

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Гунченко Анастасия Сергеевна

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

14.01.11 Нервные болезни.

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель:
доктор медицинских наук
А.В. Анисимова**

**Научный консультант:
доктор биологических наук
профессор Т.В. Наседкина**

Москва, 2018г

Оглавление

Указатель сокращений.....	3
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	10
1.1. Особенности эпидемиологии, этиологии, патогенеза, клиники и диагностики острой и хронической ишемии головного мозга.....	10
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	31
2.1. Клинические методы исследования. Экспериментальная часть.....	26
Глава 3. Клинико-генетический анализ	39
3.1 Клинико-генетический анализ больных хронической ишемией головного мозга	39
3.2. Клиническая характеристика больных ишемическим инсультом.....	48
3.3. Сравнительная характеристика основных факторов риска в группе больных ИИ и группе больных ХИМ.....	53
3.4. Клинико-генетический анализ пациентов с ИИ.....	57
Глава 4. Обсуждение результатов.....	78
Выводы.....	97
Практические рекомендации.....	98
Список литературы.....	99

Перечень условных обозначений

- ACE – ген ангиотензин превращающего фермента
- ALOX5AP – кодирует белок, активирующий 5-липоксигеназу
- APOE – ген кодирует аполипопротеин E
- CYP11B2 – ген кодирует альдостеронсинтазу
- FGB – ген кодирует фибриноген
- F5 – ген кодирует фактор 5 свертывания крови
- F7 – ген кодирует фактор 7 коагуляции
- F12 – ген кодирует фактор 12 коагуляции
- GP1BA – кодирует аминокислотную последовательность 1b-субъединицы специализированных рецепторов тромбоцитов
- GPIIIa – ген гликопротеина
- HIF1a – ген кодирует транскрипционный регулятор генов
- LTA – ген кодирует лимфотоксин-альфа
- MTHFR – кодирует фермент метилтетрагидрофолатредуктазу
- NOS2 – кодирует NO-синтазу
- NOS3 – кодирует эндотелиальную NO- синтазу
- PAI-1 – ген активатор плазминогена тип 1
- PDE4D-1 и 2 – ген кодирует фосфодиэстеразу 4D
- PON1 – кодирует фермент параоксаназа 1
- PON2 - кодирует фермент параоксаназа 2
- АГ - артериальная гипертония
- АД - артериальное давление
- АДФ – аденозиндифосфат
- Апо А-1 – аполипопротеины А-1
- АТ III – антитромбин III
- АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
- ВСА – внутренняя сонная артерия
- ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка

ГЭБ – гематозэнцефалический барьер
ДАД – диастолическое артериальное давление
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИИ – ишемический инсульт
ИМ – инфаркт миокарда
КТ – компьютерная томография
КТ-АГ – компьютерная ангиография
КЭИ- кардиоэмболический инсульт
МРТ – магнитно-резонансная томография
МТГФТ – метилентетрогидрофолатредуктаза
ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
ОСА – общая сонная артерия
ОР – относительный риск
ОШ – отношение шансов
СМАД – суточное мониторирование артериального давления
СОЭ – скорость оседания эритроцитов
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ТАП – тканевый активатор плазминогена
ТГ – триглицериды
ТИА – транзиторная ишемическая атака
УЗДГ – ультразвуковая доплерография
ЧМТ – черепно-мозговая травма
ФГ – фибриноген
ФП – фибрилляция предсердий
ФР – факторы риска
ХИМ – хроническая ишемия мозга
ЦВЗ – цереброваскулярные заболевания
ЦНС – центральная нервная система
ЭЭГ – электроэнцефалография

Введение

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.

Современные представления о гетерогенности и мультифакториальности ишемического инсульта, предусматривают детальное изучение всех звеньев патогенеза, способствующих 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 наиболее достоверно сформулировать представление об основных и

дополнительных 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*, *GPIIIa*, *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 персонифицированной первичной и вторичной профилактики.

4. Исследовать распределение аллелей и генотипов генов *ACE*, *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GPIIIa*, *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*, *GPIIIa*, *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 T/T SNP83C>T 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 I/D 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*, *GPIIIa*, *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 персонифицированного диагностического алгоритма для выявления прогностических критериев предрасположенности к ишемическому инсульту для осуществления первичной и вторичной профилактики.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы доложены на конференциях кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, используются в ГКБ № 1 им. Н.И. Пирогова и ГКБ им. В.М. Буянова Департамента здравоохранения города Москвы в отделении нейрореанимации, неврологии, и занятиях со студентами, проводимых на кафедре.

Апробация работы

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на заседании кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета от 22 июня 2018 года (№ протокола 77). Диссертация выполнена в соответствии с планом научных исследований РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

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.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, в 4 изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

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 всего 257 источников, из них 76 отечественных и 181 зарубежных.

Методология и методы исследования

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Для осуществления поставленных целей были использованы клинические, нейровизуализационные, генетические и УЗ-методы исследования. Проведена статистическая обработка полученных данных.

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 T/T SNP83C>T гена *PDE4D* (ОШ=6,22; ДИ=1,86-20,79; $p=0,004$).

3. У пациентов с ИИ аллель С гена *GPIBA* 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, $p=0,03$).

Глава 1

Обзор литературы

1.1 Особенности эпидемиологии, этиологии, патогенеза острой и хронической ишемии головного мозга

Цереброваскулярные заболевания представляют собой одну из важнейших проблем клинической неврологии. В настоящее время острый инсульт является основной причиной инвалидности и одной из ведущих причин смертности в мире. Последние эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что ишемический инсульт является доминирующим заболеванием в структуре всех цереброваскулярных болезней. В Российской Федерации регистрируется более 450 тысяч случаев инсульта в год. На долю ишемического инсульта приходится от 60% до 80% всех регистрируемых случаев. Ишемический инсульт относится к мультифакторным заболеваниям и его развитие обусловлено взаимодействием внешних факторов и наследственной предрасположенности. Сложная биологическая природа нарушений, приводящих к инсульту, является следствием взаимного потенцирования множества факторов риска, включающих как немодифицируемые (возраст, пол, расовая и этническая принадлежность, наследственность и т.д.), так и модифицируемые факторы (повышенное артериальное давление, сахарный диабет, повышенный уровень холестерина, мерцательная аритмия, избыточная масса тела, образ жизни). Модифицируемые факторы риска ответственны не более чем за 60% общепопуляционного риска развития ишемического инсульта [243].

Данные многочисленных исследований с участием близнецов и семейных пар позволяют предположить немалую роль генетических факторов.

Одним из перспективных подходов к изучению роли молекулярно-генетических механизмов формирования предрасположенности к ишемическому инсульту является изучение генов-кандидатов, потенциально вносящих

наибольший вклад в патогенез цереброваскулярных болезней [68]. Первые исследования, посвященные роли наследственных факторов в развитии нарушений мозгового кровообращения, в нашей стране проводились в конце 1960 – начале 1970-х гг. Е.В. Шмидт указывал о важной роли наследственной отягощенности у ближайших родственников больных с инсультом. Согласно наблюдениям Е.Ф. Давиденковой и соавт., в семьях пациентов с инсультом у родственников среднего и старшего возраста часто выявляются ишемический инсульт и инфаркт миокарда, артериальная гипертензия, а у лиц молодого возраста, как правило, мигрень [35].

Поиск генов, участвующих в формировании предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям, систематически проводится уже более 20 лет. Предполагалось, что будет возможно определить индивидуальный генетический риск развития инсульта, который можно будет учитывать в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний наряду с другими известными модифицируемыми и немодифицируемыми факторами риска. Но, несмотря на многочисленные исследования на сегодняшний день ни один из генетических маркеров (кроме моногенных форм заболевания) не рассматривается однозначно, как фактор риска развития ишемического инсульта. Множество исследований связанных с изучением генетических факторов риска возникновения инсульта, доказывают мультифакторность заболевания, т.е. в развитии заболевания одновременно задействовано несколько генов, оказывающих детерминирующее влияние на различные звенья патогенеза заболевания. В когортных научных исследованиях было выявлено, что пациенты, родственники которых перенесли ишемический инсульт, заболевали на 30% чаще. Влияние генетических факторов имеет больше значение и у возрастных пациентов старше 70 лет. Результаты наиболее ранних исследований Хаке В., Hassan A., Marcus H.S. свидетельствуют о значительном повышении риска инсульта при наличии его у ближайших родственников, значительное внимание уделялось подобным состояниям, как гипергомоистеинемия, метаболический синдром, гипертоническая болезнь[190]. Проведены исследования по изучению

ассоциации риска развития ишемического инсульта с гипергомоцистеинемией, а так же носительством различных полиморфных вариантов генов метилентетрагидрофолатредуктазы, факторов свертывания крови. Эпидемиологические исследования показали, что для проявления генетической предрасположенности на фенотипическом уровне необходимо обязательное участие разнообразных модифицируемых факторов. Однако результаты исследований ассоциаций генетических маркеров с риском развития цереброваскулярных заболеваний мозга достаточно противоречивы и могут быть не воспроизводимы в разных популяциях [Машин В.В. 2018, Torshin I. Yu.2008].

Обширные мета-анализы данных, включающие десятки исследований, позволяет более четко представить роль генетических факторах риска инсульта. Крупнейшее европейское исследование последних лет – Metastroke (2012г)[39] показало наиболее выраженные ассоциации с развитием атеротромботического подтипа ишемического инсульта полиморфизмов отдельных аллелей гена *HDAC9*, в тоже время продемонстрирована взаимосвязь аллельных вариантов в структуре хромосомы 9p21. Для носителей мутаций в генах транскрипционных факторов *PITX2* и *ZFHX3* выявлен значительный риск развития кардиоэмболического инсульта.

В настоящее время продолжается накопление сведений о вкладе генетических факторов в риск развития ишемического инсульта. Наличие генетической предрасположенности к инсульту показано как на животных моделях, так и на человеке – в исследованиях близнецов, родственников, при семейном анализе [137]. Анализ большой выборки пациентов и соответствующей по полу и возрасту контрольной группы показал высокий показатель отношения шансов (ОШ) у пациентов, имеющих семейную историю инсульта, – 2,24 для инсульта в результате поражения крупных сосудов и 1,93 – для инсульта с поражением мелких сосудов [219]. Кроме того, показано, что генетические факторы имеют большее влияние в случае инсультов крупных и мелких сосудов мозга в сравнении с кардиоэмболическим [165,219]. Наследуемость предрасположенности к ишемическому инсульту, рассчитанная в исследованиях

полногеномных ассоциаций (Genome Wide Association Studies, GWAS), составляет 40% для инсульта, обусловленного гемодинамически значимым атеросклерозом мозговых артерий, 33% – для кардиогенного эмболического инсульта и 16% – для лакунарного инсульта [101]. Исследования на близнецах выявили пятикратное повышение риска инсульта у однояйцевых (монозиготных) близнецов по сравнению с разнояйцевыми (дизиготными), что подтверждает значительный вклад генетического компонента в риск развития инсульта [104]. Метаанализ на основе 18 исследований выявил половые различия в наследовании ишемического инсульта: женщины, перенесшие инсульт, имели положительный семейный анамнез по инсульту чаще, чем мужчины [237]. Генетические факторы влияют на риск развития инсульта на различных уровнях – через другие факторы риска, взаимодействуя с немодифицируемыми и модифицируемыми факторами, либо принимают непосредственное участие в генезе инсульта. Они также могут влиять на тяжесть инсульта, характер течения заболевания и его последствия [128]. Кроме того, инсульт может являться следствием некоторых моногенных нарушений. Моногенные заболевания являются редкими и ассоциированы менее чем с 1% всех случаев инсульта. Они обычно ведут к инсульту определенного типа в детском и юношеском возрасте, при отсутствии других факторов риска, и имеют специфические проявления в фенотипе [82]. В числе моногенных и сравнительно редких заболеваний, сопровождающихся развитием инсульта, следует назвать церебральную аутосомно-доминантную артериопатию с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (ЦАДАСИЛ) [84,130,167], болезнь Фабри, серповидно-клеточную анемию и др. [92,193]. Гораздо чаще инсульт связан с полигенными мультифакторными нарушениями. До настоящего времени в исследованиях генетических факторов предрасположенности к инсульту наиболее распространен подход, связанный с поиском генов-кандидатов, предположительно влияющих на риск развития инсульта, и определением их аллельных вариантов с использованием однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). В свою очередь, однонуклеотидные полиморфизмы выбираются на основании их локализации в генах, продукты

которых участвуют в биологических реакциях, включенных в патофизиологические процессы.

Учитывая известные патогенетические механизмы развития ишемического инсульта, научный поиск в основном направлен по основным ферментативным и метаболическим системам: воспалительный ишемический каскад, гемореологические реакции и свойства, оксидативный стресс, разнообразные молекулярные механизмы сигнальных взаимодействий. Проведены полногеномные исследования ассоциаций, включающих сотни и тысячи пациентов, направленные на поиск новых кандидатных полиморфных вариантов, оказывающих наибольшее влияние на риск развития ишемического инсульта, так и для выявления взаимосвязи уже ранее известных генетических маркеров сердечно-сосудистых заболеваний. Подобный научный подход позволяет установить максимальное количество ассоциированных с инсультом генных мутаций, а также проследить связь ишемического инсульта с другими модифицированными факторами риска.

Наиболее целесообразно в настоящее время планирование и проведение молекулярно-генетических исследований с опорой на тщательно отобранные клинические критерии. Для каждого патогенетического подтипа ишемического инсульта уже получены сведения об основных факторах риска, но также представляется целесообразным оценить вклад достаточно распространенных и известных генетических маркеров (common genetic variants) в характер течения заболевания с разной степенью клинических проявлений, а соответственно, разработать персонифицированный профилактический алгоритм в группах с различной степенью риска.

Статистически значимые различия в частотах встречаемости аллельных вариантов однонуклеотидных полиморфизмов в группах пациентов и здоровых людей позволяют предположить их ассоциацию с риском развития инсульта. Используя этот подход, удалось выявить однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с риском развития инсульта, в генах белков липидного обмена, системы гемостаза, ренин-ангиотензин альдостероновой системы, метаболизма

гомоцистеина, медиаторов воспаления, межклеточных взаимодействий, системы регуляции сосудистого тонуса и пролиферации клеток гладкомышечной мускулатуры.

Из ранее известных научных работ Bersano A., Brenner D., Camire R., Мустафиновой О.Е. известны ассоциации между наличием полиморфных вариантов генов систем свертывания крови, регуляции артериального давления, эндотелиальной дисфункции и ряда других с риском развития ишемического инсульта [9,105,111,114,133,] (рис. 1).



Рисунок 1. Генетические факторы риска развития инсульта

Увеличение в последние десятилетия в популяции лиц пожилого и старческого возраста приводит к возрастанию распространенности цереброваскулярных заболеваний, в том числе хронической ишемии головного

мозга, которая является результатом атеротромбогенеза и других сосудистых патологических процессов.

В ранее проведенных исследованиях на кафедре нервных болезней РНИМУ им. Пирогова выявлено, что патологические изменения в сосудистой системе головного мозга различны у больных с разной степенью тяжести и характером течения АГ. Увеличение толщины комплекса интима-медиа сосудов брахиоцефальной зоны сочетается с нарушением системы гемостаза и нарастанием количества лакунарных инфарктов, увеличением объема поврежденной ткани головного мозга и прогрессированием атрофии головного мозга[3]. Полноценное кровоснабжение головного мозга контролируется разными ауторегуляторными механизмами, среди которых основное место принадлежит системе химической регуляции. В последние десятилетия, наибольший интерес представляет выявление генетических предикторов острой и хронической ишемии головного мозга. Большое количество научных исследований посвящено поиску генетических маркеров и ассоциаций полиморфизмов генов предрасположенности к атеросклерозу, идентифицируются генетические варианты генов метаболизма липидов крови, эндотелиальной дисфункции, системы гемостаза, белков, вовлеченных в агрегацию тромбоцитов и тромбоз, в различных популяциях. Ярославской государственной медицинской академией проведены многочисленные исследования с участием пациентов молодого и среднего возраста с тромбозами. Наследственные дефекты свертывания крови наиболее часто являются причиной угрожающих жизни кровотечений, а также тромбозов и тромбоэмболий основных артерий[50].

Основой развития хронической ишемии головного мозга является нарушение функциональных свойств эндотелия сосудов, что приводит в дальнейшем к изменению сосудистого тонуса и прогрессированию заболевания. Также важную роль играют изменения гемодинамических свойств крови и кровяного давления, именно поэтому наибольший интерес представляет исследование генов, кодирующих белки, принимающих участие в процессах регуляции водно-солевого обмена и поддержании тонуса сосудистой стенки.

Анализ литературных данных свидетельствует о значительной роли хронической гиперактивации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, главным компонентом которой является ангиотензинпревращающий фермент (*ACE*). [40,79,105]. В исследованиях Скворцовой и др. были охарактеризованы распределения частот генотипов и аллелей по отдельным полиморфным участкам гена *ACE* в различных популяциях. Обнаружены межпопуляционные различия по I/D полиморфизму гена *ACE* [105,131]. Ген ангиотензин превращающего фермента (*ACE*)(rs1799752) кодирует аминокислотную последовательность ангиотензин-превращающего фермента, который является одним из основных физиологических регуляторов систем артериального давления и водно-солевого гомеостаза. Носители DD генотипа имеют в 2 раза большую концентрацию ангиотензин-превращающего фермента в сыворотке, чем носители II генотипа, гетерозиготы имеют средние значения. Суммарная активность АПФ у носителей сочетания DD аллелей на 30% выше, чем у лиц с вариантом II, что является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. Выявлены ассоциации D аллеля с инфарктом миокарда, гипертрофией левого желудочка и ишемическим инсультом.

Как известно, конечным этапом патогенеза атеросклероза при развитии цереброваскулярных заболеваний является формирование тромба. К тромбозу кровеносных сосудов может приводить патологическая гиперактивация свертывающей системы крови.

К группе генетических факторов риска развития ишемического инсульта относятся гены, участвующие в гемостазе и процессах свертывания крови. Сохранение нормального состояния крови в сосудистой системе обеспечивается, главным образом, системами свертывания крови и фибринолиза. Обе системы организованы сходным образом, они характеризуются существованием в плазме неактивных форм ферментов глобулиновой природы – протромбина и плазминогена, которые могут быть активированы как тканевыми, так и плазматическими факторами и превращены в тромбин и плазмин. Тромбин вызывает образование фибрина, а плазмин обуславливает его рассасывание. В

физиологических условиях активаторы и ингибиторы системы коагуляции и фибринолиза находятся в динамическом равновесии, большое значение для сохранения жидкого состояния крови имеет также целостность эндотелия. Генетически обусловленные тромбофилии связаны с мутациями в генах факторов свертывания крови, антикоагулянтов и компонентов фибринолитической системы. Наиболее частыми из них являются мутации в генах фактора II (F2, протромбин) и V (F5), антитромбина III, протеинов C и S, тромбо- модулина, плазминогена, тканевого активатора плазминогена, кофактора гепарина II.

Ген *F5* (Фактор V) (rs6025) является важным внутренним компонентом свертывания крови. Bentley P., Peck G., Smeeth L. et al. выявили, что у носителей полиморфизма в факторе V повышается риск развития венозных тромбозов и эмболии легочной артерии. Наличие Лейденской мутации (аминокислотная замена аргинина Arg (R) на глутамин Gln (Q) в позиции 506) повышает риск первичных и рецидивирующих венозных тромбозов в 3-6 раз. Риск развития венозных тромбозов значительно увеличивается (8-кратное увеличение), если пациент, кроме этой мутации также имеет мутацию Т полиморфизма С677Т гена метилтетрагидрофолатредуктазы [109].

Ген *FVII* (rs6046) кодирует коагуляционный фактор VII (проконвертин). Вариант 353Gln ассоциирован с пониженной экспрессией гена. Установлено, что вариант 353Gln соответствует понижению уровня фактора VII в крови на 30%. Данный полиморфизм является протективным маркером и соответствует 2-х кратному понижению риска инфаркта миокарда даже при наличии заметного коронарного атеросклероза[112,115].

Ген *F12* (rs1801020) кодирует коагуляционный фактор XII (F12, Хагемана), который участвует в активации коагуляции крови, процесса фибринолиза, образования кининов. В исследованиях Santamaría, Amparo, et al. полиморфизм 46C>T (rs1801020) связан с уровнями F12 в плазме. Полиморфизм ведет к уменьшению эффективности транскрипции гена. Было показано, что уровень белка в плазме крови достоверно снижен у носителей аллеля Т. К настоящему

времени показана ассоциация полиморфизма rs1801020 фактора F12 с артериально-тромботическими заболеваниями, включая ишемический инсульт.

Ген *SERPINE1* (*PAI-1*) (rs1799768) кодирует ингибитор активатора плазминогена типа 1. Полиморфный вариант 4G участвует в повышении экспрессии гена, что приводит к повышению уровня PAI-1 в крови. Таким образом происходит снижение активности тромболитической системы, и возрастает риск тромбообразования. Известно, что уровень PAI-1 в плазме крови заметно возрастает при развивающемся инсульте, что приводит к истощению фибринолитической системы у пациента. По результатам метаанализа вариант 5G/5G по сравнению с вариантом 4G/4G действительно ассоциирован с пониженным уровнем PAI в плазме крови, но с повышенным риском развития геморрагического инсульта[110,111].

Ген *GP1BA* (rs2243093) кодирует аминокислотную последовательность 1b-субъединицы специализированных рецепторов тромбоцитов. Данные рецепторы участвуют во взаимодействии тромбоцитов со стенкой поврежденного сосуда или поврежденной поверхностью атеросклеротической бляшки. Carter A.M., Catto A.J., Vanford Y.M., Grant P.J. исследовали вариант -5C, который соответствует повышенной экспрессии гена и приводит к изменению кинетики адгезии тромбоцитов. Что позволяет рассматривать его как маркера неблагоприятного развития заболевания и возможных осложнений при наличии кардиоваскулярных заболеваний типа тромбоэмболий. Полиморфизм -5T>C в гене *GP1BA* влияет на способность тромбоцитов к агрегации и может повышать или понижать риск ишемического инсульта. Аллель 145Met является фактором риска развития артериального тромбоза и ассоциирован с повышенным риском развития ИБС и атеросклерозом артерий головного мозга. У женщин моложе 45 лет данный аллель гена ассоциирован с возрастающим риском развития острого ишемического инсульта, особенно в гомозиготном состоянии [116].

Ген гликопротеина IIIa (*GPIIIa*) (rs5918) кодирует рецептор клеточной мембраны тромбоцитов-гликопротеин IIIa, входящий в состав рецепторного комплекса GPIIb/IIIa. Выявлена ассоциация этого полиморфизма с острым

коронарным синдромом, подострым тромбозом стентов и повышенной агрегацией тромбоцитов.

Ген *FGB* (rs1800790) кодирует фибриноген, который является предшественником фибрина. Вариант -445A фибриногена бета (*FGB*) приводит к повышенному уровню фибриногена в крови. В исследовании Zhang, X. F., и T. Y. Люо длительно повышенный уровень фибриногена крови приводит к возрастающему риску образования тромбов. При повышенном кровяном давлении (>160 мм рт.ст.) наличие варианта -455A повышает риск ишемического инсульта. У пациентов с инсультом имеющих вариант -455A могут развиваться мультифокальные инфаркты головного мозга (среднее повышение риска составляет 2.6). При повышенном кровяном давлении и наличии варианта -455A риск трех или более лакунарных инфарктов повышается более чем в 4 раза. Ранее в исследованиях установлено, что развитие артериальных тромбозов у лиц трудоспособного возраста обусловлено, в основном нарушениями в системе тромбоцитарного гемостаза [5,10,23,181]. Своевременное предупреждение острых кардиологических состояний путем раннего и достоверного выявления возможных рисков развития патологических изменений миокарда является важным фактором сохранения нормальной работы сердечно-сосудистой системы. Изучение молекулярных механизмов активации системы тромбоцитарного гемостаза, является в настоящее время актуальным, и имеет большое практическое значение в персонализированной медицине.

Повышенный уровень фибриногена и агрегационная активность тромбоцитов играют большую роль в развитии артериальных тромбозов. Одной из основных причин, приводящих к повышению уровня фибриногена в плазме крови, является наличие полиморфизмов генов *FGA*, *FGB* и *FGG*, кодирующих α -, β - и γ - полипептидные цепи. В настоящее время исследованы, по меньшей мере, 44 однонуклеотидных варианта в кластере этих генов на хромосоме 4 [43,88], и определены этнические различия в частоте встречаемости аллелей и генотипов для некоторых из данных полиморфизмов [97,90,133,152].

Отдельные полиморфные участки гена *FGB* оказывают значимое влияние на уровень фибриногена в сыворотке крови [80,89,98, 125,152,172]. В частности, наличие аллеля -455A полиморфного участка G-455A гена *FGB* определяет повышенный уровень фибриногена [180]. В европейской популяции этот полиморфизм сцеплен с полиморфизмом C-148T [255]. У здоровых обследованных и у лиц с артериальной гипертензией генотип -455A/A ассоциирован с риском повышения уровня фибриногена по сравнению с носителями генотипа G/G. Взаимосвязь данных показателей с повышенной частотой развития острых сосудистых осложнений прослеживается в ряде некоторых исследований [79,81,91,98]. В то же время этот генотип связан с увеличением риска развития ишемической болезни сердца и развития лакунарных инсультов [49,9,126,127].

