

Исследование ассоциации полиморфных вариантов rs1333040 и rs7865618 хромосомы 9p21 с развитием артериовенозных мальформаций

Эркинова С.А.^{1*}, Киселёв В.С.³, Стрельников Н.В.⁴, Орлов К.Ю.⁴,
Дубовой А.В.³, Воронина Е.Н.^{1,2}, Филипенко М.Л.^{1,2}

¹ — Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, медицинский факультет, Новосибирск, Россия;
* sarafrozerkinova@gmail.com

² — Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

³ — Федеральный центр нейрохирургии, Новосибирск, Россия

⁴ — Центр ангионеврологии и нейрохирургии НИИИПК им. академика Мешалкина Е.Н., Новосибирск, Россия

Цель: исследование ассоциации полиморфных вариантов rs1333040 гена *CDKN2B* и rs7865618 гена *CDKN2A* с развитием артериовенозных мальформаций (АВМ) у жителей Западно-Сибирского региона России. **Материалы и методы.** Обследован 191 пациент (124 мужчины и 67 женщины) с диагнозом АВМ головного мозга, подтвержденным МРТ и ЦАГ в клинических центрах г.Новосибирска. Контрольная группа состояла из 480 жителей г.Новосибирска без АВМ. Определение полиморфных вариантов генов проводилось методом ПЦР в режиме реального времени, с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. **Результаты.** Ассоциативный анализ выявил связь полиморфного локуса rs7865618 гена *CDKN2A* с развитием АВМ (OR = 1,915, CI = [1,158–3,167], p = 0,01). **Заключение.** Проведенное исследование продемонстрировало, что носительство генотипа GG полиморфного локуса rs7865618 гена *CDKN2A* ассоциировано с развитием АВМ у жителей России.

Ключевые слова: артериовенозные мальформации, ген, однонуклеотидный полиморфизм, сердечно-сосудистые поражения

Study of the association of polymorphic variants rs1333040 and rs7865618 chromosome 9p21 with the development of arteriovenous malformations

Erkinova S.A.^{1,2*}, Kiselyov V.S.³, Strelnikov N.V.⁴, Orlov K.Y.⁴,
Dubovoy A.V.³, Voronina E.N.^{1,2}, Filipenko M.L.^{1,2}

¹ — Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;
* sarafrozerkinova@gmail.com

² — Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ — Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russia

⁴ — Center angioneurology and neurosurgery named after Academician Meshalkin E.N.

The aim of this study was to investigate associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rs1333040 gene *CDKN2B* and rs7865618 gene *CDKN2A* and risk of BAVM in the residents of the West Siberian region. **Method:** The study included 191 patients (124 men and 67 women) with brain BAVM's, confirmed with Magnetic resonance imaging (MRI) and cerebral angiography (CAG) in the clinical centers in Novosibirsk. The control group consisted of 480 residents of Novosibirsk without BAVM. Determination of polymorphic variants of genes was performed by Real Time qPCR using TaqMan-competing probes. **Results:** We found that the rs7865618 gene *CDKN2A* is associated with brain arteriovenous malformation (OR = 1,915, CI = [1,158–3,167], p = 0,01). **Conclusion:** The study showed that the genotype of GG rs7865618 polymorphic locus in *CDKN2A* is associated with the risk of BAVM in the West Siberians.

Key words: arteriovenous malformations, gene, single nucleotide polymorphisms, cardiovascular disease

Введение

Церебральная артериовенозная мальформация (АВМ) — врожденная патология сосудистой системы головного мозга, заключающаяся в формировании патологических сообщений между артериями и венами, исключающая капиллярную сеть. Впервые была описана Люшка и Вирховым в середине XIX века. Главной отличительной особенностью ангиоархитектоники церебральных АВМ, среди прочих сосудистых патологий, является наличие артериовенозных шунтов, клубок которых образует тело (nidus) мальформации и расши-

ренных дренирующих вен. Нарушение формирования сосудов (ангиогенез) в центральной нервной системе происходит на 4—13 неделе эмбрионального развития. Заболевание может проявить себя в любом возрасте, однако наиболее часто страдают люди в возрасте от 20 до 40 лет.

Распространенность церебральных АВМ точно не известна; их встречаемость в популяции, согласно секционному данным, составляет 0,15%, ежегодная выявляемость находится в пределах между 0,14 и 0,8%, составляя среди взрослого населения примерно одну десятую от частоты внутричерепных аневризм [1, 5, 7].

В литературе описана ассоциация АВМ с известными системными генетическими нарушениями, например, болезнью Рандю—Ослера—Вебера или геморрагической телеангиэктазией (Hereditary hemorrhagic telangiectasia ННТ), факоматозным цереброфациальным артериовенозным метамерным синдромом (Phakomatosis cerebrofacial arteriovenous metameric syndrome CAMS) [10].

Причиной возникновения АВМ могут быть разнообразные факторы, инициирующие патологический процесс в области будущей мальформации. Это могут быть факторы внешней среды, стимулирующие ангиогенез, генетические факторы, ангиогенные факторы роста и воспалительные цитокины. Таким образом, представляется наиболее вероятным, что этиология АВМ мультифакториальна; иными словами, на риск возникновения АВМ оказывают влияние как генотип плода, так и воздействие факторов окружающей среды.

