Ассоциация ДНК-маркера rs1842993 с риском развития кардиоэмболического инсульта у лиц из славянской популяции

И.М. ШЕТОВА[1]*, Д.Ю. ТИМОФЕЕВ[1], Н.А. ШАМАЛОВ[1], Е.А. БОНДАРЕНКО[2], П.А. СЛОМИНСКИЙ[2], С.А. ЛИМБОРСКАЯ[2], В.И. СКВОРЦОВА[1]

The association between the DNA marker rs1842993 and risk for cardioembolic stroke in the Slavic population

I.M. SHETOVA, D.Yu. TIMOFEEV, N.A. SHAMALOV, E.A. BONDARENKO, P.A. SLOMINSKY, S.A. LIMBORSKAYA, V.I. SKVORTSOVA

[1]Научно-исследовательский институт цереброваскулярной патологии и инсульта Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова; [1]Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва

Проведен анализ ДНК-маркеров у 950 пациентов (славян из московской популяции) с церебральным инсультом с целью выявления генетического риска заболевания в славянской популяции. Для проведения полногеномного ассоциативного анализа были отобраны больные с кардиоэмболическим инсультом. Данные по сканированию генома больных с инсультом и лиц из популяционных выборок получены с использованием микрочипа HUMANCYTOSNP12 v.2, что позволило проанализировать все образцы ДНК на панели из 301 000 однонуклеотидных полиморфных ДНК-маркеров. При проведении полногеномного сканирования был выявлен ДНК-маркер rs1842993 в перицентромерной области хромосомы 7, ассоциированный с развитием кардиоэмболического инсульта.

Ключевые слова: *кардиоэмболический инсульт, полногеномное сканирование, ДНК-маркер.*

The analysis of association between DNA markers and total stroke risk was performed in 950 Slavonic patients. Patients with cardioembolic stroke were selected for a genome-wide association study. The HUMANCYTOSNP12 v.2 microchip was used to analyze all DNA samples on a panel of 301 000 single nucleotide polymorphisms. SNP rs1842993 on chromosome 7 was found to be associated with cardioembolic stroke risk.

Key words: *cardioembolic stroke, genome-wide association study, DNA marker.*

В современной мировой практике для идентификации локусов, контролирующих сложные признаки, широко применяется полногеномное сканирование [1, 2]. Данный метод представляет собой тотальный анализ генома здоровых и больных лиц, позволяющий агностически выявить точечные мутации, называемые однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП) и потенциально влияющие на экспрессию генов и функцию белков [1]. Преимущество метода заключается в возможности выявления ранее неизвестных генов, определяющих фенотип, связанный с заболеванием, что было невозможно при кандидатном подходе [1, 3]. Частота ошибок при применении новых технологий генотипирования составляет менее 0,5% [1].

Однако необходимо учитывать стратификацию популяции, так как однонуклеотидные полиморфизмы и связанные с ними признаки чаще встречаются среди лиц одинакового происхождения. Зарубежными учеными в независимых исследованиях при церебральном инсульте еще не было выявлено ни одного отдельного локуса, оказывающего статистически значимое влияние в двух и более изолированных популяциях [1], что еще раз подчеркивает сложность взаимодействия метаболических путей, вовлеченных в патогенез инсульта.

В 2010 г. были опубликованы результаты нескольких масштабных исследований по полногеномному сканированию у больных с церебральным инсультом. Выявлено, что у лиц из китайской популяции хань минорный аллель С ОНП rs11206510 на хромосоме 1p32 ассоциирован с повышенным уровнем липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и значимым риском развития церебрального инсульта. Причем у мужчин моложе 55 лет и женщин моложе 50 лет был выявлен более высокий риск, чем в общей выборке [4].

