

Анисимова А.В.¹, Гунченко А.С.¹, Авдонина М.А.², Иконникова А.Ю.², Наседкина Т.В.²

Изучение влияния клиничко-генетических факторов на прогрессивность течения хронической ишемии головного мозга

1 - ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова (кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета), ГКБ №1 им. Н.И. Пирогова; 2 - Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук, Москва

Anisimova A.V., Gunchenko A.S., Avdonina M.A., Ikonnikova A.U., Nasedkina T.V.

Study of the effect of clinical and genetic factors on progredient current of chronic cerebral ischemia

Резюме

С целью выявления характерных клиничко-генетических предикторов, обуславливающих прогрессивность течения хронической ишемии головного мозга, обследован 81 пациент с диагнозом хроническая ишемия головного мозга, из которых 60% составили женщины, а 40% мужчины в возрасте 55±30 лет. У пациентов с хронической ишемией мозга исследован полиморфизм генов ACE, SERPINE1, FGB, F5, F7, F12, GP1BA, GPIIIa, MTHFR, CYP11B2, PON1, PON2, NOS2, NOS3, PDE4D, HIF1a, LTA, ALOX5AP, TUB. Процедура генотипирования включала амплификацию выбранных последовательностей генов и последующую гибридизацию флуоресцентно меченных участков с аллель-специфичными ДНК-зондами, иммобилизованными на биочипе. Анализ результатов генотипирования с применением кластерного анализа позволил выделить группы пациентов с различным клиничским течением заболевания. В группе пациентов с более частым развитием быстрого прогрессивного течения гипертонической болезни (ГБ) выявлена повышенная частота генотипа Т/Т гена PDE4D (rs966221). Дальнейший анализ показал ассоциацию генотипа Т/Т с быстрым прогрессивным течением ГБ в общей выборке пациентов с хронической ишемией мозга (ОШ=6,22; ДИ=1,86-20,79; p=0,0036).

Ключевые слова: прогрессивность, хроническая ишемия мозга, кластерный анализ

Summary

In order to identify specific and genetic predictors associated with progredient chronic cerebrovascular disease 81 patients of whom 60% were women and 40% of men, aged 55+30 years, have been examined. The polymorphisms in following genes were analyzed: ACE, SERPINE1, FGB, F5, F7, F12, GP1BA, GPIIIa, MTHFR, CYP11B2, PON1, PON2, NOS2, NOS3, PDE4D, HIF1a, LTA, ALOX5AP, TUB. The genotyping procedure included the amplification of selected gene sequences and subsequent hybridization of fluorescently labeled amplicons with allele-specific DNA probes immobilized on the biochip. Analysis of genotyping results using cluster analysis identified two groups of patients with different clinical course of the disease. In the group of patients with more frequent development of progressive hypertension a higher frequency of genotype T/T of PDE4D gene (rs966221) was revealed. Further analysis showed direct association of T/T genotype with progressive hypertension in total sample of patients with chronic ischemia (OR=6,22; CI=1,86-20,79; p=0,0036).

Keywords: progredient, chronic brain ischemia, cluster analysis, genetic polymorphis

Введение

Цереброваскулярные заболевания представляют собой одну из важнейших проблем клинической неврологии. На протяжении последних 25 - 30 лет во всем мире ведется активное изучение механизмов развития цереброваскулярных заболеваний и поиск эффективных методов их профилактики и лечения. Хроническая ишемия головного мозга по распространенности занимает ведущее место в структуре цереброваскулярных заболе-

ваний [1,2,3,4]. В последнее десятилетие отмечается тенденция к расширению возрастного диапазона, быстрому прогрессированию, прогрессивному характеру течения и развитию тяжелых осложнений в виде ишемического инсульта, сосудистого паркинсонизма, эпилепсии, деменции сосудистого генеза. По показателям смертности церебральный инсульт занимает 2-е место после ишемической болезни сердца и опережает онкологические заболевания. Половина всех инсультов приходится на

трудоспособный возраст и лишь около 20% выживших больных могут вернуться к прежней работе.

