

На правах рукописи

Гунченко Анастасия Сергеевна

**Факторы риска острой и хронической ишемии головного мозга
(клинико-генетический анализ)**

14.01.11 - Нервные болезни.

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

2018 год

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Анисимова Анастасия Вячеславовна

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Наседкина Татьяна Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Голубев Валерий Леонидович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им.И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра нервных болезней факультета профессионального образования врачей

доктор медицинских наук, профессор

Савин Алексей Алексеевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра нервных болезней лечебного факультета, профессор кафедры

Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области "Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф.Владимирского"

Защита состоится «__» _____ 2018 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.09 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте <http://rsmu.ru> и в научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

А.Н.Боголепова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Несмотря на значительные достижения в области современной ангионеврологии, остается высокой заболеваемость ишемическим инсультом. Одним из важнейших вопросов является изучение причин развития различных патогенетических вариантов ишемического инсульта. Происходит увеличение частоты возникновения инсультов, а также расширение возрастного диапазона, как в сторону омоложения цереброваскулярной патологии, так и в сторону старшей возрастной группы [Гусев Е.И. и др. 2015, Левин О.С. 2010, Анисимова А.В. 2017, Пизова Н.В. 2017, Chen J. et al. 2014, Ferrell A et al. 2014]. Современное изучение этой проблемы многополярно как в отечественной, так и в зарубежной литературе. [Гендлин Г.Е. 2017, Левин О.С., 2010, Шамалов Н.А. 2011, Пизов Н.А. 2018, Bevan S. 2012, Meshia J.F. 2011, Wang M., Zhang D. 2013]. Ишемический инсульт относится к мультифакторным заболеваниям и его развитие обусловлено взаимодействием модифицируемых и немодифицируемых факторов, среди которых особое внимание уделяется характеру течения артериальной гипертензии, а также наследственной предрасположенности, т.е. предикторами являются сочетание множества факторов риска, нередко с малой степенью их индивидуального проявления.

Современная концепция гетерогенности ишемического инсульта, предусматривает изучение различных звеньев патогенеза, приводящих к развитию острого нарушения мозгового кровообращения [Скворцова В.И.. 2012, Хаке В. 2012]. Одним из направлений является изучение роли молекулярно-генетических механизмов формирования предрасположенности к ишемическому инсульту с изучением генов-кандидатов, потенциально вносящих наибольший вклад в патогенез цереброваскулярных заболеваний [Титов Б.В. и др. 2015, Машин В.В. 2018, Haas R.A.2011, Marcus H.S., Hassan A. 2012].

Результаты многочисленных исследований, а так же крупных мета-анализов позволяют более достоверно составить представление о генетических факторах риска, а также о роли отдельных полиморфизмов генов в развитии определенного подтипа ишемического инсульта [Скворцова В.И., Шамалов

Н.А., 2012, Bevan S., Markus H. 2013, Williams F.M.K.,Hodgkiss D. 2013,O'Donnell C. 2013].

Дальнейшие исследования позволяют выявить новые потенциальные факторы риска развития инсульта, прогнозировать тяжесть и особенности клинических проявлений заболевания, характер течения, а также разработать основные принципы как своевременного дифференцированного лечения и первичной профилактики прогрессирования хронической ишемии мозга, так и осложнений: инсульта, деменции, сосудистого паркинсонизма. Изучение ассоциаций некоторых полиморфизмов генов, кодирующих белки системы регуляции артериального давления, свертывания крови, липопротеидного обмена, связанные с воспалительным ответом и эндотелиальной дисфункцией на основании тщательно отобранных клинических групп пациентов является актуальным и обоснованным. Комплексные клинико-генетические критерии необходимы для применения в практической неврологии в отделениях нейрореанимации, регионального сосудистого центра, амбулаторной практике для контроля профилактических мероприятий первичных и повторных нарушений мозгового кровообращения. В современной ангионеврологии необходим дифференцированный подход к диагностике заболеваний, разработка персонализированных алгоритмов лечения, а также первичной и вторичной профилактики ИИ с учетом тщательного анализа клинико-генетических особенностей каждого конкретного пациента.

Цель исследования. Изучить вклад полиморфизма генов, кодирующих белки системы свертывания крови, регуляции артериального давления, липопротеидного обмена, и генов, связанных с воспалительным ответом и эндотелиальной дисфункцией в развитие и прогноз острой и хронической ишемии головного мозга.

Задачи исследования:

1. Изучить модифицируемые факторы риска и особенности течения острого ишемического инсульта, роль факторов риска в прогнозе заболевания.
2. Изучить особенности клинических проявлений в соответствие со стадией и характером течения АГ у пациентов с ХИМ.

3. Исследовать новые потенциальные факторы риска развития ишемического инсульта на фоне ХИМ. Исследовать распределение аллелей и генотипов генов *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GP3a*, *PAI-1*, *ACE*, *MTHFR*, *CYP11B2*, *PON1*, *PON2*, *NOS2*, *PDE4D-1*, *PDE4D-2*, *HIF1a*, *NOS3*, *LTA*, *ALOX5AP* у больных с хронической ишемией мозга с учетом характера течения артериальной гипертензии, осложнившейся развитием ишемического инсульта, для разработки персонализированной первичной и вторичной профилактики.
4. Исследовать распределение аллелей и генотипов генов *ACE*, *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GP3a*, *SERPINE1*, *MTHFR*, *CYP11B2*, *PON1*, *PON2*, *NOS2*, *NOS3*, *PDE4D*, *HIF1a*, *LTA*, *ALOX5AP* у пациентов, перенесших ишемический инсульт, в зависимости от характера стенозирования брахиоцефальных артерий, по данным ультразвуковой доплерографии, характера течения артериальной гипертензии и патогенетического подтипа инсульта.

