

УДК 616.831-005.4

НОВЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

¹Ковалева Е.В., ²Доронин Б.М., ¹Морозов В.В., ¹Серяпина Ю.В.

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, e-mail: seryapinajv@gmail.com;

²ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Новосибирск

Цель исследования – выявление молекулярно-генетических предикторов повышенного риска возникновения ишемического инсульта. Материалы и методы. В исследование включены пациенты с ишемическим инсультом, подтвержденным клинически и по данным МРТ (1100 человек), контрольную группу составили 500 человек без сердечно-сосудистых заболеваний. Выделение ДНК для молекулярно-генетического тестирования из цельной венозной крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции. Определение аллельных вариантов исследуемых генов проводилось методом аллель-специфичной ПЦР в RealTime-формате, а также методом ПЦР/ПДРФ диагностики. Результаты. Показано, что носительство аллеля Т полиморфного локуса С1772Т гена HIF1a статистически значительно увеличивает риск развития ОНМК по ишемическому типу, OR = 1,603 (p = 0,01058), как в гомозиготном, так и в гетерозиготном варианте генотипа. Заключение. Данные позволяют рассматривать полиморфизм HIF1a как новый молекулярно-генетический предиктор развития ишемического инсульта.

Ключевые слова: ишемический инсульт, диагностика, фактор риска, HIF1a

NEW DIAGNOSTIC MARKER OF ISCHEMIC STROKE

¹Kovaleva E.V., ²Doronin B.M., ¹Morozov V.V., ¹Seryapina Y.V.

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
Novosibirsk, e-mail: seryapinajv@gmail.com;

²Medical University Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health of Russia, Novosibirsk

The purpose – identification of molecular genetic predictors of increased risk of ischemic stroke. Materials and methods. The study included patients with ischemic stroke, confirmed clinically and by MRI (1100), the control group consisted of 500 patients without cardiovascular disease. Extraction of DNA for molecular genetic testing of whole venous blood by phenol-chloroform extraction. Determination of allelic variants of the studied genes was performed by allele-specific PCR RealTime-format, as well as by PCR / RFLP diagnosis. Results. It has been shown that carriage of allele T polymorphic locus C1772T HIF1a gene significantly increases the risk of ischemic stroke, OR = 1,603 (p = 0,01058), both homozygous and heterozygous genotypes variant. Conclusion. The data allow us to consider polymorphism HIF1a as a new molecular genetic predictor of ischemic stroke.

Keywords: ischemic stroke, diagnosis, risk factors, HIF1a

В последние годы показано, что в развитии факторов риска и возникновении сопутствующих им осложнений большую роль играют нарушения равновесия анти- и прооксидантных систем и развитие окислительного стресса [3]. Ряд сигнальных систем, в том числе связанных с фосфорилированием белков и их конформацией, с функционированием ионных каналов сосудистой стенки, находятся под сочетанным контролем ферментов перекисного окисления. Эти системы влияют на активность ряда генов – в частности генов, регулирующих синтез белков адгезии и синтазу оксида азота эндотелиальной стенки, генов, принимающих участие в воспалительном процессе и активации определенных клеточных рецепторов. Исследования, посвященные выявлению маркеров окислительного стресса при ишемическом инсульте, свидетельствуют о прямой связи наличия окисленных ме-

таболитов в крови с ухудшением прогноза при различных подтипах ИИ, а также о высокой диагностической значимости таких маркеров [4].

Предрасположенность к сосудистой патологии передается по наследству, хотя зависимость эта непрямая и обусловлена предрасположенностью родственников разных поколений к состояниям, повышающим риск инсульта. Степень риска развития инсульта зависит от количества имеющихся факторов: сочетание 2–3 из них резко увеличивает опасность острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) [2]. В последние годы выявлен ряд генетических маркеров повышенного риска возникновения ишемического инсульта (ИИ), однако фактически они ассоциированы с заболеваниями, течение которых осложняет инсульт, и их подтипами. Однако определить патофизиологический подтип ИИ

не всегда представляется возможным, кроме того, универсальные диагностические маркеры значительно увеличивают профилактическую ценность и позволяют проводить диагностику в группах с различной степенью риска. Таким образом, исходя из патофизиологических представлений об окислительном стрессе во время сосудистой катастрофы, актуально исследование генетических маркеров – полиморфных вариантов генов системы окислительного стресса – в качестве предикторов развития ишемического инсульта, а также разработка технологии рутинной диагностики, пригодной для внедрения в широкую медицинскую практику.