В большинстве случаев сосудистое поражение головного мозга является мультифакториальным, современные представления о гетерогенности сосудистых поражений мозга подразумевают изучение различных звеньев патогенеза, т.е. его предикторами являются сочетание множества факторов риска, нередко с малой степенью их индивидуального проявления. В том числе, в качестве факторов риска рассматривают полиморфные маркеры в генах, участвующих в формировании цереброваскулярной патологии (гены ренин-ангиотензиновой системы, гены системы гемостаза, гены, регулирующие функцию эндотелия и метаболизм липидов, гены программированной клеточной смерти). Многочисленные исследования позволили выделить целый ряд генов-кандидатов, вовлеченных в патогенез ишемии мозга, однако выявить определенные полиморфные варианты генов либо генные мутации, определяющие характер течения хронической ишемии головного мозга, до сих пор не удалось. В последнее время большое внимание было уделено изучению патологических состояний на молекулярном и генетическом уровнях, проведены многочисленные исследования реологических свойств крови, что существенно расширило возможности выявления новых ранних механизмов патоморфогенеза. Дальнейшие исследования позволят прогнозировать клинические проявления заболевания, характер течения, а также разработать основные принципы своевременного дифференцированного лечения и первичной профилактики прогрессирования хронической ишемии мозга [5,6,7,8,9,10].

Основной целью настоящей работы является исследование роли полиморфных маркеров в выбранных генах-кандидатах (ACE, SERPINE1, FGB, F5, F7, F12, GP1BA, GPIIa, MTHFR, CYP11B2, PON1, PON2, NOS2, NOS3, PDE4D, HIF1a, LTA, ALOX5AP, TUB) в прогностичности течения дисциркуляторной энцефалопатии. Выявление факторов риска развития сосудистых нарушений головного мозга позволит разрабатывать профилактические мероприятия, направленные на снижение частоты осложнений, в частности, ишемического инсульта в группах больных с хронической ишемией головного мозга.

Материалы и методы

Пациентов с хронической ишемией головного мозга исследовали на кафедре неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова на базе ГКБ №1 им. Н.И.Пирогова (81 человек, средний возраст 55±30 лет, женщины 60%, мужчины 40%).

Проводился сбор анамнестических данных, оценка неврологического статуса-поражение черепно-мозговых нервов, нарушение в когнитивной сфере, вестибулярная и мозжечковая симптоматика, клинические проявления нарушения деятельности вегетативной нервной системы, контроль за цифрами артериального давления, данные наследственной отягощенности пациентов

по инсульту, начало развития гипертонической болезни, характер течения заболевания, сопутствующие заболевания, наличие инфарктов, инсультов в анамнезе, преобладающие клинические проявления хронической ишемии мозга, наличие уровня стресса (оценивался по шкале организационного стресса Маклина), в некоторых случаях МРТ головного мозга. Проводили забор крови для дальнейшего исследования генетического риска развития сосудистой катастрофы и прогностичности течения хронического нарушения мозгового кровообращения.

Молекулярно-генетическое исследование было выполнено на базе Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН. ДНК выделяли из крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Для наработки фрагментов ДНК использовали двухэтапную мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Первый этап ПЦР проводили для получения ПЦР-продукта с геномной ДНК с использованием набора «Амплификация ДНК с Таq полимеразой» («Силекс», Россия) согласно протоколу. На втором этапе проводили асимметричную ПЦР с добавлением флуоресцентного меченного дезоксирибонуклеотидтрифосфата Су5-дУТФ. Полученные флуоресцентные меченые продукты использовали для гибридизации на биологическом микрочипе. Биочип предназначен для определения 21 полиморфизма в следующих генах: ACE (rs1799752), FGB (rs1800790), F5 (rs6025), F7 (rs6046), F12 (rs1801020), GP1BA (rs2243093), GPIIa (rs5918), SERPINE1 (rs1799768), MTHFR (rs1801133), CYP11B2 (rs1799998), PON1 (rs662), PON2 (rs1801282), NOS2 (rs2297518), NOS3 (rs1799983), PDE4D (rs966221, rs2910829), HIF1a (rs11549465, rs11549467), LTA (rs909253), ALOX5AP (rs4769874), TUB (rs 4578424).

