

А.В. Марковский

ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия Минздрава России, Чита

ЧАСТОТА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ТРОМБОФИЛИИ У ЖЕНЩИН С НАРУШЕНИЯМИ РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ

В данной статье проведен анализ частоты встречаемости полиморфизма генов системы гемостаза и белков фолатного цикла, ассоциированных с повышенным риском развития тромбофилии, по результатам пациентов с нарушениями репродуктивного здоровья, обратившихся в лабораторию молекулярной генетики ЧГМА (Чита). Метод исследования – аллель-специфическая ПЦР. Было исследовано 1800 образцов ДНК. Наиболее частыми явились мутации в генах системы фибринолиза и рецепторов тромбоцитов, а также белков фолатного цикла, причем в основном это были гетерозиготные замены. Наиболее значимые в развитии тромбофилии – Лейденская мутация (FV) и мутация протромбина (FII) встречаются значительно реже, особенно гомозиготная форма, выявленная только в одном случае.

Ключевые слова: наследственная тромбофилия, гены гемостаза и белков фолатного цикла.

A.V. Markovsky

FSBI HPE «Chita State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

FREQUENCY OF INHERITED THROMBOPHILIA GENE POLYMORPHISM IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE HEALTH DISORDERS

This article analyzes the frequency of polymorphisms of hemostasis system and folate cycle protein genes associated with increased risk of thrombophilia based on the results of CHGMA (Chita State Medical Academy) genetic laboratory patients with reproductive health disorders. Method of research is allele-specific PCR. It was analyzed 1800 DNA samples. The most frequently mutations occur in the genes of receptors in the platelets and the folate cycle, mostly heterozygous substitution. Leiden mutation (F5) and prothrombin mutation (F2) are the most significant in the thrombophilia development and occur much less frequently. Only in one case revealed a homozygous mutation in the gene F2 and F5.

Keywords: inherited thrombophilia, hemostasis system genes, folate cycle protein genes.

В последнее время особое внимание уделяют изучению наследственно обусловленных нарушений в системе гемостаза – тромбофилии, являющейся фактором, повышающим риск развития тромбоза сосудов – ведущей причины смерти в современном мире (почти 25 млн человек ежегодно). В основе тромбофилии лежат нарушение

механизмов саморегуляции системы гемостаза, нарушение взаимодействия клеточных и плазменных, прокоагулянтных, антикоагулянтных и фибринолитических ее компонентов, компенсаторных возможностей организма, затруднение микроциркуляции крови в капиллярах, связанное с внутрисосудистой активацией гемокоагуляционных факторов,

агрегационных и выделительных реакций клеток крови [1]. Очевиден возможный вклад в этот процесс различных мутаций в генах системы фолатного цикла, что обусловлено высокой патогенетической значимостью гипергомоцистеинемии в развитии тромбофилии.

Врожденная предрасположенность к тромбообразованию играет большую роль в развитии венозных тромбозов, особенно в акушерско-гинекологической практике. По данным литературы, роль тромбофилии в структуре причин патологии беременности составляет от 40 до 80% и рассматривается как этиопатогенетический фактор для широкого спектра заболеваний и синдромов: осложненного течения и невынашивания беременности, развития венозных тромбозов и тромбоэмболий у беременных и родильниц, синдрома потери плода, преэклампсии, тромбоэмболических осложнений гормональной контрацепции и заместительной терапии, повторных неудач экстракорпорального оплодотворения и др. [2, 3].