Научная новизна:

На основании четко выверенных клинических групп пациентов произведен комплексный анализ взаимосвязи генетического полиморфизма 18 генов с предрасположенностью к развитию ишемического инсульта у больных, страдающих хронической ишемией мозга (ХИМ), ранее не переносивших острых нарушений мозгового кровообращения и у пациентов с ХИМ, осложненной ишемическим инсультом.

Определены частоты полиморфных вариантов генов *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GP3a*, *PAI-1*, *ACE*, *MTHFR*, *CYP11B2*, *PON1*, *PON2*, *NOS2*, *PDE4D*, *HIF1a*, *NOS3*, *LTA*, *ALOX5AP* у больных ИИ и ХИМ, выявлена роль отдельных полиморфизмов в формировании прогрессивного течения АГ, а также повышенного риска развития осложнений ХИМ.

Выявлена ассоциация генотипа Т/Т SNP83С>Т гена *PDE4D* с прогрессивным кризовым течением артериальной гипертензии у пациентов с хронической ишемией головного мозга. Ген *PDE4D* кодирует фосфодиэстеразу, которая участвует в регуляции внутриклеточного соотношения циклических аденозинмонофосфата и гуанозинмонофосфата. Данные нуклеотиды

контролируют проницаемость гематоэнцефалического барьера. Белок PDE4D принимает участие в атерогенезе, и может приводить к нестабильности атеросклеротической бляшки, что в нашем исследовании позволяет рассматривать ассоциацию данного аллеля гена в качестве дополнительного фактора риска прогрессивного течения АГ.

Выявлена ассоциация аллеля С гена *GP1BA* с наличием различной степени стенозирования брахиоцефальных артерий и развитием различных патогенетических вариантов ишемического инсульта. Ген *GP1BA* кодирует гликопротеин Ib, который входит в комплекс гликопротеинов тромбоцитов и отвечает за адгезию тромбоцитов к поврежденным стенкам сосудов на первом этапе гемостаза. В исследованных нами группах повышение риска тромбообразования вследствие наличия аллеля С гена *GP1BA* являлось значимым фактором риска развития ИИ в сочетании с нарушением гемодинамики в основных сосудах мозгового кровообращения, в том числе при гемодинамически значимом стенозе ВСА

Выявлена ассоциация аллеля D гена *ACE* с кардиоэмболическим патогенетическим вариантом развития ишемического инсульта. Ген *ACE* кодирует ангиотензинпревращающий фермент, который участвует в регуляции артериального давления и водно-солевого обмена. Полиморфизм ID участвует в повышении риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и может являться дополнительным значимым фактором риска развития кардиоэмболического патогенетического варианта ИИ.

Таким образом, изучены дополнительные клинико-генетические факторы риска, влияющие на развитие инсульта, выявлены потенциальные маркеры развития острой ишемии головного мозга, а также показания к дифференцированному лечению в зависимости от патогенетического варианта развития ИИ.

Практическая значимость работы: Выявленные корреляции между полиморфизмами изучаемых генов *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GP3a*, *PAI-1*, *ACE*, *MTHFR*, *CYP11B2*, *PON1*, *PON2*, *NOS2*, *PDE4D*, *HIF1a*, *NOS3*, *LTA*, *ALOX5AP* и клиническими проявлениями хронической ишемии мозга позволили определить новые потенциальные маркеры развития ишемического

инсульта, как осложнения хронической цереброваскулярной патологии. Выделены генетические ассоциации, которые могут быть положены в основу персонализированного диагностического алгоритма для выявления прогностических критериев предрасположенности к ишемическому инсульту для осуществления первичной и вторичной профилактики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выявлено взаимодополняющее влияние генотипа и модифицированных факторов риска: характер течения АГ, наследственная отягощенность по сосудистому анамнезу, курение, стресс, повышенный ИМТ, сердечная патология, а также некоторых полиморфизмов генов, кодирующих белки системы гемостаза.

2. У пациентов с ХИМ в качестве дополнительного фактора риска прогрессивного течения АГ можно рассматривать генотип Т/Т SNP83С>Т гена *PDE4D* (ОШ=6,22; ДИ=1,86-20,79; p=0,004).

3. У пациентов с ИИ аллель С гена *GP1BA* может рассматриваться в качестве дополнительного фактора риска развития заболевания в сочетании со стенозом БЦА. Данный аллель чаще встречался у пациентов с окклюзией БЦА или выраженным гемодинамическим стенозом (24%) по сравнению с пациентами с гемодинамически незначимым стенозом (8%) (ОШ=3,39, 95%ДИ=1,12-10,25, p=0,03).

4. У пациентов с ИИ аллель D гена *ACE* чаще встречался у пациентов с кардиоэмболическим инсультом (67%) в сравнении с пациентами с атеротромботическим инсультом (38%) (ОШ=3,33, 95% ДИ=1,17-9,46, p=0,03).

Апробация работы: Диссертация апробирована и рекомендована к защите на заседании кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета от 24 мая 2018 года (№ протокола 77). Диссертация выполнена в соответствии с планом научных исследований ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Внедрение в клиническую практику: Результаты диссертационной работы доложены на конференциях кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, используются в ГКБ № 1 им. Н.И. Пирогова в отделении

нейрореанимации, неврологии, и занятиях со студентами, проводимых на кафедре.