Наиболее интересным представляется изучение генетических маркеров патологического окислительного стресса в качестве предикторов сосудистых заболеваний и ишемического инсульта. В зарубежной литературе есть указания на ассоциации развития ИИ и более тяжелого его течения с носительством полиморфных вариантов генов глутатион-пероксидазы GPX C599T [10], гипоксия-индуцированного фактора HIF1a C1772T [9], НАДФ-Н оксидазы p22phox C242T [7], марганцевой супероксиддисмутазы MnSOD C47T [8]. Важно отметить, что носительство данных полиморфных вариантов является фактором риска не только непосредственно ишемических инсультов, но и других заболеваний сердечно-сосудистой системы, ведущих к возникновению ОНМК [7].

Внедрение молекулярно-генетических технологий диагностики ишемических инсультов в рутинную практику позволит осуществлять персонализированную диагностику, лечение и профилактику ОНМК в группах риска, увеличивать эффективность предиктивных мер в борьбе с ишемическими инсультами [1].

Цель исследования – выявление молекулярно-генетических предикторов повышенного риска возникновения ишемического инсульта.

Материалы и методы исследования

Сформированы 2 группы исследования: контрольную составили 500 пациентов без острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) в анамнезе, не имеющих нарушений артериального кровообращения, тромбофилии. Основную группу исследования составили 1100 пациентов с ишемическим инсультом различной давности. Каждый участник был индивидуально опрошен и осмотрен исследователем с последующим заполнением соответствующей исследовательской анкеты, всем участникам с клиническими признаками ОНМК проведена магнитно-резонансная томография головы и шеи, являющаяся «золотым стандартом» диагностики ише-

мических инсультов. После верификации диагноза проводили забор крови для молекулярно-генетического исследования.

Выделение ДНК для молекулярно-генетического тестирования из цельной венозной крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции [5]. Определение аллельных вариантов исследуемых генов проводилось методом генотипирования однонуклеотидных замен в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК, а также с использованием ПЦР/ПДРФ диагностики.

Частоты встречаемости аллелей и генотипов определяли прямым подсчетом. Оценка отклонения распределений генотипов изученных полиморфизмов ДНК от канонического распределения Харди – Вайнберга и анализ ассоциативных связей внутри генотипических сочетаний, а также оценку степени различий в частоте встречаемости аллелей, генотипов и межгенных комбинаций между исследуемыми группами проводили с помощью точного критерия Фишера. Расчет показателя отношения шансов (OR – oddsratio) с 95% доверительным интервалом (CI – confidenceinterval) и р-значения проводился с помощью онлайн-калькулятора, доступного в сети Интернет [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Для всех исследованных полиморфных вариантов распределение частот встречаемости генотипов соответствует равновесию Харди – Вайнберга в контрольной и в основной группах. Статистически значимых различий в частотах встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов GPX C599T, p22phox C242T и MnSOD C47T в исследуемых группах не обнаружено. Показано, что носительство аллеля Т полиморфного локуса C1772T гена HIF1a статистически значительно увеличивает риск развития ОНМК по ишемическому типу с OR = 1,603 (p = 0,01058). Для гетерозиготных носителей аллеля Т риск развития ишемического инсульта выше в 2,0 раза (p = 0,00330), а для гомозигот ТТ – в 1,9 (p = 0,00474) раза по сравнению с обладателями дикого генотипа СС.

Заключение

Результаты пилотного исследования позволяют сделать вывод о достоверном повышении риска возникновения ИИ у носителей полиморфного аллеля Т гена HIF1a C1772T. Наличие в генотипе редкого аллельного варианта HIF1a предполагает высокий риск развития ишемического инсульта, особенно при участии модифицирующих факторов риска, поэтому очевидно, что для этой категории пациентов необходимо проведение полноценных профилактических мероприятий. Кроме того, крайне важно выявление носителей молекулярно-генетических предикторов среди родственников пациента, формирование групп риска

и дальнейшее наблюдение, семейное консультирование.

Важно отметить, что исследование проведено в группе пациентов с ишемическим инсультом без разделения на патофизиологические подтипы, и выявленная степень риска у носителей полиморфизма HIF1 α является интегральной, вне зависимости от наличия иных факторов. Проведение молекулярно-генетического исследования у всех категорий пациентов с ОНМК позволяет выбрать наиболее оптимальный вид лечения, подобрать комплекс персонализированных профилактических мероприятий. Внедрение диагностики с учетом генетических – конституциональных – факторов риска востребовано в рутинной практике специалистов – неврологов, терапевтов, эндокринологов, кардиологов.

