

УДК: 616.831-005.1-056.5

АССОЦИАЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РАННЕГО ОТВЕТА C-FOS С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

*Тадевосян К.М.
Российско-Армянский (Славянский) университет
Институт молекулярной биологии, НАН, РА*

Ключевые слова: *c-Fos, однонуклеотидный полиморфизм, ишемический инсульт.*



Карине Тадевосян

Таблица 1
Нуклеотидная последовательность праймеров, используемых для PCR-SSP при генотипировании ОНП гена FOS

Ген ID	Тип и нуклеотидная последовательность (5'→3') праймеров
FOS rs7101 (C/T)	специфичный к стандартному аллелю: CTCCTACCCAGCTCTGCTC
	специфичный к мутантному аллелю: CTCCTACCCAGCTCTGCTT
	константный: TTGACAGGCGAGCCCATGC

Введение

Среди патологических состояний организма острый ишемический инсульт занимает третье место в мире по числу летальных исходов. Лишь треть от общего числа лиц, перенесших инсульт, полностью реабилитируется после заболевания, большая часть остается на всю жизнь инвалидами либо умирает. В Армении заболеваемость инсультом в среднем составляет 30-40 случаев на 10 тыс человек в год [1-3]. По прогнозам ВОЗ, в дальнейшем заболеваемость инсультом будет катастрофически увеличиваться в связи со старением популяции. Однако уже сегодня 25% от общего числа больных инсультом составляют люди активного возраста [4].

ИИ является комплексным заболеванием, в патогенез которого вовлечены как факторы окружающей среды, так и генетические факторы [5, 6]. Согласно современным представлениям, синаптическая пластичность играет значительную роль в развитии и исходе заболевания, а также в восстановлении после инсульта. Изучение молекулярных механизмов нарушения синаптической пластичности при ИИ в настоящее время находится на начальной стадии. Тем не менее, многообещающие исследования показали, что естественно возникшие нарушения в генах, кодирующих участвующие в синаптической пластичности белки, могут влиять как на развитие ИИ, так и на процесс восстановления после перенесенного заболевания [7-12].

Транскрипционные факторы вносят огромный вклад в регуляцию синаптической пластичности. Одним из таких наиболее известных транскрипционных факторов является c-Fos. Учитывая, что FOS относится к генам непосредственного раннего реагирования, белок c-Fos выполняет ряд важных функций: он представляет собой одну из основных ядерных мишеней для передачи сигналов регуляции клеточного роста, а также вовлечен во множество клеточных функций, таких как рост

нейронов и их дифференцировка, а также развитие нейрональных сетей [13].

Будучи известным как «маркер активности мозга», белок c-Fos также участвует в молекулярных процессах памяти и обучения. Было показано, что среди мышей с мутантным геном FOS наблюдалось нарушение процессов как долговременной памяти, так и синаптической пластичности, опосредованных рецептором N-метил-D-аспартата (НМДА-рецептор). НМДА-рецепторы, которые обеспечивают синаптическую передачу большинства внешних сигналов в центральную нервную систему, вносят огромный вклад в такие процессы как синаптическая пластичность, память, развитие нейронов, а также в регуляцию экспрессии генов раннего ответа, вовлеченных в нейрональную смерть после ИИ [14]. Результаты экспериментов на мышиных моделях ИИ также выявили потенциальную связь между нарушением гена c-Fos и развитием ИИ [15, 16].

Материалы и методы

Субъектами настоящего исследования являлись больные, перенесшие острый ИИ (n=322; женщины/мужчины: 154/168, средний возраст ±SD: 50±9.7 лет), а также физически здоровые лица (ЗЛ) (n=340) без наследственной предрасположенности к ИИ, соответствующие больным, перенесшим ИИ, по возрасту и полу. Все субъекты исследования были этническими армянами, проживающими на территории РА. Исключением критерием для всех субъектов исследования являлось наличие у них аутоиммунных процессов, онкологических, метаболических, эндокринных заболеваний. Больные находились на лечении/учете в Медицинском центре «Святой Григорий Просветитель» и Республиканском медицинском центре «Армения» МЗ РА. Контрольную группу составили доноры медицинского центра «Эребуни» МЗ РА.

Таблица 2
Распределение генотипов, аллелей и НМА для ОНП *FOS* rs7101

Ген, ОНП	Генотип			Аллель		НМА
c-fos rs7101	CC	CT	TT	C	T	T
ИИ	48 (0.15)	180(0.56)	94 (0.29)	276 (0.43)	368 (0.57)	274 (0.85)
ЗЛ	146 (0.43)	150(0.44)	44 (0.13)	442 (0.65)	238 (0.35)	194 (0.57)
P					<0.0002a	<0.0002b
OR					2.48	4.23
95% CI					1.98-3.01	2.95-6.25

Все субъекты были проинформированы о предстоящем исследовании и дали свое согласие на взятие крови. Настоящее исследование проводилось с разрешения Комитета по этике Института молекулярной биологии НАН РА (IRB #00004079).

