

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152.3

© Коллектив авторов

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА ТИПА 1, УРОВЕНЬ ПЛАЗМИНОГЕНА И ТРОМБОЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ

Р.Б. Айсина^{1}, Л.И. Мухаметова¹, Е.В. Острякова², Н.В. Середавкина²,
Л.И. Патрушев³, Н.Л. Патрушева³, Т.М. Решетняк², Д.А. Гулин⁴,
К.Б. Гершкович⁴, Е.Л. Насонов², С.Д. Варфоломеев¹*

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", Химический факультет, 119992 Москва; факс: (495)9395417; эл. почта: aisina2004@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт ревматологии" РАМН (ФГБУ "НИИР" РАМН)

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук" (ФГБУН "ИБХ" РАН)

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН" (ФГБУН "ИБХФ" РАН)

Проведено исследование частоты артериальных и венозных тромбозов и уровня плазминогена у 78 пациентов с антифосфолипидным синдромом (APS), 35 из них с системной красной волчанкой (SLE+APS), 43 – с первичным антифосфолипидным синдромом (PAPS). Уровни ингибитора активаторов плазминогена типа 1 (PAI-1), а также генотип PAI-1 определены у 45 пациентов с APS, из них 21 пациент с SLE+APS и 24 пациента с PAPS. Группу контроля составили 10 человек без признаков аутоиммунного заболевания и тромбозов на период исследования и в анамнезе. Впервые показано, что у трети из 67 пациентов с APS, имевших тромбозы, высоко позитивные уровни антифосфолипидных антител (aPL) ассоциируются с низким уровнем плазминогена. Уровни антигена PAI-1, измеренные иммуноферментным методом, который детектирует активный, латентный и связанный с активаторами плазминогена PAI-1, были сопоставлены с частотой тромбозов у пациентов с APS. Обнаружена взаимосвязь высоких и повышенных уровней антигена PAI-1 с высоко позитивными уровнями aPL у трети из 43 пациентов с APS и тромбозами. Рассмотрен один из возможных механизмов этой взаимосвязи. Показано, что артериальные и, в большей степени, венозные тромбозы ассоциируются с 4G/5G полиморфизмом гена PAI-1 и высоким уровнем ингибитора в плазме у 79% пациентов с APS. При наличии 4G аллеля пациенты с SLE+APS имели более высокие уровни PAI-1, чем пациенты с PAPS. Полученные результаты показывают, что измерение уровней плазминогена и PAI-1, а также ассоциированного с тромбозами полиморфизма 4G/5G гена PAI-1 может иметь практическую значимость для идентификации высокого риска тромбозов у пациентов с APS.

Ключевые слова: плазминоген, ингибитор активаторов плазминогена типа 1, полиморфизм, антифосфолипидный синдром, тромбозы.

* - адресат для переписки

Принятые сокращения: Pg – пламиноген, uPA – активатор пламиногена урокиназного типа, tPA – тканевый активатор пламиногена, PAI-1 – ингибитор активаторов пламиногена типа 1, AFK-pNA – *n*-нитроанилид CHO-Ala-Phe-Lys, APS – антифосфолипидный синдром, PAPS – первичный антифосфолипидный синдром, SLE – системная красная волчанка, β_2 GPI – β_2 -гликопротеин 1, aPL – антифосфолипидные антитела, aCL – антитела к кардиолипину, LAC – волчаночный антикоагулянт, $\text{a}\beta_2$ GPI – антитела к β_2 -гликопротеину I, GPL и MPL – международные единицы измерения антител к кардиолипину, соответственно для IgG- и IgM.

ВВЕДЕНИЕ. Антифосфолипидный синдром (APS) является аутоиммунным заболеванием, которое определяется сочетанием антифосфолипидных антител (aPL) с характерными клиническими симптомами [1]. Клинические проявления APS разнообразны из-за тромбоза сосудов различной локализации и калибра и обычно имеют рецидивирующее течение [2-4]. К числу характерных проявлений APS относится рецидивирующий синдром потери плода. Для APS типична тромбоцитопения [5].

По современным представлениям aPL – это гетерогенная группа антител, которые включают антитела к кардиолипину (aCL), волчаночный антикоагулянт (LAC) и антитела к β_2 -гликопротеину I ($\text{a}\beta_2$ GPI). Они распознают различные фосфолипиды, фосфолипид-связывающие белки и/или комплексы фосфолипид-белок [6, 7]. Критерием диагноза APS является сочетание тромбоза, акушерской патологии и/или тромбоцитопении с одним из серологических признаков, к которым относятся: aCL, LAC и $\text{a}\beta_2$ GPI [8, 9].

Доказано, что aPL являются патогенетически важным медиатором, вызывающим развитие основных клинических проявлений APS, так как они обладают способностью воздействовать на большинство процессов гемостаза, нарушение которых приводит к гиперкоагуляции. Для объяснения патогенетических свойств aPL в APS предложены различные пути и механизмы [7, 10]. Одним из рассматриваемых механизмов является нарушение фибринолиза [11-16].

Ключевым ферментом системы фибринолиза, ответственным за лизис фибрина тромба, является плазмин, который образуется из пламиногена под действием физиологических активаторов пламиногена урокиназного (uPA) и тканевого типа (tPA) типов. Через лизин-связывающие участки в кринглах плазмин(оген) связывается с фибрином, α_2 -антиплазмином, клеточными рецепторами (такими как аннексин II, α -енолаза, актин, p11, α IIb3 и др. [17]) и лигандами во внеклеточном матриксе (такими как тетрапектин [18]), что облегчает активацию пламиногена в плазмин. Связанный плазмин защищен от инактивации ингибиторами и вовлекается во многие физиологические и патологические процессы [17, 19]. Эти функции плазмينا регулируются специфичностью tPA и uPA к пламиногену и месту его локализации, а также ингибиторами плазмينا и активаторов пламиногена. Показано, что в организме uPA участвует, главным образом, в деградации внеклеточного матрикса, ангиогенезе, ремоделировании тканей и инвазии опухоли [20, 21], в то время как tPA – в фибринолизе [22], а также в патологии и физиологии центральной нервной системы [23].

Считается, что основным аутоантигеном для aPL при APS является β_2 GPI. Однако недавно обнаружено, что некоторые aPL распознают гомологичные антигенные эпитопы на β_2 GPI и протеазных доменах сериновых протеаз, которые вовлекаются в регулирование гемостаза [7]. При этом некоторые aPL

связываются с плазмином сильнее, чем с β_2 GPI, что позволяет рассматривать плазмин в качестве возможного ведущего аутоантигена для некоторых патогенных aPL [24, 25]. Некоторые плазмин-реактивные aPL связываются с tPA [26]. Кроме того, в плазме пациентов с APS обнаружены антитела к плазмину, плазминогену и tPA [24, 27, 28]. В зависимости от протеазы, являющейся мишенью aPL, одни aPL могут промотировать образование тромба, другие – ухудшать растворение тромба.

Основным регулятором фибринолиза является ингибитор активаторов плазминогена типа 1 (PAI-1). В ряде работ показано, что у пациентов с системными заболеваниями, включая APS, фибринолиз снижается, главным образом, благодаря избытку PAI-1 [13, 14, 29, 30]. Обнаруженные другими авторами спорные результаты для таких пациентов [31, 32] могут быть частично объяснены методологией, но могут быть также связаны и с генетическими факторами. Одной из основных мутаций гена PAI-1 является 4G/5G полиморфизм, характеризующийся содержанием 4G или 5G в участке -675 промоторной области гена [33]. Показано, что, по сравнению с носителями аллеля 5G, у носителей аллеля 4G выше концентрация PAI-1 и риск тромбозов. Найдена взаимосвязь 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 с инфарктом миокарда, инсультом и другими тромботическими заболеваниями [34-36].

Публикаций, посвященных изучению полиморфизма гена PAI-1 у пациентов с APS, крайне мало. Одна группа исследователей не выявила значительного влияния полиморфизма гена PAI-1 на риск тромбоза и акушерской патологии у aPL-положительных пациентов [37]. Другие авторы, исследовавшие различные группы пациентов (с первичным или вторичным APS, имевших и не имевших тромбозы), обнаружили более высокую частоту 4G аллеля и уровня PAI-1 у пациентов с APS и артериальными тромбозами [38]. Так как при APS тяжесть и распространенность тромботических осложнений непредсказуемы и часто не коррелируют с изменением уровня aPL, изучение такого прогностического фактора как 4G/5G полиморфизм гена PAI-1 является весьма актуальным.

Цель данной работы – исследование уровней плазминогена и PAI-1 в плазме, 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 и частоты артериальных и венозных тромбозов у пациентов с первичным и вторичным APS.

МЕТОДИКА. В работе использованы: стрептокиназа (47 кДа, 6300 МЕ на мг сухой массы) (“Reyon Pharmaceutical Co. Ltd.” Корея), стандартная плазма человека с известным содержанием плазминогена (“Hemoliance-Assayed Reference Plasma-Normal”, Instrumentation Lab. Company, США), *n*-нитроанилид HCO-Ala-Phe-Lys (AFK-pNA) (“Технология-Стандарт”, Россия), TECHNOZYM PAI-1 Actibind ELISA Kit и TECHNOZYM PAI-1 Antigen ELISA Kit (“Technoclone”, Австрия), Anti-beta-2-GPI ELISA Kit (“ORGENTEC Diagnostika GmbH”, Германия) и трис (2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол) (“Sigma”, США). Остальные реактивы отечественного производства марки “ос. ч.” или “х. ч.”.

