

УДК 616 – 005. 6: 618. 2: 575.21

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА ТРОМБОФИЛИИ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА В ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

Цветовская Г.А.¹, Чикова Е.Д.¹, Лифшиц Г.И.¹, Кох Н.В.², Шевела А.И.¹
Воронина Е.Н.¹, Новикова Я.В.², Махотина Н.Е.²

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

²*АНО Центр новых медицинских технологий в Академгородке
Новосибирск, Россия, cvetgalina@mail.ru*

Изучались частоты встречаемости полиморфизмов генов гемостаза и фолатного цикла у пациенток и с верифицированным диагнозом тромбозов различной локализации, и практически здоровых, проживающих в Западно-Сибирском регионе. Особенностью женщин репродуктивного возраста с развившимся тромбозом в молодом возрасте явилось наличие мультигенного характера тромбофилии в 100 % случаев при низком проценте встречаемости мутаций генов фактора V (Лейдена) и фактора II (протромбина). Показано, что ведение беременных женщин, решение вопроса о приемлемости КОК и ЗГТ не может решаться при тестировании ограниченного числа наиболее изученных генов, считающихся безусловными и строгими маркерами наследственной тромбофилии (FV, F II, MTHFR C677T).

Ключевые слова: Предрасположенность к тромбозам, женщины репродуктивного возраста, полиморфные генетические маркеры.

В основе многих видов акушерской патологии лежит развитие генерализованной микроангиопатии и тромбофилии, связанных с аутоиммунными нарушениями, гипергомоцистеинемией, наследственными дефектами системы гемостаза. Существенно возрастает риск развития тромбозов у женщин при наследственной предрасположенности к данной патологии в результате провоцирующих воздействий, таких как прием оральных контрацептивов, беременность, хирургические вмешательства. В то же время известно, что общие скрининговые тесты, используемые для выявления маркеров тромбинемии, не позволяют идентифицировать ту или иную причину склонности к внутрисосудистому свертыванию и, следовательно, этот прием недостаточен для выбора патогенетической терапии [3, 5, 6, 8]. В этой связи особого внимания ученых заслуживают наследственные формы недостаточности ингибиторов свертывания или аномалии коагуляционных протеинов, обуславливающих состояние предтромбоза и предрасположенности к тромбозу, поскольку встречаются у лиц молодого возраста и зачастую протекают без клинических проявлений [1, 4, 9].

В задачи данной работы входило изучение частоты встречаемости полиморфных вариантов ряда генов, кодирующих протеины системы гемостаза и фолатного цикла у пациенток Западно-Сибирского региона – практически здоровых и с верифицированным диагнозом тромбозов различной локализации. С этой целью проведено комплексное исследование венозной крови, включившее тестирование генов-кандидатов предрасположенности к развитию тромботических состояний.

Материал и методы

Для изучения распространенности полиморфизмов генов системы гемостаза и фолатного цикла были обследованы 290 женщин–жителей г. Новосибирска и Новосибирской области в возрасте от 16 до 43 лет. Генетическое тестирование образцов венозной крови проводилось по направлениям от гинекологов, терапевтов и у женщин, самостоятельно обратившихся в лабораторию генодиагностики ЦНМТ в Академгородке ИХБФМ СО РАН с тем, чтобы пройти тест на приемлемость контрацепции, гормонально-заместительной терапии (ГЗТ) или для выявления факторов, способных осложнять течение предстоящей беременности. Большинство женщин были направлены на тестирование 4-х генов – FV G1691A, FII G20210A, MTHFR C677T, MTRRA G66G. Проанализированы 2 группы пациенток – в 1-ю группу вошли 265 женщин без клинических проявлений тромбофилии, 2-ю группу со-

ставили 25 пациенток с различными тромботическими осложнениями. У 4-х пациенток развилась массивная ТЭЛА в возрасте 21 года, 22, 36 и 43-х лет на фоне приема оральных контрацептивов (ОК) и ГЗТ, у трех пациенток диагностирован ишемический инсульт в возрасте 21 год, 30 лет и 42 года, остальные наблюдались с тромботическими эпизодами в анамнезе – тромбозом глубоких вен (ТГВ), тромбофлебитом поверхностных вен. Средний возраст пациенток в обеих группах был сопоставим и составил $32,5 \pm 8,5$ в 1-ой группе и $30,3 \pm 10$ во 2-ой группе. В исследование вошли 19 генов-кандидатов (25 аллельных вариантов), продукты которых участвуют в коагуляционном каскаде, системе фибринолиза, поддержании сосудистого тонуса, метаболизме метионина и фолиевой кислоты. Генотипирование проводилось методом ПЦР с использованием конкурирующих TagMan-зондов, комплементарных полиморфному участку ДНК.