Публикации: Результаты диссертационной работы изложены в 5 печатных работах, в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Личный вклад автора: Автору принадлежит ведущая роль в постановке целей и задач исследования, а также в обосновании выводов и практических рекомендаций. Проводился сбор анамнеза, подробный неврологический осмотр, оценка когнитивных функций по шкале MMSE, разработка индивидуальных клинико-генетических карт, генетический анализ. Самостоятельно проведен статистический анализ полученных данных.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных результатов, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, 3 клинических случаев, 18 таблиц, 11 рисунков, 1 схема, списка литературы, включающего 77 отечественных и 196 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Исследовали 279 пациентов, из них 81 пациент с ХИМ и 178 пациентов с ХИМ, осложнившейся ишемическим инсультом (Схема 1). Выборка состояла из больных, наблюдавшихся в Региональном сосудистом центре на базе Городской клинической больницы №1 им.Н.И. Пирогова (279 пациентов, средний возраст 63,5+-10 лет, мужчин – 48%, женщин – 52%; 81 пациент с ХИМ, средний возраст 65+-10 лет; 178 пациентов с ИИ, средний возраст 62,8+-9 лет). Дизайн исследования не подразумевал вмешательство в лечебный процесс, побочные эффекты, связанные с исследованием были исключены. Процедура включения-исключения из исследования проводилась в соответствии с требованиями этического комитета РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 131 от 27.01.14г). Группа пациентов с ХИМ была сформирована

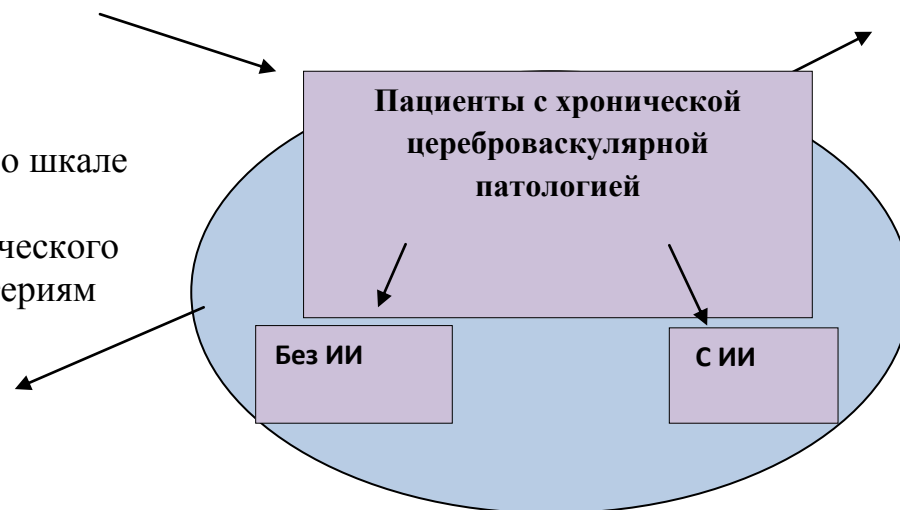
“Роль полиморфизма генов в развитии ишемического инсульта”

Клинические параметры:

1. Анамнез
2. Жалобы
3. Неврологический статус
4. Оценка тяжести инсульта по шкале NIHSS
5. Стратификация патогенетического варианта ИИ согласно критериям TOAST

Перспективное изучение прогностических критериев

1. Характер течения артериальной гипертензии
2. Характер течения цереброваскулярного процесса
3. Патогенетический вариант ишемического инсульта
4. Наличие аллелей T/T SNP83C>T гена *PDE4D*, аллеля *C* гена *GP1BA*, аллеля *D* гена *ACE*.



Диагностические параметры:

1. Генетический анализ
2. Биохимический анализ крови
3. КТ, МРТ головного мозга
4. Оценка когнитивных функций по шкале MMSE
5. ЭКГ, ЭЭГ, УЗДГ церебральных сосудов
6. Rg органов грудной клетки
7. Осмотр окулиста

Схема 1. Характеристика организации исследования

из пациентов, не имеющих в анамнезе инфарктов и инсультов, как «согласованные пары» к больным с ИИ: того же пола, этнической принадлежности и возраста. Информацию о факторах риска получали методом анкетирования, заполнения клиничко-генетических карт, информацию об уровне АД в группе ХИМ получали путем длительного наблюдения пациентов (от 4 до 10 лет).

Методы исследования. Оценивался неврологический статус пациента, степень когнитивных нарушений по шкале MMSE, оценивалось состояние стресса по шкале Маклина, стратификация патогенетического варианта ИИ в соответствии с критериями определения патогенетического типа ИИ согласно классификации TOAST (1993). Компьютерная томография головного мозга проводилась при поступлении всем больным на аппарате Somatomar.SP по программе Sequence. Дуплексное сканирование сонных артерий проводили всем исследуемым больным в остром периоде инсульта ультразвуковым сканером Acuson CV 70, с линейным датчиком частоты 5-10 МГц в режиме импульсного доплера. Эхокардиография выполнялась на ультразвуковом диагностическом аппарате Acuson 128 XP/10 по стандартной методике.

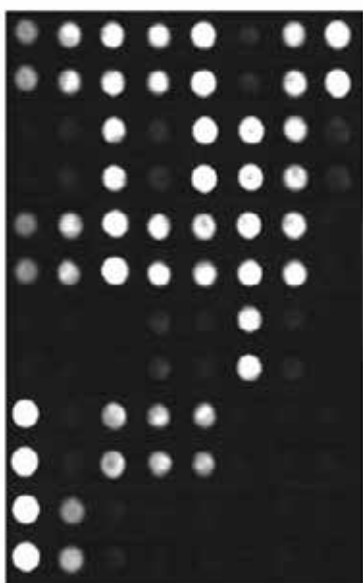
Генетический анализ. Проведение генетических исследований одобрено Этическим комитетом РНИМУ им.Н.И.Пирогова и проведено на базе Института молекулярной биологии им.В.А. Энгельгардта РАН. При сборе образцов получено информированное согласие от участников исследования или их родственников.

В настоящем исследовании для генетического тестирования была использована тест-система, позволяющая определять полиморфные варианты в генах *ACE* (rs1799752), *FGB* (rs1800790), *F5* (rs6025), *F7* (rs6046), *F12* (rs1801020), *GP1BA* (rs2243093), *GP3IIa* (rs5918), *SERPINE1* (rs1799768), *MTHFR* (rs1801133), *CYP11B2* (rs1799998), *PON1* (rs662), *PON2* (rs1801282), *NOS2* (rs2297518), *NOS3* (rs1799983), *PDE4D* (rs966221, rs2910829), *HIF1a* (rs11549465, rs11549467), *LTA* (rs909253), *ALOX5AP* (rs4769874), которые по данным других исследований, могут принимать участие в развитии ишемического инсульта.