Под эгидой International Stroke Genetics Consortium изучилось влияние на риск развития острого ишемического инсульта ОНП rs1906591 и rs10033464 на хромосоме 4q25, ассоциация которых с фибрилляцией предсердий была обнаружена в предыдущих исследованиях [5, 6]. Результаты оказались неожиданными. Подтвердилась ассоциация rs1906591 с фибрилляцией предсердий, а также с ишемическим инсультом в целом и кардиоэмболическим патоге-

© Коллектив авторов, 2012

*e-mail: shetova@gmail.com

нетическим вариантом в частности. Значимой ассоциации rs10033464 с ишемическим инсультом выявлено не было, а связь с фибрилляцией предсердий оказалась незначительной, что противоречит ранее полученным данным [7].

Ассоциация ОНП rs12425791 и rs11833579 на хромосоме 12p13 с церебральным инсультом у лиц европейского происхождения, о которой писалось несколькими годами ранее, не была подтверждена результатами метаанализа, проведенного International Stroke Genetics Consortium и Wellcome Trust Case—Control Consortium 2. Предполагается, что причиной этого является ложноположительный результат предыдущего метаанализа [8].

На кафедре фундаментальной и клинической неврологии Российского национального исследовательского медицинского университета (РНИМУ) им. Н.И. Пирогова совместно с отделом молекулярных основ генетики человека Института молекулярной генетики РАН впервые в Российской Федерации проводится полногеномное сканирование для определения индивидуального генетического риска развития церебрального инсульта у славян из московской популяции. Исследование проводится ретроспективно по типу «случай—контроль».

Цель настоящего исследования — выявить и изучить ОНП, ассоциированные с инсультом, у лиц славянской национальности из московской популяции. Конечным продуктом работы в целом должна стать диагностическая тест-система для определения индивидуальной предрасположенности к инсульту у лиц славянской национальности, позволяющая проводить скрининг на наличие распространенных маркеров в рамках одного эксперимента [1]. Создание такой тест-системы облегчит и ускорит задачу выявления лиц с высоким риском развития церебрального инсульта и поможет оптимизировать объем лечебно-профилактических мероприятий в каждом конкретном случае.

Материал и методы

В основу работы положены результаты исследования 950 больных, 473 (49,8%) мужчин и 477 (50,2%) женщин, славян из московской популяции, в остром периоде церебрального инсульта, поступивших в неврологическую клинику кафедры фундаментальной и клинической неврологии РНИМУ. Средний возраст включенных в исследование больных составил 67,9±11,6 года. Контрольную группу составили 715 лиц славянской национальности из московской, тверской и смоленской областей.

Диагноз церебрального инсульта устанавливали на основании клинической картины и результатов лабораторно-инструментальных исследований. Патогенетический вариант инсульта определялся в соответствии с критериями TOAST [9].

Для объективизации тяжести состояния и оценки выраженности неврологического дефицита использовали шкалу инсульта Национального института здоровья США (NIHSS) [10]. Состояние больных оценивали при поступлении, на 3, 7, 14 и 21-е сутки инсульта. Степень функционального восстановления пациентов определяли с использованием модифицированной шкалы Рэнкина [11] на 1-й и 21-й дни развития заболевания и индекса повседневной активности Бартел [12] на 21-й день инсульта.

Всем пациентам при поступлении в стационар, а также на 5-е сутки заболевания выполняли компьютерную томографию (КТ) головного мозга. Ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий и сердца проводили на 1—2-е сутки от развития инсульта. Применяли дуплексное сканирование позвоночных, общих, внутренних и наружных сонных артерий, а также допплерографию интра- и экстракраниальных отделов церебральных артерий. Всем больным выполняли эхокардиографическое исследование.

У всех пациентов с церебральным инсультом фиксировалось наличие основных факторов риска сосудистой патологии головного мозга: артериальной гипертензии, мерцательной аритмии, ишемической болезни сердца, перенесенных инфарктов миокарда, стенозов брахиоцефальных артерий, сахарного диабета, курения, ожирения.

