

С.А. Чугунова, М.А. Судомоина, Т.Я. Николаева, М.Г. Парфенов,
О.Ю. Макарычева, А.Б. Гехт, О.О. Фаворова

ПОЛИМОРФИЗМ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И ГЕМОРАГИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ У ЯКУТОВ

УДК 575,162

Впервые для якутской популяции проведен анализ вклада аллелей генов системы гемостаза, кодирующих альфа-фибриноген (*FGA*), бета-фибриноген (*FGB*) и тканевой активатор плазминогена (*TPA*), в генетическую предрасположенность к геморрагическому инсульту (ГИ) и в особенности его клинического течения. У больных ГИ по сравнению с контрольной группой выявлено значимое повышение частоты носительства генотипа *FGA4266 A/A*: 26,9% против 16,1% ($p=0,04$, ОШ=1,9, ДИ 1,0 - 3,8) и, соответственно, понижение частоты носительства аллеля *FGA4266 G* 73,1% против 83,9% ($p=0,04$, ОШ=0,5, ДИ 0,3 - 1,0). Выявлено триаллельное сочетание *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C*, частота носительства которого значимо различается у больных ГИ с разным типом гематомы.

Ключевые слова: геморрагический инсульт, генетическая предрасположенность, альфа-фибриноген, бета-фибриноген, тканевой активатор плазминогена

For the first time an analysis of contribution of alleles of haemostasis genes, encoding fibrinogen alpha (*FGA*), fibrinogen beta (*FGB*) and tissue plasminogen activator (*TPA*), in genetic susceptibility to and clinical aspects of hemorrhagic stroke (HS) was performed in ethnic Yakuts. HS patients compared to controls demonstrated significant increase of frequency of *FGA4266A/A* genotype carriage: 26,9% vs 16,1% ($p=0,04$, OR=1,9, CI 1,0 - 3,8) and corresponding decrease of *FGA4266G* allele carriage: 73,1% vs 83,9% ($p=0,04$, OR =0,5, CI 0,3 - 1,0). We identified tri-allelic combination: *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C*, which carriage is significantly differed in HS patients with different types of haemorrhage.

Keywords: hemorrhagic stroke, genetic susceptibility, fibrinogen alpha, fibrinogen beta, tissue plasminogen activator.

Введение

Геморрагический инсульт (ГИ) является широко распространенным полигенным заболеванием большой социальной значимости. Изучение генетической предрасположенности к нему осложняется как многочисленностью генов, вносящих вклад в развитие ГИ, так и наличием этиопатогенетической гетерогенности [10]. Генетические исследования предрасположенности к ГИ в основном направлены на анализ роли генов-кандидатов, выбранных на основе их функциональной связи с патофизиологией ГИ. Как правило, в качестве генов-кандидатов для ГИ рассматривают гены, кодирующие компоненты систем гемостаза, липидного и гомоцистеинового метаболизма, продукции оксида азота (II) и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Кроме того, в качестве кандидатов на ассоциацию с предрасположенностью к ГИ рассматривают ряд генов, не входящих в эти системы, например, гены, продукты которых участвуют в развитии воспаления.

Настоящее ретроспективное исследование посвящено изучению у этнических якутов методом «случай-контроль» возможных ассоциаций аллельных вариантов генов, кодирующих компоненты системы гемостаза, а именно, генов альфа-фибриногена (*FGA*), бета-фибриногена (*FGB*) и тканевого активатора плазминогена (*TPA*), с риском ГИ, а также с некоторыми особенностями его клинического течения.

Материалы и методы исследования

В исследование включено 148 неродственных якутских больных с ГИ, проходивших лечение в нейрососудистом отделении Центра экстренной медицинской помощи г. Якутска, со средним возрастом ($\pm$ ст. откл.) $57,0 \pm 10,5$ лет (из них 88 мужчин, средний возраст - $55,7 \pm 9,3$ года, и 60 женщин, средний возраст - $59,2 \pm 11,8$ лет). Диагноз был поставлен на основании анамнестических сведений, результатов клинического осмотра и данных дополнительных методов исследования (компьютерная томография головного мозга, люмбальная пункция). У всех пациентов инсульт был зарегистрирован впервые. Все больные были охарактеризованы по типу гематомы (медиаальный, латеральный, лобарный и смешанный типы), протромбиновому индексу (ПТИ) при дебюте заболевания и исходу заболевания (летальный и нелетальный) по данным наблюдения в течение года. Все индивиды (или их родственники) давали информированное согласие на проведение генетических исследований. Контрольную группу составили 88 здоровых по медицинским показаниям индивидов

якутской этнической принадлежности, средний возраст $\pm$ ст. откл. $59,1 \pm 14,9$ лет. Из них 46 мужчин (средний возраст $58,9 \pm 15,6$ лет) и 42 женщины (средний возраст - $59,2 \pm 14,3$ лет).