Схема биочипа приведена в таблице 1. Все ячейки для повышения достоверности анализа продублированы.

Таблица 1. Схема биочипа.

FGB_G	F5_G	F7_G	F12_C	PAI-1_4G	GP1BA_T	GP1IIa_T	CYP11B2_T
FGB_A	F5_A	F7_A	F12_T	PAI-1_5G	GP1BA_C	GP1IIa_C	CYP11B2_C
ACE_I	MTHFR_C	PON1_A	PON2_C	NOS2_C	NOS3_G	LTA_A	
ACE_D	MTHFR_T	PON1_G	PON2_G	NOS2_T	NOS3_T	LTA_G	
PDE4D_C	PDE4D_C	HIF1a_C	HIF1a_G	ALOX_G			
PDE4D_T	PDE4D_T	HIF1a_T	HIF1_A	ALOX_A			



FGB	F5	F7	F12	PAI-1	GP1BA	GP1IIa	CYP11B2
G/G	G/G	G/A	C/C	4G/5G	C/C	T/C	T/T
ACE	MTHFR	PON1	PON2	NOS2	NOS3	LTA	
I/I	C/C	A/A	C/C	C/C	G/T	A/A	
PDE4D	PDE4D	HIF1a	HIF1a	ALOX			
T/C	C/C	C/C	G/G	G/G			

Рисунок 1. Пример картины гибридизации и результаты генотипирования на биочипе.

Для наработки фрагментов ДНК использовали двухэтапную мультиплексную ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе. Флуоресцентный сигнал от ячеек биочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением Imageware

(“БиочипИМБ”, Россия) (рис.1). Секвенирование. Правильность определения генотипов для каждого варианта полиморфизма выборочно подтверждали прямым секвенированием по Сэнгеру. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США).

Статистический анализ

Для обработки данных использовали программу STATISTICA 6.0, позволяющую применить многомерный статистический метод, а также программу MDR (Multifactor Dimensionality Reduction, <http://www.multifactor dimensionality reduction.org>). Ассоциацию полиморфных вариантов генов с клиническими признаками оценивали при помощи двустороннего точного теста Фишера с использованием интерактивной таблицы сопряженности. Вычисляли значения ОШ (odds ratio, отношение шансов) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ). Критический уровень статистической значимости p принимали равным 0,05. Был произведен расчет статистической мощности данного исследования.

Результаты исследования и их обсуждения.

Клинико-генетическая характеристика больных ХИМ

Были проанализированы клинические данные группы с ХИМ, в которую вошел 81 пациент. Страдают артериальной гипертензией 55 пациентов (67,9%), из них кризовое течение болезни отмечается у 8 пациентов (9,9%), медленно прогрессирующее у 43(53%) пациентов, быстро прогрессирующее – 9 пациентов (11%). Пониженные цифры артериального давления определены у 11 (13,6%) исследуемых, 15 пациентов (17,3%) не отмечали ранее эпизодов подъема АД. Наличие состояния стресса и тревожности отмечают 35 (43%) пациентов, из них 20 страдают АГ. Длительное курение (более 20 лет) 9 (11%) пациентов. При сборе анамнестических данных 19 пациентов отмечают наличие перенесенных инсульта и инфаркта у ближайших родственников. Хроническая ишемия головного мозга 1 и 2 степени отмечена в 34 случаях и в 39 случаях соответственно. Излишний вес отмечен у 10 пациентов (12%). При

анализе клинических симптомов выяснено, что цефалгический синдром наблюдался у -24 (29,6%), вестибулопатия – 27 (33%), астенический синдром – 21 (25,9%), когнитивные нарушения – 21 (25,9%), мнестические нарушения – 18 (22,2%). Все пациенты с цереброваскулярной патологией были разделены на 2 подгруппы: подгруппа пациентов, страдающих АГ, и подгруппа пациентов с гипо- и нормотонией (Табл.2).

Таблица 2. Характеристика подгрупп пациентов ХИМ.

Признак	Подгруппа АГ n=55	Подгруппа гипо-, нормотония n=26
Стресс	23(28%)	12(14,8%)
Гиподинамия	10(12%)	2(2,5%)
Избыточный вес	6(7,4%)	4(4,9%)
Цефалгии	18(22%)	6(7,4%)
Астенический с-м	14(17,3%)	7(8,6%)
Тревожность	18(22%)	7(8,6%)
Когнитивные нарушения	15(18,5%)	6(7,4%)

Результаты генотипирования с помощью тест-системы на основе биочипов пациентов с хронической ишемией головного мозга представлены в таблице 3. При анализе результатов генотипирования методом иерархического кластерного анализа пациенты с ХИМ образовали две подгруппы. При анализе клинических картин пациентов этих двух подгрупп, выявлено, что доля пациентов, страдающих артериальной гипертензией составляет 62% и 75% в 1 и 2 подгруппе, соответственно, преобладающее количество пациентов имеют медленное прогрессирующее течение АГ 57,8% и 50%, однако в группе 2 у 22% больных отмечается быстрое прогрессирующее течение АГ, что является статистически значимым фактором ($p < 0,05$), так же отмечается несколько большее количество больных с кризовым течением АГ- 4% против 11%. В подгруппе 2 отмечается преобладание ХИМ 2 ст.-52,8%, тогда как в подгруппе 1 преобладает ХИМ 1 ст.-44%. Учитывая результаты клинических наблюдений,

анализа генетических данных можно сделать вывод о распределении пациентов по подгруппам в зависимости от прогрессивности течения АГ.

Таблица 3. Распределение генотипов генов в группе пациентов ХИМ.