Для обработки данных использовали программу STATISTICA 6.0, позволяющую применить многомерный статистический метод - кластерный анализ. Также проводили двусторонний точный тест Фишера с использованием интерактивной таблицы сопряженности и вычисляли значения ОШ (отношение шансов) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ). Критический уровень статистической значимости p принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При анализе клинической картины исследуемой группы 59 человек (73%) страдают гипертонической болезнью, из них кризовое течение болезни отмечается у 8 (14%), медленно прогрессирующее у 42 (71%), быстро прогрессирующее течение у 9 (15%) пациентов (таблица 2). Пониженные цифры артериального давления определены у 10 (12%) исследуемых, 14 человек (17%) не отмечали ранее эпизодов подъема АД. Наличие состояния стресса и тревожности отмечают 35 (43%) человек, из них 28 страдают ГБ. Постоянно курят никотин 9 (11%) пациентов, страдают сахарным диабетом 2 типа 10 (12%) человек. При тщательном сборе анамнестических данных 14 (17%) пациентов отмечают наличие перенесенных инсульта и инфаркта у ближайших родственников (таблица 3). Хроническая ишемия головного мозга 1 и 2 степени отмечена в 32 и в 34 случаях соответственно.

Таблица 1 Распределение генотипов генов в группе пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Ген	<i>FGF</i>	<i>F5</i>	<i>F7</i>	<i>F12</i>	<i>PAI-1</i>	<i>GP1b</i>	<i>GP1bA</i>							
SNP-ID	rs1800790	rs6025	rs6046	rs1801020	rs1799768	rs2243093	rs5918							
генотип (n)	G/G	42	G/G	76	G/G	58	C/C	34	4G/4G	25	T/T	71	T/T	53
	G/A	36	G/A	5	G/A	21	C/T	35	4G/5G	42	T/C	9	T/C	23
	A/A	3	A/A	0	A/A	2	T/T	12	5G/5G	14	C/C	1	C/C	5
Ген	<i>GP1b2</i>	<i>MTHFR</i>	<i>PON1</i>	<i>PON2</i>	<i>NOS</i>	<i>NOS3</i>	<i>LTA</i>							
SNP-ID	rs1799998	rs1801133	rs662	rs1801282	rs2297518	rs1799983	rs909253							
генотип (n)	T/T	22	C/C	48	A/A	47	C/C	42	C/C	51	G/G	46	A/A	37
	T/C	36	C/T	27	A/G	30	C/G	32	C/T	28	G/T	29	A/G	38
	C/C	23	T/T	6	G/G	4	G/G	7	T/T	2	T/T	6	G/G	6
Ген	<i>FDEAD</i>	<i>PDE4D</i>	<i>HIF1a</i>	<i>HIF1a</i>	<i>ALOX</i>	<i>TUB</i>	<i>SERPIN 1</i>							
SNP-ID	rs966221	rs2910829	rs11549465	rs11549467	rs4769874	rs4578424	rs1799752							
генотип (n)	C/C	38	C/C	17	C/C	65	G/G	78	G/G	70	G/G	42	L/L	21
	C/T	27	C/T	35	C/T	16	G/A	3	G/A	11	G/A	28	L/D	41
	T/T	16	T/T	29	T/T	0	A/A	0	A/A	0	A/A	11	D/D	18

Таблица 2 Сравнение групп пациентов с хронической ишемией головного мозга по характеру течения гипертонической болезни

Характер течения гипертонической болезни	Группа 1 (чел/%)	Группа 2 (чел/%)
Кризовое	4/9	4/11
Медленное прогрессирующее	25/56	17/47
Быстрое прогрессирующее	1/2	8/22

Таблица 3 Сравнение групп по факторам риска развития хронической ишемии головного мозга

	Группа 1 (чел/%)	Группа 2 (чел/%)
Стресс	20/44	15/42
Курение	6/16	3/6
Злоупотребление алкоголем	0/0	2/3
Сахарный диабет	7/16	3/6
Ожирение	8/18	2/6
Наследственность	10/20	4/11
Гипертоническая болезнь	28/62	26/75

Таблица 4 Сравнение групп пациентов с хронической ишемией головного мозга по клиническим симптомам

	Группа 1 (%)	Группа 2 (%)
Всего	45	36
Астеноневротический синдром	27	22
Тревожнодепрессивный синдром	29	31
Когнитивные нарушения	24	28
Цефалгический синдром	29	31
Вестибулопатия	24	31
Нарушения сна	20	25
Нарушение памяти	16	31
Эмоциональная лабильность	20	11
Вегетативная недостаточность (симптомно-адреналовый тип)	13	39
Синкопы	4	11

Результаты генотипирования пациентов с хронической ишемией головного мозга представлены в таблице 1.

