

УДК 616.151.511;575.167

ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ В ПРОФИЛАКТИКЕ ИШЕМИЧЕСКИХ ИНСУЛЬТОВ

¹Цветовская Г.А., ¹Чикова Е.Д., ¹Кох Н.В., ¹Морозов В.В.,
²Ковалёва Е.В., ¹Лифшиц Г.И.

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

²Центр новых медицинских технологий, Новосибирск, e-mail: cvetgalina@mail.ru

Задачей исследования явилось определение значимости данных генетического тестирования в оценке предрасположенности к тромбозам и роль наследственных факторов риска в развитии нарушений мозгового кровообращения (НМК). Изучались частоты встречаемости полиморфизмов генов всех звеньев системы гемостаза, а также генов, определяющих сосудистый тонус у пациентов с верифицированным диагнозом ишемический инсульт (ИИ) и практически здоровых лиц, проживающих в Западно-Сибирском регионе. Показано, что риск развития тромботических осложнений особенно высок при сочетании мутаций в генах, кодирующих процессы тромбообразования, а также генах, определяющих состояние системы фибринолиза и сосудистого тонуса. Проводилась оценка состояния одного из звеньев регулирования системы фибринолиза по содержанию в крови ингибитора активатора плазминогена PAI-1. Концентрации PAI-1, измеренные у больных с ИИ, были достоверно выше, чем в крови лиц без клинических проявлений тромбофилии. Риск тромбообразования у большинства больных с ИИ значительно возрастал на фоне снижения активности системы фибринолиза и повышенной агрегационной функции тромбоцитов. Диагностическая ценность молекулярно-биологических методов исследования значительно повышается при расширении спектра ДНК-полиморфизмов – маркёров склонности к тромбообразованию. Для принятия решений, касающихся диагностики, тактики подбора патогенетически обоснованных методов лечения и профилактики, обследование пациентов должно быть комплексным, включающим генетическое тестирование, оценку функционального состояния системы гемостаза и фибринолиза в том числе.

Ключевые слова: ишемический инсульт, генетическая предрасположенность, функция тромбоцитов, фибринолиз

THE VALUE OF MOLECULAR-GENETIC METHODS OF DIAGNOSTICS IN THE PREVENTION OF ISCHEMIC STROKE

¹Tsvetovskaya G.A., ¹Chikova E.D., ¹Kokh N.V., ¹Morozov V.V.,
²Kovaleva E.V., ¹Lifshits G.I.

¹Institute of chemical biology and fundamental medicine, Novosibirsk;

²Center of new medical technology, Novosibirsk, e-mail: cvetgalina@mail.ru

The study was aimed at determination of importance of genetic testing data for assessing predisposition to thrombosis and the role of genetic risk factors in development of cerebral circulation disorder (CCD). The occurrence of gene polymorphisms in all components of the hemostasis system as well as the genes that determine vascular tone of patients with verified diagnosis of ischemic stroke (IS) and almost healthy individuals living in the West Siberian region were studied. It is shown that the risk of thrombotic complications is especially high at combination of mutations in genes, encoding thrombotic processes, and genes that determine the state of the fibrinolysis system and vascular tone. The state of one of the components controlling the fibrinolysis system was estimated by the content of inhibitor of plasminogen activator PAI-1 in the blood. Concentrations of PAI-1 measured in patients with ischemic stroke were significantly higher than in the blood of individuals without clinical signs of thrombophilia. The risk of thrombosis in most patients with ischemic stroke increased significantly with a decrease in the activity of fibrinolysis system and an increase in the aggregation function of platelets. The diagnostic value of molecular-biological methods of research increases significantly at expansion of the range of DNA-polymorphisms – the markers of propensity to thrombosis. To make the decisions concerning diagnosis and tactics of selection of pathogenetically grounded methods of treatment and prevention, patient examination should be complex, including genetic testing and assessment of functional state of hemostasis and fibrinolysis systems.