Ген *CYP11B2* (rs1799998) кодирует альдостеронсинтазу. Нуклеотидный полиморфизм-замена цитозина на тимин, обнаруженный в позиции -344 *CYP11B2* промотера (-344C/T), как было показано, ассоциирован с повышением активности альдостерон-рениновой системы плазме.

Ген *HIF-1a* (rs11549465, rs11549467) кодирует ведущий транскрипционный регулятор генов млекопитающих, ответственных за реакцию на недостаток кислорода. В последнее время значительное внимание уделяется исследованию значимости индуцируемого гипоксией фактора 1 в развитии нейродегенеративных заболеваний, в том числе, таких как ишемический инсульт и хроническая ишемическая болезнь мозга. HIF-1альфа непосредственно участвует в механизмах клеточной гибели, а также вероятно может рассматриваться как один из важных медиаторов гипоксического повреждения клеток при воспалительном каскаде. У пациентов с генотипом CC коллатеральное кровообращение встречается чаще, чем у пациентов с генотипами СТ и ТТ. Наличие аллеля Т снижает экспрессию фактора, индуцируемого гипоксией (HIF1A), что может приводить к снижению скорости ангиогенеза и возрастанию риска развития острого инфаркта миокарда. Ген *LTA* (лимфотоксин альфа)

(rs909253) кодирует цитокин из суперсемейства факторов некроза опухоли. Играет роль в лимфоидном органогенезе и в дифференцировке Т-клеток.

В исследованиях Кольцовой К.В. изучали полиморфные варианты генов-регуляторов рецепторного пути индукции апоптоза (FADD, Fas, каспазы 8). Изучено их влияния на процесс формирования инсульта, характер течения и исход острого ишемического инсульта, атеротромботического подтипа. Выявлено, что изучаемые гены вовлечены в целый ряд генетических реакций, определяющих тканевый ответ на ишемическое повреждение и принимающих участие в формировании самого морфологического дефекта [104].

Ранее были получены данные о роли полиморфизма генов, кодирующих ферменты семейства NO-синтаз, ответственных за регуляцию сосудистого тонуса. Наличие полиморфных маркеров NOS3-786C>T и NOS2-84G>A может быть ассоциировано с нарушением функционирования мелких артерий мышечного типа, в результате поражения которых развивается лакунарный подтип ишемического инсульта[96,97,98,56].

Ген *NOS2* (rs2297518) фермент кодирует NO-синтазу, катализирующий образование оксида азота и цитруллина из аргинина, кислорода и NADPH. В некоторых работах Лимборской С.А., Заседателя В.И., Скворцовой В.И. было показано, что гомозиготность по мутантному аллелю (Asp/Asp) связана с повышением риска развития таких сосудистых патологий, как ишемический инсульт, и хроническая ишемия головного мозга.

Ген *NOS3* (rs1799983) кодирует эндотелиальную NO-синтазу, которая синтезирует окись азота, принимающую участие в вазодилатации (расслаблении васкулярной мускулатуры). Окись азота также влияет на ангиогенез и свертывание крови. Полиморфизм -690C>T приводит к замене Glu на Asp (E298D). В работах Ивановой А.А., Максимова В.Н., Орлова П.С. и др. показано, что гомозиготность по мутантному аллелю Т связана с повышенным риском развития ишемии мозга и ишемической болезни мозга.

Отдельный интерес представляют исследования потенциальных связей между нуклеотидными вариациями в генах, участвующих в липидном обмене, с

риском развития инсульта. Лица с высокими показателями холестерина и липопротеидов имеют высокий риск развития атеросклероза. Патологические изменения возникают не только из-за мутаций в отдельных генах, но и под влиянием внешних и генетических факторов, включающих полиморфные варианты генов, кодирующих аполипопротеины, рецепторы липопротеинов и ферменты их метаболизма в плазме крови [190].

Ген *MTHFR* (rs1801133) кодирует фермент метилтетрагидрофолатредуктазу, дефицит которого приводит к снижению метилирования ДНК, активизации генов и онкогенов. В исследованиях DeBette S., Seshadri S (2009 г) показано, что полиморфизм 677C>T приводит к появлению термолабильного варианта фермента со сниженной активностью и сопровождается повышением уровня гомоцистеина в сыворотке крови. При гомозиготном генотипе ТТ активность фермента снижена на 30%, при гетерозиготном (СТ) до 60%. Гомоцистеинемия - независимый фактор риска развития инсульта.

Эти же авторы исследовали роль гена *PON1* (параоксаназа 1) (rs662), который кодирует одноименный фермент класса арилдиалкилфосфатаз (арилэстераз), осуществляющих деструкцию (гидролиз) фосфорорганических соединений (нейротоксинов). Сравнение частот встречаемости вариантов полиморфизма Q192R в группе из 223 пациентов с коронарной болезнью артерий и 247 здоровых контролей показало, что наличие варианта 192R ассоциировано с 2-кратным увеличением риска коронарной болезни артерий.

Williams F.M.K., Carter A.M., Hysi P.G., Surdulescu G., Hodgkiss D., et al. (2013) исследовали ген *PON 2* (параоксаназа 2) (rs1801282), который кодирует внутриклеточный фермент, в плазме крови белок *PON 2* не обнаружен. В результате проведенных экспериментов было показано, что *PON2*, также как и *PON1*, обладает антигипоксантами свойствами. Одним из компенсаторно-адаптационных механизмов, направленных на защиту клетки от повреждающего действия свободных радикалов является повышение экспрессии гена параоксаназы 2. Полиморфный вариант 311S был ассоциирован с более низким риском ИБС и инсульта.

Ген *APOE* (rs1799820) кодирует аполипопротеин Е, который синтезируется в печени и головном мозге и играет существенную роль в метаболизме липидов. В головном мозге ApoE необходим для доставки холестерина от глиальных клеток мозга до нейронов. Носительство «дикого» аллеля -491A является фактором предрасположенности к ишемическому инсульту. Соответственно, носительство генотипа T/T связано с устойчивостью к ИИ [115].

Ген *PDE4D* (rs152312, rs2910829) кодирует фосфодиэстеразу 4D, которая является членом большого семейства белков. Показана ассоциация полиморфизма rs966221 с предрасположенностью к инсульту. В исследовании Woo с соавт., найдена ассоциация полиморфизма rs2910829 гена *PDE4D* с риском развития инсульта как среди белого, так и среди темнокожего населения.

Ген *ALOX5AP* кодирует белок, активирующий 5-липоксигеназу. По данным авторов Angleton P., Buyru N., Catto A.J. и др. полиморфизм rs4769874 гена *ALOX5AP* является возможным фактором риска развития острого инсульта [85, 105, 119, 144].

К настоящему времени в отечественной и зарубежной литературе изучена обширная группа генетических маркеров, большинство результатов противоречиво и часто не подтверждаются в повторных исследованиях и/или на других выборках. Это связано как с мультифакторной природой заболевания, включающей в т.ч. действие неустановленных факторов, так и с различиями и гетерогенностью исследуемых групп населения. Одновременный анализ комплекса генетических факторов, ассоциированных с риском развития ишемического инсульта, позволит определить лиц, наиболее подверженных заболеванию, с целью проведения своевременных профилактических мероприятий, направленных на снижение риска возникновения различных подтипов ишемического инсульта[12].

В современной научной практике необходим принципиально новый подход к поведению клинико-генетического анализа. Целесообразно проведение молекулярно-генетических исследований с опорой на тщательно отобранные клинические критерии. Одновременное исследование множества генов у

пациентов с мультифакториальными заболеваниями и оценку предрасположенности, необходимо осуществлять при условиях строгой дифференцированной выборки клинических групп. Это позволит производить наиболее качественный клинико-генетический анализ предрасположенности к мультифакторному заболеванию, а также прогнозировать характер течения заболевания, что увеличивает его профилактическую ценность в группах с различной степенью риска.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клинические методы исследования. Экспериментальная часть (Схема 1)

Последние десятилетия ознаменованы значительными успехами в области молекулярно-генетических исследований генома человека, которые позволили от формального описания законов наследования шагнуть на новый уровень к наиболее полной интерпретации (расшифровке) человеческого генома. Понимание основополагающих процессов генетического контроля метаболических механизмов в организме изменяет общие представления об этиологии и устоявшихся молекулярных основах патогенеза моногенных наследственных заболеваний, так и отдельных состояний, определяющих предрасположенность индивида к наиболее распространенным полигенным мультифакториальным заболеваниям. В то же время потенирует развитие новых теорий, призванных объяснить различную индивидуальную чувствительность к неблагоприятным факторам эндогенной среды, инфекционным агентам и фармакологическим лекарственным препаратам. Изучение полиморфизмов отдельных генов имеет большое перспективное значение при тщательном подборе клинических групп пациентов, дифференцированном сопоставлении с клиническими проявлениями мультифакторного заболевания, а также основными факторами риска. Только дифференцированный клинический подход с разработкой индивидуальных генетических карт позволит разработать персонализированные методы лечения, профилактики заболеваний и индивидуальной, генетически обоснованной фармакотерапии.

Наиболее актуальной проблемой современной молекулярной биологии и медицинской генетики является разработка методических (биочипы) и методологических основ современного анализа генетического полиморфизма человека для использования в персонифицированной медицине.

Микрочипы (microarrays) достаточно широко применяются в самых разных областях науки: молекулярной биологии, биомедицины, генетики, онкологии. Существует несколько технологических платформ, на основе которых создаются биологические микрочипы. Наиболее известной является технология Affymetrix GeneChip (Santa Clara, CA, США). Микрочипы Affymetrix включают около 100 индивидуальных элементов (зондов) и используются для одномоментного анализа более 200 000 полиморфных ДНК маркеров. Особенностью данных микрочипов является то, что синтезирование олигонуклеотидных зондов происходит прямо на поверхности кварцевых стекол методом фотолитографии. Также существуют микрочипы, которые содержат на твердой подложке предварительно выделенные или синтезированные фрагменты ДНК. В исследовательских целях применяются микрочипы, содержащие большое количество элементов. Выявление ограниченного набора генетических маркеров, используемого в диагностических целях, представляет переход к микрочипам обоснованным, и содержит десятки или одну - две сотни элементов. В этих случаях применяют микроскопические стекла с нанесенными и ковалентно пришитыми зондами. Особенностью технологии гидрогелевых биочипов является трехмерная структура ячеек геля, в которых иммобилизованы зонды (фрагменты ДНК или белки) [9,46]. Технология гидрогелевых биочипов развивается в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН с 1989 г. и является удобной и надежной платформой для разработки тест-систем для анализа полиморфизма генома человека.

Метод генотипирования с помощью таких тест-систем основан на двухэтапной гнездовой ПЦР с последующей гибридизацией на гидрогелевых биочипах [25]. В ходе первого этапа ПЦР происходит наработка интересующих участков исследуемых локусов с использованием геномной ДНК человека, выделенной из крови. Полученный в ходе первого этапа ПЦР продукт используется в качестве матрицы для второго этапа ПЦР, в котором осуществляется наработка преимущественно одноцепочечного (за счет 10-кратной разницы в концентрациях прямого и обратного праймеров) продукта

ПЦР с одновременным включением в него флюоресцентной метки. Далее осуществляется гибридизация полученных продуктов с биочипом, после чего в зависимости от полученных картин гибридизации делается вывод о генотипе образца. Имобилизованные в ячейках биочипа олигонуклеотиды обычно имеют длину 15-19 оснований, один из олигонуклеотидов комплементарен последовательности «дикого типу» ДНК, а второй «мутантного». Последовательности олигонуклеотидных зондов и условия гибридизации подобраны таким образом, что свечение ячеек наблюдается только при полной комплементарности олигонуклеотидных зондов и флюоресцентно-меченных продуктов ПЦР, что обеспечивает возможность идентифицировать однонуклеотидные замены (Single nucleotide polymorphism, SNP). Принцип метода аллель-специфичной гибридизации представлен на рисунке 2. Для повышения надежности анализа ячейки биочипа продублированы.

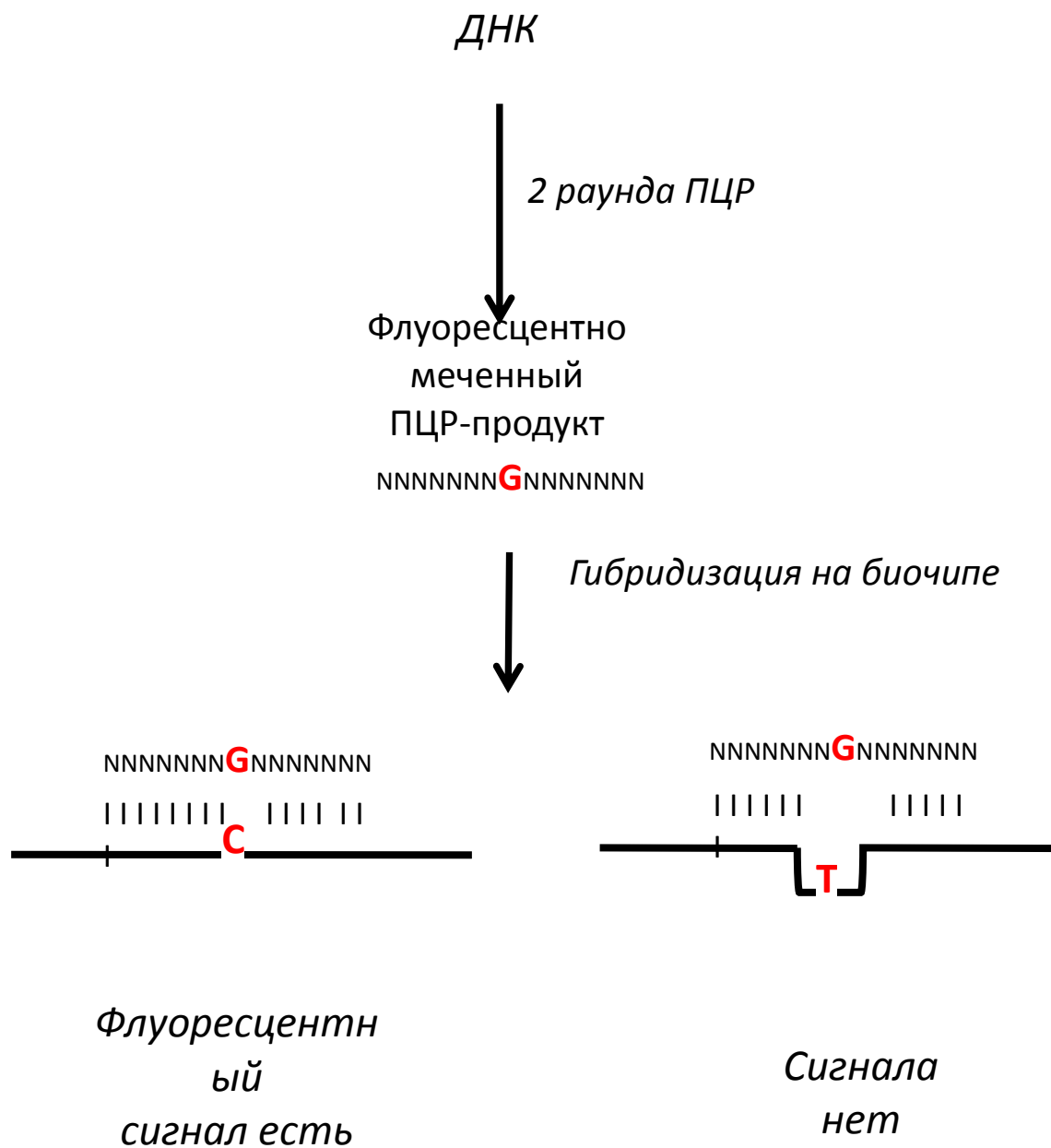


Рисунок 2. Схема анализа SNP методом аллель-специфичной гибридизации на биологическом микрочипе.

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

Клинические параметры:

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

Диагностические параметры:

1. Генетический анализ
2. Биохимический анализ крови
3. КТ, МРТ головного мозга
4. Оценка когнитивных функций по шкале MMSE
5. ЭКГ, ЭЭГ, УЗИ церебральных сосудов
6. Rg органов грудной клетки
7. Осмотр окулиста
8. Заключение специалистов (кардиолог, терапевт и др.)

Проспективное 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.

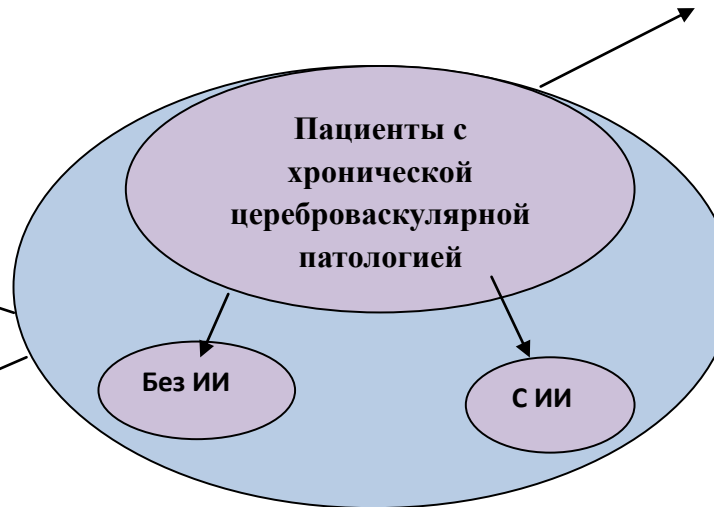


Схема 1. Характеристика организации исследования

В исследовании приняли участие 279 пациентов, из них 81 пациент с хронической ишемией головного мозга и 178 пациентов с хронической цереброваскулярной патологией, осложнившейся ишемическим инсультом. 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)(Табл.1).

Таблица 1.

Распределение ИИ и ХИМ по возрастным категориям

Возраст (лет)	ИИ(n=178)	ХИМ(n=81)
	%	%
40-49	9,5	1,2%
50-59	26,7	11,6%
60-69	29,1	71,2%
70-75	34,7	16%

Распределение больных с ишемическим инсультом по возрастным группам показало увеличение вдвое в возрасте 50-59 лет 60-69 лет, старше 70 лет, по сравнению с 40-49 годами.

Диссертационное исследование проведено на базе Регионального сосудистого центра ГКБ №1 им. Н.И. Пирогова. В дизайне исследования исключено вмешательство в лечебный процесс, побочные эффекты, связанные с исследованием также были исключены. В качестве инвазивных лабораторных методов исследования пациентам производился забор крови. Всем исследуемым больным было проведено обследование согласно Приложению к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

от 6 июля 2009 г. № 389н о порядке оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения. Пациентам были разъяснены цели и задачи исследования, после этого заполнялись и подписывались пациентами бланки информированного согласия, строго оценивались критерии включения-исключения, заполнялись регистрационные карты, и проводилось исследование неврологического статуса пациента. Процедура включения-исключения из исследования проводилась в соответствии с требованиями Этического комитета РНИМУ им.Н.И. Пирогова.

Диагноз выставлялся на основании анамнестических сведений о развитии заболевания у данного пациента, данных о сопутствующих соматических и перенесенных заболеваниях, являющимися факторами риска развития инсульта, неврологического осмотра. При проведении нейровизуализационного исследования (преимущественно КТ головного мозга) верифицировался тип инсульта. При помощи лабораторных, инструментальных, клинических исследований определялся патогенетический подтип инсульта в соответствие с критериями TOAST.

Оценка уровня сознания, неврологического дефицита и исходной тяжести инсульта определялось на уровне нейрореанимационного отделения на основании клинического осмотра и тестирования по международным шкалам Глазго и NIHSS. Исход инсульта оценивался по шкале мобильности Ревермид (приложение).

Артериальная гипертензия распределялась по уровню АД на три степени: отсутствие АГ- АД <140/90 мм рт ст, 1 степень- АД 140-159/90-99 мм рт ст, 2 степень- 160-179/100-109 мм рт ст, 3 степень- >=180/110 мм рт ст. (В соответствии с Национальными рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению артериальной гипертензии)

Наследственную предрасположенность к инсульту оценивали по данным анамнеза - наличию у кровных родственников сердечно-сосудистых заболеваний (перенесенных инфаркта миокарда, инсульта).

Уровень общего холестерина определялся энзиматическим методом. Гиперхолестеринемия определялась при уровне выше 5,2 ммоль/л (200 мг%) по рекомендации Европейского общества по изучению атеросклероза.

Оценивался уровень когнитивных нарушений в соответствии со шкалой MMSE.

Группа пациентов с ХИМ была сформирована 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 клинических карт, информацию об уровне АД в референтной группе получали путем длительного наблюдения пациентов (от 4 до 10 лет).

Уровень стресса оценивали при помощи Шкалы организационного стресса Маклина, данная шкала измеряет толерантность к организационному стрессу, с помощью которой можно проанализировать умение общаться, адекватно оценивать ситуацию, без ущерба для собственного здоровья и работоспособности, активно и интересно отдыхать, в короткие сроки восстанавливать свои силы.

Методы исследования. Компьютерная томография головного мозга проводилась при поступлении всем больным на аппарате Somatomar.SP по программе Sequence, толщина выделяемого слоя и шаг стола: 10мм-для поверхностных отделов супратенториально, 5мм-для базальных отделов, 3 мм- для задней черепной ямки. Параметры томографии 130 кВ, 249 mAs, время сканирования 3 сек. Матрица изображения 512*512. По классификации Н.В. Верещагина, очаги ишемии в веществе головного мозга разделяют на обширные, большие, средние и малые. Обширными считают инфаркты в бассейне интракраниального отдела ВСА. Большими инфарктами считают ишемические повреждения в бассейне основных стволов СМА, развивающиеся в результате окклюзии проксимального отдела СМА и ее основного ствола. Средние по величине инфаркты занимают бассейн корковых и глубоких ветвей СМА. Малые инфаркты, диаметром ≤ 15 мм, включают лакунарные, располагающиеся в области базальных ядер.

Дуплексное сканирование сонных артерий проводили всем исследуемым больным в остром периоде инсульта ультразвуковым сканером Acuson CV 70, с линейным датчиком частоты 5-10 MHz в режиме импульсного доплера. Преобладание в морфологической структуре атеросклеротических бляшек гомогенного компонента или гетерогенного с преобладанием «плотного» компонента, с гладкой поверхностью без признаков изъязвления свидетельствовало об образовании атеротромбоза. Преобладание морфологически нестабильных бляшек, в основном гетерогенных с преобладанием «мягкого» компонента, с неровной внутренней люминальной поверхностью, при стенозах МАГ разной степени (40-59%) свидетельствовало прошедшей артерии-артериальной эмболии. В трансверсальных и продольных срезах измеряли степень стеноза. Степень стеноза $\leq 70\%$ определялся как гемодинамически значимый.

Транскраниальная доплерография проводилась на аппарате «Ангиодин» по стандартной методике пациентам с атеротромботическим подтипом инсульта в остром периоде заболевания. Снижение скорости кровотока в пораженной СМА и резкое падение в ней внутрисосудистого давления свидетельствовало о тромбоэмболической окклюзии одной из ее дистальных ветвей, повышение систолической скорости в пораженной СМА и развитие в ней гиперперфузии свидетельствует о наличии стойкого сужения просвета артерии.

Эхокардиография выполнялась на ультразвуковом диагностическом аппарате Acuson 128 XP/10 по стандартной методике.

Коагулограмма выполнялась на анализаторе крови коагулологическом ВС-10 10 –канальном АО Мелт с определением активированного частичного тромбопластинового времени (норма 30-35 с), протромбинового индекса (норма 80-100%), тромбинового времени (норма 16-21 с), концентрации фибриногена (норма 2-4 г/л), фибринолитической активности (норма 200-249 м/н). Исследование агрегационной активности тромбоцитов проводилось у пациентов перенесших тромболитическую терапию в богатой плазме, содержащей 200-250 тысяч тромбоцитов. Определялась спонтанная агрегация тромбоцитов и

индуцированную. В качестве индукторов применяли: 1% коллаген, 2,5 мкг/мл адреналин. Оценивали время достижения максимальной агрегации.

Генетический анализ. Проведение генетических исследований одобрено Этическим комитетом РНИМУ им. Н.И.Пирогова. 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), *GPIIIa* (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), *TUB* (rs4578424), которые по данным исследований, могут принимать участие в развитии ишемического инсульта.

Схема биочипа приведена в таблице 2. Все ячейки для повышения достоверности анализа продублированы.

Таблица 2.

