

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У ПАЦИЕНТОВ С ПОЛИМОРФИЗМОМ 5G/4G ГЕНА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА ПЕРВОГО ТИПА

Проф. Л. И. СОКОЛОВА¹, доц. В. С. МЕЛЬНИК¹, докт. мед. наук А. Н. САВЧУК²

¹ Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев,

² ННЦ Институт биологии, Национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев

Проведено исследование аллельного полиморфизма 5G/4G гена ингибитора активатора плазминогена первого типа у больных ишемическим инсультом головного мозга. Изучены особенности клинического течения, динамика неврологического дефицита и последствия инфаркта мозга. Показано, что среди пациентов с патологическим гомозиготным вариантом 4G/4G гена PAI-1, который предопределяет недостаточную активность фибринолитической системы, регистрируется более выраженный неврологический дефицит, наблюдаются высокая смертность и недостаточное восстановление неврологических функций.

Ключевые слова: ишемический инсульт, ингибитор активатора плазминогена первого типа, аллельный полиморфизм.

Ишемический инсульт, без сомнения, остается одной из важнейших медико-социальных проблем. По показателям заболеваемости и смертности от инсульта Украина занимает одно из первых мест в Европе. Однако и специалисты стран Европейского Союза пока считают свои результаты лишь удовлетворительными и постоянно проводят исследования этиологии и патогенеза мозгового инсульта с целью разработки и внедрения более эффективных терапевтических стратегий.

Исследования последних лет показали, что вероятность развития и особенности клинического течения большинства заболеваний в значительной степени зависят от генотипа пациента, который определяет реагирование эндогенных ферментативных систем в ответ на действие экзогенного повреждающего фактора. В организме человека параллельно запускаются программы, которые, с одной стороны, являются компенсаторными, однако с другой — обуславливают ряд патологических состояний. Показано, что индивидуальную особенность универсальных защитных и самоповреждающих механизмов определяет вариация тех или иных генов, так называемый аллельный полиморфизм. Определенный набор аллельных вариантов генов в одних случаях способствует стойкости к ряду заболеваний, а в других — вызывает патологические состояния [1, 2].

В патогенезе ишемического инсульта ведущая роль отводится изменениям в системе гемостаза, приводящим к образованию сгустков фибрина (тромбов и эмболов, которые, в свою очередь, обуславливают острое нарушение мозгового кровообращения). Образовавшиеся сгустки фибрина, как правило, дополнительно включают форменные элементы крови — эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Одновременно с образованием сгустков

активизируется фибринолитическая система и фибрин подвергается постепенному расщеплению ферментом плазмином, который в норме находится в плазме крови в неактивном состоянии в виде белка — предшественника плазминогена.

Фибринолиз, как и процесс свертывания крови, может протекать по внешнему и внутреннему механизмам. Внешний механизм осуществляется при участии тканевого активатора плазминогена и урокиназы (образуется в юкстагломерулярном аппарате почки). Внутренний механизм реализуется плазменными активаторами, а также активаторами лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов и разделяется на Хагеман-зависимый и Хагеман-независимый.

Одним из ключевых регуляторов системы фибринолиза является ингибитор активатора плазминогена первого типа (PAI-1), который образует неактивные комплексы с тканевым активатором плазминогена (t-PA) и урокиназой (uPA) и тем самым обеспечивает до 60% общей ингибиторной активности в отношении активатора плазминогена в плазме. Повышение уровня PAI-1 связано с увеличением риска артериальных тромбозов [3]. Активная форма PAI-1 циркулирует в кровяном русле от 1 до 2 ч, затем переходит в неактивную форму.

