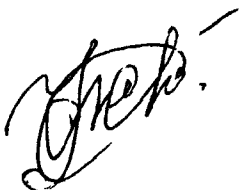


На правах рукописи



**ФРОЛОВА
СВЕТЛАНА ЮРЬЕВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ КОМПОНЕНТЫ
ПОДВЕРЖЕННОСТИ К ИНСУЛЬТУ У НАСЕЛЕНИЯ г.ТОМСКА**

**03.00.15 – генетика
14.00.13 – нервные болезни**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

ТОМСК – 2005

Работа выполнена в ГУ НИИ медицинской генетики Томского научного центра Сибирского отделения РАН, г. Томск и ГОУ ВПО «Сибирский Государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные руководители:

академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Пузырёв Валерий Павлович

доктор медицинских наук, профессор
Алифирова Валентина Михайловна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
Мирютова Наталья Фёдоровна

кандидат биологических наук
Одинокова Ольга Николаевна

Ведущая организация:

Институт цитологии и генетики
СО РАН, Новосибирск

Защита состоится «7» июня 2005 года в 10 час00 мин. на заседании диссертационного совета К 001.045.01 при ГУ НИИ медицинской генетики Томского научного центра СО РАН по адресу: 634050 г. Томск, Набережная р. Ушайки, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАН, г. Томск.

Автореферат разослан «13» «апрель» 2005 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Кучер А.Н.

2006-4
5636

2141753

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

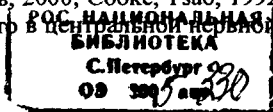
Цереброваскулярная патология занимает второе место среди главных причин смертности и является ведущей причиной инвалидизации населения в экономически развитых странах, что определяет её как одну из важнейших медицинских и социальных проблем [Беленков и др., 2003; Гусев и др., 2004; Скворцова и др., 2003]. Обсуждается более 100 гуморальных факторов патологических процессов, наследственно-конституциональных аномалий, относимых к факторам риска (ФР).

Исследования отечественных и зарубежных учёных позволили сделать вывод о том, что семейная предрасположенность является самостоятельным фактором риска развития инсульта [Давиденкова и др., 1979; Скворцова и др., 2003]. Известно, что отягощённость одновременно по отцовской и материнской линиям намного больше увеличивает риск развития инсульта, чем наследование по одной из них. Наследование по материнской линии является «независимым» фактором риска развития инсульта [Булеца, 1990; Welin et al., 1987; Killy et al., 1993; Jousilahti et al., 1997]. В близнецовых исследованиях показано, что конкордантность по риску развития ишемического инсульта у монозиготных близнецов составила 17,7%, у дизиготных – 3,6% [Bras et al., 1992].

Одним из подходов в изучении генетической предрасположенности к возникновению инсульта является использование полиморфных маркёров различных генов для анализа сцепления и/или ассоциаций с болезнями или их клиническими проявлениями. Гены, потенциально «задействованные» в развитии ишемического инсульта, относятся к разным генетическим системам: гены ренин-ангиотензиновой системы (РАС), системы гемостаза, гены синтеза окиси азота (NOS-гены), гены кодирующие метаболизм гомоцистеина и липидов, гены апоптоза и другие [Скворцова и др., 2003].

Выбор генов-кандидатов проводился на основании анализа метаболических нарушений, характерных для данной патологии. По данным литературы известно, что мутация Лейдена (G1691A) ассоциирована с ишемическим инсультом [Margaglione et al., 1999; Casas et al., 2004], венозными тромбозами [Kosch, 2002], инфарктом миокарда [Middendorf et al., 2004]. Установлено, что мутация гена протромбина *FII* (G20210) часто встречается вместе с лейденской мутацией, повышая риск развития тромбозов и инфарктов [Doggen et al., 1998]. Показано, что PLA2 полиморфизм гена *GPIIa* является фактором риска поражения крупных сосудов при инсульте у мужчин [Slowik et al., 2004], может вносить вклад в развитие инфаркта миокарда и коронарного атеросклероза и ассоциирован с развитием инсульта у молодых женщин европеоидной расы.

В последнее время большое число публикаций посвящено изучению функциональной роли молекулы оксида азота (NO) в организме человека [Снайдер, 1992; Башкатова и др., 1998; Зенков, 2000; Cooke, Tsao, 1992; Dimple, 1992; Gelis, Billiar, 1998]. Установлено, что в центральной нервной систе-



ме (ЦНС) гиперпродукция NO играет роль в развитии эпилепсий и инсультов. NO, вырабатывается эндотелиальной синтазой оксида азота – eNOS, кодируемой геном *NOS3*, является самым мощным из известных эндогенных вазодилататоров [Ванин, 1998; Гомазков, 2000; Wilcox et al., 1997] и его связь с сердечно-сосудистой патологией, не вызывает сомнений [Степанов и др., 1998; Чистяков и др., 2000; Пузырёв, 1999; Ковалев, 2001; Косянкова, 2002; Макеева, 2004; Sessa, 1994; Warpeha et al., 1999; Hingorani et al., 1999; Guzik et al., 2001; Colombo et al., 2003; Casas et al., 2004]. Однако, анализ литературы показывает множество пробелов в наших современных знаниях по исследованию роли гена *NOS3* в патогенезе инсульта.

Для эффективного определения характера генетических изменений, лежащих в основе инсульта, и для дальнейшего развития представлений о механизмах его развития целесообразно проведение популяционно-генетического исследования. Такой подход может служить основой в оценке общей подверженности популяции к развитию цереброваскулярной патологии. Таким образом, анализ генетической компоненты в этиологии и патогенезе развития инсульта представляется весьма актуальным.

Цель исследования: Установить факторы риска инсультов и значимость аллельных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* в развитии острых нарушений мозгового кровообращения у русских жителей города Томска.

Задачи исследования:

1. Изучить основные факторы риска развития инсульта у жителей г. Томска.
2. Оценить частоты аллелей и генотипов по полиморфным вариантам генов-кандидатов подверженности к инсульту: гена эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*), гена пятого фактора свертываемости крови (*FV*), гена протромбина (*FII*) и гена рецептора интегринов (*GPIIIa*) в Томской популяции.
3. Изучить ассоциации полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* с факторами риска развития инсульта и его клиническими проявлениями.
4. Определить связь генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* с количественными, патогенетически значимыми для инсульта признаками.

Научная новизна: Впервые проведено исследование генетической изменчивости полиморфных вариантов VNTR, C774T, G894T, C-691T гена эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*); G1691A, A4070G гена пятого фактора свертываемости крови (*FV*), полиморфизма G20210A гена протромбина (*FII*) и варианта T196C гена рецепторов интегринов (*GPIIIa*) у жителей г. Томска, перенесших мозговой инсульт. Получены новые сведения о вкладе полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* в предрасположенность к инсульту. Показано, что полиморфизмы VNTR и C774T гена *NOS3* могут быть факторами риска развития инсульта и служить генетическими маркерами при тестировании данной патологии.

