Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов *F12, PON1, PON2, NOS2, PDE4D, HIF1a, GPIba, CYP11B2* с ишемическим инсультом среди русского населения Центральной России

М.А. АВДОНИНА[1]*, Т.В. НАСЕДКИНА[1], А.Ю. ИКОННИКОВА[1], Е.В. БОНДАРЕНКО[2], П.А. СЛОМИНСКИЙ[2], Н.А. ШАМАЛОВ[3], И.М. ШЕТОВА[3], С.А. ЛИМБОРСКАЯ[2], А.С. ЗАСЕДАТЕЛЕВ[1], В.И. СКВОРЦОВА[3]

Association study of polymorphic markers of *F12, PON1, PON2, NOS2, PDE4D, HIF1a, GPIba, CYP11B2* genes with ischemic stroke in Russian patients

M.A. AVDONINA, T.V. NASEDKINA, A.YU. IKONNIKOVA, E.V. BONDARENKO, P.A. SLOMINSKY, N.A. SHAMALOV, I.M. SHETOVA, S.A. LIMBORSKAYA, A.S. ZASEDATELEV, V.I. SKVORTSOVA

[1]Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; [2]Институт молекулярной генетики РАН; [3] Научно-исследовательский институт цереброваскулярной патологии и инсульта Российского национального исследовательского медицинского университета (РНИМУ) им. Н.И. Пирогова, Москва

Исследованы частоты аллелей и генотипов для 10 однонуклеотидных полиморфных маркеров в генах *F12, PON1, PON2, NOS2, PDE4D, HIF1a, GPIba, CYP11B2* у русских больных с ишемическим инсультом (ИИ) и здоровых доноров, соответствующих по этнической принадлежности, полу и возрасту группе пациентов. Процедура генотипирования включала амплификацию выбранных последовательностей генов и последующую гибридизацию флюоресцентно меченных участков с аллель-специфичными ДНК-зондами, иммобилизованными на биочипе. Анализ частот аллелей каждого из генов в отдельности в группе больных с ИИ в сравнении со здоровыми не выявил достоверных различий. Сравнительный анализ парных сочетаний генов показал, что комбинация генотипов *PON1A/-x PON2* GG достоверно чаще встречается в группе больных с ИИ (p=0,044, OR=3,4, 95% CI 1,06—10,4) по сравнению со здоровыми и, таким образом, ассоциирована с повышенным риском инсульта.

Ключевые слова: *инсульт, генетическая предрасположенность, генотипирование, PON1, PON2, биочипы.*

Allele and genotype frequencies of 10 single nucleotide polymorphisms in *F12, PON1, PON2, NOS2, PDE4D, HIF1a,GPIba, CYP11B2* genes were studied in a group of Russian patients with ischemic stroke (IS) from central regions of the Russian Federation and healthy donors matched for sex, age and ethnicity. The genotyping procedure included the amplification of selected DNA sequences with the following hybridization of fluorescently-labeled regions with allele-specific DNA-probes immobilized on a biochip. An analysis of allele and genotype frequencies for each gene in IS patients and controls did not reveal any significant differences. The pair-wise comparison of genes demonstrated that the frequency of the combination *PON1A/-x PON2* GG was higher in the group of patients (p=0.044, OR=3.4 95% CI 1.06—10.4) compared to the controls and, thus, was associated with the higher risk for stroke.

Key words: *stroke, genetic predisposition, genotyping, PON1, PON2, biochips.*

В настоящее время сосудистые заболевания головного мозга остаются актуальной медицинской, социальной и экономической проблемой [2, 3, 9]. Возникновение инсульта, как и любого другого сердечно-сосудистого заболевания, зависит от определенных факторов риска, оценка действия которых позволяет прогнозировать вероятность инсульта у каждого больного, а воздействие на эти факторы является важной мерой профилактики острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК). Доказанными и модифицируемыми факторами риска инсульта являются артериальная гипертензия, курение, сахарный диабет, дислипидемия, фибрилляция предсердий, стеноз каротидных артерий, ожирение, малоподвижный образ жизни и ряд других [4].

Систематические эпидемиологические исследования показали, что в развитии цереброваскулярных заболеваний важную роль играют также генетические факторы [8]. Показана ассоциация полиморфных вариантов различных генов с риском развития инсульта как в мировых популяциях [18], так и в России [6, 7].