Keywords: ischemic stroke, genetic predisposition, platelet function, fibrinolysis

Одной из серьёзных медико-социальных проблем являются острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), поскольку уровень инвалидизации после перенесенного инсульта составляет в России от 76 до 85%. В течение года после перенесенного ишемического инсульта (ИИ) умирает 50% больных, т.е. каждый второй заболевший, именно в этот период регистрируется высокий процент повторных тромбозов сосудов мозга [5, 6, 8, 9, 14]. Причиной возникно-

вения подавляющего большинства острых ишемических нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) являются атеротромбоз и тромбоэмболия сосудов, питающих мозг. Особого внимания ученых заслуживают наследственные формы недостаточности ингибиторов свертывания или аномалии коагуляционных протеинов, обуславливающих состояние предтромбоза и предрасположенности к тромбозу, поскольку встречаются у лиц молодого возраста и зачастую

протекают без клинических проявлений [1, 2, 4, 9]. В то же время ряд авторов не обнаружили достоверного влияния на риск развития инсульта носительства патологических мутаций [3, 7]. Таким образом, литературные данные о роли генов-кандидатов тромбофилий в патогенезе тромбоэмболических осложнений и развитии ишемического инсульта остаются крайне противоречивыми.

Это послужило основанием для проведения исследований, данные которых могли бы позволить своевременно определять возможные риски развития острых нарушений мозгового кровообращения, использоваться при разработке мер профилактики цереброваскулярных заболеваний и предупреждения повторных тромботических осложнений при ИИ.

Цель и задачи исследования. Определить значимость данных генетического тестирования в оценке предрасположенности к тромбозам и роль наследственных факторов риска в развитии нарушений мозгового кровообращения (НМК). Изучить частоту встречаемости полиморфных вариантов ряда генов, кодирующих протеины различных звеньев системы гемостаза (тромбоцитарного, плазменного, фибринолиза) и эндотелиальных факторов у жителей Западно-Сибирского региона – практически здоровых и с верифицированным диагнозом ишемический инсульт.

Материалы и методы исследования

Обследованы две группы пациентов – в 1-ю группу вошли 219 человек – без клинических проявлений тромбофилии; 2-ю группу составили 43 больных с верифицированным диагнозом ишемический инсульт (ИИ), у 4-х больных данной группы ИИ диагностирован повторно. Диагноз ишемического инсульта был верифицирован по результатам МРТ или КТ диагностики головного мозга. Оценка неврологического статуса включала определение степени нарушения сознания, выраженность нарушений двигательной и чувствительной функций, статодинамических, координаторных и когнитивных нарушений. Возрастной диапазон больных 30–68 лет (средний возраст $53,4 \pm 6,2$ года). Генотипирование ряда полиморфизмов системы гемостаза, фибринолиза в частности, и эндотелиальных факторов проводилось методом ПЦР с использованием конкурирующих TagMan-зондов, комплементарных полиморфному участку ДНК.

В крови 78 больных (35 пациентов практически здоровых – 1-я группа и 43 больных с НМК – 2-я группа) исследовали содержание ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1). Для определения в плазме крови концентрации PAI-1 использовали наборы Technoclone PAI-1 Antigen ELISA. Анализатор Archytek фирмы ABBOT. Агрегационная активность тромбоцитов определялась на агрегометре CRONOLOG (США). Выявленное распределение частот встречаемости генотипов проверяли на отклонение от равновесия Харди – Вайнберга с использованием

критерия согласия χ^2 Пирсона. Проверка равенства средних значений в двух выборках проводилась по t-критерию Стьюдента. Статистически значимыми считали различия, при которых $p\text{-level} < 0,05$. Доведительный интервал – 95%.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ изменений показателей гемостаза – тромбоцитарного, коагуляционного звеньев и системы фибринолиза у больных с ишемическим инсультом показал, что активность АТШ, содержание протеина С значительно не отличались от нормальных значений, в то же время у 47% обследованных пациентов регистрировался повышенный уровень фибриногена в среднем до $4,6 \pm 0,53$ г/л. В 73% случаев отмечался повышенный уровень Д-димера и РФМК, что указывало на активацию гемостаза, т.е. на усиление процессов тромбин- и фибринообразования.