Впервые оценена роль генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* в изменчивости комплекса количественных патогенетически значимых признаков при инсульте. Показано, что полиморфные варианты гена *NOS3* ассоциированы с показате-

лями уровня липидов и свёртывающей системы крови (VNTR полиморфизм гена *NOS3* с показателями уровня триглицеридов; полиморфизм G894T с уровнем общего фибриногена; аллельные варианты полиморфизма C-691T с показателями холестерина в составе липопротеидов высокой плотности и индексом атерогенности). Полиморфизм T196C гена *GP1IIa* связан показателями свёртывающей системы крови (уровнем общего фибриногена, активированным тромбопластиновым временем).

Практическая значимость: Сведения о значимости артериальной гипертонии как фактора риска инсульта у лиц сотягощённым семейным анамнезом позволяют обратить внимание на более активную профилактику инсульта не только на популяционном, но и на индивидуальном уровне, направленном на максимально раннее выявление лиц с заболеваниями и патологическими процессами, повышающими риск развития острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК). Полученные данные о вкладе молекулярно-генетических маркёров в формирование клинического полиморфизма инсульта могут быть учтены при формировании групп риска и организации профилактических мероприятий, стать основой для осуществления молекулярно-генетического тестирования подверженности к данной патологии в семьях, служить ориентиром в выборе лекарственной терапии (генотип-специфическая терапия). Полученная информация о распространении частот аллелей и генотипов полиморфизма генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GP1IIa* может быть использована в области генетической эпидемиологии, в популяционной и эволюционной генетике для углублённого описания генофондов народонаселения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ведущий фактор риска развития инсульта – артериальная гипертония - ассоциирован с полиморфизмами (VNTR, C774T, G894T, C-691T) гена эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*)
2. Аллельные варианты гена *NOS3* связаны с показателями уровня липидов и свёртывающей системы крови (VNTR полиморфизм с показателями уровня триглицеридов; полиморфизм G894T с уровнем общего фибриногена; C-691T с показателями холестерина в составе липопротеидов высокой плотности и индексом атерогенности).
3. Наличие мутации Лейдена *FV*(G1691A) является фактором риска более тяжёлого течения инсульта.
4. Полиморфизм T196C гена *GP1IIa* ассоциирован с показателями свёртывающей системы крови (уровнем общего фибриногена, активированным тромбопластиновым временем), а также с нарушением ритма сердца у пациентов, перенесших инсульт.

Апробация работы: Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на межлабораторном научном семинаре ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН (Томск, 2005г.); IV и V конгрессах молодых учёных «Науки о человеке» (Томск, 2003; 2004); на V Конгрессе с международным участием «Паллиативная медицина и реабилитация в здраво-

охранении» (Афины, 2003г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 300-летию Санкт-Петербурга «Актуальные проблемы современной неврологии, психиатрии и нейрохирургии» (Санкт-Петербург, 2003г.); Международной конференции «Современные подходы к диагностике, профилактике и лечению нейродегенеративных заболеваний (деменции, инсульта и болезни Паркинсона)» (Новосибирск, 2003г.); Международном европейском конгрессе по генетике человека (Мюнхен, Германия, 2004г.); научно-практической конференции, посвященной 25-летию юбилею факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов (Томск, 2004г.), Российском национальном конгрессе кардиологов (Томск, 2004), VII научной конференции «Актуальные проблемы клинической генетики» (Томск, 2004г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ.

Структура и объём диссертации: Диссертационная работа изложена на 181 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения и выводов, практических рекомендаций. Данные проиллюстрированы 47 таблицами, 16 рисунками. Библиографический указатель включает 229 источников, из них 88 работ отечественных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки вклада полиморфных вариантов генов *NOS3*(VNTR, C774T, G894T, C-691T), *FG*(G1691A, A4070G), *FG*(G20210A), *GP1IIa*(T196C) в развитие инсульта обследовано 114 пациентов, перенесших инсульт. Из них 66 мужчин и 48 женщин. Средний возраст пациентов составил $55,6 \pm 8,1$ лет. Все больные были подразделены на 2 группы. Первая группа: больные с ишемическим инсультом (ИИ), $n=98$ (85,9%) человек, 2-я группа: больные с геморрагическим инсультом (ГИ), $n=16$ (14,0%) человек.

Контрольную группу ($n=110$) составили лица, не имевшие клинических признаков сердечно-сосудистых нарушений, что подтверждалось данными опросника клинического обследования, и электрокардиографии, средний возраст $41,9 \pm 7,9$ лет. Группа сформирована из выборки, использованной в эпидемиологическом исследовании факторов риска ИБС в г. Томске, проводимом кафедрой факультетской терапии СибГМУ.

Клинико-биохимические методы исследования. Диагноз инсульта устанавливался на основании общепринятых критериев в соответствии с международной классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ-10, ВОЗ, 1992г). Неврологический статус исследовался по общепринятой схеме. Объективная оценка степени выраженности неврологического дефицита состояния больного оценивалась по шкале американского института неврологических расстройств и инсульта (шкала National Institutes of Health – National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NIH- NINDS)) [Goldstein, Bartels, Davis, 1989].

Диагноз подтверждён нейровизуализационными методами исследования в 88,59% случаев. МР-томография головного мозга проводилась на базе МРТ-лаборатории НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН, КТ-исследование - в лаборатории клиник СибГМУ. Всем пациентам определялось артериальное давление (АД). Рассчитывались среднеарифметические значения САД и ДАД и показатель среднего артериального давления (среднее АД), который вычислялся по формуле:

$$\text{АД среднее} = (\text{САД} - \text{ДАД}) : 3 + \text{ДАД}.$$

Исследование показателей свёртывающей системы крови (ССК) (протромбиновый индекс (ПТИ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), определение фибриногена в плазме крови, определение растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме крови (РФМК)) проводилось на базе биохимической лаборатории клиник СибГМУ г. Томска. Липидный спектр (определение содержания общего холестерина (ОХС) и триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП), липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) и индекса атерогенности (ИА)) на базе биохимической лаборатории НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН.

Молекулярно-генетические методы анализа. Исследовались полиморфные варианты генов *NOS3*(VNTR, C774T, G894T, C-691T), *FV*(G1691A, A4070G), *FII* (G20210A), *GPIIIa*(T196C). При поступлении образцов крови больных инсультами выделение ДНК проводили по стандартной неэнзиматической методике [Маниатис, Фрич, 1984; Lahiri, 1992]. Полиморфные варианты исследуемых генов исследовали с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в геномной базе данных (GDB) и литературе [Радзинский и др., 2001; Wang et al., 1996; Avcu et al., 2000; Guzik et al., 2001].

Генотипирование полиморфизмов осуществляли путём ПДРФ-анализа продуктов амплификации соответствующими рестриктазами и последующим разделением продуктов рестрикции в 3% агарозном или 6% полиакриламидном гелях. Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе "UV-VIS Imager-II"(США).

