

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ МОЛОДОГО И СРЕДНЕГО ВОЗРАСТА НА ФОНЕ КОНСТИТУЦИОНАЛЬНОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Овсянникова А.Н.¹, Машин В.В.¹, Белова Л.А.¹, Абрамова В.В.¹

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия (432017, Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42), e-mail: anna-ovs73@mail.ru.

Изучен полиморфизм генов системы гемостаза у больных ишемическим инсультом (ИИ) молодого и среднего возраста на фоне конституциональной венозной недостаточности. Для исследования были выбраны описанные в литературе полиморфные варианты генов — кандидатов ишемического поражения головного мозга: полиморфизм 20210G>A гена FII, полиморфизм 1691G>A гена FV, полиморфизм-455G>A гена FGB, полиморфизм -6755G>4G гена PAI-1, полиморфизм 807C>T гена ITGA2 и полиморфизм 1565T>C гена ITGB3. Установлено, что генетическая предрасположенность к тромбофилическим состояниям играет существенную роль в развитии ишемического инсульта у людей молодого и среднего возраста. Выявлена ассоциация полиморфизма 20210G>A гена FII, 1691G>A гена FV («Лейденская мутация»), 675 5G>4G гена PAI-1 с развитием ИИ у лиц молодого и среднего возраста с конституциональной венозной недостаточностью. Полиморфизм гена фибриногена 455 G>A, напротив, чаще встречался у больных ИИ, не имеющих симптомов конституциональной венозной недостаточности.

Ключевые слова: полиморфизм генов, ишемический инсульт, тромбофилия, конституциональная венозная недостаточность

THE POLIMORPHISM OF HEMOSTASIS SYSTEM GENES IN YOUNG AND MIDDLE AGE PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE AND CONSTITUTIONAL VENOUS INSUFFICIENCY

Ovsyannikova A.N.¹, Mashin V.V.¹, Belova L.A.¹, Abramova V.V.¹

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation (432017, 42, Lva Tolstogo street), e-mail: anna-ovs73@mail.ru

The polymorphisms of the hemostatic system genes in young and middle age patients with ischemic stroke (IS) and constitutional venous insufficiency was studied. Polymorphic variants of candidate genes of ischemic brain lesions described in the literature were chosen for the research: polymorphism 20210G>A FII gene, polymorphism of 1691G>A FV gene, polymorphism-455G>A FGB gene, polymorphism-6755G>gene 4G PAI-1, polymorphism 807C>T ITGA2 gene and polymorphism T>ITGB3 gene. Concluded that genetic susceptibility to thrombophilic conditions plays a large role in ischemic stroke in young and middle age patients. The association of polymorphism 20210G>A gene FII, 1691G>A FV gene («Leiden mutation»), 675 5G>4G the PAI-1 gene with the development of IS in young and middle age patients with constitutional venous insufficiency was found. Gene polymorphism of the fibrinogen 455 G>A on the contrary was more frequent in patients with IS and without symptoms of constitutional venous insufficiency.

Keywords: polymorphism gene, ischemic stroke, thrombophilia, constitutional venous insufficiency

Среди актуальных и приоритетных проблем современной неврологии инсульты прочно удерживают лидирующее положение в связи с их значительной распространенностью, высокой смертностью и степенью инвалидизации населения в экономически развитых странах, а также большими финансовыми затратами на лечение и реабилитацию [5, 6]. В последнее время отмечается рост распространенности заболеваний острыми нарушениями мозгового кровообращения, при этом увеличивается распространенность инсульта, особенно среди лиц трудоспособного возраста [3]. Несмотря на определенные достижения в области ангионеврологии, последние года отмечены увеличением частоты острых ишемических сосудисто-мозговых заболеваний, что определяет

необходимость дальнейшего изучения различных аспектов проблемы ишемического инсульта [4]. В подавляющем большинстве случаев ишемический инсульт (ИИ) — мультифакториальное заболевание, в развитии которого наряду с другими факторами несомненную роль играют изменения в системе гемостаза [4, 5]. В последнее десятилетие значительное внимание уделяется изучению влияния генетической предрасположенности на состояние свертывающей системы крови. К настоящему времени установлено влияние полиморфизма ряда генов, белковые продукты которых регулируют систему гемостаза, на риск развития сосудистой патологии [9, 10].