В группе обследованных нами больных с ИИ при поступлении в клинику повышение функциональной активности тромбоцитов, индуцированной коллагеном, АДФ и адреналином, отмечено в 80% случаев. Функция тромбоцитов у ряда больных, наблюдавшихся после госпитализации, оставалась повышенной и после выписки больного из стационара, несмотря на включение в комплексную терапию антиагрегантов.

Известно, что при дисфункции эндотелия подавление фибринолитической активности происходит главным образом за счет увеличения синтеза и секреции эндотелием PAI-1. [12, 13]. В наших исследованиях средний уровень PAI1 в крови практически здоровых людей составил $26,77 \pm 12,06$ ng/ml. Концентрации ингибитора активатора плазминогена, измеренные у больных с ИИ (2-я группа), были достоверно выше, чем в крови лиц без клинических проявлений тромбофилии (табл. 1).

Нормальное содержание PAI1 в крови больных ИИ обнаружено у 19,3% больных, в 80,7% случаев обследованных данной группы регистрировались высокие уровни белка. Значения, превышающие нормальный уровень в 2,5–3 раза, отмечены у пациентов, кровь у которых забиралась в первые 3–5 дней после развития ишемического инсульта. Однако у большинства пациентов высокие значения PAI1 регистрировались и после выписки из стационара. Показано, что у большинства больных 2-й группы риск тромбообразования значительно возрос на фоне снижения активности системы фибринолиза и повышенной агрегационной функции тромбоцитов.

Таблица 1

Показатели функционального состояния системы гемостаза у больных с ишемическим инсультом

Показатель	1-я группа (здоровые $n = 124$)	2-я группа (ИИ $n = 43$)
АТ Ш, %	94 ± 4,6	97,7 ± 4,2
Протеин С, %	91,8 ± 4,5	89,8 ± 5,3
Плазминоген, %	83,6 ± 4,8	86,8 ± 3,5
Д-димер., мг/л	0,36 ± 0,07	0,76 ± 0,22*
РФМК, мг/%	6,3 ± 0,5	24,6 ± 5,8*
РАI-1, ng/ml	26,77 ± 12,06	79,73 ± 12,49 *
ФГ, г/л	3,4 ± 0,4	4,2 ± 0,5
Агр-ция Тг индуцированная Т, %		
АДФ, 2,5 мкг/мл %	64,3 ± 2,2	81,5 ± 3,1*
Адр (2,5 мкг/мл) %	67,4 ± 4,2	83,8 ± 3,3*
Коллаген (20мг/мл) %	62,0 ± 2,6	78,7 ± 5,2*

Примечание. * ($p < 0,05$) достоверные различия между практически здоровыми людьми и больными с ИИ.

Нами проанализированы гены различных звеньев системы гемостаза – тромбocитарного, плазменного, фибринолиза и эндотелиальных факторов, участвующих в развитии тромбофилии, данные анализа представлены в табл. 2.

Таблица 2

Частоты встречаемости генотипов полиморфизма генов-кандидатов тромбофилии у практически здоровых (гр. 1) и больных с ишемическим инсультом (гр. 2) в % у жителей Западной Сибири