Статистические методы анализа данных. Основным методом статистического анализа являлся непараметрический метод (U-тест Манна-Уитни). Для изучения взаимосвязи основных факторов риска развития инсульта с клиническими и лабораторными признаками использовался корреляционный анализ с использованием гамма (γ) статистики. При описании генетической структуры использовали: тестирование на соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) и сравнение частот аллелей и генотипов проводили с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность и точным тестом Фишера [Вейр, 1995]; определение теоретической и ожидаемой гетерозиготности рассчитывали по методу Nei [1987]. Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим феноти-

пом рассчитывали относительный риск (RR) [Allison, 1997]. Обсуждение величин RR проводили при уровне значимости не более 5%. Анализ ассоциаций изучаемых полиморфных вариантов генов с количественными патогенетическими значимыми для инсульта признаками был выполнен с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты клинического исследования больных

Среди факторов риска наиболее часто встречающимися оказались в группе ИИ: артериальная гипертония (92,8%), стресс (42,8%), курение (41,8%), ОНМК в анамнезе (17,3%). В группе ГИ: артериальная гипертония наблюдалась в 100,0% случаев, стресс, метеочувствительность, употребление острой и солёной пищи у 62,5% пациентов, курение у 31,2%, ОНМК в анамнезе - у 25,0%, стенокардия - у 25,0% обследованных.

При опросе самих пациентов и их родственников выявлено, что отягощённый наследственный анамнез наблюдался в группе ИИ у 75(76,5%) больных, а в группе ГИ - у 11(68,8%) пациентов. В группе больных, перенесших ИИ, инсульты по материнской линии, у матери пробанда были отмечены в 33,6% наблюдений, в 40,8 % случаев они страдали АГ, а в 8,1% случаев перенесли инфаркт миокарда (ИМ). По отцовской линии количество инсультов и ИМ оказалось равным и составило 14,3% случаев. Сибсы - сёстры страдали АГ в 22,4% наблюдений, у братьев АГ была установлена в 11,2% семей. В группе ГИ отягощённый семейный анамнез также отмечался по обоим родительским линиям. По отцовской линии в 25,0% случаев имели место инсульт и артериальная гипертония, по линии матери в 31,2% наблюдений были зарегистрированы инсульты и в 18,7% АГ. При анализе перенесенных заболеваний у сестёр в 12,5% случаев отмечалась АГ, а у братьев в 18,7% инфаркт миокарда и в 6,2% АГ.

Степень тяжести инсульта определялась в соответствии с классификацией, предложенной Е. И. Гусевым и соавт. (1996 г.). В группе ИИ преобладала средняя степень тяжести у 72(73,4%) обследованных. В группе ГИ тяжёлая степень преобладала у 9(56,2%) пациентов, что объяснялось характером инсульта и наличием отёка головного мозга.

Одновременно была проведена оценка степени выраженности неврологического дефицита согласно шкале NIH-NINDS и объективным данным [Goldstein et al., 1989]. Среди пациентов, перенесших ИИ, преобладали лица (52,04%) со средней степенью неврологических нарушений (суммарный балл по шкале NIH-NINDS составил $7,64 \pm 1,45$ балла), в неврологическом статусе которых преобладала более выраженная очаговая симптоматика. В случае ГИ в первую группу с лёгкими нарушениями вошло 5(31,2%) пациентов (суммарный балл по шкале NIH-NINDS - $3,0 \pm 1,6$ балла), вторую группу составили 5 (31,2%) больных со средней степенью выраженности неврологического дефицита (суммарный балл по шкале NIH-NINDS - $8,6 \pm 0,8$ балла) и третью

группу - лица (суммарный балл по шкале NIH-NINDS - $15,0 \pm 3,4$ балла), (37,5%) с тяжёлыми клиническими проявлениями.

В обеих группах установлена взаимосвязь тяжести клинических проявлений инсульта от уровня среднего АД: чем выше определялся уровень среднего АД, тем тяжелее протекал инсульт.

Обнаружена взаимосвязь показателей АЧТВ с возрастом у пациентов с ИИ ($\gamma = 0,17$; $p = 0,01$) и со стрессом в группе больных, перенесших ГИ ($\gamma = 0,63$; $p = 0,01$). Установлено, что больные, перенесшие ИИ, и имеющие высокие цифры фибриногена, были особенно метеочувствительны ($\gamma = 0,2$; $p = 0,01$). Чем выше был уровень фибриногена, тем более увеличенным обнаружился показатель РФМК и индекс атерогенности ($\gamma = 0,25$; $p = 0,005$; $\gamma = 0,16$; $p = 0,024$). Повышение уровня ТГ коррелировало с ИМ ($\gamma = 0,38$; $p = 0,022$), мерцательной аритмией ($\gamma = 0,33$; $p = 0,03$), со степенью ГБ ($\gamma = 0,33$; $p = 0,001$). В группе ИИ уровень ТГ коррелировал со степенью ГБ ($\gamma = 0,22$; $p = 0,007$), а в группе ГИ с показателями САД ($\gamma = 0,43$; $p = 0,025$). Повышение уровня ХС-ЛПНП в общей группе и в группе ИИ коррелировало со стрессом. ($\gamma = 0,28$; $p = 0,003$; $\gamma = 0,29$; $p = 0,001$). Снижение уровня ХС-ЛПВП в общей группе взаимосвязано с курением ($\gamma = 0,36$; $p = 0,00002$), с риском возникновения ИМ ($\gamma = 0,25$; $p = 0,04$), и с повышением уровня среднего АД ($\gamma = 0,14$; $p = 0,02$). Показатели среднего АД оказались связаны с такими факторами риска как злоупотребление алкоголем ($\gamma = 0,140$; $p = 0,032$), степенью и продолжительностью АГ ($\gamma = 0,53$; $p = 0,03$; $\gamma = 0,36$; $p = 1 \times 10^{-4}$) и перенесёнными ОНМК ($\gamma = 0,33$; $p = 0,03$). Уровень ср. САД ассоциировался с возрастом ($\gamma = 0,16$; $p = 0,008$), стенокардией ($\gamma = 0,205$; $p = 0,03$), степенью АГ ($\gamma = 0,51$; $p = 1 \times 10^{-5}$), её продолжительностью ($\gamma = 0,41$; $p = 1 \times 10^{-5}$), показателями ср. ДАД ($\gamma = 0,76$; $p = 1 \times 10^{-6}$) и среднего АД ($\gamma = 0,84$; $p = 1 \times 10^{-5}$) и степенью неврологических нарушений при инсульте ($\gamma = 0,51$; $p = 1 \times 10^{-5}$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в развитии инсульта играют роль не только АГ и атеросклероз, но также отягощённая наследственность и факторы внешней среды (курение, алкоголь, стрессовые ситуации, употребление в пищу острого и солёного). Изменения биохимических показателей крови и показателей системной гемодинамики, взаимосвязанные с факторами риска, могут влиять на степень неврологических нарушений при инсульте.

Оценка частот аллелей и генотипов по полиморфизмам генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* у жителей г. Томска

Для всех полиморфизмов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга (РХВ) (табл. 1). Значения гетерозиготности для полиморфизмов гена *NOS3* варьировали в пределах от 22,7% (для VNTR) до 45,8% (для G894T). Среди генов гемостаза наименьшие значения гетерозиготности были получены для гена протромбина (2,0%), наибольшие - для гена *GPIIIa* (25,0%).