Инсульт в большинстве случаев развивается на фоне хронической недостаточности мозгового кровообращения, в патогенез которой свой вклад вносит патология не только артериального, но и венозного русла мозга [1]. В настоящее время наиболее общепризнанной является гипотеза о врожденном происхождении хронической церебральной венозной недостаточности [8]. В 1995 г. D.M. Moody и соавт. выявили новый тип патологии сосудов мозга — перивентрикулярные венозные коллагенозы (ПВК). Предложенные механизмы развития ПВК также включают генетическую детерминированность данной патологии [7].

Учитывая многообразие патогенетических вариантов формирования сосудистой мозговой недостаточности, актуальной является оценка роли нарушений как артериального, так и венозного компонентов мозгового кровотока в развитии цереброваскулярных заболеваний [1, 2].

Цель исследования

Изучить полиморфизм генов системы гемостаза как предиктора развития ИИ у лиц молодого и среднего возраста на фоне конституциональной венозной недостаточности (КВН).

Материалы и методы

Обследованы 172 пациента в остром периоде ишемического инсульта в возрасте от 25 до 60 лет включительно. В числе обследованных было 69 женщин (40,1%) и 103 мужчины (59,9%). Средний возраст женщин $56,1 \pm 6,02$ лет, мужчин $55,3 \pm 8,32$ лет. Средний возраст всех больных составил $55,7 \pm 7,43$ лет.

Всем больным проводилось тщательное клинично-инструментальное обследование с целью верификации сосудистой патологии головного мозга, проявлений конституциональной венозной недостаточности.

Оценка степени тяжести ишемического инсульта проводилась с использованием шкалы тяжести инсульта Национального института здоровья США (the National Institutes of Health Stroke Scale — NIHSS) с интерпретацией результатов данной шкалы по критериям L.V. Goldstein et al., шкалы Рэнкина (RS) и индекса Бартеля (BI).

В соответствии с классификацией НЦ неврологии РАМН (Н.В. Верещагин, Л.К.Брагина, С.Б. Вавилов, 1983) очаги ишемии подразделяли на обширные, большие, средние и малые (лакунарные).

Молекулярно-генетическое исследование проводилось в лаборатории молекулярной и клеточной биологии Научно-исследовательского технологического института имени С.П. Капицы ФГБОУ ВПО Ульяновского государственного университета. Экстракция геномной ДНК проводилась из лейкоцитов замороженной венозной крови с использованием набора Ампли Прайм ДНК-сорб-АМ. Генетические полиморфизмы определяли с использованием комплекта реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития тромбофилии методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени «КардиоГенетикаТромбофилия», разработанным компанией «ДНК-Технология». Регистрационный номер 2010/08414 от 22.07.2010 г. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе в реальном времени CFX96. Использовалась технология выявления и идентификации SNP методом ПЦР с анализом кривых плавления («ДНК-Технология»).

Проводился анализ полиморфизмов генов, кодирующих белки системы свертывания крови и гемостаза: полиморфизм 20210G>A гена FII, полиморфизм 1691G>A гена FV, полиморфизм -455G>A гена FGB, полиморфизм -675 5G>4G гена PAI-1, полиморфизм 807C>T гена ITGA2, полиморфизм 1565T>C гена ITGB3.

Среди обследованных пациентов с ИИ выделены группы больных в зависимости от наличия и отсутствия КВН: группа больных ИИ и КВН и группа больных ИИ без КВН.

Критериями включения в группу с КВН являлись наличие жалоб, обусловленных венозной церебральной дисциркуляцией, наличие нескольких типичных локализаций венозной патологии (варикозное расширение и тромбоз вен нижних конечностей, геморрой, варикоцеле, варикозное расширение вен пищевода), семейный «венозный анамнез».

Критерием исключения было наличие соматических заболеваний, которые могли бы

явиться причиной вторичных нарушений венозного кровообращения.

У больных группы ИИ без КВН отсутствовали венозная патология типичных локализаций и «венозный анамнез».

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ «Statistica 8.0». При описании результатов исследования количественные данные представлены в виде $M (\pm \sigma)$, где M - среднее арифметическое, σ - стандартное отклонение. Качественные данные представлены в виде абсолютных значений и процентов. Группы сравнивались по качественным данным с помощью χ^2 , точного критерия Фишера. Достоверность различий в выборках по количественным признакам оценивали по критерию Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при уровне вероятности более 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Группу больных ИИ с КВН составили 94 пациента (56,7%). Из них женщин 30 (31,9%), мужчин 64 (68,1%). Средний возраст больных $54,6 \pm 7,02$. Средний возраст женщин $55,4 \pm 3,64$ лет, средний возраст мужчин $54,7 \pm 3,34$ года.