Целью данного исследования был анализ частоты полиморфных маркеров генов *F12*, *PON1*, *PON2*, *NOS2*, *PDE4D*, *HIF1a*, *GPIba*, *CYP11B2* в группах русских больных с ишемическим инсультом (ИИ) и здоровых доноров

© Коллектив авторов, 2012

*e-mail: marysheilaus@gmail.com

Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova 2012;112:2:51

того же пола и возраста. Для одновременного определения множества однонуклеотидных полиморфных маркеров (ОНПМ) была использована технология биочипов [1].

Материал и методы

В исследование включали больных с ИИ, последовательно поступавших в неврологическую клинику РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Критериями включения являлись первый в жизни ИИ у пациентов в возрасте от 18 лет и старше, а также поступление в клинику в острейшем периоде заболевания (первые 3 сут). Всего обследовали 200 больных с ИИ в возрасте от 34 до 93 лет, 118 (59%) мужчин и 82 (41%) женщин. Также была сформирована контрольная группа здоровых доноров, которую составили 198 этнических русских — жителей различных регионов Центральной России, из них 86 (43,4%) мужчин и 112 (56,6%) женщин, средний возраст 57±5 лет. Все участники исследования (или их родственники) подписывали форму информированного согласия и заполняли предложенные им анкеты, сообщив место рождения и этническое происхождение до третьего колена. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

У пациентов с ИИ степень выраженности неврологической симптоматики оценивали при поступлении в клинику по шкале инсульта NIH [12]. Всем пациентам выполняли компьютерную томографию (КТ) головного мозга при поступлении в стационар, при необходимости — на 3—5-е сутки. На основании данных клинической картины, результатов КТ и ультразвуковых методов исследования брахиоцефальных сосудов (дуплексное сканирование, микроэмболодетекция) и сердца (эхокардиография) устанавливали патогенетический вариант инсульта в соответствии с критериями TOAST [14].

ДНК выделяли из крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [5]. Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе синтезировали на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer («Applied Biosystems», США) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры. На 3'-конце олигонуклеотидов находился спейсер со свободной аминогруппой, который вводили при синтезе с помощью 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 («Glen Research», США). Нуклеотидные последовательности могут быть получены у авторов по запросу. Биочипы изготовлены с помощью фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов полиакриламидного геля [1].

Для наработки фрагментов ДНК использовали двухэтапную мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Праймеры подбирали с использованием программы Oligo 6 («Molecular Biology Insights», США). Последовательности праймеров могут быть получены у авторов. Первый этап ПЦР проводили для получения ПЦР-продукта с геномной ДНК с использованием набора Амплификация ДНК с Taq полимеразой («Силекс», Россия) согласно протоколу. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 5 пкмоль каждого праймера и матрицу в количестве не менее 10 нг геномной ДНК. Реакцию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 94 °С (5 мин), далее 35 циклов амплификации по схеме: 94 °С, 30 с; 60 °С, 30 с; 72 °С, 1 мин; далее 72 °С, 5 мин.

На втором этапе проводили асимметричную ПЦР. Реакционная смесь содержала прямой праймер в количестве 5 пкмоль, обратный праймер по 50 пкмоль, а также флуоресцентно меченный дезоксинуклеотидтрифосфат Cy5-дУТФ. В качестве матрицы использовали 2 мкл ПЦР-продукта первого этапа. Реакцию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 94 °С (5 мин), далее 35 циклов амплификации по схеме: 94 °С, 30 с; 62 °С, 30 с; 72 °С, 1 мин; далее 72 °С, 5 мин.

Полученные на втором этапе мультиплексной ПЦР флуоресцентно меченные продукты использовали для гибридизации на биочипе. Гибридизационная смесь общим объемом 40 мкл состояла из 10 мкл формамида («Serva», США), 10 мкл 20х SSPE («Promega», США) и 20 мкл амплификата (по 4 мкл образца из каждой мультиплексной реакции). Гибридизационную смесь полностью денатурировали при 95 °С (5 мин), быстро охлаждали на льду (1 мин), наносили на биочип и оставляли на ночь при 37 °С. Затем чип отмывали в 1х SSPE в течение 10 мин при комнатной температуре и высушивали.

Флуоресцентный сигнал ячеек биочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного ПЗС-камерой и программным обеспечением Imageware («Биочип-ИМБ», Россия) [1].

Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 («Applied Biosystems», США).