Таблица 1

Распределение генотипов и частот аллелей полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GpIIIa* в контрольной выборке

Ген	Поли-мор-физм	Гено-тип	N.O.	N.E.	χ^2 d.f.=1	Частота аллеля (%)	h_{obs} h_{exp}
<i>NOS3</i>	C774T	CC	74	71,3	2,13 $p=0,99$	C=79,9 T=20,1	0,277 0,394
		CT	31	35,9			
		TT	7	4,5			
	G894T	GG	57	59,5	1,20 $p=0,53$	G=70,4 T=29,6	0,458 0,417
		GT	55	50,0			
		TT	8	10,5			
	C-691T	CC	76	79,2	3,72 $p=0,16$	C=81,3 T=18,7	0,358 0,305
		CT	43	36,5			
		TT	1	4,2			
	VNTR	AA	4	2,5	1,08 $p=0,21$	B=85,3 A=14,7	0,227 0,250
		AB	27	29,8			
		BB	88	86,5			
<i>FV</i>	G1691A	GG	113	113,0	-	G=97,9 A=2,1	0,042 0,041
		GA	5	4,8			
		AA	0	0,05			
	A4070G	AA	78	76,7	2,33 $p=0,12$	A=90,8 G=9,2	0,139 0,166
		AG	13	15,4			
		GG	2	0,7			
<i>FII</i>	G20210A	GG	103	103,0	-	G=99,0 A=1,0	0,019 0,019
		AG	2	1,9			
		AA	0	0,01			
<i>GpIIIa</i>	T196C	PLA1/1	85	86,8	0,07 $p=0,79$	PLA1=85,8 PLA2=14,2	0,250 0,244
		PLA1/2	29	25,3			
		PLA2/2	0	1,8			

Примечание. N.O. – наблюдаемая и N.E. – ожидаемая численность генотипов соответственно; критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга; d.f. – число степеней свободы; h_{obs} и h_{exp} – соответственно наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность.

Изученные варианты гена *NOS3* отличались большим уровнем полиморфизма, чем варианты генов свертываемости крови (табл. 1). Полиморфные варианты гена *NOS3* достаточно широко изучены в различных популяциях, в том числе и в России. Наиболее полно в литературе представлены данные по частотам аллелей гена *NOS3* [Степанов и др., 1998; Косьянкова, 2001; Пузырёв К. В. и др., 2002; Hingorani et al., 1998; Hibi et al., 1998; Miyahara et al., 1994], особенно полиморфизма VNTR.

Частота аллеля «С» варианта С-691Т в контрольной группе составила 81,3%. По данным литературы, его встречаемость колеблется от 48% у бурят до 94% у якутов, а у татар, проживающих на территории Томской области, составляет 83% [Сейтова, 2004]. В настоящем исследовании частота аллеля «С» полиморфизма G894Т составила 70,4%. Частота аллеля «С» полиморфизма С774Т также соответствовала данным литературы и составила 79,9%. В исследованиях сибирских популяций показано, что частота данного аллеля варьирует от 69% у якутов до 74% у тувинцев и бурят [Косянкова, 2002]. Его частота у американцев составляет 74% [Novorodovsky et al., 1999].

Таким образом, исследованные ДНК-полиморфизмы у русских г. Томска по частотам аллелей и генотипов не отличаются от данных, представленных в мировой литературе.

Характеристика полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* у больных инсультом

Для полиморфизмов гена *NOS3* в группе больных минимальное и максимальное значения гетерозиготности были отмечены для маркеров С-691Т и С774Т, которые составили 23,8% и 43,5% соответственно (табл. 2). У больных инсультом и в контрольной группе выявлено различие по вариантам С-691Т и VNTR за счет понижения уровня гетерозиготности у больных в первом случае ($p=0,057$) и повышения - во втором ($p=0,053$). Это позволяет предполагать, что, гетерозиготный генотип по данным маркерам может иметь прогностическое значение. Среди генов гемостаза в группе больных инсультом минимальные и максимальные значения гетерозиготности, так же как и в контрольной группе, были получены для гена протромбина (0,9%), для гена *GpIIIa* (20,6 %).

При сравнении частот аллелей полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII* у больных инсультом не было выявлено существенных отличий от таковых в сравнении с другими сосудистыми заболеваниями. Частота аллеля С691 среди больных инсультом, составила 84,3% (табл. 2). По данным литературы, частота этого аллеля находится на уровне 85% у больных коронарным атеросклерозом (КА), 60% у больных с нарушением проводимости сердца (НПС), 65% у пациентов с ЭГ и 78% у пациентов с кардиомиопатией (ГКМП) [Косянкова, 2002; Макеева, 2004].

У больных инсультом частота аллеля G894 гена *NOS3* составила 73%. Частота аллеля «С» полиморфизма С774Т – 74,5%, а аллеля 4b VNTR полиморфизма гена *NOS3* у больных инсультом – 77,3% (табл. 2). Среди других заболеваний частота этого аллеля находится на уровне 84% у больных коронарным атеросклерозом (КА), 85% у больных с (НПС), 80% у пациентов с ЭГ и 74% у пациентов с кардиомиопатией [Косянкова, 2001; Макеева, 2004].

Частота мутации Лейдена 1691А гена пятого фактора свертывания крови и мутации 20210А гена протромбина у больных инсультом в настоящем исследовании была равна 3,3% и 0,5% соответственно. Эти оценки находятся в пределах величин, описанных в литературе, как для здоровых, так и для боль-

ных с различными формами сосудистых нарушений, включая инсульт, церебральный венозный тромбоз, коронарный атеросклероз, ИМ [Madonna et al., 2002; Margaglione et al., 1999; Kenet et al., 2000; Longstreth et al., 1998; Redondo et al., 1999; Doggen et al., 1998].

Таблица 2

Распределение генотипов и частот аллелей полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GpIIIa* в группе больных инсультом

Ген	Поли-морфизм	Гено-тип	N.O.	N.E.	χ^2 d.f.=1	Частота аллеля (%)	h_{obs} h_{exp}
<i>NOS3</i>	C774T	CC	57	60,0	1,014 p=0,31	C=74,5 T=25,5	0,435 0,380
		CT	47	41,0			
		TT	4	7,0			
	G894T	GG	57	58,7	0,147 p=0,70	G=73,0 T=27,0	0,422 0,391
		GT	46	42,5			
		TT	6	7,7			
<i>NOS3</i>	C691T	CC	76	74,5	0,299 p=0,58	C=84,3 T=15,7	0,238 0,265
		CT	25	27,8			
		TT	4	2,5			
	VNTR	AA	6	5,5	0,001 p=0,97	B=77,3 A=22,7	0,343 0,351
		AB	37	37,8			
		BB	65	64,5			
<i>FV</i>	G1691A	GG	100	99,1	-	G=96,7 A = 3,3	0,047 0,064
		GA	5	6,7			
		AA	1	0,1			
	A4070G	AA	82	82,2	0,073 p=0,78	A=88,9 G=11,1	0,202 0,197
		AG	21	20,4			
		GG	1	1,2			
<i>FII</i>	G20210A	GG	107	107,0	-	G=99,5 A = 0,5	0,009 0,009
		AG	1	1,0			
		AA	0	0,0			
<i>GpIIIa</i>	T196C	PLA1/1	85	86,1	1,405 p=0,23	PLA1=89,7 PLA2=10,3	0,206 0,185
		PLA1/2	22	19,7			
		PLA2/2	0	1,1			

Примечание. Обозначения см. табл. 1.