Ген	FGB		F5		F7		F12		PAI-1		GPIIb		GPIIIa		CYP11B2	
SNP-ID	rs1800790		rs6025		rs6046		rs1801020		rs1799768		rs2243093		rs5918		rs1799998	
генотипы (n)	G/G	42	G/G	76	G/G	58	C/C	34	4G/4G	25	T/T	71	T/T	53	T/T	22
	G/A	36	G/A	5	G/A	21	C/T	35	4G/5G	42	T/C	9	T/C	23	T/C	36
	A/A	3	A/A	0	A/A	2	T/T	12	5G/5G	14	C/C	1	C/C	5	C/C	23
Ген	ACE		MTHFR		PON1		PON2		NOS		NOS3		LTA			
SNP-ID	rs1799752		rs1801133		rs662		rs1801282		rs2297518		rs1799983		rs909253			
генотипы (n)	I/I	21	C/C	48	A/A	47	C/C	42	C/C	51	G/G	46	A/A	37		
	I/D	41	C/T	27	A/G	30	C/G	32	C/T	28	G/T	29	A/G	38		
	D/D	18	T/T	6	G/G	4	G/G	7	T/T	2	T/T	6	G/G	6		
Ген	PDE4D		PDE4D		HIF1a		HIF1a		ALOX							
SNP-ID	rs966221		rs2910829		rs11549465		rs11549467		rs4769874							
генотипы (n)	C/C	38	C/C	17	C/C	I/I	I/I	78	G/G	70						
	C/T	27	C/T	35	C/T	I/D	I/D	3	G/A	11						
	T/T	16	T/T	29	T/T	D/D	D/D	0	A/A	0						

Также в двух подгруппах больных был проведен анализ распределения генотипов для каждого из исследуемых полиморфных участков генов. Статистически значимых различий в частоте встречаемости генотипов генов ACE, SERPINE1, FGB, F5, F7, F12, GPIIb, GPIIIa, MTHFR, CYP11B2, PON1,

PDE4D (rs966221)

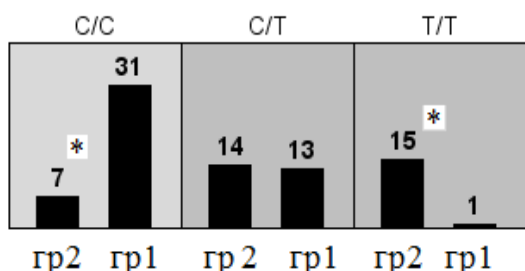


Рисунок 2. Распределение генотипов гена PDE4D в двух подгруппах пациентов с хронической ишемией головного мозга.

PON2, NOS2, NOS3, HIF1a, LTA, ALOX5AP, в двух подгруппах пациентов выявлено не было. При анализе распределения генотипов гена PDE4D были выявлены различия для SNP83 C>T (rs966221). Так генотип C/C чаще

выявляли у пациентов подгруппы 1 (68% против 19%), в то время как генотип T/T чаще встречался у пациентов подгруппы 2 (42% против 2%), различия статистически достоверны (p=0,0001) (рис. 2). Так как для подгруппы 2 характерно быстрое прогрессирующее течение АГ, можно предположить, что генотип T/T является

фактором риска прогрессивного развития АГ. Для проверки этого предположения провели сравнительный анализ генотипов гена *PDE4D* у пациентов с быстрым или кризовым течением и пациентов с медленным течением или отсутствием заболевания в общей выборке пациентов с хронической ишемией мозга. Генотип Т/Т чаще встречался у пациентов с прогрессирующим течением АГ (8/17) по сравнению с пациентами с медленным течением АГ или гипо- и нормотонией (8/56) в общей выборке (73 пациента). Разница статистически достоверна (ОШ=6,22; ДИ=1,86-20,79; $p=0,004$).

Полученные данные в нашем исследовании позволяют рассматривать генотип Т/Т SNP83C>Т гена *PDE4D* в качестве фактора риска прогрессивного течения АГ, а также хронической ишемии мозга, в целом, так как артериальная гипертензия является одним из главных факторов риска развития ишемии мозга.

Клинико-генетический анализ пациентов с ишемическим инсультом

Анализ клинической картины ишемического инсульта проводился у 178 больных с нарушением мозгового кровообращения в каротидном и вертебробазилярном бассейне (табл.4). При анализе данных инструментального исследования (КТ, МРТ) и неврологического статуса пациентов показано, что в бассейне левой средней мозговой артерии - 48 (27%), в бассейне правой средней мозговой артерии -32 (18%), в бассейне правой внутренней сонной артерии -17 (9,5%), в бассейне левой внутренней сонной артерии -20 (11,2%), в вертебрально-базилярной системе -61 (34,3%). Фоновыми заболеваниями являлись: артериальная гипертензия 3 стадии 3 степени -115 (92%), атеросклероз брахиоцефальных артерий -99 (79,2%), пароксизмальные формы нарушения ритма сердца – (пароксизмальная форма мерцательной аритмии – 12 (6,7%), постоянная форма фибрилляции предсердий -17 (9,5%). Сопутствующими заболеваниями являлись: ИБС: атеросклеротический кардиосклероз – 21,6%, постинфарктный кардиосклероз – 6,4%, хронические обструктивные болезни легких – 8,8%, варикозная болезнь нижних конечностей – 17,6%, окклюзивный тромбоз подкожных и глубоких вен -8% .

