

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА В ОЦЕНКЕ РИСКА РАЗВИТИЯ ТРОМБОЗОВ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Субботовская А. И., Цветовская Г. А., Слепухина А. А., Лифшиц Г. И.

Цель. Оценка вклада генетического полиморфизма rs1799889 гена *PAI-1* в развитие гипофибринолиза, с учетом изменения уровня белкового продукта гена у пациентов с тромбозами различной локализации.

Материал и методы. Исследовано 50 пациентов с тромбозами различной этиологии и локализации в анамнезе и 25 пациентов группы контроля — практически здоровых доноров, проживающих на территории г. Новосибирска и Новосибирской области. Всем пациентам проведено генотипирование по полиморфизму -6754G/5G гена *PAI-1* и измерена концентрация уровня ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) в плазме крови.

Результаты. В группах пациентов изучена встречаемость полиморфных вариантов гена *PAI-1* -6754G/5G и определено содержание ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), выявлено влияние генотипов на уровень продуцируемого белка. Выявление сочетания аллельного варианта 4G и высокого уровня белка PAI-1 высокоинформативно при оценке риска развития тромботических событий.

Заключение. Генотипы 4G/4G и 5G/4G гена *PAI-1* в сочетании с повышенным уровнем в крови PAI-1 являются диагностически значимыми маркерами нарушения функционального состояния эндотелия, состояния гипофибринолиза и, как следствие, являются предикторами процесса тромбообразования.

Российский кардиологический журнал 2015, 10 (126): 50–53
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2015-10-50-53>

Ключевые слова: ингибитор активатора плазминогена, PAI-1, полиморфизм гена *PAI-1*, концентрация PAI-1 в крови, тромбоз.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия.

Субботовская А. И. — к.м.н., зав. лабораторией генной диагностики, Цветовская Г. А. — к.б.н., с.н.с. лаборатории генной диагностики, Слепухина А. А. — м.н.с. лаборатории персонализированной медицины, Лифшиц Г. И. — д.м.н., зав. лабораторией персонализированной медицины.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
creobrain@gmail.com

AUC (area under curve) — площадь под кривой, PAI-1 — ингибитор активатора плазминогена 1, ИИ — ишемический инсульт, ТГВ — тромбоз глубоких вен, ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии.

Рукопись получена 08.06.2015
 Рецензия получена 10.06.2015
 Принята к публикации 17.06.2015

PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR GENE POLYMORPHISM IN EVALUATION OF THE VARIOUS LOCALIZATION THROMBOSIS RISKS (PILOT STUDY)

Subbotovskaya A. I., Tsvetovskaya G. A., Slepukhina A. A., Lifshitz G. I.

Aim. Assessment of the impact of genetic polymorphism of rs1799889 gene of *PAI-1* in hypofibrinolytic state development, with the inclusion of the protein product amount shifts, in patients with thrombosis of different localizations.

Material and methods. Totally 50 patients studied with thrombosis of different localization and etiology in anamnesis, and 25 controls — almost healthy donors, living on the territory of Novosibirsk city and the region. All patients underwent genotyping of polymorphism -6754G/5G of the *PAI-1* gene, and concentration of plasminogen activator inhibitor (PAI1) in blood plasma measurement.

Results. In the groups of patients the prevalence studied of the gene *PAI-1* variants -6754G/5G, and the level of PAI1 measured, the influence of genotypes on the level of protein assessed. Assessment of allele variant 4G and high level of PAI1 is highly informative for the estimation of thrombosis risk.

Conclusion. Genotypes 4G/4G and 5G/4G of gene *PAI1*, together with increased level of PAI1 are diagnostically important markers of endothelium dysfunction, hypo fibrinolysis condition and hence are predictors of clotting.

Russ J Cardiol 2015, 10 (126): 50–53
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2015-10-50-53>

Key words: plasminogen activator inhibitor, PAI1, *PAI-1* gene polymorphism, PAI blood concentration, thrombosis.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SD RAS, Novosibirsk, Russia.