Полиморфизм 4G/5G гена PAI-1 широко изучается в связи с риском развития острой сердечно-сосудистой патологии. Показано, что уровень PAI-1 в плазме крови ассоциирован с полиморфизмом в области промотора гена PAI-1, представляющего собой однонуклеотидную делецию/инсерцию гуанина (4G/5G). В популяции возможны три варианта генотипа по гену PAI-1: 5G/5G (норма), 5G/4G (гетерозигота), 4G/4G (мутантный вариант) [4]. Известно, что у гомозиготных по 4G-аллелю людей регистрируется более высокий

уровень содержания PAI-1 в плазме по сравнению с теми, кто имеет варианты 5G/5G либо 5G/4G [5, 6]. Механизм, лежащий в основе аллельных различий в уровне синтеза PAI-1, был установлен после обнаружения того, что оба аллеля могут связываться с активатором транскрипции гена, тогда как аллель 5G также имеет сайт связывания с транскрипционным репрессором. Отсутствие действия репрессора обеспечивает более высокий уровень транскрипции гена PAI-1 с аллелем 4G [7].

Известно, что скорость возникновения реперфузии в ишемизированном участке головного мозга при ишемическом инсульте напрямую зависит от активности фибринолитической системы, важнейшим регулятором которой является PAI-1. В связи с этим мы поставили цель изучить особенности неврологического дефицита у **пациентов с ишемическим инсультом и полиморфизмом 5G/4G гена PAI-1.**

В клиничко-лабораторное обследование изначально были включены 123 пациента с острым ишемическим инсультом (основная группа). Однако при проведении генетического исследования у 10 из них выделить ДНК не удалось, поэтому в анализ были включены данные 113 пациентов. Средний возраст пациентов составлял $73,6 \pm 8,9$ года. Все они проходили стационарное лечение в I и II неврологических отделениях Киевской городской клинической больницы № 4. Диагноз «ишемический инсульт» был подтвержден методами нейровизуализации (КТ или МРТ головного мозга).

Для объективной оценки неврологического дефицита использовали современные шкалы. Выраженность неврологического дефицита у больных оценивали по шкале Национального Института здоровья США (NIHSS – National Institute of Health Stroke Scale, USA) при госпитализации, на 7-й и 14-й дни заболевания, согласно которой суммарный показатель клинических проявлений от 3 до 8 баллов свидетельствует о **неврологических нарушениях легкой степени тяжести**, от 9 до 12 баллов – средней степени тяжести, от 13 до 15 баллов – тяжелой степени, больше 15 баллов – крайне тяжелой степени.

Пациенты группы контроля ($n = 40$) были сопоставимы по основным демографическим показателям с больными основной группы, однако без острых нарушений мозгового кровообращения (транзиторная ишемическая атака, ишемический или геморрагический инсульт) в анамнезе.

Все пациенты или их родственники были предупреждены о цели и методах клинического исследования и дали письменное согласие на участие в нем.

Забор венозной крови проводили с помощью пункции локтевой вены с 8 до 9 ч утра в первый день заболевания натошак, в **пробирку с раствором EDTA**. Нами был сформирован банк образцов ДНК пациентов. Для этого из лимфоцитов крови выделяли ДНК методом фенол-хлороформной

Таблица 1

Частота генотипов по полиморфизму 5G/4G гена PAI-1 у пациентов с ишемическим инсультом

Генотип	Группы			
	основная		контрольная	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%
5G/5G	24	21,2	5	12,5
4G/5G	42	37,2	19	47,5
4G/4G	47	41,6	16	40,0

экстракции. Далее проводили генотипирование с целью детекции полиморфизма 5G/4G гена PAI-1 методом аллельспецифической полимеразной цепной реакции (ПЦР) на ПЦР-амплификаторе фирмы «Eppendorf». Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в **2%-ном агарозном геле**. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы SPSS 17.0 и однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и χ^2 .