Таблица 4. Клиническая характеристика пациентов с ИИ

Неврологические симптомы		Частота встречаемости			
		Кардиоэмболический (n=49-28%)	Атеротромботический (n=54-30%)	Неуточненный (n=75-42%)	
Уровень сознания	Ясное сознание	29 (16,3%)	30 (16,9%)	36 (20%)	
	В сознании	21 (11,7%)	26 (14,6%)	23 (12,9%)	
	Оглушение	5 (2,8%)	3 (1,6%)	2 (1,1%)	
Речевые нарушения	Тотальная афазия	6 (3,3%)	4 (2,2%)	3 (1,6%)	
	Сенсорная афазия	4 (2,2%)	0		
	Моторная афазия	3 (1,6%)	3 (1,6%)		
	Сенсо-моторная афазия	18 (10%)	19 (10,6%)	17 (9,5%)	
	Нет речевых нарушений	29 (16,3%)	32 (18%)	41 (23%)	
Менингеальные знаки		6 (4,8%)	3 (2,4%)	6 (4,8%)	
Гемипарез	Частичная	13 (7,3%)	15 (8,4%)	9 (5%)	
	Полная				
Нистагм		9 (7,2%)	4 (3,2%)	11(8,8%)	
Объем движений глазных яблок	Норма				
	Парез взора	6(4,8%)	3 (2,4%)	3 (2,4%)	
Девиация языка в сторону пареза		17 (13,6%)	13(10,4%)	9 (7,2%)	
Дизартрия	Легкая	19(15,2%)	7(5,6%)	4 (3,2%)	
	Грубая		2 (1,6%)		
Дисфагия				1 (0,8%)	
Лицевая мускулатура	Асимметрия	2 (1,6%)	1 (0,8%)	2 (1,6%)	
	Парез/паралич нижней группы мышц	18 (14,4%)	17 (13,6%)	22 (17,6%)	
Чувствительные нарушения на лице		4(3,2%)	2 (1,6%)	2 (1,6%)	
Парезы ипсилатеральные очагу поражения	Плегия	В/к	8 (6,4%)	10 (8%)	2 (1,6%)
		н/к	7 (5,6%)	9(7,2%)	1(0,8%)
	1 балл	в/к	3(2,4%)	2 (1,6%)	2 (1,6%)
		н/к	2 (1,6%)	4(3,2%)	2 (1,6%)
	2 балла	в/к	1 (0,8%)	5 (4%)	
		н/к	1 (0,85)	3(2,4%)	2(1,6%)
	3 балла	в/к	8(6,4%)	7(5,6%)	3(2,4%)

		н/к	2(1,6%)	8(6,4%)	2(1,6%)
	4 балла	в/к	2(1,6%)	6(4,8%)	8(6,4%)
		н/к	9(7,2%)	5(4%)	8(6,4%)
Анизорефлексия			30(24%)	34(27,2%)	35(28%)
Нарушение чувствительности на туловище			7(5,6%)	6(4,8%)	7(5,6%)
Симптом Бабинского Функции тазовых органов	Не контролирует		18(14,4%)	19(15,2%)	22(17,6%)
			10(8%)	12(9,6%)	5(4%)
	Контролирует		20 (16%)	22(17,6%)	30(24%)

Проведено генотипирование 69 образцов ДНК пациентов с ИИ. Средний возраст исследуемой группы составил 58 ± 10 лет, женщин 63%, мужчин 37%. Все пациенты имели ХИМ 2 ст, осложненной ишемическим инсультом с неуклонным прогрессивным кризовым или медленным прогрессивным течением артериальной гипертензии. Прогрессивное кризовое течение АГ отмечается у 40 (58%), медленное прогрессивное у 29 (42%). Наличие состояния стресса и тревожности отмечают 60 (86%) пациентов. Постоянно курят 16 (23%) пациентов. 45 (65%) пациентов отмечали наличие перенесенных инсульта и инфаркта у ближайших родственников. Атеротромботический характер инсульта выявлен у 26 пациентов (38%), кардиоэмболический инсульт- 29 (42%). Цефалгии были характерны у 32 пациентов (46%), головокружение у 39 пациентов (57%), нарушения сна у 22 пациентов (32%), астенический синдром у 51 пациента (74%), когнитивные нарушения у 21 (30%), двигательные нарушения у 43 пациентов (62%), соответственно.

При анализе клинических картин пациенты были разбиты на подгруппы в зависимости от ведущего клинического фактора:

1. По степени стенозирования брахиоцефальных артерий. 1-я подгруппа с гемодинамически незначимым стенозированием ВСА (менее 75%)- 47 пациентов, 2-я группа с гемодинамически значимым стенозированием (более 75%) ВСА-32 пациента. Страдает постоянной формой фибрилляции предсердий в 1 подгруппе- 12 пациентов (25%), во 2 подгруппе- 2 пациента (4%).

Атеротромботический характер инсульта в 1 подгруппе у 17 %, во 2 подгруппе у 64 % ($p < 0,05$), кардиоэмболический характер инсульта в 1 подгруппе в 30% случаев, во 2 подгруппе в 14%. По клиническим данным: головная боль в 1 подгруппе- 45%, во 2 подгруппе- 50%, головокружение в 1 подгруппе 57%, 2 подгруппе 55%, когнитивные нарушения в 1 подгруппе 21%, во 2 подгруппе 50% ($p < 0,05$).

2. По характеру развития инсульта (кардиоэмболический или атеротромботический). Кардиоэмболический тип инсульта наблюдался у 49 пациентов (28%), атеротромботический – у 54 пациентов (30%).

3. По характеру течения артериальной гипертензии: медленное прогрессирующее течение у 29 пациентов, неуклонно прогрессирующее и кризовое течение у 40 пациентов. Атеротромботический характер инсульта в 1 подгруппе в 8 % случаев, во 2 подгруппе в 14%, кардиоэмболический инсульт в 1 подгруппе 4% случая, во 2 подгруппе 13% случаев, нарушение сна в 1 подгруппе в 4%, во 2 подгруппе в 18% случаев ($p < 0,05$), астенический синдром в 1 подгруппе 19%, во 2 подгруппе 32%, мнестические нарушения в 1 подгруппе 7%, во 2 подгруппе 15% .

4. По наследственной отягощенности: с отягощенной наследственностью 45 пациентов (65%), с неотягощенной наследственностью 24 (35%) пациента. При детальном анализе подгруппы по сочетанию эндо- и экзогенных факторов на первый план выступает влияние внешних факторов.