Молекулярно-генетические исследования проводились на базе Института молекулярной генетики РАН. Были использованы препараты ДНК, полученные из 3 мл венозной крови. ДНК больных с ишемическим инсультом и лиц из контрольной выборки русской этнической группы выделяли при помощи AxyPrepTM Blood Genomic DNA Midiprep kit («Axygen Biosciences», США). Полиморфные аллели исследуемых генов были исследованы с использованием технологии ДНК-микрочипов. Для этого были использованы микрочипы HUMANCYTOSNP12 v.2 (“Illumina”, США), позволяющие одновременно тестировать 301 000 однонуклеотидных полиморфных сайтов. Первичные данные были обработаны в пакете программ Genome Studio для определения генотипов по каждому полиморфному сайту.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы HELIX STUDIO (http://www.goldenhelix.com) для проведения полногеномного ассоциативного анализа (GWAS) и программы GraphPad InStat (http://www.graphpad.com), с помощью которой проверяли соответствие наблюдаемого распределения частот генотипов формуле Харди—Вайнберга и величину относительного риска (ОР). Достоверность различий частот аллелей и генотипов полиморфных локусов в сравниваемых группах определяли с помощью критерия χ^2. Сравнение частот генотипов проводили с

использованием таблиц сопряжения 2×3, а частот аллелей и объединенных генотипов с использованием таблиц сопряжения 2×2. Достоверным считали уровень значимости $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Из 950 пациентов с церебральным инсультом ишемический инсульт был диагностирован в 780 (82,1%), геморрагический — в 170 (17,9%) случаях. Впервые развившийся церебральный инсульт был у 729 (76,7%) пациентов, повторный инсульт — у 221 (23,3%). У пациентов с геморрагическим инсультом в 146 (85,9%) случаях имели место внутримозговые гематомы, в 24 (14,1%) — спонтанное субарахноидальное кровоизлияние. При анализе распределения патогенетических вариантов у пациентов с ишемическим инсультом атеротромботический вариант верифицирован у 338 (43,3%) больных, кардиоэмболический — у 298 (38,2%), лакунарный — у 73 (9,4%) и неустановленного патогенетического подтипа — у 71 (9,1%). При анализе распределения пациентов по тяжести состояния выявлено преобладание больных с тяжелым состоянием (показатель по шкале NIHSS ⩾14 баллов) на 1—3-и сутки от развития заболевания (что соответствует максимальной выраженности отека головного мозга в острейшем периоде инсульта). Летальный исход наблюдался у 180 (23,1%) пациентов с ишемическим инсультом и у 43 (45,3%) — с геморрагическим.

Распространенность основных факторов риска церебрального инсульта у пациентов с различными его типами представлена в таблице.

Для проведения полногеномного ассоциативного анализа на представленном этапе исследования были отобраны больные с кардиоэмболическим инсультом. В выборку для проведения полногеномного сканирования были включены 290 больных с этой формой инсульта и 450 человек из случайных популяционных выборок. Данные по сканированию генома больных с инсультом и лиц из популяционных выборок были получены с использованием микрочипа HUMANCYTOSNP12 v.2, что позволило проанализировать все образцы ДНК на панели из 301 000 однонуклеотидных полиморфных ДНК-маркеров.

Полученную базу данных по частоте ОНП у больных с инсультом и здоровых лиц просканировали на частоту минорного аллеля по всем ОНП (с исключением из дальнейшего анализа маркеров с частотой в объединенной выборке менее 5%), число типированных у каждого индивидуума ДНК-маркеров (с исключением из дальнейшего анализа лиц, у которых было типировано менее 90% ДНК-маркеров) и на соответствие распределения частот аллелей и генотипов уравнению Харди—Вайнберга (с исключением из дальнейшего анализа ДНК-маркеров с отклонением ожидаемого и наблюдаемого распределения частот генотипов с вероятностью более 0,1 по критерию χ^2 в случайной популяционной выборке). В итоге из дальнейшего анализа было исключено 1400 ДНК-маркеров. Так как средний уровень типирования превысил 99%, то из дальнейшего анализа были исключены всего 2 человека. Скорее всего, в этих случаях имели место ошибки генотипирования, что могло быть связано с качеством препаратов ДНК — было типировано менее 60% всех анализируемых ДНК-маркеров.