Тромбозы различной локализации, венозные тромботические осложнения, объединяющие тромбоз глубоких вен (ТГВ), тромбоэмболию легочной артерии (ТЭЛА), ишемический инсульт (ИИ) представляют огромную проблему современной медицины, являясь одной из основных причин инвалидизации и смертности трудоспособного населения [1]. Венозные тромбозы — частое осложнение хирургических вмешательств, травм, беременности, а также многих острых и хронических заболеваний (инфаркт миокарда, ишемический инсульт, злокачественные образования, инфекции и т.д.) [2–4]. Эмболический механизм, по данным разных

авторов, является причиной развития ишемических нарушений мозгового кровообращения в 50–90% случаев [5, 6].

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. При этом особое внимание уделяется нарушениям функциональных свойств сосудистой стенки и снижению фибринолитической активности крови [4, 6–8].

В то же время литературные данные о роли генов-кандидатов тромбофилий в патогенезе тромбоэмболических осложнений остаются крайне противоречивыми.

В работах, ранее опубликованных нами, показано, что при решении вопроса о наличии генетически обусловленной тромбофилии, необходимо обязательное тестирование полиморфизмов генов всех звеньев системы гемостаза [9, 10].

В задачи настоящей работы входило исследование роли генетической составляющей в оценке гипотезы бринолиза — одного из значимых факторов риска развития тромботических осложнений различной локализации.

С этой целью выполнено генотипирование по генному полиморфизму *PAI-1* -675 5G/4G образцов венозной крови у жителей Западно-Сибирского региона (г. Новосибирска и Новосибирской области) — практически здоровых и с верифицированным диагнозом тромбозов различной локализации — и измерение содержания белкового продукта гена *PAI-1*, ингибитора активатора плазминогена. Проведен анализ ассоциации показателей и оценка риска развития венозных и артериальных тромбозов по содержанию *PAI-1* в крови.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 75 пациентов в возрасте от 16 до 65 лет, из них 16 мужчин и 59 женщин, проживающих на территории г. Новосибирска и Новосибирской области. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Получено письменное информированное согласие каждого участника исследования. В зависимости от предшествующего исследованию анамнеза пациенты были разделены на 2 группы: группа I — 25 практически здоровых доноров, не отметивших клинических проявлений тромбозов; группа II — 50 пациентов с тромбозами различной этиологии и локализации в анамнезе. Анализируемые группы были сопоставимы по полу и возрасту (табл. 1).

Под наблюдением находились 13 больных с ТЭЛА, у 5-ти пациентов отмечены неоднократные эпизоды ТЭЛА, у 37 пациентов тромботические осложнения проявились в виде ТГВ.

Всем пациентам, принявшим участие в исследовании, было проведено генотипирование полиморфных вариантов гена *PAI-1* методом Real-time ПЦР с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, специфичных полиморфному участку ДНК, тестирование проводилось с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Определение содержания белка *PAI-1* проводилось в цитрат — стабилизированной плазме венозной крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием ком-

Таблица 1

Поло-возрастная характеристика пациентов, включённых в исследование

	Группа I, n=25	Группа II, n=50	
Женщины, n (%)	21 (84,0)	38 (76,0)	$\chi^2 = 0,704$
Мужчины, n (%)	4 (16,0)	12 (24,0)	$p=0,553$
Возраст, г (X±SD)	37,4±10,9	39,2±12,2	$p=0,471$ по критерию Манна - Уитни

Таблица 2

Частота встречаемости полиморфных вариантов гена *PAI-1* в исследуемых группах

Генотип	Группа I, n (%)	Группа II, n (%)	χ^2	p
5G5G	14 (58,3)	7 (14,3)	20,83	$p<0,0001$
5G4G	9 (37,5)	17 (34,7)		
4G4G	1 (4,2)	25 (51,0)		

мерческой тест-системы “Technoclone *PAI-1* Antigen ELISA” (Technoclone, Германия).

Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ SPSS v.20.0. Для данных, распределенных по нормальному закону, вычисляли средне-выборочные характеристики: $\bar{x}$ — среднее арифметическое, s — среднее квадратичное отклонение, m — ошибку среднего; при непараметрическом распределении — M — медиану и 25-й и 75-й квартили [Q25:Q75]. Для оценки достоверности различий 2 выборок использовали критерии Манна-Уитни для независимых выборок. Для оценки достоверности различий 3 и более выборок использовали критерии Краскела-Уоллиса для независимых выборок. Значимость различий качественных данных оценивали с использованием критерия χ^2 и точного теста Фишера (при частоте встречаемости исследуемого признака менее 5). Различия считались значимыми при уровне значимости $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что инсерционно-делеционный полиморфизм 5G/4G в промоторном регионе гена *PAI-1* находится в гомозиготном состоянии примерно у 25% общей популяции. При сравнении групп доля гомозиготного варианта 4G/4G в группе пациентов, имеющих тромбоз в анамнезе, составила 51,0%, что статистически значимо выше встречаемости данного генотипа в группе здоровых доноров 4,2% ($\chi^2=20,83$, $p<0,0001$), (табл. 2).

Также нами были использованы данные, характеризующие распределение генотипов *PAI-1* -675 4G/5G в популяции Западно-Сибирского региона (6339 чел., f.var. 5G=0,45), полученные в нашем институте в течение последних лет и подходящих в качестве популяционного контроля. Распределение частот не откло-

Таблица 3

Уровень PAI в зависимости от полиморфного варианта гена *PAI-1*

Генотип	PAI-1, нг/мл М [Q25:Q75]	p по критерию Манна-Уитни	p по критерию Краскела-Уоллиса
5G5G, (1)	26,14 [16,98: 45,00]	$p_{12}=0,037$	$p<0,0001$
5G4G, (2)	45,36 [21,08: 55,44]		
4G4G, (3)	53,47 [43,11: 66,05]	$p_{13}<0,0001$	

Таблица 4

Характеристики ROC-кривой. Прогностическая роль уровня белка PAI-1 в плазме у пациентов с тромботическими эпизодами в анамнезе

Показатель	Точка отсечения	AUC	p	Чувствительность, %	Специфичность, %
PAI, нг/мл	37,1	0,959	$p<0,0001$	93,2	99,2

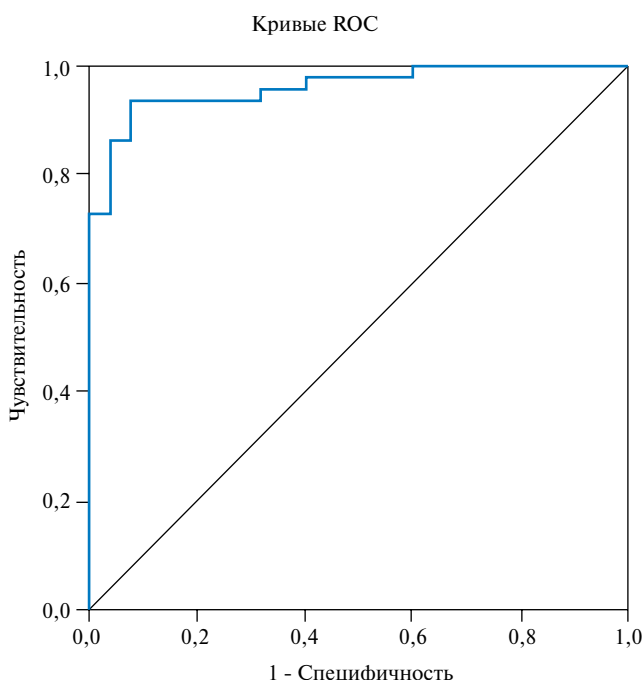


Рис. 1. ROC-анализ уровня PAI-1 у пациентов с тромбозом в анамнезе.

няется от равновесия Харди-Вайнберга. При сравнении группы II с популяционным контролем получаем значимые отличия встречаемости аллельных вариантов 4G и 5G в группах, встречаемость варианта 4G у пациентов с тромбозами выше (ОШ=1,764, ДИ=1,151-2,705, $\chi^2=6,97$, $p=0,00830$), как и генотипа 4G/4G, в сравнении с генотипом 5G/5G: ОШ=2,411, ДИ=1,040-5,591; $\chi^2=4,48$, $p=0,03430$.