Локус хромосомы 9p21, выявленный в полногеномных исследованиях (GWAS), является важным генетическим маркером сердечно-сосудистых поражений и связан с развитием инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, поражением периферических артерий, абдоминальной аневризмой аорты, внутримозговой аневризмой и инсультом [3, 8, 9, 12]. Целью нашего исследования было изучение ассоциации полиморфных вариантов rs1333040 гена *CDKN2B* и rs7865618 гена *CDKN2A* на риск развития АВМ у жителей России.

Материалы и методы

В группу больных был включен 191 пациент с АВМ (124 мужчины и 67 женщины, средний возраст всех больных составлял $37,1 \pm 15,0$ лет) сосудистого отделения ФГБУ Федерального центра нейрохирургии г.Новосибирска и Нейрососудистого отделения центра ангионеврологии и нейрохирургии ННИИПК им. ак. Мешалкина Е.Н. г.Новосибирска. Средний возраст пациентов к периоду манифестации заболевания составлял $33,8 \pm 13,5$ года. Верификация диагноза проводилась на основании магнитно-резонансной томографии (МРТ) и селективной церебральной ангиографии (ЦАГ). На каждого пациента заполнялась специально разработанная анкета, включающая демографические данные (возраст, пол, национальность), медицинскую информацию (возраст дебюта, тип течения).

В контрольной группе были 480 чел. (199 мужчины и 281 женщины, средний возраст $33 \pm 11,1$ года) без сосудистых заболеваний. Молекулярно-генетическое исследование проводилось на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН. Были исследованы полиморфные варианты rs1333040 гена *CDKN2B* и rs7865618 гена *CDKN2A*.

Выделение ДНК из венозной крови проводили методом фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20°C .

Типирование полиморфных вариантов rs1333040 гена *CDKN2B* и rs7865618 гена *CDKN2A* проводили методом Real-time ПЦР с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов. Реакции амплификации проводили с помощью амплификатора CFX-96 (Bio-Rad, США). Каждый образец амплифицировался с использованием двух пар специфических праймеров и двух пар зондов (табл. 1), несущих «гаситель» на 3'-конце и флуоресцентный краситель на 5'-конце. Результаты интерпретировали исходя из анализа графиков накопления флуоресценции. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, смесь содержала 40—100 нг ДНК; 300 нМ каждого праймера; по 100—200 нМ TaqMan-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ-ные dNTP, амплификационный буфер, термостабильную Taq-полимеразу — 0,5 ед. акт./реакц.

Статистическая обработка данных. Соответствие частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга проверяли по критерию χ^2 . Вычисление проводили с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия). Адрес свободного доступа <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. В этом случае и при использовании других критериев нулевую гипотезу отвергали при $p \leq 0,05$. Силу ассоциации анализируемых признаков определяли по величине отношения шансов (OR). Для OR рассчитывали доверительный интервал (CI) при 95% уровне значимости.

Результаты исследования и обсуждение

Частоты встречаемости генотипов полиморфных локусов rs1333040 гена *CDKN2B* и rs7865618 гена *CDKN2A* представлены в табл. 2 и соответствуют закону Харди—Вайнберга во всех сформированных группах. Нами

Таблица 1

Структуры праймеров и зондов для генотипирования полиморфных вариантов rs1333040 гена *CDKN2B* и rs7865618 гена *CDKN2A*

Полиморфизм	Праймеры	Последовательность праймеров	Последовательность зондов
rs1333040	Прямой	5'-Agtgccaccttatggaatga-3'	5'-Rox-CAGCGGTAGCATTCTTACCT-BHQ-3
	Обратный	5'-CCACTGTTGTAGTATACCTTCTTACCA-3'	5'-Cy5-CAGCGGTAaCATTCTTACCTC-BHQ-3'
rs7865618	Прямой	5'-gttaggtttgctcttatggaaca-3'	5'-FAM-Cttcttaaaccagcatcatgg-BHQ-3'
	Обратный	5'-ATGCCCCACAAATACATTGA-3'	5'-R6G-cttcttaaaccggcatcatg-BHQ-3'

Частота генотипов в соответствии с распределением Харди—Вайнберга

Ген (SNP)	Хромосома	Группа	Число пациентов (частота, %)			Всего	HWE p
			GG	GA	AA		
CDKN2A rs7865618	9						
		ABM	12	51	37	191	p = 0,21 (Exact)
		Контроль	20	45	35	480	p = 0,09 (Exact)
CDKN2B rs1333040	9		ТТ	ТС	СС		
		ABM	32	43	24	191	p = 0,08 (Exact)
		Контроль	26	47	26	480	p = 0,22 (Exact)

Примечание. HWE p — уровень статистической значимости соответствия частот генотипов закону распределения Харди—Вайнберга (Hardy—Weinberg equilibrium)

были обнаружены статистически значимые различия встречаемости частот генотипов между группами больных АВМ и контроля. Для полиморфного варианта rs7865618 гена *CDKN2A* мы наблюдаем рецессивную модель наследования. Риск развития АВМ для пациентов с генотипом GG (OR = 1,915, CI = [1,158–3,167], p = 0,01) примерно в 2 раза выше, чем для пациентов с генотипами GA и AA. Для полиморфного локуса rs1333040 гена *CDKN2B* не было выявлено статистически значимых различий в исследованных группах (OR = 0,748, CI = [0,519–1,079], p = 0,12).