ДНК выделяли стандартным методом с применением экстракции смесью фенол/хлороформ. Геномное типирование проводили описанными в литературе методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР (метод ПЦР-ПДРФ) применяли для анализа однонуклеотидной замены A4266G в 5-м экзоне гена *FGA*, приводящей к замене Thr на Ala в положении 312 аминокислотной цепи [2] и для анализа однонуклеотидной замены в C-249T в гене *FGB* [13]. Метод ПЦР с использованием аллельспецифических праймеров (метод ПЦР-SSP) применяли для анализа однонуклеотидной замены C-7351T гена *TPA* [8]. Для выявления аллелей и аллельных сочетаний, носительство которых достоверно связано с ГИ или его клиническими характеристиками, применяли оригинальное программное обеспечение «APSampler», использующее метод Монте-Карло Марковскими цепями и Байесовскую непараметрическую статистику и позволяющее верифицировать значимость выявленных ассоциаций ГИ с носительством отдельных «паттернов» (аллелей и сочетаний аллелей) с помощью точного критерия Фишера [6]. Значимым считали различие сравниваемых частот при значении $p \leq 0,05$. Силу ассоциаций выражали в значениях отношения шансов (ОШ), принимая значение доверительного интервала (ДИ) равным 95%.

ЧУГУНОВА Саргылана Афанасьевна – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, врач-невролог РБН №2 ЦЭМП высшей квалиф. категории, e-mail: sargys@mail.ru; сотрудники ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет» Росздрава, г. Москва: **СУДОМОИНА Марина Анатольевна** – к.б.н., с.н.с., доцент, **ПАРФЕНОВ Михаил Григорьевич** – к.б.н., м.н.с., **ГЕХТ Алла Борисовна** – д.м.н., проф., **ФАВОРОВА Ольга Олеговна** – д.б.н., проф., зав. кафедрой; **НИКОЛАЕВА Татьяна Яковлевна** – д.м.н., зав. кафедрой МИ ЯГУ; **МАКАРЫЧЕВА Ольга Юрьевна** – аспирант ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Росмедтехнологий, Москва.

Таблица 1

Частота носительства аллелей и генотипов полиморфного участка A4266G (Thr312Ala) гена альфа-фибриногена у больных ГИ и группы контроля якутской этнической группы

Аллели и генотипы	Больные ГИ, 145 чел.	Здоровые, 87 чел.	Значение p при сравнении частот, ОШ, 95%ДИ
Аллели, число (%) носителей			
G	106 (73,1%)	73 (83,9%)	$p=0,04$, ОШ=0,5, ДИ 0,3 - 1,0
A	110 (75,9%)	58 (66,7%)	н.з.
Генотипы, число (%) носителей			
G/G	35 (24,1%)	29 (33,3%)	н.з.
A/G	71 (49,0%)	44 (50,6%)	н.з.
A/A	39 (26,9%)	14 (16,1%)	$p=0,04$, ОШ=1,9, ДИ 1,0 - 3,8

Примечание. н.з.- не обнаружено значимых различий.

Результаты и обсуждение

Частоты носительства аллелей и генотипов исследуемых полиморфных участков приведены в табл.1-3. Для частот всех генотипов в группе больных ГИ и в контрольной группе соблюдалось равновесие Харди-Вайнберга.

В случае однонуклеотидной замены A4266G (Thr312Ala) в гене *FGA* у больных ГИ по сравнению с контрольной группой выявлено значимое повышение частоты носительства генотипа A/A: 26,9% против 16,1% ($p=0,04$, ОШ=1,9, ДИ 1,0 - 3,8) и, соответственно, понижение частоты носительства аллеля G: 73,1% против 83,9% ($p=0,04$, ОШ=0,5, ДИ 0,3 - 1,0). Значимых отличий в распределении аллелей и генотипов *FGB* и *TPA* в сравниваемых группах не обнаружено.