Далее данные были обработаны с использованием иерархического кластерного анализа. Пациенты с хроническим нарушением мозгового кровообращения образовали две группы, в каждую из которых были объединены

пациенты с определенными сочетаниями аллелей исследованных генов. В первую группу вошло 45 пациентов, во вторую - 36.

При анализе клинических картин пациентов двух групп можно отметить, что доля пациентов, страдающих гипертонической болезнью, составляет 62% и 75% соот-

ветственно. В группе 1 чаще регистрируются ожирение (18%).

Анализ клинических симптомов (таблица 4) показал, что в группе 2 чаще регистрируются мигрень (25%), но различия не достигли статистической значимости, вероятно, из-за малой выборки.

При сравнении двух групп по характеру течения заболевания выявлено, что преобладающее количество пациентов в обеих группах имеют медленное прогрессирующее течение ГБ 56% и 47%. Однако в группе 2 быстрое прогрессирующее течение ГБ имеют 22% пациентов по сравнению с 2% в группе 1, различия являются статистически значимыми ($p < 0,05$). Также в группе 2 отмечается несколько большее количество больных с кризовым течением ГБ- 11% против 9%.

В группе 2 отмечается преобладание 2 ст. хронической ишемии мозга -53%, тогда как в группе 1 преобладает хроническая ишемия головного мозга 1 ст. - 44%, различия статистически не значимы.

Также был проведен анализ распределения генотипов для каждого из исследуемых полиморфных участков генов в двух группах больных. Статистически значимых различий в частоте встречаемости генотипов генов ACE, SERPINE1, FGB, F5, F7, F12, GPIBA, GPIIIa, MTHFR, CYP11B2, PON1, PON2, NOS2, NOS3, HIF1a, LTA, ALOX5AP, TUB в двух группах пациентов выявлено не было. При анализе распределения генотипов гена PDE4D были выявлены различия для SNP83 C>T (rs966221). Так генотип C/C чаще выявлялись у пациентов группы 1 (68% против 19%), в то время как генотип T/T чаще встречался у пациентов группы 2 (42% против 2%), различия статистически достоверны ($p = 0,0001$) (рис. 4). Так как для группы 2 характерно быстрое прогрессирующее течение ГБ, можно предположить, что генотип T/T является фактором риска прогрессивного развития ГБ. Для проверки этого предположения провели сравнительный анализ генотипов гена PDE4D у пациентов с быстрым или кризовым течением и пациентов с медленным течением или отсутствием заболевания в общей выборке пациентов с хронической ишемией мозга. Генотип T/T чаще встречался у пациентов с прогрессирующим течением ГБ (8/17) по сравнению с пациентами с медленным течением ГБ или гипо- и нормотонией (8/56) в общей выборке (81 пациент). Разница статистически достоверна (ОШ=6,22; ДИ=1,86-20,79; $p = 0,0036$).

В нашем исследовании проведено генотипирование 81 пациента с хронической цереброваскулярной недостаточностью на наличие полиморфных маркеров в генах ACE (rs1799752), FGB (rs1800790), F5 (rs6025), F7 (rs6046), F12 (rs1801020), GPIBA (rs2243093), GPIIIa (rs5918), SERPINE1 (rs1799768), MTHFR (rs1801133), CYP11B2 (rs1799998), PON1 (rs662), PON2 (rs1801282), NOS2 (rs2297518), NOS3 (rs1799983), PDE4D (rs966221, rs2910829), HIF1a (rs11549465, rs11549467), LTA (rs909253), ALOX5AP (rs4769874), TUB (rs 4578424). По подобию генотипов с использованием кластерного анализа были сформированы две группы пациентов и проведено сравнение клинических особенностей каждой группы.