Пациенты и группа контроля. В исследование были включены 78 пациентов с APS, из которых у 43 был первичный APS (PAPS) и у 35 – вторичный APS (системная красная волчанка (SLE)+APS), клинические обследования которых были проведены в ФГБУ “НИИР” РАМН. Все больные были включены в исследование после подписания информированного согласия на участие в исследовании. Диагноз SLE был верифицирован согласно критериям Американской Коллегии Ревматологов от 1997 г и APS – по Международным критериям 2004 г. [39, 40]. Уровень плазминогена (Pg)

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

в плазме определяли 78 пациентам с APS. Уровень свободного активного PAI-1 и общего антигена PAI-1 определяли 45 пациентам с APS, из них 24 с PAPS и 21 с SLE+APS. Группу контроля составили 10 человек без признаков аутоиммунного заболевания и тромбозов на период исследования и в анамнезе.

В группе исследования плазминогена тромбозы были зарегистрированы в анамнезе у 67 больных APS, из них у 32 – артериальные, у 53 – венозные, в то же время 14 из этих больных имели сочетанную локализацию тромбозов. В группе исследования PAI-1 тромбозы были зарегистрированы в анамнезе у 43 больных APS, из них у 22 – артериальные, у 33 – венозные, при этом 12 из этих больных имели сочетанные тромбозы. В нашем исследовании анализ проведен только по артериальной и венозной локализации. При рассмотрении сочетанной локализации различий не было выявлено. Клинико-лабораторные данные исследованных больных приведены в таблице 1.

Таблица 1. Клинико-лабораторные параметры больных, в плазме которых определяли уровни плазминогена (Pg) и PAI-1.

Параметры	Больные с измеренным Pg, n=78	Больные с измеренным PAI-1, n=45
Больные APS (n)	78	45
SLE+APS (n)	35	21
PAPS (n)	43	24
Средний возраст (лет)^a	35,6±10,9	36,1±11,0
Длительность заболевания (лет)^a	9,1±8,5	9,0±8,4
Женщины:мужчины (APS)	56:22	31:14
Тромбозы:	67*	55**
Артериальные	32	22
Венозные	53	33
Акушерская патология	25	11
Уровни aCL:		
Высоко позитивные	22	15
Умеренно позитивные	17	12
Низко позитивные	13	7
Негативные	26	11
Уровни aβ₂GPI:		
Высоко позитивные	36	24
	7	3
Умеренно позитивные	10	4
	25	14
Низко позитивные		
Негативные		

Примечание: n - число больных; процент больных с акушерской патологией рассчитан из числа женщин. * - 14 больных имели сочетанную локализацию тромбозов. ** - 12 больных имели сочетанную локализацию тромбозов. а - данные представлены в виде средней ± стандартные отклонения.

Верификация тромбозов проводилась с помощью физикальных методов исследования: методами эхокардиографии, ультразвуковой доплерографии периферических сосудов, а также магнитно-резонансной томографии головного мозга и сцинтиграфии лёгких по показаниям.

Кроме общепринятых методов исследования, больным определяли антифосфолипидные антитела, уровни плазминогена, свободного активного PAI-1 и общего антигена PAI-1.

Антифосфолипидные антитела.

Волчаночный антикоагулянт (LAC) определяли по удлинению времени свертывания в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах при использовании цитратной плазмы, обедненной тромбоцитами, согласно рекомендациям международного комитета по стандартизации LAC [41, 42] и З.С. Баркагана с соавт. [43]. Скрининговыми тестами были активированное частичное тромбопластиновое время, коаиновое время свертывания, тесты с разведенным ядом гадюки Рассела и разбавленным тромбопластином. Подтверждающими тестами была коррекция нарушений при добавлении фосфолипидов и сохранение удлинения времени свертывания при смешивании исследуемой и донорской плазмы.

IgG- и IgM-aCL определяли стандартизованным иммуноферментным методом. За верхнюю границу нормы принята концентрация aCL, превышающая среднее значение данного показателя у доноров на 5 стандартных отклонений, что составило 23 GPL для IgG-aCL и 26 MPL для IgM-aCL. При интерпретации результатов использовались не абсолютные значения в GPL и MPL, а уровни позитивности (для IgG-aCL: >65,0 GPL – высоко позитивный, 35,0-65,0 GPL – умеренно позитивный, 25,0-35,0 GPL – низко позитивный, <25 GPL – негативный; для IgM-aCL: >45 MPL – высоко позитивный, 35-45 MPL – умеренно позитивный, 25-35 MPL – низко позитивный, <25 MPL – негативный). Согласно международным предварительным критериям диагностическими считались высоко и умеренно позитивные результаты.

IgG- и IgM-a β_2 GPI определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов (ELISA Kit “ORGENTEC Diagnostica”, Германия), согласно инструкции фирмы изготовителя. Для IgG- и IgM-a β_2 GPI установлены следующие уровни позитивности: >60,0 Ед/мл – высоко позитивный, 30,0-60,0 Ед/мл – умеренно позитивный, 15,0-30,0 Ед/мл – низко позитивный, <15 Ед/мл – негативный [44].

Фибринолитические параметры.

Определение потенциально активного плазминогена. Метод основан на добавлении в плазму избытка стрептокиназы (SK), которая стехиометрически связывает весь плазменный плазминоген (Pg), и измерении амидазной активности образовавшегося комплекса Pg-SK. В качестве калибратора использовали стандартную плазму человека с известной концентрацией плазминогена (“Hemoliance-Assayed Reference Plasma-Normal”, Instrumentation Lab. Company, USA), а в качестве буфера – 0,2 М Трис-HCl буфер pH 7,4, содержащий 0,22 М NaCl и 0,01% Triton X-100. Предварительно готовили рабочие растворы: растворы стандартной плазмы, разбавленные буфером в 5-50 раз, и растворы плазмы исследуемых пациентов, разбавленные в 10 раз. В ячейки планшета вносили по 50 мкл вышеназванных рабочих растворов стандартной и исследуемых образцов плазмы, добавляли по 50 мкл раствора SK (5000 МЕ/мл) в буфере, выдерживали 2 мин для связывания плазменного плазминогена стрептокиназой при 37°C, вносили по 100 мкл 1,2 mM раствора субстрата плазмина AFK-pNA в дистиллированной воде и регистрировали скорость гидролиза субстрата образовавшимся комплексом Pg-SK по увеличению A405 через 1-минутные интервалы на планшетном фотометре (“Antos 2020”, Австрия), соединённом с компьютером. На основании калибровочной зависимости амидазной

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

активности комплекса Pg-SK ($\Delta A_{405}/\text{мин}$) от концентрации плазминогена, полученной с использованием стандартной плазмы человека, определяли концентрацию потенциально активного плазминогена в образцах плазмы пациентов с APS на основании найденных для них значений $\Delta A_{405}/\text{мин}$. Каждый эксперимент выполняли 2 раза.

Определение активного PAI-1. Концентрацию свободного активного PAI-1 в исследуемых образцах плазмы определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора TECHNOZYM PAI-1 Actibind ELISA Kit ("Technoclone") согласно инструкции фирмы изготовителя.

Определение общего антигена PAI-1. Концентрацию общего антигена PAI-1 (активного, латентного и в составе неактивных комплексов с активаторами плазминогена) в исследуемых образцах плазмы определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора TECHNOZYM PAI-1 Antigen ELISA Kit ("Technoclone") согласно инструкции фирмы изготовителя.

Генотипирование 4G/5G полиморфизма PAI-1. Определение генетических вариантов PAI-1 (4G/4G, 4G/5G и 5G/5G) методом полимеразной цепной реакции проводилось в группе анализа и коррекции генома (руководитель д.б.н. Л.И. Патрушев) лаборатории биотехнологии ФГБУН "ИБХ" РАН.

Статистический анализ. Результаты клинико-лабораторных параметров больных анализировали с использованием программы Statistica 6.0, применялись методы описательной статистики, непараметрические методы. Статистическая значимость показателей была определена как $p < 0,05$. При описании центральных тенденций количественных признаков, не имеющих нормального распределения, применялись медиана (Me) и интерквартильный размах [25-й и 75-й процентиля]. Качественные показатели в 2-х несвязанных группах сравнивались в таблице сопряженности 2×2 с помощью теста χ^2 , при количестве наблюдений менее 5 применялся точный критерий Фишера.

Обработку результатов анализа плазминогена и PAI-1 и расчёт погрешностей проводили в программе Sigma Plot.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Уровень плазминогена в плазме и тромбозы у больных APS. В исследование уровня плазминогена были включены 78 пациентов, которые были разделены на две группы: 43 больных с RAPS и 35 – с SLE+APS. Концентрация плазминогена в группе больных APS варьировала от 0,37 до 3,68 мкМ. Средняя его концентрация в группе исследования составила $1,80 \pm 0,14$ мкМ и в группе контроля – $1,95 \pm 0,15$ мкМ. Уровень плазминогена был стратифицирован: нормальный уровень – в пределах от 1,5 до 2,0 мкМ, выше 2,0 мкМ – высокий и, соответственно, ниже 1,5 мкМ – низкий. Из 78 больных APS нормальные уровни плазминогена (1,51-1,99 мкМ) определялись у 39,7%, высокие (2,05-3,68 мкМ) – у 24,4%, низкие (0,37-1,49 мкМ) – у 35,9% пациентов (табл. 2).

В группе 43 больных RAPS уровень плазминогена был нормальным (1,51-1,98 мкМ) у 48,8%, высоким (2,06-3,46 мкМ) – у 27,9% и низким (0,88-1,48 мкМ) – у 23,3%, в то время как в группе 35 пациентов с SLE+APS его уровень был нормальным (1,55-1,99 мкМ) у 28,6%, высоким (2,05-3,33 мкМ) у 20% и низким (0,37-1,48 мкМ) у 51,4% пациентов. Вычисленные значения средних концентраций плазминогена ($[Pg]_{\text{средн.}}$) по каждой группе приведены в таблице 2.

Таблица 2. Уровень пламиногена (Pg) у 78 обследованных больных APS.

