

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РИСКЕ РАЗВИТИЯ ОСТРОГО ТРОМБОЗА ГЛУБОКИХ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Денис Николаевич РОВЕНСКИХ¹, Владимир Николаевич МАКСИМОВ^{2,3},
Нина Павловна ТАТАРНИКОВА², Станислав Александрович УСОВ⁴,
Михаил Иванович ВОЕВОДА^{2,3}

¹ МБУЗ Городская клиническая больница № 1
630075, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6

² ФГБУ НИИ терапии СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

³ ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

⁴ Новосибирский военный институт внутренних войск имени генерала армии
И.К. Яковлева МВД России
630114, г. Новосибирск, Ключ-Камышенское плато, 6/2

Острый тромбоз глубоких вен нижних конечностей (ОТГВНК) представляет собой глобальную медико-социальную проблему, по-прежнему являясь одной из причин смертности и инвалидизации в России и в индустриально развитых странах мира. Ключевое место в патогенезе развития ОТГВНК отводится феномену тромбофилии. Исследования последних лет существенно расширили наши представления о молекулярных механизмах формирования тромбофилических состояний. Весьма редкими остаются публикации по анализу «ген-генных взаимодействий» полиморфных генетических вариантов, способных влиять на развитие ОТГВНК. Материал и методы. Первую группу составили 58 пациентов с ОТГВНК (35 мужчин и 43 женщины в возрасте от 25 до 60 лет), группа контроля была отобрана из двух популяционных выборок жителей двух административных районов г. Новосибирска, обследованных в рамках популяционных программ MONICA и НАРИЕЕ. Изучены мутации в генах протромбина (G20210A, (rs 179996), гена F5 (лейденская, A506G, (rs 6025), полиморфизм C677T (rs 1801133) в гене метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR. Заключение. Лейденская мутация выявлена у двух лиц основной группы, мутации протромбина не обнаружено. Установлено достоверное повышение частоты встречаемости генотипа аллелей TT полиморфизма C677T гена MTHFR, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла, проявляющимися гомоцистеинемией, у лиц с ОТГВНК, что может служить особенностью региона.

Ключевые слова: острый тромбоз глубоких вен нижних конечностей, тромбофилия, лейденская мутация, мутация протромбина, гомоцистеинемия.

Острый тромбоз глубоких вен нижних конечностей (ОТГВНК) с его ранним осложнением в виде тромбоэмболии легочной артерии и поздним в виде развития хронической венозной недостаточности представляет собой глобальную медико-социальную проблему, по-

прежнему являясь одной из причин смертности и инвалидизации в России и в индустриально развитых странах мира [2–4, 7]. По данным В.С. Савельева [7], в РФ частота возникновения ОТГВНК в общей популяции составляет 2 на 1000 человек ежегодно.

Ровенских Д.Н. – врач, хирург-онколог

Максимов В.Н. – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

Татарникова Н.П. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований и терапевтических заболеваний

Усов С.А. – д.м.н., профессор

Воевода М.И. – д.м.н., проф., член-кор. РАМН, директор, e-mail: mvoevoda@ya.ru

Ключевое место в патогенезе развития ОТГВНК отводится феномену тромбофилии [1, 4, 5]. Под термином «тромбофилия» в настоящее время подразумевают нарушения гемостаза и гемореологии, характеризующиеся повышенной склонностью к развитию тромбозов кровеносных сосудов, в основе которых лежат приобретенные и генетически обусловленные нарушения в различных звеньях гемостаза и гемореологии [3, 5, 9].

Исследования последних лет существенно расширили наши представления о молекулярных механизмах формирования тромбофилических состояний [10, 12, 13]. Во многом это объясняется успехами в изучении такой фундаментальной составляющей эндогенного риска, как генетическая предрасположенность.

Необходимость использования принципиально новых подходов при изучении генетической предрасположенности к тромбозу диктуется существующей на сегодняшний момент концепцией о полигенном характере наследственной тромбофилии [4, 8, 10–13]. В связи с этим особое внимание уделяется явлению аллельного полиморфизма, которое присуще большинству генов человека [13].