Полученная в данном исследовании частота аллеля PLA2 гена *GPIIIa* для больных инсультом 10,3% ниже значений, описанных в литературе: в Англии частота данного аллеля у больных инсультом составила – 30% [Angela et al., 1999], в США – 50% [Kathryn et al., 1998], среди других заболеваний частота

аллеля PLA2 находится на уровне 32,9% у пациентов с коронарным тромбозом [Mirtelsson et al., 1999].

В целом, исследованные варианты гена *NOS3* в группе больных инсультом, так же как и в контроле, отличались большим уровнем полиморфизма, чем маркеры генов свертываемости крови.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* с инсультом

Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к инсульту и его клиническими особенностями судили по величине относительного риска шансов (RR). В случае достижения значимых отличий по частотам аллелей в сравниваемых группах, значения $RR > 1$ указывают на возможную положительную ассоциацию аллеля с заболеванием. Обсуждение величин относительного риска проводили при уровне значимости не более 5%.

Не было показано различий между больными инсультом и контрольной группой по частотам аллелей и генотипов полиморфных вариантов G894T; C-691T гена *NOS3* и изученных генов гемостаза (табл. 3). Положительная ассоциация была показана для больных инсультом по аллелю «А» VNTR полиморфизма ($\chi^2=4,26$; $p=0,038$; $RR=1,54$), что указывает на возможную патологическую роль данного полиморфизма в развитии этого заболевания. Установлено различие в частотах генотипов полиморфного варианта C774T гена *NOS3* между исследуемыми группами.

Получены достоверные различия по частотам генотипов по VNTR-полиморфизму гена *NOS3*, в зависимости от типа инсульта. В подгруппе больных ГИ выявлено отклонение от PXB ($\chi^2=4,6$; $d.f=1$; $p=0,03$) и недостаток гетерозигот на уровне 53,6%. В этой же подгруппе было выявлено увеличение частоты генотипа «АА» по сравнению с больными ИИ ($p=0,04$) и контрольной группой ($p=0,03$). В подгруппе больных ИИ наблюдается повышение частоты гетерозигот «АВ» VNTR полиморфизма по сравнению с контролем ($p=0,03$).

В природных популяциях давлению отбора подвергаются носители определенных генотипов, различным вкладом которых определяется приспособленность популяции в целом. Полученные в настоящем исследовании данные позволяют предположить, что носители генотипов «АА» и «АВ» VNTR полиморфизма имеют предрасположенность к развитию различных форм инсульта.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* с некоторыми факторами риска

При исследовании полиморфных вариантов генов *NOS3* (VNTR, C774T, G894T, C-691T), *FV* (G1691A, A4070G), *FII* (G20210A), *GPIIIa* (T196C) в различных возрастных группах больных инсультом не выявлено статистически значимых отличий по частотам аллелей и генотипов.

Таблица 3

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов гена *NOS3 FV, FII, GpIIIa* у больных инсультом и в группе контроля

Группы	VNTR					C774T				
	генотипы n (%)			аллели n (%)		генотипы n (%)			аллели n (%)	
	AA	AB	BB	A	B	CC	CT	TT	C	T
Контроль	4(3,4)	27(22,7)	88(73,9)	35(14,7)	203(85,3)	74(66,1)	31(27,7)	7(6,2)	179(79,9)	45(20,1)
Инсульт	6(6,0)	37(34,0)	65(60,0)	49(22,7)	167(77,3)	57(52,8)	47(43,5)	4(3,7)	161(74,5)	55(25,5)
χ^2 (p)	4,89(0,08)			4,26(0,038)		6,23(0,04)			1,51(0,21)	
RR				1,54					1,26	
G894T						C-691T				
Контроль	GG	GT	TT	G	T	CC	CT	TT	C	T
	57(47,5)	55(45,8)	8(6,7)	169(70,4)	71(29,6)	76(63,4)	43(35,8)	1(0,8)	195(81,3)	45(18,7)
Инсульт	57 (52,3)	46 (42,2)	6 (5,5)	160(73,0)	58(27,0)	76 (72,4)	25 (23,8)	4 (3,8)	177(84,3)	33(15,7)
χ^2 (p)	0,56(0,76)			0,36(0,546)		5,58(0,06)			0,52(0,47)	
RR				0,86					0,81	
FVG1691A						FV A4070G				
Контроль	GG	GA	AA	G	A	AA	AG	GG	A	G
	113(95,8)	5(4,2)	0(0)	231(97,9)	5(2,1)	78(83,8)	13(14)	2(3,2)	169(90,8)	17(9,2)
Инсульт	100 (94,3)	5 (4,7)	1 (1,0)	205(96,7)	7(3,3)	82 (78,8)	21(20,2)	1 (1,0)	185(88,9)	23(11,1)
χ^2 (p)	0,74*			0,231(0,63)		0,44*			0,213(0,64)	
RR				1,57					1,236	
FIIIG20210A						GpIIIa T196C				
Контроль	GG	GA	AA	G	A	PLA1/1	PLA1/2	PLA2/2	PLA1	PLA2
	103(98,1)	2(1,9)	0	208(99,0)	2(1,0)	85(73,3)	29(25,0)	2(1,7)	199(85,8)	33(14,2)
Инсульт	107(99,1)	1(0,9)	0	215(99,5)	1(0,5)	85(79,4)	22(20,6)	0(0)	192(89,7)	22(10,3)
χ^2 (p)	0,61*			0,61*		0,33*			1,25(0,26)	
RR				0,48					0,69	

Примечание. RR – относительный риск; p – уровень значимости: критерий χ^2 - использован для сравнения частот аллелей и генотипов; * - уровень значимости, полученный точным тестом Фишера.

Для сравнения изучаемых полиморфных вариантов генов и степени АГ все больные были подразделены на две группы. Первую группу (I) составили пациенты с нормальной и пограничной степенью гипертензии АД= от 120/80 до 140/90 мм. рт. ст., (n=53) вторую (II) составили пациенты с мягкой, средней и тяжелой степенью гипертензии АД=159/99-180/110 (n=55); третья группа (III) - контроль (n=120). При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных с различной степенью АГ и контрольной группой не было выявлено различий по полиморфизмам генов *FV* (G1691A, A4070G), *FII* (G20210A), *GPIIIa* (T196C) (табл. 4). Отмечено постепенное накопление аллеля «А» полиморфизма VNTR гена *NOS3* от 14,7% в контрольной группе до 20,8% у пациентов I группы и 24,5% у больных II группы (табл. 4).

