

Львова О.А.^{1,2}, Косаченко А.И.¹, Буторова А.С.¹,
Сергеева М.В.³, Сергеев А.П.¹

Влияние комбинаций генетических полиморфизмов на вероятность возникновения инвалидности после перенесенного в детстве ишемического инсульта

1 – ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург. 2 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет Минздрава России», Екатеринбург. 3 – ФГБУН «Институт промышленной экологии» УрО РАН, Екатеринбург

Lvova O.A., Kosachenko A.I., Butorova A.S., Sergeeva M.V., Sergeev A.P.

The influence of combinations of genetic polymorphisms on the probability of disability after arterial ischemic stroke in childhood

Резюме

Разработан алгоритм, позволяющий оценить влияние комбинаций генетических полиморфизмов на исходы детских ишемических инсультов. Выборка составила 172 ребенка с ишемическим инсультом, доказанным по результатам МРТ головного мозга. В качестве предикторов были использованы данные генетических исследований на носительство полиморфизмов 8 генов тромбофильного спектра: FGB:-455G>A, F2:20210G>A, F5:1691G>A, F7:10976G>A, F13:103G>T, ITGA2:807C>T, ITGB3:1565T>C, PAI-1:-675 5G>4G, и 4 генов фолатного цикла: MTHFR:677C>T, MTHFR:1298A>C, MTRR:66A>G, MTR:2756A>G. Было установлено, что комбинации генетических полиморфизмов с ненулевыми значениями могут обладать как деструктивным, так и протективным свойством в отношении риска инвалидности.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, детский ишемический инсульт, исход, отношения шансов, точный критерий Фишера, фактор риска

Summary

An algorithm has been developed to evaluate how combinations of genetic polymorphisms affect the outcomes of pediatric ischemic strokes. Case series included 172 patients data base, all patients had MRI confirmation of stroke and signed concern form. Eight thrombophilic genes polymorphisms: FGB:-455G>A, F2:20210G>A, F5:1691G>A, F7:10976G>A, F13:103G>T, ITGA2:807C>T, ITGB3:1565T>C, PAI-1:-675 5G>4G, and four genes polymorphisms of folic acid enzymes: MTHFR:677C>T, MTHFR:1298A>C, MTRR:66A>G, MTR:2756A>G were established as feasible predictors. Combinations of genetic polymorphisms with nonzero values can have both effects: a destructive and a protective.

Key words: genetic polymorphism, pediatric arterial ischemic stroke, outcome, odds ratio, Fisher's exact test, risk factor

Введение

Детский ишемический инсульт (ИИ) – заболевание, приводящее к формированию тяжелых исходов: моторному и интеллектуальному дефициту, эпилепсии и другим дефицитарным состояниям [1]. Острые нарушения мозгового кровообращения являются одной из причин, определяющих высокий риск инвалидизации и смертности у детей [2]. Одной из наиболее частых причин ИИ в детском возрасте остается наследственная тромбофилия, а среди всех ее вариантов – носительство полиморфных генов и их комбинаций. Полиморфными принято называть гены, которые представлены в популяции несколькими разновидностями – аллелями, что обуславливает разнообразие признаков внутри вида. Наличие в популя-

ции множественных аллелей одного локуса называется генетическим полиморфизмом [3].

Генетический полиморфизм – разнообразие частот аллелей гомозигот. Различия между аллелями одного и того же гена, как правило, заключаются в незначительных вариациях его «генетического» кода.

