

РОЛЬ ГЕНА CSK В РАЗВИТИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Платунова И.М.¹, Никулина С.Ю.¹, Чернова А.А.¹, Прокопенко С.В.¹, Никулин Д.А.²

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, e-mail: nicoulina@mail.ru;

²ФГБУЗ «Сибирский клинический центр» ФМБА России, Красноярск

С целью изучения прогностической роли ОНП-маркера rs1378942 гена CSK в развитии ишемического инсульта проведено обследование 194 пациентов с ишемическим инсультом (118 мужчин и 76 женщин, средний возраст 55,06±9,40 лет) и 157 здоровых лиц (106 мужчин и 51 женщина, средний возраст 58,2±7,09 лет). Диагноз острого нарушения мозгового кровообращения устанавливался на основании совокупности данных, полученных в ходе сбора анамнеза, данных физикального осмотра, исследования соматического и неврологического статуса, биохимических показателей крови и клинико-инструментальной диагностики, согласно национальному стандарту Российской Федерации. Группа контроля была сформирована НИИ СО РАМН в ходе международного проекта HAPIEE. В результате исследования установлено статистически значимое преобладание гетерозиготного генотипа AC rs1378942 гена CSK в группе больных с инсультом по сравнению с группой контроля. Носительство гомозиготного распространенного генотипа AA и аллеля A полиморфизма rs 1378942 гена CSK имеет протективное значение в генезе развития ишемического инсульта.

Ключевые слова: ген CSK, ишемический инсульт, атеротромботический инсульт, генетическая предрасположенность, однонуклеотидный полиморфизм, мультифакторное заболевание

THE ROLE OF CSK GENE IN THE DEVELOPMENT OF ISCHEMIC STROKE

Platunova I.M.¹, Niculina S.Yu.¹, Chernova A.A.¹, Prokopenko S.V.¹, Niculin D.A.²

¹Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V. F. Voyno-Yasenetsky of the Health Ministry Russian Federation, Krasnoyarsk, e-mail: nicoulina@mail.ru;

²Siberian clinical center of Russian FMBA, Krasnoyarsk

To study the prognostic role of SNP-marker rs1378942 CSK gene in development of ischemic stroke were examined 194 patients with ischemic stroke (118 men and 76 women, average age 55,06±9.40 years) and 157 healthy individuals (106 men and 51 women, average age 58.2±7.09 years). The diagnosis of stroke were established on the anamnesis data, data of physical examination, investigation of somatic and neurological status, blood biochemical indicators and clinical and instrumental diagnosis, according to the national standard of the Russian Federation. The control group was formed by the research Institute of SD RAMS during the international project HAPIEE. The study showed a statistically significant predominance of the heterozygous genotype of AC rs1378942 CSK gene in the group of patients with stroke compared with control group. Carriers of the homozygous common genotype AA and allele A of polymorphism rs 1378942 CSK gene has protective significance in the development of ischemic stroke.

Keywords: gene CSK, ischemic stroke, atherothrombotic stroke, genetic predisposition, single nucleotide polymorphism, multifactorial disease

Заболееваемость инсультом и смертность от него в Сибири являются одними из самых высоких в мире [2]. Тенденция роста заболеваемости направлена с запада на восток и с юга на север [3, 7].

Понятие «инсульт» невозможно определить как самостоятельное заболевание, так как в основе его лежит множество причин, влияющих на его развитие. К ним относятся как внешние (средовые) факторы, так и индивидуальные генетические особенности. Сложность патогенеза инсульта обусловлена его многофакторной природой [1, 6].

Поиск генетических предикторов развития инсультов в настоящее время ведется активно во всех развитых странах, и данное направление признано приоритетным, о чем

свидетельствуют многочисленные исследования, направленные на выявление генетических факторов риска развития мультифакторных заболеваний [5, 4, 11, 15].

В качестве генетического предиктора развития ишемического инсульта (ИИ) у больных ГБ был изучен однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) *rs1378942* гена *CSK*. Этот ген расположен на 15-й хромосоме в локусе 15q24.1. ОНП маркер *rs 1378942* гена *CSK* локализован в интроне. Данный ген кодирует различные семейства тирозинкиназ [14]. Ферменты тирозинкиназ играют важную роль в регуляции клеточного роста и дифференцировке нормальных клеток. Нарушение экспрессии гена *CSK* влечет за собой увеличение активности *scK*-тирозинкиназы. Тирозинкиназы представляют собой семейство протеинкиназ — натрийуретических пептидов, катализирующих перенос концевой фосфата с молекулы АТФ на гидроксильную группу остатка тирозина в молекулах клеток-мишеней, которые представлены клетками сердечно-сосудистой системы, почек, эндокринных органов и центральной нервной системы [10, 13].

