

Наследственные формы тромбофилии, обусловленные носительством мутаций генов II и V факторов свертывания крови, как причина развития венозных тромбозов у жителей Республики Беларусь

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

Аннотация. С целью совершенствования существующих схем обследования больных с венозными тромбозами (ВТ) нами была изучена роль лейденской мутации (FVL) и мутации G20210A в гене протромбина (PT) в развитии тромбозов вен различной локализации и оценена распространенность данных генетических нарушений в популяции Беларуси. Показано, что FVL встречается у 2,9 %, а G20210A PT — у 1,7 % населения республики. Носительство мутаций в гетерозиготном состоянии является важным фактором риска развития ВТ и ассоциируется с существенным увеличением вероятности возникновения осложнений ВТ. Установление носительства FVL и G20210A PT целесообразно использовать в алгоритмах обследования больных ВТ независимо от возраста и наличия у них других факторов риска тромбообразования.

Венозные тромбозы (ВТ) — важная проблема современной медицины, значимая в практике врачей различных специальностей: хирургов, терапевтов, акушеров-гинекологов.

Открытие молекулярных основ наследственной (первичной) тромбофилии в 90-х годах XX в. позволило изучить причины и механизмы патологического тромбообразования — от мутации генов факторов свертывания до индивидуальных клинических проявлений тромбозов сосудов различной локализации. Установлено, что около 50% ВТ ассоциировано с различными формами первичной тромбофилии. Наиболее частыми причинами наследственных форм тромбофилии в европейских странах являются мутация в гене фактора V (FV) свертывания крови, известная как лейденская (FVL), и мутация G20210A в гене протромбина (PT) [8, 17].

Лейденская мутация была описана в 1994 г. R. Bertina et al. [7]. Представляет собой замену гуанина на аденин в 10 экзоне в позиции 1691 гена FV, что сопровождается замещением аргинина на глутамин в 506 позиции белка. Гетерозиготное носительство мутации сопряжено с 2–7-кратным, а гомозиготное — с 40–80-кратным возрастанием риска развития ВТ [12].

Мутация G20210A в гене протромбина была описана S. Poort et al. в 1996 г. [16]. Данный генетический дефект характеризуется заменой гуанина в положении 20210 на аденин в 3'-концевой, не кодирующей части гена протромбина. Гетерозиготное носительство G20210A PT повышает риск тромбообразования примерно в 3 раза, однако у лиц старше 60 лет риск возникновения ВТ, связанный с наличием этой мутации, может возрастать в 19 раз [12].

FVL и G20210A PT считаются факторами риска развития артериальных тромбозов у пациентов молодого возраста (до 50–55 лет) при отсутствии выраженного атеросклероза и других существенных факторов риска артериальной окклюзии, а также акушерской патологии: эклампсии, задержки внутриутробного развития плода, привычного невынашивания беременности [5, 9, 12, 15].

Ввиду вышеизложенного в европейских странах диагностику носительства FVL и G20210A PT рекомендовано включать в минимальный перечень обследований, необходимых для исключения наследственной тромбофилии, у пациентов с венозными и в ряде случаев с артериальными тромбозами, а также с другими, в частности акушерскими, патологическими состояниями. Тестирование на носительство мутаций людей, не имевших в анамнезе ВТ, це-

лесообразно для уточнения степени риска развития тромбоэмболических осложнений перед проведением хирургических вмешательств, планированием беременности, назначением оральных контрацептивов и заместительной терапии женскими половыми гормонами [5, 12, 15].

С целью совершенствования существующих схем обследования больных с ВТ и здоровых лиц, относящихся к группе повышенного риска тромбообразования, нами была изучена роль FVL и G20210A PT в развитии тромбозов вен различной локализации и оценена распространенность данных генетических нарушений в популяции Беларуси в целом.

Материалы и методы

Исследовали геномную ДНК 92 больных ВТ различной локализации в возрасте от 23 до 80 лет (опытная группа), а также образцы крови, высушенные на фильтровальной бумаге и используемые для скрининга на фенилкетонурию, от 344 новорожденных из всех регионов республики (контрольная группа). Средний возраст пациентов — 48,7±3,2 года. 43,5% составили женщины, 56,5% — мужчины. У 34 (36%) пациентов отмечено развитие таких осложнений ВТ нижних конечностей, как тромбоз легочной артерии (ТЭЛА) и посттромбофлебитический синдром (ПТФС) (рис. 1).