Статистическая обработка результатов

Тесты на соблюдение равновесия Харди-Вайнберга и выявление ассоциаций методом χ^2 проводили с помощью программы DeFinetti [13]. Для всех статистических расчетов при p-value <0,05 результат считали статистически значимым.

Результаты и их обсуждение

Результаты определения нами частот встречаемости полиморфизмов генов предрасположенности к тромбофилии представлены в таблице.

Частота встречаемости аллелей, генотипов полиморфных локусов исследуемых генов в 1-ой и 2-ой группах женщин репродуктивного возраста и их ассоциация с тромбозами различной локализации (OR)

Группа	Частота встречаемости аллеля (n)		Частота встречаемости генотипа (n)			Соответствие закону Харди-Вайнберга, (χ^2 *, df=1), p	Выявленная ассоциация OR, С.И., χ^2 , p
Полиморфный локус G1691A гена V фактора свертывания крови (лейденская мутация)							
	G	A	G/G	G/A	A/A		для аллеля А OR =4 [0,76-21,1] χ^2 =3,09 p=0,257
№ 1	0,99	0,01	0,98(247)	0,02(5)	0	p=0,874	
№ 2	0,96	0,04	0,92(24)	0,08(2)	0	p=0,838	
Полиморфный локус G20210A гена протромбина							
	G	A	G/G	G/A	A/A		для аллеля А OR =2,5 χ^2 =0,42 p=0,52
№ 1	0,99	0,01	0,98(249)	0,02(5)	0	p=0,858	
№ 2	1	0	1 (26)	0	0		
Полиморфный локус C677 гена MTHFR							
	C	T	C/C	C/T	T/T		для аллеля Т OR =1 χ^2 =0,04 p=0,84878
№ 1	0,71	0,29	0,48(122)	0,46(114)	0,06(16)	p=0,115	
№ 2	0,72	0,27	0,55(15)	0,33(9)	0,11(3)	p=0,379	
Полиморфный локус A66G гена MTRR							
	A	G	A/A	G/A	G/G		для аллеля G OR =4,8 [2,4-9,9] χ^2 =21,57 p=3,4e-06
№ 1	0,45	0,55	0,21(45)	0,48(102)	0,3 (65)	p=0,671	
№ 2	0,2	0,8	0,04 (1)	0,32(8)	0,64 (16)	p=1,00	
Полиморфный локус G1258A гена MTHFD							
	G	A	G/G	G/A	A/A		для аллеля А OR =4 [1,9-8,6] χ^2 =14,04 p=0,00018
№ 1	0,57	0,42	0,34(18)	0,47(25)	0,19(10)	p=0,801	
№ 2	0,25	0,75	0,13(3)	0,25(6)	0,62 (15)	p=0,102	
Полиморфный локус 675 4G/5G гена PAI							
	5G	4G	5G/5G	4G/5G	4G/4G		для аллеля 4G OR =2,6 [1,3-5,4] χ^2 =7,29, p=0,007
№ 1	0,52	0,47	0,24 (19)	0,57(46)	0,18 (15)	p=0,171	
№ 2	0,29	0,7	0,13(3)	0,32 (7)	0,54 (12)	p=0,268	
Полиморфный локус T1565C гена GPIIa							
	T	C	T/T	C/T	C/C		для аллеля С OR =2,7 χ^2 =4,2 p=0,04
№ 1	0,89	0,11	0,82(86)	0,15(16)	0,03(3)	p=0,079	
№ 2	0,73	0,27	0,63(7)	0,18(2)	0,18(2)	p=0,108	

Примечание: * критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга. Распределение частот генотипов соответствует закону Харди-Вайнберга во всех группах для всех исследуемых генов