В нескольких крупных исследованиях изучалось влияние полиморфизма *rs1378942* гена *CSK* на развитие различных патологических процессов [9]. Исследования, проведенные на популяциях Японии, Восточной Азии и Европы, выявили взаимосвязь полиморфизма *rs1378942* гена *CSK* с развитием ГБ [12]. В Российской Федерации также подтверждена роль данного полиморфизма гена *CSK* в формировании ГБ [8].

Однако изучение влияния указанного полиморфизма на развитие ишемического инсульта в России ранее не проводилось.

Цель исследования: изучить прогностическую роль ОНП-маркера *rs1378942* гена *CSK* в развитии ишемического инсульта.

Материал и методы исследования

С целью изучения прогностической роли ОНП-маркера *rs1378942* гена *CSK* в исследование были включены 194 пациента с ишемическим инсультом (основная группа) и 157 пациентов без артериальной гипертензии (контрольная группа). Все пациенты основной группы были взяты в исследование в остром периоде инсульта – до 20 суток от момента начала сосудистого события. Основную группу составили представители европеоидной расы, жители города Красноярск, госпитализированные в первичный территориальный сосудистый центр «КГБУЗ КМКБ № 20 им. И.С. Берзона» за период 2010–2011 гг. В исследование были включены 194 больных с инсультом (118 мужчин, средний возраст $54,56 \pm 9,52$ лет, и 76 женщин, средний возраст $55,84 \pm 9,23$ лет) в возрасте от 21 до 70 лет (средний возраст $55,06 \pm 9,40$ лет). Диагноз «острый инсульт» устанавливался на основании совокупности данных, полученных в ходе сбора анамнеза, данных физикального осмотра, исследования соматического и неврологического статуса, биохимических показателей крови

и клинико-инструментальной диагностики, согласно национальному стандарту Российской Федерации (протокол ведения больных с инсультом от 01.09.2009 г.).

Группа контроля была сформирована НИИ СО РАМН в ходе международного проекта НАРИЕЕ (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe). Программа исследования включала: измерение артериального давления, антропометрию (рост, вес, объем талии, бедер), социально-демографические характеристики, опрос о курении, употреблении алкоголя (частота приема и типичная доза), уровень физической активности, оценку липидного профиля (общий холестерин, триглицериды, холестерин липопротеидов высокой плотности), опрос на выявление стенокардии напряжения согласно опроснику (ROSE), ЭКГ-покоя в 12 отведениях. Группа контроля представлена в количестве 157 человек без артериальной гипертензии (АГ) (106 мужчин и 51 женщина). В этой группе каждые 6 месяцев по данным двух и более исследований в течение нескольких лет с интервалом не менее 6 месяцев зафиксировано артериальное давление (АД) не выше «нормального». Половозрастные показатели группы контроля были сопоставимы с показателями основной группы.

Молекулярно-генетическое исследование проводили в ФГБУ «НИИ терапии и профилактической медицины» СО РАМН г. Новосибирска. Геномную ДНК выделяли из 5–10 мл периферической крови по стандартной методике с использованием протеиназы с последующей экстракцией фенол-хлороформом. Полиморфизм гена тестировали с помощью ПЦР в реальном времени в соответствии с протоколом фирмы-производителя (зонды TaqMan, Applied Biosystems, США) на приборе АВ 7900НТ.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась в программе SPSS, версии 20.0. Описательная статистика результатов исследования представлена для качественных признаков в виде процентных долей и их стандартных ошибок доли, для количественных – в виде средних арифметических и стандартных отклонений. Проверка нормальности распределения значений переменных в группах наблюдения проводилась с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Значимость различий качественных признаков в группах наблюдения оценивали при помощи непараметрического критерия χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность. При частоте встречаемости признака 5 и менее использовался точный критерий Фишера. Различия во всех случаях оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа rs1378942 гена *CSK* среди больных с инсультом и в контрольной группе представлены в таблице 1. Частота гомозиготного генотипа AA по распространенному аллелю у больных с инсультом составила $28,4\% \pm 3,3$, гетерозиготного

генотипа — АС $52,5\% \pm 3,7$ и гомозиготного генотипа СС по редкому аллелю – $19,1\% \pm 2,9$. В контрольной группе $40,1\% \pm 3,9$ являлись носителями гомозиготного генотипа АА по распространенному аллелю, $39,5\% \pm 3,9$ – носителями гетерозиготного генотипа АС и $20,4\% \pm 3,2$ – носителями гомозиготного генотипа СС по редкому аллелю гена *CSK*.