В большинстве случаев факторы, которые могут быть расценены как очевидные предикторы инвалидности после перенесенного инсульта у детей, остаются неизвестными и специалисты ограничиваются только констатацией факта наступления органического поражения головного мозга и тяжелой неврологической симптоматики. Считают, что риск неврологического дефицита (в англоязычной литературе используется термин

Таблица 1 – Четырехпольная таблица, описывающая исходы перенесенного в детстве ишемического инсульта

Наличие комбинации генов	Есть инвалидность	Нет инвалидности
Комбинация есть	n11	n12
Комбинации нет	n21	n22

Примечание: n11 – количество пациентов с инвалидностью, у которых обнаружена проверяемая комбинация; n12 – количество пациентов без инвалидности, у которых обнаружена проверяемая комбинация; n21 – количество пациентов с инвалидностью, у которых не обнаружена проверяемая комбинация; n22 – количество пациентов без инвалидности, у которых не обнаружена проверяемая комбинация

«disability», эквивалентность которого русскоязычному понятию инвалидности может быть, как доказана, так и оспорена) напрямую связан с количеством факторов риска, приведших к болезни [8, 9, 10, 11], однако варианты исходов в остром периоде болезни остаются плохо предсказуемыми. Факторов риска, однозначно указывающих на вероятность развития инвалидности в исходе болезни у детей, нет.

Цель работы – выявить комбинации генетических полиморфизмов, которые статистически значимо связаны с исходами детских ишемических инсультов.

Материалы и методы

Выборка: 172 ребенка с доказанным ИИ в соответствии с критериями включения-исключения («девочки без инвалидности» – 30 человек, «девочки с инвалидностью» – 31 человек, «мальчики с инвалидностью» – 51 человек, «мальчики без инвалидности» – 60 человек).

Критерии включения в выборку: возраст испытуемых от 0 до 15 лет независимо от пола; диагноз острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу (I63.0-I64.9, G45.0-45.9 по МКБ-10) [4], подтвержденный по клиническим данным, результатам компьютерной томографии (КТ) и/или МРТ головного мозга; письменное информированное согласие родителей или их законных представителей на участие в исследовании.

Критерии исключения из выборки: возраст дебюта инсульта старше 15 лет; отсутствие точного диагноза острых нарушений мозгового кровообращения (дети на этапе дифференциальной диагностики); внутречерепные кровоизлияния любой этиологии; симметричные перивентрикулярные ишемические очаги, лейкомаляции и пери-, интравентрикулярные кровоизлияния как морфологический субстрат перинатального поражения центральной нервной системы (ЦНС); отказ пациентов и/или их родителей от обследования.

У всех детей была проведена оценка носительства полиморфизмов 12 генов: 8 тромбофильного спектра (FGB:-455G>A, F2:20210G>A, F5:1691G>A, F7:10976G>A, F13:103G>T, ITGA2:807C>T, ITGB3:1565T>C, PAI-1:-675 5G>4G) и 4 фолатного цикла (MTHFR:677C>T, MTHFR:1298A>C, MTRR:66A>G, MTR:2756A>G) в образцах крови методом полимеразной цепной реакции.

Спустя 4 и более лет после ИИ были определены исходы (инвалидность или отсутствие инвалидности). Статус инвалидности был оценен по критериям в соответствии с приказом от 29 сентября 2014 г. № 664н [5] (наличие справки серии МСЭ).

Исходные данные пациентов с данными об оценке носительства 12 вышеуказанных полиморфизмов генов и исходом перенесенного ИИ в виде таблицы MS Excel были анонимизированы. Отсутствие полиморфизма кодировалось 0, наличие полиморфизма в одной из аллелей генов – 1, наличие полиморфизма в двух аллелях – 2. Наличие или отсутствие инвалидности определялось значениями 1 и 0 соответственно.

Авторы разработали алгоритм, реализованный средствами языка VBA в среде MS Access для перебора всех возможных комбинаций генов.

На вход алгоритма поступали следующие данные: гены, участвующие в переборе; наличие или отсутствие инвалидности; количество сочетаний генов; уровень значимости.

Сначала генерировался список всевозможных комбинаций кодов для разного количества генов. Например, 2 генам соответствовало 8 их сочетаний (00, 01, 10, 11, 12, 20, 21, 22). Далее для каждого сочетания генов вычислялось количество их появлений в базе данных по принципу, представленному в таблице 1.