По данным нашего исследования, распространенность лейденской мутации в гене FV у женщин репродуктивного возраста, проживающих на территории г. Новосибирска и Новосибирской области, в целом по группе составила 3,3 % и практически не отличается от частоты встречаемости данной мутации в европейской популяции. У женщин без клинических проявлений тромбофилии процент встречаемости полиморфизма FV был равен 1,97. В группе больных с верифицированным диагнозом тромбоз глубоких вен (ТГВ), ишемический инсульт, тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) частота гетерозиготного варианта гена FV составила 4,7 %, и ни в одном случае не была зарегистрирована гомозиготная форма гена. Этот факт указывает на некоторые отличия от частот мутаций данного гена у пациенток европейской популяции с тромботическими эпизодами в анамнезе. Так, по данным [1] частота гомозиготной формы мутации FV Leiden при тромбозах выявлена в 17,6 % обследованных и гетерозиготной – в 35,3 %. Заслуживающим внимания, на наш взгляд, является факт отсутствия мутации в гене протромбина G20210A у обследованных нами пациенток с верифицированным диагнозом тромбозов. Известно, что эта мутация достаточно редко встречается в популяции (1 – 4 %), но среди больных с венозными тромбозами достигает 17-20 % [1, 2, 9]. Мы не выявили также различий в распространенности мутаций в гене про-

тромбина (FII), связанной с заменой G A среди женщин практически здоровых и пациенток с тромботическими осложнениями. В целом для общего числа обследованных частота гетерозиготного варианта GA 20210 гена протромбина составила 1,75. Гомозиготная форма не была выявлена ни у одной из обследованных женщин. У больных с эпизодами тромбозов (2-ая группа) в 100 % случаев регистрировался «дикий» тип гена (вариант G/G).

Работами многочисленных авторов показано, что ведущими причинами в генезе венозных тромбоэмболий являются мутационные повреждения гена фактора V свертывания крови (лейденская мутация) и гена протромбина (аллель 20210A). Риск развития тромботических осложнений особенно высок при сочетании мутаций в гене протромбина GA 20210 с FV (фактор Лейдена) [3, 10].

Частоту «мутированных» генов FV и FII в общей структуре полиморфизмов у женщин с тромбозами, выявленную в нашем исследовании, можно было бы рассматривать как показатель достаточно благоприятной ситуации в плане распространенности наследственной тромбофилии среди женщин, проживающих в Западно-Сибирском регионе. Однако, на наличие генетически обусловленной тромбофилии указывают находки при скрининге более широкого спектра генов системы гемостаза и фолатного цикла (см. табл.).

Изучение генов системы фолатного цикла было обусловлено их высокой пато-

генетической значимостью в развитии тромбофилии. Признанным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и фактором риска развития венозных и артериальных тромбозов на протяжении ряда десятилетий считается гипергомоцистеинемия. В литературе приводятся данные об ассоциации тромбозов с мутацией гена MTHFR C677T, приводящей к снижению активности MTHFR и накоплению ГЦ [2, 12].

Как видно из Таблицы, среди женщин Западно-Сибирского региона выявлен довольно высокий процент мутаций в этих генах. Мутации в гене MTHFR C677T выявлены в 51,4 %, при этом распределение вариантов гена не показало достоверных различий для 1-ой и 2-ой групп. В то же время необходимо отметить, что у женщин 2-ой группы с тромботическими заболеваниями в 55,6 % случаев отсутствовал дефект в гене MTHFR C677T. Другая ситуация выявлена при анализе встречаемости мутаций в генах метилентетрагидрофолат-дегидрогеназы – MTHFD (1958A->G), метионин синтазы и метионин синтазы-редуктазы MTRR (66A > G). В группе женщин с тромбозами различной локализации редкие аллели этих генов обнаруживались достоверно чаще. Аллель 1258A гена MTHFD является фактором риска развития тромбоза, при его носительстве риск возрастает в 4 раза (OR = 4,0 С.И. [1,9-8,6] p=0,00018). При носительстве аллеля 66G гена MTRR также повышается риск тром-

боза (OR =4,8 С.И. [2,4-9,9] chi2=21,57 p=3,4e-06) (табл.).