Схема биочипа

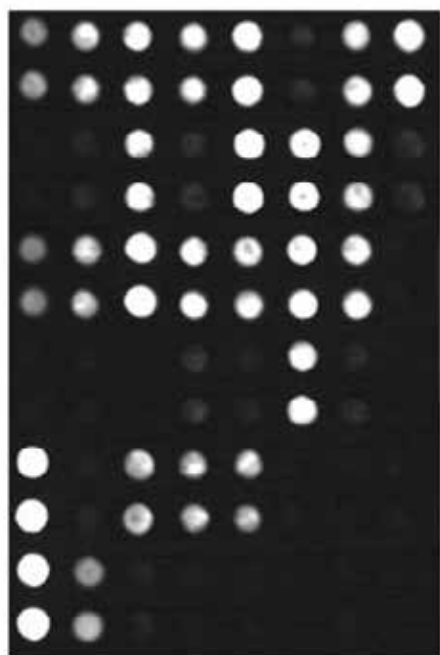
<i>FGB_G</i>	<i>F5_G</i>	<i>F7_G</i>	<i>F12_C</i>	<i>PAI-1_4G</i>	<i>GP1BA_T</i>	<i>GPIIIa_T</i>	<i>CYP11B2_T</i>
<i>FGB_A</i>	<i>F5_A</i>	<i>F7_A</i>	<i>F12_T</i>	<i>PAI-1_5G</i>	<i>GP1BA_C</i>	<i>GPIIIa_C</i>	<i>CYP11B2_C</i>
<i>ACE_I</i>	<i>MTHFR_C</i>	<i>PON1_A</i>	<i>PON2_C</i>	<i>NOS2_C</i>	<i>NOS3_G</i>	<i>LTA_A</i>	
<i>ACE_D</i>	<i>MTHFR_T</i>	<i>PON1_G</i>	<i>PON2_G</i>	<i>NOS2_T</i>	<i>NOS3_T</i>	<i>LTA_G</i>	
<i>PDE4D_C</i>	<i>PDE4D_C</i>	<i>HIF1a_C</i>	<i>HIF1a_G</i>	<i>ALOX_G</i>			
<i>PDE4D_T</i>	<i>PDE4D_T</i>	<i>HIF1aT</i>	<i>HIF1_A</i>	<i>ALOX_A</i>			

Для наработки фрагментов ДНК использовали двухэтапную мультиплексную ПЦР. Реакционная смесь (25 мкл) на первом этапе ПЦР содержит 10 пкмоль каждого праймера, 67 мМ ТрисHCl, pH 8.6, 166 мМ

(NH₄)₂SO₄, 0.01% Тритон X100, 1.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из dNTP (–«Силекс», Россия), 2.5 ед. акт. Taq полимеразы (–«Силекс», Россия) и ДНК-матрицу. Реакцию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 94°C (5 мин), далее 35 циклов амплификации по следующей схеме: 94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 1 мин; далее 72°C, 5 мин.

На втором этапе исследования ДНК проводили асимметричную полимеразно-цепную реакцию. Реакционная смесь включала в себя прямые праймеры в количестве 5 пкмоль, обратные праймеры по 50 пкмоль, а также флуоресцентно меченный дезоксинуклеотидтрифосфат Cy5-дУТФ. В качестве матрицы использовали 2 мкл ПЦР-продукта первого этапа. Реакция проводилась по программе ПЦР, аналогичной программе 1го этапа. Выделенные на втором этапе мультиплексной ПЦР флуоресцентно меченные образцы использовали для гибридизации на биочипе. Гибридизационная смесь объемом 40 мкл содержит 10 мкл формамида (–«Serva», США), 10 мкл 20×SSPE (–«Promega», США) и 20 мкл амплификата (по 4 мкл образца из каждой мультиплексной реакции). Гибридизационную смесь денатурируют при 95°C (5 мин), затем быстро охлаждают на льду (1 мин), наносят на биочип и оставляют на ночь при температуре 37°C. Затем чип отмывают в 1× SSPE в течение 10 мин при комнатной температуре и высушивают. Флуоресцентный сигнал от ячеек биочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением Imageware (–«БиочипИМБ», Россия).

Пример картины гибридизации и результат генотипирования образца приведен на рисунке 3.



<i>FGF</i> G/G	<i>F5</i> G/G	<i>F7</i> G/A	<i>F12</i> C/C	<i>PAI-1</i> 4G/5G	<i>GP1BA</i> C/C	<i>GP1Ia</i> I/C	<i>CYP11B2</i> I/I
<i>ACE</i> I/I	<i>MTHFR</i> C/C	<i>PON1</i> A/A	<i>PON2</i> C/C	<i>NOS2</i> C/C	<i>NOS3</i> G/T	<i>LTA</i> A/A	
<i>PDE4D</i> T/C	<i>PDE4D</i> C/C	<i>HIF1α</i> C/C	<i>HIF1α</i> G/G	<i>ALOX</i> G/G			

Рисунок 3. Картина гибридизации и генотипы образца.

Секвенирование. Правильность определения генотипов для каждого варианта полиморфизма 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 (табл.3):

Таблица 3.

Расчет статистической мощности исследования

	Доверительная вероятность %	Доверительный интервал +/-%	Генеральная совокупность	Требуемый размер выборки
Пациенты с ИИ (клиника)	95	5	178	122
Пациенты с ИИ (генетика)	95	5	69	59
Пациенты с ХИМ (клиника)	95	5	84	69
Пациенты с ХИМ (генетика)	95	5	84	69

Глава 3

Клинико-генетический анализ

3.1 Клинико-генетический анализ больных хронической ишемией мозга

Были проанализированы клинические данные исследуемой группы, в которую вошли 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%), быстро прогрессирующее – 9 (11%). Пониженные цифры артериального давления определены у 11 (13,6%) исследуемых, 14 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) у 9 (11%) пациентов. При сборе анамнестических данных 19 исследуемых 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%) пациентов.

Все пациенты с цереброваскулярной патологией были разделены на 2 группы: группа пациентов, страдающих АГ, и группа пациентов с гипо- и нормотонией. При сравнении влияния факторов риска развития цереброваскулярной патологии в двух группах пациентов выявлено: состояние стресса в 1 группе отмечают 23 пациента (28%), во 2 группе – 12 (14,8%); гиподинамия в 1 группе встречается в 10 (12%) случаях, во 2 группе – 2 (2,5%); наличие избыточного веса отмечено у 6 (7,4%) и 4 (4,9%) пациентов соответственно.

При оценке клинических проявлений в 1 группе наличие вегетативной симптоматики (симпато-адреналовый тип) отмечается у 9 (11%) пациентов и 2 (2,5%) во 2 группе; цефалгический синдром в 1 группе встречается в 22% случаев (18 пациентов) и в 7,4% (6 пациентов) во 2 группе. Астенический синдром – в 17,3% (14 пациентов) и 8,6% (7 пациентов) соответственно, состояние тревожности в 1 группе у 18 (22%) и 7 (8,6%) во 2 группе, когнитивное снижение отмечено у 15 пациентов (18,5%) и 6 (7,4%) соответственно, мнестические нарушения в 18,5% (15 пациентов) и 3,7% (3 пациента) случаев, вестибулопатия в обеих группах на уровне 6%. (табл. 4)

Таблица 4.

Анализ симптомов

Симптом	Группа 1 (n=67)	Группа 2 (n=14)
Цефалгический симптом	22%(18)	7,4% (6)
Астенический симптом	17,3% (14)	8,6% (7)
Тревожность	22% (18)	8,6% (7)
Когнитивно- мнестические нарушения	18,5% (15)	3,7% (3)
Вестибулопатия	6% (5)	6% (5)
Анизорефлексия	16% (13)	8% (7)
Рефлексы орального автоматизма	8% (7)	5% (4)

Генетический анализ пациентов с ХИМ

Результаты генотипирования с помощью тест-системы на основе биочипов пациентов с хронической ишемией головного мозга представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Распределение генотипов в группе пациентов с хронической ишемией головного мозга

Ген	FGB		F5		F7		F12		PAI-1		GPIIb		GPIIIA		CYP11B2	
NP-ID	rs1800790		rs6025		rs6046		rs1801020		rs1799768		rs2243093		rs5918		rs1799998	
генотипы (n)	G/G	42	G/G	76	G/G	58	C/C	34	G/4G	25	T/T	71	T/T	53	T/T	22
	G/A	36	G/A	5	G/A	21	C/T	35	G/5G	42	T/C	9	T/C	23	T/C	36
	A/A	3	A/A	0	A/A	2	T/T	12	G/5G	14	C/C	1	C/C	5	C/C	23
Ген	ACE		MTHFR		PON1		PON2		NOS		NOS3		LTA			
NP-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							
NP-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						

Данные генотипирования были обработаны с использованием иерархического кластерного анализа. Пациенты с хроническим нарушением мозгового кровообращения образовали две группы, в каждую из которых были объединены пациенты с определенными сочетаниями аллелей исследованных генов (рис.4). В первую группу вошло 45 пациентов, во вторую – 36.

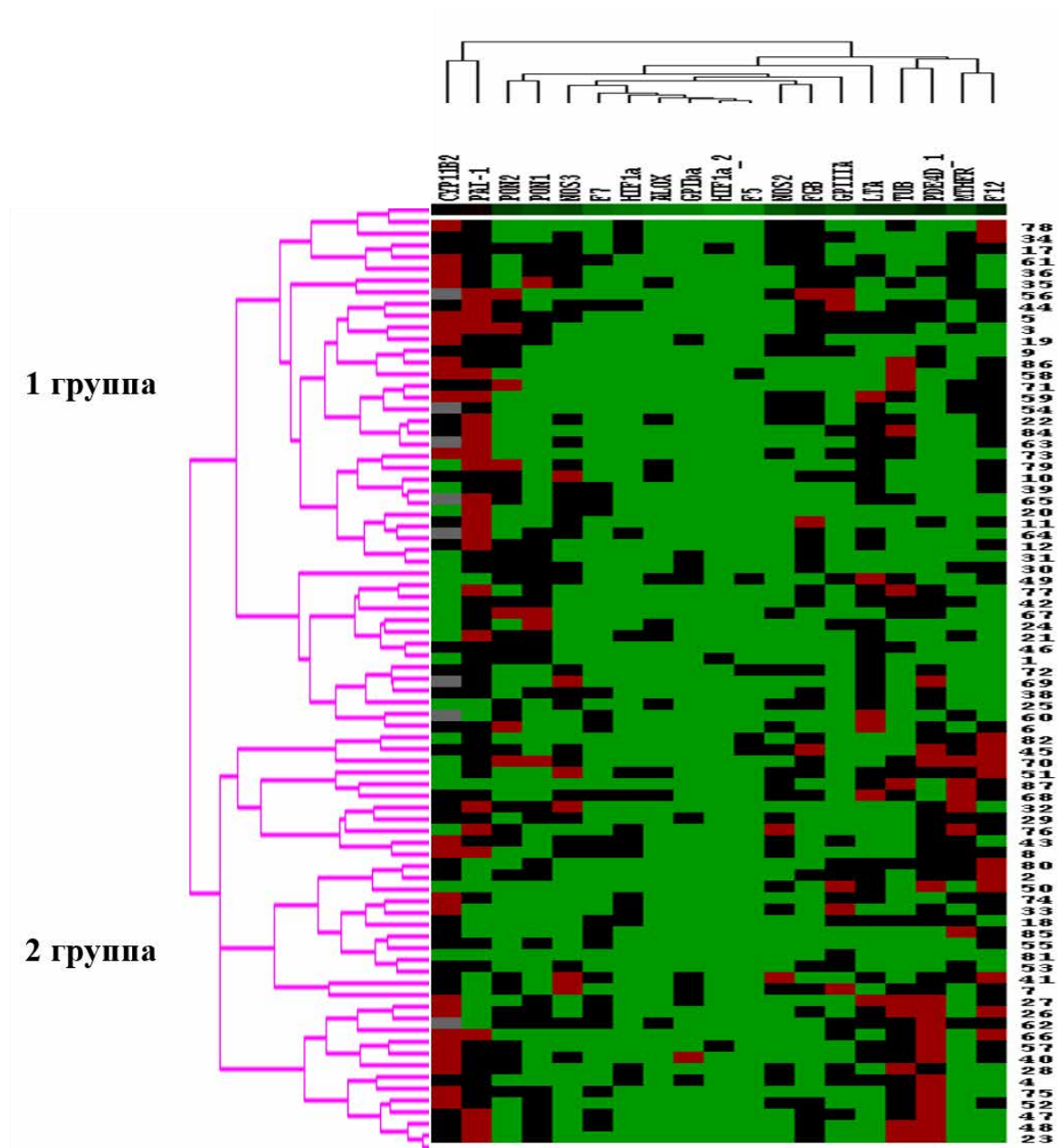


Рисунок 4. Результаты кластерного анализа генетических данных больных с хронической ишемией головного мозга.



Рисунок 5. Сравнение пациентов 1 и 2 групп по факторам риска развития ХИМ.

При анализе клинических картин пациентов двух групп, выделенных по результатам кластерного анализа генетических данных, можно отметить, что в обеих группах доля пациентов, страдающих артериальной гипертензией, составляет 62% и 75%, соответственно (рис.5). 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%.

Можно отметить, что в группе 2 чаще регистрируются головная боль, астенические и вегетативные нарушения, но при статистической обработке данная разница не была значимой, вероятно, из-за малой выборки (рис.6).

В группе 2 отмечается преобладание ХИМ 2 ст.-52,8%, тогда как в группе 1 преобладает ХИМ 1 ст.-44%. Учитывая результаты клинических наблюдений,

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

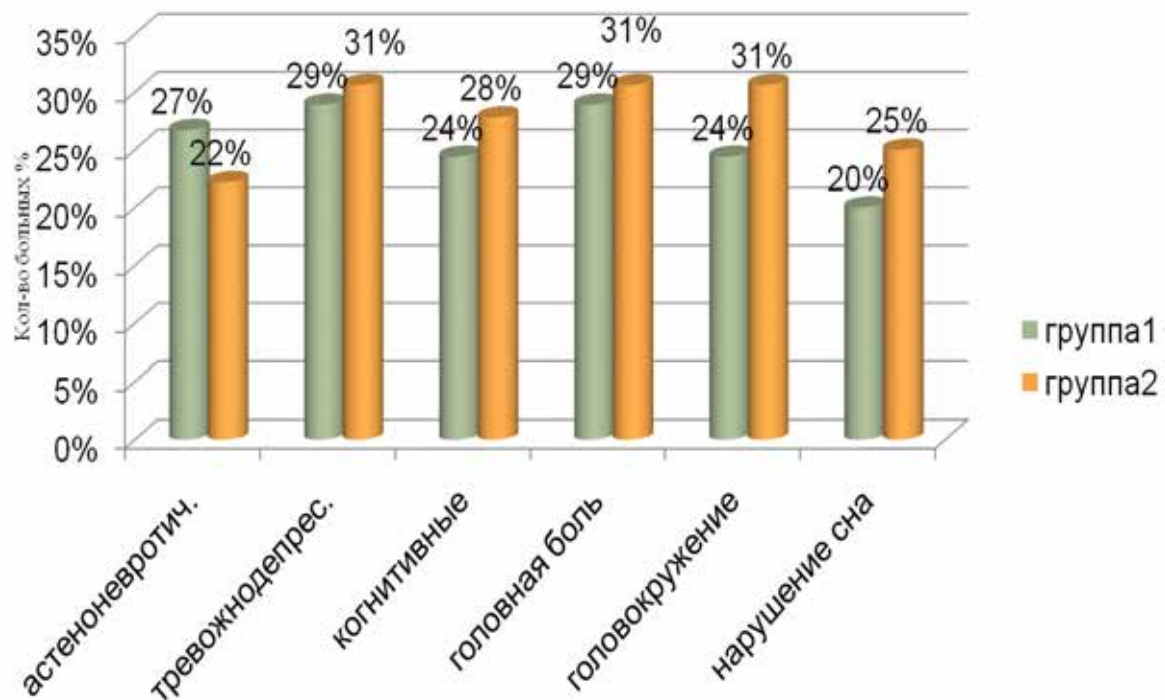


Рисунок 6. Сравнительная характеристика клинических симптомов у пациентов 1 и 2 групп.

Также был проведен анализ распределения генотипов для каждого из исследуемых полиморфных маркеров в двух группах больных. Статистически значимых различий в частоте встречаемости генотипов генов *ACE*, *SERPINE1*, *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GPIIIa*, *MTHFR*, *CYP11B2*, *PON1*, *PON2*, *NOS2*, *NOS3*, *HIF1a*, *LTA*, *ALOX5AP*, *TUB* в двух группах 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 группы 1 (68% против 19%), в то время как генотип T/T чаще встречался у пациентов группы 2 (42% против 2%), различия статистически достоверны ($p=0,0001$) (рис. 7). Так как для группы 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 (81 пациент). Полученные различия статистически значимы (ОШ=6,22; ДИ=1,86-20,79; $p=0,0036$).

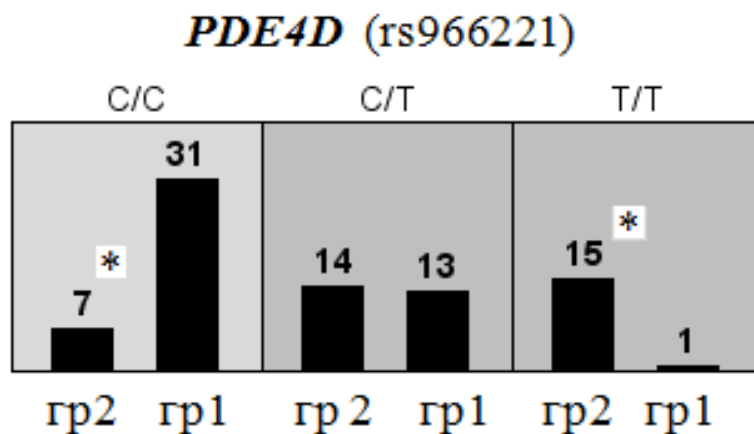


Рисунок 7. Распределение генотипов гена *PDE4D* в двух группах пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Это позволяет 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 основных модифицируемых факторов риска развития ХИМ.

Ген *PDE4D* кодирует фосфодиэстеразу, фермент, относящийся к семейству металлофосфогидролаз, которые регулируют внутриклеточное соотношение циклических аденозинмонофосфата (цАМФ) и гуанозинмонофосфата (цГМФ) за счёт их расщепления до 5'-монофосфатного нуклеотида. Увеличение уровня внутриклеточного цАМФ повышает электрическое сопротивление эндотелия за счёт стабилизации межклеточных контактов, за счёт этого уменьшается проницаемость гематоэнцефалического барьера [138]. Показано, что ген *PDE4D* экспрессируется в большинстве типах клеток и тканей разных систем органов, в

том числе мозг, легкие, почки, моноциты, В- и Т-лимфоциты, а также сосудистые гладкомышечные клетки и активированные макрофаги [213]. Белок PDE4D принимает участие в процессах воспаления при атерогенезе и может приводить к нестабильности атеросклеротической бляшки [100].

Таким образом, уровень ферментативной активности PDE4D может играть важную роль в формировании риска развития сосудистых заболеваний головного мозга посредством участия белкового продукта в воспалительной реакции, формировании физиологического ответа на повреждение сосудов, ангиогенезе. В ряде исследований была установлена прямая зависимость SNP83 (rs966221) гена *PDE4D* с различными формами инсульта [100,149,161].

Наиболее наглядно результаты нашего исследования можем рассмотреть на клиническом примере:

Клинический пример 1. 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 на фоне резкого повышения АД до 200/110 мм рт ст.

МСКТ головного мозга: в кортикальных отделах левой височной доли



Рисунок 9. Результаты МСКТ пациентки С.

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: КТ-картина ОНМК по ишемическому типу в бассейне левой СМА. (рис.9).

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. Гемиплегия справа с низким мышечным тонусом в руке, гипертонусом в ноге. Сухожильные и периостальные рефлексy 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 образцов ДНК (табл.6). По результатам генотипирования был определен генотип CC гена *GP1BA*, и генотип ID гена *ACE*. В нашем исследовании наличие аллеля C 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 T гена *PDE4D* (rs966221) присутствует в данном генотипе, этот вариант согласно результатам нашего исследования, показал ассоциации с прогрессивным кризовым течением АГ.

Таблица 6.

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>
G/G	G/G	G/G	C/T	4G/5G	C/C	T/T	T/C
<i>ACE</i>	<i>MTHFR</i>	<i>PON1</i>	<i>PON2</i>	<i>NOS2</i>	<i>NOS3</i>	<i>LTA</i>	
I/D	C/C	A/G	C/C	C/T	G/G	A/A	
<i>PDE4D-1</i>	<i>PDE4D-2</i>	<i>HIF1a-1</i>	<i>HIF1a-2</i>	<i>ALOX</i>			
T/T	C/C	C/C	G/G	G/G			

3.2. Клиническая характеристика больных с ишемическим инсультом

Анализ клинической картины ишемического инсульта проводился у 178 больных с нарушением мозгового кровообращения в каротидном и вертебробазилярном бассейне. Для определения состояния сознания и неврологической симптоматики у пациентов использовали шкалу NIHSS, которая характеризует различную степень выраженности моторных, сенсорных и речевых нарушений.

Ишемический инсульт в бассейне левой средней мозговой артерии определен у 48 пациентов (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 различной степени выраженности -99 (79,2%) , нарушения ритма сердца – (пароксизмальная форма – 12 (6,7%), постоянная форма -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% (Рис.8).

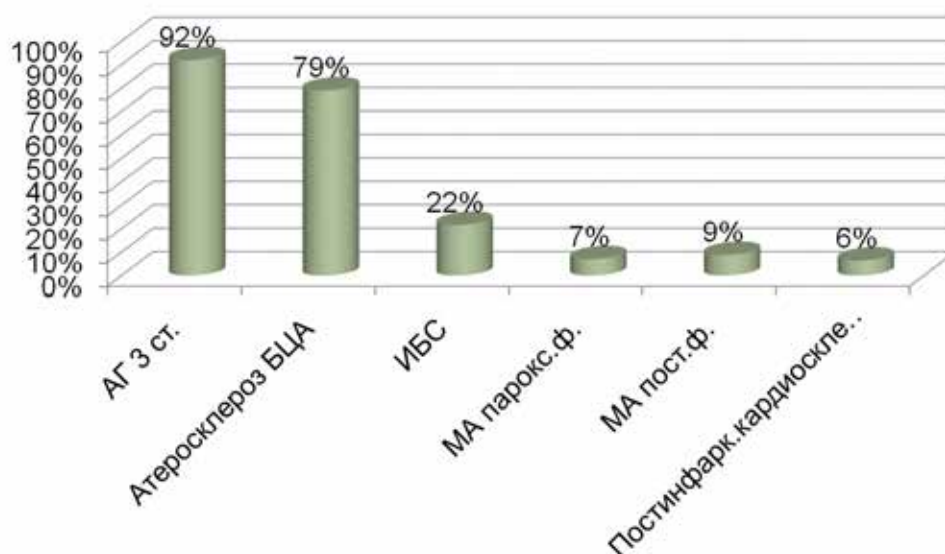


Рисунок 8. Фоновые заболевания у пациентов с III

Все пациенты, участвующие в исследовании, проходили комплексное обследование, в которое входили: ЭКГ, КТ головного мозга, ЭХО-КГ, рентгенографию легких, УЗДГ брахиоцефальных артерий, биохимический анализ крови, включая липидный профиль (общий холестерин, триглицериды, липопротеиды низкой плотности, липопротеиды высокой плотности), общий анализ крови, общий анализ мочи. Осмотры специалистов: терапевта, окулиста, кардиолога и др. (по показаниям).

Признаки гипертрофии выявлялись и при других исследованиях на ЭХО-КГ: гипертрофия миокарда левого желудочка – 59 пациентов (47,2%). Атеросклеротические изменения брахиоцефальных сосудов по результатам УЗДГ выявлялись у 143 (79,8%) пациентов, окклюзия СА - 17(9,3%), гемодинамически значимый стеноз СА (>70%)– 33 (18,5%), стеноз СА от 50 до 70% гемодинамически незначимый – 93 (52%).

В неврологическом статусе пациентов из общемозговых симптомов -ясное сознание –96 (54,4%), в сознании (при речевых нарушениях) –72(40,8 %), оглушение –10 (4,8%) , сопор –0 (0%); диффузная головная боль –59 (47,2%), несистемное головокружение –66 (52,8%), сочетание диффузной головной боли и

несистемного головокружения 45 (36%); отсутствие контроля за функцией тазовых органов –25 (20%).