Полиморфные варианты rs1333040 гена *CDKN2B* и rs7865618 гена *CDKN2A* локализованы в районе антисмысловой РНК (ANRIL), кодируемой комплементарной цепью локуса *CDKN2A/B*. ANRIL экспрессируется эндотелиальными клетками сосудов, моноцитами и макрофагами, гладкомышечными клетками коронарных и атероматозных сосудов и осуществляет транскрипционную регуляцию экспрессии генов *CDKN2A* и *CDKN2B* [2].

Ген *CDKN2A/B* включен в регулирование клеточного цикла и влияет на физиологические процессы, такие, как старение, апоптоз, самообновление стволовых клеток и ремоделирование тканей.

Philipp S. Wild et al. при проведении полногеномного исследования по поиску ассоциаций полиморфных вариантов генов с сердечно-сосудистыми поражениями [4], показали ассоциацию данных полиморфных вариантов с риском развития сосудистых заболеваний (OR = 1,22, CI = [1,117–1,26], p = 0,0169). В исследовании C.L. Sturiale et al, состоящем из 206 пациентов с АВМ и 171 чел. в контроле [11], была найдена статистически значимая ассоциация между АВМ и генотипом ТТ и аллелем Т полиморфного локуса rs1333040 и генотипом GG и аллелем G полиморфного локуса rs7865618 среди пациентов Рима. Sturiale C.L. et al. также описали значительную ассоциацию между этими ‘опасными’ генотипами и аллелями и различными клиническими особенностями ангиоархитектоники АВМ, такими, как размер узла, наличие глу-

бокого венозного дренажа и кровоизлияний в головной мозг. Аллель Т полиморфного локуса rs1333040 гена *CDKN2B* ассоциирован с АВМ также среди американцев (OR = 1,43, CI = [0,98–2,08], p = 0,064) [13] и немцев (OR = 1,24, CI = [1,20–1,29] [6]).

Заключение

В данном исследовании анализировались ассоциации 2 полиморфных локусов в генах ингибиторов циклин зависимых киназ с риском развития АВМ у жителей Западно-Сибирского региона России. Выявлена ассоциация генотипа GG полиморфного варианта rs7865618 гена *CDKN2A* (OR = 1,915, CI = [1,158–3,167], p = 0,01) с увеличением риска сосудистых поражений. Нами не обнаружено статистически значимой ассоциации полиморфного варианта rs1333040 гена *CDKN2B* с риском АВМ.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Список литературы

- Jellinger K. Vascular malformations of the central nervous system: a morphological overview. *Neurosurg Rev.* 1986; 9(3):177-216.
- Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, et al. ANRIL, a long, non-coding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J.* 2011 Feb;25(2):444-8
- Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet.* 2010 May;42(5):420-5.
- Wild PS, Zeller T, Schillert A, et al. A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011 Aug 1;4(4):403-12.
- Valavanis A. The role of angiography in the evaluation of cerebral vascular malformations. *Neuroimaging Clin N Am.* 1996 Aug; 6(3):679-704.
- Hoppmann P, Erl A, Turk S, et al. No association of chromosome 9p21.3 variation with clinical and angiographic outcomes after placement of drug-eluting stents. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009 Nov;2(11):1149-55

7. Berenstein A, Ortiz R, Niimi Y, et al. Endovascular management of arteriovenous malformations and other intracranial arteriovenous shunts in neonates, infants, and children. *Childs Nerv Syst.* 2010 Oct;26(10):1345-58.

8. Koch W, Turk S, Erl A, et al. The chromosome 9p21 region and myocardial infarction in a European population. *Atherosclerosis.* 2011 Jul;217(1):220-6.

9. Sturiale CL, Fontanella MM, Gatto I, et al. Association between polymorphisms rs1333040 and rs7865618 of chromosome 9p21 and sporadic brain arteriovenous malformations. *Cerebrovasc Dis.* 2014;37(4):290-5

10. Rangel-Castilla L, Russin JJ, Martinez-Del-Campo E et al. Molecular and cellular biology of cerebral arteriovenous malformations:

a review of current concepts and future trends in treatment. *Neurosurg Focus.* 2014 Sep;37(3):E1

11. Sturiale CL, Gatto I, Puca A, et al. Association between the rs1333040 polymorphism on the chromosomal 9p21 locus and sporadic brain arteriovenous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84(9):1059-62.

12. Munir MS, Wang Z, Alahdab F, et al. The association of 9p21-3 locus with coronary atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2014 Jun 6;15:66.

13. Kremer PH, Koeleman BP, Pawlikowska L, et al. Evaluation of genetic risk loci for intracranial aneurysms in sporadic arteriovenous malformations of the brain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015 May;86(5):524-9.