У всех обследованных ишемический инсульт развился на фоне повышенного систолического артериального давления (САД). У большинства (38 (33,6%)) пациентов уровень САД при возникновении первых симптомов заболевания находился в диапазоне 160–179 мм. рт. ст. У 45 (39,8%) пациентов диагностирована постоянная форма мерцательной аритмии, у 6 (5,3%) – пароксизмальная, у 6 (5,3%) больных был инфаркт миокарда в анамнезе. При проведении доплерографии у 19 (16,8%) обследованных диагностированы признаки стенозирующего поражения внутренних сонных артерий в экстракраниальном отделе: у 14 из них – стеноз просвета до 75%, у 5 – больше 75%. Стенозирующие атеросклеротические поражения у **большинства больных были двухсторонними**. У 29 пациентов диагностирован сахарный диабет (СД).

Большая часть обследованных с ишемическим инсультом имела неврологические нарушения

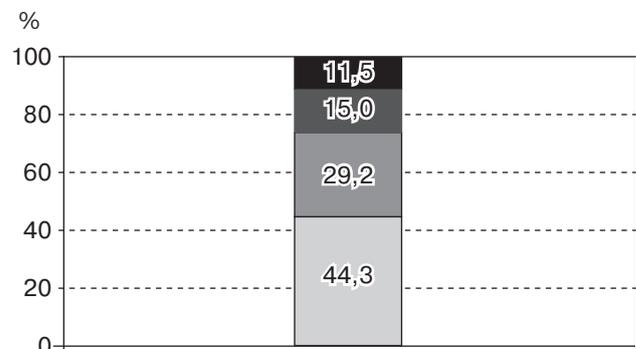


Рис. 1. Исходный уровень неврологического дефицита у пациентов с ишемическим инсультом по шкале NIHSS: ■ – крайне тяжелая степень; ■ – тяжелая степень; ■ – средняя степень; □ – легкая степень

Таблица 2

Степень выраженности неврологического дефицита у пациентов с ишемическим инсультом и полиморфизмом 5G/4G гена PAI-1 в 1-й, 7-й и 14-й дни заболевания (шкала NIHSS)

День	Генотипы	n	Средний балл NIHSS	Стандартная ошибка	95 %-ный доверительный интервал		p
					нижняя граница	верхняя граница	
1-й	5G/5G	24	9,7	0,8	7,6	11,1	0,270
	4G/5G	42	10,8	0,7	9,4	12,1	
	4G/4G	47	11,0	0,5	9,9	12,1	
	Итого	113	10,6	0,4	9,8	11,3	
7-й	5G/5G	24	6,3	1,0	4,4	8,3	0,042
	4G/5G	38	7,3	0,7	5,9	8,6	
	4G/4G	42	8,8	0,5	7,7	9,9	
	Итого	104	7,7	0,4	6,9	8,5	
14-й	5G/5G	23	4,0	0,8	2,3	5,6	0,047
	4G/5G	36	4,6	0,6	3,5	5,8	
	4G/4G	37	6,0	0,5	5,0	7,0	
	Итого	96	5,0	0,3	4,3	5,7	

легкой (50 (44,3%) пациентов) и средней (33 (29,2%)) степени тяжести (рис. 1). У 17 (15%) пациентов наблюдались неврологические нарушения тяжелой степени и у 13 (11,5%) – крайне тяжелой.

Нами было проведено сравнение частоты генотипов по полиморфизму 5G/4G гена PAI-1 у пациентов с ишемическим инсультом и обследованных группы контроля (табл. 1). Достоверной разницы между группами исследования мы не нашли, что не позволяет считать полиморфизм 5G/4G гена PAI-1 предиктором развития ишемического инсульта.

Среди 113 пациентов фатальные последствия инсульта в первые 14 дн заболевания были зарегистрированы у 17 (15,0%): с генотипом 5G/5G умер 1 (4,2%) и выжили 23 (95,8%) пациента; с генотипом 5G/4G – 6 (14,3%) и 36 (85,7%), а с генотипом 4G/4G – 10 (21,3%) и 37 (78,7%) соответственно ($p = 0,12$). Таким образом, хотя мы и не зарегистрировали достоверной разницы

по количеству умерших с разным аллельным полиморфизмом гена PAI-1, среди пациентов с гомозиготным патологическим вариантом 4G/4G наблюдался наибольший показатель в первые две недели заболевания.