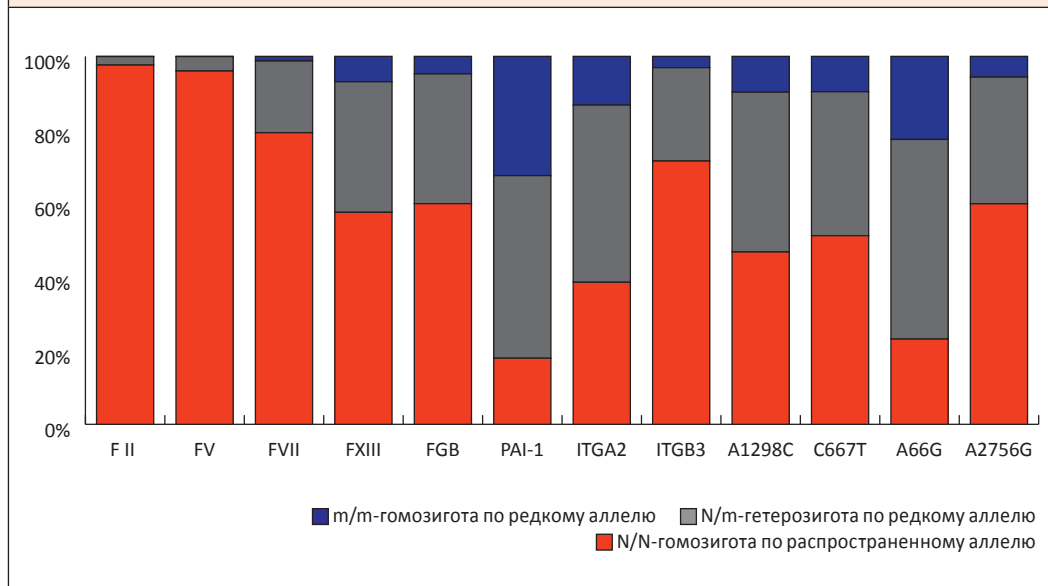
Цель исследования: оценить распространенность полиморфных вариантов генов системы гемостаза и фолатного цикла у пациенток с осложнениями репродуктивного здоровья в Забайкальском крае.

Материал и методы. Проведен анализ 1800 результатов ПЦР-исследований 12 полиморфизмов генов, ассоциированных с тромбофилией, выполненных на базе лаборатории молекулярной генетики НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО ЧГМА за период с мая 2012 г. по сентябрь 2017 г. Все пациентки – 1800 женщин, проживающие в Забайкальском крае и преимущественно в г. Чита, в возрасте от 20 до 60 лет включительно были с нарушениями репродуктивного здоровья: невынашиванием беременности (80%) и бесплодием (20%), причем в 21% случаев с отягощенным семейным тромбофобическим анамнезом.

Материалом для молекулярно-генетического анализа (PCR-Rt) служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической венозной крови с помощью набора реагентов «ДНК-Экспресс-кровь», (ООО НПФ «Литех», Москва). В исследуемый профиль для каждой пациентки входили гены факторов системы гемостаза: *FII* (G20210A), *FV* (G1691A), *FVII* (G10976A), *FXIII* (G103T), *FGB* (G455A), *PAI-1* (5G/675/4G), *ITGA2* (C807T), *ITGB3* (T1565C), а также системы фолатного цикла: *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G), *MTHFR* (C677T), *MTHFR* (A1298C). Амплификацию для выявления генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском развития тромбофилии, проводили с использованием комплекта реагентов «КардиоГенетика Тромбофилия» и «Генетика Метаболизма Фолатов» («ДНК-Технология») на ДНК-амплификаторе ДТ96.

Результаты. По данным комплексного молекулярно-генетического исследования полиморфизмов генов наследственной тромбофилии, генетические маркеры («рисковый» аллель) дисфункции плазменного, тромбоцитарного звеньев системы гемостаза и фолатного цикла выявлены у каждой из обследованных нами пациенток хотя бы в одном из исследованных генов. При этом наиболее частыми явились полиморфные варианты генов системы фибринолиза *PAI-1* 5G/675/4G (5G/4G – 49,6% и 4G/4G – 32,4%) и рецепторов тромбоцитов *ITGA2* C807T (C/T – 48,2% и T/T – 13,2%), а также белков фолатного обмена *MTRR* A66G (A/G – 54,3% и G/G – 22,6%) и *MTHFR* A1298C (A/C – 43,4% и C/C – 9,7%), причем в основном это были гетерозиготные замены. Наиболее значимые в развитии тромбофилии Лейденская мутация (F5) и мутация протромбина (F2) встречались значительно реже – в 4,0% и 2,4% случаев соответственно (рис. 1). Популяционная

РИСУНОК 1. Частота выявления полиморфизма генов гемостаза и системы фолатного обмена, ассоциированных с риском развития тромбофилии



встречаемость варианта А данных полиморфизмов – 2–5% [4].