При исследовании частот генотипов полиморфных вариантов C774T и C-691T получены достоверные отличия между пациентами I группы и контролем ($p=0,01$; $p=0,01$) (табл.4). У пациентов I группы отмечается отклонение распределения генотипов от РХВ по полиморфному варианту C774T ($\chi^2=4,21$; d.f.=1; $p=0,04$) и накопление носителей генотипов «СТ» и «ТТ» по сравнению с контрольной группой ($\chi=4,60$; $p=0,032$). Кроме этого, пациенты I группы характеризуются отклонением распределения генотипов от РХВ по полиморфному варианту C-691T ($\chi^2=4,48$; d.f.=1; $p=0,034$) и, кроме этого, значимым недостатком гетерозигот «СТ» по сравнению с контрольной группой ($\chi^2=4,77$; $p=0,029$).

Обнаружено постепенное снижение частоты гетерозигот «ГТ» полиморфизма G894T гена *NOS3* от 45 % в контрольной группе до 40,6% с пограничной степенью и 37% у больных мягкой, средней и тяжелой степенью АГ. Достоверные отличия в распределении генотипов были получены между больными I и II групп ($\chi^2=4,47$; $p=0,034$). В литературе имеются сообщения о связи VNTR полиморфизма гена *NOS3* с эссенциальной гипертензией (ЭГ) [Степанов и др., 1998; Benjafield, Morris, 2000; Fernandez et al., 2004], острой коронарной недостаточностью [Park et al., 2004] с ЭГ в популяции Японии [Nakayama, 1997], с ГЛЖ при ЭГ в популяции г. Томска [Косянкова, Пузырев, 2002, 2003].

Полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи полиморфизмов VNTR, C774T, C-691T и G894T гена *NOS3* со степенью артериальной гипертензии при инсульте. Данные полиморфизмы могут служить генетическими маркерами при тестировании подверженности к данной патологии, особенно у лиц с гипертензией.

Выявлены значимые отличия по частотам генотипов полиморфизма C774T гена *NOS3* между группой больных инсультом, перенесших инфаркт миокарда и контрольной группой ($p=0,01$). Таким образом, у пациентов с инсультом, особенно сочетающихся с инфарктом миокарда преобладают генотипы «СТ» и «ТТ» полиморфизма C774T.

Таблица 4

Частота аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *NOS3* у больных инсультом с различной степенью АГ и здоровых лиц

Группы		VNTR					C774T				
		генотипы n(%)			аллели n(%)		генотипы n(%)			аллели n(%)	
		AA	AB	BB	A	B	CC	CT	TT	C	T
I		1(1,9)	20(37,7)	32(60,4)	27(20,8)	84(79,2)	25(52,7)	27(39,8)	1(7,5)	77(72,6)	29,4(27,4)
II		5(9,1)	17(30,9)	33(60,0)	27(24,5)	83(75,5)	32(58,2)	20(36,4)	3(5,4)	84(76,4)	26(23,6)
III		4(3,4)	27(22,7)	88(73,9)	35(14,7)	203(85,3)	74(66,1)	31(27,7)	7(6,2)	179(79,9)	45(20,1)
χ^2 p	I, III	0,12*			4,16(0,04)		0,01*			1,79(0,18)	
	II, III	0,117*			4,33(0,03)		0,51*			0,36(0,54)	
Группы		G894T					C-691T				
		генотипы n(%)			аллели n(%)		генотипы n(%)			аллели n(%)	
		GG	GT	TT	G	T	CC	CT	TT	C	T
I		24(51,4)	28(40,6)	1(8,0)	76(71,7)	30(28,3)	39(72,7)	9(25,1)	3(2,2)	87(85,3)	159(14,7)
II		33(57,0)	17(37,0)	5(6,0)	83(75,5)	27(24,5)	37(68,5)	16(29,6)	1(1,9)	90(83,3)	18(16,7)
III		57(47,5)	55(45,8)	8(6,7)	169(70,4)	71(29,6)	76(63,4)	43(35,8)	1(0,8)	195(81,3)	45(18,7)
χ^2 p	I, III	0,406*			0,01(0,91)		0,01*			0,553(0,46)	
	II, III	0,171*			0,716(0,39)		0,53*			0,101(0,75)	

Примечание. Обозначения см. таб. 3.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* с некоторыми клиническими признаками инсульта

В настоящем исследовании изучены взаимоотношения полиморфных вариантов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* с некоторыми клиническими признаками инсульта: степенью тяжести (шкала NIH), показателями ЭКГ (ритм, гипертрофия левого желудочка (ГЛЖ), изменениями миокарда (желудочков и/или предсердий), изменениями глазного дна (гипертензивная ангиопатия сетчатки (ГАПС), артериолосклероз сетчатки (АС)).

Несмотря на то, что не было выявлено различий в частотах аллелей полиморфизма C774T гена *NOS3* у больных с различной степенью тяжести инсульта и в контрольной группе, обнаружены значимые различия в распределении генотипов между группой больных со средней степенью заболевания и контрольной группой ($p=0,01$). У первых наблюдается повышение частоты гетерозигот «СТ» до 56,3% по сравнению с контрольной группой, где частота их составила 27,7% ($p=0,03$) (рис. 1). Показано накопление аллеля «А» полиморфизма G1691A гена *FV* в группе больных с наибольшей степенью тяжести заболевания (группа III) ($p=0,02$) и различия в распределении генотипов между группой III и контролем ($\chi^2 = 7,603$; $p=0,02$) (рис. 1).

В группах больных с лёгкой и тяжелой степенью инсульта частота «патологического» аллеля «А» полиморфизма VNTR гена *NOS3* составила 25,4% и 31,2% соответственно, тогда как в контрольной группе его частота находилась на уровне 14,7% (рис. 1). Кроме того, что у больных с тяжелой степенью инсульта имеет место накопление «патологического» аллеля «А», у них выявлено также повышение частоты гомозиготных носителей данного аллеля (рис.1). Так как I группу по тяжести заболевания составили пациенты с пограничной степенью АГ (146-147/92-94), а III группу - со средней и тяжёлой степенью АГ (153-175/96-103), то данный результат является закономерным, поскольку нами установлена связь полиморфизма VNTR и степенью АГ.

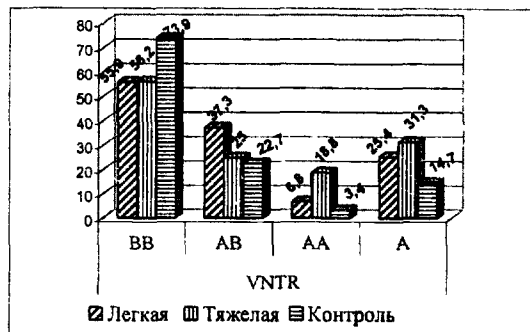
Полученные результаты свидетельствуют, что некоторые полиморфные варианты гена *NOS3* могут вносить вклад в предрасположенность к развитию инсульта и дают возможность прогнозировать тяжесть течения заболевания. Наличие мутации Лейдена может являться фактором риска тяжелого течения инсульта.