Идентификация мутаций проводилась методом ПЦР-амплификации-рестрикции с последующим электрофоретическим разделением рестриционных фрагментов, а также методом мультиплексной амплификации и гибридизации с аллель-специфичными олигонуклеотидами с ви-

зуализацией продуктов гибридизации с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). В работе использовались готовые наборы реагентов для определения мутаций фирмы «Гены - Биологии и Медицине» (Москва) и фирмы «Pronto Diagnostics Ltd» (Израиль).

Результаты работы анализировали с помощью стандартных пакетов программ Statistica 6,0, MS Excel, SPSS.

Для расчета частоты аллелей использовали формулу:

$$F = (2N_{ho} + N_{het}) / (N_{tot})$$

где F — частота аллеля, N_{ho} — число гомозиготных носителей мутации, N_{het} — число гетерозиготных носителей мутации, N_{tot} — общее количество обследованных. Для расчета 95% доверительного интервала (CI) доли применяли метод шкалы Вильсона без поправки на непрерывность [4].

Для расчета ожидаемых чисел генотипов в соответствии с законом Харди-Вайнберга использовали формулы:

$$E_{ho} = N_{tot} \times F^2;$$

$$E_{het} = N_{tot} \times 2F \times (1-F);$$

$$E_{norm} = N_{tot} (1-F)^2,$$

где E_{ho} , E_{het} , E_{norm} — ожидаемое число гомозиготных, гетерозиготных носителей мутации и лиц с нормальным генотипом соответственно [18]. Для проверки соответствия закону Харди-Вайнберга полученного распределения аллелей и генотипов изучаемых мутаций и сравнения их распределения в анализируемых группах пользовались критерием χ^2 с

поправкой Йетса [1]. Для характеристики риска развития ВТ или его осложнений, обусловленного носительством мутаций, вычисляли величину отношения шансов (OR) с 95% CI согласно формуле:

$$OR = (N_1 \times N_2) / (N_3 \times N_4),$$

где N_1 — число носителей FVL или G20210A PT в гетерозиготном состоянии в группе пациентов или лиц, имевших осложнения ВТ; N_2 — число лиц с нормальным генотипом в контрольной группе или среди больных с неосложненным ВТ; N_3 — число больных ВТ или лиц, имевших осложнения ВТ, с нормальным генотипом; N_4 — число носителей FVL или G20210A PT в гетерозиготном состоянии среди новорожденных или в группе пациентов с неосложненным ВТ. Носительство мутаций считалось фактором риска тромбообразования или возникновения осложнений ВТ в случае, если величина OR была больше единицы [2].

Результаты и обсуждение

Из 344 обследованных новорожденных 10 (2,9% (95% CI 1,6-5,3)) оказались носителями FVL, а у 6 (1,74% (95% CI 0,8-3,8)) была выявлена мутация G20210A PT в гетерозиготном состоянии. Сочетанное носительство FVL и G20210A PT не обнаружено ни в одном случае. Распространенность мутантных аллелей FVL и G20210A в Беларуси составила 1,45% (95% CI 0,8-2,7) и 0,87% (95% CI 0,4 - 1,9) соответственно.

Распределение нормального и мутантных генотипов FVL и G20210A PT в популяции было близким вычисленному на основании закона Харди — Вайнберга (табл. 1). Соответствие экспериментально установленных популяционных частот мутаций равновесию Харди — Вайнберга согласуется с результатами, полученными другими исследователями, и свидетельствует о том, что носительство изучаемых мутантных аллелей не является значительным фактором риска, нарушающим внутриутробное развитие и увеличивающим перинатальную смертность в популяции [11].

В европейских странах частота мутантного аллеля FVL различная и в среднем составляет 2,5% (табл. 2).