Уровень Pg	Всего n=78 n (%)	SLE+APS n=35 n (%)	PAPS n=43 n (%)	Контроль n=10 n (%)
Низкий [Pg] _{средн.} , мкМ	28 (35,9)* 1,07 ± 0,12	18 (51,4)** 1,05 ± 0,13	10 (23,3) 1,12 ± 0,10	0
Нормальный [Pg] _{средн.} , мкМ	31 (39,7) 1,70 ± 0,13	10 (28,6) 1,63 ± 0,12	21 (48,8) 1,74 ± 0,15	10 (100) 1,95 ± 0,15
Высокий [Pg] _{средн.} , мкМ	19 (24,4) 2,68 ± 0,17	7 (20) 2,68 ± 0,17	12 (27,9) 2,68 ± 0,14	0

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля. ** - $p < 0,05$ по сравнению с больными PAPS.

Низкий уровень пламиногена в группе больных SLE+APS выявлялся достоверно чаще, чем в группе больных PAPS ($\chi^2=5,45$; $p=0,02$) и группе контроля ($\chi^2=5,24$; $p=0,02$). Следует отметить, что низкий уровень пламиногена имели 51,4% больных SLE+APS по сравнению с 35,9% всех больных APS. Следовательно, низкий уровень пламиногена ассоциируется в большей степени с SLE+APS, чем с PAPS.

Анализ содержания пламиногена в зависимости от активности заболевания и характера течения SLE показал, что хотя 51,4% больных SLE+APS имели низкий уровень пламиногена, не отмечалась взаимосвязь последнего с характером течения, активностью SLE, а также с отдельными её клиническими проявлениями

Поскольку гипопламиногенизм может быть фактором риска тромбоза, был проведен анализ уровня пламиногена в зависимости от тромбозов различной локализации. Из 78 пациентов с APS 67 имели тромбозы в анамнезе, в том числе 32 артериальных и 53 венозных тромбоза. Средняя концентрация пламиногена ($1,68 \pm 0,13$ мкМ) у больных APS, имевших тромбозы, была ниже, по сравнению с группой контроля ($1,95 \pm 0,15$ мкМ) (табл. 3).

Таблица 3. Уровень пламиногена (Pg) в зависимости от локализации тромбозов у 67 больных APS.

Уровень Pg	Всего больных n=67 n (%)	Артериальные тромбозы n=32* n (%)	Венозные тромбозы n=53* n (%)	Контроль n=10 n (%)
Низкий [Pg] _{средн.} , мкМ	23 (34,3)** 1,1 ± 0,12	9 (28,1)** 0,94 ± 0,13	19 (35,8) ** 1,10 ± 0,12	0
Нормальный [Pg] _{средн.} , мкМ	30 (44,8) 1,74 ± 0,15	18 (56,3) 1,71 ± 0,05	22 (41,6) 1,71 ± 0,17	10 (100) 1,95 ± 0,15
Высокий [Pg] _{средн.} , мкМ	14 (20,9) 2,63 ± 0,11	5 (15,6) 2,31 ± 0,10	12 (22,6) 2,74 ± 0,10	0

Примечание: * - часть больных имели сочетанные тромбозы, ** - $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

При анализе локализации тромбозов из 32 больных с артериальными тромбозами 28,1% имели низкие (0,57-1,48 мкМ), 56,3% – нормальные (1,50-1,92 мкМ) и 15,6% – высокие (2,06-2,82 мкМ) концентрации плазминогена. В группе 53 больных с венозными тромбозами низкое содержание плазминогена (0,57-1,48 мкМ) выявлялось у 35,8%, нормальное (1,51-1,98 мкМ) у 41,6% и высокое (2,2-3,68 мкМ) у 22,8%. Значения средних концентраций плазминогена ($[Pg]_{\text{средн.}}$) по каждой группе приведены в таблице 3. Из данных таблицы 3 видно, что у пациентов с APS низкие уровни плазминогена наблюдаются чаще при венозных тромбозах, чем при артериальных.

Не было обнаружено ассоциации гипоплазминогемии с синдромом потери плода, который в анамнезе имели 25 из 56 женщин с APS. Низкое содержание плазминогена было у 8 (42%), нормальное у 9 (36%) и высокое у 8 (32%) из 25 женщин с рецидивирующим синдромом потери плода в анамнезе. У 30 женщин с APS, не имевших патологии беременности, распределение уровней плазминогена было следующим: у 12 (40%) – низкий, у 14 (47%) нормальный и у 4 (13%) высокий.

В связи с возможностью взаимодействия плазминогена и aPL представлялось важным проанализировать, существует ли взаимосвязь между их уровнями. Повышенные уровни aPL на момент обследования отмечались у 66 (84,6%) из 78 пациентов с APS. У 12 (15,4%) пациентов были повышены только aCL, у 13 (16,7%) только – $a\beta_2\text{GP-I}$, у 40 (51,3%) выявлялось повышение как aCL, так и $a\beta_2\text{GPI}$, у одного – только LAC. Распределение числа больных по позитивностям уровней aCL и $a\beta_2\text{GPI}$ и средние концентрации плазминогена по каждой группе приведены в таблице 4.

Таблица 4. Уровень плазминогена в зависимости от уровня антифосфолипидных антител у 78 пациентов с АФС.

Уровень Pg	Позитивность уровня aCL			
	+++	++	+	–
	n=23 n (%)	n=17 n (%)	n=14 n (%)	n=24 n (%)
Низкий $[Pg]_{\text{средн.}}, \text{мкМ}$	10 (43,5) $1,05 \pm 0,08$	6 (35,3) $0,97 \pm 0,17$	5 (35,7) $1,25 \pm 0,11$	7 (29,2) $1,08 \pm 0,17$
Нормальный $[Pg]_{\text{средн.}}, \text{мкМ}$	8 (34,8) $1,73 \pm 0,12$	6 (35,3) $1,58 \pm 0,06$	3 (21,4) $1,81 \pm 0,09$	11 (45,8) $1,76 \pm 0,07$
Высокий $[Pg]_{\text{средн.}}, \text{мкМ}$	5 (21,7) $2,30 \pm 0,16$	5 (29,4) $2,20 \pm 0,08$	6 (42,8) $2,79 \pm 0,29$	6 (25) $2,75 \pm 0,13$
Уровень Pg	Позитивность уровня $a\beta_2\text{GPI}$			
	+++	++	+	–
	n=37 n (%)	n=6 n (%)	n=9 n (%)	n=26 n (%)
Низкий $[Pg]_{\text{средн.}}, \text{мкМ}$	12 (32,4) $1,02 \pm 0,06$	1 (16,6) $1,14 \pm 0,02$	4 (44,4) $1,31 \pm 0,20$	7 (26,8) $1,12 \pm 0,16$
Нормальный $[Pg]_{\text{средн.}}, \text{мкМ}$	16 (43,2) $1,48 \pm 0,08$	4 (66,8) $1,62 \pm 0,21$	4 (44,4) $1,69 \pm 0,14$	10 (38,6) $1,76 \pm 0,14$
Высокий $[Pg]_{\text{средн.}}, \text{мкМ}$	9 (24,3) $2,60 \pm 0,13$	1 (16,6) $3,05 \pm 0,02$	1 (11,2) $2,27 \pm 0,12$	9 (34,6) $2,67 \pm 0,20$

Примечание: +++ - высоко позитивные, ++ - умеренно позитивные, + - низко позитивные, – - негативные уровни aPL.

В большинстве случаев уровень плазминогена не зависел от уровня позитивности как aCL, так и a β_2 GP-I. Однако низкий уровень плазминогена наблюдался у 10 из 23 пациентов с высоко позитивными и у 6 из 17 больных с умеренно позитивными значениями aCL, а также – у 12 из 37 пациентов с высоко-позитивными и у 1 из 6 больных с умеренно позитивными значениями a β_2 GP-I. При этом средние концентрации плазминогена у больных с низко позитивными и негативными уровнями aCL и a β_2 GP-I были выше, чем у больных с высоко и умеренно позитивными значениями обоих aPL (табл. 4).

Проведённый анализ взаимосвязи уровня позитивности aPL у больных с низким содержанием плазминогена и локализацией тромбозов показал, что из 9 больных с артериальными тромбозами высоко позитивные уровни a β_2 GP-I наблюдались у 6 (66,7%) и aCL у 5 (55,6%). В случае венозных тромбозов (n=19) высоко позитивные уровни a β_2 GP-I наблюдались у 10 (52,6%), а высоко позитивные уровни aCL лишь у 4 (21,1%) больных.

Таким образом, при венозных тромбозах у пациентов с APS и низким содержанием плазминогена высоко позитивные уровни a β_2 GP-I встречались значительно чаще, чем высоко позитивные уровни aCL, а при артериальных тромбозах они наблюдались почти с одинаковой частотой.

Уровень PAI-1 в плазме и тромбозы у больных APS. В связи с тем, что повышение уровня PAI-1 является важным фактором риска тромбозов, важно было исследовать его уровни у больных APS. Был проведен анализ уровня как свободного активного, так и общего антигена PAI-1 в плазме 45 больных APS и 10 человек в группе контроля. Согласно инструкции фирмы изготовителя иммуноферментных наборов нами были установлены диапазоны нормальных значений активного PAI-1 и антигена PAI-1. За нормальный уровень активного PAI-1 было принято среднее значение его концентрации $15,8 \pm 0,92$ Ед/мл, найденное у группы контроля, за повышенный уровень – значения выше этой концентрации. Среднее значение уровня антигена PAI-1 $44 \pm 0,85$ нг/мл, найденное у группы контроля, считали нормальным, значения в диапазоне от 44 до 100 нг/мл – повышенным и выше 100 нг/мл – высоким.