Высшие корковые функции: тотальная афазия –13 (7,3%), сенсорная афазия –4 (2,2%), моторная афазия –6 (3,3%), сенсо-моторная афазия –52 (29%), речевых нарушений не выявлено –103 (58,2%). Менингеальные симптомы выявлялись в 7 (5,6%) случаях. Выпадение полей зрения: частичная гемианопсия–36 (20%), полная гемианопсия–0 (0%), выпадение полей зрения не выявлено –142 (80%). Нистагм регистрировался в 34 (27,2%) случаях. Диплопия в 2 (1,6%) случаях. Ограничение подвижности при движении глазных яблок - частичный парез взора выявлялся в 7 (5,6%) случаях, тоническое отведение глазных яблок – 7 (5,6%), или полный паралич взора, не преодолеваемый вызыванием окулоцефалического рефлекса в 0 (0%) случаях. Девиация языка в сторону пораженной стороны –45 (36%). Дизартрия мягкая или средней (может не выговаривать некоторые слова) – 24 (19,2%), грубая дизартрия выявлялась –4(3,2%). Дисфагия выявлена –2 (1,6%). Парез лицевой мускулатуры выявлялся в 1 (0,8%) случаях, минимальный паралич (асимметрия) – 3 (2,4%), частичный паралич (полный или почти полный паралич нижней группы мышц) - 59 (47,2%). Чувствительные нарушения на лице на стороне пареза выявлены в 16 (12,8%) случаях. Со стороны двигательной системы выявлялись парезы: плегия - верхние конечности – 25 (20%), нижние конечности – 24 (19,2%); 1 балл - верхние конечности – 4 (3,2%), нижние конечности – 1(0,8%); 2 балла верхние конечности – 7 (5,6%), нижние конечности – 4 (3,2%); 3 балла - верхние конечности - 19 (15,2%), нижние конечности – 20 (16%); 4 балла - верхние конечности – 26 (20,8%), нижние конечности – 32 (25,6%); парезы выявляемые в пробах на ритмику активных движений – 0 (0%). Анизорефлексия в виде снижения рефлексов на стороне пареза наблюдалась во всех случаях. Так же на стороне пареза при осмотре выявлялось снижение тонуса во всех случаях. Чувствительные нарушения на туловище регистрировались в 34 (19.1%) случаях. Патологические стопные знаки (симптом Бабинского) – 81 (45%) (Табл.7).

Таблица 7.

Характеристика группы 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%)
Девияция 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%)

Таблица 7.

Продолжение

		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			18(14,4%)	19(15,2%)	22(17,6%)
Функции тазовых органов	Не контролирует		10(8%)	12(9,6%)	5(4%)
	Контролирует		20 (16%)	22(17,6%)	30(24%)

Атеротромботический подтип инсульта у пациентов с ИИ в каротидном бассейне диагностирован у 54 больных.

Распределение больных по механизму возникновения нарушения мозгового кровообращения в случае данного подтипа инсульта представлено в Табл.8.

Таблица 8.

Механизм возникновения ОНМК

Изменения по УЗДГ БЦА	Количество больных (n=143)
Атеротромботический механизм	
Окклюз.тромбоз ВСА	17 (9,3%)
Гемодинамически значимый стеноз ВСА(>70%)	33 (18,5%)
Артерио-артериальный механизм	
Стеноз СА от 50 до 70%	93 (52%)

Клиническая картина при наличии стеноза ВСА не более 70% с наличием морфологически нестабильной бляшки свидетельствует о прошедшей артерио-артериальной эмболии ветвей СМА (52%). В случае гемодинамически значимого стеноза ВСА обусловлена закупоркой СМА (18,5%). В случаях окклюзивного тромбоза ВСА (9,3%) закупорки внутримозговой артерии не происходило, но клиническая картина соответствовала поражению СМА.

По данным литературных источников острое развитие инсульта наблюдается при артерио-эмболическом механизме развития АТИ, подострое развитие, характеризующееся нарастанием выраженности неврологической симптоматики в течение нескольких часов, наблюдается у больных с атеротромбозом ВСА, что подтверждается на примере исследуемой группы больных.

3.3. Сравнительная характеристика основных факторов риска в группе больных с ИИ и группе больных с ХИМ

По данным ранее проведенных множественных исследований и публикациям известно, что артериальная гипертензия является одним из наиболее значимых факторов рисков развития инсульта. Это подтверждается и в нашем исследовании: артериальная гипертензия зарегистрирована у 84,9% пациентов с ИИ против 21% у больных с ХИМ ($p < 0,05$). При сравнении распределения больных с ИИ и пациентов из группы ХИМ по степени артериальной гипертензии, отмечено, что у группы с ХИМ крайне редко встречалась АГ 3 степени (4,8%), АГ 1 степени (31,7%), и преимущественно регистрировали нормотонию (63,5%). В группе больных ИИ АГ 1 степени регистрировали только в 5,6% случаев, а АГ 3 степени - в 60,3% (Рис. 9).

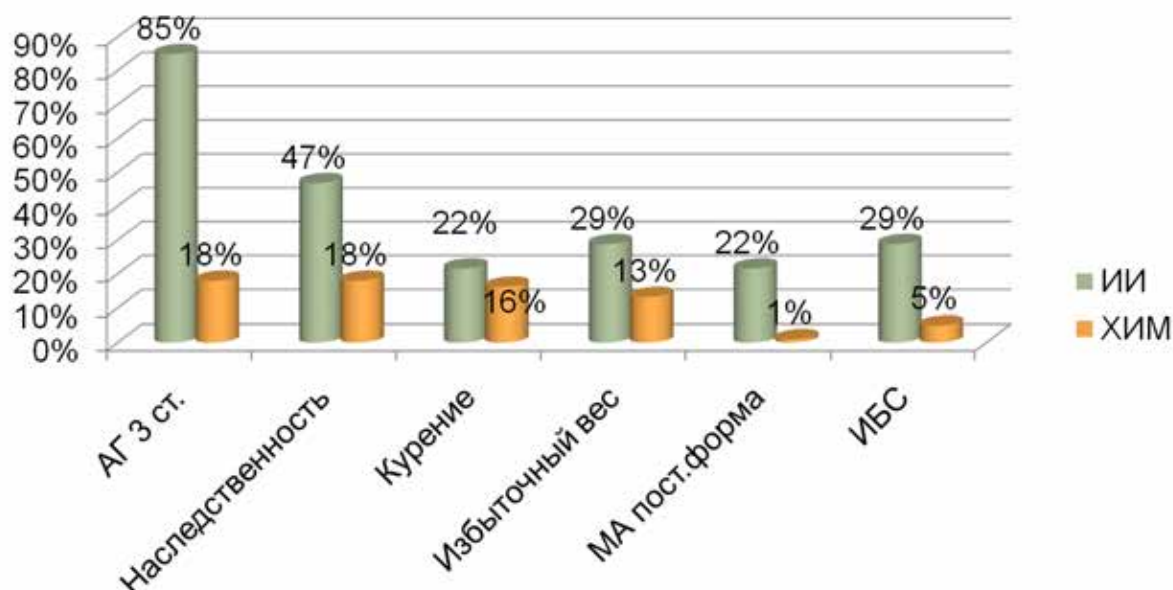


Рисунок 9. Распределение больных с инсультом и больных с ХИМ по факторам риска.

Среди исследуемых пациентов с ОНМК из 110 пациентов страдающих гипертонической болезнью той или иной степени у 59 (53,6%) человек регистрируется по данным Эхо-КГ гипертрофия левого желудочка.

Важное значение имеет семейный анамнез для получения максимального количества информации о наследственной предрасположенности к развитию инсульта. Учитывая данные таблицы 1 отягощенная наследственность, регистрируется среди 47,2% больных инсультом, и 18,2% в группе ХИМ - в связи с чем, можно считать данный фактор значимым в развитии ишемического инсульта в исследуемой группе ($p < 0,05$).

В нашей группе больных доля курящих составляет 21,6%, а в группе контроля 16,2 %, что является статистически не значимым фактором риска ($p > 0,05$).

Избыточный вес является фактором риска развития инсульта и сердечно-сосудистых заболеваний, усугубляющим течение артериальной гипертензии. В исследуемой группе больных ИИ повышенный ИМТ регистрировался в 2 раза чаще, чем у пациентов с хронической ишемией мозга: 28,8% против 8% ($p<0,05$). Было отмечено, что большая часть пациентов в исследуемой группе с повышенным ИМТ имеют ожирение I степени, 4 пациента имеют ИМТ выше 40.

У исследуемых больных со II и III степенью ожирения в 100% случаев отмечается наличие артериальной гипертензии 2-3 степени.

В то же время многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что мерцательная аритмия является наиболее значимым фактором риска инсульта.

В нашей исследуемой группе постоянная форма МА регистрируется в 21,6% случаев, в группе ХИМ- 1%, что в данном случае является статистически значимым фактором ($p<0,05$). А также ревматическое поражение и протезирование клапанов сердца в анамнезе в группе пациентов с ИИ- 6,4%, в группе ХИМ-0% ($p<0,05$).

По литературным данным отмечена четкая взаимосвязь злоупотребления алкоголем и развитием ОНМК, но в нашей работе это не нашло достоверного подтверждения: в группе больных ИИ-4%, в группе ХИМ- 1%(табл.9).

Большое значение имеет наличие фоновых заболеваний, в частности, сердечная патология (ИБС, постинфарктный кардиосклероз, ХСН), регистрировалась в 28,8% случаев, в то время как в группе ХИМ - 5%, что может свидетельствовать о достоверности значения данного фактора в развитии ИИ ($p<0,05$).

Наиболее часто среди обследуемых пациентов выявляли ИБС и МА, вызванные атеросклеротическим кардиосклерозом в 21,6%. Ревматическое поражение клапанов сердца и протезирование клапанов встречается в 6,4% случаев.

Таблица 9.

Сравнительная характеристика групп по факторам риска

Факторы риска	ИИ n, %	ХИМ n, %	ОШ (ДИ 95%), значение p
Артериальная гипертензия	107(84,9%)	18(18,2%)	20,917 (10,536-41,527), p<0,05
Наследственность	59(46,8%)	18(18,2%)	4,023 (2,164-7,477), p<0,05
Курение	27(21,6%)	16(16,2%)	1,429 (0,721-2,832), p>0,05
Избыточный вес	36(28,8%)	13(13,2%)	4,601 (2,027-10,446), p<0,05
Мерцательная аритмия	27(21,6%)	1(1%)	27,0 (3,598-202,623), p<0,05
Сердечная патология	36(28,8%)	5 (5%)	7,604 (2,856-20,248), p<0,05

По данным крупного популяционного исследования, у пациентов, испытывающих психологический стресс, включая подавленность, беспокойство и нарушения сна, риск смерти от инсульта повышался на 66%, а от ишемической болезни сердца — на 59% по сравнению с пациентами без признаков стресса. Влияние психологического стресса одинаково велико как при развитии ИБС так и ИИ [Canadian Medical Association Journal Sciences (Научный журнал Канадской медицинской ассоциации)].

В исследуемой группе больных ИИ состояния стресса (стресс 2-3) отмечены у 98 пациентов (78,4%), в группе ХИМ- у 46 пациентов (46,5%) (p<0,05).

Как правило, в развитии инсульта принимают участие несколько факторов риска, таких как АГ, стресс, наследственная отягощенность по инсульту и инфаркту по данным анамнеза жизни (табл.10).

Таблица 10.

Распределение по сочетанию факторов риска

Сочетание факторов риска	ИИ (n=178)%	ХИМ (n=81)%
АГ+отягощ.наследственность	45	8
Стресс,АГ, отяг.наслед.	40	8
Стресс,отягощ. наследст.	42	19

По данным, представленным в таблице 10 можно сделать вывод о преобладающем значении таких факторов риска развития инсульта, как артериальная гипертензия, стресс и наследственность.

3.4. Клинико-генетический анализ пациентов с ишемическим инсультом

Исследование пациентов с острым ишемическим инсультом головного мозга проведено на кафедре неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова на базе ГКБ №1 им. Н.И.Пирогова (69 пациентов, средний возраст $62,8 \pm 9$ лет, женщины 63%, мужчины 37%).

Производился сбор анамнестических данных, оценка неврологического статуса-поражение черепно-мозговых нервов, нарушение в когнитивной сфере (по шкале MMSE), вестибулярная и мозжечковая симптоматика, клинические проявления нарушения деятельности вегетативной нервной системы, контроль за цифрами артериального давления, данные наследственной отягощенности пациентов по инсульту, начало развития гипертонической болезни, характер течения заболевания, сопутствующие заболевания, наличие инфарктов, инсультов в анамнезе, преобладающие клинические проявления хронической ишемии мозга, наличие уровня стресса (оценивался по шкале организационного стресса Маклина), проводилось КТ и МРТ головного мозга. Проводили забор крови для дальнейшего исследования генетического риска развития сосудистой катастрофы.

Молекулярно-генетическое исследование образцов ДНК было выполнено на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Проведен тщательный отбор пациентов для генотипирования с учетом преобладания клинических симптомов и факторов риска. Проведен анализ клинической картины исследуемой группы 69 пациентов с хронической цереброваскулярной болезнью 2 ст, осложненной инфарктом головного мозга с неуклонным прогрессивным кризовым и медленным прогрессивным течением артериальной гипертензии. Прогрессивное кризовое течение АГ отмечается у 40 пациентов (58%), медленное прогрессивное у 29 (42%). Наличие состояния стресса и тревожности отмечают 60 (86%) пациентов. Постоянно курят 16 (23%) пациентов. 45 (65%) пациентов отмечали в анамнезе наличие перенесенных инсульта и инфаркта у ближайших родственников. Атеротромботический характер инсульта- 26 пациента(38%), кардиоэмболический инсульт- 29 (42%). Цефалгии - 32 пациента(46%), головокружение -39 пациентов(57%), нарушения сна – 22 пациента(32%), астенический синдром -51 пациент(74%), когнитивные нарушения – 21 (30%), двигательные нарушения -43 пациента(62%).

При анализе клинических характеристик пациенты были разбиты на следующие подгруппы:

1. По степени стенозирования брахиоцефальных артерий. 1-я подгруппа с гемодинамически незначимым стенозированием ВСА (менее 75%)- 47 пациентов, 2-я подгруппа 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 % (критерий Фишера 3,85), кардиоэмболический характер инсульта в 1 подгруппе в 30%, во 2 подгруппе в 14%, гемодинамический в 1 подгруппе- 23%, во 2 подгруппе-0. 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% (критерий Фишера 2,3) (Табл.11).

Таблица 11.

Распределение клинических симптомов и подтипов инсульта в группах пациентов с разной степенью стеноза ВСА

	1 группа гемодинамически незначимый стеноз ВСА n=47 чел.	2 группа гемодинамически значимый стеноз ВСА- n= 32 чел.
По характеру инсульта		
Атеротромботический	17%	64%
Кардиоэмболический	30%	14%
Преобладающие клинические симптомы		
Цефалгия	45%	50%
Вестибулопатия	57%	55%
Когнитивные нарушения	21%	50%

2. По характеру течения артериальной гипертензии: медленное прогрессирующее течение 29 пациентов, неуклонно прогрессирующее и кризовое течение – 40 пациентов. Атеротромботический характер инсульта в 1 группе -8 %, во 2 группе 14%, кардиоэмболический в 1 группе 4%, во 2 группе 13%, нарушение сна в 1 группе 4%, во 2 группе 18% (критерий Фишера 2,9), астенический синдром в 1 группе 19%, во 2 группе 32%, мнестические нарушения в 1 группе 7%, во 2 группе 15% (Табл.12).

Таблица 12.

Распределение клинических симптомов и подтипов инсульта в группах пациентов с разным характером течения АГ

	1 группа- n=29 чел. Медленное прогрессирующее течение	2 группа –n= 40 чел. Быстрое и кризовое течение
По характеру развития инсульта		
Атеротромботический	8%	14%
Кардиоэмболический	4%	13%
Преобладающие клинические симптомы		
Нарушение сна	4%	18%
Астенический синдром	19%	32%
Мнестические нарушения	7%	15%

3. 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, а также симптомы астенического синдрома.

Анализ исследуемой группы показал, что наиболее достоверные различия по характеру развития ишемического инсульта получены в подгруппе 1, где пациенты разбиты в соответствие со степенью стенозирования ВСА, критерий достоверности составил 3,85, а также данные когнитивных нарушений (по шкале MMSE) - критерий составил 2,37.

В 1 подгруппе 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.

В подгруппе 2 при сравнении пациентов по характеру течения АГ наиболее выраженные когнитивные нарушения наблюдаются при быстром прогрессивном течении болезни с сосудистыми кризами, резкими колебаниями артериального давления и общемозговыми симптомами.

Результаты генотипирования пациентов с инсультом представлены в таблице 13. При сравнении частот аллелей и генотипов генов *ACE*, *SERPINE1*, *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GPIIIa*, *MTHFR*, *CYP11B2*, *PON1*, *PON2*, *NOS2*, *NOS3*, *PDE4D*, *HIF1a*, *LTA*, *ALOX5AP* в группе больных инсультом по сравнению с группой больных с ХИМ [6] статистически значимых различий не выявлено.

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

Результаты сравнения частот аллелей генов *ACE*, *SERPINE1*, *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GPIIIa*, *MTHFR*, *CYP11B2*, *PON1*, *PON2*, *NOS2*, *NOS3*, *HIF1a*, *LTA*, *ALOX5AP* в подгруппах пациентов с различной степенью окклюзии ВСА представлены в Таблице 14. Обнаружено, что аллель С гена *GP1BA* чаще встречается в подгруппе пациентов с окклюзией ВСА и выраженным гемодинамическим стенозом (24%) по сравнению с подгруппой пациентов с гемодинамически незначимым стенозом (8%) (ОШ=3,39, 95% ДИ=1,12-10,25, $p=0,03$). Результаты сравнения частот аллелей исследуемых генов в подгруппах пациентов с различным характером развития инсульта (атеротромботический или кардиоэмболический) представлены в Таблице 15. Обнаружено, что аллель D гена *ACE* чаще встречается в подгруппе пациентов с кардиоэмболическим инсультом (67%) по сравнению с пациентами с атеротромботическим инсультом (38%) (ОШ=3,33, 95% ДИ=1,17-9,46, $p=0,03$).

Таблица 13.

Частоты аллелей и генотипов в группах больных с хронической ишемией головного мозга и больных инсультом

Ген	SNP-ID	Больные с ишемией (n=81)							Больные с инсультом						
		Генотип			N	Мажорный аллель (n)	Минорный аллель (n)	Частота минорного аллеля	Генотип			N	Мажорный аллель (n)	Минорный аллель (n)	Частота минорного аллеля
FGB	rs1800790	GG	GA	AA		G	A		GG	GA	AA		G	A	
		42	36	3	81	120	42	0.26	33	24	2	59	90	28	0.24
F5	rs6025	GG	GA	AA		G	A		GG	GA	AA		G	A	
		76	5	0	81	157	5	0.03	64	1	0	65	129	1	0.01
F7	rs6046	GG	GA	AA		G	A		GG	GA	AA		G	A	
		58	21	2	81	137	25	0.15	50	14	2	66	114	18	0.14
F12	rs1801020	CC	CT	TT		C	T		CC	CT	TT		C	T	
		34	35	12	81	103	59	0.36	26	34	6	66	86	46	0.35
PAI-1	rs1799768	4G4	4G5	5G5					4G4	4G5	5G5				
		G	G	G		4G	5G		G	G	G		4G	5G	
		25	42	14	81	92	70	0.43	19	42	5	66	80	52	0.39
GP1ba	rs2243093	TT	TC	CC		T	C		TT	TC	CC		T	C	

Таблица 13.

Продолжение

		71	9	1	81	151	11	0.07	47	19	0	66	113	19	0.14
GPIIIA	rs5918	TT	TC	CC		T	C		TT	TC	CC		T	CC	
		53	23	5	81	129	33	0.2	50	14	2	66	114	18	0.14
CYP11B2	rs1799998	CC	TC	TT		C	T		CC	CT	TT		C	T	
		23	36	22	81	82	80	0.49	14	32	14	60	60	60	0.5
MTHFR	rs1801133	CC	CT	TT		C	T		CC	CT	TT		C	T	
		48	27	6	81	123	39	0.24	38	18	10	66	94	38	0.29
PON1	rs662	AA	AG	GG		A	G		AA	AG	GG		A	G	
		47	30	4	81	124	38	0.23	36	21	2	59	93	25	0.21
PON2	rs1801282	CC	CG	GG		C	G		CC	CG	GG		C	G	
		42	32	7	81	116	46	0.28	34	27	5	66	95	37	0.28
NOS2	rs2297518	CC	CT	TT		C	T		CC	CT	TT		C	T	
		51	28	2	81	130	32	0.2	42	23	1	66	107	25	0.19
NOS3	rs1799983	GG	GT	TT		G	T		GG	GT	TT		G	T	
		46	29	6	81	121	41	0.25	35	25	4	64	95	33	0.26
LTA	rs909253	AA	AG	GG		A	G		AA	AG	GG		A	G	
		37	38	6	81	112	50	0.31	36	21	3	60	93	27	0.23

Таблица 23.

Продолжение

<i>PDE4D-1</i>	rs966221	CC	CT	TT		C	T		CC	CT	TT		C	T	
		38	27	16	81	103	59	0.36	27	26		62	80	44	0.35
<i>PDE4D-2</i>	rs2910829	CC	CT	TT		C	T		CC	CT	TT		C	T	
		17	35	29	81	69	93	0.57	21	18	17	56	60	52	0.46
<i>HIF1a-1</i>	rs1154946 5	CC	CT	TT		C	T		CC	CT	TT		C	T	
		65	16	0	81	146	16	0.10	51	11		62	121	11	0.8
<i>HIF1a-2</i>	rs1154946 7	GG	GA	AA		G	A		GG	GA	AA		G	A	
		78	3	0	81	159	3	0.02	62	4		66	128	4	0.03
<i>ALOX</i>	rs4769874	GG	GA	AA		G	A		GG	GA	AA		G	A	
		70	11		81	151	11	0.07	52	5	2	59	109	9	0.08
<i>ACE</i>	rs1799752	DD	ID	II		D	I						D	I	
		18	41	21	80	77	83	0.52	14	37	15	66	65	67	0.51

Таблица 14.

Распределение аллелей в подгруппах пациентов с различной степенью окклюзии ВСА

Ген	Гемодинамически незначимый стеноз (n=84)			Окклюзия и г/з стеноз (n=34)			OR	95% CI	P
	Мажорный аллель (n)	Минорный аллель (n)	Частота минорного аллеля	Мажорный аллель (n)	Минорный аллель (n)	Частота минорного аллеля			
<i>FGB</i>	64	20	0,23	26	8	0,24	0,98	0,385-2,516	0,97
<i>F5</i>	83	1	0,01	34	0	0,00	0,81	0,032-20,311	0,523
<i>F7</i>	70	14	0,17	31	3	0,09	0,48	0,13-1,81	0,418
<i>F12</i>	56	29	0,35	20	14	0,41	1,35	0,597-3,061	0,608
<i>PAI-1</i>	48	36	0,43	21	13	0,38	0,83	0,365-1,866	0,799
<i>GP1ba</i>	77	7	0,08	26	8	0,24	3,39	1,12-10,25	0,03
<i>GP3a</i>	76	8	0,09	28	6	0,18	2,036	0,648-6,391	0,357
<i>CYP11B2</i>	44	40	0,48	16	18	0,53	1,238	0,557-2,749	0,749
<i>ACE</i>	43	41	0,49	16	18	0,53	1,18	0,531-2,621	0,839
<i>MTHFR</i>	61	23	0,27	23	11	0,32	1,268	0,535-3,010	0,852
<i>PON1</i>	69	15	0,18	24	10	0,29	1,917	0,759-4,836	0,253
<i>PON2</i>	63	21	0,25	24	10	0,29	1,25	0,514-3,038	0,793

Таблица 34.

Продолжение

<i>NOS2</i>	68	16	0,19	27	7	0,21	1,102	0,408-2,977	0,848
<i>NOS3</i>	63	21	0,25	27	7	0,21	0,778	0,296-2,046	0,786
<i>LTA</i>	63	21	0,25	28	12	0,30	1,286	0,556-2,971	0,71
<i>PDE4D-1</i>	50	34	0,4	25	9	0,26	0,529	0,220-1,274	0,222
<i>PDE4D-2</i>	42	34	0,4	16	18	0,53	1,39	0,617-3,128	0,555
<i>HIF1α-1</i>	78	6	0,07	29	5	0,15	2,241	0,635-7,913	0,352
<i>HIF1α-2</i>	81	3	0,04	33	1	0,03	0,818	0,082-8,158	0,864
<i>ALOX</i>	79	5	0,06	30	4	0,12	2,107	0,529-8,379	0,457
<i>F2</i>	81	3	0,04	34	0	0,00	0,338	0,017-6,715	0,638

Таблица 15.

Распределение аллелей в группах пациентов с различным характером развития инсульта

Ген	Атеротромботический (n=32)			Кардиоэмболический (n=30)					
	Мажорный аллель (n)	Минорный аллель (n)	Частота минорного аллеля	Мажорный аллель (n)	Минорный аллель (n)	Частота минорного аллеля	OR	95% CI	P
<i>FGB</i>	25	7	0,22	22	8	0,27	1,299	0,405-4,165	0,886
<i>F5</i>	32	0	0,00	30	0	0,00	-		
<i>F7</i>	31	1	0,03	34	4	0,11	3,647	0,386-34,439	0,366
<i>F12</i>	22	10	0,31	15	15	0,50	2,2	0,784-6,194	0,195
<i>PAI-1</i>	21	11	0,34	17	13	0,43	1,46	0,523-4,076	0,603
<i>GP1ba</i>	27	5	0,16	26	4	0,13	0,831	0,201-3,441	1
<i>GP3a</i>	29	3	0,09	25	5	0,17	1,933	0,419-8,914	0,467
<i>CYP11B2</i>	19	13	0,41	17	13	0,43	1,118	0,407-3,068	1
<i>ACE</i>	20	12	0,38	10	20	0,67	3,33	1,17-9,46	0,03
<i>MTHFR</i>	24	8	0,25	21	9	0,30	1,286	0,420-3,934	0,778
<i>PON1</i>	23	9	0,28	21	9	0,30	1,095	0,366-3,282	1
<i>PON2</i>	26	6	0,19	21	9	0,30	1,857	0,569-6,059	0,379
<i>NOS2</i>	28	4	0,13	24	6	0,20	1,75	0,441-6,942	0,502

Таблица 15.