Таким образом, наличие у пациента аллельного варианта 4G гена *PAI-1*, генотипа 4G/4G может расцениваться как фактор риска развития тромбоза у пациентов — жителей Сибирского региона. Обращает на себя внимание мета-анализ

объемом 9200 человек, где исследователи изучают роль полиморфизма -675 4G/5G гена *PAI-1* на различных моделях сравнения, считая вариантом риска тромбоэмболизма указанные выше аллель и генотип с ОШ более 2 по нескольким признакам выделения групп [11].

Аллельный вариант 4G, который сопровождается повышенной экспрессией гена и приводит к повышению в крови концентрации белка PAI-1 [12], зарегистрирован нами в 85,7% случаев обследованных пациентов с тромбозами.

PAI-1 относится к семейству сериновых протеаз и играет ключевую роль в системе фибринолиза, ингибируя генерацию плазмина. Основной функцией его является расщепление фибринового сгустка, тем самым замедляя процессы фибринолиза и потенциально способствуя более длительной персистенции тромба. В проведенном исследовании получено, что у пациентов с тромбозом в анамнезе уровень PAI-1 в плазме в 2,4 раза выше (50,34 vs 21,24), чем в группе условно-здоровых доноров ($p<0,0001$, по критерию Манна Уитни).

Исследуемый полиморфизм гена *PAI-1* расположен в промоторной области и, соответственно, оказывает влияние на уровень белкового продукта в крови. Было показано, что промоторный вариант 5G в отличие от варианта 4G содержит дополнительный сайт связывания супрессора транскрипции, тем самым ингибируя синтез белкового продукта [13]. Анализ содержания белка PAI-1 в плазме венозной крови в зависимости от полиморфного варианта гена *PAI-1* выявил статистически значимо более высокий уровень белкового продукта у носителей аллеля 4G (табл. 3).

Возможность использования содержания белка PAI-1 в плазме венозной крови для оценки риска развития тромбоза была проверена с использованием ROC-анализа (рис. 1). Площадь под кривой (AUC)

для уровня белка PAI-1 составила 0,959, что позволяет расценивать исследуемый показатель в качестве классификатора риска развития тромботических осложнений (табл. 4).

При этом значение концентрации белка PAI-1 более 37,1 нг/мл значительно повышает риск развития тромбоза с чувствительностью 93,2% и специфичностью 99,2% (табл. 4).

Заключение

Молекулярно-генетическое тестирование генного полиморфизма — 6755G/4G *PAI-1* вносит весомый вклад при решении вопроса о наличии риска гипофибринолиза, как одного из компонентов состояния тромботической готовности. Пациенты, у которых наблюдается сочетание минорного аллеля с другими тромбогенными факторами, должны быть включены в группы риска развития тромботических осложне-

ний, даже если на момент обследования данных за наличие тромбинемии у них не выявляется.

Генотип 4G/4G достоверно приводит к повышению уровня PAI-1 в крови. В то же время сочетание аллельного варианта 4G гена *PAI-1* и повышение концентрации в плазме белка PAI-1 более 37,1 нг/мл является диагностически значимым маркером состояния гипофибринолиза и высокого риска тромбообразования, что впервые показано нами на пациентах, перенесших тромбозы, — жителях г. Новосибирска и области [14].

Благодарности. Работа выполнена в рамках Госконтракта “Разработка портативного устройства для мультипараметрического контроля функциональных свойств систем свертывания крови человека”, соглашение № 14.607.21.0066, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0025.

