общем распределении наблюдаемых генотипов между группой больных с ИИ и группой контроля. При сопоставлении частот отдельных генотипов установлено, что в группе больных с ИИ по сравнению с группой контроля достоверно чаще встречается гетерозиготное носительство (мутантный генотип G/A) – у 55,6 % больных, в группе контроля данный генотип выявлен у 33,3 % обследованных лиц ($p=0,0394$). Гомозиготный мутантный аллель A/A был выявлен только в группе больных с ИИ и встречался у 5,5 % обследованных больных, тогда как в группе контроля ни у кого из обследованных данная мутация не выявлена. Различия между группой больных и группой контроля в распределении мутантного генотипа A/A статистически не значимы ($p>0,05$).

Мутация 5G(-675)4G в гене SERPINE1(PAI-1). Ген SERPINE1 кодирует белок – эндотелиальный ингибитор активатора плазминогена-1 (ИАП-1), принадлежащий семейству серпинов. Белок ИАП-1 ингибирует работу тканевого активатора плазминогена и урокиназы, которые в свою очередь активируют переход плазминогена в плазмин, расщепляющий фибрин тромбов. Таким образом, SERPINE1 негативно воздействует на фибринолиз и препятствует растворению тромбов, что повышает риск сосудистых осложнений, различных

тромбоэмболий. Полиморфизм 5G(-675)4G проявляется в изменении количества повторов гуанина (G) в промоторной (регуляторной) области гена. Гомозиготная мутация 4G/4G полиморфизма – 675 4G/5G является фактором риска для развития тромбозов, инфаркта миокарда, ишемического инсульта. Распространенность гомозиготной формы 4G/4G в европейских популяциях составляет 5–8 %. При анализе мутации 5G(-675)4G в гене ингибитора активатора плазминогена были выявлены статистически значимые различия в общем распределении наблюдаемых частот генотипов между группой больных с ИИ и группой популяционного контроля. При сопоставлении частот отдельных генотипов установлено, что гетерозиготное носительство 5G(-675)4G, а именно генотип 5G/4G достоверно часто встречался в группе больных с ИИ-63,9 % по сравнению с группой контроля 33,3 % ($p=0,0078$). Гомозиготный мутантный генотип 4G/4G, ассоциированный с наибольшим риском тромбообразования, встречался у 2,7 % больных с ИИ, тогда как в группе контроля ни у кого из обследованных данный генотип не выявлен. Данные различия между группами по частоте встречаемости генотипа 4G/4G статистически не значимы ($p=0,29$). Также было установлено, что носители «нейтрального» генотипа 5G/5G достоверно чаще встречаются в группе контроля – у 66,7 % больных, по сравнению с группой больных ИИ 33,3 % обследованных больных.

Мутация С807Т в гене ITGA2. Ген ITGA2 кодирует белок-альфа-2-мембранный гликопротеин, известный как GPIa, экспрессирующийся на мембранах различных клеток. Полиморфизм С807Т представляет собой нуклеотидную замену цитозина (С) на тимин (Т) в позиции 807. Наличие Т-аллеля ассоциируется с увеличением скорости адгезии тромбоцитов, что может являться фактором риска тромбофилии. При анализе полиморфизма С807Т гена ITGA2 статистически значимых различий в общем распределении наблюдаемых частот генотипов между группой больных с ИИ и группой контроля не выявлено. При сопоставлении частот отдельных генотипов установлено, что «нейтральный» генотип С/С встречается с одинаковой частотой как в группе больных с ИИ, так и в группе контроля, по 33,3 % обследованных. Статистически значимых различий между группами больных и контроля в распределении «мутантных» генотипов С/Т и Т/Т нами также выявлено не было.