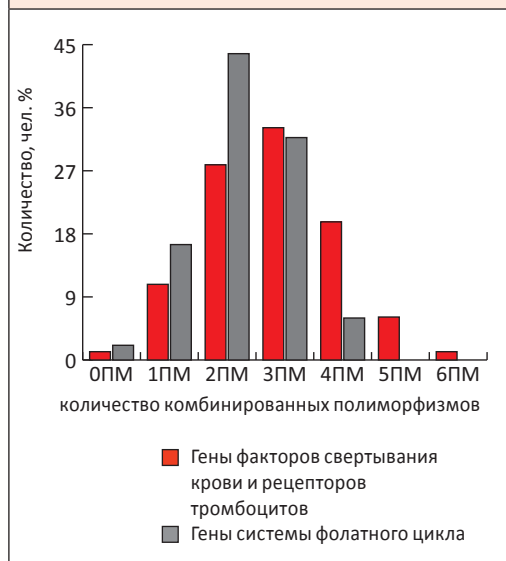
Ген *PAI-1* кодирует белок – эндотелиальный ингибитор активатора плазминогена 1 типа (ИАП-1), принадлежащий семейству серпинов и являющийся одним из важнейших факторов плазменного звена гемостаза. Белок ИАП-1 ингибирует работу тканевого активатора плазминогена и урокиназы, которые в свою очередь активируют переход плазминогена в плазмин, расщепляющий фибрин тромбов. Носительство аллеля 4G приводит к повышенной экспрессии гена и увеличенному уровню PAI-1 в крови, снижению активности тромболитической системы и возрастанию риска тромбообразования. Таким образом, PAI-1 негативно воздействует на фибринолиз и препятствует растворению тромбов, что повышает риск сосудистых осложнений, различных тромбоэмболий. Распространенность гомозиготной формы

4G/4G в европейских популяциях составляет 5–8% [5].

При анализе полиморфизма C807T гена *ITGA2* в распределении частот «рисковых» генотипов 807C/T и 807T/T выявлено 48,1 и 13,2% соответственно. Ген *ITGA2* кодирует белок-альфа-2-мембранный гликопротеин, известный как GPIa, экспрессирующийся на мембранах различных клеток. Полиморфизм C807T представляет собой нуклеотидную замену цитозина на тимин в позиции 807. Наличие T-аллеля ассоциируется с увеличением скорости адгезии тромбоцитов, что может являться фактором риска тромбофилии. Распространенность гомозиготной формы, ассоциированной с наибольшим риском тромбообразования, в европейских популяциях составляет 5–8% [6].

В нашем исследовании наряду с высокой частотой встречаемости полиморфных вариантов генов системы гемостаза в исследуемой

РИСУНОК 2. Распределение пациенток по количеству комбинированных полиморфизмов (ПМ), %



группе пациенток, как правило, имело место их сочетание с носительством мутаций в генах фолатного обмена (*MTHFR*, *MTRR* и *MTR*). Как известно, данные полиморфизмы являются причиной повышения уровня гомоцистеина в крови. Так, например, ферментативная активность ключевого фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) в случае генотипа *MTHFR677CT* снижена на 35%, а *677TT* – на 75% по сравнению с аллелем дикого типа, что ассоциировано с развитием гипергомоцистеинемии (ГГЦ) – одного из ключевых факторов риска гиперкоагуляционного синдрома и ангиопатии [7].

Среди наиболее значимых для развития ГГЦ мутаций *A1298C* и *C677T* гена *MTHFR* гетерозиготы встречались в 43,4% и 39,1% случаев, а частота гомозиготной формы была практически одинакова и составила 9,7% и 9,6% соответственно. Выявленные частоты в исследуемой группе свидетельствуют о том, что такие

полиморфные варианты, как мутация в гене *MTHFR*, вероятно, не менее значимы, чем мутации в генах *FII* и *FV*, для повышения риска тромботических осложнений.