Отмечено достоверное увеличение патологического аллеля PLA2 (16,7%) гена *GpIIIa* в группе больных инсультом с нарушениями сердечного ритма на ЭКГ (группа 1) по сравнению с группой обследованных без таковых (группа 2) ($p=0,03$; $p=0,02$). Статистически значимыми были отличия по частотам генотипов ($\chi^2=3,95$; $p=0,04$) в данных группах. Также показаны статистически достоверные отличия по частотам аллелей и генотипов полиморфного варианта VNTR гена *NOS3* и различия в распределении генотипов C774T в группе больных инсультом с изменениями миокарда на ЭКГ и контрольной группой ($p=0,01$; $p=0,01$) ($p=0,04$). Данные результаты могут свидетельствовать о связи VNTR полиморфизма гена *NOS3* с клиническими проявлениями со стороны сердечно-сосудистой системы при инсульте.

Частота аллеля «А» полиморфизма G1691A гена *FV*.



Частота генотипов и аллеля «А» VNTR полиморфизма гена *NOS3*



Частота генотипов полиморфизма C774T гена *NOS3*

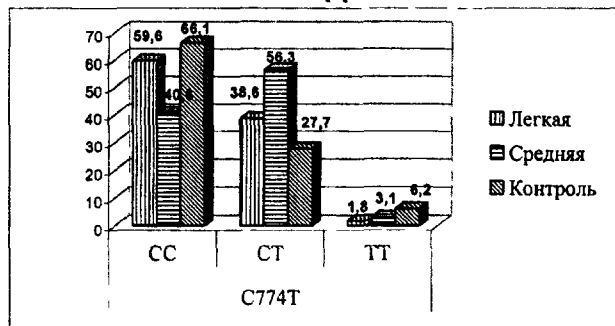


Рис.1. Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов G1691A гена *FV*, и VNTR, C774T гена *NOS3* у больных с различной степенью тяжести инсульта и контрольной группой

Связь полиморфных вариантов генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIa* с патогенетически значимыми количественными признаками инсульта

Следующим этапом нашей работы была оценка функциональной значимости генов *FV*(G1691A, A4070G), *FI*(G20210A), *GpIIa*(T196C), *NOS3*(VNTR, C774T, G894T, C-691T) в фенотипической изменчивости количественных признаков, таких как: показатели ССК, липидного спектра, и среднего артериального давления. В контрольной группе не показано связи генов *NOS* с количественными патогенетически значимыми признаками, возможно, в силу сбалансированного функционирования физиологических систем у здоровых индивидов. Иная ситуация наблюдается в группе больных.

С помощью однофакторного дисперсионного анализа оценена зависимость распределения значений вышеперечисленных показателей от пола и возраста. Не было обнаружено зависимости от пола. Показатели АЧТВ и ХС-ЛПВП показали зависимость от возраста. Уровень АЧТВ показал обратную зависимость (коэффициент корреляции $r = -0,1877$, $p = 0,05$), уровень ХС-ЛПВП - прямую ($r = 0,2668$, $p = 0,005$). Для выполнения анализа ассоциаций генотипов с количественными признаками, необходимо было ввести поправку на возраст значений уровня ХС-ЛПВП. После введения данной поправки, не было обнаружено зависимости данных показателей от возраста.

С помощью однофакторного дисперсионного анализа показано, что с полиморфными вариантами гена *NOS3* у больных инсультом ассоциированы следующие патогенетически значимые признаки: VNTR - с показателями уровня триглицеридов (ТГ); G894T - с уровнем общего фибриногена (ОФ); аллельные варианты полиморфизма C-691T с показателями ХС-ЛПВП, и индексом атерогенности (ИА) (табл. 5). Функциональные механизмы полученных ассоциаций до конца не ясны и, вероятно, связаны с продемонстрированным в данном исследовании вкладом полиморфизмов генов *NOS* в детерминацию изменчивости спектра количественных факторов риска и клинических признаков инсульта. Продукты экспрессии изученных генов включены в контроль сосудистого тонуса и других процессов, поэтому их молекулярные изменения могут привести к патологическим последствиям.

В настоящем исследовании выявлена ассоциация между аллелем PLA2 гена *GpIIa* с уровнем общего фибриногена в крови, что является неблагоприятным прогностическим фактором течения заболевания (табл. 5). Кроме того, получена ассоциация между наличием патологического аллеля PLA2 и уровнем АЧТВ. При инсульте повышается уровень ОФ, а показатели АЧТВ укорачиваются вследствие гиперкоагуляции. С одной стороны, в присутствии аллеля PLA2 тромбоциты способны связывать меньшее количество фибриногена, что может отрицательно сказываться на образовании микро- и макроагрегатов при повреждении сосудистой стенки.

С другой стороны, показана ассоциация аллеля PLA2 с повышенной агрегацией тромбоцитов, которая в данном случае возможна за счёт повышения уровня фибриногена, так же ассоциированного с наличием аллеля PLA2. Таким образом, выявленная ассоциация патологического аллеля PLA2 гена

Gp11a с уровнем ОФ и АЧТВ предполагает возможную прогностическую значимость данного полиморфизма относительно течения заболевания.

Таблица 5

Связь полиморфизма гена *Gp11a* (T196C) и полиморфизмов гена *NOS3* с количественными патогенетически значимыми признаками у больных инсультом

Признаки	генотипы	M ±S. D.	F	p
Полиморфизм T196C гена <i>Gp11a</i>				
АЧТВ	PLA1(n=86)	33,3±0,66	3,64	0,05
	PLA1/2(n=22)	30,3±1,57		
Общий фибриноген	PLA1(n=86)	3,48±0,08	6,797	0,01
	PLA1/2(n=22)	4,01±0,21		
Полиморфизм VNTR гена <i>NOS3</i>				
триглицериды	bb(n=65)	1,59±0,37	5,605	0,04
	ab(n=37)	1,66±0,08		
	aa(n=6)	2,46±0,62		
Полиморфизм G894T гена <i>NOS3</i>				
Общий фибриноген	gg(n=57)	3,82±0,12	4,746	0,01
	gt(n=46)	3,36±0,12		
	tt(n=6)	3,12±0,28		
Полиморфизм C-691T гена <i>NOS3</i>				
ХС-ЛПВП	cc(n=76)	1,02±0,02	4,55	0,012
	ct(n=25)	0,83±0,04		
	tt(n=4)	1,10±0,08		
Индекс атерогенности	cc(n=76)	3,64±0,13	3,26	0,042
	ct(n=25)	4,37±0,41		
	tt(n=4)	3,00±0,17		

Примечание. F- статистика Фишера-Снедекора для однофакторного дисперсионного анализа, p – уровень значимости; ХС-ЛПВП-холестерин в составе липопротеидов высокой плотности; АЧТВ–активированное частичное тромбопластиновое время.