Анализ исследуемой подгруппы 1 по степени стенозирования брахиоцефальных артерий показал наиболее достоверные различия по характеру развития ишемического инсульта (атеротромботический, кардиоэмболический), критерий достоверности составил 3,85, а также данные когнитивных нарушений (по шкале MMSE) - критерий составил 2,37.

Также был проведен анализ распределения аллелей и генотипов для каждого из исследуемых полиморфных участков генов в группах больных с инсультом, имеющих различные клинические проявления.

При сравнении пациентов с разной степенью гемодинамического стеноза выявлено, что у пациентов с гемодинамически незначимым стенозом ВСА и наличием постоянной формы фибрилляции предсердий наиболее часто

наблюдался кардиоэмболический механизм развития инсульта, у пациентов с гемодинамически значимым стенозом ВСА – атеротромботический характер, также в данной подгруппе отмечалось неуклонно прогрессирующее и кризовое течение АГ с сосудистыми кризами и наиболее выраженными нарушениями когнитивной функции. Аллель С гена *GP1BA* чаще встречался в подгруппе пациентов с гемодинамически значимым стенозированием ВСА (24%) по сравнению с подгруппой пациентов с гемодинамически незначимым стенозом (8%) и эти различия были статистически значимы (ОШ=3,39, 95% ДИ=1,12-10,25, $p=0,03$).

Можно предположить, что в исследованных подгруппах пациентов, различающихся по степени стенозирования ВСА, повышение риска тромбообразования вследствие наличия аллеля С гена *GP1BA* являлось значимым фактором риска развития инсульта в сочетании с нарушением гемодинамики в основных сосудах мозгового кровообращения, в том числе при выраженном стенозе или окклюзии ВСА.

Сравнение частот аллелей исследуемых генов в подгруппах пациентов с различным характером развития инсульта (атеротромботический или кардиоэмболический) показало, что аллель D гена *ACE* чаще встречался в подгруппе пациентов с кардиоэмболическим инсультом (67%) по сравнению с пациентами с атеротромботическим инсультом (38%) (ОШ=3,3, 95% ДИ=1,17-9,46, $p=0,02$).

При сравнении частот аллелей исследуемых генов в подгруппах пациентов с различным характером течения артериальной гипертензии (медленное прогрессирующее течение или неуклонно прогрессирующее и кризовое течение) статистически значимых различий между подгруппами выявлено не было.

В подгруппе 2 выделенной в соответствии с характером течения АГ наиболее выраженные когнитивные нарушения наблюдаются у пациентов с ИИ при быстром прогрессивном течении заболевания с сосудистыми кризами, резкими колебаниями артериального давления и общемозговыми симптомами.

Клиническим примером нашего исследования, является пациентка С., 64 лет, длительное время страдающая артериальной гипертензией, кризового

течения. Родственники - мать - АГ кризового течения, перенесла ОНМК в возрасте 62 лет, отец – АГ, быстрое прогрессивное течение. Заболела остро 17.10.12г. на фоне резкого повышения АД до 200/110 мм рт ст.

МСКТ головного мозга 17.10.12г: в кортикальных отделах левой височной



доли визуализируется зона пониженной плотности размерами: 88x44,5x25 мм, в подкорковых структурах левой височной доли зона пониженной плотности размерами: 57x20,5x31 мм. Мелкие сосудистые очаги в правой височной и теменной долях до 3 мм. Срединные структуры не смещены. Боковые желудочки асимметричны, S>D на 4 мм. Заключение: ОНМК по ишемическому типу в бассейне левой СМА. (рис.6).

Рисунок 6. Результаты МСКТ пациентки С.

УЗИ исследования экстракраниальных отделов церебральных артерий: стенотический

атеросклероз БЦА (гемодинамически значимые стенозы ОСА(76%), ВСА dext. et sin(55%). Непрямолинейный ход ПА в V1-V2 сегментах со снижением ЛСК в V2 сегменте. Доступны локации лишь сифоны ВСА с обеих сторон трансорбитальным доступом. Кровоток магистрального типа с легкой асимметрией ЛСК S<D.

ЭКГ: ритм синусовый. ЧСС 61-75 уд в мин. Умеренно выраженные изменения миокарда передне-перегородочной области левого желудочка.

Неврологический статус: По шкале NIHSS тяжесть состояния 22 балла. Уровень сознания - оглушение. Контакт невозможен из-за тотальной афазии. Установка взора влево. Правосторонняя гемиплегия с низким мышечным тонусом в руке, гипертонусом в ноге. Сухожильные и периостальные рефлексы D>S. Симптом Бабинского с двух сторон.

Заключение: ишемический инсульт в бассейне левой СМА от 17.10.12г. Атеротромботический подтип. На фоне атеросклероза сосудов головного мозга, сердца, магистральных артерий, аорты, гипертонической болезни III стадии, IV степени риска ССО, кризового течения.

Результаты генотипирования: У пациентки с прогрессивным кризовым течением артериальной гипертензии на фоне стресса, гемодинамически значимым стенозом ВСА проведено исследование образца ДНК (табл.5). По результатам генотипирования был определен генотип СС гена *GP1BA*, и генотип ID гена *ACE*. В нашем исследовании наличие аллеля С гена *GP1BA* было ассоциировано с окклюзией БЦА и выраженным гемодинамически значимым стенозом, что находит подтверждение у данного пациента. Аллель D гена *ACE* чаще встречался в подгруппе пациентов с кардиоэмболическим инсультом, что у данного пациента не отмечено. Аллель Т гена *PDE4D* (rs966221) присутствует в данном генотипе, этот вариант согласно результатам нашего исследования, показал ассоциации с прогрессивным кризовым течением АГ.

Таблица 5. Результаты генотипирования пациента С.