Тромбозы в анамнезе имели 43 (93,5%) из 45 исследованных больных APS, в том числе 20 пациентов с SLE+APS и 23 – с PAPS. Из 43 больных APS с тромбозами уровень свободного активного PAI-1 был повышенным (от 17,8 до 93,9 Ед/мл) у 51,2% и нормальным (от 1 до 16,1 Ед/мл) – у 48,8% (табл. 5). Уровень антигена PAI-1 у больных APS с тромбозами варьировал от 14,96 до 398,40 нг/мл. В отличие от уровня активного PAI-1, уровень антигена PAI-1 был нормальным только у 11,6% пациентов и варьировал в диапазоне от 14,96 до 44 нг/мл. Большинство больных имели повышенные (от 47,1 до 93,3 нг/мл у 32,6% больных) или высокие (от 102,0 до 463,3 нг/мл у 55,8% больных) уровни антигена PAI-1.

Из больных APS 43 имели в анамнезе 22 артериальных и 33 венозных тромбоза. Для каждой локализации тромбоза в таблице 5 приведено распределение больных по уровням активного PAI-1 и антигена PAI-1, а также средние значения их концентраций. Как видно, у больных с повышенной концентрацией активного PAI-1 или с повышенным и высоким уровнем антигена PAI-1 венозные тромбозы наблюдались чаще, чем артериальные.

Из анализа данных таблицы 5 следует, что тромбозы у больных APS ассоциируются в значительной степени с высоким или повышенным уровнем антигена PAI-1. Концентрация же свободного активного PAI-1 может зависеть от степени экспрессии активаторов плазминогена. Известно, например,

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

что на уровень tPA могут влиять такие внешние факторы, как стресс, курение и др. В связи с этим дальнейший анализ клинических данных у больных APS с тромбозами сопоставляли только с уровнем антигена PAI-1, определение которого иммуноферментным методом достоверно включает и активный, и латентный, и связанный с активаторами ингибитор.

Таблица 5. Уровень активного PAI-1 и общего антигена PAI-1 в зависимости от локализации тромбозов у больных APS.

Уровень PAI-1	Всего больных n=43; n (%)	Артериальные тромбозы n=22*; n (%)	Венозные тромбозы n=33*; n (%)	Контроль n=10; n(%)
Активный PAI-1:				
Нормальный [PAI-1] _{сред} Ед/мл	21 (48,8) 7,64 ± 0,63	14 (63,6) 10,38 ± 0,90	15 (45,5) 6,94 ± 0,66	10 (100)
Повышенный [PAI-1] _{сред} Ед/мл	22 (51,2) 37,00 ± 2,15	8 (36,4) 40,21 ± 2,34	18 (54,5) 38,03 ± 2,20	0
Антиген PAI-1:				
Нормальный [PAI-1] _{сред} нг/мл	5 (11,6) 25,26 ± 5,83	3 (13,6) 21,71 ± 5,01	3 (9,1) 23,76 ± 5,48	10 (100)
Повышенный [PAI-1] _{сред} нг/мл	14 (32,6) 72,69 ± 14,95	7 (31,8) 69,73 ± 16,09	11 (33,3) 69,30 ± 13,44	0
Высокий [PAI-1] _{сред} нг/мл	24 (55,8) 226,55 ± 46,96	12 (54,6) 196,91 ± 43,02	19 (57,6) 243,47 ± 49,50	0

Примечание: * - часть больных имели сочетанные тромбозы.

Рецидивирующий синдром потери плода в анамнезе имели 11 из 31 женщины с APS. Содержание антигена PAI-1 было нормальным у 2 (18%), повышенным у 6 (55%) и высоким у 3 (27%) из 11 женщин, имевших синдром потери плода. У 20 женщин с APS, не имевших патологии беременности, уровень PAI-1 был нормальным у 3 (15%), повышенным у 13 (65%) и высоким у 4 (20%). На основании сравнения этих данных следует, что повышенные и высокие уровни антигена PAI-1 не ассоциируются с синдромом потери плода в анамнезе.

Результаты исследования уровня антигена PAI-1 в зависимости от уровней aPL приведены в таблице 6. Нормальный уровень антигена PAI-1 наблюдался только у 4 и 3 пациентов с высоко позитивными и у 1 и 2 пациентов с негативными уровнями aCL и aβ₂GPI, соответственно. У большинства больных APS с тромбозами наблюдались высокие или повышенные уровни антигена PAI-1. Из 15 пациентов с высоко позитивными уровнями aCL уровень антигена PAI-1 был высоким у 5 (33,4%) и повышенным у 6 (40%), а из 23 пациентов с высоко позитивными уровнями aβ₂GPI уровень ингибитора был высоким у 12 (52,2%) и повышенным – у 8 (34,8%). Из данных таблицы следует, что, по крайней мере, у третьей части пациентов с APS и тромбозами высокие и повышенные уровни PAI-1 ассоциируются с высоко позитивными уровнями aCL и aβ₂GPI, хотя для остальных больных не наблюдалось такой корреляции между этими параметрами.

Таблица 6. Уровень антигена PAI-1 в зависимости от уровня антифосфолипидных антител (aPL) у 43 больных APS с тромбозами.

Уровень антигена PAI-1	Уровни позитивности aCL			
	+++	++	+	-
	n=15 n (%)	n=12 n (%)	n=5 n (%)	n=11 n (%)
Высокий	5 (33,4)	8 (66,6)	5 (100)	6 (54,6)
Повышенный	6 (40,0)	4 (33,4)	0	4 (36,4)
Нормальный	4 (26,6)	0	0	1 (9)
Уровень антигена PAI-1	Уровни позитивности aβ ₂ GPI			
	+++	++	+	-
	n=23 n (%)	n=3 n (%)	n=4 n (%)	n=13 n (%)
Высокий	12 (52,2)	2 (66,7)	2 (50)	8 (61,5)
Повышенный	8 (34,8)	1 (33,3)	2 (50)	3 (23,1)
Нормальный	3 (13,0)	0	0	2 (15,4)

Примечание: +++ - высоко позитивные, ++ - умеренно позитивные, + - низко позитивные, – - негативные уровни антифосфолипидных антител.

Анализ уровня антигена PAI-1 в зависимости от локализации тромбозов был проведен отдельно по группам пациентов с PAPS и SLE+APS (табл. 7).

Таблица 7. Уровень антигена PAI-1 в зависимости от локализации тромбозов у больных SLE+APS и PAPS.

Уровень антигена PAI-1	SLE+APS			PAPS		
	Число больных n=20 n (%)	Артери- альные тромбозы n=7* n (%)	Венозные тромбозы n=16* n (%)	Число больных n=23 n (%)	Артери- альные тромбозы n=15* n (%)	Венозные тромбозы n=17* n (%)
Высокий [PAI-1] _{сред} нг/мл	13 (65) 256,0±51,4	5 (71,4) 186,7±43,9	10 (62,5) 276,0±53,8	11 (47,8) 191,7±41,7	7 (46,7) 159,2±32,7	9 (53,0) 207,3±44,7
Повышенный [PAI-1] _{сред} нг/мл	6 (30) 72,2±12,9	1 (14,3) 89,3±20,6	5 (31,3) 71,2±11,3	8 (34,8) 68,5±15,8	6 (40,0) 70,4±16,2	5 (29,4) 67,4±14,6
Нормальный [PAI-1] _{сред} нг/мл	1 (5) 14,96±3,5	1 (14,3) 14,96±3,5	1 (6,3) 14,986±3,5	4 (17,4) 22,44±5,2	2 (13,3) 25,08±5,8	3 (17,6) 26,79±6,2

Примечание: * - 12 больных APS имели сочетанные тромбозы.

В группе 23 больных PAPS с тромбозами уровень антигена PAI-1 был нормальным у 13%, повышенным у 34,8% и высоким у 47,8%. В этой группе больных наблюдалось 17 венозных и 14 артериальных тромбоза.

Из 20 больных SLE+APS с тромбозами уровень антигена PAI-1 был нормальным только у 1 (5%) больного, повышенным у 6 (30%) и высоким у 13 (65%). В этой группе больных венозных тромбозов (n=16) было значительно больше, чем артериальных (n=7).

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

В группе SLE+APS из 7 пациентов с артериальными тромбозами уровень PAI-1 был высоким у 71,4%, повышенным у 14,3% и нормальным у 14,3%, а из 16 пациентов с венозными тромбозами уровень PAI-1 был высоким у 62,5%, повышенным у 31,3% и нормальным у 6,3% больных (табл. 7). Таким образом, высокие и повышенные уровни антигена PAI-1 ассоциируются с частотой и артериальных, и венозных тромбозов. Однако высокий уровень антигена PAI-1 и число венозных тромбозов в группе больных APS, имевших системную красную волчанку, выявлялись чаще, чем в группе больных PAPS. При этом в обеих группах больных средние значения высоких концентраций антигена PAI-1 при венозных тромбозах были достоверно выше, чем при артериальных тромбозах.

Полиморфизм гена PAI-1 и частота тромбозов у больных APS. Поскольку 4G/5G полиморфизм гена PAI-1 (а именно, наличие 4G аллеля в гене) является фактором риска тромбозов, были определены генотипы по гену ингибитора у 45 больных APS, 43 из которых имели тромбозы различной локализации. Было обнаружено, что у больных APS с тромбозами генотип 5G/5G встречается значительно реже, чем генотипы 4G/4G и 4G/5G. Был проведен анализ взаимосвязи 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 с повышенным уровнем антигена PAI-1 в плазме больных PAPS и SLE+APS. Из 43 больных с тромбозами 34 (79,1%) пациента были носителями 4G аллеля и только 9 (20,9%) не имели данной мутации гена PAI-1 (табл. 8).

Таблица 8. Уровень антигена PAI-1 в зависимости от наличия 4G аллеля в его гене у 43 пациентов с APS, имевших тромбозы.