Ген Варианты	1-я группа ($n = 219$)			2-я группа ($n = 43$)		
	гомоз. форма	гетер. форма	частота встречаемости минорного аллеля (%)	гомоз. форма	гетер. форма	частота встречаемости минорного аллеля (%)
FV 1691 G-> A	A/A нет	G/A 3,8	3,8	A/A нет	G/A 8,3	8,3
FII (20210 G -> A)	A/A нет	G/A 1,6	1,6	A/A 1,2	G/A 8,1	9,3
MTHFR (C677T)	T/T 12,6	C/T 41,4	54,3	T/T 18,1	C/T 44,3	62,4
MTHFD (1958A->G)	A/A 18,7	G/A 47,3	66,0	A/A 58,4	G/A 25,8	84,2
MTRR (66A > G)	A/A 29,8	G/A 43,6	73,4	A/A 54,0	G/A 38,7	92,7
MTHFR (A1298C)	-	-	-	C/C 33,3	24,9	58,2
PAI1 (675 5G -> 4G)	4G/4G 29,5	5G/4G 39	68,5	4G/4G 40,8	5G/4G 45,4	86,2
PLAT 7351 C -> T	T/T 7,9	C/T 30,5	38,3	T/T 20	C/T 44,4	64,4
GpIIIa (1565 T- C)	C/C 3,4	C/T 23,4	26,8	C/C 23,6	T/C 32,4	56,0
GpIa C807T	4,8	29,8	34,6	12,7	43,4	56,1
NSO3 (Glu298Asp)	-	-	-	T/T 18,1	G/T 63,3	81,4
NSO3 (VNTR)				25,4	46,2	71,6
EDN1 (Lys198Asn)	L/L 2,1	L/A 31,7	33,8	L/L 8,6	L/A 43,9	52,5
FGB β-пептид (455 G -> A)	A/A 6,7	G/A 34,8	41,5	A/A 11,6	G/A 46,7	58,3

В создании условий для нормального кровообращения огромная роль отводится системе фибринолиза, в состав которой входят активаторы, ингибиторы и конечный фермент – плазмин, ответственной за лизис фибринового сгустка [11, 13]. Наличие полиморфной замены 675 5G -> 4G гена ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) может указывать на предрасположенность к дисфункции эндотелия и развитие депрессии системы фибринолиза. Из таблицы видно, что частота полиморфизма гена PAI-1, а именно полиморфный вариант 4G, который сопровождается повышенной экспрессией гена и приводит к повышению в крови PAI-1, зарегистрирован нами у 86,2% обследованных пациентов, т.е. в 1,5 раза чаще, чем в крови практически здоровых людей. При этом в 2,3 раза чаще у больных с ИИ выявлялся генотип 4G/G. Сочетание полиморфизма гена PAI-1 с полиморфным вариантом гена тканевого активатора плазминогена PLAT (полиморфная замена 7351 C -> T) имело место в 49% случаев, причем вариант T/T обнаружен у 20% обследуемых, что также может являться предиктом снижения высвобождения тканевого активатора плазминогена, приводящего к неэффективному фибринолизу.

По нашим данным встречаемость полиморфной замены 1565 T -> C гена GРIІа у обследованных нами пациентов зарегистрирована в 56% случаев, из них в 23,6% обнаружен вариант C/C. У здоровых лиц Сибирского региона этот вариант встретился у 3,4% обследованных. Замещение лейцина на пролин, обусловленное заменой T на C в экзоне 2 гена GРIІа в положении 1565, сопровождается повышенной склонностью тромбоцитов к агрегации, а также усилением адгезии тромбоцитов к эндотелию сосудов, что повышает риск развития сердечной-сосудистой заболеваний. Полиморфный вариант T гена Gр-Ia – интегрин-альфа-2 – рецептора для субэндотелиального коллагена зарегистрирован нами в 56% случаев. Полученные данные позволяют рассматривать варианты патологических полиморфизмов GрIІа и Gр-Ia – интегрин-альфа-2 в качестве маркеров – предиктов высокого риска тромбообразования, в особенности, в сочетании с дефектами генов – маркеров гипофибринолиза и эндотелиальной дисфункции.

Полиморфный вариант A/A гена фибриногена (β-пептид FGГ 455 G->A) зарегистрирован нами в 11,6% случаев у больных с ИИ по сравнению с 6,7% обнаруженным в популяции Западно-Сибирского региона у лиц без признаков тромботических заболеваний. В случае полиморфного варианта

(A) данного гена значительно повышается риск тромбообразования за счет нарушения структуры фибриногена, повышенного образования фибрина и устойчивости тромба к фибринолизу [4].

Предрасположенность к эндотелиальной дисфункции оценивалась нами при анализе мутации генов, регулирующих состояние сосудистой стенки – NOS(e) эндотелиальной NO-синтазы, VNTR-полиморфизм и полиморфная замена C-T (Glu298Asp), а также эндотелина. Полиморфный вариант гена эндотелиальной NO-синтазы – NOS(e), VNTR-полиморфизм и полиморфная замена C -> T (Glu298 Asp), зарегистрированы нами в 42,8 и 18,5% случаев соответственно, что может быть причиной снижения синтеза NO и, как следствие, увеличения вазоконстрикции – одного из механизмов развития тромбоза.