При статистическом анализе полученных данных (GraphPad InStat) для проверки соответствия распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди—Вайнберга использовали стандартный метод χ^2. С целью определения сочетаний ОНПМ, определяющих повышенный и пониженный риск развития инсульта, проводили двусторонний точный тест Фишера с использованием интерактивной таблицы сопряженности и вычисляли значения OR (odds ratio, отношение шансов) с 95% доверительным интервалом (95% CI). Критический уровень статистической значимости принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Для проведения генотипирования разработан биочип, содержащий олигонуклеотидные зонды для анализа полиморфных маркеров следующих генов: *F12* (rs1801020 — по базе данных SPN), *PON1* (rs662), *PON2* (rs1801282), *NOS2* (rs2297518), *PDE4D* (rs966221, rs2910829), *HIF1a* (rs11549465, rs11549467), *GPIba* (rs2243093), *CYP11B2* (rs1799998). Схема биочипа и пример гибридизационной картины представлены на рисунке, А и Б.

При анализе картин гибридизации рассчитывали интенсивность сигнала флюоресценции в ячейке по отношению к фону. Далее для каждой гибридизационной картины получали диаграмму значений сигналов флюоресценции ячеек биочипа, нормированных на значение максимального сигнала в паре ячеек «дикий тип — мутация» (I_{min}/I_{max}, рисунок, В). Если уровни сигнала в ячейках с зондами «дикого типа» и с «мутацией» различались не более чем на 30% (верхняя пунктирная линия на рисунке, В), считалось, что генетический маркер находится в гетерозиготном состоянии. Если сигнал от ячейки с зондом «дикого типа» был равен максимальному значению, а от ячейки с «мутацией» составлял менее 30% от максимального уровня (нижняя пунктирная линия) для данной пары зондов, считалось, что аллель «дикого типа» находится в гомозиготном состоянии. Соответственно, обратная картина наблюдалась для гомозиготы по «мутации». Верификация результатов гибридизации была проведена путем сравнения результатов определения генотипов с использованием разработанного биочипа и выборочного секвенирования исследованных образцов (рисунок, Г). Результаты гибридизации полиморфных ДНК маркеров на биочипе полностью совпали с результатами секвенирования.

Наблюдаемое распределение частот генотипов остальных изученных генов во всех группах обследованных больных и здоровых соответствовало равновесию Харди—Вайнберга. Отклонение от равновесия Харди—Вайнберга выявлено лишь в случае полиморфного маркера rs11549467 гена *HIF1a* для группы больных с ИИ. Тем не менее частоты аллелей в группе больных с ИИ и здоровых не отличались. Частота аллеля G составила 97,5%, аллеля A — 2,5%, что соответствует базе данных National Center for Biotechnology Information [15]. Для подтвержде-

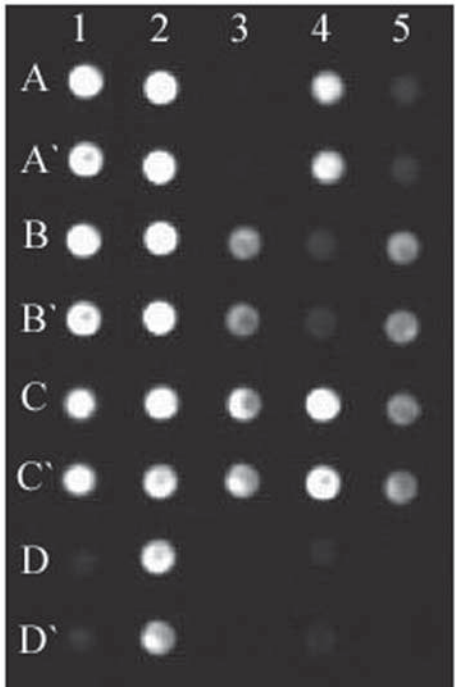
Анализ ассоциаций аллелей генов *F12, PON1, PON2, PDE4D, HIF1a, GPIba, CYP11B2, NOS2* с ишемическим инсультом

Ген	SNP-ID	Полимор-физм	OR	95% CI	*p*	Больные с ИИ			Здоровые доноры		
						минорный аллель (*n*)	мажорный аллель (*n*)	частота минорного аллеля	минорный аллель (*n*)	мажорный аллель (*n*)	частота минорного аллеля
F12	rs1801020	46 C>T	1,19	0,88—1,59	0,29	140	258	0,35	125	273	0,31
PON1	rs662	192A>G	1,16	0,85—1,59	0,38	115	277	0,29	100	280	0,26
PON2	rs1801282	311C>G	0,97	0,7—1,34	0,87	98	292	0,25	99	285	0,26
PDE4D	rs966221	SNP83C>T	0,83	0,63—1,12	0,27	147	233	0,39	163	217	0,43
PDE4D	rs2910829	SNP87C>T	1,07	1,11—1,92	0,66	221	173	0,56	205	167	0,55
HIF1a	rs11549465	581 C>T	0,69	0,47—1,01	0,06	54	338	0,14	75	323	0,19
HIF1a	rs11549467	587 G>A	1,00	0,41—2,43	1,18	10	384	0,03	10	384	0,03
CYP11B2	rs1799998	—344 C>T	0,9	0,67—1,2	0,51	206	178	0,54	216	168	0,56
GPIba	rs2243093	—5T>C	1,18	0,8—1,75	0,43	64	330	0,16	56	342	0,14
NOS2	rs2297518	608G>A	1,12	0,79—1,59	0,53	83	311	0,21	76	320	0,19