Уровень антигена PAI-1	4G/4G и 4G/5G генотипы			5G/5G генотип		
	Всего	PAPS	SLE+APS	Всего	PAPS	SLE+APS
	n=34 n (%)	n=17 n (%)	n=17 n (%)	n=9 n (%)	n=6 n (%)	n=3 n (%)
Высокий <i>[PAI-1]_{сред}</i> нг/мл	18 (52,9) 222,5±45,8	8 (47,1) 178,2±41,1	10 (58,8) 258,0±49,6	6 (66,7) 238,6±50,3	3 (50) 227,8±43,1	3 (100) 249,5±57,73
Повышенный <i>[PAI-1]_{сред}</i> нг/мл	12 (35,3) 70,2±12,9	6 (35,3) 66,1±15,3	6 (35,3) 74,2±12,9	3 (33,3) 73,2±16,9	3 (50) 73,2±16,9	0
Нормальный <i>[PAI-1]_{сред}</i> нг/мл	4 (11,8) 20,6±4,7	3 (17,6) 22,44±5,52	1 (5,9) 14,96±3,5	0	0	0

Из 9 больных с генотипом 5G/5G уровень ингибитора был высоким у 6, при этом количество больных SLE+APS (n=3) было в 2 раза меньше, чем больных PAPS (n=6), а средняя концентрация уровня PAI-1 в группе больных SLE+APS была выше, чем в группе больных PAPS.

В случае 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 число пациентов с первичным и вторичным APS было одинаковым (n=17). В группе больных PAPS с тромбозами уровень антигена PAI-1 был высоким у 47,1%, повышенным

у 35,3% и нормальным у 17,7%. В группе больных SLE+APS с тромбозами уровень антигена PAI-1 был высоким у 58,8%, повышенным у 35,3% и нормальным лишь у 5,9%. Из таблицы 8 видно, что у носителей 4G аллеля гена PAI-1 высокий уровень ингибитора наблюдается чаще и его средняя концентрация выше у пациентов с SLE+APS, чем у пациентов с PAPS. Полученные результаты указывают, что и первичный, и вторичный APS ассоциируются с наличием 4G аллеля в гене PAI-1. Однако у носителей 4G аллеля высокий уровень ингибитора наблюдается чаще и его средняя концентрация выше у пациентов с SLE+APS, чем у пациентов с PAPS.

Взаимосвязь 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 с частотой и локализацией тромбозов у больных APS представлена на рисунке 1. У 43 больных APS наблюдалось 22 артериальных и 33 венозных тромбоза. Большинство – 34 (79,1%) из 43 больных имели 4G/5G полиморфизм гена PAI-1. При этом у носителей 4G аллеля количество венозных тромбозов (n=27) значительно превышало количество артериальных тромбозов (n=17), в то время как у небольшого числа больных (n=9) с генотипом 5G/5G гена ингибитора наблюдалось почти равное количество артериальных (n=5) и венозных тромбозов (n=6).

Таким образом, полученные результаты показывают, что и артериальные, и, в большей степени, венозные тромбозы у большинства больных APS ассоциируются с наличием 4G аллеля в гене PAI-1. Вероятно, 4G/5G полиморфизм гена PAI-1 является фактором риска тромбозов только при наличии aPL и других признаков APS, так как из 10 здоровых доноров без признаков аутоиммунного заболевания 9 человек были носителями 4G аллеля, но тромбозов не имели.

ОБСУЖДЕНИЕ. APS – это аутоиммунное заболевание, при котором присутствие aPL ассоциируется с повышенным риском артериальных или венозных тромбозов, рецидивирующей потерей плода и/или тромбоцитопенией. Несмотря на то, что имеется тесная связь между aPL и тромбозами, гетерогенность тромботических проявлений при APS предполагает, что другие дополнительные факторы могут давать вклад в тромбофилию у этих пациентов. Сообщалось, что ухудшение фибринолиза может быть одним из патогенетических механизмов образования тромбов при APS [11-13]. Действительно, пути активации фибринолиза взаимосвязаны с воспалительными процессами, сопровождающими аутоиммунные заболевания [16].

Уровень пламиногена в плазме и тромбозы у больных APS. В связи с тем, что действие aPL направлено против фосфолипид-связанных белков на мембранах тромбоцитов и клеток эндотелия сосудов, они вовлекаются в клинически важные нормальные прокоагулянтные и антикоагулянтные реакции, изменяя экспрессию и секрецию различных молекул. Показано, что некоторые aPL распознают гомологичные антигенные эпитопы на β_2 GPI и протеазных доменах сериновых протеаз (тромбина, плазмина, tPA, активированного протеина С (APC) и фактора IXa (FXa)), которые участвуют в регулировании гемостаза (рис. 2). Взаимодействие aPL с FXa и тромбином может препятствовать их инактивации антитромбином, что способствует образованию тромба. Тромбоз могут способствовать APC-реактивные aPL за счёт ингибирования его антикоагулянтной функции. Другие aPL могут ухудшать растворение тромба в результате связывания с плазмином, прямо ингибируя его активность, или с tPA, ингибируя активацию им пламиногена в плазмин [7].

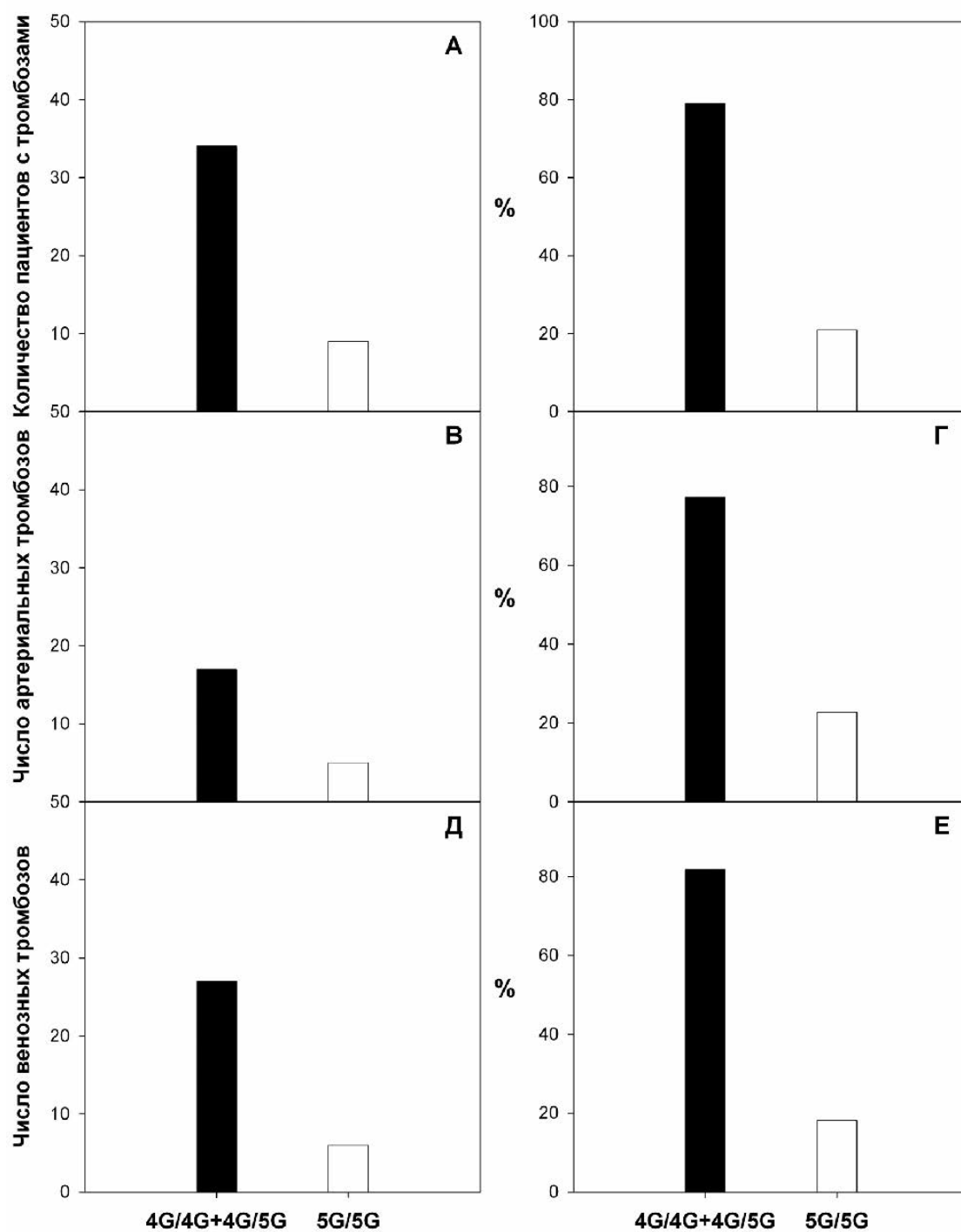


Рисунок 1.

Количество исследованных пациентов с APS и тромбозами, имевших (■) и не имевших (□) 4G аллель в гене PAI-1 (А); распределение числа артериальных (В) и венозных тромбозов (Д) по группам, соответственно. Б, Г и Е - данные рисунков А, В и Д в процентах, соответственно.