Одной из причин противоречивости данных об участии генетических факторов риска в развитии ИИ и ассоциации генетических мутаций с развитием ишемического инсульта может быть ограниченное количество генов, взятых авторами для анализа [3, 7]. Нами показано, что риск развития тромботических осложнений особенно высок при сочетании мутаций в генах, кодирующих процессы тромбообразования, а также генах, определяющих состояние системы фибринолиза и сосудистого тонуса. Особенностью пациентов с ишемическим инсультом явилось наличие мультигенного характера тромбофилии в 100% случаев. Встречаемость пяти и более дефектных генов, кодирующих факторы различных звеньев системы гемостаза, в группе больных с ИИ значительно превышала таковой показатель по сравнению со здоровыми людьми.

Заключение

Таким образом, диагностическая ценность молекулярно-биологических методов исследования значительно повышается при расширении спектра тромбогенных ДНК-полиморфизмов, значимых для развития тромбозов различной локализации. Для принятия решений, касающихся диагностики, тактики подбора патогенетически обоснованных методов лечения и профилактики, обследование пациентов должно быть комплексным, включающим генетическое тестирование, оценку функционального состояния системы гемостаза и фибринолиза в том числе, оценку состояния эндотелия. Высокая агрегационная способность тромбоцитов в сочетании с явлениями гипофибринолиза являются надежными диагностически значимыми факторами риска развития тромботических и тромбозов.

лических состояний как при наследственной тромбофилии, так и приобретенной. С целью профилактики повторных эпизодов заболевания у лиц с инсультом и проходящими нарушениями мозгового кровообращения в анамнезе целесообразно анализировать расширенный спектр генов, кодирующих ферменты и гликопротеиды всех звеньев системы гемостаза с оценкой генов активаторов и ингибиторов активации плазминогена и эндотелиальных факторов. Выявление лиц с наследственной тромбофилией, входящих в группы риска по развитию тромботических заболеваний, своевременная профилактика и адекватная терапия позволят значительно снизить процент инвалидизации населения после перенесенного ишемического инсульта и других тромботических заболеваний.

Список литературы

1. Баранов В.С. Генетические основы предрасположенности к некоторым частым мультифакториальным заболеваниям // Медицинская генетика. – 2004. – Т.3. – С. 102–112.
2. Вавилова Т.В. Антитромботическая терапия и методы ее лабораторного контроля // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 12. – С. 21–32.
3. Гиляров М.Ю., Генерозов Э.В., Магомедова М.У. Генетически обусловленные тромбофилии и их влияние на риск развития инсульта у пациентов с фибрилляцией предсердий // Вестник аритмологии. – 2009. – № 56. – С. 26–30.
4. Гусев Е.И., Фаворова О.О., Судомоина М.А. Полиморфизм генов фибриногена у больных с ишемическим инсультом // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2008. – № 4. – С. 27–30.
5. Дамулин И.В., Парфёнов В.А., Скоромец А.А., Яхно Н.Н. Нарушения кровообращения в головном и спинном мозге // Болезни нервной системы / под ред. Н.Н. Яхно, Д.Р. Штульмана. – М.: Медицина, 2003. – Т. 1. – С. 231–302. – 744 с.
6. Иванова Г.Е., Шкловский В.М., Петрова Е.А. Принципы организации ранней реабилитации больных с инсультом // Качество жизни (медицина). – 2006. – № 2. – С. 62–70.
7. Калашникова Л.А., Добрынина Л.А., Патрушева Н.Л. Мутации генов, сочетающиеся с тромбозами, при ишемическом инсульте у больных с первичным антифосфолипидным синдромом // Терапевтический архив. – 2005. – № 10. – С. 49–53.
8. Скоромец А.А., Ковальчук В.В. Медикаментозная реабилитация пациентов после инсульта // Журнал неврологии и психиатрии. – 2007. – № 2. – С. 21–24.
9. Сломинский П.А., Тупицина Т.В., Шетова И.М. Анализ кандидатных генов при остром атеротромботическом инсульте и коронарной болезни сердца // Медицинская генетика. – 2005. – № 6. – С. 267–268.
10. Суслина З.А., Ерофеева А.В., Танащян М.М. Ишемические инсульты: состояние гемостаза и факторы церебральной эмболии. // Инсульт. – 2006. – № 16. – С. 3–9.
11. Шутов А.А., Байдина Т.В., Агафонов О.В., Гайдаш Г.В. Дисфункция эндотелия у больных с ишемическим инсультом // Инсульт. – 2005. – № 14. – С. 42–45.