Существует мнение [12], что нарушение любого из звеньев как метионинового, так и фолатного цикла может привести к повышению общего содержания гомоцистеина в плазме крови. Мы полагаем высоко вероятным, что дефект гена MTHFD, который кодирует фермент, осуществляющий превращение одноуглеродных производных тетрагидрофолата и участвует в синтезе метионина, тимидилата и пурина в сочетании с мутациями в генах MTR и MTRR, которые кодируют аминокислотную последовательность ферментов, участвующих в процессах реметилирования гомоцистеина в метионин, может приводить к гипергомоцистеинемии и служить фактором риска тромботических заболеваний у молодых пациенток даже при нормальном (диком) типе гена MTHFR(C677T).

Наряду с высокой частотой встречаемости гомозиготных вариантов генов MTHFD, MTRR во 2-ой группе женщин, как правило, имело место сочетание гомо- и гетерозиготных мутаций нескольких генов фолатного цикла. Комбинация из трех генных полиморфизмов встретилась у 84,2 % больных, присутствие гомозиготного варианта одного или двух полиморфизмов выявлено в этой группе пациенток в 95,3 % случаев. По-видимому, именно сочетания генетических полиморфизмов являются серьезным фактором риска нарушений в работе ферментов фолатного цик-

ла, приводящих к избыточному накоплению гомоцистеина в плазме крови.

Особого внимания заслуживает обнаруженная нами комбинация мутированных генов фолатного цикла с наличием полиморфной замены 675 5G -> 4G гена ингибитора активатора плазминогена (PAI1). Носительство аллеля 4G, который сопровождается повышенной экспрессией гена и приводит к повышению в крови PAI-1, зарегистрирован нами в 86 % случаев обследованных пациентов. У носителей аллеля 4G675 гена PAI-1 риск тромбозов повышен в 2,6 раз (OR =2,6 С.І. [1,3-5,4] $\chi^2=7,29$ $p=0,007$). Гомозиготная форма 4G/4G гена PAI1 во 2-ой группе в 3 раза превышала таковую по сравнению с женщинами без проявлений признаков тромбофилии. Если в первой группе обследованных женщин гомозиготная форма выявлена в 17,5 % случаев, то в группе с тромбозами этот процент составил 54,5. В 45 % случаев имело место сочетание полиморфизма PAI-1 с присутствием полиморфного варианта тканевого активатора плазминогена (PLAT- 7351 C->T, что также является предиктом снижения высвобождения тканевого активатора плазминогена, приводящим к неэффективному фибринолизу.

Особенностью женщин репродуктивного возраста с развившимся тромбозом в молодом возрасте явилось наличие мультигенного характера тромбофилии в 100 % случаев. Очевидным было и преобладание

сочетаний гомозиготных форм исследуемых генов (MTHFD (1958A->G), MTRR (66A > G), PAI1 (675 5G -> 4G), GPIIa (1565 T- C), NSO3 (Glu298Asp) в этой группе, что рассматривается нами в качестве предиктов скрытых форм тромбофилии. Так, замена T на C в 1565 положении гена GPIIa приводит к аминокислотной замене лейцина (Leu) на пролин (Pro) в 33-м положении. Тромбоциты, несущие GPIIa Pro33, имеют более низкий порог активации, то есть они более склонны к агрегации. У носителей 1565C гена GPIIa риск тромбозов повышен в 2,7 раз (OR =2,7 $\chi^2=4,2$ $p=0,04$).

Комбинации из 2-х, 3-х и более «мутированных» генов (чаще гетерозиготных форм) имели место и у женщин без клинических признаков тромбофилии (1-ая группа). Такие находки, даже без изменений в генах FV и F II, по нашему мнению, должны настораживать врача, поскольку при определенных условиях (беременность, операционное вмешательство, использование КОК и ГЗТ) может иметь место реализации предрасположенности к тромбозам в патологический процесс. Эти пациенты должны быть включены в группы риска развития тромботических осложнений, хотя на момент обследования данных за наличие тромбинемии у них не выявляется.

Заключение

Несмотря на то, что в мировой практике молекулярно-генетический анализ

не используется в качестве скринингового, действительность показывает, что вопрос о приемлемости контрацепции и заместительной гормональной терапии не может решаться без генетического тестирования пациенток с целью выявления наследственной предрасположенностью к тромбозам. Нами показано, что эти вопросы не могут быть решены и при тестировании ограниченного числа наиболее изученных генов, считающихся безусловными и строгими маркерами наследственной тромбофилии (F.V, F II, MTHFR- C677T).