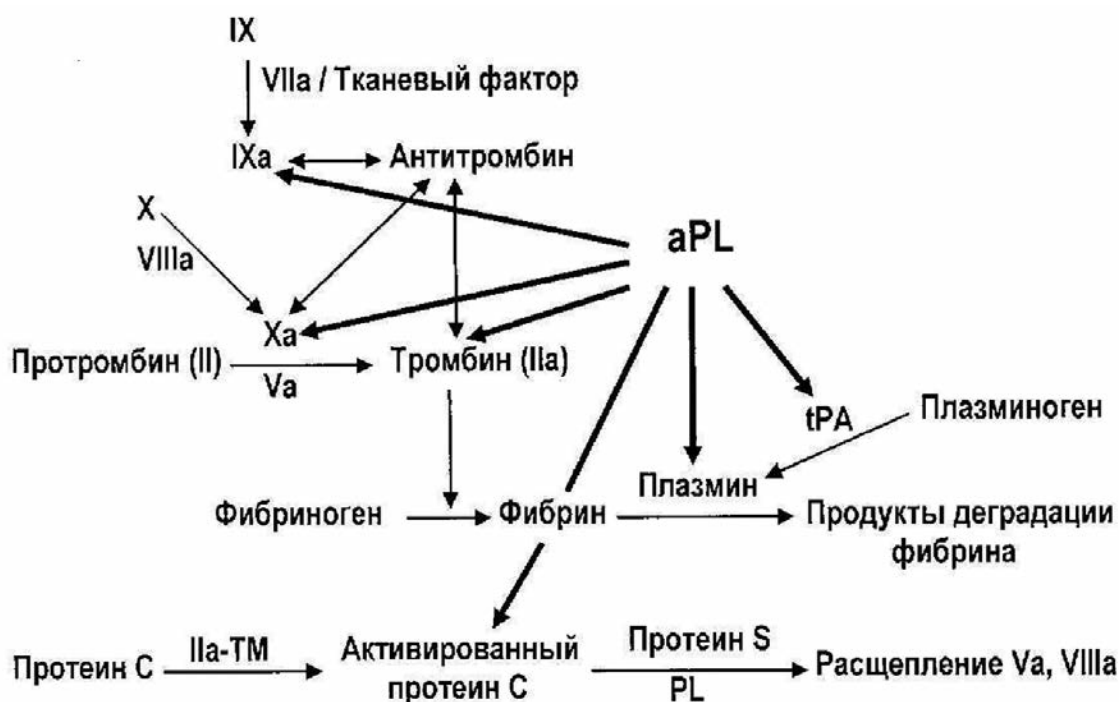


Рисунок 2.

Целевые сериновые протеазы в системе гемостаза, которые распознаются и на которые влияют антифосфолипидные антитела. Обозначения: aPL - антифосфолипидные антитела, PL - фосфолипид, TM - тромбомодулин, tPA - тканевый активатор плазминогена.

Роль гипоплазминогемии в развитии тромбозов, в том числе и при APS, активно обсуждается, однако к настоящему времени нет достаточно убедительных данных, подтверждающих эту гипотезу [45]. Антитела к плазминогену (anti-Pg) часто встречаются у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, например, при SLE и ревматоидном артрите, что предполагает возможность для плазминогена быть мишенью иммунного ответа при этих заболеваниях [46, 47]. При исследовании двух групп пациенток (с PAPS и без PAPS), имевших рецидивирующий синдром потери плода, обнаружены аномально высокие уровни IgG anti-Pg антител в обеих группах больных, в то время как высокие уровни IgG anti-tPA антител – только у пациентов с PAPS [28]. Авторы предположили, что высокие уровни anti-Pg и anti-tPA антител могут быть риском гипофибринолиза, а высокие уровни anti-Pg антител – риском рецидивирующего синдрома потери плода.

Нами был исследован уровень плазминогена в плазме 78 пациентов с APS. Исследуемые пациенты были разделены на две группы: 43 больных с PAPS и 35 – с SLE+APS. Концентрация плазминогена в группе исследования варьировала от 0,37 до 3,68 мкМ. Средний его уровень в группе больных составил $1,80 \pm 0,14$ мкМ, а в группе контроля – $1,95 \pm 0,15$ мкМ, который принимали за нормальный, а значения ниже этой величины – за низкий. В группе больных APS низкий уровень плазминогена имели 28, то есть более одной трети из 78 пациентов. В группе больных PAPS низкие уровни плазминогена найдены у 10 (23,3%) из 43 больных, в то время как в группе больных SLE+APS – у 18 из 35, т.е. у 51,4% (табл. 2). Из этих результатов следует, что гипоплазминогемия наблюдается чаще у больных APS, которые

имеют сопутствующее заболевание SLE. Однако взаимосвязь низкого уровня плазминогена с активностью SLE, характером течения и отдельных клинических проявлений заболевания в работе не была обнаружена.

Для выяснения взаимосвязи между гипоплазминогемией и тромбозами, был проведён анализ уровня плазминогена в зависимости от локализации тромбозов. Из 78 пациентов с APS тромбозы были в анамнезе у 67 (86%). Средняя концентрация плазминогена у больных APS, имевших тромбозы, составляла $1,68 \pm 0,13$ мкМ. Однако 34,3% больных APS с тромбозами имели низкое содержание плазминогена ($1,10 \pm 0,12$ мкМ) (табл. 3). При анализе локализации тромбозов низкий уровень плазминогена выявлялся у 9 (28,1%) из 32 больных с артериальными и у 19 (35,8%) из 53 больных с венозными тромбозами при близких значениях средней его концентрации ($0,94 \pm 0,13$ мкМ и $1,10 \pm 0,13$ мкМ, соответственно). Следовательно, артериальные и, в большей степени, венозные тромбозы у одной трети больных APS ассоциируются с низким содержанием плазминогена.

Как было сказано выше, в плазме пациентов с APS обнаружены aPL, реактивные к эпитопам протеазного домена плазмина [7, 24, 25]. Возможно, эти плазмин-реактивные aPL могут также связываться с эпитопами протеазного домена плазминогена. Чтобы выявить возможность такого взаимодействия был проведен анализ взаимосвязи уровней плазминогена и aPL. На момент обследования 66 (84,6%) из 78 пациентов с APS имели повышенные уровни aPL. Низкий уровень плазминогена наблюдался у 10 (43,5%) из 23 пациентов с высоко-позитивными значениями aCL и у 12 (32,4%) из 37 пациентов с высоко-позитивными значениями α_2 GPI. Кроме того, часть больных APS с умеренно позитивными уровнями обоих aPL также имели низкие уровни плазминогена (табл. 4). В среднем у одной трети больных APS низкие уровни плазминогена ассоциируются с высоко и умеренно позитивными уровнями aCL и α_2 GP-I. Выше была показана взаимосвязь тромбозов с низким содержанием плазминогена у одной трети больных APS. Подобная аналогия указывает на то, что связывание плазминогена с aPL, ингибирующее его превращение в плазмин или снижающее концентрацию потенциально активного плазминогена, является дополнительным фактором риска тромбозов у пациентов с APS.

Уровень PAI-1 в плазме и тромбозы у больных APS. Увеличение уровня PAI-1 в плазме является одной из наиболее часто встречающихся причин снижения фибринолитической активности и повышения риска тромбообразования. Нами был проведен анализ уровня как свободного активного, так и общего антигена PAI-1 в плазме 45 больных APS и 10 человек в группе контроля. Тромбозы в анамнезе имели 43 (93,5%) из 45 исследованных больных APS, в том числе 20 пациентов с SLE+APS и 23 – с RAPS. 43 пациента с APS имели в анамнезе 22 артериальных и 33 венозных тромбоза. Из 43 больных APS с тромбозами уровень свободного активного PAI-1 был повышенным у 51,2% и нормальным – у 48,8% (табл. 5). В отличие от уровня активного PAI-1, уровень антигена PAI-1 был нормальным только у 11,6% пациентов, в то время как большинство больных имели повышенные (32,6%) или высокие (55,8%) уровни антигена PAI-1. При этом у больных с повышенной концентрацией активного PAI-1 или с повышенным и высоким уровнем антигена PAI-1 венозные тромбозы наблюдались чаще, чем артериальные.

В отличие от уровня антигена PAI-1, повышенные и нормальные уровни свободного активного PAI-1 наблюдались почти с одинаковой частотой у больных APS с тромбозами. Это может быть связано с тем, что концентрация

свободного активного PAI-1 зависит от степени экспрессии активаторов плазминогена (tPA или uPA). Известно, например, что на уровень tPA, который специфически активирует плазминоген на фибрине, могут влиять различные внешние факторы. В течение многих лет считали, что фактором риска тромбозов является низкая активность и/или концентрация tPA. Недавно выяснилось, что маркером риска тромбозов является скорее повышенный, чем пониженный уровень антигена tPA [48-50]. Это, на первый взгляд, парадоксальное явление, объясняется тем, что повышенные уровни активного PAI-1 образуют с tPA необратимый неактивный комплекс tPA-PAI-1. Это приводит к снижению концентрации активного PAI-1 и tPA и к повышению уровня их антигенов. Кроме того, ранее в экспериментах по определению концентраций tPA и uPA кинетическим сопряжённым методом нами было обнаружено, что их уровни значительно варьируют у 78 пациентов с APS, что существенно отражалось на измеряемой кинетическим методом концентрации активного PAI-1. Вариации концентраций tPA и uPA могут влиять и на уровни активного PAI-1, определяемого иммуноферментным методом. Из анализа данных таблицы 5 следует, что тромбозы у больных APS ассоциируются в значительной степени с высоким или повышенным уровнем антигена PAI-1. В связи с этим анализ клинических данных у больных APS с тромбозами сопоставляли только с уровнем антигена PAI-1, определение которого иммуноферментным методом достоверно включает и активный, и латентный, и связанный с активаторами ингибитор.

Исследование уровней aPL и антигена PAI-1 у больных APS с тромбозами показало, что нормальный уровень антигена PAI-1 наблюдался только у 4 и 3 пациентов с высоко позитивными уровнями aCL и $\alpha\beta_2$ GPI и у 1 и 2 пациентов с негативными уровнями aCL и $\alpha\beta_2$ GPI, соответственно (табл. 6). У третьей части больных APS с тромбозами высоко позитивные уровни aCL и $\alpha\beta_2$ GPI были ассоциированы с высокими или повышенными уровнями антигена PAI-1. В литературе нет сведений о прямом или косвенном воздействии aPL на PAI-1 при APS. Однако полученные результаты указывают на существование некоторой взаимосвязи между ними.

