

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ 5G/4G ГЕНА PAI-1 ТА РІВНЯ ЙОГО ПРОДУКТУ ЗА АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ТА КАРДІОЕМБОЛІЧНОГО ІШЕМІЧНИХ ІНСУЛЬТІВ

О. Л. ХОЛОДКОВА¹, М. К. БУРЛОВА-ВАСИЛЬЄВА², О. М. САВЧУК²,
Н. К. КРАВЧЕНКО², В. С. МЕЛЬНИК³, В. Ю. ШАНДЮК³

¹Одеський національний медичний університет, кафедра анатомії людини

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології»,
кафедра біохімії

³Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, медичний факультет №1, кафедра неврології
e-mail: burlova@mail.ru

Атеротромботичний та кардіоемболічний інсульт є одними з найпоширеніших підтипів серед випадків ішемічного інсульту. Молекулярні механізми розвитку даних патологій різняться, але в основі обох станів лежать порушення функціонування фібринолітичної системи. Одним із ключових компонентів фібринолізу є інгібітор активаторів плазміногену 1 типу (PAI-1). У зв'язку з цим, метою даної роботи було порівняння розподілу генотипів і алельних варіантів поліморфізму 5G/4G гена PAI-1 у хворих з атеротромботичним ішемічним інсультом, хворих з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії та практично здорових донорів, а також кількісно визначити рівень інгібітора у плазмах крові досліджених груп осіб. Проведено клініко-лабораторне обстеження 112 хворих з гострим ішемічним інсультом, які були відкритим методом рандомізовані на дві групи: пацієнти з атеротромботичним ішемічним інсультом (n=59) та пацієнти з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії (n=53). В дослідженні також взяли участь практично здорові донори (n=40). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним у кожній досліджуваній групі свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності з розподілом Харді-Вайнберга, що свідчить про коректність результатів генотипування. Між групами пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії та з атеротромботичним ішемічним інсультом достовірних відмінностей у розподілі генотипів виявлено не було. Також не було виявлено відмінностей у розподілі генотипів досліджуваних груп у порівнянні з контрольною. Концентрація PAI-1 за атеротромботичного ішемічного інсульту становила 15,26±2,84 нг/мл, в той час як за кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії спостерігалось значне відхилення від середнього показника групи. У 60% хворих концентрація PAI-1 досягала 21,09±1,02 нг/мл, перевищуючи показник, характерний для практично здорових донорів, майже на 30%.

Ключові слова: атеротромботичний ішемічний інсульт, кардіоемболічний ішемічний інсульт, генетичний поліморфізм, інгібітор активаторів плазміногену 1 типу.

Вступ. За даними ВООЗ другою за частотою причиною смертності в світі є інсульт, в Україні даний діагноз ставиться щорічно більш ніж 100 тис. пацієнтам (Geneva: World Health Organization, 2013; Чепелевська та Любінець, 2008). Атеротромботичний та кардіоемболічний інсульт є одними з найпоширеніших підтипів серед випадків ішемічного інсульту (De Jong et al., 2003). Молекулярні механізми розвитку даних патологій різняться, але в основі обох станів лежать порушення функціонування фібринолітичної системи, що зазвичай передують тромбозам та тромбоемболіям. Одним із ключових компонентів тромболітичної системи є інгібітор активаторів плазміногену 1 типу (PAI-1), який утворює неактивні комплекси з тканинним активатором плазміногену (t-PA) та урокіназою (uPA), інгібуючи таким чином фібриноліз (Tjärnlund-Wolf et al., 2012). У зв'язку з цим, метою даної роботи

було порівняння розподілу генотипів і алельних варіантів поліморфізму 5G/4G гена PAI-1 у пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом, пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії та здорових донорів, а також кількісно визначити рівень інгібітора у плазмах крові хворих.

Матеріали та методи. Проведено клініко-лабораторне обстеження 112 хворих з гострим ішемічним інсультом. Вік хворих на момент огляду варіював від 43 до 91 років, складаючи в середньому 73,62±8,9 років. Хворі перебували на стаціонарному лікуванні в I та II неврологічних відділеннях Київської міської клінічної лікарні №4.