В Беларуси распространенность FVL оказалась ниже, чем в большинстве стран Европы, и ближе к таковой в России, в част-

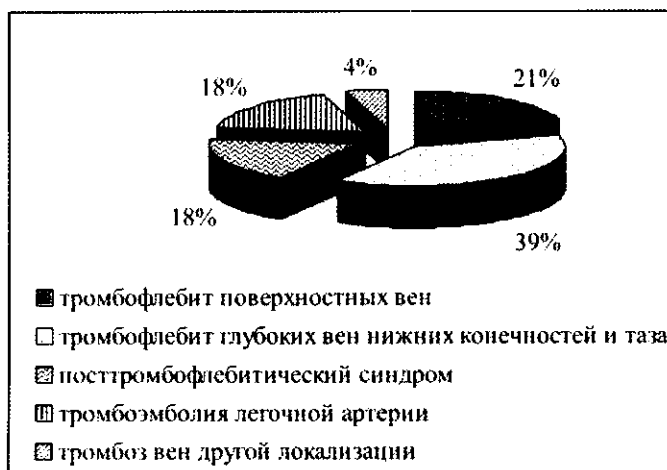


Рис. 1. Локализация ВТ в исследованной группе пациентов (n=92)

Таблица 1

Сравнение ожидаемых и наблюдаемых генотипов FVL и G20210A PT

FVL	GG	333,8	334	0,008	>0,99
	GA	10,2	10		
	AA	0,08	0		
G20210A	GG	337,8	338	0,001	>0,99
	GA	6,1	6		
	AA	0,03	0		

ности в Санкт-Петербурге, где частота гетерозиготного носительства FVL среди здоровых людей составляет 3,2 – 3,5% [3, 6].

Носительство G20210A PT в гетерозиготном состоянии в популяциях европейских стран обнаруживается примерно в 2,8% случаев. В южных регионах Европы мутация встречается несколько чаще – у 3,4% здорового населения. На севере Европы и в России распространенность G20210A PT ниже – 2,2–2,1%. Частота гетерозиготного носительства G20210A PT в Беларуси оказалась несколько меньше, чем в России и ряде европейских стран, однако в целом соответствует вариабельности распространенности этой мутации среди жителей Европы, установленной другими исследователями [10].

Из 92 обследованных пациентов с ВТ 10 (10,9% (95% CI 6,01–18,86)) оказались носителями FVL в гетерозиготном состоя-

нии; G20210A PT в гетерозиготном состоянии была идентифицирована также у 10 больных. В группе больных, как и среди новорожденных, сочетанное носительство FVL и G20210A PT не обнаружено.

Частота FVL и G20210A PT в группе пациентов с ВТ оказалась достоверно выше популяционных частот данных мутаций. Носительство FVL и G20210A PT в гетерозиготном состоянии сопровождалось существенным увеличением риска развития ВТ (табл. 3).

Необходимо отметить, что в целом среди пациентов с ВТ–жителей Беларуси частота наследственной тромбофилии, обусловленной носительством FVL и G20210A PT, несколько ниже, чем в России или европейских странах, где с наличием указанных мутантных аллелей ассоциируется не менее 25% всех случаев ВТ [3, 6, 10, 12–14]. Возможная

причина заключается не только в том, что в популяции Беларуси указанные мутации действительно встречаются реже, чем в других странах Европы и в России, но и в особенностях подхода к формированию опытной группы в данном исследовании. Нами обследована безвыборочная группа больных различного возраста с тромбозами разнообразной локализации. Многие пациенты имели существенные наследственные факторы риска тромбообразования, в частности варикозное расширение вен (32,6%). Вместе с тем некоторые авторы отмечали неожиданно низкую частоту FVL у лиц с варикозным расширением вен, имевших тромботические осложнения [6].

Нами установлено накопление мутантных аллелей FVL и G20210A PT в группе больных с осложнениями тромбоза вен нижних конечностей, такими как ТЭЛА и ПТФС. Среди пациентов с ТЭЛА и ПТФС носителями мутантных аллелей оказались 13 из 34 чел. В то же время из 54 больных, перенесших неосложненный тромбоз вен нижних конечностей, носительство FVL и G20210A PT выявлено только у 7 (рис. 2). Носительство FVL сопровождалось более высоким риском развития ПТФС (OR 5,2 95% CI 1,03–26,3) по сравнению с ТЭЛА (OR 3,6 95% CI 0,7–20,1). Напротив, у носителей G20210A PT вероятность возникновения ТЭЛА (OR 3,8 95% CI 0,8–17,5) превышала риск ПТФС (OR 1,6 95% CI 0,3–10,01).