Мутация Т1565С в гене ITGB3. Ген ITGB3 кодирует белок интегрин бета-3 (ITGB3) –мембранный гликопротеин, известный как тромбоцитарный гликопротеин IIIa. На мембране тромбоцитов GPIIIa образует комплекс с GPIIb, представляющий собой тромбоцитарный рецептор фибриногена. Полиморфизм Т1565С обусловлен заменой тимина (Т) на цитозин (С) в позиции 1565. В результате такой замены меняются биохимические свойства белка GPIIIa, в котором аминокислота лейцин замещается на пролин в позиции 59 (Leu59Pro). Тромбоциты носителей С аллеля имеют повышенную склонность к агрегации, что может являться увеличением риска тромбообразования, приводящего к сердечно-сосудистой патологии. При

анализе полиморфизма T1565C в гене ITGB3 выявлены статистически значимые различия в общем распределении наблюдаемых частот генотипов между группой больных с ИИ и группой популяционного контроля. При сопоставлении частот отдельных генотипов установлено, что гомозиготное носительство «нейтрального» генотипа ТТ отмечается у 36,1 % больных с ИИ, тогда как в контрольной группе ни у кого из обследованных лиц данный генотип не выявлен ($p=0,0147$). В то же время «мутантный» гетерозиготный аллель С/Т достоверно чаще встречался в группе контроля – у 66,7 % обследованных лиц, по сравнению с группой больных ИИ- 33,3 % ($p=0,0021$). Статистически значимых различий между группами в распределении мутантного генотипа С/С выявлено не было.

Таким образом, анализируя полученные результаты, можно отметить следующее:

1. Генетическая предрасположенность к тромбофилическим состояниям играет существенную роль в развитии острой ишемии мозга у пациентов молодого и среднего возраста. Так, у каждого из обследованных нами пациентов с ИИ указанных групп выявлен «мутантный» генотип хотя бы в одном из исследованных генов системы гемостаза.
2. Наиболее часто встречаемыми полиморфными вариантами исследованных генов системы гемостаза в группе больных с ИИ по сравнению с контрольной группой являются следующие: генотип G/A гена F5 (Лейденская мутация); генотип G/A гена фибриногена, генотип 5G/4G гена-ингибитора активатора плазминогена.
3. Полиморфные варианты гена F7 (G/A, A/A), имеющие протективный эффект относительно риска развития тромбоэмболии, были выявлены только в группе больных с ИИ.

Список литературы

1. Варякин Ю.Я. Эпидемиологические аспекты профилактики нарушений мозгового кровообращения. Атмосфера. Нервные болезни, 2005; 2: 4-10.
2. Кобылина О.В., Гехт А.Б., Фаворова О.О., Гусев Е.И., Николаева Т.Я. Генетические аспекты ишемического инсульта // Инсульт, приложение к Журналу неврологии и психиатрии им. Корсакова. 2008. № 23. С. 49 – 55.
3. Котова Е.Ю. Основные эпидемиологические характеристики инсульта и дополнительные методы обследования больных инсультом в г. Ульяновске (по данным Регистра инсульта) / Е.Ю. Котова, В.В. Машин // Бюллетень сибирской медицины. 2008. № 5. Т.3:179.
4. Суслина З.А., Танашян М.М., Ионова В.Г., Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антиромботическая терапия. М., 2005. 246с.
5. Танашян М.М., Хамидова З.М., Лагода О.В. Гемореологические характеристики у пациентов с прогрессирующим атеросклерозом магистральных артерий головы // Труды II-го

Национального конгресса «Неотложные состояния в неврологии», Москва, 30 ноября – 1 декабря 2011 г. С. 232.

6. Alberts M.J. Secondary prevention of stroke and expanding role of the neurologist. *Cerebrovascular Diseases*, 2002; 13 (Suppl. 1): 12-16.

7. Brott T. et al. Measurements of acute cerebral infarction examination scale. *Stroke*, 1989; 20:964-690.

8. Goldstein L. et al. Interrater reliability of the NIH Stroke Scale. *Arch.Neurol.*, 1989; 46: 660-622.

Рецензенты:

Машин В.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой неврологии, нейрохирургии, физиотерапии и ЛФК ИМЭиФК ГОУ ВПО УлГУ, г. Ульяновск.

Белова Л.А., д.м.н., профессор кафедры неврологии, нейрохирургии, физиотерапии и ЛФК ИМЭиФК ГОУ ВПО УлГУ, г. Ульяновск.