Мы предположили, что одним из возможных механизмов этой взаимосвязи может быть следующее. Известно, что при патологических условиях, включая воспалительные и другие процессы, экспрессия PAI-1 разными клетками стимулируется цитокинами [51], что приводит к локальному концентрированию ингибитора. Это особенно важно в случае тромбоцитов, которые содержат большие количества PAI-1 в латентной форме [52]. При активации тромбоцитов происходит секреция содержимого пулов их хранения во внешнюю среду. Высвободившийся PAI-1 связывается с фибрином, что объясняет относительную сопротивляемость к лизису тромбов, богатых тромбоцитами. Кроме того, при активации тромбоцитов на наружной поверхности их мембраны появляются большие количества кислых фосфолипидов, которые являются центрами связывания сериновых протеаз (тромбина, плазмина, tPA, APC и FXa). А иммунная система организма при APS вырабатывает антитела именно к комплексам фосфолипид-белок. Связывание aPL с различными фосфолипид-связанными протеазами приводит, как было сказано выше, либо к тромбообразованию, либо к ухудшению растворения тромба. Таким образом, в случае активации тромбоцитов при воспалительных процессах, к которым относится и APS, происходит и выброс PAI-1, и стимулирование образования aPL. Подобные взаимодействия aPL с фосфолипид-связанными протеазами могут происходить

и на поверхности клеток эндотелия сосудов, что приводит к сужению сосудов и сдвигу равновесия между свертывающей и противосвертывающей системами в сторону образования тромбов.

Интересно было сравнить уровни антигена PAI-1 в зависимости от локализации тромбозов отдельно по группам пациентов с первичным и вторичным APS. В группе 23 больных PAPS с тромбозами уровень антигена PAI-1 был нормальным у 4 (13%), повышенным у 8 (34,8%) и высоким у 11 (47,8%). В этой группе больных наблюдалось 17 венозных и 15 артериальных тромбозов (табл. 7). В группе PAPS из 15 пациентов с артериальными тромбозами уровень PAI-1 был высоким у 46,7%, повышенным у 40% и нормальным у 13,3%, а из 17 пациентов с венозными тромбозами был высоким у 53%, повышенным у 29,4% и нормальным у 17,6%.

Из 20 больных SLE+APS с тромбозами уровень антигена PAI-1 был нормальным только у одного (5%) больного, повышенным у 6 (30%) и высоким у 13 (65%). В этой группе больных венозных тромбозов (n=16) было значительно больше, чем артериальных (n=7). Из 7 пациентов с артериальными тромбозами уровень PAI-1 был высоким у 71,4%, повышенным у 14,3% и нормальным у 14,3%, а из 16 пациентов с венозными тромбозами был высоким у 62,5%, повышенным у 31,3% и нормальным у 6,3%.

Сравнительный анализ показал, что высокий уровень антигена PAI-1 и число венозных тромбозов в группе больных APS, имевших системную красную волчанку, выявлялись чаще, чем в группе больных PAPS. При этом в обеих группах больных средние значения высоких концентраций антигена PAI-1 при венозных тромбозах были выше, чем при артериальных тромбозах.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что высокие и повышенные уровни антигена PAI-1 ассоциируются с частотой тромбозов у пациентов с APS. Наши данные согласуются с предположением авторов ряда публикаций, что у пациентов с системными заболеваниями, включая APS, фибринолиз уменьшается главным образом, благодаря избытку PAI-1 [13, 14, 29, 30].

Нами не было обнаружено ассоциации повышенных уровней антигена PAI-1 или гипоплазминогемии с рецидивирующим синдромом потери плода у пациенток с APS. Однако этот вопрос требует исследования значительно большей выборки пациенток с APS и акушерской патологией, чем в данной работе.

Полиморфизм гена PAI-1 и частота тромбозов у больных APS. Одним из факторов риска тромбозов у пациентов с APS может быть наличие 4G аллеля гена PAI-1, вызывающее повышение продукции ингибитора. К настоящему времени этот вопрос оставался спорным: одна группа исследователей не выявила значительного влияния полиморфизма гена PAI-1 на риск тромбоза и акушерской патологии у aPL-положительных пациентов [37], другая группа обнаружила более высокую частоту 4G аллеля и уровня PAI-1 у пациентов с APS и артериальными тромбозами [38].

Нами были определены генотипы по PAI-1 у 45 больных APS, 43 из которых имели тромбозы различной локализации. Было обнаружено, что у пациентов с APS и тромбозами генотип 5G/5G по гену PAI-1 встречается значительно реже, чем генотипы 4G/4G и 4G/5G. Из 43 больных с тромбозами 34 (79,1%) пациента были носителями 4G аллеля и только 9 (20,9%) не имели данной мутации гена PAI-1 (табл. 8).

Из 9 больных с генотипом 5G/5G по гену PAI-1 уровень ингибитора был высоким у 6, при этом количество больных SLE+APS (n=3) было в 2 раза

меньше, чем больных PAPS (n=6), а средняя концентрация PAI-1 в группе больных SLE+APS была выше, чем в группе больных PAPS.

В случае 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 число больных с первичным и вторичным APS было одинаковым. Из 17 больных PAPS с тромбозами уровень антигена PAI-1 был высоким у 47,1%, повышенным у 35,3,4% и нормальным у 17,7%. В группе 17 больных SLE+APS с тромбозами уровень антигена PAI-1 был высоким у 58,8%, повышенным у 35,3% и нормальным лишь у одного (5,9%). Полученные результаты указывают, что и первичный, и вторичный APS ассоциируются с наличием 4G аллеля гена PAI-1. Однако у носителей 4G аллеля высокий уровень ингибитора наблюдался чаще, и его средняя концентрация была выше у пациентов с SLE+APS, чем у пациентов с PAPS.

Взаимосвязь 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 с частотой и локализацией тромбозов у больных APS представлена на рисунке 1 (12 пациентов имели сочетанные тромбозы). У 43 больных APS наблюдались 22 артериальных и 33 венозных тромбоза. Большинство (79,1%) из 43 больных имели 4G/5G полиморфизм гена PAI-1. При этом у небольшого числа больных (n=9), являвшихся носителями 5G/5G генотипа, наблюдалось почти равное количество артериальных (n=5) и венозных тромбозов (n=6), в то время как у носителей 4G аллеля количество венозных тромбозов (n=27) значительно превышало количество артериальных тромбозов (n=17). Полученные результаты показывают, что тромбозы у большинства больных APS ассоциированы с наличием 4G аллеля гена PAI-1 и высоким уровнем ингибитора, что согласуется с результатами, опубликованными в работе [38]. Однако авторы этой работы сделали заключение о взаимосвязи 4G аллеля и уровня PAI-1 с артериальными тромбозами, в то время как наши исследования пациентов с PAPS и SLE+APS, показали, что 4G аллель и высокий уровень PAI-1 ассоциируются чаще с венозными, чем с артериальными тромбозами.

Таким образом, 4G/5G полиморфизм гена PAI-1, по-видимому, является одним из значительных факторов риска тромбозов у пациентов с APS. При этом присутствие aPL и других признаков APS, вероятно, необходимо, так как из 10 здоровых доноров без признаков аутоиммунного заболевания 9 человек были носителями 4G аллеля, но тромбозов в анамнезе не имели.

Полученные в данной работе результаты показывают, что у третьей части пациентов с APS и тромбозами высоко позитивные уровни aPL ассоциированы с низкими уровнями плазминогена и/или с высокими уровнями антигена PAI-1. Артериальные и, в большей степени, венозные тромбозы у 79% пациентов с APS связаны с наличием 4G аллеля в гене PAI-1, который приводит к повышенной экспрессии ингибитора, по сравнению с 5G аллелью. Вероятно, каждый из вышеперечисленных эффектов может давать вклад в распространенность и различную локализацию тромбозов у пациентов с APS. Следовательно, изучение уровней плазминогена, антигена PAI-1 и 4G/5G полиморфизма гена PAI-1 может быть использовано в качестве дополнительного прогностического фактора риска тромбозов, которые часто не коррелируют с изменением уровня aPL у пациентов с APS.