Многие авторы, так же как и мы, отмечали, что ТЭЛА осложняет течение ВТ у носителей FVL реже, чем у лиц с другими формами тромбофилии, и объясняли данный феномен преимущественным поражением вен голени, а не илеофemorального сегмента у носителей FVL [13]. Преимущественное поражение сосудов определенной локализации и развитие соответствующих осложнений описано не только для FVL, но и для других форм наследственной тромбофилии. В частности, развитие ТЭЛА считают весьма характерным в случае носительства G20210A [14], что подтверждено и нашими наблюдениями.

Выявление у пациента наследственных форм тромбофилии существенно влияет на выбор тактики проведения первичной и вторичной профилактики тромбообразования [8, 12]. Возможности применения тестов на носительство мута-

Таблица 2

Распространенность FVL в популяциях различных стран [6, 11]

Дания	8384	3,4%	3,0–3,8
США	4936	2,7%	2,2–3,2
Италия	1928	1,2%	0,7–1,7
Германия	1628	3,7%	2,8–4,6
Голландия	602	2,3%	1,1–3,5
Швеция	576	5,6%	3,8–7,8
Великобритания	474	4,5%	2,6–6,3
Россия (С.-Петербург)	458	1,74%	0,89–3,4*
Япония	382	0%	0,0–1,0
Гренландия	266	0%	0,0–1,4
Исландия	192	2,6%	0,4–4,9

*Рассчитано авторами статьи на основании данных литературы [6].

Таблица 3

Распределение генотипов FVL и G20210A PT в исследованных группах и риск развития ВТ у носителей мутаций

FVL	GG	82	334	8,8	0,004	4,1 (1,5–11,0)
	GA	10	10			
G20210A	GG	82	338	14,6	<10 ⁻³	6,9 (2,2–21,9)
	GA	10	6			

ций при массовых, безвыборочных обследованиях лиц, не имевших ВТ в анамнезе, с целью формирования среди населения групп повышенного риска тромбообразования существенно ограничены ввиду относительно небольшой частоты мутантных аллелей в популяции Беларуси. Вместе с тем наличие генетических, а следовательно, неустраняемых факторов риска тромбообразования у больных ВТ является обоснованием для назначения длительной антикоагулянтной терапии с целью предотвращения рецидивов заболевания. В данном исследовании тестирование безвыборочной группы пациентов с ВТ на наличие FVL и G20210A PT позволило определить показания для пролонгированного назначения антикоагулянтов у значительной части больных. Таким образом, обследование на носительство FVL и G20210A PT всех пациентов с ВТ независимо от возраста, обстоятельств разви-

тия тромбоза и наличия других факторов риска тромбообразования обосновано и целесообразно [12, 19].

Итак, наши исследования показали, что FVL и G20210A PT – достаточно распространенные генетические аномалии у населения Республики Беларусь. Возникновение примерно 20% ВТ у жителей Беларуси ассоциировано с гетерозиготным носительством FVL и G20210A PT. Наличие мутантных аллелей сопровождается увеличением риска развития осложнений ВТ в 3–5 раз; при этом пациенты-носители FVL имеют большую предрасположенность к развитию ПТФС, а больные с G20210A PT – к ТЭЛА. Идентификация носительства FVL и G20210A PT у больных с установленным диагнозом ВТ позволяет выявить существенные, неустраняемые факторы риска развития заболевания примерно у пятой части обследованных, выделить группу лиц с высокой вероят-