Объектами исследования являлись образцы геномной ДНК лейкоцитов периферической крови больных с ИИ и ЗЛ. Забор крови проводили пункцией из локтевой вены. Кровь брали в вакуумные пробирки содержащие ЭДТА. Геномная ДНК была изолирована в соответствии со стандартной процедурой [17] и хранилась при -30°C для дальнейшего использования.

Анализ выбранного однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) исследуемого гена проводился методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (PCR-SSP) как это было описано ранее [18]. Дизайн праймеров для PCR-SSP осуществлялся при использовании базы данных «GenBank» database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Табл. 1). Визуализация продукта реакции проводилась по стандартной процедуре в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (БЭ).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного пакета «GraphPad Prism» (GraphPad Software Inc., USA). Распределение генотипов в исследуемых группах для данного полиморфизма проверяли на соответствие закону Харди-Вайнберга. На основе данных электрофореза рассчитывали частоту встречаемости генотипов, аллелей и носителей мутантной аллели (НМА) в исследуемых группах. Достоверность различия по этим параметрам между больными с ИИ и ЗЛ определяли с помощью точного критерия Фишера, рассчитывая отношение шансов (OR) и 95%-ый доверительный интервал (CI). Значение $P < 0,05$ принимали как статистически значимое. Статистическую мощность исследова-

ния определяли на основе протокола, описанного ранее [19].

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящей работе мы впервые выявили и дали оценку ассоциации между ОНП транскрипционного фактора *FOS* и ИИ. Согласно полученным результатам, представленным в таблице 2, статистически значимых различий между уровнями экспрессии *FOS* у больных с ИИ и ЗЛ не наблюдалось ($p > 0,05$). Частота встречаемости генотипов, аллелей и НМА исследуемого полиморфизма в группе больных с ИИ значительно отличалась от отмеченных параметров среди ЗЛ ($P < 0,05$). Вместе с этим мы наблюдали положительную ассоциацию исследуемого полиморфизма с ИИ. А именно, частота встречаемости мутантного аллеля rs7101*Т *FOS* в группе больных ИИ превышает аналогичный параметр в группе ЗЛ (0,57 против 0,35, OR=2,48, 95%CI: 1,98-3,01, $P < 0,0002$). Аналогично, частота носительства мутантного аллеля rs7101*Т гена *FOS* в группе больных ИИ превышала тот же параметр у ЗЛ (0,57 против 0,35, OR=2,48, 95%CI: 1,98-3,01, $P < 0,0002$, статистическая сила=99,84%). Помимо этого, среди больных ИИ гораздо чаще встречались лица с гомозиготным генотипом по мутантному аллелю rs7101*Т гена *FOS*, чем среди ЗЛ (0,29 против 0,13) (Табл.2).

Настоящее исследование позволяет предположить, что мутантная аллель rs7101*Т *FOS*, особенно в гомозиготной форме, может являться дополнительным фактором, повышающим риск развития ИИ, по крайней мере, в армянской популяции.

Заключение

Таким образом, в нашей работе впервые продемонстрирована ассоциация ОНП гена, кодирующего транскрипционный фактор c-Fos с ИИ. Данные результаты позволяют предположить, что ген раннего ответа *FOS* является одним из кандидатных генов при ИИ.

Ր **ЛИТЕРАТУРА**

1. Strong K., Mathers C., Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world Lancet Neurol., 2007, 6, 182-187.
2. Feigin V.L., Lawes C.M., Bennett D.A., et al. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. Lancet Neurol., 2009, 8(4), 355-369.
3. Daily News: Health <http://www.nydailynews.com/life-style/health/young-people-strokes-study-article-1.1496754> (retrieved 09 January 2013).
4. Ministry of Health of RA. Health and health service, Armenia, 2012. Official collection of statistical and informational data. Republican informational-analytical center of health care of the National Institute of Health. Yerevan, 2001.
5. Murphy T.H., Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. Nat. Rev. Neurosci., 2009, 10(12), 861-872.
6. Cramer S.C., Nudo R.J. Brain repair after stroke. Cambridge University Press, UK, 2010
7. Ikram M.A., et al. Genomewide association studies of stroke, N Engl J. Med. 360 (2009) 1718-1728.
8. Wang X, et al.; RMS Stroke SNP Consortium. A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in 6 study populations: association of lymphotoxin-alpha in nonhypertensive patients. Stroke. 2009, 40 (3):683-695.
9. Cramer S.C., Nudo R.J. Brain repair after stroke, Cambridge University press, UK, 2010.
10. Kim DE, Noh SM, Jeong SW, Cha MH. NINJ2 SNP may affect the onset age of first-ever ischemic stroke without increasing silent cerebrovascular lesions. BMC Res Notes. 2012, 20; 5:155.
11. Kim Y.O., Kim S.Y., Yun D.H., Lee S.W. Association between ABCB1 polymorphisms and ischemic stroke in Korean population, ExpNeurobiol. 4 (2012) 164-171.
12. Qin L, Jing D, Parauda S, Carmel J, Ratan RR, Lee FS, Cho S. An adaptive role for BDNF Val66Met polymorphism in motor recovery in chronic stroke. J. Neurosci. 2014, 34 (7):2493-2502.
13. Fleischmann A., Hvalby O., Jensen V., Strekalova T., et al. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. J. Neurosci. 2003, 23 (27), 9116-9122.
14. Changiz T., Henry G S M., Ted Weita L., et al. Role of NMDA receptor-dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. J. Nature Medicine 15. 2009, 1399 – 1406.
15. T.N. Lin, J. Te, BS; H.C. Huang, S.I. Chi, DDS, C.Y. Hsu. Prolongation and Enhancement of Postischemic c-fos Expression after Fasting. J Stroke. 1997; 28: 412-418.
16. K. Kogure and H. Kato. Altered gene expression in cerebral ischemia J. Stroke., 1993, 24:2121-2127.
17. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 1988, 16, 1215.
18. Bunce M, O'Neil CM, Barnado MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). Tissue Antigens 1995; 46:355-367.
19. Lalouel JM, Rohrwasser A. Power and replication in case-control studies. Am J Hypertens 2002; 15: 201-205.