В залежності від підтипу інсульту пацієнти були відкритим методом рандомізовані на дві групи: перша група – пацієнти з атеротромботичним ішемічним інсультом (n=59) та друга група

– пацієнти з кардіоеMBOLІЧНИМ іШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ НА ФОНІ МИГОТЛИВОЇ АРИТМІЇ (n=53).

Діагноз іШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ БУВ ПІДТВЕРДЖЕНИЙ НЕЙРОВІЗУАЛІЗАЦІЙНО (КТ- або МРТ-ГОЛОВНОГО МОЗКУ). КардіоеMBOLІЧНИЙ ПІДТИП ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ БУВ ДІАГНОСТОВАНИЙ ЗА НАЯВНІСТЮ У ХВОРОГО МИГОТЛИВОЇ АРИТМІЇ: ПОСТІЙНОЇ, ПАРОКСИЗМАЛЬНОЇ ФОРМИ АБО ПЕРЕНЕСЕНОГО ГОСТРОГО ІНФАРКТУ МІОКАРДА В АНАМНЕЗІ ТА ЇХ ПОЄДНАННЯ. ДІАГНОЗ МИГОТЛИВА АРИТМІЯ ВВАЖАЛИ ДОСТОВІРНИМ, ЯКЩО ДАНИЙ СТАН БУВ ПІДТВЕРДЖЕНИЙ НА ЕЛЕКТРОКАРДІОГРАМІ АБО ЗА НАЯВНОСТІ ПАРОКСИЗМАЛЬНОЇ ФОРМИ МИГОТЛИВОЇ АРИТМІЇ, ЩО БУЛО ЗАФІКСОВАНО У АМБУЛАТОРНІЙ КАРТІ ТА ПАРОКСИЗМОМ МИГОТЛИВОЇ АРИТМІЇ ПЕРЕД РОЗВИТКОМ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ. ПЕРЕНЕСЕНИЙ ІНФАРКТ МІОКАРДА ТЕЖ БУВ ПІДТВЕРДЖЕНИЙ НА ЕЛЕКТРОКАРДІОГРАМІ У ВИГЛЯДІ ПОСТІНФАРКТНОГО КАРДІОСКЛЕРОЗУ ТА ЗАДОКУМЕНТОВАНИЙ У АМБУЛАТОРНІЙ КАРТЦІ. В ДОСЛІДЖЕННЯ НЕ ВКЛЮЧАЛИ ХВОРИХ У СТАНІ КОМИ, ХВОРИХ З ВИРАЖЕНОЮ ДИХАЛЬНОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ АБО З ПІДОЗРОЮ НА ОНКОЛОГІЧНЕ ЗАХВОРЮВАННЯ.

В ДОСЛІДЖЕННІ ТАКОЖ ВЗЯЛИ УЧАСТЬ ЗДОРОВІ ДОНОРИ (n=40). ВСІ ДОНОРИ А ТАКОЖ ХВОРІ АБО ЇХ РОДИЧІ БУЛИ ПОПЕРЕДЖЕНІ ПРО ПРОВЕДЕННЯ КЛІНІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ДАВАЛИ ПИСЬМОВУ ЗГОДУ НА УЧАСТЬ У НЬОМУ.