PDE4D (rs966221)

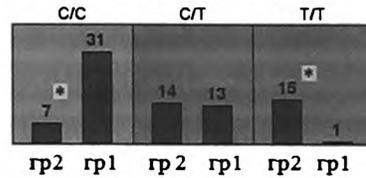


Рис.1 Распределение генотипов гена PDE4D в двух группах пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Течение гипертонической болезни в группе 1 характеризуется медленным прогрессирующим течением, преимущественно сопровождается дисметаболическими нарушениями. В группе 2 течение гипертонической болезни носит быстрый прогрессивный и кризовый характер, сопровождается церебральным атеросклерозом и общемозговыми симптомами. Таким образом, две группы пациентов, сформированных на основе многопараметрического анализа генотипов, отличаются характером течения заболевания, а именно, типом прогрессивного течения ГБ, как одного из главных факторов риска ишемического инсульта.

Детальный анализ распределения генотипов исследуемых полиморфных участков генов в двух группах больных, выявил различия в частоте встречаемости генотипов для SNP83C>T гена PDE4D (рис. 4). Это позволило предположить, что наличие генотипа T/T может способствовать прогрессивности течения ГБ. Исследование ассоциации между генотипом T/T и фенотипом прогрессивного течения ГБ в общей выборке пациентов с хронической ишемией мозга подтвердило это предположение. Генотип T/T достоверно чаще встречался у пациентов с прогрессирующим течением ГБ (ОШ=6,22; ДИ=1,86-20,79; $p = 0,0036$). Это позволяет рассматривать генотип T/T SNP83C>T гена PDE4D в качестве фактора риска прогрессивного течения ГБ, а также хронической ишемии мозга, в целом, так как гипертоническая болезнь является одним из главных факторов риска развития ишемии мозга.

Ген PDE4D кодирует фосфодиэстеразу, фермент, относящийся к семейству металлофосфоидролаз, которые регулируют внутриклеточное соотношение циклических аденозинмонофосфата (цАМФ) и гуанозинмонофосфата (цГМФ) за счёт их расщепления до 5'-монофосфатного нуклеотида. Повышение внутриклеточного уровня цАМФ увеличивает электрическое сопротивление эндотелия путем стабилизации межклеточных контактов, за счет этого уменьшается проницаемость гематоэнцефалического барьера [12]. Показано, что ген PDE4D экспрессируется во многих типах клеток и тканей различных органов, включая мозг, легкие, почки, моноциты, В- и Т-лимфоциты и сосудистые гладкомышечные клетки, а также активированные макрофаги [13]. Белок PDE4D принимает участие в процессах воспаления при атерогенезе и может приводить к нестабильности атеросклеротической бляшки [14].

Таким образом, уровень ферментативной активности PDE4D может играть важную роль в формировании риска развития сосудистых заболеваний головного мозга посредством участия белкового продукта в воспалении, формировании физиологического ответа на повреждение сосудов, ангиогенезе. В ряде исследований была установлена прямая зависимость SNP83 (rs966221) гена PDE4D с различными формами инсульта [15,16].

Заключение

Таким образом, в ходе данного исследования проведен анализ характера течения хронической ишемии мозга, который определяется особенностями клинических проявлений таких как цефалгии, вестибулопатии, когнитивно-мнестические нарушения, вегетативная недостаточность, астеноневротический и тревожнодепрессивный синдром, и совокупностью факторов риска развития заболевания таких как артериальная гипертензия и характер ее течения, избыточный вес, курение, сахарный диабет, отягощенная наследственность по инсульту, воздействие стресса. Проведен анализ частоты встречаемости генотипов генов ACE, SERPINE1, FGB, F5, F7, F12, GPIIbA, GPIIIa, MTHFR, CYP11B2, PON1, PON2, NOS2, NOS3, PDE4D, HIF1a, LTA, ALOX5AP, TUB. На основе многопараметрического анализа выделены две группы