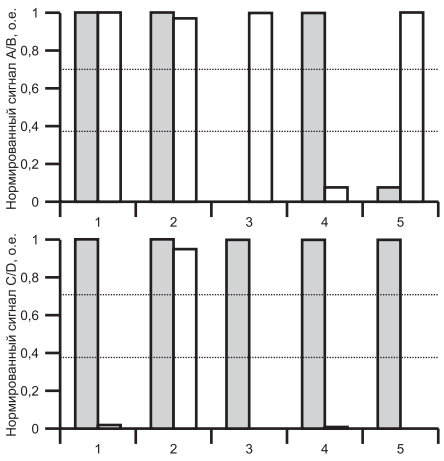
А

	1	2	3	4	5
A	*F12_C*	*PON1_A*	*PON2_C*	*PDE4D_C*	*PDE4D_C*
A`	*F12_C*	*PON1_A*	*PON2_C*	*PDE4D_C*	*PDE4D_C*
B	*F12_T*	*PON1_G*	*PON2_G*	*PDE4D_T*	*PDE4D_T*
B`	*F12_T*	*PON1_G*	*PON2_G*	*PDE4D_T*	*PDE4D_T*
C	*NOS2_C*	*HIF1a_C*	*HIF1a_G*	*GP1BA _T*	*CYP11B2_T*
C`	*NOS2_C*	*HIF1a_C*	*HIF1a_G*	*GP1BA _T*	*CYP11B2_T*
D	*NOS2_T*	*HIF1a_T*	*HIF1a_A*	*GP1BA _C*	*CYP11B2_C*
D`	*NOS2_T*	*HIF1a_T*	*HIF1a_A*	*GP1BA _C*	*CYP11B2_C*

Б



В



Г

1	2	3	4	5
F12_C/T	*PON1_A/G*	*PON2_G/G*	*PDE4D1_C/C*	*PDE4D2_T/T*
NOS2_C/C	*HIF1a_C/T*	*HIF1a_G/G*	*GP1BA _T/T*	*CYP11B2_T/T*

Схема биочипа и картина гибридизации.

А — схема расположения зондов в ячейках биочипа (ячейки темного цвета соответствуют последовательности дикого типа; ячейки белого цвета — мутантным последовательностям); каждая ячейка продублирована; Б — пример гибридизационной картины образца ДНК здорового донора; В — диаграмма значений флуоресцентных сигналов; Г — генотип образца.

ния полученных результатов все 18 образцов ДНК, содержащие минорный аллель, были просеквенированы. Поскольку аллель A (rs11549467) гена *HIF1a* является достаточно редким, отклонения от равновесия Харди—Вайнберга могут быть связаны с недостаточной величиной выборки.

Результаты по определению частоты аллелей в группах больных и здоровых представлены в таблице. Достоверных различий в распределении частот аллелей между группами для всех 10 исследованных ОНПМ в контрольной группе в сравнении с группой больных с ИИ не выявлено, что соответствует результатам проведенных ранее исследований [10].

Далее проводили анализ межгенных взаимодействий в группе больных с ИИ в сравнении с группой здоровых доноров. Сравнительный анализ парных сочетаний генов в двух группах показал, что комбинация генотипов *PON1A/-x PON2* GG достоверно чаще встречается в группе больных (p=0,044, OR=3,4, 95% CI 1,06—10,4) и, таким образом, ассоциирована с повышенным риском развития заболевания.