Далее для каждой четырехпольной таблицы рассчитывался точный критерий Фишера [6]. Если полученное значение было ниже заявленного уровня значимости (в нашем случае 0,1), то результат заносился в таблицу. Результирующая таблица содержала перечень всех возможных генетических комбинаций, а также 4 ячейки четырехпольной таблицы для каждого случая. Дальнейшее описание алгоритма представлено на примере комбинации генов FGB:-455G>A и F2:20210G>A.

Из всех возможных комбинаций количеств полиморфизмов (00, 01, 02, 10, 11, 12, 20, 21, 22) для выбранной комбинации генов (FGB:-455G>A & F2:20210G>A) бралась произвольная (00), чтобы противопоставить ее всем оставшимся (01, 02, 10, 11, 12, 20, 21, 22). Считалось, что сравниваемая комбинация (00) является «вредным» фактором.

Таким образом, при расчете отношения шансов условно «вредная» комбинация могла быть признана действительно вредной, если отношение шансов больше 1. В противном случае, если отношение шансов меньше 1, эта комбинация признавалась протективной.

Для уже составленных таблиц сопряженности признаков рассчитывались точный критерий Фишера, отношение шансов и доверительный интервал.

Таблица с вычислениями представлена на рисунке 1.

Genes_comb	CP	OsRCBU	OsR	OsRCBL	RRCBL	RRCBU	RR	Chi2
gf7vii	0,95	0,189604311	0,189604318	0,189604321249811	0,287500000005474	0,287499999999126	0,2875	21,7499515134362
gf7vii	0,95	0,025949305499139	2,354936708860786-02	2,35493684780762E-02	5,00000025259462E-02	4,999999747402539E-02	0,05	32,763252200684
gf13	0,95	0,394230762599542	0,394230761230769	0,394230775862376	0,5625000000005718	0,562499999999282	0,5625	20,2484501736999
gf13	0,95	0,613059391820974	0,613059405940594	0,613059420060234	0,7625000009907937	0,7624999999992603	0,7625	3,5312048388733
gf7GA	0,95	1,076898773000022	1,07689873417722	1,07689875835381	1,03750001137462	1,03749998842389	1,0375	6,113910699636709
gf7G & gf13	0,95	4,743420085048595-02	4,74342185263158E-02	4,74342125941719E-02	0,1250000023995719	0,1249999996004281	0,125	25,2480181802383
gf7G & gf7GA	0,95	0,336063545460311	0,336063571770492	0,336063581817872	0,500000000000887	0,499999991990113	0,5	12,5400015175650
gf7G & gf7G	0,95	0,161071424048317	0,161071428571429	0,161071433094341	0,275000005912086	0,274999994067915	0,275	22,3164819164619
gf2 & gf7vii	0,95	0,161071424048317	0,161071428571429	0,161071433094341	0,275000005912086	0,274999994067915	0,275	22,3164819164619
gf2 & gf7vii	0,95	0,025949305499139	2,354936708860786-02	2,35493684780762E-02	5,00000025259462E-02	4,999999747402539E-02	0,05	32,763252200684
gf2 & gf13	0,95	0,333008292730964	0,333008298755187	0,333008304779409	0,518750005769729	0,518749994230271	0,51875	28,0468578504616
gf2 & gf13	0,95	0,587133906890951	0,587133922330097	0,587133933769244	0,717500009742138	0,717499990217362	0,7175	4,2204694997780
gf2 & gf7GA	0,95	0,975602387736079	0,975602409638554	0,975602411241019	0,987500011290286	0,987499988709714	0,9875	1,2046048566648E-02
gf2 & gf7vii	0,95	0,161071424048317	0,161071428571429	0,161071433094341	0,275000005912086	0,274999994067915	0,275	22,3164819164619
gf2 & gf7vii	0,95	0,025949305499139	2,354936708860786-02	2,35493684780762E-02	5,00000025259462E-02	4,999999747402539E-02	0,05	32,763252200684
gf2 & gf13	0,95	0,347314043466827	0,347314049586777	0,347314055522784	0,512000005734846	0,511999994265304	0,512	24,1352829000013