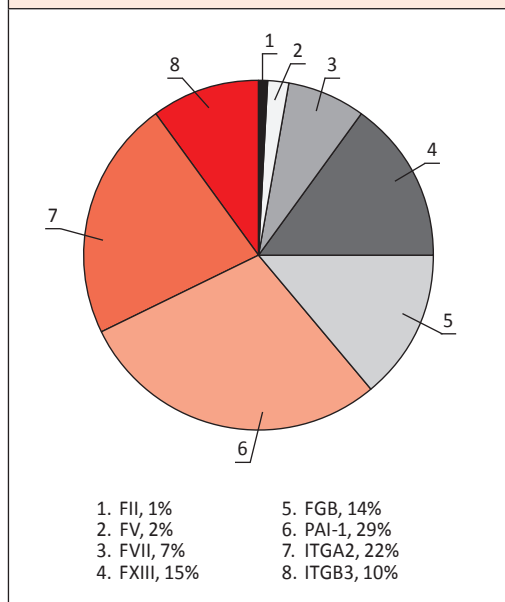
Среди европейцев с полиморфизмом *MTHFR677T* 12% составляют гомозиготы, 43% – гетерозиготы, а 45% – аллели дикого типа. Важно отметить, что в России данные о частоте «рискового» аллеля *MTHFR677T* представлены лишь отдельными не крупными исследованиями (выборки от 50 до 600 человек) [8].

Анализ встречаемости отдельных мутаций у пациенток показал преобладание комбинированных дефектов по сравнению с одиночными как в системе гемостаза (88%), так и фолатного цикла (81,4%), а именно двойных и тройных полиморфных вариантов в исследуемых генах, которые в совокупности в каждой группе генов составили 61% и 75,4% от всех выявленных случаев носительства полиморфизмов соответственно (рис. 2). Считается, что сочетанное носительство протромботических полиморфизмов, особенно *FV* и *FII* (0,2%), существенно повышает риск развития тромбозов и осложнений репродуктивного здоровья [9].

Низкую частоту наиболее значимых в развитии тромбофилии мутированных генов *FV* (2%) и *FII* (1%) в общей структуре полиморфизмов, обнаруженную в нашем исследовании, можно было бы рассматривать как показатель достаточно благоприятной ситуации в плане распространенности наследственной тромбофилии среди населения Забайкальского края (рис. 3). Однако, по нашему мнению, оценка риска развития тромбофилии не может проводиться при тестировании ограниченного числа наиболее изученных генов, считающихся безусловными и строгими маркерами наследственной тромбофилии (*FII*, *FV*, *MTHFR677T*).

В мировой практике молекулярно-генетический анализ не рекомендован в качестве скринингового. Однако низкий процент

РИСУНОК 3. Структура частоты выявления полиморфизма генов гемостаза, ассоциированных с риском развития тромбофилии (%)



не имеющих «рисковых» аллелей полиморфизма генов системы гемостаза (1,2%) и метаболизма фолатов (2,1%) среди всех обследованных женщин, а также утверждение группы ученых о том, что почти в 73% случаев идиопатического венозного тромбоза можно выявить генетический дефект [10], подтверждают целесообразность именно комплексного исследования маркеров наследственной тромбофилии уже при первичном обследовании пациента, особенно с нарушениями репродуктивного здоровья.

Таким образом, результаты анализа проведенных ПЦР-исследований показывают важность дальнейшего комплексного изучения генетических изменений системы гемостаза и метаболизма фолатов в акушерско-гинекологической практике, которые помогут практикующим врачам выявлять основные звенья