Работа поддержана Межфакультетским проектом МГУ им. М.В. Ломоносова “Пост-геномные исследования и технологии” и проектом “Сердечно-сосудистая патология при ревматических заболеваниях: диагностика, профилактика и лечение” (тема в ФГБС “НИИР” РАМН Рк 01200907561 от 12.12.2010).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Harris E.N.* (1990) *Br. J. Haematol.*, **74**, 1-9.
2. *Eby C.* (2009) *Clin. Lab. Med.*, **29**, 305-319.
3. *Koniari I., Siminelakis S.N., Baikoussis N.G., Papadopoulos G., Goudevenos J., Apostolakis E.* (2010) *J. Cardiothorac. Surg.*, **5**, 101-110.
4. *Решетняк Т.М., Вавилова Т.В.* (2010) *Клин. лаб. диагн.*, №5, 12-22.
5. *Lim W.* (2009) *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, 233-239.
6. *Oosting J.D., Derksen R.H., Bobbink I.W., Hackeng T.M., Bouma B.N., de Groot P.G.* (1993) *Blood*, **81**, 2618-2625.
7. *Chen P.P., Giles I.* (2010) *Curr. Rheumatol. Rep.*, **12**, 45-52.
8. *Galli M.* (2009) *J. Thromb. Haemost.*, **8**, 234-236.
9. *Pengo V., Ruffatti A., Legnani C., Greelle P., Barcellona D., Erba N., Testa S., Marongiu F., Bison E., Denas G., Banzato A., Jose S.P., Iliceto S.* (2010) *J. Thromb. Haemost.*, **8**, 237-242.
10. *Pierangeli S.S., Chen P.P., Raschi E., Scurati S., Grossi C., Borghi M.O., Palomo I., Harris E.N., Meroni P.L.* (2008) *Semin. Thromb. Hemost.*, **34**, 236-250.
11. *Krone K.A., Allen K.L., McCrae K.R.* (1999) *Curr. Rheumatol. Rep.*, **13**, 53-57.
12. *Forastiero R., Martinuzzo M.* (2008) *Lupus*, **17**, 872-877.
13. *Tsakiris D.A., Marbet G.A., Makris P.E., Settas L., Duckert F.* (1989) *Thromb. Haemost.*, **61**, 175-177.
14. *Ruiz-Arguelles G., Ruiz-Arguelles A., Lobato-Mendizabal E., Diaz-Gomez F., Pacheco-Pantoja E., Drenkard C., Alarcón-Segovia D.* (1991) *Am. J. Hematol.*, **37**, 9-13.
15. *Keeling D.M., Campbell S.J., Mackie I.J., Machin S.J., Isenberg D.A.* (1991) *Br. J. Haematol.*, **77**, 354-359.
16. *Hart D.A., Fritzler M.J.* (1989) *J. Rheumatol.*, **16**, 1184-1191.
17. *Castellino F.J., Ploplis V.A.* (2005) *Thromb. Haemost.*, **93**, 647-654.
18. *Mogues T., Etzerodt M., Hal C., Engelich G., Graversen J.H., Hartshorn K.L.* (2004) *J. Biomed. Biotechnol.*, **2**, 73-78.
19. *Zorio E., Gilabert-Estellés J., España F., Ramón L.A., Cosín R., Estellés A.* (2008) *Curr. Med. Chem.*, **15**, 923-929.
20. *Dano K., Behrendt N., Hoyer-Hansen G., Johnsen M., Lund L.R., Ploug M., Romer J.* (2005) *Thromb. Haemost.*, **93**, 676-681.
21. *Almholt K., Lund L.R., Rygaard J., Nielsen B.S., Dano K., Romer J., Johnsen M.* (2005) *Int. J. Cancer.*, **113**, 525-532.
22. *Collen D., Lijnen H.R.* (2005) *Thromb. Haemost.*, **93**, 627-630.
23. *Melchor J.P., Strickland S.* (2005) *Thromb. Haemost.*, **93**, 655-660.
24. *Yang C.D., Hwang K.K., Yan W., Gallagher K., FitzGerald J., Grossman J.M., Hahn B.H., Chen P.P.* (2004) *J. Immunol.*, **172**, 5765-5773.
25. *Kolev K., Gombas J., Varadi B., Skopál J., Mede K., Pitlik E., Nagy Z., Machovich R.* (2002) *Thromb. Haemost.*, **87**, 502-508.
26. *Lu C.S., Horizon A.A., Hwang K.K., FitzGerald J., Lin W.S., Hahn B.H., Wallace D.J., Metzger A.L., Weisman M.H., Chen P.P.* (2005) *Arthritis Rheum.*, **52**, 4018-4027.
27. *Cugno M., Cabibbe M., Galli M., Meroni P.L., Caccia S., Russo R., Bottasso B., Mannucci P.M.* (2004) *Blood*, **103**, 2121-2126.
28. *Bu C., Zhang C., Li Z., Gao L., Xie Z., Gai G.* (2007) *Clin. Exp. Immunol.*, **149**, 31-39.
29. *Violi F., Ferro D., Valesini G., Quintarelli C., Saliola M., Grandilli M.A., Balsano F.* (1990) *BMJ*, **300**, 1099-1102.

30. Nilsson T.V., Lofvenberg E. (1989) Clin. Rheumatol., **8**, 58-63.
31. Francis R.B., McGehee W.G., Fernstein D.I. (1988) Thromb. Haemost., **59**, 412-414.
32. Mackworth-Young C.G., Andreotti F., Harmer H., Loizou S., Pottinger B.E., Pearson J.D., Davies G.J., Maseri A., Walport M.J. (1995) Br. J. Rheumatol., **34**, 201-206.
33. Dawson S., Hamsten A., Wiman B., Henney A., Humphries S. (1991) Arterioscler. Thromb., **11**, 183-190.
34. van Goor M.L., Garcia E.G., Leebeek F., Brouwers G.J., Koudstaal P., Dippel D. (2005) Thromb. Haemost., **93**, 92-96.
35. Eriksson P., Kallin B., van Hooft F.M., Bavhenolm P., Hamsten A. (1995) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **92**, 1851-1855.
36. Айсина Р.Б., Левашов М.Ю., Мухаметова Л.И., Гершкович К.Б., Гулин Д.А. (2011) Пост-геномные исследования и технологии (Варфоломеева С.Д., ред.), Изд-во МГУ, М., с. 530-564.
37. Yasuda S., Tsutsumi A., Atsumi T., Bertolaccini M.L., Ichikawa K., Khamashta M.A., Hughes G.R., Koike T. (2002) J. Rheumatol., **29**, 1192-1197.
38. Tassies D., Espinosa G., Munoz-Rodriguez F.J., Freire C., Cervera R., Monteagudo J., Maragall S., Escolar G., Ingelmo M., Ordinas A., Font J., Reverter J.C. (2000) Arthritis Rheum., **43**, 2349-2358.
39. Hochberg M.C. (1997) Arthritis Rheum., **40**, 1725.
40. Myakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R., Derksen R.H., de Groot P.G., Koike T., Meroni P.L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyiannopoulos P.G., Krilis S.A. (2006) J. Thromb. Haemost., **4**, 295-306.
41. Brandt J.T., Triplett D.A., Alving B., Scharrer I. (1995) Thromb. Haemost., **74**, 1185-1190.
42. Brandt J.T., Barna L.K., Triplett D.A. (1995) Thromb. Haemost., **74**, 1597-1603.
43. Баркаган З.С., Момот А.П. (2001) Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Ньюдиамед, М., 285 с.
44. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Решетняк Т.М., Попкова Т.В., Черкасова М.В., Диатроптова М.А., Мач Э.С., Денисов Л.Н., Насонов Е.Л. (2009) Клинико-лабораторный консилиум, № 2, 47-58.
45. Sartori M.T., Simioni P., Patrassi G.M., Theodoridis P., Tormene D., Girolami A. (2000) Thromb. Haemost., **6**, 36-40.
46. Gonzalez-Gronow M., Cuchacovich M., Grigg D.M., Pizzo S.V. (1996) J. Mol. Med., **74**, 453-469.
47. Kozmin L.D., Shirokova I.E., Lisitsina T.A., Popkova T.V., Reschetnyak T.M., Belenkiy A.G., Martynov A.I., Bliznikov O.P. (2003) Biochemistry (Moscow), **68**, 339-345.
48. Jansson J.H., Olofsson B.O., Nilsson T.K. (1993) Circulation, **88**, 2030-2034.
49. Ridker P.M., Baker M.T., Hennekens C.H., Stampfer M.J., Vaughan D.E. (1997) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **17**, 1687-1690.
50. Thompson S.G., Kienast J., Pyke S.D., Haverkate F., van de Loo J.C. (1995) N. Engl. J. Med., **332**, 635-641.
51. Kawai Y., Matsumoto Y., Watanabe K., Yamamoto H., Satoh K., Murata M., Handa M., Ikeda Y. (1996) Blood, **87**, 2314-2321.
52. Booth N.A. (2000) Fibrinolysis&Proteolysis, **14**, 206-213.

Поступила: 10. 02. 2012.

**POLYMORPHISM OF THE PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR TYPE 1 GENE,
PLASMINOGEN LEVEL AND THROMBOSIS IN PATIENTS WITH
ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME**

*R.B. Aisina¹, L.I. Mukhametova¹, E.V. Ostryakova², N.V. Seredavkina², L.I. Patrushev³,
N.L. Patrusheva³, T.M. Reshetnyak², D.A. Gulin², K.B. Gershkovich²,
E.L. Nasonov², S.D. Varfolomeyev¹*

¹Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia;
fax: (495) 9395417; e-mail: aisina2004@mail.ru

²Research Institute of Rheumatology of the Russian Academy of Medical Sciences, Russia

³M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian
Academy of Sciences, Russia

⁴N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Russia

The frequency of venous and arterial thromboses and plasminogen level were investigated in 78 patients with antiphospholipid syndrome (APS), 35 of whom with systemic lupus erythematosus (SLE+APS) and 43 - with primary APS (PAPS). The levels and genotype of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) were determined in 45 patients with APS, of whom 21 patients with SLE+APS and 24 patients with PAPS. A control group included 10 healthy individuals without autoimmune disease signs and thromboses on period of investigation and in past history. It was shown for the first time that for one third of 67 patients with APS and thromboses high positive levels of antiphospholipid antibodies (aPL) are associated with low plasminogen levels. The levels of PAI-1 antigen measured by ELIZA method, which detects active, latent and bound with plasminogen activator PAI-1, were opposed with frequency of thromboses in APS patients. Correlation between the high and increased levels of PAI-1 and high positive aPL levels was found for one third of 43 patients with APS and thrombosis. One of the possible mechanisms of this interconnection was considered. It was shown that arterial and, to a more extent, venous thromboses are associated with the 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene and high plasma level of the inhibitor in 79% of APS patients. At the presence of the 4G allele patients with SLE+APS had higher PAI-1 levels than patients with PAPS. The obtained results show that measuring the levels of plasminogen and PAI-1 as well as the 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene which is associated with thromboses may have the practical significance for identification of high risk of thrombosis in APS patients.

Key words: plasminogen, plasminogen activator inhibitor type 1, polymorphism, antiphospholipid syndrome, thrombosis.