Ранее в ряде работ была показана достоверная ассоциация генов *PON1* и *PON2* как самостоятельных факторов риска, так и сочетаний их аллелей с развитием ИИ [12,13,16, 17,19]. Гены семейства PON кодируют параоксаназы, обладающие антиоксидантной активностью и защищающие клетки от оксидантного стресса. Белок PON1 обнаруживается в сыворотке крови, где ассоциирован с липопротеинами высокой плотности (ЛПВП) и предположительно участвует в их взаимодействии с липопротеинами низкой плотности (ЛПНП). В многомерном анализе, включающем возраст, пол, уровень ЛПНП, гипертонию, диабет, курение и лечение правастатином [19], выявлена ассоциация замены Gln/Arg (A>G) аминокислотного остатка 192 гена *PON1* с возникновением инсульта. Параоксаназа 2 (PON2) является внутриклеточным ферментом, в плазме крови белок не обнаружен. Тем не менее замена серина на цистеин 311Ser/Cys (C>G) приводит к повышению уровня холестерина и ЛПНП, что является фактором риска развития инсульта. Гомозиготность по аллелю 311Cys ассоциирована с более тяжелым течением инсульта [17]. В настоящей работе выявлено, что негативное влияние гомозиготного генотипа 311GG(Cys) гена *PON2* проявляется именно в сочетании с «нормальным» аллелем 192Gln *PON1*, что указывает на важность анализа гаплотипов.

Настоящие результаты, полученные на русской популяции жителей различных регионов Центральной России, согласуются с многочисленными зарубежными и отечественными исследованиями, в которых было показано, что нарушения в функционировании антиоксидантной системы могут лежать в основе большинства известных сегодня мультифакториальных заболеваний, в том числе и инсульта. Обнаружение генетических маркеров инсульта позволит повысить возможность проведения адекватного патогенетического лечения и разработать эффективные основы профилактики ОНМК.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта №№02.522.11.2018 с Министерством образования и науки РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Глотов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Э. и др.* Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации. Мол биология 2005; 39: 403—412.
2. *Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. и др.* Эпидемиология инсульта в России. Инсульт. Приложение к журн неврол и психиат 2003; 9: 114.
3. *Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В.* Проблема инсульта в Российской Федерации: время активных совместных действий. Журн неврол и психиат 2007; 8: 4—10.
4. *Драпкина О.М., Ашихмин Я.И., Ивашкин В.Т.* Профилактика инсульта как заболевания, обусловленного атеросклерозом. Лечение нервных болезней 2007; 2: 1—4.
5. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование фенол-хлороформной экстракции. Мир 1984; 479.
6. *Парфенов М.Г., Титов Б.В., Судомоина М.А., Мартынов М.Ю., Фаворов А.В., Ochs M.F., Гусев Е.И., Фаворова О.О.* Комплексный анализ генетической предрасположенности к ишемическому инсульту у русских. Мол биология 2009; 43: 937—945.
7. *Скворцова В.И., Лимборская С.А., Сломинский П.А., Кольцова Е.А., Шетова И.М., Боцина А.Ю., Шамалов Н.А.* Роль полиморфных вариантов генов ренин-ангиотензиновой системы в развитии ишемического инсульта в московской популяции. Журн неврол и психиат 2003; 6: 35—37.
8. *Скворцова В.И., Евзельман М.А.* Ишемический инсульт. Орел 2006; 404.
9. *Скворцова В.И.* Снижение заболеваемости, смертности и инвалидности от инсультов в Российской Федерации. Материалы II Российского Международного конгресса «Цереброваскулярная патология и инсульт». Спецвыпуск «Инсульт». Журн неврол и психиат 2007; 25—29.
10. *Bersano A., Ballabio E., Bresolin N., Candelise L.* Genetic polymorphisms for the study of multifactorial stroke. Hum Mutat 2008; 29: 6: 776—795.
11. *Bhattacharyya T., Nicholls S.J., Topol E.J. et al.* Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. JAMA 2008; 19: 299: 11: 1265—1276.
12. *Brott T., Adams H.P.Jr.* Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. Stroke 1989; 20: 864—870.
13. *Can Demirdupen B., Tьrkanoplu A., Bek S. et al.* Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke. Clin Biochem 2008; 41: 1—2: 1—9.
14. *Fure B., Wyller T.B., Thommessen B.* TOAST criteria applied in acute ischemic stroke. Acta Neurol Scand 2005; 112: 254—258.
15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.
16. *Imai Y., Morita H., Kurihara H. et al.* Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. Atherosclerosis 2000; 149: 435—442.
17. *Lazaros L., Markoula S., Kyritsis A., Georgiou I.* Paraoxonase gene polymorphisms and stroke severity. Eur J Neurol 2010; 5: 757—759.
18. M*atarin M., Brown W.M., Dena H., Britton A., De Vrieze F.W., Brott T.G., Brown R.D.Jr, Worrall B.B., Case L.D., Chanock S.J., Metter E.J., Ferruci L., Gamble D., Hardy J.A., Rich S.S., Singleton A., Meschia J.F.* Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. Stroke 2009; 40: 3436—3442.
19. *Ranade K., Kirchgessner T.G., Iakoubova O.A. et al.* Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. Stroke 2005; 6: 11: 2346—2350.