При поступлении в стационар неврологический дефицит у пациентов с различными вариантами полиморфизма гена PAI-1 достоверно не отличался. Однако на 7-й и 14-й дни заболевания мы зарегистрировали достоверно больший неврологический дефицит у выживших пациентов с гомозиготным патологическим вариантом 4G/4G (табл. 2).

Наиболее благоприятный тип течения ишемического инсульта был зарегистрирован у больных с генотипом 5G/5G гена PAI-1, так как они имели исходно менее выраженный неврологический дефицит, который к 14-му дню заболевания у 23 (95,8%) выживших составил $4,0 \pm 0,8$

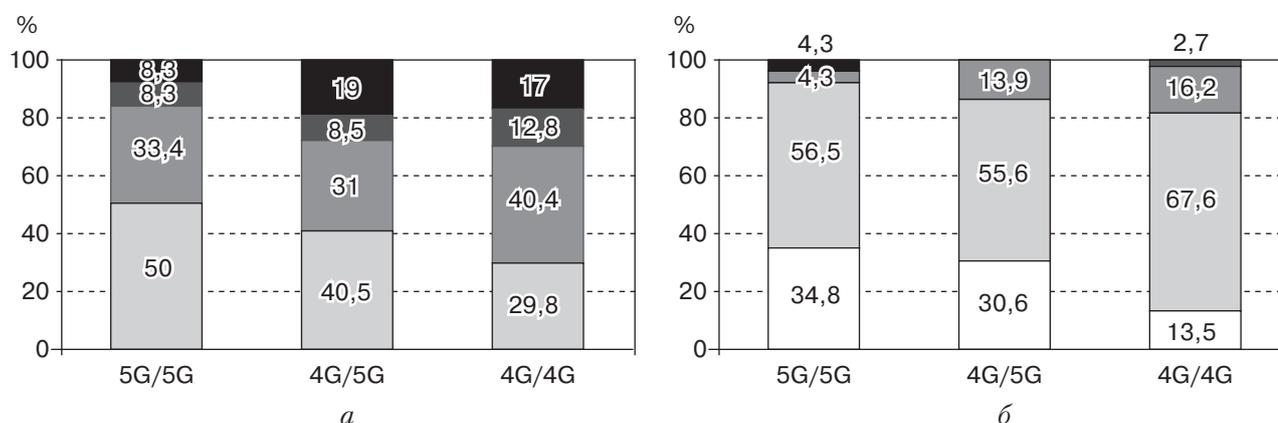


Рис. 2. Структура неврологического дефицита в 1-й (а) и 14-й (б) дни заболевания у пациентов с ишемическим инсультом и полиморфизмом 5G/4G гена PAI-1 (шкала NIHSS): ■ – крайне тяжелая степень; ■ – тяжелая степень; ■ – средняя степень; ■ – легкая степень; □ – полное восстановление функций

балла. Наиболее неблагоприятный тип течения наблюдался у обследованных с гомозиготным патологическим вариантом 4G/4G: у 37 (78,7%) выживших пациентов на 14-й день неврологический дефицит в среднем составил $6,0 \pm 0,5$ балла по шкале NIHSS.

Анализ структуры неврологического дефицита на 1-й и 14-й дни заболевания (рис. 2) также подтвердил, что пациенты с генотипом 5G/5G гена PAI-1 демонстрируют более полное восстановление утраченных неврологических функций и к 14-му дню заболевания у 34,8% из них наблюдается полный регресс неврологического дефицита, еще у 56,5% больных зарегистрированы легкие неврологические нарушения. Среди пациентов с патологическим гомозиготным вариантом 4G/4G на 14-й день заболевания в 16,2% случаев

отмечен неврологический дефицит средней степени тяжести и еще в 2,7% — тяжелый. Полное восстановление неврологических функций наблюдалось лишь у 13,5% пациентов.