В группу больных ИИ без КВН вошли 78 человек (45,3%), из них женщин 37 (47,4%), мужчин 41 (52,6%). Средний возраст больных $56,2 \pm 8,46$ лет.

Обращало на себя внимание преобладание лиц молодого возраста (согласно

возрастной классификации ВОЗ, 2009) в группе больных с КВН (22 (23,4%) и 9 (11,5%), $p=0,04$).

Распределение пациентов по полу показало преобладание в группе больных ИИ с проявлениями КВН лиц мужского пола — 64 пациента (68,1%) и 41 пациент (52,6%). Среди больных ИИ без проявлений КВН преобладали женщины — 37 (47,4%) и 30 пациентов (31,9%) соответственно.

У больных ИИ с КФП варикозное расширение вен диагностировано у 64 человек (68,1%), тромбоз вен нижних конечностей в анамнезе — у 15 пациентов (16%), 8 пациентов (8,5%) страдали хроническим геморроем, у 7 больных (7,4%) диагностировано варикоцеле.

По результатам РКТ головного мозга в группе больных ИИ с проявлениями КВН отмечалось преобладание средних инфарктов — 65 пациентов (69,1%), среди больных ИИ без КВН ишемические очаги средних размеров выявлены у 21 пациента (26,9%), $p=0,0001$; в то время как среди больных ИИ без КВН преобладали очаги больших размеров — у 24 (30,8%) больных второй группы и 12 человек (12,7%) первой группы, $p=0,04$. Обширные и малые (лакунарные) ишемические очаги диагностированы в двух группах одинаково часто (3(3,2%) и 8 (10,3%) и 14 (14,9%) и 25 (32,1%) пациентов соответственно, $p>0,05$).

По локализации ишемического очага среди больных ИИ с КВН преобладали полушарные ишемические инсульты (59,6%); в группе больных ИИ без КВН напротив, чаще встречалась локализация очага инфаркта в вертебрально-базилярном бассейне (60,3%), $p=0,01$. Различий по локализации зоны инфаркта в правом или левом полушарии головного у больных данных групп не выявлено.

В клинической картине заболевания у пациентов имело место сочетание общемозговых и очаговых симптомов. Очаговая неврологическая симптоматика была обусловлена локализацией фокального поражения головного мозга. Среди общемозговых симптомов, наиболее распространена была головная боль. Жалобы на головную боль предъявляли все пациенты с

ИИ и КВН (100%), а среди пациентов с ИИ без КВН этот симптом встречался у 49 (62,8%) пациентов. Выраженность головной боли по визуальной-аналоговой шкале (ВАШ) составила в группе больных ИИ и КВН от 3 до 9 баллов, в среднем $5,9 \pm 1,61$ балла, в группе пациентов ИИ без КВН $4,9 \pm 2,04$ (диапазон от 1 до 9) баллов.

Пациенты из группы с КВН чаще предъявляли жалобы на ночные и утренние головные боли (59,6%) затылочной локализации (68,1%) или диффузного характера (30,8%), распирающие (24,4%), тупые (17,1%), усиливающиеся при воздействии факторов, ухудшающих венозный отток из полости черепа (72,3%).

Для больных ИИ без КВН характерны головные боли, возникающие во второй половине дня (75,6%), после психоэмоционального напряжения (33,3%), длительного вынужденного положения головы и шеи (69,2%), давящие (41,1%), «по типу обруча» (29,4%).

Жалобы на головокружение чаще предъявляли больные из группы пациентов с ИИ и КВН (64,9%) по сравнению с больными ИИ без КВН (48,7%), $p=0,01$.

Оценка клинического состояния пациентов проводилась как при поступлении, так и на 21-й день заболевания с использованием шкалы инсульта Национального института здоровья (National Institutes of Stroke Scale – NIHSS), шкалы Рэнкина (RS) и индекса Бартеля (BI). Средние значения оценок по этим шкалам при поступлении составили: NIHSS – $10,3 \pm 2,24$; RS – $4,2 \pm 1,93$; BI – $33,2 \pm 17,0$ для пациентов с ИИ и КФП. Для пациентов с ИИ без КФП: NIHSS – $9,8 \pm 2,15$; RS – $4,6 \pm 1,03$; BI – $34,6 \pm 16,2$ для пациентов с ИИ и КФП. На 21-й день заболевания оценка по шкалам была следующая: NIHSS – $5,4 \pm 2,13$; RS – $3,7 \pm 0,6$; BI – $59,2 \pm 13,23$ и NIHSS – $4,8 \pm 2,16$; RS – $3,1 \pm 1,14$; BI – $60 \pm 12,14$ соответственно. Достоверных различий по данным критериям в сравниваемых группах не выявлено.