К настоящему времени выявлено несколько десятков генетических маркеров, носительство которых ассоциировано с риском развития ОТГВНК. Несмотря на интенсивные поиски новых генетических детерминант наследственной тромбофилии, данные о роли большей части полиморфизмов ДНК в формировании предрасположенности к тем или иным тромботическим проявлениям остаются весьма противоречивыми. Практически отсутствуют работы по распространенности уже известных факторов риска развития ОТГВНК. Весьма редкими остаются публикации по анализу «ген-генных взаимодействий» полиморфных генетических вариантов, способных влиять на развитие заболевания.

Цель исследования – изучить роль некоторых молекулярно-генетических факторов в риске развития ОТГВНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Первую группу составили 58 пациентов с ОТГВНК (35 мужчин и 43 женщины в возрасте от 25 до 60 лет, средний возраст $49,5 \pm 1,3$ года), последовательно поступивших в Новосибирский городской ангиохирургический центр в экстренном порядке. Критериями включения в исследование были возраст от 25 до 60 лет, установленный клинически диагноз острого тром-

боза глубоких вен нижних конечностей, верификация диагноза с помощью ультразвукового дуплексного сканирования сосудов нижних конечностей, информированное согласие пациента на включение в исследование. Критерии исключения: наличие диагностированного онкологического заболевания, регулярный прием комбинированных оральных контрацептивов, травма нижних конечностей, длительная иммобилизация ввиду наличия основного заболевания.

Группа контроля была отобрана из двух популяционных выборок (MONICA и aHAPIEE) жителей двух административных районов г. Новосибирска, типичных как для Новосибирска, так и для других крупных промышленных городов Сибири. Выборка сформирована на основе избирательных списков с использованием таблиц случайных чисел. Общий объем выборки из генеральной совокупности определялся протоколами проектов HAPIEE. В рамках проекта HAPIEE с 2003 по 2006 г. проведено обследование 9397 мужчин и женщин. Отклик составил около 70 %. Протокол получил одобрение локального этического комитета. Всеми обследуемыми предварительно подписано информированное согласие на участие в исследовании. Для сравнительного анализа сформирована группа из 580 человек (360 мужчин, 230 женщин), средний возраст $49,9 \pm 0,5$ года.

ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Полиморфизм генов тестировали по опубликованным методикам с помощью ПЦР с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В исследование были включены мутация в гене протромбина (G20210A, rs 179996), мутация в гене F5 (лейденская, A506G, rs 6025), полиморфизм C677T (rs 1801133) в гене метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR.

При выполнении статистического анализа на первом этапе определяли частоты генотипов и аллелей изучаемых однонуклеотидных полиморфизмов в группе больных ОТГВНК и в контрольной группе, потом оценивали соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга в контрольной группе (по критерию χ^2). Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов с ОТГВНК проверялась с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 по Пирсону. В случае четырехпольных таблиц при сравнении выборок по частотам генотипов и аллелей применяли точный двусторонний критерий Фишера. Относительный риск (odds ratio, OR) заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов.

Таблица 1

Частоты генотипов лейденской мутации в гене F5 (A506G, rs6025)

Генотип	Контрольная группа		ОТГВНК	
	n	%	n	%
AG	18	3,1	2	3,4
GG	562	96,9	56	96,6

Таблица 2

Частоты генотипов полиморфизма C677T (rs1801133) в гене MTHFR

Генотип	Контрольная группа		ОТГВНК	
	n	%	n	%
CC	308	53,1	18	31,0
CT	229	39,5	26	44,8
TT	43	7,4	14	24,1

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ген V фактора свертывания находится на первой хромосоме. Механизм тромбофилии при наличии мутации Лейдена выглядит таким образом: в позиции 1691 гена, кодирующего V фактор, происходит замена аденина на гуанин, вследствие чего в 506 положении белка вместо аргинина появляется глутамин (Arg506Glu). При такой замене V фактор не расщепляется естественным физиологическим антикоагулянт-ом протеином C, как это происходит в норме, а становится устойчивым к его действию, что приводит к повышению концентрации V фактора свертывающей системы крови в сыворотке [6, 14]. В ходе исследования у 2 женщин с ОТГВНК в возрасте 39 и 33 года была выявлена мутация Лейдена (табл. 1); увеличения частоты носительства мутации Лейдена не найдено. Возможно, если сформировать большую группу женщин с ОТГВНК в возрасте до 50 лет, то вклад лейденской мутации в риск развития заболевания подтвердится.