Литература

1. Søgaard KK, Schmidt M, Pedersen L, et al. 30-year mortality after venous thromboembolism: a population-based cohort study. *Circulation*. 2014; 130(10): 829-36.
2. Vorob'yova NM, Panchenko EP, Andriyashkin VV, et al. Factors responsible for the effectiveness of anticoagulation therapy in patients with venous thromboembolism. *Flebologiya* 2010; 4(3): 13-20. Russian (Н.М. Воробьева, Е.П. Панченко, В.В. Андрияшкин и др. Факторы, определяющие эффективность антикоагулянтной терапии у больных с венозными тромбозомболическими осложнениями. *Флебология*. 2010; 4 (3): 13-20).
3. Buesing KL, Mullapudi B, Flowers KA. Deep venous thrombosis and venousthromboembolism prophylaxis. *Surg Clin North Am*. 2015 Apr; 95(2): 285-300.
4. Makatsaria AD, Saidov AD, Zavolovskaya MU, et al. The role of genetic thrombophilia in the structure of thrombotic-related complications in gynecological patients high-risk perioperative. *Med. Science*. 2008; 1: 7-10. Russian (Макацария А.Д., Саидова А.Д., Заволовская М.Ю. и др. Роль генетической тромбофилии в структуре тромботических осложнений у гинекологических больных высокой группы риска в периоперационном периоде. *Мед. Науки*. 2008; 1: 7-10).
5. Ovcharenko SI, Sleep EA, Okisheva EA, et al. Thrombophilia as a cause of pulmonary artery thrombosis. *Trudniy pacient*. 2008; 2-3 URL: <http://t-patient.ru/articles/6288/> Russian (Овчаренко С.И., Сон Е.А., Окишева Е.А. и др. Тромбофилия как причина тромбоза лёгочных артерий. *Трудный пациент*. 2008; 2-3. URL: <http://t-patient.ru/articles/6288/>).
6. Suslin ZA, Yerofeyev AV, Tanashyan MM, et al. Ischemic strokes: hemostasis and factors of cerebral embolism. *Stroke: Appendix to the Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2006; 16: 3-9. Russian (Суслина З.А., Ерофеева А.В., Танащян М.М. и др. Ишемические инсульты: состояние гемостаза и факторы церебральной эмболии. *Инсульт: Приложение к Журналу неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2006; 16: 3-9).
7. Rabinovich A, Cohen JM, Kahn SR. The predictive value of markers of fibrinolysis and endothelial dysfunction in the post thrombotic syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost*. 2014; 111(6): 1031-40.
8. Abdullah WZ, Idris SZ, Bashkar S, et al. Role of fibrinolytic markers in acute stroke. *Singapore Med J*. 2009; 50(6): 604-9.
9. Tsvetovskaya GA, Chikova ED, Lifshits GI, et al. Genetic risk factors of thrombophilia for women of childbearing age in west-siberian region. *Fundamental research*. 2010; 10: 72-9. Russian (Цветовская Г.А., Чикова Е.Д., Лифшиц Г.И. и др. Генетические факторы риска тромбофилии у женщин репродуктивного возраста в западно-сибирском регионе. *Фундаментальные исследования*. 2010; 10: 72-9).
10. Tsvetovskaya GA, Chikova ED, Koh NV, et al. The value of molecular-genetic methods of diagnostics in the prevention of ischemic stroke. *Fundamental research*. 2014; 7(5): 1039-43. Russian (Цветовская Г.А., Чикова Е.Д., Кох Н.В. и др. Значение молекулярно-генетических методов диагностики в профилактике ишемических инсультов. *Фундаментальные исследования*. 2014; 7(5): 1039-43).
11. Wang J, Wang C, Chen N, et al. Association between the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of venous thromboembolism: a meta-analysis. *Thromb Res*. 2014; 134(6): 1241-8.
12. Huang J, Sabater-Lleal M, Asselbergs FW, et al. Genome-wide association study for circulating levels of PAI-1 provides novel insights into its regulation. *Blood*. 2012; 120(24): 4873-81.
13. Burzotta F, Di Castelnuovo A, Amore C, et al. 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasminic PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb Haemost*. 1998; 79(2): 354-8.
14. Novikova YaV, Shevela AI, Lifshits GI. Polymorphic variant *CYP2C9* and *VKORC1* in patients with pathology of the venous system of legs. *Outpatient surgery*. 2007; 4: 153-4. Russian (Новикова Я.В., Шевела А.И., Лифшиц Г.И. Полиморфные варианты *CYP2C9* и *VKORC1* у пациентов с патологией венозной системы нижних конечностей. *Амбулаторная хирургия*, 2007; 4: 153-4).