Выявлено триаллельное сочетание *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C*, частота носительства которого отличается у больных ГИ с разным типом гематомы (табл.4). Статистически значимое повышение частоты носительства этого сочетания наблюдается у больных ГИ как с лобарной гематомой ($p=0,02$, ОШ=4,5, ДИ 1,2 - 16,4), так и с латеральной гематомой ($p=0,02$, ОШ=4,2, ДИ 1,2 - 14,6) по сравнению с больными с медиальной гематомой. Соответственно, у больных ГИ с медиальной гематомой выявлено понижение частоты носительства этого сочетания по сравнению как со всеми остальными больными ($p=0,01$, ОШ=0,2, ДИ 0,08 - 0,8), так и с больными с лобарной гематомой ($p=0,02$, ОШ=0,2, ДИ 0,06 - 0,8), и с больными с латеральной гематомой ($p=0,02$, ОШ=0,2, ДИ 0,07 - 0,8).

В исследуемой выборке больных не выявлено ассоциаций аллелей рассматриваемых генов ни с исходом заболевания, ни с ПТИ.

Некоторые авторы считают ГИ наиболее удобной моделью для генетических исследований среди всех инсультов. ГИ характеризуется точностью фенотипических проявлений и в некоторых случаях - убедительными доказательствами генетической этиологии [11]. Согласно сложившимся в результате многочисленных исследований представлениям, развитие ГИ, как и многих других сердечно-сосудистых заболеваний, обусловлено совместным вкладом многих полиморфных генов. Для выявления этих генов проводили как исследование генетической предрасположенности к ГИ для отдельных этнических групп [например, 1, 4, 5, 7, 9, 14-16], так и обобщение полученных данных с помощью мета-анализа [10]. Что касается генов системы гемостаза, в этой работе обнаружили ассоциации с ГИ аллелей генов ингибитора активатора плазминогена I *SERPINE1* и фактора свертывания крови V. При проведении мета-анализа пришли к выводу о возможных различиях генетической предрасположенности к различным типам ГИ, подтверждающая тем самым этиопатогенетическую гетерогенность этого заболевания.

Известно, что частой причиной лобарных гематом является церебральная амилоидная ангиопатия. В отличие от медиально расположенных они имеют склонность к рецидивированию. В свою очередь, медиальные гематомы отличаются более тяжелым течением с нарушениями сознания и склонностью к прорыву крови в желудочки мозга. Наблюдаемое нами у больных ГИ с медиальной гематомой понижение частоты носительства триаллельного сочетания *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C* может свидетельствовать о различии генетических факторов, предрасполагающих к гематомам различного типа. С этим выводом согласуются данные нескольких исследований о достоверной ассоциации аллеля $\epsilon 2$ гена *APOE* с развитием

Таблица 2

Частота носительства аллелей и генотипов полиморфного участка C-249T гена бета-фибриногена у больных ГИ и группы контроля якутской этнической группы

Аллели и генотипы	Больные ГИ, 128 чел.	Здоровые, 82 чел.
Аллели, число (%) носителей		
C	65 (50,8%)	43 (52,4%)
T	113 (88,3%)	77 (93,9%)
Генотипы, число (%) носителей		
C/C	15 (11,7%)	5 (6,1%)
C/T	50 (39,1%)	38 (46,3%)
T/T	63 (49,2%)	39 (47,6%)

Примечание. В табл.2-3 значимых различий между больными ГИ и здоровыми не обнаружено.

Таблица 3

Частота носительства аллелей и генотипов полиморфного участка C-7351T гена тканевого активатора плазминогена у больных ГИ и группы контроля якутской этнической группы

Аллели и генотипы	Больные ГИ, 127 чел.	Здоровые, 73 чел.
Аллели, число (%) носителей		
C	123 (96,9%)	66 (90,4%)
T	60 (47,2%)	36 (49,3%)
Генотипы, число (%) носителей		
C/C	67 (52,8%)	37 (50,7%)
C/T	56 (44,1%)	29 (39,7%)
T/T	4 (3,1%)	7 (9,6%)

лобарных гематом, но не медиально расположенных [10, 11]. В этих исследованиях, однако, не получили данных об ассоциации аллелей генов, кодирующих компоненты системы гемостаза, с каким-либо типом ГИ (рассматривали гены факторов свертывания крови V и XIII, ген ингибитора активатора плазминогена I *SERPINE1*). Существование генетических предпосылок для различной локализации гематом при ГИ обсуждается также в обзоре [11].