Chi2Level	Chi2Corrected	Chi2CorrectedLevel	PLevelSide	FLevelLeft	FLevelRight	FLevelTable
1,55471465812977E-06	44,6366471906164	1,19253495967087E-11	4,6703092182684E-12	4,6703092182684E-12	0,999999999999234	1,90429381306611E-12
5,22060839003362E-09	90,4017857142857	0	6,0383891890496E-25	6,0383891890496E-25	1	5,88568395388714E-25
1,4015581882863E-06	31,0063115577889	1,28930880816072E-08	1,30178299821871E-08	1,30178299821871E-08	0,999999995772181	6,79001103514666E-09
3,021139940504354E-02	4,06836414370422	0,021846715477063	2,17583677341426E-02	2,17583677341426E-02	0,9875713069644	9,32967469854237E-03
0,367867587928078	4,93845977975079E-02	0,41206884027154	0,412090460499443	0,412090460499443	0,671603376402965	8,36987681404078E-02
3,19791729763708E-06	73,2461538461538	0	1,47084350276284E-19	1,47084350276284E-19	1	1,3748321032131E-19
1,94980790682695E-04	20,1308821529432	3,61925238001604E-06	3,14807959189447E-06	3,14807959189447E-06	0,999998989718271	2,113779786279683E-06
1,15746209474693E-06	46,4880761156027	4,63606930622973E-12	1,63764798686695E-12	1,63764798686695E-12	0,999999999999745	1,38247741412883E-12
1,15746209474693E-06	46,4880761156027	4,63606930622973E-12	1,63764798686695E-12	1,63764798686695E-12	0,999999999999745	1,38247741412883E-12
5,22060839003362E-09	90,4017857142857	0	6,0383891890496E-25	6,0383891890496E-25	1	5,88568395388714E-25
5,78468998982829E-07	38,0212757251646	1,49492768059179E-10	2,7281888066576E-10	2,7281888066576E-10	0,999999999999605	1,78889366951213E-10
1,99694851105013E-02	5,07960000388878	1,13852057942543E-02	1,23043270280366E-02	1,23043270280366E-02	0,991300375817092	5,60470286512839E-03
0,454300547068604	0	0,500000001729732	0,5	0,5	0,58792286665681	8,79228666568103E-02

Рисунок 1 – Полученные результаты

Результаты и обсуждение

Для удобства напомним, что в настоящей работе авторами было принято, что комбинация полиморфизмов признается вредной (повреждающей), если ее отношение шансов статистически значимо больше 1 (поле OsR на рисунке 1), в случае, если меньше 1 – протективными (защитным) фактором. Проведенные расчеты показали следующее.

По результатам, полученным в ходе математической обработки, наиболее изученные полиморфизмы генов F2:20210G>A и F5:1691G>A в «диком» варианте и гетерозиготный вариант MTHFR:677C>T оказались способны в определенных комбинациях с другими полиморфизмами прогнозировать как риск инвалидности в исходе детского ИИ (повреждающие комбинации), так и его отсутствие (протективные комбинации). Выявлены такие комбинации генов-кандидатов, носительство которых повышает риск инвалидности после перенесенного в детстве инсульта в два и более раз.

Заключение

Алгоритм, предложенный в исследовании, позволяет оценить, как комбинации полиморфизмов влияют на риск формирования инвалидизации у детей в отдаленном от инсульта периоде. В результате перебора всех возможных генетических комбинаций и построения статистической модели было установлено, что комбинации генетических полиморфизмов с ненулевыми значениями могут обладать как высоким рисковым, так и протективным значением.