<i>FGB</i>	<i>F5</i>	<i>F7</i>	<i>F12</i>	<i>PAI-1</i>	<i>GP1ba</i>	<i>GP3a</i>	<i>CYP11B2</i>
GG	GG	GG	CT	4G5G	CC	TT	TC
<i>ACE</i>	<i>MTHFR</i>	<i>PON1</i>	<i>PON2</i>	<i>NOS2</i>	<i>NOS3</i>	<i>LTA</i>	
ID	CC	AG	CC	CT	GG	AA	
<i>PDE4D-1</i>	<i>PDE4D-2</i>	<i>HIF1a-1</i>	<i>HIF1a-2</i>	<i>ALOX</i>			
TT	CC	CC	GG	GG			

Выявленные маркеры риска развития кардиоэмболического и атеротромботического инсульта требуют дальнейшего изучения и представляют важность для формирования прогноза течения цереброваскулярной патологии.

В ходе исследования были идентифицированы локусы, связанные с развитием кардиоэмболического и атеротромботического подтипов ИИ, что подтверждает данные ранее проведенных исследований по отдельным полиморфизмам генов. Нами выявлены полиморфные маркеры в генах *GP1BA* и *ACE*, которые ассоциированы с особенностями клинического течения цереброваскулярного процесса (на фоне прогрессивного кризового течения АГ) и с патогенетическими вариантами ишемического инсульта (атеротромботический, кардиоэмболический), при наличии других

немодифицированных факторов риска. Применение клинико-генетического анализа наиболее актуально в персонализированной медицине, для возможного создания индивидуальных алгоритмов прогнозирования осложнений ХИМ, первичной и вторичной профилактики инсульта, а также для применения в комплексной оценке развития различных патогенетических вариантов ИИ. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят прогнозировать индивидуальный ответ на лечение и профилактику повторных заболеваний в зависимости от сочетания клинических и генетических характеристик.

Выводы

1. Сочетание модифицированных и немодифицированных факторов риска, включая некоторые полиморфизмы генов, кодирующих белки системы регуляции артериального давления, свертывания крови, липопротеидного обмена, связанные с воспалительным ответом и эндотелиальной дисфункцией, у пациентов с острой и хронической ишемией головного мозга позволяет уточнить характер течения сосудистого процесса и его прогноз.
2. У пациентов с хронической ишемией головного мозга на фоне артериальной гипертензии неуклонного прогрессирующего и кризового течения в сравнении с пациентами с медленным прогрессивным течением выявлена более высокая частота встречаемости генотипа T/T SNP83C>T гена *PDE4D*, (ОШ=6,22, ДИ=1,86-20,79, p=0,01). Генотип T/T может выступать в качестве дополнительного фактора риска прогрессивного течения АГ на фоне хронической ишемии мозга и атеросклеротического поражения церебральных сосудов.
3. В исследованных подгруппах пациентов с различной степенью стенозирования БЦА аллель С гена *GP1BA* чаще встречался в подгруппе пациентов с гемодинамически значимым стенозированием ВСА (24%) по сравнению с подгруппой пациентов с гемодинамически незначимым стенозом (8%) (ОШ=3,385, 95% ДИ=1,118-10,248, p=0,03). Носительство аллеля С гена *GP1BA* можно рассматривать как дополнительный фактор риска развития ИИ у пациентов с выраженным стенозом БЦА.

4. Выявлена статистически значимая корреляция между развитием кардиоэмболического патогенетического варианта ишемического инсульта и носительством аллеля D гена *ACE* (67% случаев по сравнению с подгруппой с атеротромботическим патогенетическим вариантом ИИ- 38%) (ОШ=3,333, 95% ДИ=1,174-9,464, $p=0,026$), который может являться дополнительным значимым фактором риска развития кардиоэмболического патогенетического варианта ИИ.

5. Выявление полиморфизмов генов *ACE*, *PDE4D*, *GP1BA* является дополнительным фактором комплексной оценки развития ХИМ и ишемического инсульта при проведении дифференцированной первичной и вторичной профилактики инсульта.

Практические рекомендации

1. Выявленные клинические факторы риска могут быть рекомендованы к применению в клинической практике в отделениях сосудистых заболеваний головного мозга для улучшения и разработки персонафицированной профилактики острых нарушений мозгового кровообращения.

2. Выявленные аллели генов могут рассматриваться, как дополнительные потенциальные факторы риска развития осложнений хронической цереброваскулярной недостаточности, и рекомендованы к использованию при разработке персонафицированных подходов к профилактике сосудистых заболеваний головного мозга, так и при амбулаторном наблюдении.

3. Генотип по локусу SNP83C>T гена *PDE4D* можно учитывать в формировании оценки риска развития сосудистых заболеваний головного мозга в качестве фактора риска прогрессирующего течения АГ, а также хронической ишемии мозга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гунченко, А.С. Изучение влияния клинико-генетических факторов на прогрессивность течения хронической ишемии головного мозга/ А.В. Анисимова, С.С. Галкин, А.Ю.Иконникова и др. // Уральский медицинский журнал. 2016.- №4.- С. 16-20.

2. Гунченко, А.С. Особенности клинических и генетических факторов риска в развитии ишемического инсульта / А.В. Анисимова, А.Ю.Иконникова, М.А. Авдоница, Т.В.Наседкина // Уральский медицинский журнал. 2017. -№9. - С. 22-30.

3. Гунченко, А.С. Тромбоцитарный гемостаз и системная тромболитическая терапия при ишемическом инсульте/ А.В. Анисимова, С.С. Галкин, Т.И. Колесникова, и др. // Уральский медицинский журнал. 2016. - №4(137). - С. 27-33.

4. Гунченко, А.С. Динамика параметров тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с ишемическим инсультом после проведенной системной тромболитической терапии / А.В.Анисимова, С.С.Галкин // Уральский медицинский журнал. 2017. -№9.- С. 44-50.

5. Гунченко, А.С. Состояние микроциркуляции и тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с ишемическим инсультом после проведения системной тромболитической терапии/ А.В. Анисимова, С.С. Галкин, А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров // Неврология и психиатрия им.Корсакова. Спецвыпуски. 2018. - № 118(3). -С. 39-42.