Необходимость анализа совместного вклада независимо действующих и/или взаимодействующих аллелей и генотипов нескольких генов в генетическую предрасположенность к ГИ также давно признается исследователями, и его проводят для различных популяций. Такое исследование проводили,

Таблица 4

Частота носительства триаллельного сочетания *FGB-249C*; *FGA4266G*; *TPA-7351C* у больных ГИ с различным типом гематом (всего 106 чел.)

	Тип гематомы			
	лобарная	латеральная	медиальная	смешанная
Всего больных с данным типом гематомы	27(100%)	38(100%)	30(100%)	11(100%)
Среди них число (%) носителей сочетания	11(40,7%)*	15(39,5%)*	4(13,3%)*	3(27,3%)

* Группы, для которых попарно выявлены значимые различия.

в частности, в Голландии для генов гамма-фибриногена (*FGG*) и *FGA*, где получили ассоциацию ГИ с определенным гаплотипом аллелей этих двух генов, но не с их отдельными аллелями [3]. Эти результаты в принципе соответствуют нашим данным об ассоциации сочетания *FGB*-249C; *FGA*4266G; *TPA*-7351C, несущего аллели генов *FGB* и *FGA*, с разным типом гематомы. При исследовании в Турции показали ассоциацию ГИ с носительством сочетания аллелей двух полиморфных участков в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), но не с отдельными аллелями этих участков [12]. Однако в этих исследованиях в основном рассматривают сочетания аллелей и генотипов не более двух генов, возможно, из-за недостаточной распространенности доступных способов статистического анализа. Насколько нам известно, в России подобных исследований не проводили.

Наше исследование проведено для якутов, проживающих в Республике Саха (Якутия). Якуты представляют собой генетически изолированную популяцию, которая отвечает многим требованиям, предъявляемым при проведении молекулярно-генетических исследований, что обеспечивает адекватные условия для выявления генетической предрасположенности к заболеваниям. Кроме того, использование программного обеспечения «APSampler» для анализа ассоциации с заболеванием как отдельных аллелей, так и сочетаний аллелей и генотипов нескольких генов, значительно повышает эффективность проводимого

анализа. Комплексный анализ позволил выявить на сравнительно небольшой выборке индивидов ассоциацию ГИ с носительством аллелей и генотипов гена *FGA*, а также связь сочетания аллелей генов *FGA*, *FGB* и *TPA* с типом гематомы у больных ГИ. Тем не менее относительно невысокая статистическая значимость полученных результатов говорит о желательности валидации полученных результатов для расширенной группы больных и контрольной группы.

Заключение

Впервые для якутской популяции проведен анализ вклада аллелей генов, кодирующих компоненты системы гемостаза - *FGA*, *FGB* и *TPA*, в генетическую предрасположенность к ГИ и в особенности его клинического течения. Выявлена ассоциация ГИ с носительством аллелей и генотипов гена *FGA*, а также связь сочетания трех аллелей генов *FGA*, *FGB* и *TPA* с типом гематомы у больных ГИ.