В результате проведенного исследования был сделан вывод о том, что полиморфизм 5G/4G гена PAI-1 связан с особенностями клинической картины ишемического инсульта. У пациентов с патологическим гомозиготным вариантом 4G/4G гена PAI-1, который обуславливает недостаточную активность фибринолитической системы, регистрируется более выраженный неврологический дефицит на протяжении первых 14 дн заболевания, отмечается высокая смертность (21,3%) и недостаточная степень восстановления утраченных неврологических функций к концу второй недели заболевания.

Список литературы

1. Shared Genetic Susceptibility to Ischemic Stroke and Coronary Artery Disease / M. Dichgans, R. Malik, L. König [et al.] // Stroke.— 2014.— № 45 — P. 24–36.
2. Voetsch B. Genetic determinants of arterial thrombosis / B. Voetsch, J. Loscalzo // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.— 2004.— Vol. 24.— P. 216–229.
3. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts / P. G. Wiklund, L. Nilsson, S. N. Ardnor [et al.] // Stroke.— 2005.— Vol. 36.— P. 1661–1665.
4. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk / A. E. Tsantes, G. K. Nikolopoulos, P. G. Bagos [et al.] // Thrombosis Research.— 2008.— № 122 (6).— P. 736–742.
5. Residual vein thrombosis and onset of post-thrombotic syndrome: Influence of the 4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 gene / E. Incalcaterra, F. Meli, I. Muratori [et al.] // Thrombosis Research.— 2014.— № 133 (3).— P. 371–374.
6. The 4G/4G PAI-1 genotype is associated with elevated plasma PAI-1 levels regardless of variables of the metabolic syndrome and smoking status. A population-based study in Spanish population / M. J. Martínez-Calatrava, M. T. Martínez-Larrad, C. Zabena [et al.] // Diabetes, Obesity and Metabolism.— 2007.— № 9 (1).— P. 134–135.
7. Association of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor polymorphism with myocardial infarction: a meta-analysis / L. L. Gong, J. H. Peng, F. F. Han [et al.] // Thrombosis Research.— 2012.— № 130 (3).— P. 43–51.

ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІЧНОЇ КАРТИНИ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ПОЛІМОРФІЗМОМ 5G/4G ГЕНА ІНГІБІТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМІНОГЕНУ ПЕРШОГО ТИПУ

Л. І. СОКОЛОВА, В. С. МЕЛЬНИК, О. М. САВЧУК

Проведено дослідження алельного поліморфізму 5G/4G гена інгібітора активатора плазміногену першого типу у хворих на ішемічний інсульт головного мозку. Вивчено особливості клінічного перебігу, динаміку неврологічного дефіциту та наслідки інфаркту мозку. Показано, що серед пацієнтів із патологічним гомозиготним варіантом 4G/4G гена PAI-1, який зумовлює недостатню активність фібринолітичної системи, реєструється більш виражений неврологічний дефіцит, спостерігаються висока смертність і недостатнє відновлення неврологічних функцій.

Ключові слова: ішемічний інсульт, інгібітор активатора плазміногену першого типу, алельний поліморфізм.

CLINICAL FEATURES OF ISCHEMIC STROKE IN PATIENTS WITH POLYMORPHISM OF 5G/4G GENE OF TYPE 1 PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR

L. I. SOKOLOVA, V. S. MELNYK, A. N. SAVCHUK

Allelic polymorphism of 5G/4G gene of type 1 plasminogen activator inhibitor was investigated in patients with ischemic stroke. The peculiarities of clinical course, dynamics of neurological deficiency and consequences of cerebral infarction were studied. It is shown that in patients with abnormal

homozygote option of 4G/4G gene PAI-1, which determines insufficient activity of the fibrinolytic system, more pronounced neurological deficit is registered, high mortality rate and insufficient recovery of neurological function are observed.

Key words: ischemic stroke, type 1 inhibitor of plasminogen activator, allelic polymorphism.

Поступила 14.07.2014