У ПАЦІЄНТІВ ТА ДОНОРІВ КОНТРОЛЬНОЇ ГРУПИ ЗАБІР ВЕНОЗНОЇ КРОВІ ПРОВІДИЛИ ПУНКЦІЄЮ ЛІКТЬОВОЇ ВЕНИ З 8 ДО 9 ГОДИНИ РАНКУ НАТЩЕСЕРЦЕ, В ПРОБІРКУ З РОЗЧИНОМ ЕДТА. БУЛО СФОРМОВАНО БАНК ЗРАЗКІВ ДНК ХВОРИХ НА ІНСУЛЬТ ТА КОНТРОЛЬНОЇ ГРУПИ ОСІБ. ДЛЯ ЦЬОГО З ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ВИДІЛЯЛИ ДНК МЕТОДОМ ФЕНОЛ-ХЛОРОФОРМНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ. НАДАЛІ ПРОВІДИЛИ ГЕНОТИПУВАННЯ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ 5G/4G ГЕНА PAI-1 МЕТОДОМ АЛЕЛЬСПЕЦИФІЧНОЇ ПЛР НА ПЛР-АМПЛІФІКАТОРІ ФІРМИ «Eppendorf». ПРОДУКТИ ПЛР АНАЛІЗУВАЛИСЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ В 2% АГАРОЗНОМУ ГЕЛІ. СТАТИСТИЧНУ ОБРОБКУ РЕЗУЛЬТАТІВ ПРОВІДИЛИ З ВИКОРИСТАННЯМ ПРОГРАМИ Statistica 6.0 ПО КРИТЕРІЮ χ^2 І КРИТЕРІЮ ФІШЕРА.

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ ПРОВІДИЛИ У МІКРОПЛАНШЕТАХ ІЗ СОРБЦІЙНОЮ ЗДАТНІСТЮ ЗА СТАНДАРТНОЮ МЕТОДИКОЮ ДЛЯ РОЗЧИННИХ БІЛКІВ (Hockfield et al., 1993). ПЛАЗМУ КРОВІ РОЗВОДИЛИ 50 ММ ТРИС-НСІ БУФЕРОМ, pH 7,4 У СПІВВІДНОШЕННІ 1:100.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. ЗМЕНШЕННЯ АКТИВНОСТІ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ СИСТЕМИ, ЩО МОЖЕ ВІДБУВАТИСЯ ВНАСЛІДОК ПІДВИЩЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АБО АКТИВНОСТІ PAI-1, ЗАЗВИЧАЙ ПРИЗВОДИТЬ ДО ПІДВИЩЕННЯ РИЗИКУ ТРОМБОЗІВ (Singh et al., 2013). ГЕНЕТИЧНА СКЛАДОВА КОЛИВАННЯ PAI-1 У КРОВІ ПОЛЯГАЄ У НАЯВНОСТІ ПОЛІМОРФІЗМУ 5G/4G ГЕНА PAI-1. ОСОБЛИВІСТЬ ДАНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ПОЛЯГАЄ В ТОМУ, ЩО У ПРОМОТОРІ ГЕНА PAI-1 Є ДІЛЯНКА, ЩО МОЖЕ МІСТИТИ ПОСЛІДОВНІСТЬ З ЧОТИРЬОХ

(4G) АБО Ж З П'ЯТИ (5G) ОСНОВ ГУАНІНУ (ПОЛІМОРФІЗМ ПО ТИПУ ІНСЕРЦІЯ/ДЕЛЕЦІЯ). В ПОПУЛЯЦІЇ МОЖЛИВІ 3 ВАРІАНТИ ГЕНОТИПУ ЗА ГЕНОМ PAI-1: 5G/5G (НОРМА), 5G/4G (ГЕТЕРОЗИГОТА), 4G/4G (МУТАНТНИЙ ВАРІАНТ) (Tsantes A.E. et al., 2008) З ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ ВІДОМО, ЩО У КРОВІ ЛЮДЕЙ, ЩО МАЮТЬ ВАРІАНТ 4G/4G, КОНЦЕНТРАЦІЯ PAI-1 ЗНАЧНО ВИЩЕ, НІЖ У ЛЮДЕЙ, ЩО МАЮТЬ ВАРІАНТИ 5G/5G ТА 5G/4G (Martínez-Calatrava et al., 2007; Incalcaterra et al., 2014). ЦЕ ПОВ'ЯЗАНО З ТИМ, ЩО АЛЕЛІ 5G ТА 4G МАЮТЬ САЙТИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЯК З АКТИВАТОРОМ, ТАК І РЕПРЕСОРОМ ГЕНУ, В ТОЙ ЧАС ЯК АЛЕЛЬ 5G МАЄ ДОДАТКОВИЙ САЙТ ЗВ'ЯЗУВАННЯ З РЕПРЕСОРОМ, ЩО ПРИЗВОДИТЬ ДО ЗНИЖЕННЯ РІВНЯ ТРАНСКРИПЦІЇ ГЕНУ. ТАКОЖ ВІДОМО, ЩО У НОСІЇВ ВАРІАНТУ 4G/4G РИЗИК РОЗВИТКУ ТРОМБОЗІВ ТА СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ Є ПІДВИЩЕНИМ (Incalcaterra et al., 2014; Gong et al., 2012).