Литература

1. Banerjee I., Gupta V., Ahmed T. et al. Inflammatory system gene polymorphism and the risk of stroke: a case-control study in an Indian population // *Brain Res Bull.* - 2008. - Vol. 75. - P. 158-165.
2. Carter A.M., Catto A.J., Grant P.J.: Association of the alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism with poststroke mortality in subjects with atrial fibrillation // *Circulation.* - 1999. - Vol. 99. - P. 2423-2426.
3. Cheung E.Y., Bos M.J., Leebeek F.W. et al. Variation in fibrinogen *FGG* and *FGA* genes and risk of stroke: the Rotterdam Study // *Thromb Haemost.* 2008. - Vol. 100. - P. 308-313.
4. Cho K.H., Kim B.C., Kim M.K. et al. No association of factor XIII Val34Leu polymorphism with primary intracerebral hemorrhage and healthy controls in Korean population // *J Korean Med Sci.* 2002. - Vol. 17. - P. 249-53.
5. Corral J., Iniesta J.A., González-Conejero R. et al. Factor XIII Val34Leu polymorphism in primary intracerebral haemorrhage // *Hematol J.* 2000. - Vol. 1. - P. 269-273.
6. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // *Genetics.* 2005. - Vol. 171. - P. 2113-2121.
7. Greisenegger S., Weber M., Funk M. et al. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and risk of primary intracerebral hemorrhage // *Eur J Neurol.* 2007. - Vol. 14. - P. 1098-1101.
8. Jannes J., Hamilton-Bruce M.A., Pilotto L. et al. Tissue plasminogen activator -7351C/T enhancer polymorphism is a risk factor for lacunar stroke // *Stroke.* 2004. - Vol. 35. - P. 1090-1094.
9. Liu X.N., Song L., Wang D.W. et al. Correlation of thrombospondin-1 G1678A polymorphism to stroke: a study in Chinese population // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2004. - Vol. 84. - P. 1959-1962.
10. Peck G., Smeeth L., Whittaker J. et al. The genetics of primary haemorrhagic stroke, subarachnoid haemorrhage and ruptured intracranial aneurysms in adults // *PLoS ONE.* 2008. - Vol. 3. - P. e3691.
11. Rost N.S., Greenberg S.M., Rosand J. et al. The Genetic Architecture of Intracerebral Hemorrhage // *Stroke.* - 2008. - Vol. 39. - P. 2166-2173.
12. Szazi A., Ergul E., Tuncer N. et al. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of *MTHFR* polymorphisms C677T and A1298C // *Brain Res Bull.* 2006. - Vol. 71. - P. 45-50.
13. van 't Hooft F.M., von Bahr S.J., Silveira A. et al. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999. - Vol. 19. - P. 3063-3070.
14. Wang Q., Ding H., Tang J.R. et al. C-reactive protein polymorphisms and genetic susceptibility to ischemic stroke and hemorrhagic stroke in the Chinese Han population // *Acta Pharmacol Sin.* 2009. - Vol. 30. - P. 291-298.
15. Xue H., Wang H., Song X. et al. Phosphodiesterase 4D gene polymorphism is associated with ischaemic and haemorrhagic stroke // *Clin Sci (Lond).* 2009. - Vol. 116. - P. 335-340.
16. Yamada Y., Metoki N., Yoshida H. et al. Genetic factors for ischemic and hemorrhagic stroke in Japanese individuals // *Stroke.* 2008. - Vol. 39. - P.

А.В. Казанцева, Г.Г. Фасхутдинова, С.С. Куличкин, Э.К. Хуснутдинова РОЛЬ ПОЛИМОРФНОГО VNTR ЛОКУСА В ГЕНЕ *DRD4* В РАЗВИТИИ АЛКОГОЛЬНОЙ И НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ И ФОРМИРОВАНИИ ЛИЧНОСТНЫХ ЧЕРТ У ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДОВ

УДК 575.162, 575.167, 57.026,
57.024, 57.022

Известно, что черты личности, характеризующие социабельность, являются промежуточными фенотипами при развитии аддиктивных расстройств. С целью выявления маркеров риска развития алкоголизма и опийной наркомании у татар, русских, башкир, якутов, эвенков по этнической принадлежности был проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного VNTR локуса в промоторном регионе гена *DRD4* между пациентами и здоровыми донорами. Выявлено, что маркером повышенного риска развития опийной наркомании у татар является аллель *DRD4**S, а алкоголизма у татар и русских - генотип *DRD4**S/*S и аллель *DRD4**S. Однофакторный дисперсионный анализ, проведенный с учетом половой и этнической принадлежности у здоровых индивидов, прошедших психологическое тестирование, показал ассоциацию аллеля *DRD4**S с повышенной «экстраверсией» у мужчин татар и с «настойчивостью» у русских мужчин. Полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи пониженной дофаминергической активности с риском развития аддиктивных расстройств, повышенной «экстраверсией» и пониженной «настойчивостью».

Ключевые слова: дофаминергическая система, алкоголизм, наркомания, черты личности, полиморфный локус, анализ ассоциаций.

Sociability-related personality traits are assumed to be intermediate phenotypes predisposing to addiction. In order to reveal alcoholism and opiate addiction risk markers we conducted comparative analysis of allele and genotype distribution of VNTR loci in promoter region of *DRD4* gene between patients of Tatar, Russian, Bashkir, Yakut, Evenk ethnicity and matched controls. *DRD4* S-allele was revealed to be the risk marker for opiate addiction in Tatar male, while both *DRD4* S/S-genotype and *DRD4* S-allele were demonstrated to be the risk markers for alcoholism

КАЗАНЦЕВА Анастасия Валерьевна – м.н.с. Института биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: kazantsa@mail.ru; **ФАСХУТДИНОВА Гульназ Габдулахатовна** – аспирант Института биохимии и генетики УНЦ РАН, faskhutdinova@gmail.com; ekkh@anrb.ru; **КУЛИЧКИН Степан Степанович** – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, e-mail: kulichkin_stepan@mail.ru; **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., зав. отделом Института биохимии и генетики УНЦ РАН.