Продолжение

<i>NOS3</i>	26	6	0,19	23	7	0,23	1,319	0,387-4,497	0,759
<i>LTA</i>	26	6	0,19	21	9	0,30	1,857	0,569-6,059	0,379
<i>PDE4D-1</i>	20	12	0,38	22	8	0,27	0,606	0,206-1,786	0,422
<i>PDE4D-2</i>	14	12	0,46	13	17	0,57	1,526	0,530-4,389	0,592
<i>HIF1a-1</i>	29	3	0,09	26	4	0,13	1,487	0,304-7,279	0,703
<i>HIF1a-2</i>	31	1	0,03	29	1	0,03	1,069	0,064-17,905	1
<i>ALOX</i>	31	1	0,03	30	0	0,00	0,344	0,0145-8,789	1
<i>F2</i>	30	2	0,06	30	0	0,00	0,2	0,009-4,344	0,492

Таблица 16.

Распределение аллелей в группах пациентов по типу течения АГ

	Медленное прогрессирующее течение			Быстрое прогрессивное течение + Кризовое течение					
Гены	Мажорный аллель (n)	Минорный аллель (n)	Частота минорного аллеля	Мажорный аллель (n)	Минорный аллель (n)	Частота минорного аллеля	OR	95% CI	p
<i>FGB</i>	37	9	0,20	53	19	0,26	1,474	0,601-3,616	0,507
<i>F5</i>	45	1	0,02	72	0	0,00	0,209	0,008-5,250	0,389
<i>F7</i>	39	7	0,15	62	10	0,14	0,899	0,316-2,557	1
<i>F12</i>	31	15	0,33	45	27	0,38	1,24	0,569-2,704	0,694
<i>PAI-1</i>	25	21	0,46	44	28	0,39	0,758	0,358-1,603	0,566
<i>GP1ba</i>	39	7	0,15	64	8	0,11	0,696	0,234-2,071	0,576
<i>GP3a</i>	40	6	0,13	64	8	0,11	0,833	0,269-2,580	0,776
<i>CYP11B2</i>	26	20	0,43	34	38	0,53	1,453	0,690-3,059	0,351
<i>ACE</i>	23	23	0,50	36	36	0,50	1	0,477-2,096	1,149
<i>MTHFR</i>	33	13	0,28	51	21	0,29	1,045	0,461-2,370	1

Таблица 16.
Продолжение

<i>PON1</i>	40	6	0,13	53	19	0,26	2,39	0,874-6,534	0,107
<i>PON2</i>	38	8	0,17	49	23	0,32	2,23	0,898-5,536	0,0903
<i>NOS2</i>	37	9	0,20	58	14	0,19	0,992	0,390-2,524	1
<i>NOS3</i>	36	10	0,22	54	18	0,25	1,2	0,497-2,895	0,825
<i>LTA</i>	35	11	0,24	56	16	0,22	0,909	0,378-2,184	0,826
<i>APOE</i>	39	7	0,15	52	14	0,21	1,5	0,553-4,069	0,47
<i>PDE4D-1</i>	28	18	0,39	47	25	0,35	0,827	0,385-1,779	0,696
<i>PDE4D-2</i>	26	20	0,43	32	32	0,50	1,3	0,607-2,785	0,534
<i>HIF1a-1</i>	41	5	0,11	66	6	0,08	0,746	0,214-2,601	0,749
<i>HIF1a-2</i>	45	1	0,02	69	3	0,04	1,957	0,197-19,411	1
<i>ALOX</i>	41	5	0,11	68	4	0,06	0,482	1,122-1,900	0,309
<i>F2</i>	45	1	0,02	70	2	0,03	1,286	0,113-14,606	1

Примером данного исследования является клинический пример 2. Пациентка К., 63 лет.

Анамнез: много лет страдает артериальной гипертензией, с максимальным подъемом до 220/140 мм.рт.ст. Отмечает состояние хронического стресса. Родственники: отягощенная наследственность со стороны матери по АГ кризового течения и инсульту с летальным исходом. Отец- АГ, инфаркт миокарда.

Заболела остро, на фоне повышения АД

МСКТ головного мозга : В обеих гемисферах мозжечка, преимущественно в базальных отделах, определяются очаги острой ишемии мозга 20x37 мм слева и 18x29 мм справа. Кора головного мозга истончена. Боковые желудочки расширены до 14 мм. Гипофиз в норме.

Заключение: Очаги острой ишемии в обеих гемисферах мозжечка (Рис. 10).

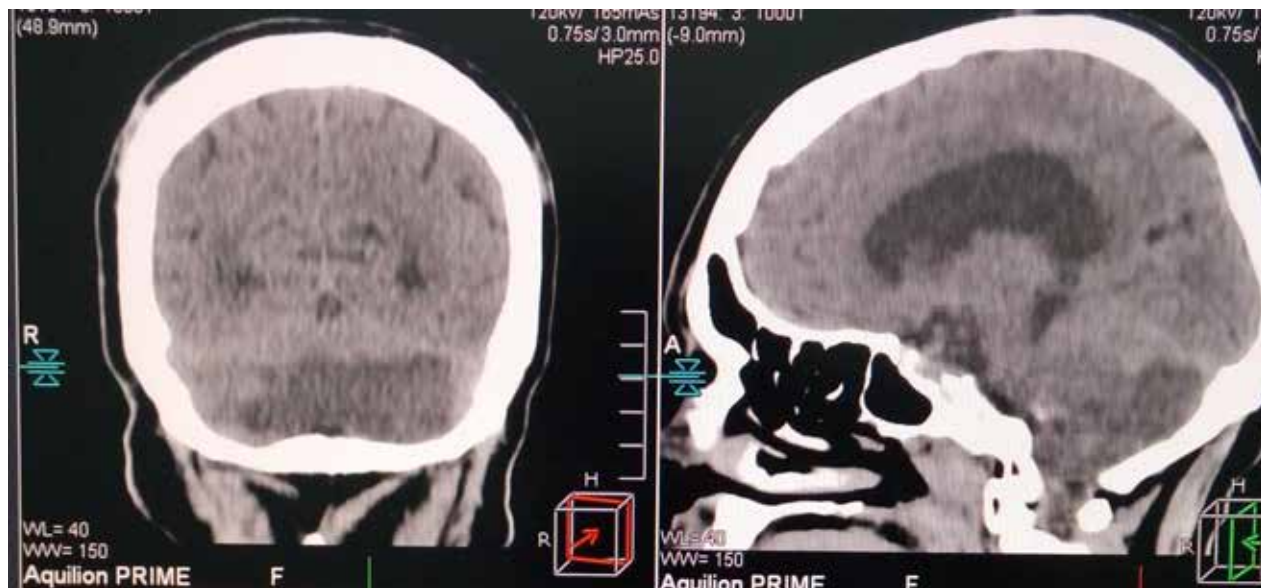


Рисунок 10. КТ картина ОНМК пациента К.

УЗДС БЦА: диффузные изменения спектральных характеристик потоков магистральных артерий основания головного мозга по атеросклеротическому

типу. Признаки гемодинамическим значимого препятствия кровотоку ВСА справа до 78%. Выраженная асимметрия ЛСК по ПА $D < S$.

ЭЭГ: Умеренные изменения б.э.а. головного мозга с признаками дисфункции срединных стволовых структур. NIHSS= 1

Неврологический статус: в сознании, контактна, ориентирована.

Менингеальной симптоматики не выявлено. Головную боль на момент осмотра отрицает. Выраженное несистемное головокружение. Зрачки $D=S$, фотореакция сохранена. Гемипарезов нет. Движения глазных яблок сохранены в полном объеме. Диплопия отсутствует. Левосторонняя гипестезия на лице. Лицевая мускулатура симметрична. Слух сохранен, мелкоамплитудный горизонтальный нистагм. Глотаet твердую и жидкую пищу, не поперхивается, фонировать. Язык по средней линии. Парезов нет. Мышечный тонус без четкой разницы сторон. Сухожильные периостальные рефлексы справа выше, чем слева. Чувствительность на конечностях не изменена. Симптом Бабинского с двух сторон. В позу Ромберга не ставилась ввиду тяжести состояния. УКП выполняет с выраженной атаксией слева. Функции тазовых органов контролирует.

Заключение: Ишемический инсульт в обеих ЗМА. Атеротромботический подтип. На фоне атеросклероза брахиоцефальных артерий.

У пациентки с прогрессирующим кризовым течением АГ, состоянием хронического стресса, гемодинамически значимым атеросклерозом ВСА, отягощенным наследственным анамнезом проведено исследование образцов ДНК.

По результатам генотипирования у больного был определен генотип СС гена *GP1BA*, и генотип II гена *ACE*. В нашем исследовании аллель С гена *GP1BA* чаще ассоциировался с группой пациентов с окклюзией БЦА и выраженным гемодинамически значимым стенозом, что наблюдается у данного пациента. Аллель D гена *ACE* чаще встречался в группе пациентов с кардиоэмболическим инсультом, и является предполагающим потенциальным маркером развития кардиоэмболического инсульта, что в данном клиническом случае не находит подтверждения.

В то же время наличие у пациента генотипа Т/Т по локусу rs966221 гена PDE4D соответствует неуклонному прогрессирующему кризовому характеру течения АГ, и является возможным потенциальным маркером развития ишемического инсульта, что можно наблюдать у данного больного (табл.17).

Таблица 17.

Результаты генотипирования

FGB	F5	F7	F12	PAI-1	GP1ba	GP3a	CYP11B2
GG	GG	GA	CC	4G5G	CC	TT	TC
ACE	MTHFR	PON1	PON2	NOS2	NOS3	LTA	
II	CC	AA	CG	CC	GG	GG	
PDE4D-1	PDE4D-2	HIF1a-1	HIF1a-2	ALOX			
TT	CC	CC	GG	GG			

Ген *GP1BA* кодирует гликопротеин Ib, который входит в мембранный комплекс гликопротеинов тромбоцитов GPIb-V-IX. GPIb-V-IX отвечает за адгезию тромбоцитов к поврежденным стенкам сосудов на первом этапе гемостаза, и является основным тромбоцитарным рецептором для фактора фон Виллебранда [236,190,178]. Наличие цитозина (C) в этой позиции значительно увеличивает экспрессию комплекса GPIb/V/IX на поверхности тромбоцитов [6,236].

В результате этого отмечается увеличение скорости адгезии тромбоцитов к коллагену типа 1, что ведет к повышению скорости агрегации тромбоцитов и увеличивает риск тромбообразования [DOI: 10.1038/sj.tpj.6500435]. Ранее было показано, что аллель C, а так же генотип СТ статистически значимо чаще встречались в группе с острым нарушением мозгового кровообращения в семьях больных с фибрилляцией предсердий [190,232].

Можно предположить, что в исследованных группах пациентов повышение риска тромбообразования вследствие наличия аллеля C 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 СА.

Сравнение частот аллелей исследуемых генов в группах пациентов с различным характером развития инсульта (атеротромботический или кардиоэмболический) показало, что аллель D гена *ACE* чаще встречается в подгруппе пациентов с кардиоэмболическим инсультом по сравнению с пациентами с атеротромботическим инсультом (67% против 38%), разница статистически значима ($p=0,03$).

Кардиоэмболический патогенетический вариант инсульта по сравнению с ишемическим инсультом (ИИ) иной этиологии достаточно часто протекает более тяжело из-за обширного поражения ткани головного мозга вследствие наличия больших тромбоэмболов в камерах сердца. Системные эмболии у пациентов с крупными тромбами в полостях сердца объясняются тем, что происходит фрагментация биоматериала, а также наблюдается тенденция к пролонгированному тромбообразованию на шероховатой поверхности уже сформированных тромбов и поврежденном эндотелии вследствие запуска контактного механизма активации коагуляционного и агрегационного потенциала крови[48].

Ген *ACE* кодирует ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), который является важным физиологическим регулятором артериального давления и водно-солевого обмена. Наиболее известен инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм гена *ACE*, который заключается во вставке (инсерции, I) или потере (делеции, D) Alu-повтора, размером в 289 пар нуклеотидов. Делеция Alu-повтора приводит к повышению экспрессии гена *ACE* и увеличению концентрации АПФ в крови, лимфе и тканях, что является фактором, повышающим риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркта миокарда, гипертрофии левого желудочка, ишемической болезни сердца), болезни почек, атеросклероза, болезни Альцгеймера.

Известно, что у лиц, гомозиготных по аллелю D (генотип D/D), уровень АПФ повышен в 2 раза по сравнению с I/I генотипом. Суммарная активность

АПФ у носителей сочетания D/D аллелей на 30% выше, чем у лиц с вариантом I/I, что является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [48,81].

Результаты исследования данной подгруппы демонстрирует клинический пример 3. Пациент К., 54 лет.

Анамнеза: длительное время артериальная гипертензия с максимальными цифрами АД 210\100 мм рт.ст., протезирование аортального клапана, перенес

инфаркт миокарда, диагностирована пароксизмальная форма мерцательной аритмии. Наследственный анамнез: со стороны отца ОИМ, ОНМК на фоне артериальной гипертензии, мать – неотягощена. Заболел остро.

МСКТ головного мозга: в области базальных ядер слева определяются единичные очаги, с наличием перифокального отека, максимальными размерами до 0,7х0,9 см. В области базальных ядер слева выявлены кистовидно расширенные периваскулярные пространства, без перифокального глиоза, размером до 0,8х1,1 см. Дополнительных образований в области мосто-мозжечковых углов не выявлено. Область хиазмы без особенностей, гипофиз в размерах не увеличен, ткань гипофиза имеет обычный сигнал. Боковые щели мозга асимметричны,

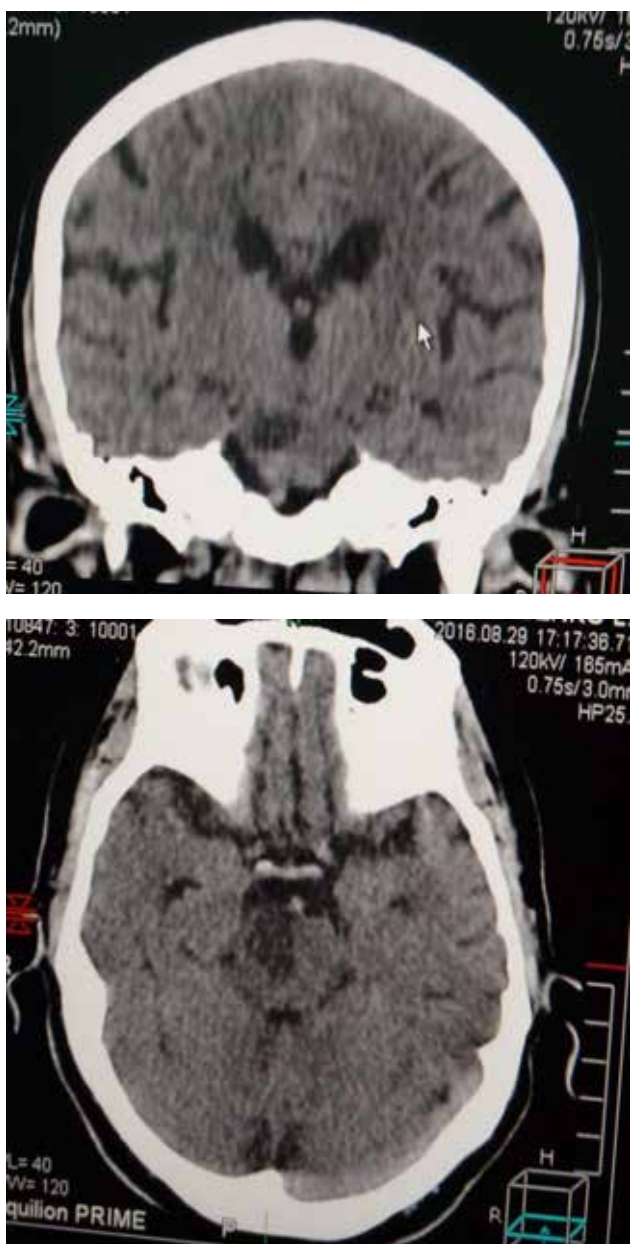


Рисунок 11. КТ головного мозга пациента К. D<S, расширены.

Заключение: КТ-картина ишемических очагов области базальных ядер слева, множественных супратенториальных очагов глиоза, умеренной внутренней гидроцефалии (рис.11).

УЗДС-БЦА: нестенотический атеросклероз БЦА. Аномалия восхождения в канале поперечных отростков позвоночника правой ПА (С4).

ЭхоКТ: Эхокардиографическое исследование протезирования аортального клапана. Общая сократимость миокарда левого желудочка не снижена. Снижение диастолической ф-ции – 1 тип. Умеренная дилатация обоих предсердий. Незначительно выраженная легочная гипертензия.

NIHSS=4 балла

Неврологический статус: В сознании, контактен, ориентирован. Речь не нарушена. Инструкции выполняет. Менингеальных знаков нет. Из общемозговой симптоматики - головная боль, головокружение. Гемипарезов не выявлено. Глазные щели симметричны, D=S. Зрачки OD = OS, фотореакция сохранена. Движения глазных яблок в полном объеме. Чувствительность на лице не изменена. Диплопию отрицает. Лицо симметричное. Нистагмозид при взгляде в стороны. Глотает, фонировать. При приеме как жидкой, так и твердой пищи не поперхивается. Глоточные рефлексы живые, симметричные. Язык девирует влево. Верхний левосторонний монопарез до 3 баллов. Мышечный тонус диффузно снижен, чуть ниже слева. Сухожильные и периостальные рефлексы, низкие S<D. Патологических стопных знаков не выявлено. Чувствительность на туловище не изменена. Координаторные пробы выполняет слева с рук с мимоподражением из-за пареза. Тазовых нарушений нет.

У пациента с цереброваскулярной болезнью на фоне прогрессирующего кризового течения артериальной гипертензии, пароксизмальной формой мерцательной аритмии проведено исследование образцов ДНК.

Результаты генотипирования: у больного был определен генотип ТТ гена *GP1BA*, и генотип DD гена *ACE*. В нашем исследовании наличие аллеля С гена *GP1BA* ассоциировалось с окклюзией БЦА и выраженным гемодинамически значимым стенозом, что у данного пациента не наблюдается. Аллель D гена *ACE*

чаще встречался в группе пациентов с кардиоэмболическим инсультом, и является предполагаемым потенциальным маркером развития КЭИ, что находит подтверждение в данном клиническом случае.

Аллель Т гена PDE4D (rs966221) присутствует в генотипе данного пациента, этот вариант согласно результатам нашего исследования, показал ассоциации с прогрессивным кризовым течением АГ (табл.18).

Таблица 18.

Результаты генотипирования

FGB	F5	F7	F12	PAI-1	GP1ba	GP3a	CYP11B2
GA	GG	GG	CT	4G5G	TT	TT	TC
ACE	MTHFR	PON1	PON2	NOS2	NOS3	LTA	
DD	CT	AG	CG	CC	GT	AG	
PDE4D-1	PDE4D-2	HIF1a-1	HIF1a-2	ALOX			
TT	CC	CC	GG	GG			

На данный момент, вопрос о роли полиморфизма I/D гена *ACE* в развитии ишемического инсульта остается спорным [144,256]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что, инсерционно-делеционный полиморфизм может выступать как маркер риска развития кардиоэмболического варианта ишемического инсульта.

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

В ряде восточноевропейских популяций не обнаружено ассоциации между полиморфизмом I/D гена *ACE* и подтипами ИИ [79,169].

В ходе исследования были идентифицированы локусы, связанные с развитием кардиоэмболического и атеротромботического подтипов ИИ, что подтверждает данные ранее проведенных исследований. А также выявлены новые

данные, свидетельствующие об актуальном продолжении поиска новых потенциальных факторов риска ИИ.

Выявленные нами полиморфные маркеры в генах *GP1BA* и *ACE* ассоциированы с особенностями клинического течения цереброваскулярного процесса (прогредиентного кризового течения) и с патогенетическими вариантами ишемического инсульта, при условии дифференцированного клинического отбора и наличия других немодифицированных факторов риска[3,3].

Глава 4

Обсуждение результатов исследования

Цереброваскулярные заболевания представляют собой одну из важнейших проблем клинической неврологии. Ишемический инсульт относится к мультифакторным заболеваниям и его развитие обусловлено взаимодействием модифицируемых факторов и наследственной предрасположенности, взаимным потенцированием множества факторов риска. На протяжении многих лет ведутся активные исследования о вкладе генетических факторов в риск развития ишемического инсульта. Генетические аспекты влияют на риск развития цереброваскулярной патологии на различных уровнях, в частности, через другие факторы риска, взаимодействуя с внешними и внутренними предикторами, либо принимая непосредственное участие в генезе инсульта.

В настоящее время, очевидно, что для понимания механизмов развития заболевания и выявления значимых закономерностей необходим комплексный анализ, учитывающий клинические особенности течения заболевания, генетические и экзогенные (средовые) факторы. В клиническую практику широко внедряются высокотехнологичные методы диагностики, также персонифицированного прогнозирования предрасположенности к инсульту, в частности, клинико-генетический анализ. Применение современных молекулярно-генетических методов дает возможность открытия новых перспектив для диагностики, лечения и прогнозирования исхода острых нарушений мозгового кровообращения, в том числе ишемического характера.

Одним из наиболее крупных европейских мета-аналитических многоцентровых исследований последних лет является Metastroke (2012 г), в котором продемонстрированы наиболее выраженные ассоциации полиморфных аллелей гена HDAC9 с развитием атеротромботического подтипа ишемического инсульта, также выявлена определенная взаимосвязь аллельных вариантов гена в

хромосоме 9p21. Проанализирован и описан ряд мало распространенных, но отчетливо повышающих риск развития атеротромботического подтипа ишемического инсульта полиморфизмов: тромбоцитарный гликопротеин GpIIb, фактор свертывания крови FXIII, метилентетрагидрофолатредуктаза *MTHFR* (C677T), отдельные мутации, вносящие изменения в гены сигнальной системы клеток с участием фосфодиэстеразы *PDE4D* и параоксаназы PON, изменения структуры гена аполипопротеина Е APOE, ответственного за утилизацию холестерина. Для носителей мутаций в генах транскрипционных факторов PITX2 и ZFNХ3 выявлен значительный риск развития кардиоэмболического инсульта. Аналогичные результаты получены в исследовании [Bevan S., Traylor M., Adib-Samii P., Malik R., Paul N.L., Jackson C., Farrall M., Rothwell P.M., Sudlow C., Dichgans M., Markus H.S., 2012]. Данные локусы имеют ассоциации с развитием фибрилляции предсердий, наличие которой является основным фактором развития кардиоэмболического инсульта.. В России при изучении [Тимофеев Д.И., Шамалов Н.А., Бондаренко Е.А., Сломинский П.А., Скворцова В.И., 2012г] славянской популяции достоверно определен повышенный риск возникновения кардиоэмболического патогенетического подтипа инсульта у носителей варианта SNP rs1842993 в структуре 7 хромосомы.

Несмотря на то, что наблюдаются значительные патогенетические отличия, при исследовании удастся выделить общие маркеры генетической предрасположенности ко всем подтипам ишемического инсульта. Исследования в Южной и Восточной Азии не отличаются большими выборками, и не учитывают подразделения на клинические подтипы инсульта. Тем не менее в популяции Китая [Wang M., Jiang X., Wu W., Zhang D, Zhang S., Xu M., Zhang C., Qu Z., Zhang B., Zheng Z., Zhang L., 2012-2013] обнаружена генетическая предрасположенность к развитию ишемического инсульта у лиц-носителей полиморфных вариантов генов системы биосинтеза лейкотриенов ALOX5AP rs4073259, эндотелиальной NO- синтазы NOS3 4b/a (уточнить), T-786C и G894T, ангиотензинпревращающего фермента ACE I/D. Для гена параоксаназы PON,

участвующего в перекисном окислении липидов, обнаружен протективный эффект мутантного аллеля в отношении развития атеросклероза сосудов и ишемического инсульта. Исследования в области генетической предрасположенности к ишемическому инсульту в славянской популяции в России немногочисленны. В том числе, изучены ассоциации полиморфизмов генов F12, параоксаназ PON1 и PON2, гена фактора, индуцируемого гипоксией HIF1a, гена Gp1ba, цитохрома P450 с риском развития ишемического инсульта. Установлено, что варианты PON1 A/-х PON2 GG значительно повышают риск возникновения ишемического инсульта [Наседкина Т.И., Шетова И.М., Заседателев А.С., Тимофеев Д.И., Шамалов Н.А., Бондаренко Е.А., Сломинский П.А., Скворцова В.И., 2012г].

Накоплено достаточно большое количество информации о факторах генетической предрасположенности к развитию различных подтипов ишемического инсульта, но в связи с многообразием и разнонаправленностью патофизиологических процессов, а также различной степенью индивидуального влияния внешних факторов, для эффективного использования этих данных в персонифицированной медицине обосновано проведение молекулярно-генетических исследований с опорой на клинические критерии.