Врачи-гинекологи, флебологи должны иметь данные о дефектах в генах, контролирующих различные звенья сложной системы гемостаза и фолатного цикла, поскольку это может быть основой для выявления скрытых форм тромбофилии у женщин репродуктивного возраста, а также предупреждения тромбозов и купирования повторных эпизодов заболевания. Применение молекулярно-биологических методов дает возможность определять значимые факторы, оказывающие влияние на развитие патологического процесса, выявлять патологию на стадии предболезни, осуществлять поиск патогенетически обоснованных методов профилактики и лечения и, тем самым, снижать риск тромботических осложнений. Эффективность диагностики и лечения во многом зависит от понимания врачом возможностей использования

данных генетического анализа для выяснения механизмов развития наследственной тромбофилии.

Список литературы

1. Баранов В.С. Генетические основы предрасположенности к некоторым частым мультифакториальным заболеваниям // Медицинская генетика. 2004. Т. 3. С. 102-112.
2. Гипергомоцистеинемия как самостоятельный фактор риска поражений и тромбирования кровеносных сосудов / З.С. Баркаган [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. 2002. № 1. С. 65–71.
3. Вавилова Т.В. Гемостазиология в клинической практике. Пособие для врачей. СПб, 2005. 91 с.
4. Роль генетической тромбофилии в структуре тромботических осложнений у гинекологических больных высокой группы риска в периперационном периоде / А.Д. Макацария [и др.] // Мед. науки. 2008. № 1. С. 7.
5. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. СПб.: Изд-во «Формат», 2006. 209 с.
6. Выявление генетических факторов риска развития сердечно-сосудистой патологии в Северо-Западном регионе России / С.Н. Пчелина [и др.] // Медицинская генетика. 2005. Т. 4. № 6. С. 256.
7. Генетические факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний / С.Н. Пчелина [и др.] // Пособие для врачей. СПб, 2006. С. 25.
8. Стойко Ю.М., Замятина А.В. Патогенетические аспекты консервативной терапии хронической венозной недостаточности у беременных // Consilium Medicum 2007 / 9:6:44-47.

9. Роль полиморфных вариантов некоторых генов, участвующих в развитии эндотелиальной дисфункции, в формировании гестоза / Е.А. Трифонова [и др.] // Молекул. мед. 2009. № 1. С. 3-9.
10. Генетические факторы риска развития тромбозов в молодом возрасте / А.М. Шейдина [и др.] // Вопросы современной педиатрии. 2005. Vol. 4, № 1. P. 42-46.
11. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction / S.M. Boekholdt [et al.] // Circulation. 2001, Vol. 104. P. 3063-3068.
12. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C / A. Undas [et al.] // J.Biol.Chem. 2001, Vol. 276. P. 4389-4397.
13. http://ihg.gsf.de/ihg/index_engl.html. (Институт генетики человека. Мюнхен, Германия).

GENETIC RISK FACTORS OF THROMBOPHILIA FOR WOMEN OF CHILDBEARING AGE IN WEST-SIBERIAN REGION

Tsvetovskaja G.A.¹, Chikova E.D.¹, Lifshits G.I.¹, Kokh N.V.², Shevela A.I.¹, Voronina E.N.¹, Novikova Y.V.², Makhotina N.A.²

¹*Institute of chemical biology and fundamental medicine*

²*Center of new medical technology in Akademgorodok*

Novosibirsk, Russia, cvetgalina@mail.ru

Frequency of polymorphism of hemostasis genes and folate cycle of almost healthy patients and patients with verified diagnosis of thrombosis of different location from Western Siberia was studied. The feature of women of childbearing age with thrombosis developed in youth was combination of various polymorphous versions of genes-candidates of thrombosis susceptibility (detected in 100 % of cases) with low frequency of gene mutations of factor V Leiden and factor II (prothrombin). It is shown that prenatal care and decision concerning the prescription of combined oral contraceptives and substitutive hormonal therapy can not be taken by testing of the limited number of most studied genes considered as the unconditioned and strict markers of inherited thrombophilia (factor V, factor II, MTHFR (C677T)).

Keywords: women of childbearing age, susceptibility for thrombosis, polymorphic genetic markers.