Ограничение метода

В связи с тем, что детские ишемические инсульты являются редким заболеванием, необходимо применять наиболее точные и надежные методы формирования вы-

борки, такие как метод «копи-пар». Метод «копи-пар» требует абсолютно точно подобранной контрольной группы. В основе него лежит подбор для каждой единицы наблюдения опытной группы одинаковой по 2-3 признакам единицы наблюдения в контрольной группе. Чем больше известных признаков будут одинаковыми или близкими в парных наблюдениях, тем нагляднее проявится влияние изучаемого признака.

Авторы признают, что полученная для расчетов выборка использована «как есть», и в этом смысле она не является случайной. Кроме того, авторы отдают себе отчет в том, что около 30% испытуемых из выборки исключаются в связи с их выходом из процесса динамического наблюдения. Почти во всех лонгитюдных исследованиях некоторые члены исходной группы выбывают с течением времени из исследования. Если такие изменения в составе выборки значительны, они могут повлиять на достоверность выводов [6].

Медицинская статистика позволяет изучить количественную сторону массовых явлений в неразрывной связи с их качественной стороной. Современные статистические методы, такие как точный критерий Фишера и скорректированный хи-квадрат, позволяют изучать взаимосвязь определенных фактора и исхода.

Критерий хи-квадрат Пирсона, который применяется традиционно, является асимптотическим и не дает точные результаты. Также его асимптотические свойства проявляются только в случае довольно большой выборки и не слишком искаженной таблицы сопряженности признаков. Метод критерия хи-квадрат легко программно реализовать в любом приложении (например, в MS Excel).

Точный критерий Фишера в основном применяется для сравнения малых выборок, поскольку вычисления критерия довольно громоздки и могут занимать много времени или требовать мощных вычислительных

Таблица 2 – Генетические комбинации

Комбинация генов	Комбинация количества полиморфных аллелей	Отношение шансов	Односторонний р-уровень точного критерия Фишера	Эффект
F2 & F5 & F13	001	0,45	0,0133	Протективный
F5 & MTHFR:677C>T & MTHFR:1298A>C	010	0,47	0,0365	Протективный
F2 & MTHFR:677C>T & MTHFR:1298A>C	010	0,47	0,0365	Протективный
F2 & F7 & ITGA & MTR	0010	0,47	0,0365	Протективный
F5 & ITGB & MTHFR677CT	001	0,47	0,0297	Протективный
F5 & F13	01	0,48	0,0207	Протективный
ITGA & ITGB	10	0,49	0,0269	Протективный
F2 & F5 & F7 & F13	0001	0,49	0,0342	Протективный
F2 & F5 & ITGB & MTHFR:677C>T	0001	0,50	0,0427	Протективный
F7 & ITGA & ITGB	010	0,50	0,0427	Протективный
F2 & F5 & F13 & MTRR	0001	2,15	0,0285	Повреждающий
F13 & PAI-1	01	2,21	0,0267	Повреждающий
MTR	1	2,25	0,0090	Повреждающий
F5 & MTR	01	2,28	0,0087	Повреждающий
F2 & F7 & MTR	001	2,45	0,0069	Повреждающий
F2 & F5 & F7 & MTR	0001	2,55	0,0061	Повреждающий
F7 & MTR	01	2,71	0,0027	Повреждающий
F5 & F7 & MTR	001	2,83	0,0023	Повреждающий
F2 & F13 & MTR	001	2,91	0,0029	Повреждающий
F13 & MTR	01	3,07	0,0017	Повреждающий

Примечание: F2 – вариант гена F2:20210G>A, F5 – вариант гена F5:1691G>A, F7 – вариант гена F7:10976G>A, F13 – вариант гена F13:103G>T, MTR – вариант гена MTR:2756A>G, MTRR – вариант гена MTRR:66A>G, PAI-1 – вариант гена PAI-1:675 5G>4G, ITGB – вариант гена ITGB3:1565T>C, ITGA – вариант гена ITGA2:807C>T

ресурсов. В связи с тем, что точный критерий Фишера не является асимптотическим, результаты его использования отличаются точностью, что позволяет применять его в исследованиях с небольшим числом наблюдений. Именно поэтому авторами был выбран точный критерий Фишера для оценки статистической значимости связи фактора и исхода.