НАМИ БУЛО ПРОВЕДЕНО ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЧАСТОТ ГЕНОТИПІВ ТА АЛЕЛІВ ЗА ПОЛІМОРФІЗМУ 5G/4G ГЕНА PAI-1 МІЖ ДОСЛІДЖУВАНИМИ ГРУПАМИ ПАЦІЄНТІВ ТА КОНТРОЛЬНОЮ ГРУПОЮ ОСІБ. АНАЛІЗ ВІДПОВІДНОСТІ ФАКТИЧНИХ ЧАСТОТ ГЕНОТИПІВ ТЕОРЕТИЧНО ОЧІКУВАНИМ У КОЖНІЙ ДОСЛІДЖУВАНИЙ ГРУПІ СВДЧИВ ПРО ВИПАДКОВИЙ РОЗПОДІЛ ГЕНОТИПІВ У ВІДПОВІДНОСТІ З РОЗПОДІЛОМ ХАРДІ-ВАЙНБЕРГА, ЩО СВДЧИТЬ ПРО КОРЕКТНІСТЬ РЕЗУЛЬТАТІВ ГЕНОТИПУВАННЯ. РОЗПОДІЛ ГЕНОТИПІВ ТА АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ПОЛІМОРФІЗМУ 5G/4G В ГЕНІ PAI-1 В ОБОХ ДОСЛІДНИХ ТА КОНТРОЛЬНИЙ ГРУПАХ НАВЕДЕНО В ТАБЛ. 1. МІЖ ГРУПАМИ ПАЦІЄНТІВ З КАРДІОЕМБОЛІЧНИМ ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ НА ФОНІ МИГОТЛИВОЇ АРИТМІЇ ТА З АТЕРОТРОМБОТИЧНИМ ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ ДОСТОВІРНИХ ВІДМІННОСТЕЙ У РОЗПОДІЛІ ГЕНОТИПІВ ВИЯВЛЕНО НЕ БУЛО.

Табл. 1. Розподіл генотипів та алельних варіантів поліморфізму 5G/4G в гені PAI-1

Tab. 1. Genotype and allelic variant distribution of 5G/4G polymorphism in PAI-1 gene

| Група | Пацієнти з кардіоеMBOLІЧНИМ ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ НА ФОНІ МА, n=53 | Пацієнти з атеротромБОТИЧНИМ ІШЕМІЧНИМ ІНСУЛЬТОМ, n=59 | Контрольна група (здорові донори), n=40 |
|-------------------|--|--|---|
| Локус PAI-1 5G/4G | | | |
| Генотипи, n (%) | | | |
| 5G/5G | 9 (17) | 12 (20) | 5 (12,5) |
| 4G/5G | 23 (43) | 21 (36) | 19 (47,5) |
| 4G/4G | 21 (40) | 26 (44) | 16 (40) |
| Алелі (%) | | | |
| 5G | 0,39 | 0,4 | 0,37 |
| 4G | 0,61 | 0,6 | 0,63 |

Також не було виявлено відмінностей у розподілі генотипів досліджуваних груп у порівнянні з контрольною.

При дослідженні кількісних змін PAI-1 у плазмах крові хворих було виявлено коливання концентрацій інгібітора. У групі хворих з атеротромботичним ішемічним інсультом рівень PAI-1 становив $15,26 \pm 2,84$ нг/мл, в той час як за кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії спостерігалось значне відхилення від середнього показника групи. У 60% хворих на кардіоемболічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії концентрація PAI-1 досягала $21,09 \pm 1,02$ нг/мл, перевищуючи показник, характерний для групи хворих з атеротромботичним ішемічним інсультом, майже на 40%.