пациентов, различающихся по характеру течения гипертонической болезни. Анализ частот генотипов отдельных генов в группах и в общей выборке выявил ассоциацию полиморфизма SNP83>T гена PDE4D с риском развития прогрессивного течения гипертонической болезни.■

Анисимова А.В., профессор, д.м.н., ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета, ГКБ №1 им. Н.И. Пирогова, Москва; Гунченко А.С., аспирант, ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета, ГКБ №1 им. Н.И. Пирогова, Москва; Авдонина М.А., научный сотрудник, Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгарта Российской академии наук, Москва; Иконникова А.Ю., младший научный сотрудник, Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгарта Российской академии наук, Москва, Наседкина Т.В., профессор д.б.н., Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгарта Российской академии наук, Москва. Автор, ответственный за переписку - Анисимова А.В., 111401 г. Москва, улица 2-я Владимирская, дом 29, кв.52, тел. +7 903 725-12-77, e-mail: gssh@mail.ru.

Литература:

1. Скворцова В.И., Лимборская С.А., Кольцова Е.А., Сломинский П.А. Полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента у больных с ишемической болезнью головного мозга. Журнал неврологии и психиатрия им С.С. Корсакова 2001; (прил.3): 21-7.
2. Левин О.С. Дисциркуляторная энцефалопатия: от патогенеза к лечению Журнал трудный пациент 2010; №4: 1-52
3. Котова О.В. Хронические нарушения мозгового кровообращения. Изд. ФАРМАТЕКА 2010; Актуальные обзоры № 15: 46-50.
4. Анисимова А.В. Ранние стадии хронической ишемии головного мозга. Автореферат 2004; 1-45
5. Табеева Г.Р., Азимова Ю.Э. Цереброваскулярные расстройства в пожилом возрасте. Журнал Практическая Медицина 2010; 1-56
6. Дамулин И. В., Парфёнов В.А., Скоромец А.А., Яхно Н.Н. Нарушения кровообращения в головном и спинном мозге. Болезни нервной системы. Руководство для врачей 2003; Медицина: 231-302.
7. Страмбовская Н. Н. Частота генетического полиморфизма некоторых ростковых факторов у больных хронической ишемией мозга. Дальневосточный медицинский журнал 2014; 49-52
8. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина. 2000.
9. Ч.П.Ворлоу, М.С.Деннис, Ж. Ван Гейн, Г.Ж.Жанкий, П.А.Г. Сандеркок, Ж.М.Бамфорд, Ж.Вордлау, перевод под ред. А.А.Скоромца. Инсульт: практическое руководство для введения больных 1998; С-П.
10. Калашикова Л.А. под ред. З.А.Суслиной. М. Очерки ангионеврологии 2005; 277-288
11. Маниатис Т, Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование фенол-хлороформной экстракции. Изд. Мир 1984.
12. Folcik VA, Smith T, O'Bryant S, Kawczak JA, Zhu B, Sakurai H, Kajiwara A, Staddon JM, Glabinski A, Chernosky AL, Tani M, Johnson JM, Tuohy YK, Rubin LL, Ransohoff RM. Treatment with BBB022A or rolipram stabilizes the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis: an additional mechanism for the therapeutic effect of type IV phosphodiesterase inhibitors. J Neuroimmunol. 1999; 97(1-2):119-28
13. Szpirer C., Szpirer J., Rivière M. et al. Chromosomal localization of the human and rat genes (PDE4D and PDE4B) encoding the cAMP specific phosphodiesterases 3 and 4. J Cytogenet. Cell Genet. 1995; № 1-2:11-14
14. Lusis A.J. Atherosclerosis. J Nature. 2000; №68: 233-241
15. Yan Yan, Xiuping Luo, Jinlu Zhang, Li Su, Wenjie Liang, Guifeng Huang, Guangliang Wu, Guihua Huang, Lian Gu. Association between phosphodiesterase 4D polymorphism SNP83 and ischemic stroke. J Neurol Science 2014; Issues 1-2: 3-11.
16. Liu X, Zhu R, Li L, Deng S, Li Q, He Z. Genetic polymorphism in PDE4D gene and risk of ischemic stroke in Chinese population: a meta-analysis. PLoS One. 2013; 8(6).