Как следует из представленных данных, доказано статистически значимое снижение количества носителей гомозиготного генотипа АА по распространенному аллелю у больных с инсультом ($28,4\% \pm 3,3$) по сравнению с контролем ($40,1\% \pm 3,9$). Также выявлено статистически значимое преобладание гетерозиготного генотипа АС в группе больных с инсультом ($52,5\% \pm 3,7$) в сравнении с контрольной группой ($39,5\% \pm 3,9$) (табл. 1).

Вероятно, носительство гомозиготного распространенного генотипа АА и аллеля А полиморфизма rs 1378942 гена *CSK* имеет протективное значение в генезе развития ишемического инсульта.

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма rs1378942 гена *CSK* среди больных с инсультом и группы контроля

Генотипы:	Инсульт (n=183)		Контроль (n=157)		p
	n	%±m	n	%±m	
АА	52	28,4±3,3	63	40,1±3,9	0,031
АС	96	52,5±3,7	62	39,5±3,9	0,023
СС	35	19,1±2,9	32	20,4±3,2	0,878
Аллели:					
Аллель А	200	54,6±2,6	188	59,9±2,8	0,195
Аллель С	166	45,4±2,6	126	40,1±2,8	0,195
ОШ; 95% ДИ ОШ	0,807; 0,595–1,096				
Генотип АА	52	28,4±3,3	63	40,1±3,9	0,031
Генотипы АС+СС	131	71,6±3,3	94	59,9±3,9	0,031
ОШ; 95% ДИ ОШ	1,688; 1,074–2,655				

Примечание: p — уровень значимости при сравнении распределения генотипов с контрольной группой

Проведен анализ распределения генотипов гена *CSK* среди женщин, имеющих инсульт. По результатам исследования установлено, что различия в носительстве гетерозиготного генотипа АС гена *CSK* среди женщин с инсультом ($47,2\% \pm 5,9$) по сравнению с контрольной группой ($29,4\% \pm 6,4$) статистически незначимы.

Проведено сравнение распределения генотипов гена *CSK* среди 111 мужчин, имеющих

инсульт, и 106 мужчин из группы контроля. Так, частота гомозиготного генотипа AA по распространенному аллелю у мужчин с инсультом составила $26,1\% \pm 4,2$, гетерозиготного генотипа AC – $55,9\% \pm 4,7$ и гомозиготного генотипа CC по редкому аллелю – $18,0\% \pm 3,6$. При исследовании частоты встречаемости генотипов и аллелей статистически значимых различий не выявлено.

При выделении в отдельную группу больных с атеротромботическим подтипом ишемического инсульта ($n=130$) частота носителей гомозиготного генотипа AA по распространенному аллелю составила $28,5 \pm 4,0$, а гетерозиготного генотипа AC — $52,3 \pm 4,4$, по гомозиготному редкому генотипу — $19,2 \pm 3,5$. В сравнении с группой контроля, где эти же генотипы были распределены следующим образом: AA ($40,1 \pm 3,9$), AC ($40,1 \pm 3,9$) и CC ($19,7 \pm 3,2$), статистически значимых различий при сравнении в этих группах выявлено не было.

При дальнейшем разделении групп больных с ишемическим атеротромботическим инсультом, учитывая гендерные различия, получены следующие данные. Установлено статистически значимое преобладание носителей гетерозиготного генотипа AC в группе женщин с ишемическим атеротромботическим инсультом — $51,9 \pm 6,9$ по сравнению с женщинами группы контроля — $28,0 \pm 6,3$ (табл. 2).

Обращая на это внимание, можно предположить, что носительство гетерозиготного генотипа AC полиморфизма rs1378942 гена CSK является генетическим фактором риска развития атеротромботического подтипа ишемического инсульта у женщин.