Но есть трудность в программной реализации критерия Фишера: из-за факториального выражения критерия значение вероятности достигает больших величин, что вызывает переполнение в памяти машины. Поэтому прямой расчет по формуле 1 невозможен. Также при переборе большого числа генов строится множество четырехпольных таблиц, по которым производится расчет критерия Фишера. Такие программные пакеты как Statistica могут работать только с одной таблицей в один

момент времени, в связи с чем было принято решение обрабатывать и рассчитывать данные в среде MS Access.■

Львова Ольга Александровна (Lvova Olga Aleksandrovna) – д.м.н., доцент кафедры психиатрии, психотерапии и наркологии ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Екатеринбург; ведущий научный сотрудник лаборатории нейротехнологий Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург. Косаченко Александра Ильинична (Kosachenko Aleksandra Puinichna) – младший научный сотрудник лаборатории нейротехнологий Департамента психологии Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина г. Екатеринбург. Буторова Анастасия Сергеев-

на (*Vitorova Anastasia Sergeevna*) – младший научный сотрудник лаборатории нейротехнологий Департамента психологии Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина г. Екатеринбург. **Сергеева Марина Викторовна** (*Sergeeva Marina Viktorovna*) – научный сотрудник ФГБУН «Институт промышленной экологии Уральского отделения Российской академии наук», г. Екатеринбург. **Сергеев Алек-**

сандр Петрович (*Sergeev Aleksandr Petrovich*) – к.ф.-м.н., доцент Департамента информационных технологий и автоматики ИРИТ-РТФ Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина г. Екатеринбург. Автор, ответственный за переписку: Львова Ольга Александровна, адрес для переписки: 620014, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3, телефон +7 9222 093259, e-mail: olvova@bk.ru

Литература:

1. Рахматова А.Ю., Косаченко А.И., Москалева А.С., Львова О.А., Сергеева М.В., Сергеев А.П. Точность методов Случайный лес и Многослойный перцептрон в задаче прогнозирования исходов детских ишемических инсультов. *Уральский медицинский журнал*. 2017; 10 (154): 58-62.
2. Испулаева С.Х., Жетписбаев Г.А., Пушкарев К.А., Байгоджаева А.К., Бисенбаева Н.Б., Жакупова А.В. И др. Особенности структуры и клинико-диагностических аспектов ишемических инсультов у детей. *Молодой ученый*. 2015; №9: 404-8.
3. Майборода А.А. Генетический полиморфизм: теория и практика. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2014; 131 (8): 125-129.
4. Всемирная Организация Здравоохранения. *Международная Классификация Болезней 10-го пересмотра*. 1990.
5. Приказ Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 29 сентября 2014 г. № 664н г. Москва "О классификациях и критериях, используемых при осуществлении медико-социальной экспертизы граждан федеральными государственными учреждениями медико-социальной экспертизы". Электронный ресурс, режим доступа: <https://rg.ru/2014/12/12/mintrud-dok.html>.
6. Кендалл М., Стюарт А. Том 2. *Статистические выводы и связи*. М.: Наука; 1973.
7. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. *Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины*. М., Медиа Сфера; 1998.
8. Tham E.H., Tay S.K., Low P.S. Factors predictive of outcome in childhood stroke in an Asian population. *Ann. Acad. Med. Singapore*. 2009; 38(10): 876-81.
9. Khong T. Placental vascular development and neonatal outcome. *Seminars in Neonatology*. 2004; 9(4): 255-63.
10. Launthier S., Carmant L., David M. Stroke in children: The coexistence of multiple risk factors predicts poor outcome. *Neurology*. 2000; 54: 371-8.
11. Delsing B.J., Catsman-Berreoets C.E., Appel I.M. Early prognostic indicators of outcome in ischemic childhood stroke. *Pediatr. Neurol*. 2001; 24(4): 2839.