В основе причин ишемического инсульта в независимости от механизмов развития (кардиоэмболический, атеротромботический или др.) лежит нарушение в системе регуляции гемостаза и эндотелиальная дисфункция.

Активность сосудисто-тромбоцитарного гемостаза определяется функциональным состоянием его компонентов. Стенки кровеносных сосудов способны синтезировать простагландин, антитромбин и мощные активаторы фибринолиза. Участие тромбоцитов в гемостазе основывается на их ангиотрофической и вазоспастической функциях, их способности к адгезии и агрегации, а также участию в свертывании крови.

Состояние стенок кровеносных сосудов играет важную роль в обеспечении гемостаза. Интима сосудов, эндотелий обладают высокой тромбоустойчивостью.

Проведено большое количество исследований по изучению способности эндотелия сосудов синтезировать и секретировать простациклин - ингибитор агрегации тромбоцитов, основной физиологический антикоагулянт антитромбин III; обладающий способностью фиксировать на своей поверхности с помощью специальных рецепторов гепарин и активный комплекс гепарин — антитромбин III; также способностью продуцировать и выделять в кровоток активаторы фибринолиза.

В эндотелии сосудистой стенки синтезируются факторы, участвующие в осуществлении гемостатических реакций. Три основные группы биологически активных веществ: вазодилататоры, вазоконстрикторы и другие, среди которых активаторы плазминогена, тромбомодулин, брадикинин, факторы роста и др. [Бабак О. Я., Шапошникова. Ю. Н., Немцова В. Д, Братусь В. В, Марков Х. М 2004-2005]. Вазодилататорами эндотелиального происхождения являются оксид азота, простациклин и гиперполяризующий фактор эндотелия (endothelium - derived relaxing factor - EDRF). Эти активные вещества являются потенциальными ингибиторами функции тромбоцитов и пролиферации сосудистых ГМК [Покровский В. И., Виноградов Н. А 2005]. Синтез NO происходит под влиянием фактора некроза опухоли альфа (ФНОα). NO является самым мощным из известных эндогенных вазодилататоров.

Снижение выработки NO в клетках эндотелия и их дисфункция при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, в то числе и при АГ, может являться результатом торможения NOS [Марков Х. М, 2001].

Существуют многочисленные исследования подтверждающие, что эндотелиальная дисфункция имеет важное значение в развитии тяжелых осложнений АГ.

Данные литературы свидетельствуют о сочетанном и сложном патогенезе эндотелиальной дисфункции. В ее развитии наиболее значимыми вероятно являются возраст, курение, дислипидемия, дефицит L-аргинина и NO; генетические дефекты и ишемические и перфузионные повреждения эндотелия,

воспаление, нарушение в регуляции ренин-ангиотензиновой системы, оксидативный стресс.

Клинически значимая роль дисфункции эндотелия связана с развитием и прогрессированием многих заболеваний, в частности артериальной гипертензии, хронической ишемии головного мозга, ишемического инсульта.

Ввиду многофакторности механизмов гемостаза и эндотелиальной дисфункции, участия множества рецепторов, биологических веществ и молекул необходимо исследование не отдельных полиморфных вариантов генов, а их ассоциаций для более полного и приближенного анализа возможных механизмов развития ишемического инсульта на разных уровнях регуляции.

Вышесказанное послужило основанием для выбора цели диссертационного исследования. Были определены задачи исследования, согласно которым планировалось изучение модифицированных факторов риска и вклада генов, кодирующих системы свертывания крови, регуляции артериального давления, липопротеидного обмена, гены, связанные с воспалительным ответом и эндотелиальной дисфункцией в развитии и прогнозе острой и хронической ишемии головного мозга.

Дизайн исследования включал в себя клинический раздел, в котором проводился тщательный сбор анамнеза, полный неврологический осмотр с оценкой неврологического дефицита по шкале NIHSS, определение патогенетического типа ишемического инсульта согласно критериям TOAST (атеротромботический, кардиоэмболический) и инструментально-лабораторную часть. В инструментально-лабораторной части проводилась оценка КТ головного мозга, УЗДГ брахиоцефальных артерий, исследование ДНК крови исследуемых пациентов на основе гидрогелевых биочипов.

Для генетического тестирования была использована тест-система, позволяющая определить полиморфные варианты в генах *ACE* (rs1799752), *FGB* (rs1800790), *F2* (rs1799963), *F5* (rs6025), *F7* (rs6046), *F12* (rs1801020), *GP1BA* (rs2243093), *GPIIIa* (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), *TUB* (rs4578424).

Для наработки фрагментов ДНК использовали двухэтапную мультиплексную ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе.

Дизайн исследования исключал вмешательство в лечебный процесс, побочные реакции, связанные с данным исследованием, были исключены. Всем пациентам было проведено обследование согласно приложению к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 15 ноября 2012 г. № 928н о порядке оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения.

В нашей работе было проведено детальное изучение имеющихся факторов риска развития осложнений цереброваскулярной патологии у пациентов, вошедших в исследование, сопоставление факторов риска у пациентов с ХИМ, в том числе осложнившейся развитием ИИ, а также поиск новых потенциальных факторов риска развития ишемического инсульта.

На первом этапе исследования с целью более точного разделения пациентов по клиническим группам в зависимости от степени и характера течения АГ, стадии течения ХИМ, модифицированных и немодифицированных факторов риска, сопутствующей патологии, результатам инструментальных обследований, неврологического статуса нами были разработаны клиничко-генетические карты.

Пациентам разъясняли цели и задачи исследования, затем заполняли бланки информированного согласия, оценивали критерии включения-исключения, заполняли специально разработанную клиничко-генетическую карту и исследовали неврологический статус пациента. Проводили ряд обследований пациенту, который включал инструментальные методы: компьютерная томография головного мозга, доплеровское ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий, ЭКГ, рентгенография органов грудной клетки, а также инвазивные методы забор крови для исследования образцов ДНК на наличие

полиморфных маркеров генов, биохимический и общий анализ крови. Процедура включения-исключения из исследования проводилась в соответствии с требованиями этического комитета.

Были проанализированы клинические данные двух исследуемых групп пациентов с ХИМ и пациентов с ХИМ, осложнившейся ИИ.

В группу с ХИМ вошел 81 человек. Были выделены 2 подгруппы в зависимости от показателей уровня АД: страдают гипертонической болезнью 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%); гипотония у 11 (13,6%) исследуемых, 14 пациентов (17,3%) не отмечали ранее эпизодов подъема АД.

Безусловно, цереброваскулярная болезнь представляет собой сложную мультифакторную патологию, тяжесть которой зависит от количества факторов риска и степени их индивидуального доминирования.

Наличие состояния хронического стресса и тревожности отмечаются в 43% случаев, из них 20 пациентов отмечают повышение АД в той или иной степени. Длительное курение (более 20 лет) у 9 человек (11%) пациентов.

Еще в конце 1960-начале 1970 гг. Е.В.Шмидт указывал о важности наследственной отягощенности у ближайших родственников больных инсультом. По результатам наиболее ранних научных исследований Hassan A., Marcus H.S. выявлены данные о наличии значительного риска развития инсульта при его наличии в анамнезе у ближайших родственников при сопутствующих дисметаболическом синдроме, гипергомоцистеинемии, гипертонической болезни. При сборе анамнестических данных 19 пациентов отмечают наличие отягощенного сосудистого анамнеза- наличие инсультов и инфарктов у ближайших родственников. Хроническая ишемия головного мозга 1 и 2 степени отмечена в 34 случаях и в 39 случаях соответственно.

Для оценки клинических данных пациенты с ХИМ были разделены на 2 группы: группа пациентов, страдающих АГ, и группа пациентов с гипо- и нормотонией.

При сравнении влияния факторов риска развития цереброваскулярной патологии в двух группах пациентов выявлено: состояние стресса в 1 группе отмечают 23 пациента (28%), во 2 группе- 12 (14,8%) человек; гиподинамия в 1 группе встречается в 10 (12%) случаях, во 2 группе- 2(2,5%); наличие избыточного веса отмечено у 6 пациентов(7,4%) и 4 (4,9%) пациентов соответственно.

При оценке клинических проявлений в 1 группе наличие цефалгического синдрома в 1 группе в 22% случаев (18 чел.) и в 7,4% (6 чел.) во 2 группе. Астенический синдром – в 17,3% (14чел) и 8,6% (7 чел) соответственно, состояние тревожности в 1 группе у 18 человек (22%) и 7 человек (8,6%) во 2 группе, когнитивное снижение отмечено у 15 человек (18,5%) и 6 человек (7,4%) соответственно, мнестические нарушения в 18,5% (15 чел) и 3,7% (3 чел) случаев.

Таким образом, наиболее выраженные клинические проявления отмечаются в 1 группе пациентов, в которой наблюдается прогрессивное кризовое течение артериальной гипертензии.

Полученные в исследовании данные генотипирования 81 пациента с ХИМ были обработаны с использованием иерархического кластерного анализа. В результате чего, пациенты с ХИМ образовали две подгруппы, в каждую из которых были объединены пациенты с определенными сочетаниями аллелей исследованных генов. В первую группу вошло 45 пациентов, во вторую - 36.

При детальном клиническом анализе картин пациентов двух групп с ХИМ, выделенных при обработке генетических данных, выявлено, что в обеих группах доля пациентов, страдающих артериальной гипертензией составляет 62% и 75% 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%. Можно отметить, что в группе 2 чаще регистрируются головная боль, астенические и вегетативные нарушения, но при статистической обработке данная разница не была значимой, вероятно, из-

за малой выборки. В группе 2 отмечается преобладание ХИМ 2 ст.-52,8%, тогда как в группе 1 преобладает ХИМ 1 ст.-44%. Учитывая результаты клинических наблюдений, анализа генетических данных можно сделать вывод о распределении пациентов по группам в зависимости от прогрессивности течения АГ.

Нами был проведен анализ распределения генотипов для каждого из исследуемых полиморфных участков генов в двух группах больных с ХИМ. Статистически значимых различий в частоте встречаемости генотипов генов *ACE*, *SERPINE1*, *FGB*, *F5*, *F7*, *F12*, *GP1BA*, *GPIIIa*, *MTHFR*, *CYP11B2*, *PON1*, *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 группы 1 (68% против 19%), в то время как генотип T/T чаще встречался у пациентов группы 2 (42% против 2%), различия статистически достоверны ($p=0,0001$). Так как для группы 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 T/T 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 (81 пациент). Разница статистически достоверна (ОШ=6,22; ДИ=1,86-20,79; $p=0,004$).

Таким образом, это позволяет рассматривать генотип T/T SNP83C>T гена *PDE4D* в качестве фактора риска прогрессивного течения АГ, а также хронической ишемии мозга, в целом, так как гипертоническая болезнь является одним из основных факторов риска развития ишемии мозга.

Ген *PDE4D* кодирует фосфодиэстеразу, фермент, относящийся к семейству металлофосфогидролаз. Увеличение уровня внутриклеточного цАМФ повышает электрическое сопротивление эндотелия за счет стабилизации межклеточных

контактов, в результате этого уменьшается проницаемость гематоэнцефалического барьера [138]. Белок PDE4D принимает участие в процессах воспаления при атерогенезе и может приводить к дестабилизации атеросклеротической бляшки.

Таким образом, уровень ферментативной активности PDE4D может играть важную роль в формировании риска развития сосудистых заболеваний головного мозга посредством участия белкового продукта в воспалительной реакции, формировании физиологического ответа на повреждение эндотелия сосудов, ангиогенезе [Sherine A., Leena E. 2008]. В ряде исследований [Jacob C., Lagente V. 2002, Bevan S., Marcus H.S. 2005] была установлена прямая зависимость SNP83 (rs966221) гена *PDE4D* с различными формами инсульта [100,190,184].

Результаты ранее проведенных экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что отдельные генетические особенности могут являться дополнительными факторами риска развития ишемического инсульта. Увеличение риска развития инсульта является результатом взаимодействия генотипа с внешними или динамическими факторами. По данным авторов Avolio A., Buurgu N., Somay G., Welin L., Svardsudd K. отмечено генетическое влияние на риск развития инсульта и его зависимость от возраста пациентов. Наиболее выражено в молодом возрасте, когда на первый план выступает наследственная предрасположенность, чем внешние факторы и сопутствующие заболевания, влияние которых начинает возрастать у пациентов среднего и пожилого возраста[89].

В группу с ИИ вошли 178 больных. Для определения состояния сознания и неврологической симптоматики у пациентов использовали шкалу NIHSS и характеризовалось различной степенью выраженности моторных, сенсорных и речевых нарушений.

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%, сахарный диабет 2 типа -19,2% , варикозная болезнь нижних конечностей – 17,6%, окклюзивный тромбоз подкожных и глубоких вен -8% .

Атеросклеротические изменения брахиоцефальных сосудов по результатам УЗДГ выявлялись у 143 (79,8%) пациентов, окклюзия СА - 17(9,3%), гемодинамически значимый стеноз СА (>70%)– 33 (18,5%), стеноз СА от 50 до 70% гемодинамически незначимый – 93 (52%), что соответствует данным ранее проведенных исследований Bevan S., Corbalan R., Lysis A.J., Touboul P.J. по частоте развития различной степени стенозирования БЦА.

Проведен подробный анализ неврологического статуса пациентов исследуемых групп, а также уточнен патогенетический подтип ишемического инсульта в каждом конкретном случае.

Атеротромботический подтип инсульта у пациентов с ИИ в каротидном бассейне диагностирован в 54 случаях, что составляет 31 % от общего числа исследуемых, что соответствует частоте встречаемости данного подтипа ИИ критериям TOAST [27,74].

Клиническая картина при наличии стеноза ВСА не более 70% с наличием морфологически нестабильной бляшки свидетельствует о прошедшей артерио-артериальной эмболии ветвей МА (52%). В случае гемодинамически значимого стеноза ВСА обусловлена закупоркой СМА (18,5%). В случаях окклюзивного тромбоза ВСА (9,3%) закупорки внутримозговой артерии не происходило, но клиническая картина соответствовала поражению СМА.

По ранее проведенным множественным отечественным и зарубежным исследованиям и публикациям Lysis A.J., Corbalan R., Скворцова В.И., Чазов И.Е., Гусев Е.И., известно, что артериальная гипертензия представляется одним из

основных и наиболее значимых факторов рисков развития инсульта. Это подтверждается и в нашем исследовании: артериальная гипертензия зарегистрирована у 84,9% пациентов с ИИ против 21% у больных с ХИМ ($p<0,05$). В группе с ХИМ крайне редко встречалась АГ 3 степени (4,8%), АГ 1 степени (31,7%), и преимущественно регистрировалась нормотония (63,5%). В группе больных ИИ АГ 1 степени регистрировалась только в 5,6% случаев, а АГ 3 степени - в 60,3%.

Важное значение имеет семейный анамнез для получения максимального количества информации о наследственной предрасположенности к развитию инсульта. Отягощенная наследственность регистрируется среди 47,2% больных инсультом, и 18,2% в группе ХИМ - в нашем исследовании данный фактор явился значимым в группе пациентов с ишемическим инсультом ($p<0,05$).

По данным исследований Котовой О.В., Isozumi K., Neter J.E. избыточный вес является фактором риска развития инсульта и сердечно-сосудистых заболеваний. В исследуемой группе больных ИИ повышенный ИМТ регистрировался в 2 раза чаще, чем у пациентов с хронической мозговой недостаточностью: 28,8% против 8% ($p<0,05$). Было отмечено, что большая часть пациентов в исследуемой группе с повышенным ИМТ имеют ожирение I степени, 4 пациента имеют ИМТ выше 40 [42,163,198].

Отечественные и зарубежные литературные данные [Гусев Е.И., Гендлин Б.Е., Коновалов А.Н., Folsom A.R., Adams H.P., Kapelle L.J.] свидетельствуют о том, что мерцательная аритмия является наиболее значимым фактором риска кардиоэмболического инсульта [33,1,138].

В нашей исследуемой группе постоянная форма МА регистрируется в 21,6% случаев, в группе контроля - 1%, что в данном случае является статистически значимым фактором ($p<0,05$).

По данным крупного популяционного исследования Corbalan R., Tapia J., Lloyd-Jones D., Paolucci et al., у пациентов, испытывающих психологический стресс, включая подавленность, беспокойство и нарушения сна, риск смерти от инсульта повышался на 66%, а от ишемической болезни сердца — на 59% по

сравнению с пациентами без признаков стресса. Влияние психологического стресса одинаково велико при развитии ИБС с ИИ [123,214], что нашло подтверждение в нашем исследовании.

В исследуемой группе больных ИИ состояния стресса (стресс 2-3) 98 человек(78,4%), в референтной группе- 46 человек(46,5%) ($p<0,05$).

Исследование генотипа образцов ДНК произведено у 69 пациентов с ИИ. Проведен анализ клинической картины исследуемой группы 69 пациентов с ХИМ 2 ст, осложненной инфарктом головного мозга с неуклонным прогрессивным кризовым и 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- 26 пациента (38%), кардиоэмболический инсульт- 29 (42%). Цефалгии- 32 пациента (46%), головокружение -39 пациентов (57%), нарушения сна – 22 пациента (32%), астенический синдром -51 пациент (74%), когнитивные нарушения – 21 (30%), двигательные нарушения -43 пациента (62%).

По результатам анализа отечественных и зарубежных исследований в основе патогенеза хронической ишемии головного мозга лежит нарушение эндотелиальных функций, что в будущем приводит к повреждению стенки сосуда, развитию атеросклероза и прогрессированию заболевания.

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 % ($F = 3,85, p = 0,05$, ДИ=95%), 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%, во 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% случаев, 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 группы показал, что наиболее достоверные различия по характеру развития ишемического инсульта получены в группе 1, где пациенты разбиты на подгруппы в соответствие со степенью стенозирования ВСА, критерий достоверности составил 3,85, а также данные когнитивных нарушений (по шкале MMSE) - критерий составил 2,37.

В группе 2 при сравнении подгрупп пациентов по характеру течения АГ наиболее выраженные когнитивные нарушения наблюдаются при быстром прогрессирующем течении болезни с сосудистыми кризами, резкими колебаниями артериального давления и общемозговыми симптомами [6,232].

В связи с мультифакторным характером цереброваскулярной патологии целесообразно проводить комплексный анализ генетических факторов, ассоциированных с риском развития ишемического инсульта. Нами проведен клинико-генетический анализ исследуемых групп пациентов с ХИМ и с ИИ с помощью тест-системы на основе биочипов.

Далее в каждой группе проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов генов *ACE*, *FGB*, *F2*, *F5*, *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).

При сравнении пациентов с разной степенью гемодинамического стеноза выявлено, 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). При этом, у пациентов с гемодинамически незначимым стенозом ВЦА и наличием постоянной формы фибрилляции предсердий наиболее часто наблюдался кардиоэмболический механизм развития инсульта, у пациентов с гемодинамически значимым стенозом ВЦА – атеротромботический характер.

Ген *GP1BA* кодирует гликопротеин Ib, который входит в мембранный комплекс гликопротеинов тромбоцитов GPIb-V-IX. GPIb-V-IX отвечает за адгезию тромбоцитов к поврежденным стенкам сосудов на первом этапе гемостаза, и является основным тромбоцитарным рецептором для фактора фон Виллебранда [Marcus H., Hambley H. 1998, Francis G.S. 2000]. Наличие цитозина (С) в этой позиции значительно увеличивает экспрессию комплекса GPIb/V/IX на поверхности тромбоцитов [Slowik A., Turaj W. 2004, Touboul P.J., Elbaz A. 2000].

Происходит увеличение скоростных показателей адгезии тромбоцитов к коллагену типа 1, что в дальнейшем приводит к повышению скорости агрегации тромбоцитов и значительному риску тромбообразования [DOI:

10.1038/sj.tpj.6500435]. Ранее было показано [Marcus H., Thorelli E.1998], что аллель С, а так же генотип СТ статистически значимо чаще встречались в группе с острым нарушением мозгового кровообращения в семьях больных с фибрилляцией предсердий [190 ,232].

Можно предположить, что в исследованных группах пациентов 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.

В группе больных ИИ атеротромботический инсульт наблюдался у 32 пациентов, кардиоэмболический инсульт – у 30 пациентов. 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=3,33, 95% ДИ=1,17 - 9,46, p=0,03).

Кардиоэмболический подтип ишемического инсульта по сравнению с другими подтипами (ИИ) зачастую имеет более неблагоприятный прогноз из-за обширного поражения ткани мозга вследствие значительных размеров тромбоэмболов в камерах сердца. Происхождение системных эмболий у больных с тромбами в полостях сердца объясняются частичной или полной фрагментацией биоматериала и склонностью к пролонгированному тромбообразованию на шероховатой поверхности уже сформированных тромбов и поврежденном эндотелии вследствие запуска преимущественно контактного механизма активации. Исследования молекулярно-генетических основ различных паогенетических вариантов и форм инсульта многочисленны [Kohler H.P., Grant P.J. 2000, Kostulas K., Gretasdottir S. 2007], но не могут дать однозначного ответа о механизмах их патогенеза. Ранее было выявлено, что наиболее выраженные ассоциации с риском развития острого ишемического инсульта и его подтипов – ишемического и геморрагического были показаны для генов-кандидатов *F2*, *F5*,

GP1BA, *ACE* [Lalouscher W., Endler G. 2007, Matarin M. 2009, Шадрина М.И., Сломинский П.А. 2001]. Некоторые работы не смогли выявить положительной корреляции между данными полиморфными маркерами в данных генах-кандидатах и риском развития определенного подтипа инсульта [Мустафинова О.Е., 2002, Lopez J.A., Reynolds C.C. 1992]. Вполне возможно, что это связано как с недостаточным объемом выборок, так и с отсутствием четкого определения патогенетических вариантов инсульта. Также, различные гены могут отвечать за различные патогенетические варианты инсульта [73,177,186, 192].

По данным работ Agerholm-Larsen B.(2000г), Francis G.S. (2000г), Pera J., Slowik A., Wloch D. (2004, 2006г) ген *ACE* кодирует ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), который является важным физиологическим регулятором артериального давления и водно-солевого обмена. Наиболее известен инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм гена *ACE*, который заключается во вставке (инсерции, I) или потере (делеции, D) Alu-повтора, размером в 289 пар нуклеотидов. Делеция Alu-повтора приводит к повышению экспрессии гена *ACE* и увеличению концентрации АПФ в крови, лимфе и тканях, что является фактором, повышающим риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркта миокарда, гипертрофии левого желудочка, ишемической болезни сердца), болезни почек, атеросклероза, болезни Альцгеймера [79,139,202].

Известно, что у лиц, гомозиготных по аллелю D (генотип D/D), уровень АПФ повышен в 2 раза по сравнению с I/I генотипом [Peterson D.M. 1987]. Суммарная активность АПФ у носителей сочетания D/D аллелей на 30% выше, чем у лиц с вариантом I/I [Alberts M.J. 2002], что является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [81, 222].

На данный момент, вопрос о роли полиморфизма I/D гена *ACE* в развитии ишемического инсульта остается спорным. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что, инсерционно-делеционный полиморфизм может выступать как маркер риска развития кардиоэмболического варианта ишемического инсульта.

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.

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

Таким образом, полиморфные маркеры в генах *GP1BA* и *ACE* ассоциированы с особенностями клинического течения цереброваскулярного процесса (прогредиентного кризового течения) и с патогенетическими вариантами ишемического инсульта, при наличии других немодифицированных факторов риска.

Инсульт является мультифакторным заболеванием, которая требует мультидисциплинарного подхода к ранней диагностике, своевременного назначения лечения и комплексной медицинской и социальной реабилитации. Уникальность данной работы заключается в принципиально новом подходе к проведению анализа генетических данных на основании четко выверенных клинических групп, что позволило получить достоверные данные, которые подчеркивают возможность выделения новых потенциальных факторов риска развития ишемического инсульта у пациентов с хронической цереброваскулярной недостаточностью для более эффективной персонифицированной первичной профилактики ИИ, направленной на коррекцию модифицированных факторов риска. Необходим более рациональный подход к лечению АГ у пациентов с генетической предрасположенностью, что позволит значительно снизить частоту развития ИИ у этой категории больных.

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 персонифицированной 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 персонифицированных 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 прогрессивного течения АГ, а также хронической ишемии мозга.