Проведенный анализ распределения полиморфных вариантов исследуемых генов системы гемостаза показал достоверное преобладание в группе больных ИИ с КВН по сравнению с группой больных ИИ без КВН полиморфных генотипов гена FV, гена FII и гена PAI-1, $p < 0,05$.

Полиморфизм 20210 G>A гена FII. При сравнении наблюдаемых частот отдельных генотипов в гене протромбина также выявлено преобладание гетерозиготного генотипа G/A в группе больных ИИ с КВН. Так, данный генотип выявлен у 10 пациентов (10,6%) с ИИ, имеющих симптомы КВН, в группе больных ИИ без КВН генотип G/A встречался у 4 человек (5,1%) – 6,9%, $p < 0,05$. Достоверных различий в распределении генотипа G/G в исследуемых группах не выявлено.

Полиморфизм 1691G>A гена FV («Лейденская мутация»). При анализе Лейденской мутации (1691G>A) в гене FV выявлены статистически значимые различия в общем распределении наблюдаемых генотипов в исследуемых группах больных. При сопоставлении частот отдельных генотипов нами установлено, что гетерозиготное носительство Лейденской мутации (генотип G/A) достоверно чаще встречается в группе больных с ИИ и КВН – у 16 (17,1%) больных, по сравнению с группой больных ИИ без КВН – 4 (5,1%), ($p < 0,05$). Нейтральный генотип G/G встречался одинаково часто у больных ИИ с проявлениями КВН и у больных ИИ без КВН — 78 (82,9%) и 74 (94,9%) соответственно, $p > 0,05$.

Полиморфизм -675 5G>4G гена ингибитора активатора плазминогена (PAI-1). Анализ полиморфизма 5G (-675) 4G гена ингибитора активатора плазминогена показал, что в группе больных ИИ с КВН достоверно чаще по сравнению с группой больных ИИ без КВН встречалось как гетерозиготное носительство, так и гомозиготное носительство данного гена. Так, генотип -675 5G>4G выявлен у 31 пациента (32,9%) с проявлениями КВН и у 12 пациентов (15,4%) без проявлений КВН; генотип -675 4G>4G диагностирован у 14 (14,9%) больных и 8 (10,2%) соответственно, $p < 0,05$. Носители «нейтрального» генотипа 5G/5G по нашим наблюдениям встречаются одинаково часто в двух сравниваемых группах, $p > 0,05$ (табл. 1).

Таблица 1

Частота встречаемости генотипов генов FGB, FII, FV у больных с ИИ и КВН и ИИ без КВН

Обследованные группы	Исследованные гены, выявленные генотипы, n (%)								
	FGB (-455G>A)			F V (1691 G>A)			Ген F II (20210 G>A)		
	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A
Больные ИИ с КВН	69 (73,4)	25 (26,6)	-	78 (82,9)	16 (17,1)*	-	84 (89,4)	10 (10,6)*	-

Больные ИИ без КВН	43 (55,1)	33 (42,3)*	2 (2,6)	74 (94,9)	4 (5,1)	-	76 (97,4)	2 (2,6)	-
--------------------	--------------	---------------	------------	--------------	------------	---	--------------	------------	---

Примечание: *— статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$.

Полиморфизм -455G>A в гене фибриногена. При сравнении наблюдаемых частот отдельных генотипов в гене фибриногена выявлено достоверное преобладание гетерозиготного генотипа G/A среди больных с ИИ без КВН – 42,2% по сравнению с группой больных ИИ и КВН – 26,6% ($p < 0,05$). Гомозиготный генотип A/A, ассоциированный с наибольшим риском тромбофилических состояний, выявлен только в группе больных, не имеющих признаков КВН. Полученные результаты обследования данной выборки больных подтверждают данные о значительном вкладе полиморфизма гена FGB в развитие артериального тромбоза.

Выявленные различия в распределении полиморфных вариантов генов ITGA2 и ITGB3 в сравниваемых группах не достигают уровня статистической значимости, $p > 0,05$ (табл. 2).