патогенеза различных тромбофилических состояний наряду с другими клинико-диагностическими исследованиями. По нашему мнению, не только комбинированные, но и изолированные генетические дефекты должны быть учтены, а их носители включены в группы риска развития тромботических осложнений, поскольку при определенных условиях может иметь место реализация предрасположенности к тромбозам в патологический процесс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты молекулярно-генетического типирования продемонстрировали достаточно высокую, но соответствующую общепопуляционным данным распространенность мутантных генотипов полиморфизма генов гемостаза и фолатного обмена у пациенток из Забайкальского края, направленных в специализированную локальную лабораторию преимущественно в связи с осложнениями репродуктивного здоровья. В исследуемой группе женщин отмечены высокая частота мутаций в генах системы фибринолиза, рецепторов тромбоцитов и белков фолатного цикла, преимущественно в гетерозиготной форме, а также наличие мультигенного характера тромбофилии (в более чем 80% случаев) при низкой встречаемости наиболее значимых в развитии тромбофилии мутаций генов факторов V и II. Это позволяет предположить, что определенные комбинации нескольких тромбофилических полиморфизмов, в том числе с мутациями генов метаболизма фолатов, ассоциированы с риском нарушений репродуктивного здоровья, что, несомненно, представляет интерес для персонализированного подхода к профилактике данных состояний.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в ходе написания данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Войцеховский В.В. Вторичная профилактика тромбообразования у больных наследственной гематогенной тромбофилией. Дальневосточный медицинский журнал, 2017, 4: 14-17./
Voitsekhovskiy VV. Secondary prevention of thrombosis in patients with hereditary hematogenous thrombophilia. Dalnevostochny Meditsinskiy Zhurnal, 2017, 4: 14-17.
2. Павлова Т.В., Воронова И.Л., Соснова Ю.Г. Наследственные тромбофилии и беременность. Тольяттинский медицинский консилиум, 2017, 1-2: 57-62./Pavlova TV, Voronova IL, Sosnova YuG. Hereditary thrombophilias and pregnancy. Tolyattinskiy Meditsinskiy Konsilium, 2017, 1-2: 57-62.
3. Савицкая В.М., Ниделько А.А. Роль наследственной тромбофилии в невынашивании беременности. Альманах молодой науки, 2016, 4:16-20./Savitskaya VM, Nidelko AA. The role of hereditary thrombophilia in miscarriage. Almanakh Molodoy Nauki, 2016, 4: 16-20.
4. Сироткина О.В., Дубина М.В. Молекулярно-генетическая диагностика предрасположенности к тромбозам и тромбоэмболическим осложнениям. Клинико-лабораторный консилиум, 2010, 5: 44-49./Sirotkina OV, Dubina MV. Molecular genetic diagnosis of predisposition to thrombosis and thromboembolic complications. Kliniko-Laboratory Konsilium, 2010, 5: 44-49.
5. Lu Y, Wang M, Liu Z et al. No association between the promoter polymorphisms of PAI1 gene and sporadic Alzheimer's disease in Chinese Han population. Neuroscience Letters, 2009, 455: 97-100.
6. Parad A, Zolghadri J, Nezam M, Afrasiabi A, Haghpanah S, Karimi M. Inherited thrombophilia and recurrent pregnancyloss. Iran Red Cres Med J, 2013, 15(12): e13708.
7. Марковский А.В., Страмбовская Н.Н. Полиморфизм генов белков фолатного обмена и рак молочной железы в Забайкалье. Врач-аспирант, 2015, 70(3.2): 230-234./Markovsky AV, Strambovskaya NN. Polymorphisms in folate metabolic genes and breast cancer in Transbaikal. Vrach-Aspirant, 2015, 70 (3.2): 230-234.
8. Фетисова И.Н., Добролюбов А.С., Липин М.А. и соавт. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека. Вестник новых медицинских технологий, 2007, X(1): 115-117./Fetisova IN, Dobrolyubov AS, Lipin MA, et al. Polymorphisms in folate metabolic genes and human diseases. Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologiy, 2007, X (1): 115-117.
9. Stevens M.S. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. J Thromb Thrombolysis, 2016, 41: 154-164. doi: 10.1007/s11239-015-1316-1.
10. Бокарев И., Попова Л. Тромбофилии. Врач, 2010, 5: 2-5./Bokarev I, Popova L. Thrombophilias. Vrach, 2010, 5: 2-5.