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма rs1378942 гена CSK среди женщин с ишемическим атеротромботическим инсультом и группы контроля

Генотипы:	Женщины с ишемическим атеротромботическим инсультом ($n=52$)		Контроль ($n=50$)		p
	n	$\% \pm m$	n	$\% \pm m$	
AA	16	$30,8 \pm 6,4$	24	$48,0 \pm 7,1$	0,114
AC	27	$51,9 \pm 6,9$	14	$28,0 \pm 6,3$	0,024
CC	9	$17,3 \pm 5,2$	12	$24,0 \pm 6,0$	0,555
Аллели:					
Аллель А	59	$56,7 \pm 4,9$	62	$62,0 \pm 4,9$	0,533
Аллель С	45	$43,3 \pm 4,9$	38	$38,0 \pm 4,9$	0,533
ОШ; 95% ДИ ОШ	0,804; 0,459–1,407				

Генотип АА	16	30,8±6,4	24	48,0±7,1	0,075
Генотипы АС+СС	36	69,2±6,4	26	52,0±7,1	0,075
ОШ; 95% ДИ ОШ	0,481; 0,214–1,081				

Примечание: p — уровень значимости при сравнении распределения генотипов с контрольной группой; p^* — уровень значимости, достигнутый точным критерием Фишера

В выделенной группе мужчин с ишемическим атеротромботическим инсультом не установлено статистически значимых различий ни по одному генотипу.

При анализе полиморфизма rs1378942 гена *CSK* среди больных с ишемическим лакунарным инсультом и контрольной группы получены следующие результаты. Частота гомозиготного генотипа АА по распространенному аллелю у больных с лакунарным ишемическим инсультом составила 30,8%±7,4, гетерозиготного генотипа АС – 56,4%±7,9 и гомозиготного генотипа СС по редкому аллелю гена *CSK* – 12,8% ±5,4. В контрольной группе 40,1%±3,9 являлись носителями гомозиготного генотипа АА по распространенному аллелю, 40,1%±3,9 – носителями гетерозиготного генотипа АС и 19,7%±3,2 – носителями гомозиготного генотипа СС по редкому аллелю гена *CSK*. По результатам нашего исследования статистически значимых различий не выявлено.

Частота носителей аллеля А гена *CSK* среди женщин с лакунарным ишемическим инсультом составила 56,7±9,0, у группы контроля – 62,0±4,9. Частоты носителей аллеля С гена *CSK* распределились следующим образом: женщины с лакунарным ишемическим инсультом – 43,3±9,0 и контрольная группа – 38,0±4,9. Не выявлено статистически значимых отличий ни по одному генотипу между женщинами с лакунарным инсультом и женщинами группы контроля.

Частота носителей аллеля А гена *CSK* среди мужчин с лакунарным ишемическим инсультом составила 60,4±7,1, у группы контроля – 59,3±3,4. Частоты носителей аллеля С гена *CSK* распределились следующим образом: мужчины с лакунарным ишемическим инсультом – 39,6±7,1 и контрольная группа – 40,7±3,4. Не выявлено статистически значимых отличий ни по одному генотипу между мужчинами с лакунарным инсультом и мужчинами группы контроля.

В нескольких крупных исследованиях изучалось влияние полиморфизма rs1378942 гена *CSK* на развитие различных патологических процессов. Исследования, проведенные на популяциях Японии и Восточной Азии, показали взаимосвязь полиморфизма rs1378942 гена *CSK* с ГБ. Была установлена ассоциация носительства гомозиготного генотипа АА распространенного аллеля А с риском ГБ (ОШ=1,09 95%ДИ 0,98–1,22), одномоментно на этой же популяции изучался уже упомянутый полиморфизм rs1004467 гена *CYP17A1*, у

которого также была выявлена ассоциативная связь носительства гомозиготного генотипа АА с риском ГБ (ОШ 1,30 95% ДИ 1,07–1,25). Российские исследования установили ассоциативную связь гетерозиготного генотипа АС rs1378942 гена *CSK* с повышением риска артериальной гипертензии.

Полученные в нашей работе результаты перекликаются с данными российских исследований, так как нами установлено, что гетерозиготный генотип АС rs1378942 гена *CSK* значимо преобладает в группе больных с инсультом (52,5%±3,7) по сравнению с группой контроля (39,5%±3,7) (ОШ 1,688 95% ДИ 1,074–2,655).