Таблица 2

Частота встречаемости генотипов генов PAI-1, ITGA2, ITGB3 у больных с ИИ и КВН и ИИ без КВН

Обследованные группы	Исследованные гены, выявленные генотипы, n (%)								
	Ген PAI-1 (-675 5G>4G)			Ген ITGA2 (807 C>T)			Ген ITGB3 (1565 T>C)		
	5G/5G	5G/4G	4G/4G	C/C	C/T	T/T	T/T	C/T	C/C
Больные ИИ с КВН	49 (52,2)	31 (32,9)*	14 (14,9)*	75 (79,8)	11 (11,7)	8 (8,5)	63 (67,1)	31 (32,9)	-
Больные ИИ без КВН	58 (74,4)	12 (15,4)	8 (10,2)	56 (71,8)	16 (20,5)	6 (7,7)	58 (74,4)	20 (25,6)	-

Примечание: *— статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$.

Выводы:

1. Конституциональная венозная недостаточность у больных ишемическим инсультом молодого и среднего возраста определяет более выраженную общемозговую симптоматику в остром периоде заболевания, в то же время не влияет на функциональный исход неврологического дефицита к концу первого месяца заболевания.
2. Выявлена ассоциация полиморфизма 20210G>A гена протромбина (FII), 1691G>A гена FV («Лейденская мутация»), 675 5G>4G гена ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) с

развитием ишемического инсульта у лиц молодого и среднего возраста с конституциональной венозной недостаточностью. Полученные данные свидетельствуют о наличии в данной группе больных с ИИ полиморфизма генов, белковые продукты которых осуществляют первую и вторую фазы коагуляционного гемостаза, а также влияют на функционирование системы фибринолиза.

3. Полиморфизм гена фибриногена –455 G>A как в гомозиготном, так и в гетерозиготном варианте преобладает у больных ИИ, не имеющих симптомов конституциональной венозной недостаточности.

Список литературы

1. Белова Л.А. Роль артериовенозных взаимоотношений в формировании клинко-патогенетических вариантов гипертонической энцефалопатии // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2012. — № 6. — С. 8–12.
2. Бокерия Л.В., Бузиашвили Ю.И., Шумилина М.В. Нарушения церебрального венозного кровообращения у больных с сердечно-сосудистой патологией (головная боль, ишемия, атеросклероз). М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2003. С.162.
3. Котова Е.Ю., В.В. Машин. Основные эпидемиологические характеристики инсульта и дополнительные методы обследования больных инсультом в г. Ульяновске (по данным Регистра инсульта) // Бюллетень сибирской медицины. 2008. — № 5, Т. 3:179.
4. Машин В.В., Котова Е.Ю. Пинкова Е.А. Заболеваемость и факторы риска инсульта. Возможности профилактики // Неврологический вестник журнал имени В.М. Бехтерева, Казань, Т. XXXIX. — Вып. 1. — Материалы научного конгресса «Бехтерев — основоположник нейронаук: творческое наследие, история и современность» (приложение к журналу). — 2007. — С. 156–157.
5. Суслина З.А., Танащян М.М., Ионова В.Г. Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антитромботическая терапия // М., 2005. – 246 с.
6. Alberts M.J. Secondary prevention of stroke and expanding role of the neurologist. *Cerebrovascular Diseases*, 2002; 13 (Suppl. 1): 12-16.
7. Broun W.R., Thore Cl. R. Perivascular fibrosis in multiple sclerosis lesions // *Brain Pathol.* — 2011 May; 21 (3): 355.
8. Byung-Boong L. E. E. Venous embryology: the key to understanding anomalous venous conditions // *Damar Cer Derg.* – 2012. – V. 19. — № 4. – P. 170–182.
9. Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin Chim Acta.* 2003; 330; 31-55.

10. Martiskainen M., Pohjasvaara T., Mikkelsen J. Fibrinogen gene promoter -455 A allele as a risk factor for lacunar stroke // Stroke. — 2003. — V. 34, № 4. — P. 886–891.

Рецензенты:

Саенко Ю.В., д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной и клеточной биологии НИТИ имени С.П. Капицы, ФГБОУ ВПО УлГУ, г. Ульяновск;

Белова Л. А., д.м.н., профессор кафедры неврологии, нейрохирургии, физиотерапии и ЛФК ИМЭиФК УлГУ, г. Ульяновск.