Список литературы

1. Белеванцева А.В., Лифшиц Г.И., Суховеева О.А. Предиктивная медицина социально значимых заболеваний: организационные, юридические, экономические и морально-этические аспекты // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2008. – Т. 6, № 2. – С. 6–12.
2. Белкин А.А., Волкова Л.И. Современные аспекты эпидемиологии, патофизиологии, этиологии и классификации инсульта // Медицинская наука и практика. – 2005. – № 1. – С. 2–10.
3. Кравцова Е.Ю., Соснин Д.Ю., Мартынова Г.А. Окислительная модификация белков как биохимический маркер прогноза ишемического инсульта // Медицинский альманах. – 2012. – № 21 (2). – С. 95–97.
4. Мартынов М.Ю., Ясаманова А.Н., Колесникова Т.И., Щукин И.А., Чубыкин В.И., Глухарева А.П., Авдеев С.А. Окислительный стресс у больных с мозговым инсультом // Consilium Medicum Неврология. – 2010. – № 2.
5. Bendeck M.P. Targeting Pericellular Proteolysis in Vascular Disease // Circ. Res. – 2002. – Vol. 91. – P. 861–862.
6. Case-control studies. Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and tests for association [Electronic resource]. URL: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (accessed: 22.11.2014).
7. Fearheller D.L., Brown M.D., Park J.-Y., Brinkley T.E., Basu S., Hagberg J.M., Ferrell R.E., Fenty-Stewart N.M. Exercise Training, NADPH Oxidase p22phox Gene Polymorphisms, and Hypertension // Med Sci Sports Exerc. – 2009. – № 41 (7). – P. 1421–1428.
8. Fujimoto H., Kobayashi H., Ogasawara K., Yamakado M., Ohno M. Association of the manganese superoxide dismutase polymorphism with vasospastic angina pectoris // J Cardiol. – 2010. – № 55 (2). – P. 205–210.
9. Singh N., Sharma G., Mishra V. Hypoxia inducible factor-1: its potential role in cerebral ischemia // Cell MolNeurobiol. – 2012. – № 32(4). – P. 491–507.

10. Voetsch B., Jin R.C., Bierl C., Benke K.S., Kenet G., Simioni P., Ottaviano F., Damasceno B.P., Annichino-Bizacchi J.M., Handy D.E., Loscalzo J. Promoter Polymorphisms in the Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) Gene: A Novel Risk Factor for Arterial Ischemic Stroke among Young Adults and Children. Stroke. 2007; 38 (1): 41–49.

References

1. Belevanceva A.V., Lifshic G.I., Suhoveeva O.A. Prediktivnaja medicina socialno znachimyh zabolevanij: organizacionnye, juridicheskie, jekonomicheskie i moralno-jeticheskie aspekty // Vestnik NGU. Serija: Biologija, klinicheskaja medicina. 2008. T. 6, no. 2. pp. 6–12.
2. Belkin A.A., Volkova L.I. Sovremennye aspekty jepidemiologii, patofiziologii, jetiologii i klassifikacii insulta // Medicinskaja nauka i praktika. 2005. no. 1. pp. 2–10.
3. Kravcova E.Ju., Sosnin D.Ju., Martynova G.A. Okislitel'naja modifikacija belkov kak biohimicheskij marker prognoza ishemicheskogo insulta. Medicinskij almanah. 2012; 21 (2): 95–97.
4. Martynov M.Ju., Jasamanova A.N., Kolesnikova T.I., Shhukin I.A., Chubykin V.I., Gluhareva A.P., Avdeev S.A. Okislitel'nyj stress u bolnyh s mozgovym insultom. Consilium Medicum Nevrologija. 2010; 2.
5. Bendeck M.P. Targeting Pericellular Proteolysis in Vascular Disease // Circ. Res. 2002. Vol. 91. pp. 861–862.
6. Case-control studies. Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and tests for association [Electronic resource]. URL: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (accessed: 22.11.2014).
7. Fearheller D.L., Brown M.D., Park J.-Y., Brinkley T.E., Basu S., Hagberg J.M., Ferrell R.E., Fenty-Stewart N.M. Exercise Training, NADPH Oxidase p22phox Gene Polymorphisms, and Hypertension. Med Sci Sports Exerc. 2009; 41 (7): 1421–1428.
8. Fujimoto H., Kobayashi H., Ogasawara K., Yamakado M., Ohno M. Association of the manganese superoxide dismutase polymorphism with vasospastic angina pectoris. J Cardiol. 2010; 55 (2): 205–210.
9. Singh N., Sharma G., Mishra V. Hypoxia inducible factor-1: its potential role in cerebral ischemia. Cell MolNeurobiol. 2012;32(4): 491–507.
10. Voetsch B., Jin R.C., Bierl C., Benke K.S., Kenet G., Simioni P., Ottaviano F., Damasceno B.P., Annichino-Bizacchi J.M., Handy D.E., Loscalzo J. Promoter Polymorphisms in the Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) Gene: A Novel Risk Factor for Arterial Ischemic Stroke among Young Adults and Children. Stroke. 2007; 38 (1): 41–49.

Рецензенты:

Смагин А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории лимфодетоксикации, УРАН «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск;

Шевела А.И., д.м.н., профессор, научный руководитель, АНО «Центр новых медицинских технологий в Академгородке», г. Новосибирск.