Висновки. Отримані нами дані вказують на можливе залучення поліморфізму 5G/4G гена PAI-1 у розвитку різних підтипів інсульту. Розширення розміру вибірки хворих може виявити причину зростання концентрації PAI-1 у пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії.

Список літератури:

1. De Jong G., van Raak L., Kessels F., Lodder J. Stroke subtype and mortality. A follow-up study in 998 patients with a first cerebral infarct // *Journal of Clinical Epidemiology*. – 2003. – № 56(3). – P. 262 – 268.
2. Gong L.L., Peng J.H., Han F.F. et al. Association of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor polymorphism with myocardial infarction: a meta-analysis // *Thrombosis Research*. – 2012. – № 130(3). – P. 43 – 51.

3. Incalcaterra E., Meli F., Muratori I. et al. Residual vein thrombosis and onset of post-thrombotic syndrome: Influence of the 4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 gene // *Thrombosis Research*. – 2014. – № 133(3). – P. 371 – 374.
4. Martínez-Calatrava M.J., Martínez-Larrad M.T., Zabena C. et al. 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 // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2007. – № 9(1). – P. 134 – 135.
5. Selected methods for antibody and nucleic acid probes / Hockfield S., Carlson S., Evans C. et al. – USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1993. – 679 P.
6. Singh N.K., Gupta A., Behera D.R., Dash D. Elevated plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) as contributing factor in pathogenesis of hypercoagulable state in antiphospholipid syndrome // *Rheumatology International*. – 2013. – № 33(9). – P. 2331 – 2336.
7. The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2011 / Geneva: World Health Organization. – 2013. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
8. Tjårlund-Wolf A., Brogren H., Lo E.H., Wang X. Plasminogen activator inhibitor-1 and thrombotic cerebrovascular diseases // *Stroke*. – 2012. – № 43(10). – P. 2833 – 2839.
9. Tsantes A.E., Nikolopoulos G.K., Bagos P.G. et al. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk // *Thrombosis Research*. – 2008. – № 122(6). – P. 736 – 742.
10. Чепелевська Л.А., Любінець О.В. Динаміка і структура смертності населення України від зовнішніх причин смерті // *Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я*. – 2008. – № 2. – С. 4 – 9.

STUDY OF PAI-1 5G/4G POLYMORPHISM AND PAI-1 LEVEL IN ATHEROTHROMBOTIC AND CARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKE PATIENTS

O. L. Holodkova, M. K. Burlova-Vasylieva, O. M. Savchuk, N. K. Kravchenko,
V. S. Melnyk, V. U. Shanduk

Atherothrombotic and cardioembolic strokes are the most common subtypes of ischemic strokes. Molecular mechanisms of these pathologies differ, but both conditions are based on the disruption of the fibrinolytic system. One of the key components of fibrinolysis is plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). Thus, the aim of this study was to compare the distribution of genotypes and allelic variants of the PAI-1 gene 5G/4G polymorphism in patients with atherothrombotic ischemic stroke, cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation and practically healthy donors as well as to quantify the inhibitor level in blood plasma of studied individuals. We performed clinical and laboratory examination of 112 patients with acute ischemic stroke, randomized into two groups: patients with atherothrombotic ischemic stroke (n=59) and patients with cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation (n=53). The study also involved practically healthy donors (n=40). Analysis of the conformity of observed genotype frequencies to theoretically expected frequencies in each group testified to the random distribution of genotypes according to the Hardy-Weinberg equilibrium. We found no statistically significant changes of the genotypes distribution between the groups of patients with atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation. Also no difference was found in the genotypes distribution of studied groups compared with the controls. The concentration of PAI-1 in atherothrombotic ischemic stroke was 15.26 ± 2.84 ng/ml, while for cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation a significant deviation from the average was observed. 60% of patients had elevated PAI-1 concentration that reached 21.09 ± 1.02 ng/ml, exceeding practically healthy donors by almost 30%.

Keywords: atherothrombotic ischemic stroke, cardioembolic ischemic stroke, genetic polymorphism, plasminogen activators inhibitor type 1.

Одержано редколегією 13. 11. 2013