Все полученные данные по спектру аллельных вариантов были обработаны по методу главных компонент (PCA) с целью выявления уровня генетической гетерогенности выборок и исключения из дальнейшего анализа лиц, сильно отличающихся по величине первой и второй главных компонент от основной группы изучаемых лиц. На рисунке (см. на цв. вклейке) приведены данные PCA-анализа и видно, что среди обследованных есть лица, которые значимо отличаются от основной части выборки по величине первой и второй главных компонент (величина различий между крайними точками достигала 0,45 по первой главной компоненте и 0,3 — по второй главной компоненте). Эти лица (n=45) были исключены из анализируемой выборки, и в результате была сформирована достаточно гомогенная выборка для проведения ассоциативного анализа, в которой отличия по величине первой и второй главных компонент между крайними точками не превышают 0,1.

Далее эта база данных была использована для проведения ассоциативного анализа, в рамках которого проводилось сравнение частот аллелей по каж-

Частота встречаемости основных факторов сосудистого риска у обследованных пациентов с церебральным инсультом

Фактор риска	Частота встречаемости, %	
	ишемический инсульт	геморрагический инсульт
Артериальная гипертензия	97,6	95,9
Ишемическая болезнь сердца	75,0	68,0
Инфаркт миокарда в анамнезе	28,5	25,9
Мерцательная аритмия	36,0	19,4
Ожирение	40,5	41,8
Сахарный диабет	25,8	22,4
Курение	37,4	35,9

дому из ОНП ДНК-маркеров с использованием критерия χ^2 с учетом поправок на множественность сравнений. Величина χ^2 была рассчитана для каждого ОНП и сопоставлена с ожидаемой величиной при предположении о совпадении частоты анализируемого аллеля в сравниваемых выборках. При использованном числе маркеров (300 000 ОНП) достоверными являются отличия в частоте аллелей в выборке больных с инсультом и случайной популяционной выборке, для которых p не превышает 10^{-8}. Для визуализации полученных результатов был использован метод Манхеттен плот, при котором величина десятичного логарифма вероятности откладывается на графике в соответствии с положением ДНК-маркера. В итоге был выявлен один ассоциированный с риском развития кардиоэмболического инсульта ДНК-маркер — rs1842993 в перицентромерной области хромосомы 7, который достоверно ассоциирован с риском развития кардиоэмболического инсульта ($p<10^{-8}$).

Распределение аллелей и генотипов по маркеру rs1842993 было проанализировано во всей выборке больных с инсультом. Показано, что частота редкого аллеля выше у больных с инсультом по сравнению с лицами из контрольной группы (33,1 и 24,7% соответственно, χ^2=18,237; Df=1). У носителей более редкого аллеля риск развития инсульта также достоверно повышен — ОР =1,512 при 95% доверительном интервале (ДИ) 1,252—1,825.

Для уточнения полученных результатов необходимо продолжить проведение полногеномного сканирования на расширенных независимых выборках больных и проанализировать дополнительные ДНК-маркеры, расположенные в области ОНП rs1842993. Также важно на междисциплинарном уровне изучить влияние выявленного ОНП rs1842993 на метаболические пути, задействованные в патогенезе кардиоэмболического инсульта.