Заключение

Установлено статистически значимое преобладание гетерозиготного генотипа АС rs1378942 гена *CSK* в группе больных с инсультом (52,2%±3,7) по сравнению с группой контроля (39,5%±3,9), ($p=0,023$), (ОШ; 95% ДИ ОШ 0,807; 0,595–1,096). Статистически значимые различия по гетерозиготному генотипу АС rs1378942 гена *CSK* получены при сравнении женщин основной группы с атеротромботическим подтипом ишемического инсульта (51,9%±6,9) по сравнению с женщинами группы контроля (28,0%±6,3), ($p=0,024$); (ОШ; 95% ДИ ОШ 0,804; 0,459–1,407).

Список литературы

1. Евзельман М.А. Генетика инсульта / М.А. Евзельман, А.С. Климушкин, Е.В. Жучкова // Учен. записки Орлов. гос. ун-та. Сер. Естеств., техн. и мед. науки. – 2009. – № 4. – С. 50–53.
2. Исследование этиопатогенеза ишемического инсульта у пациентов молодого возраста / Н.Н. Чапаева, А.Б. Терехова, С.В. Шишкин [и др.] // Медицина и образование в Сибири. – 2013. – № 4. – С. 58.
3. Комплексный анализ генетической предрасположенности к ишемическому инульту у русских / М.Г. Парфенов, Б.В. Титов, М.А. Судомоина [и др.] // Молекуляр. биология. – 2009. – Т. 43, № 5. – С. 937–945.
4. Кузнецова Т. Ю. Генетические особенности ишемического инсульта в различных этнических группах, проживающих на территории Республики Мордовия / Т.Ю. Кузнецова // Фундам. исслед. – 2014. – № 7-5. – С. 980–982.
5. Кузнецова Т.Ю. Роль генетической предрасположенности в инсульте / Т.Ю. Кузнецова, А.А. Фирсов // Мед. альм. – 2013. – № 1(25). – С. 109–110.
6. Статус метилирования гена *CDNK2A* (P16^{INK4A} и P14^{ARF}) в тканях сонных артерий у больных атеросклерозом / М.С. Назаренко, А.В. Марков, А.А. Слепцов [и др.] // Мед.

генетика. – 2012. – № 2. – С. 34–37.

7. Страмбовская Н.Н. Прогностическая роль полиморфных вариантов генов-кандидатов у больных ишемическим инсультом в Забайкалье // *Фундаментальные исследования* – 2015. – № 1-1. – С. 140–144.

8. Association of common variants in/near six genes (ATP2B1, CSK, MTHFR, CYP17A1, STK39 and FGF5) with blood pressure/hypertension risk in Chinese children / B. Xi, Y. Shen, X. Zhao [et al.] // *J. Hum. Hypertens.* – 2014. – Vol. 28, № 1. – P. 32–36.

9. C-terminal Src kinase (Csk)-mediated phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) promotes proteolytic cleavage and nuclear translocation of eEF2 / Q. Yao, B. Q. Liu, H. Li [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 18. – P. 12666–12678.

10. Combining X-ray crystallography and molecular modeling toward the optimization of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as potent c-Src inhibitors active in vivo against neuroblastoma / C. Tintori, A. L. Fallacara, M. Radi [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 58, № 1. – P. 347–361.

11. Lee H. Y. Aging and arterial stiffness / H. Y. Lee, B. H. Oh // *Circ. J.* – 2010 – Vol. 74, № 11. – P. 2257–2262.

12. CYP17 polymorphism (rs743572) is associated with increased risk of gallbladder cancer in tobacco users / R. Rai, K. L. Sharma, S Misra [et al.] // *Tumour. Biol.* – 2014. – Vol. 35, № 7. – P. 6531–6537.

13. Meng Y. Locking the active conformation of c-Src kinase through the phosphorylation of the activation loop / Y. Meng, B Roux // *J. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 426, № 2. – P. 423–435.

14. Naik M. U. Junctional adhesion molecule-A suppresses platelet integrin α IIb β 3 signaling by recruiting Csk to the integrin-c-Src complex / M. U. Naik, J. L. Caplan, U. P. Naik // *Blood.* – 2014. – Vol. 123, № 9. – P. 1393–1402.

15. Polymorphisms on chromosome 9p21 confer a risk for acute coronary syndrome in a Chinese Han population / Q. Zeng, Y. Yuan, S. Wang [et al.] // *Can. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 29, № 8. – P. 940–944.