Ր **ԱՄՓՈՓՈՒՄ**

Առաջնային պատասխանի c-Fos գենի պոլիմորֆիզմը առցանցված է իշեմիկ կաթվացի հետ

Թադևոսյան Կ.Մ.

ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտը Հայ-Ռուսական (Սլավոնական) համալսարան

Ըստ ժամանակակից պատկերացումների, սինապտիկ պլաստիկությունը որոշիչ դեր է խաղում իշեմիկ կաթվացի (ԻԿ) զարգացման, ավարտի, ինչպես նաև դրանից հետո հիվանդների վերականգնման գործընթացներում: ԻԿ-ով հիվանդների մոտ սինապտիկ պլաստիկության խանգարումների մոլեկուլային մեխանիզմների ուսումնասիրությունները դեռևս գտնվում է իրենց զարգացման սկզբնական փուլում: Հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ ժառանգականորեն պայմանավորված գենետիկական փոփոխությունները սինապտիկ պլաստիկության հետ կապված սպիտակուցների գեներում կարող են ինդուցել ԻԿ-ի զարգացումը, ինչպես նաև պատասխանատու լինել ԻԿ-ից հետո ոչ լիարժեք ֆունկցիոնալ վերականգնման համար: Տրանսկրիպցիոն գործոնները մեծ ներդրում ունեն սինապտիկ պլաստիկության կարգավորման գործում: Առավել կարևոր տրանսկրիպցիոն գործոնների շարքին է պատկանում c-Fos-ը: Սակայն ԻԿ-ի ժամանակ վերը նշված տրանսկրիպցիոն գործոնի ֆունկցիոնալ ակտիվության վերաբերյալ տվյալներն այսօր գործնականում բացակայում են: Ելնելով վերը նշվածից, տվյալ նախագիծն ուղղված է գնահատելու ԻԿ-ի հնարավոր առնչությունը c-Fos տրանսկրիպցիոն գործոնի կողավորող գենի ֆունկցիոնալ պոլիմորֆիզմների հետ: Այդ նպատակով ԻԿ-ով հիվանդների և առողջ անձանց գենոմային ԴՆԹ-ի սնուշներում PCR-SSP մեթոդի կիրառմամբ ուսումնասիրվել է c-Fos rs7101 ֆունկցիոնալ եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմը: Ստացված արդյունքները բացահայտել են դրական առնչություն rs7101 FOS մուտանտ ալելի և ԻԿ-ի միջև:

Ր **RESUME**

Polymorphism of immediate early response gene c-Fos is associated with ischemic stroke

Tadevosyan K.M.

Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia

Russian-Armenian (Slavonic) University

According to modern concepts, synaptic plasticity plays a decisive role in ischemic stroke (IS) progression and outcome and recovery of patients after stroke. Molecular mechanisms of synaptic plasticity alterations in patients with IS are only beginning to be understood. Promising studies demonstrated that naturally occurring genetic alterations in genes, encoding synaptic plasticity-related proteins may influence both IS progression and poor functional recovery after ischemic stroke. Transcription factors make a great contribution in regulation of synaptic plasticity. Among the most important transcriptional factors is c-Fos. However, there is practically no data about its functional activities in ischemic stroke. Therefore, the main goal of the current project is to evaluate potential association of IS with functional polymorphisms of gene encoding transcriptional factors c-Fos. For this purpose, in genomic DNA samples of IS patients and healthy subjects functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) of c-Fos rs7101 were studied by PCR-SSP. The results obtained shown positive association of mutant allele of rs7101* T FOS with IS.