12. Abdullah W. Z., Idris S. Z., Bashkar S., Hassan R. Role of fibrinolytic markers in acute stroke // Singapore Med J. – 2009. – № 50(6). – P. 604–609.

13. Glueck C.J., Phillips H., Cameron D. et al. The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic PAI-1 gene: An independent risk factor for serious pregnancy complications // Metabolism. – 2000. – № 49. – P. 845–852.

14. Mac Kenzje J.M. Are all cardio-embolic strokes embolic? // Cerebrovasc Dis. – 2000. – Vol. 10. – № 4. – P. 289–305.

References

1. Baranov V. Medicinskaja genetika, 2004, T.3, pp. 102–112.
2. Vavilova T.V. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika, 2004, no.12. pp. 21–32.
3. Giljarov M.Ju., Generozov Je.V., Magomadova M.U., Moroshkina S.U., Pogoda T.V., Kostin P.A., Sulimov V.A., Sirkin A.L. Vestnik aritmologii, 2009, no.56, pp. 26–30.
4. Gusev E.I., Favorova O.O., Sudomoina M. A. Zhurnal neurologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova, 2008, no.4, pp. 27–30.
5. Damulin I.V., Parfjonov V.A., Skoromec A.A., Jahno N.N. Bolezni nervnoj sistemy, Pod redakciej N.N. Jahno, D.R. Shtul'mana, Moscov, Medicina, 2003, T. 1, pp. 231–302, 744 p.
6. Ivanova G.E., Shklovskij V.M., Petrova E.A. Kachestvo zhizni (medicina), 2006, no. 2, pp. 62–70.
7. Kalashnikova L.A., Dobrynina L.A., Patrusheva N.L., Kovalenko N.F., Patrushev L.I., Aleksandrova E.N., Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Nasonov E.L. Terapevticheskij arhiv, 2005, no.10, pp. 49–53.
8. Skoromec A.A., Koval'chuk V.V. Zhurnal neurologii i psihiatrii, 2007, no. 2, pp. 21–24.
9. Slominskij P.A., Tupicina T.V., Shetova I.M. Medicinskaja genetika, 2005, no.6, pp. 267–268.
10. Suslina Z.A., Erofeeva A.V., Tanashjan M.M., Ionova V.G. Insul't, 2006, no.16, pp. 3–9.
11. Shutov A.A., Bajdina T.V., Agafonov O.V., Gajdash G.V. Insul't, 2005, no.14, pp. 42–45.
12. Abdullah W. Z., Idris S. Z., Bashkar S., Hassan R. Role of fibrinolytic markers in acute stroke // Singapore Med J. 2009. no. 50(6). pp. 604–609.
13. Glueck C.J., Phillips H., Cameron D. et al. The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic PAI-1 gene: An independent risk factor for serious pregnancy complications // Metabolism. 2000. no. 49. pp. 845–852.
14. Mac Kenzje J.M. Are all cardio-embolic strokes embolic? // Cerebrovasc Dis. 2000. Vol. 10. no. 4. pp. 289–305.

Рецензенты:

Ломиворотов В.В., д.м.н., профессор, руководитель отдела анестезиологии и реаниматологии, ФГБУ «НИИПК им. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, г. Новосибирск;

Ступак В.В., д.м.н., профессор, зав. отделом нейрохирургии, ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 15.07.2014.