Суммируя полученные результаты нужно отметить следующее: очевидно, что полиморфные варианты генов *NOS3* (VNTR, G894T, C-691T), *Gp11a* (T196C) вносят определённый вклад в возникновение и развитие инсульта, определяя характер клинических проявлений, и могут иметь прогностическое значение.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее распространённым фактором риска инсульта у жителей г. Томска является артериальная гипертония. Тяжесть инсульта зависит от уровня среднего артериального давления. Наследственная отягощённость - второй по значимости (после артериальной гипертонии) фактор риска и наблюдается у пациентов с ишемическими инсультами в 76,53% случаев, а с геморрагическими – в 68,78 %.
2. Установлено, что полиморфные варианты VNTR и C774T гена *NOS3* вносят вклад в предрасположенность к развитию инсульта и являются важными для прогнозирования тяжести течения и типа заболевания: выявлено накопление аллеля «А» VNTR полиморфизма у больных по сравнению с контрольной группой и по мере нарастания тяжести заболевания. Больные геморрагическим инсультом имеют более высокую частоту генотипа «АА» по сравнению с больными ишемическим инсультом и контрольной группой. Носители гетерозиготного генотипа «СТ» полиморфного варианта C774T имеют повышенный риск развития инсульта, характеризующегося средней степенью тяжести неврологических нарушений.
3. Мутация Лейдена FV (G1691A) является фактором риска тяжелого течения инсульта. Частота «патологического» аллеля «А» у больных с тяжелой степенью заболевания находится на уровне 9,4%, что превышает значения, полученные для контрольной группы 2,1% ($p=0,05$).
4. Выявлена ассоциация полиморфного варианта T196C гена *GP1IIa* с нарушениями сердечного ритма при инсульте. У больных инсультом с нарушением сердечного ритма на ЭКГ установлена более высокая частота «патологического» аллеля PLA2 (16,7%) и его гетерозиготных носителей (33,3%) по сравнению с группой больных без нарушений сердечного ритма (7%) ($\chi^2=3,95$; $p=0,046$) и (13,9%) ($\chi^2=4,46$; $p=0,034$) соответственно.
5. Для полиморфных вариантов гена *NOS3* и T196C гена *GP1IIa* получены ассоциации с параметрами липидного спектра и свёртывающей системы крови. VNTR полиморфизм гена *NOS3* ассоциирован с показателями уровня триглицеридов; полиморфизм G894T - с уровнем общего фибриногена; аллельные варианты полиморфизма C-691T - с показателями холестерина в составе липопротеидов высокой плотности и индексом атерогенности. Полиморфизм T196C гена *GP1IIa* связан с показателями свёртывающей системы крови (уровнем общего фибриногена и активированным тромбопластиновым временем).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявление высокой значимости артериальной гипертонии - как фактора риска инсульта, у лиц с отягощённой предрасположенностью, позволяет обратить внимание на более активную популяционную и индивидуальную профилактику инсульта, направленную на максимально раннее выявление лиц с заболеваниями и патологическими процессами, повышающими риск развития острых нарушений мозгового кровообращения. При планирова-

- нии мероприятий по профилактике инсультов, особое внимание необходимо уделять контролю АД, лечению артериальной гипертензии, сердечно-сосудистых заболеваний.
2. Обратить внимание на развитие инсульта у лиц с наследственной предрасположенностью на фоне пограничной и умеренной АГ, а также на низкий процент больных, получающих адекватное лечение.
 3. Необходимо продолжить исследование инсульта и его факторов риска в открытой популяции г. Томска для более достоверной и углублённой информации о динамике эпидемиологических показателей, роли генетических факторов.
 4. Полученная информация о распространении частот аллелей и генотипов полиморфизма генов *NOS3*, *FV*, *FII*, *GPIIIa* может быть использована в эволюционной геномике, популяционной генетике и генетической эпидемиологии широко распространённых заболеваний. Сведения о вкладе молекулярно-генетических маркёров в формирование клинического полиморфизма инсульта могут учитываться при формировании групп риска и организации профилактических мероприятий.
 6. Анализ прогностической значимости полиморфных вариантов генов в семьях, может являться основой для осуществления молекулярно-генетического тестирования к данной патологии, служить ориентиром в выборе вида лекарственной терапии (генотип-специфическая терапия).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фролова С.Ю., Асмус И.А. Изучение факторов риска развития инсультов / Пятый конгресс с международным участием «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении». Сборник научных работ. - Москва, 2003. - № 2. - С. 57.
2. Фролова С.Ю., Асмус И.А. Роль наследственности в развитии инсультов / Четвёртый конгресс молодых учёных и специалистов «Науки о человеке». Сборник статей / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. - Томск, СГМУ. - 2003. - С. 28-29.
3. Фролова С.Ю., Алифирова В.М., Полешук Н.В. Инсульт: факторы риска / Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 300-летию Санкт-Петербурга «Актуальные проблемы современной неврологии, психиатрии и нейрохирургии». 27 – 28 ноября 2003 г., Санкт-Петербург. - Спб., 2003. - С. 338-339.
4. Goncharova I.A., Frolova S.Y., Kosyankova T.V., Rudko A.A., Puzyrev V.P., Aliphirova V.M. A study of the hemostatic system genes and NO syntase genes contribution into stroke development / Eur. J. Hum. Genet. Abstracts. - 2004. - V. 12. - № 1. - P. 277 – 278.
5. Фролова С.Ю., Гончарова И.А., Косянкова Т.В., Рудко А.А. Анализ полиморфных вариантов генов синтаз оксида азота и системы гемостаза в развитие инсульта / Пятого конгресса молодых учёных и специалистов «Науки

- о человеке». Сборник статей / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ, 2004. - С. 227-228.
6. Фролова С.Ю., Гончарова И.А., Косянкова Т.В., Рудко А.А. Изучение вклада генов синтазы оксида азота и генов системы гемостаза в развитие инсульта / «25 лет факультету повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов»: Сборник научных трудов / Под ред. Л.М. Огородовой, В.М. Алифировой – Томск: «Печатная мануфактура», 2004. – С. 43-48.
7. Фролова С.Ю., Алифирова В.М., Гончарова И.А., Косянкова Т.В., Рудко А.А. Вклад генов синтазы оксида азота и генов системы гемостаза в развитие инсульта / Российский национальный конгресс кардиологов. «Российская кардиология: от центра к регионам». Материалы конгресса. Томск.- 2004. (Приложение 2 к журналу «Кардиоваскулярная терапия и профилактика»). - Т. 3. - № 4. – С. 501.
8. Гончарова И.А., Фролова С.Ю., Пузырёв В.П., Алифирова В.М., Цимбалюк И.В. Вклад полиморфного варианта T196C гена третьего субсемейства интегринов *GpIIb/IIIa* в предрасположенность к инсульту / Генетика человека и патология. Сборник научных трудов / Под ред. В. П. Пузырёва. Вып. 7. Томск: «Печатная мануфактура». 2004. С. 44-50.

Р - 8 2 3 6

РНБ Русский фонд

2006-4

5636

Тираж 100. Заказ 336.
Томский государственный университет
систем управления и радиоэлектроники.
634050, г. Томск, пр. Ленина, 40.