ностью возникновения осложнений ВТ и выбрать адекватный режим вторичной профилактики тромбообразования на основании объективных лабораторных данных.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования тестов на носительство FVL и G20210A PT в алгоритмах обследования больных с установленным диагнозом ВТ независимо от их возраста и наличия других факторов риска тромбообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ таблиц сопряженности 2x2 с вычислением статистик связи (с поправкой Изйтса) // Биометрика (Электронный ресурс). – 2006 – Режим доступа <http://www.biometrika.tomsk.ru/freq2.htm> – Дата доступа: 09.10.2005.
2. Бабич П.Н. и др. // Укр. мед. часопис. – 2005. – N 2. – С. 113–1198.
3. Ельчанинов А.П. и др. // Юбилейная X конференция «Нейроиммунология», Москва, 28–31 мая 2001 г. – Т. 2. – С. 49.
4. Калькулятор доверительных интервалов / Свердловское региональное отделение Межрегионального общества специалистов доказательной медицины (Электронный ресурс). – 2006 – Режим доступа http://www.okb1.ru/~osdm/research.php?topic=1_1&level=1 – Дата доступа: 09.10.2005.
5. Макацария А.Д., Бицадзе В.О. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике. – М.: Триада-Х, 2003.
6. Шейдина А.М. Молекулярно-генетические основы наследственной предрасположенности к варикозному расширению вен и тромботическим осложнениям: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2000.
7. Bertina R.M. et al. // Nature. – 1994. – V. 369. – P. 64–67.
8. Bick R.L. et al. // Hematology/Oncology clinics of North America. – 2003. – V. 17, 1. 1. – P. 217–258.
9. Bick R.L. // Hematology/Oncology clinics of North America. – 2003. – V. 17, 1. 1. – P. 9–36.
10. Burzotta F // Brit. Med. J. – 2004. – V. 90. – P. 82–86.
11. Conroy J.M. et al. // Thrombosis research. – 2000. – P. 317–324.
12. De Stefano V. et al. // Haematologica. – 2002. – V. 87. – P. 1095–1108.
13. Kujovich J.L. // GeneReviews Full Glossary (Electronic resource). – 2006 – Mode of access: <http://www.geneclinics.org/servlet/access?id=888889&key=acA-w0Ack382G&gry=...> – Date of access: 09.11.2006.
14. Kujovich J.L. // GeneReviews Full Glossary (Electronic resource). – 2006 – Mode of access: <http://www.geneclinics.org/servlet/access?id=8888891&key=acA-w0Ack382G&gry=...> – Date of access: 09.11.2006.
15. Nicolaes G.A.F. et al. // Hematology/Oncology Clinics of North America. – 2003. – V. 17, 1. 1. – P. 37–61.
16. Poort S.R. et al. // Blood. – 1996. – V. 88. – P. 3698 – 3703.
17. Spek C. A. et al. // Molecular genetics and metabolism. – 2000. – V. 71. – P. 51–61.
18. Torben B.L. et al. // Thrombosis research. – 1998. – V. 89. – P. 211–215.
19. Tripodi A. et al. // Clin. Chem. – 2001. – V. 47, N 9. – P. 1597–1606.

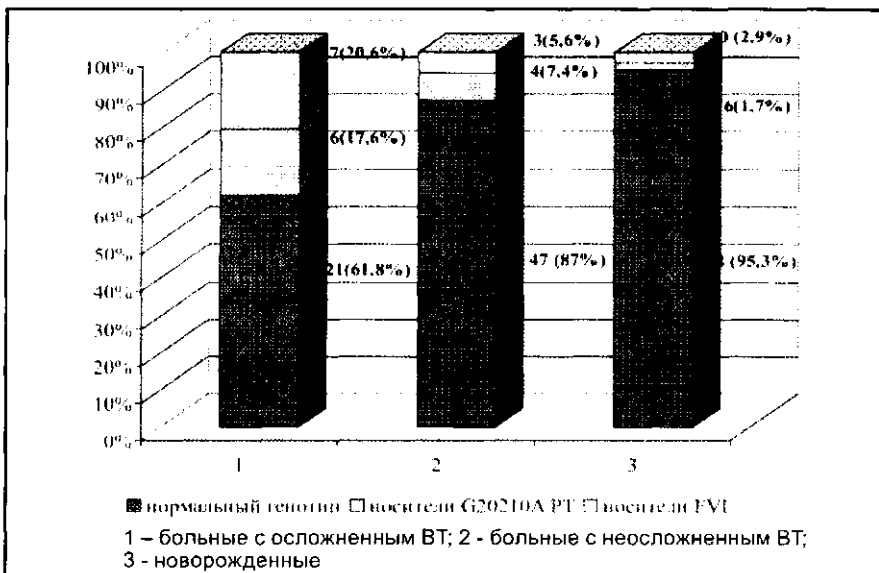


Рис. 2. Распределение генотипов FVL и G20210A PT среди пациентов с осложненными и неосложненными ВТ нижних конечностей