Наше исследование, направленное на поиск детерминант инсульта, продолжается. Данные, которые будут получены, планируется использовать в разработке диагностической тест-системы для определения индивидуальной генетической предрасположенности к инсульту у лиц славянской популяции, что должно открыть новые возможности для быстрой и своевременной диагностики и индивидуализированной профилактики церебрального инсульта, а также определить основные составляющие патогенетического лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lanktree M.B., Dichgans M., Hegele R.A.* Advances in genomic analysis of stroke. What have we learned and where are we headed? Stroke 2010; 41: 4: 825—832.
2. *Аульченко Ю.С.* Разработка и применение методов полногеномного анализа генетических ассоциаций сложных признаков: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск 2010.
3. *Лимборская С.А., Сломинский П.А., Скворцова В.И., Боцина А.Ю., Шамалов Н.А., Шетова И.М., Тупицына Т.В.* Полногеномное сканирование в изучении риска развития церебрального инсульта. Журн неврол и психиат 2009; 12: 3—7.
4. *Xu C., Wang F., Wang B., Li X., Li C., Wang D., Xiong X., Wang P., Lu Q., Wang X., Yang Q., Yin D., Huang Y., Ji L., Wang N., Chen S., Cheng X., Liao Y., Ma X., Su D., Chen G., Xia H., Shi L., Tu X., Wang Q.K.* Minor Allele C of Chromosome 1p32 Single Nucleotide Polymorphism rs11206510 Confers Risk of Ischemic Stroke in the Chinese Han Population. Stroke 2010; 41: 1587—1592.
5. *Gudbjartsson D.F., Arnar D.O., Helgadottir A., Gretarsdottir S., Holm H., Sigurdsson A., Jonasdottir A., Baker A., Thorleifsson G., Kristjansson K., Palsson A., Blondal T., Sulem P., Backman V.M., Hardarson G.A., Palsdottir E., Helgason A., Sigurjonsdottir R., Sverrisson J.T., Kostulas K., Ng M.C., Baum L., So W.Y., Wong K.S., Chan J.C., Furie K.L., Greenberg S.M., Sale M., Kelly P., MacRae C.A., Smith E.E., Rosand J., Hillert J., Ma R.C., Ellinor P.T., Thorgeirsson G., Gulcher J.R., Kong A., Thorsteinsdottir U., Stefansson K.* Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. Nature 2007; 448: 353—357.
6. *Kaab S., Darbar D., van Noord C., Dupuis J., Pfeufer A., Newton-Cheh C., Schnabel R., Makino S., Sinner M.F., Kannankeril P.J., Beckmann B.M., Choudry S., Donahue B.S., Heeringa J., Perz S., Lunetta K.L., Larson M.G., Levy D., MacRae C.A., Ruskin J.N., Wacker A., Schomig A., Wichmann H.E., Steinbeck G., Meitinger T., Uitterlinden A.G., Witteman J.C., Roden D.M., Benjamin E.J., Ellinor P.T.* Large scale replication and metaanalysis of variants on chromosome 4q25 associated with atrial fibrillation. Eur Heart J 2009; 30: 813—819.
7. *Lemmens R., Buysschaert I., Geelen V., Fernandez I., Montaner J., Schmidt H., Schmidt R., Attia J., Maguire J., Levi C., Jood K., Blomstrand C., Jern C., Wnuk M., Slowik A., Lambrechts D., Thijs V.* International Stroke Genetics Consortium. The Association of the 4q25 Susceptibility Variant for Atrial Fibrillation With Stroke Is Limited to Stroke of Cardioembolic Etiology. Stroke 2010; 41.
8. *Rosand J., Meschia J.F., Singleton A.B.* Failure to Validate Association between 12p13 Variants and Ischemic Stroke. The New England Journal of Medicine 2010; 362: 16.
9. *Adams H.P.Jr., Bendixen B.H., Kappelle L.J. et al.* Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke 1993; 24: 1: 35—41.
10. *Brott T., Adams H.P.Jr., Olinger C.P. et al.* Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. Stroke 1989; 20: 964—970.
11. *Rankin J.* Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60: II. Prognosis. Scott Med J 1957; 2: 200—215.
12. *Mahoney E.L., Barthel D.* Functional evaluation: the Barthel Index. Maryland State Med J 1965; 14: 56—61.