Список цитируемой литературы

1. Айриян Н.Ю. Анализ данных эпидемиологического мониторинга инсульта в Российской Федерации: диссертация на соискание ученой степени к.м.н. ГОУ ВПО РГМУ федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Москва, 2006.
2. Аксютин Н. В., Никулина С. Ю., Шульман В. А., Назаров Б. В., Максимов В. Н., Россовская М. Л., Козлов В. В., Поплавская Е. Е., Беспалов А. В. Взаимосвязь полиморфизма гена альфа-цепи тромбоцитарного гликопротеина 1-бета с развитием кардиоэмболического инсульта в семьях больных с фибрилляцией предсердий // Сибирское медицинское обозрение. - 2013. - № 3. – С. 21-26.
3. Анисимова А.В. Ранние стадии хронической ишемии головного мозга: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора наук. ГБОУ ВПО РГМУ им. Н.И.Пирогова, Москва, 2004.
4. Анисимова А.В., Галкин С.С., Колесникова Т.И., Гунченко А.С., Юцкова Е.В., Капельницкий П.В. Тромбоцитарный гемостаз и системная тромболитическая терапия при ишемическом инсульте // Уральский медицинский журнал. - 2016. - № 04. - С.27-34.
5. Анисимова А.В., Гендлин Г.Е., Борисов С.Н. Профилактика развития инсульта у пациентов с фибрилляцией предсердий: роль современных антикоагулянтов // Журнал неврологии и психиатрии. - 2013. - № 9. С. 59-65.
6. Анисимова А.В., Гунченко А.С., Авдоница М.А., Иконникова А.Ю., Наседкина Т.В. Изучение влияния клиничко-генетических факторов на прогрессивность течения хронической ишемии головного мозга // Уральский медицинский журнал. - 2016. - № 04. - С. 16-20.
7. Баранов В.С. Геномика на пути к предиктивной медицине // Acta naturae. - 2009. - № 3. - С. 77-88.
8. Белова Л.А. Ангиотензин II-образующие ферменты // Биохимия. - 2000. - №12. - С.1589-1599.

9. Бондаренко Е.А. Полиморфные варианты генома человека и риск развития острого инсульта: автореферат дисс. на соискание ученой степени к.б.н. Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 2011г.

10. Бутко Д.Ю. Состояние церебральной гемодинамики и статокINETических функций у больных с вертебрально-базиллярной недостаточностью // Журнал неврология и психиатрия. - 2004. - № 12. -С.38-42.

11. Быков Ю.Н. Церебральный инсульт: психосоматические и соматопсихические аспекты // Неврологический Вестник. - 2006. - № 1/2. -С. 73-78.

12. В.И. Корчагин, К.О. Миронов, О.П. Дрибноходова, М.Ю. Максимова, С.Н. Иллариошкин, М.М. Танащян, А.Е. Платонов, Г.А. Шипулин, А.А. Раскуражев, М.А. Пирадов. Роль генетических факторов в формировании индивидуальной предрасположенности к ишемическому инсульту // Анналы неврологии. -2016. - № 1. - С. 65-74.

13. Варакин Ю.Я., Никитин Ю.М., Жагалко В.К., Клейменова Н.Б. Поражение магистральных артерий головы // Журнал неврология и психиатрия. - 1994. - № 2. - С.21 - 24.

14. Верещагин И.В., Пирадов М.А, Суслина З.А. Инсульт. Принципы диагностики лечения и профилактики. - М.: Интермедиа. - 2002.

15. Верещагин Н.В., Гулевская Т.С., Миловидов Ю.К. Приоритетное направление научных исследований по проблеме ишемического нарушения мозгового кровообращения // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1990. - № 1. - С. 3-8.

16. Верещагин Н.В., Гулевская Т.С., Миловидов Ю.К. Приоритетное направление научных исследований по проблеме ишемического нарушения мозгового кровообращения // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1990. - № 1. - С. 3-8.

17. Верещагин Н.В., Пирадов М.А, Суслина З.А. Инсульт. Принципы диагностики лечения и профилактики. - М.: Интермедиа. - 2002.

18. Верещагин, Н.В. Инсульт: принципы диагностики, лечения и профилактики. - М.: Медицина. - 2002. - С.176.

19. Виленский Б. С. Современная тактика борьбы с инсультом. - СПб.: Фолиант. - 2005. - С. 17.
20. Виленский Б.С. Соматические осложнения инсульта: профилактика и лечение // Неврологический журнал. - 2003. - № 3. - С.4-10.
21. Воронина Е. Н., Филипенко М. Л., Сергеевичев Д. С., Пикалов И. В. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм // Вестник ВОГиС. - 2006. - № 3. - С. 553-564.
22. Воропаев А.А. Применение транскраниальной электростимуляции при хронической цереброваскулярной недостаточности // Журнал невропатологии и психиатрии. - 2006. - №5. - С. 31-34.
23. Гераскина Л.А. Стратификация причин кардиоэмболического инсульта. Неврологический журнал. - 2002. - №2. - С. 8-12.
24. Гомазков О.А. Пептиды в кардиологии // Биохимия. Физиология. Патология. Информация. Анализ. - М.: Материк Альфа. - 2000. - С. 143.
25. Грядунов Д.А., Зименков Д.В., Михайлович В.М., Наседкина Т.В., Дементьева Е.И., Рубина А.Ю., Паньков С.В., Барский В.Е., Заседателев А.С. Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике // Медицинский алфавит. Лаборатория. - 2009. - № 3.
26. Гусев Е.И. Проблема инсульта в России // Инсульт. Приложение к журналу неврологии и психиатрии имени С.С.Корсакова. - 2003. - № 9. - С. 3-5.
27. Гусев Е.И. Эпидемиология инсульта в России // Consilium Medicum. - 2003. - №5. - С. 5-7.
28. Гусев Е.И. Эпидемиология инсульта в России // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Инсульт: приложение к журналу. - 2003. - № 8. - С. 4-9.
29. Гусев Е.И., Бурд Г.С., Скворцова В.И. Дифференцированная терапия в остром периоде мозгового инсульта // Вестник интенсивной терапии. - 1993. - № 1. - С. 4-9.
30. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. - М.: Медицина. - 2000.

31. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Киликовский В.В., Стаховская Л.В., Айриян Н.Ю. Проблема инсульта в Российской Федерации // Качество жизни. - 2006. - №2. - С. 10–14.
32. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В., Киликовский В.В., Айриян Н.Ю. Эпидемиология инсульта в России // Consilium medicum. Спец. выпуск. - 2003. - С. 5-7.
33. Гусев Е.И., Коновалов А.Н., Скворцова В.И., Гехт А.Б. Неврология. Национальное руководство. - М.: ГЭОТАР-Медиа. - 2009. - С. 10-40.
34. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Современные представления о лечении острого церебрального инсульта // Consilium medicum. - 2000. - №2.
35. Давиденкова Е.Ф., Колесова Н.Н., Либерман И.С. Медико-генетическое консультирование в системе профилактики ишемической болезни сердца и инсультов. - Л.: Медицина. - 1979.
36. Дамулин И. В., Парфёнов В.А., Скоромец А.А., Яхно Н.Н. Нарушения кровообращения в головном и спинном мозге. Болезни нервной системы. Руководство для врачей. - М.: 2003. - С. 231-302.
37. Доршакова О.В. Патогенетическая характеристика и клинические проявления нарушений мозгового кровообращения в вертебрально-базилярном бассейне при стенозирующем поражении экстракраниальных артерий: диссертация на соискание ученой степени к.м.н. ГОУ ВПО ПГУ, Петрозаводск, 2008г.
38. Дроздецкий С.И. Кардиологические аспекты инсульта. XVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». Актуальные вопросы кардиоваскулярной фармакологии. - М.: 2010. - № 2. - С. 130—138.
39. Евтушенко С.К., Филимонов Д.А., Евтушенко И.С. Новые факторы риска развития инсульта у лиц молодого возраста // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. Спецвыпуски. - 2015. - С. 3-12.
40. Елисеева Ю.Е. Ангиотензин-превращающий фермент, его физиологическая роль // Вопросы медицинской химии. - 2001. - № 1.
41. Калашникова Л.А. под. ред. З.А.Суслиной. Очерки ангионеврологии. - М.: 2005. - С. 277–288.

42. Котова О.В. Хронические нарушения мозгового кровообращения. - С-П.: Фарматека. - 2010. № 15. С. 46-50 .
43. Кузник Б.И., Кучук В.М. Тканевые факторы свертывания крови мозговых оболочек и их роль в развитии патологических процессов // Журнал неврология и психиатрия им. С.С. Корсакова. - 1968. - № 11. - С. 5-6.
44. Левин О.С. Дисциркуляторная энцефалопатия: от патогенеза к лечению // Журнал трудный пациент. - 2010. - №4. С. 1-52.
45. Манвелов Л.С., Варакин Ю.Я., Смирнов В.Е., Горностаева Г.В. Профилактика сосудистых заболеваний головного мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1998. - № 12. - С. 44-47.
46. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование фенол-хлороформной экстракции. - М.: Мир. - 1984.
47. Машин В.В., Барашков Н.С., Пинкова Е.А., Хайруллин Р.М. Клинико-экономический анализ лечения ишемического инсульта у больных с артериальной гипертензией // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2010. - №3. - С. 652-654.
48. Мелехов А.В., Гендлин Г.Е., Алексеева Е.М., Дадашова Э.Ф., Никитин И.Г., Анисимова А.В. Частота перенесенных нарушений мозгового кровообращения у пациентов с различными формами фибрилляции предсердий // Журнал неврологии и психиатрии. - 2017. - №.2. - С. 4-14.
49. Мустафинова О.Е., Тхаркахова З.Н., Бикмеева А.М. и др. Полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента и риск мультифакториальных заболеваний // Медицинская генетика. - 2002. - №5. - С. 212-220.
50. Н. В. Пизова, М. В. Степанова. Тромбофилии, связанные с резистентностью к активированному протеину С: генетические полиморфизмы и инсульт // Неврологический журнал : научно-практический журнал. - 2012. - Том 17, N 6. - С. 4-11.
51. Ощепкова, Е.В. О Федеральной целевой программе «Профилактика и лечение артериальной гипертензии в Российской Федерации» // Кардиология. - 2002. - № 6. - С. 58-59.

52. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. - М.: Изд. РАМН. - 2000.

53. Преображенский, Д.В. Современная терапия артериальной гипертензии (анализ рекомендаций Европейского общества кардиологов) // *Consilium medicum*. - 2003. - № 11. - С. 626-636.

54. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: Медиа Сфера. - 2002. С. 166-180, 191-194.

55. Решетняк Т.М., Насонова Е.А., Алекберова З.С. и др. Антифосфолипидный синдром. 10 лет изучения в России // *Клиническая медицина*. - 1998. - №2. - С. 4-41.

56. Скворцова В.И., Лимборская С.А., Кольцова Е.А., Сломинский П.А. Полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента у больных с ишемической болезнью головного мозга // *Журнал неврология и психиатрия им С.С. Корсакова*. - 2001. - №3. - С. 21-7.

57. Скворцова В.И., Сломинский П.А., Кольцова Е.А., Тупицына Т.В., Милосердова О.В., Боцина А.Ю., Лимборская С.А. Изучение роли миссенсмутации (M235T) в гене ангиотензиногена в развитии ишемической болезни мозга // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. - 2003. - №1. - С. 52-54.

58. Скворцова В.И., Чазов И.Е., Стаховская Л.В. Вторичная профилактика инсульта. - М. - 2002. - С. 118.

59. Скворцова В.И., Евзельман М.А. Ишемический инсульт. - Орел. - 2006. - С. 404.

60. Скоромец, А. А. Методические рекомендации по организации неврологической помощи больным инсультом в Санкт-Петербурге // *Человек*. - СПб. - 2002. - С. 9-13.

61. Старчина Ю.А., Парфенов В.А., Чазова И.Е. и др. Когнитивные функции и эмоциональное состояние больных, перенесших инсульт, на фоне антигипертензивной терапии // *Журн. неврол. и психиат. им. С.С.Корсакова. Инсульт*. - 2005. - №15. - С. 39-44.

62. Страмбовская Н. Н. Частота генетического полиморфизма некоторых ростковых факторов у больных хронической ишемией мозга // Дальневосточный медицинский журнал. - 2014. - С. 49-52.

63. Строжаков Г.И., Гендлин Г.Е., Ускова О.В., Соболев К.О., Срангуль А.И., Анисимова А.В., Колесникова Т.И. Ишемический инсульт на фоне синусового ритма сердца у больных с артериальной гипертензией // Журнал неврологии и психиатрии. Спецвыпуски. - 2013. - №3. - С. 13-20.

64. Струкова С.М. Современные представления о механизмах свертывания крови // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. - 2002. - № 1.

65. Суслина З. А. Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антитромботическая терапия. М.: Мед. Книга. - 2005. - С.248 .

66. Суслина З.А., Варакин Ю.Я. Эпидемиологические аспекты изучения инсульта. Время подводить итоги // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2007. - №2. - С. 22 - 28.

67. Суслина З.А., Варакин Ю.Я., Верещагин Н.В. Сосудистые заболевания головного мозга. - М.: МЕДпресс-информ. - 2006. - С. 254.

68. Суслина З.А., Иллариошкин С.Н., Пирадов М.А. Неврология и нейронауки – прогноз развития // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. -2007. - №1. - С. 5–9.

69. Суслина З.А., Фонякин А.В., Гераскина З.А. Ишемический инсульт и сердце: от патогенеза к профилактике // Клиническая фармакология и терапия. - 2003. - №12.

70. Суслина З.А., Варакин Ю.Я., Верещагин Н.В. Сосудистые заболевания головного мозга. Эпидемиология. Основы профилактики. - М.: «МЕДпресс-информ». - 2006. - С.256.

71. Табеева Г.Р., Азимова Ю.Э. Цереброваскулярные расстройства в пожилом возрасте // Журнал Практическая Медицина. - 2010. - С. 1-56.

72. Холин А. В. Магнитно-резонансная томография при заболеваниях центральной нервной системы. - СПб.: Гиппократ. - 2000. - С. 192.

73. Шадрина М.И., Сломинский П.А., Милосердова О.В. и др. Анализ полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента у больных

ишемической болезнью сердца в московской популяции // Генетика. - 2001. - №4. - С. 540 - 544.

74. Шамалов Н.А., Кустова М.А. Криптогенный инсульт // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. Спецвыпуск № 2. – 2014. - С. 42–49.

75. Шмидт Е.В. Мозговой инсульт и нарушение коронарного кровообращения // Клиническая медицина. - 1963. - №9. - С. 18-20.

76. Шулутко Б.И. Артериальная гипертензия - СПб.: Гиппократ. - 2001. - С. 382.

77. Adams H. P., Bendixen B. H., Kappelle L. J. et al. Classification of subtype of acute stroke: Definition for use in a multicentre clinical trial, TOAST, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment // Stroke. - 1993. - № 24 (1). - P. 35–41.

78. Afshar-Kharghan V., Li CQ., Khoshnvis-Asl M., Lopez J.A. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ibalpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex // Blood. - 1999. - №1. - P. 186-191.

79. Agerholm-Larsen B., Nordestgaard B.G., Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites // Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. - 2000. - Vol. 20(2). - P. 484-492.

80. Akar N., Akar E., Yilmaz E., Deda G. Plasminogen activator inhibitor -1 4G/5G polymorphism in Turkish children with cerebral infarct and effect on factor V 1691 A mutation // J Child. Neurol. - 2001. - Vol.16. - P. 294-295.

81. Alberts M.J. Secondary prevention of stroke and the expanding role of the Neurologist // Cerebrovasc. Dis. - 2002. - Vol. 13 (suppl. 1). - P. 12-16.

82. Alison E. Baird Genetics and Genomics of Stroke. Novel Approaches // J. Am. Coll. Cardiol. - 2010. - Vol. 56 (4). - P. 245–253.

83. Anderson C. D., Nails M.A., Biffi A. et al. The effect of survival bias on case-control genetic association studies of highly lethal diseases // Circ. Cardiovasc. Genet. - 2011. - Vol. 4. - P. 188-196.

84. Andre C. CADASIL: pathogenesis, clinical and radiological findings and treatment // Arq. Neuropsiquiatr. - 2010. - Vol. 68 (2). - P. 287–299.

85. Angleton P., Chandler W.L., Schmer G. Diurnal Variation of Tissue-Type Plasminogen Activator and Its Rapid Inhibitor (PAI-1) // Circulation. - 1989. - № 1. - P. 101-6.

86. Apolipoprotein C3 Polymorphisms, Cognitive Function and Diabetes in Caribbean Origin Hispanics / Caren E. Smith [et al.] // PloS ONE. — 2009. — Vol. 4 (5). — P. e5465. — Published on-line. — May 8. — 2009. — doi : 10.1371/journal.pone.0005465PMCID.

87. Ariyaratnam R., Casas J.P., Whittaker J. et al. Genetics of ischemic stroke among persons of non-European descent: a meta-analysis of eight genes involving approximately 32,500 individuals // PLoS Med. - 2007. - Vol. 4(4). - P. 728-736.

88. Arkel Y.S. Ischemic stroke in young patient with protein C deficiency and protrombin gene mutation G 20210 A // Blood Coagul. Fibrinolysis. - 1998. - V. 9, № 8. - P. 757-760.

89. Asplund K. European White Book on Stroke, 1998. Atrial Fibrillation Investigators: Risk factors for stroke and efficacy of antitrombotic therapy in atrial fibrillation. Analysis of pooled data from five randomized controlled trials // Arch. Inter. Med. - 1994. - Vol. 154. - P. 1449-1457.

90. Avolio A. Aortic dimensions in Oriental and Occidental populations with different prevalence of hypertension text// Hypertension. - 1994. - Vol. 12. - P. 78.

91. Baker R.I., Eikelboom J., Lofthouse E., et al. Platelet glycoprotein Ibalpha Kozak polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke // Blood. - 2001. - №98. - P. 36–40.

92. Ballabio E., Bersano A., Bresolin N., Candelise L. Monogenic vessel diseases related to ischemic stroke: a clinical approach // J. Cereb. Blood Flow Metab. - 2007. - Vol. 27 (10). - P. 1649–1662.

93. Barclay L. Lowering Blood Pressure Immediately After Stroke May Be Harmful // Neurology. - 2003. - №61. - P. 1030-1031, 1047-1051.

94. Barley J., Blackwood A., Miller M. et al. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism, blood pressure and the renin-angiotensin system in Caucasian and Afro-Caribbean peoples // J Hum. Hypertens. - 1996. - Vol. 10(1). - P. 31-35.

95. Bentley P., Peck G., Smeeth L., Whittaker J., Sharma P. Causal relationship of susceptibility genes to ischemic stroke: comparison to ischemic heart disease and biochemical determinants // PLoS One. - 2010. - №5. - P. 9-136.
96. Berger K., Stogbauer F., Stoll M. et al. The glu298asp polymorphism in the nitric oxide synthase 3 gene is associated with the risk of ischemic stroke in two large independent case-control studies // Hum. Genet. - 2007. - Vol. 121(2). - P. 169-178.
97. Bersano A., Ballabio E., Bresolin N. et al. Genetic polymorphisms for the study of multifactorial stroke // Hum. Mutat. - 2008. - Vol. 29(6). - P. 776-795.
98. Bertina R.M., Koeleman B.P.C., Koster T. et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C // Nature. - 1994. - P. 64-67.
99. Bevan S., Markus H. The genetics of stroke // ACNR. - 2004. - Vol. 4(4). - P. 9-11.
100. Bevan S., Porteous L., Sitzer M., Markus H.S. Phosphodiesterase 4D gene, ischemic stroke, and asymptomatic carotid atherosclerosis // Stroke. - 2005. - P. 949-953.
101. Bevan S., Traylor M., Adib-Samii P. et al. Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genome-wide associations // Stroke. - 2012. - Vol. 43 (12). - P. 3161–3167.
102. Boncoraglio G.B., Bodini A., Brambilla C. et al. An effect of the PAI-1 4G/5G polymorphism on cholesterol levels may explain conflicting associations with myocardial infarction and stroke // Cerebrovasc. Dis. - 2006. - Vol. 22(2-3). - P. 191-195.
103. Boysen G., Nyboe J., Appleyard M. et al. Stroke incidence and risk factors for stroke in Copenhagen, Denmark // Stroke. - 1988. - Vol. 19(11). - P. 1345-1353.
104. Brass L.M., Isaacs J.L., Merikangas A.R. A study of twins and stroke // Stroke. - 1992. - Vol. 23 (2). - P. 221–223.
105. Brenner D., Labreuche J., Poirier O. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system in brain infarction and vascular death // Ann. Neurol. - 2005. - Vol. 58(1). - P. 131-138.

106. Brophy V.H., Ro S.K., Rhee B.K. et al. Association of phosphodiesterase 4D polymorphisms with ischemic stroke in a US population stratified by hypertension status // *Stroke*. - 2006. - Vol. 37(6). - P. 1385-1390.
107. Brott T.G., Adams H.P., dingler C.P. et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale // *Stroke*. - 1989. - Vol.20(7). - P. 864 - 870.
108. Brown R.D., Whisnant J.P., Sicks J.D. et al. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989 // *Stroke*. - 1996. - Vol. 27(3). - P. 373-380.
109. Burn J., Dennis M., Bamford J. et al. Long-term risk of recurrent stroke after a first-ever stroke. The Oxfordshire community stroke project // *Stroke*. - 1994. - Vol. 25. - P. 333-337.
110. Burzotta F., Di Castelnuovo A., Amore C. et al. 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatc PAI-1 activity in Italians: a model of geneenvironment interaction // *Thromb. Haemost.* - 1998. - Vol. 79(2). - P. 354-358.
111. Buyru N., Altinisik J., Somay G., Ulutin T. Factor V Leiden mutation in cerebrovascular disease // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* - 2005. - Vol. 11(3). - P. 339-342.
112. Cambien F., Poirier O., Lecerf L. et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction // *Nature*. - 1992. - Vol. 359(6396). - P. 641-644.
113. Cambien F., Poirier O., Lecerf L., Evans A., Cambou J.P., Arveiler D., Luc G., Bard J.M., Bara L., Ricard S., Tiret L., Amouyel P., Alhenc-Gelas F., Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction // *Nature*. - 1992. - P.641–644.
114. Camire R.M., Pollak E.S., Kaushansky K., Tracy P.B. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool // *Blood*. - 1998. - Vol. 92(9). - P. 3035-3041.
115. Carhuapoma J.R. Cerebral venous thrombosis and anticardiolipin antibodies // *Stroke*. - 1997. - № 12. - P. 2363-2369.
116. Carmeliet P., Stassen J.M., Schoonjans L. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis // *J Clin. Invest.* - 1993. - Vol. 92(6). - P. 2756-2760.

117. Carter A.M., Catto A.J., Bamford J.M., Grant P.J. Platelet GPIIIa and GPIb variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke // *Arterioscl. Thromb. Vase. Biol.* - 1998. - Vol. 18(7). - P. 1124-1131.
118. Casas J.P., Hingorami A.D., Bautista L.E., Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls // *Arch. Neurol.* - 2004. - Vol. 61(11). - P. 1652-1661.
119. Catto A.J., Carter A.M., Stickland M. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease // *Thromb. Haemost.* - 1997. - Vol. 77(4). - P. 730-734.
120. Chalmers J., MacMahon S., Anderson C. et al. // *Clinician's manual on blood pressure and stroke prevention* // Second ed. London. - 2000. - P. 129.
121. Chung C.M., Wang R.Y., Chen J.W., et al.. A genomewide association study identifies new loci for ACE activity: potential implications for response to ACE inhibitor // *Pharmacogenomics J.* - 2010. - №10. - P. 537–544.
122. Comijs H.C. et al. The course of cognitive decline in older patients // *Dement Geriatr Cogn Dis.* - 2004. - №17. - P. 136-142.
123. Corbalan R., Tapia J., Braun S. et al. Multidisciplinary study of cerebrovascular disorders. Cardiovascular profile of occlusive vascular disorders // *RevMed. Chil.* - 1994. - P.1021-1030.
124. Dahabreh I.J., Kitsios G.D., Kent D.M., Trikalinos T.A. Paraoxonase 1 polymorphisms and ischemic stroke risk: A systematic review and meta-analysis // *Genet. Med.* - 2010. - Vol. 12 (10). - P. 606–615.
125. Dahlback B., Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1994. - Vol. 91(4). - P. 1396-1400.
126. Dawson S., Hamsten A., Wiman B. et al. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasminogen activator inhibitor-1 activity // *Arterioscler. Thromb.* - 1991. - Vol. 11(1). - P. 183-190.
127. Diaz J.F., Hachinski V.C., Pederson L.L., Donald A. Aggregation of multiple riskfactors for stroke in siblings of patients with brain infarction and transient ischemic attacks // *Stroke.* - 1986. - Vol. 17(6). - P. 1239-1242.

128. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke // *Lancet. Neurol.* - 2007. - Vol. 6 (2). – P. 149–161.
129. Dichgans M., Ludwig H., Muller-Hocker J. et al. Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains // *Eur. J Hum. Genetics.* - 2000. - Vol. 8(4). - P. 280-285.
130. Dichgans M., Mayer M., Uttner I. et al. The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases // *Ann. Neurol.* - 1998. - Vol. 44 (5). - P. 731–739.
131. Dikmen M., Giines H.V., Degirmenci I. Are the angiotensin-converting enzyme gene and activity risk factors for stroke? // *Arq. Neuropsiquiatr.* - 2006. - Vol. 64(2A). - P. 211-216.
132. Domingues-Montanari S., Mendioroz M., del Rio-Espinola A. et al. Genetics of stroke: a review of recent advances // *Expert Rev. Mol. Diagn.* - 2008. - Vol. 8(4). - P. 495-513.
133. Dziannot-Pabijan D. Plasmin-a2-Antiplasmin Complexes in Acute Ischemic Stroke // *Adv Clin Exp Med.* - 2006. - №15. - P. 797-801.
134. Esen F.I., Hancer V.S., Kucukkaya R.D., Yesilot N., Coban O., Bahar S., Tuncay R. Glycoprotein Ib-alpha Kozak polymorphism in ischemic stroke // *Neurol Res.* - 2012. - № 34. - P. 68-71.
135. Fidani L., Clarimon J., Goulas A. et al. Association of phosphodiesterase 4D gene GO haplotype and ischaemic stroke in a Greek population // *Eur. J. Neurol.* - 2007. - Vol. 14(7). - P. 745-749.
136. Fitzgerald L.A., Philips D.R. Platelet membrane glycoproteins // *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* - 1987. - P. 572-593.
137. Flossmann E., Schulz U.G., Rothwell P.M. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke // *Stroke.* - 2004. - Vol. 35 (1). - P. 212–227.
138. Folcik VA, Smith T, O'Bryant S, Kawczak JA, Zhu, B, Sakurai H, Kajiwarra A, Staddon JM, Glabinski, A, Chernosky AL, Tani M, Johnson JM, Tuohy VK, Folsom A.R., Prineas R.J., Kaye S.A., Munger R.G. Incidence of hypertension and

stroke in relation to body fat distribution and other risk factors in older women // *Stroke*. - 1990. - Vol. 21(5). - P. 701-706.

139. Francis G.S. ACE inhibition in cardiovascular disease // *N. Engl. J. Med.* - 2000. - Vol. 342(3). - P. 201-202.

140. Fuster V., Badimon L., Badimon J.J., Chesebro J.H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes // *N. Engl. J. Med.* - 1992. - Vol. 326(4). - P. 242-250.

141. Galinsky D., Tysoe C., Brayne C.E. et al. Analysis of the apo E/apo C-I, angiotensin converting enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase genes as candidates affecting human longevity // *Atherosclerosis*. - 1997. - Vol. 129(2). - P. 177-183.

142. Gillum R.F., Gorelick P.B., Cooper E.S. (eds.) *Stroke in Blacks*. -1999.- P. 230.

143. Giovannoni M.P., Cesari N., Graziano A. et al. Synthesis of pyrrolo2,3-d.pyridazinones as potent, subtype selective PDE4 inhibitors // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* - 2007. - Vol. 22(3). - P. 309-318.

144. Gormley K., Bevan S., Markus HS. Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin system and cerebral small vessel disease // *Cerebrovasc. Dis.* - 2007. - Vol. 23(2-3). - P. 148-155.

145. Graeber M., Muller U. Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders // *J. Neurol. Sei.* - 1998. - Vol. 153(2). - P. 251-263.

146. Gretarsdottir S., Thorleifsson G., Manolescu A. et al. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke // *Ann. Neurol.* - 2008. - Vol. 64(4). - P. 402- 409.

147. Grossmann R., Geisen U., Merati G. et al. Genetic risk factors in young adults with, 'cryptogenic' ischemic cerebrovascular disease // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. - 2002. - Vol. 13(7). - P. 583-590.

148. Hachinski VC. The clinical problem of brain and heart.// *Stroke*. - 1993. - №24. - P. 1-2.

149. Hakonarson H. Role of FLAP and PDE4D in myocardial infarction and stroke: target discovery and future treatment options // *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* - 2006. - Vol. 8(3). - P. 183-192.

150. Hamsten A., de Faire U., Walldius G. et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: Risk factor for recurrent myocardial infarction // *Lancet*. - 1987. - Vol. 2(8549). - P. 3-9.
151. Hankey G.J. Long-term outcome after ischaemic stroke/transient ischaemic attack // *Cerebrovasc. Dis.* - 2003. - Vol. 16(suppl. 1). - P. 14-19.
152. Harker L.A. Therapeutic inhibition of platelet function in stroke // *Cerebrovasc. Dis.* - 1998. - Vol. 8(suppl. 5). - P. 8-18.
153. Heagerty A.M. Angiotensin II: vasoconstrictor or growth factor? // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 1991. - Vol. 18(2). - P. 14-19.
154. Helgadottir A., Manolescu A., Thorleifsson G. et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke // *Natl. Genet.* - 2004. - Vol. 36(3). - P. 233-239.
155. Helgadottir A., Thorleifsson G., Manolescu A. et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction // *Science*. - 2007. - Vol. 316(5830). - P. 1491-1493.
156. Hindorff L.A., Schwartz S.M., Siscovick D.S. et al. The association of PAI-1 promoter 4G/5G insertion/ deletion polymorphism with myocardial infarction and stroke in young women // *J. Cardiovasc. Risk*. - 2002. - Vol. 9(2). - P. 131-137.
157. Hou L., Osei-Hyiaman D., Yu H., et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in eNOS gene with ischemic stroke in Chinese patients // *Neurology*. - 2001. - №4. - P. 490-6.
158. Houslay M.D., Adams D.R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signaling cross-talk, desensitization and compartmentalization // *Biochem. J.* - 2003. - Vol. 370(Pt 1). - P. 1-18.
159. Howard G., Wagenknecht L.E., Cai J. et al. Cigarette smoking and other risk factors for silent cerebral infarction in the general population // *Stroke*. - 1998. - Vol. 29(5). - P. 913-917.
160. Hsieh K., Funk M., Schillinger M., et al. Vienna Stroke Registry, impact of the platelet glycoprotein Ib alpha Kozak polymorphism on the risk of ischemic cerebrovascular events: a case-control study // *Blood Coagul Fibrinolysis*. - 2004. - №15. - P. 469-73.

161. Hsieh M.S., Yu S.C., Chung W.T. et al. Phosphodiesterase 4D (PDE4D) gene variants and risk of ischemic stroke in the Taiwanese population // *Lab. Medicine*. - 2009. - Vol. 40(2). - P. 87-90.
162. Ikram M.A., Seshadri S., Bis J.C. et al. Genomewide association studies of stroke // *N. Engl. J. Med.* - 2009. - Vol. 360(17). - P. 1718-1728.
163. Isozumi K. Obesity as a risk factor for cerebrovascular disease // *Keio J. Med.* - 2004. - Vol. 53(1). - P. 7-11.
164. Jacob C., Martin-Chouly C., Lagente V. Type 4 phosphodiesterasedependent pathways: Role in inflammatory processes // *Therapie*. - 2002. - Vol. 57(2). - P. 163-168.
165. Jerrard-Dunne P., Cloud G., Hassan A., Markus H.S. Evaluating the genetic component of ischemic stroke subtypes: a family history study // *Stroke*. - 2003. - Vol. 34 (6). - P. 1364–1369.
166. Joutel A., Chabriat H., Vahedi K. et al. Splice site mutation causing a seven amino acid Notch3 in-frame deletion in CADASIL // *Neurology*. - 2000. Vol. 54(9). - P. 1874-1875.
167. Joutel A., Corpechot C., Ducros A. et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia // *Nature*. - 1996. - Vol. 383 (6602). - P. 707–710.
168. Joutel A., Ducros A., Alamowitch S. A human homolog of bacterial acetolactate synthase genes maps within the CADASIL critical region // *Genomics*. - 1996. - Vol. 38(2). - P. 192-198.
169. Kamberi B1, Kamberi F2, Spiroski M3. Vascular Genetic Variants and Ischemic Stroke Susceptibility in Albanians from the Republic of Macedonia // *Open Access Maced J Med Sci*. - 2016. - №4. - P. 556-564.
170. Kanaji T., Okamura T., Osaki K. et al. A common genetic polymorphism : 46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level // *Blood*. - 1998. - №6. - P. 2010—2014.
171. Kane W.H., Davie E.W. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders // *Blood*. - 1988. - Vol. 71(3). - P. 539-555.

172. Kannel W.B., D'Agostino R.B., Belanger A.J. Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: insights from the Framingham Study // *Am. Heart. J.* - 1987. - Vol. 113(4). - P. 1006-1010.
173. Karagiannis A., Balaska K., Tziomalos K. et al. Lack of an association between angiotensin converting enzyme gene polymorphism and peripheral arterial occlusive disease // *Vase. Med.* - 2004. - Vol. 9(3). - P. 189-192.
174. Kaushal R., Pal P., Alwell K. et al. Association of ALOX5AP with ischemic stroke: a population-based case-control study // *Hum. Genet.* - 2007. - Vol. 121(5). - P. 601-607.
175. Kohler H.P., Grant P.J. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease // *N. Engl. J. Med.* - 2000. - Vol. 342(24). - P. 1792-1801.
176. Kooperberg C., Bis J.C., Marciante K.D., Heckbert S.R., Lumley T., Psaty B.M. Logic regression for analysis of the association between genetic variation in the reninangiotensin system and myocardial infarction or stroke // *Am. J. Epidemiol.* - 2007. - №165. - P. 334-343.
177. Kostulas K., Gretarsdottir S., Kostulas V. et al. PDE4D and ALOX5AP genetic variants and risk for Ischemic Cerebrovascular Disease in Sweden // *J. Neurol. Sci.* - 2007. - Vol. 263(1-2). - P. 113-117.
178. Kunicki T. J., Orzechowski R., Annis D. et al. Variability of integrin alpha 2 beta 1 activity on human platelets // *Blood.* - 1993. - Vol. 82. - P. 2693 - 2703.
179. Kunicki T. J., Williams S. A., Salomon D. R., Harrison P., Crisler P., Nakagawa P., Mondala T. S., Head S. R., Nugent D. J. Genetics of platelet reactivity in normal, healthy individuals // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* - 2009. - №7. - P. 2116-2122.
180. Lalouschek W., Endler G., Schillinger M. et al. Candidate genetic risk factors of stroke: results of a multilocus genotyping assay // *Clin. Chem.* - 2007. - Vol. 53(4). - P. 600-605.
181. Lane D.A., Grant P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease // *Blood.* - 2000. - Vol. 95(5). - P. 1517-1532.
182. Libby P. Inflammation in atherosclerosis // *Nature.* - 2002. - Vol. 420(6917). - P. 868-874.

183. Liu H., Xia P., Liu M. et al. PON gene polymorphisms and ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis // *Int. J. Stroke.* - 2013. - Vol. 8 (2). - P. 111–123.
184. Liu X, Zhu R, Li L, Deng S, Li Q, He Z. Genetic polymorphism in PDE4D gene and risk of ischemic stroke in Chinese population: a meta-analysis // *PLoS One.* - 2013. - №8(6).
185. Lloyd-Jones, D. Heart Disease and Stroke Statistics: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee // *Circulation.* - 2009. - № 119. - P. 21-181.
186. Lopez J.A., Leung B., Reynolds C.C. et al. Efficient plasma membrane expression of a functional platelet glycoprotein Ib-IX complex requires the presence of its three subunits // *J. Biol. Chem.* - 1992. - Vol. 267(18). - P. 12851-12859.
187. Lusis A. J. Genetic factors in cardiovascular disease. 10 questions // *Trends Cardiovasc. Med.* - 2003. - N 8. - P. 309-316.
188. Lusis A.J. Atherosclerosis // *J Nature.* - 2000. - №68. - P. 233–241.
189. Marciante K.D., Bis J.C., Rieder M.J., Reiner A.P., Lumley T., Monks S.A., Kooperberg C., Carlson C., Heckbert S.R., Psaty B.M. Renin_angiotensin system haplotypes and the risk of myocardial infarction and stroke in pharmacologically treated hypertensive patients // *Am. J. Epidemiol.* - 2007. - №166. - P. 19–27.
190. Marcus H., Hambley H. Neurology and blood: haematological abnormalities in ischemic stroke // *J. neurol. Neurosurg. Psychiatry.* - 1998. - Vol. 64. - P. 150-159.
191. Matarin M., Brown W.M., Dena H., et al. Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke // *Stroke.* - 2009. - №40. - P. 3436–3442.
192. Mendall M.A. et al Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease // *Heart.* - 1997. - Vol. 78. - P.273-277.
193. Meschia J.F., Brott T.G., Brown R.D. Jr. Genetics of cerebrovascular disorders // *Mayo Clin. Proc.* - 2005. - Vol. 80 (1). - P. 122–32.
194. Meschia JF, Brott TG, Brown RD Jr, Crook R, Worrall BB, Kissela B, Brown WM, Rich SS, Case LD, Evans EW, Hague S, Singleton A, Hardy J; SWISS Study Group; ISGS Study Group; MSGD Study Group. Phosphodiesterase 4D and 5-

lipoxxygenase activating protein in ischemic stroke. // *Ann Neurol.* - 2005. - Vol. 58(3). - P. 351-61.

195. Miyahara K., Kawamoto T., Sase K., et al. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene // *Eur J Biochem.* - 1994. - №3. - P. 719-26.

196. Moroi M., Jung S.M., Yoshida N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib // *Blood.* - 1984. - Vol. 64(3). - P. 622-629.

197. Munshi A., Kaul S. Stroke genetics focus on PDE4D gene // *Int. J. Stroke.* - 2008. - Vol. 3(3). - P. 188-192.

198. Neter J.E., Stam B.E., Kok F.J. et al. Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials // *Hypertension.* - 2003. - Vol. 42(5). - P. 878-884.

199. Nicolaes G.A., Dahlback B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein // *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* - 2002. - Vol. 22(4). - P. 530-538.

200. Nilsson-Ardnor S., Wiklund P.G., Lindgren P. et al. Linkage of ischemic stroke to the PDE4D region on 5q in a Swedish population // *Stroke.* - 2005. - Vol. 36(8). - P. 1666-1671.

201. Owen C.A. Jr., Bowie E.J. Generation of coagulation factors V, XI, and XII by the isolated rat liver // *Haemostasis.* - 1977. - Vol. 6(4). - P. 205-212.

202. Pera J., Slowik A., Dziedzic T. ACE I/D polymorphism in different etiologies of ischemic stroke // *Acta Neurol. Scand.* - 2006. - Vol. 114(5). - P. 320-322.

203. Peterson D.M., Stathopoulos N.A., Giorgio T.D. et al. Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet glycoproteins Ib and IIb-IIIa // *Blood.* - 1987. - Vol. 69(2). - P. 625- 628.

204. Petrovic D., Milanez T., Kobal J. et al. Prothrombotic gene polymorphisms and atherothrombotic cerebral infarction // *Acta. Neurol. Scand.* - 2003. - Vol. 108(2). - P. 109-113.

205. Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT, Poirier O, Cambien F, Benetos A. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension // *Am J Hypertens.* - 1998. - Vol. 11(7). - P. 856-60.

206. Prisco D., Chiarantini E., Boddi M. et al. Predictive value for thrombotic disease of plasminogen activator inhibitor-1 plasma levels // *Int. J. Clin. Lab. Res.* - 1993. - Vol. 23(2). - P. 78-82.
207. Psaty B.M., Smith N.L., Siscovick D.S. et al. Health outcomes associated with antihypertensive therapies used as first-line agents. A systematic review and metaanalysis // *JAMA.* - 1997. - Vol. 277(9). - P. 739 -745.
208. Reiner A.P., Siscovick D.S., Rosendaal F.R. Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis: facts and fancies // *Rev. Clin. Exp. Hematol.* - 2001. - Vol. 5(3). - P. 262-287.
209. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels // *J. Clin. Invest.* - 1990. - Vol. 86(4). - P. 1343-1346.
210. Roest M., van der Schouw Y.T., Banga J.D. et al. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women // *Circulation.* - 2000. - Vol. 101(1). - P. 67-70.
211. Rosand J., Bayley N., Rost N., de Bakker P.I. Many hypotheses but no replication for the association between PDE4D and stroke // *Nat. Genet.* - 2006. - Vol. 38(10). - P. 1091-1092.
212. Rubattu S., Di Angelantonio E., Nitsch D. et al. Polymorphisms in prothrombotic genes and their impact on ischemic stroke in a Sardinian population // *Thromb"Haemost.* - 2005. - Vol. 93(6). - P. 1095-1100.
213. Rubin LL, Ransohoff RM. Treatment with BBB022A or rolipram stabilizes the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis: an additional mechanism for the therapeutic effect of type IV phosphodiesterase inhibitors // *J Neuroimmunol.* - 1999. - Vol. 97(1-2). - P. 119-28.
214. Paolucci S. et al. Post-stroke depression, antidepressant treatment and rehabilitation results. A case-control study // *Cerebrovasc Dis.* - 2001. - Vol. 12. - P. 264-371.
215. Saleheen D., Bukhari S., Haider S.R. et al. Association of phosphodiesterase 4D gene with ischemic stroke in a Pakistani population // *Stroke.* - 2005. - Vol. 36(10). - P. 2275-2277.

216. Samani N.J., Erdmann J., Hall A.S. et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease // *N. Engl. J. Med.* - 2007. - Vol. 357(5). - P. 443-453.
217. Schelling P., Fischer H., Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? // *J. Hypertens.* - 1991. - Vol. 9(1). - P. 3-15.
218. Schneiderman J., Sawdey M.S., Keeton M.R. et al. Increased type I plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1992. - Vol. 89(15). - P. 6998-7002.
219. Schulz U.G., Flossmann E., Rothwell P.M. Heritability of ischemic stroke in relation to age, vascular risk factors, and subtypes of incident stroke in population-based studies // *Stroke.* - 2004. - Vol.35 (4). - P. 819-824.
220. Sirgo G., Perez-Vela J.L., Morales P. et al. Association between 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 gene with stroke or encephalopathy after cardiac surgery // *Intensive Care Med.* - 2006. - Vol. 32(5). - P. 668-675.
221. Slioter A.J., Rosendaal F.R., Tanis B.C. et al. Prothrombotic conditions, oral contraceptives, and the risk of ischemic stroke // *J. Thromb. Haemost.* - 2005. - Vol. 3(6). - P. 1213-1217.
222. Slowik A., Turaj W., Dziedzic T. DD genotype of ACE gene is a risk factor for intracerebral hemorrhage // *Neurology.* - 2004. - Vol. 63(2). - P. 359-361.
223. Song Q., Cole J.W., O'Connell J.R. et al. Phosphodiesterase 4D polymorphisms and the risk of cerebral infarction in a biracial population: the Stroke Prevention in Young Women Study // *Hum. Mol. Genet.* - 2006. - Vol. 15(16). - P. 2468-2478.
224. Sonoda A., Murata M., Ikeda Y. et al. Stroke and platelet glycoprotein Iba polymorphisms // *Thromb. Haemost.* - 2001. - Vol. 85(3). - P. 573-574.
225. Sonoda A., Murata M., Ito D. et al. Association between platelet glycoprotein Iba genotype and ischemic cerebrovascular disease // *Stroke.* - 2000. - Vol. 31(2). - P. 493-497.
226. Spanbroek R., Grabner R., Lotzer K. et al. Expanding expression of the 5lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2003. - Vol. 100(3). - P. 1238-1243.

227. Staton J.M., Sayer M.S., Hankey G.J. et al. Association between phosphodiesterase 4D gene and ischaemic stroke // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. - 2006. - Vol. 77(9). - P. 1067-1069.
228. Szolnoki Z., Havasi V., Bene J. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene interactions and the risk of ischaemic stroke // Acta Neurol. Scand. - 2005. - Vol. 111(1). - P. 29-33.
229. Szolnoki Z., Somogyvari F., Kondacs A. et al. Evaluation of the modifying effects of unfavourable genotypes on classical clinical risk factors for ischaemic stroke // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. - 2003. - Vol. 74(12). - P. 1615-1620.
230. Szolnoki Z., Somogyvari F., Kondacs A. et al. Evaluation of the roles of the Leiden V mutation and ACE I/D polymorphism in subtypes of ischaemic stroke // J. Neurol. - 2001. - Vol. 248(9). - P. 756-761.
231. Szpirer C., Szpirer J., Riviere M. et al. Chromosomal localization of the human and rat genes (PDE4D and PDE4B) encoding the cAMP specific phosphodiesterases 3 and 4 // Cytogenet. Cell Genet. - 1995. - Vol. 69(1-2). - P. 11-14.
232. Tham W. et al. Progression of cognitive impairment after stroke : one year results from a longitudinal study of Singaporean stroke patients. J. Neurol. Sci. - 2002. - Vol. 203/204. - P. 49-52.
233. Thorelli E., Kaufman R.J., Dahlback B. The C-terminal region of the factor V B-domain is crucial for the anticoagulant activity of factor V // J. Biol. Chem. - 1998. - Vol. 273(26). - P.16140-16145.
234. Thun M.J., Apicella L.F., Henley S.J. Smoking vs other risk factors as the cause of smoking-attributable deaths: confounding in the courtroom // JAMA. - 2000. - Vol. 284(6). - P. 706 -712.
235. Tiret L., Rigat B., Visvikis S. et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels // Am. J. Hum. Genet. - 1992.- Vol. 51(1). - P. 197-205.
236. Touboul P.J, Elbaz A., Koller C., et al. Common carotid artery intima-media thickness and ischemic stroke subtypes: the GENIC casecontrol study. The GENIC Investigators. Circulation. - 2000. - Vol.102(3). - P.313–8.
237. Touzé E., Rothwell P.M. Sex differences in heritability of ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis // Stroke. - 2008. - Vol.39 (1). - P. 16–23.

238. Tracy P.B., Eide L.L., Bowie E.J. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets // *Blood*. - 1982. - Vol. 60(1). - P. 59-63.
239. Tsantes A.E., Nikolopoulos G.K., Bagos P.G., Bonovas S., Kopterides P., Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk // *Thromb*. - 2008. - P. 736–742.
240. Varadi K., Rosing J., Tans G. et al. Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor V R506Q mutation // *Thromb. Haemost.* - 1996. - Vol. 76(2). - P. 208-214.
241. Voetsch B, Benke KS, Panhuysen CI, Damasceno BP, Loscalzo J. The combined effect of paraoxonase promoter and coding region polymorphisms on the risk of arterial ischemic stroke among young adults // *Arch Neurol*. - 2004. - Vol. 61(3). - P. 351-356.
242. Walker S.P., Rimm E.B., Ascherio A. Body size and fat distribution as predictors of stroke among US men // *Am. J. Epidemiol.* - 1996. - Vol. 144(12). - P. 1143-1150.
243. Whisnant J.P. Modeling of risk factors for ischemic stroke. The Willis Lecture // *Stroke*. - 1997. - Vol. 28 (9). - P. 1840–1844.
244. Wiklund P.G., Nilsson L., Ardnor S.N. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke: replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts // *Stroke*. - 2005. - Vol. 36(8). - P. 1661-1665.
245. Wolf P. A., D'Agostino R.B., Belanger A. J., Kannel W.B. Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study // *Stroke*. - 1991. - Vol. 22(3). - P. 312-318.
246. Wolfe C.D.A., Rudd A.G., Howard R. et al. The incidence and case fatality of stroke subtypes in a multi ethnic population. The South London Stroke Register // *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. - 2002. - Vol. 72(2). - P. 211-216.
247. Woo D., Kaushal R., Kissela B. et al. Association of Phosphodiesterase 4D with ischemic stroke: a population-based case-control study // *Stroke*. - 2006. - Vol. 37(2). - P. 371-376.

248. Wu A.H., Tsongalis G.J. Correlation of polymorphism to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases // *Am. J. Cardiol.* - 2001.- Vol. 87(12). - P. 1361-1366.
249. Yamada Y., Fuku N., Tanaka M. et al. Identification of CELSR1 as a susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals by a genome-wide association study // *Atherosclerosis.* - 2009. - Vol. 207(1). - P. 144-149.
250. Yamamoto H. Mechanism of second and further strokes/ H. Yamamoto, J. Bogousslavsky// *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* - 1998. - №64. - P. 771-776.
251. Yan Yan, Xiuping Luo, Jinlu Zhang, Li Su, Wenjie Liang, Guifeng Huang, Guangliang Wu, Guihua Huang, Lian Gu. Association between phosphodiesterase 4D polymorphism SNP83 and ischemic stroke // *J Neurol Science.* - 2014. - Issues 1-2. - P. 3–11.
252. Zee R.Y., Brophy V.H., Cheng S. et al. Polymorphisms of the phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (PDE4D) gene and risk of ischemic stroke: a prospective, nested case-control evaluation // *Stroke.* - 2006. - Vol. 37(8). - P. 2012-2017.
253. Zee R.Y., Cheng S., Hegener H.H. et al. Genetic variants of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein, and risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke: a nested case-control approach // *Stroke.* - 2006. - Vol. 37(8). - P. 2007-2011.
254. Zhang J.H., Kohara K., Yamamoto Y. Genetic predisposition to neurological symptoms in lacunar infarction // *Cerebrovasc. Dis.* -2004. - Vol. 17(4). - P. 273-279.
255. Zhang Y., Wang Y., Cui C. et al. Platelet glycoprotein polymorphisms: risk, in vivo expression and severity of atherothrombotic stroke in Chinese // *Clin. Chim. Acta.* - 2007. - Vol. 378(1-2). - P. 99-104.
256. Zhang Z, Xu G, Liu D, Fan X, Zhu W, Liu X. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies // *PLoS One.* - 2012. -Vol. 7(10). - P. 46-49.
257. Zhao L., Funk C.D. Lipoxygenase pathways in atherogenesis // *Trends Cardiovasc. Med.* - 2004. - Vol. 14(5). - P. 191-195.