Таблица 3

Частоты генотипов полиморфизма C677T (rs1801133) в гене MTHFR у мужчин и женщин с ОТГВНК

Генотип	Мужчины		Женщины	
	n	%	n	%
CC	8	22,9	10	43,5
CT	16	45,7	10	43,5
TT	11	31,4	3	13,0

Ген протромбина располагается на одиннадцатой хромосоме. Особенностью данной мутации является то, что замена нуклеотида располагается в 3'-нетранслируемом участке. Это означает, что нуклеотидная последовательность измененного участка гена не участвует в кодировании аминокислотной последовательности протромбина. Поэтому никаких химических изменений самого белка при наличии данной мутации не возникает, но обнаруживается увеличение его содержания в сыворотке крови, которое может быть в 1,5–2 раза выше нормы. В ходе исследования мутации гена протромбина не выявлено ни у одного исследуемого с ОТГВНК.

Ген MTHFR у человека расположен на коротком плече первой хромосомы (1p36.3). Наиболее изучен вариант, в котором нуклеотид цитозин в позиции 677, относящейся к 4-му экзону, заменен на тимидин (мутация C677T), что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина в сайте связывания фолата. У лиц, гомозиготных по аллелю T, отмечается термолабильность MTHFR и снижение активности фермента примерно до 35 % от среднего значения, а также нарушается распределение фолатов в эритроцитах, выражающееся в накоплении формильных полиглутаматов тетраглутамата и метилированных дериватов тетрагидрофолата. Кроме того, наличие этой замены сопровождается повышением уровня гомоцистеина в крови.

Таблица 4

Частоты генотипов полиморфизма C677T (rs1801133) в гене MTHFR у мужчин и женщин с ОТГВНК в возрасте до 50 лет и 50 лет и старше

Генотип	Мужчины				Женщины			
	до 50 лет		50 лет и старше		до 50 лет		50 лет и старше	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CC	4	28,6	4	19,0	5	50,0	5	38,5
CT	8	57,1	8	38,1	4	40,0	6	46,2
TT	2	14,3	9	42,9	1	10,0	2	15,4

Исследованные группы высокодостоверно ($p < 0,0001$) различались по частотам генотипов полиморфизма C677T (rs1801133) в гене MTHFR за счет существенного повышения доли носителей генотипа ТТ у лиц с ОТГВНК (табл. 2). Отношение шансов иметь ОТГВНК у носителей аллеля Т в 2,5 раза выше, чем у носителей генотипа СС (95 % доверительный интервал 1,4–4,5; $p = 0,001$). Несмотря на небольшой размер группы пациентов с ОТГВНК, мы разделили ее по полу для оценки частот генотипов полиморфизма C677T (rs1801133) в гене MTHFR (табл. 3). Оказалось, что среди женщин носительство генотипа ТТ встречается значительно реже (13 %), чем среди мужчин (31 %). Конечно, настоящее исследование – по сути пилотное, и для того чтобы сделать обоснованные выводы, требуется существенное увеличение численности группы лиц с ОТГВНК. Тем не менее есть основания предположить значительный вклад нарушений фолатного обмена в риск развития ОТГВНК у мужчин.

При выделении подгрупп в зависимости от возраста (до 50 лет и 50 лет и старше) у женщин группа делится почти поровну с тенденцией к повышению доли носительниц аллеля Т среди пациенток 50 лет и старше. Мужчин с ОТГВНК в возрасте до 50 лет было в 1,5 раза меньше, чем пациентов 50 лет и старше, а доля гомозигот ТТ среди них – в 3 раза ниже (табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования изучена встречаемость лейденской мутации, мутации протромбина и частоты генотипов полиморфизма C677T гена MTHFR. Лейденская мутация выявлена у двух пациентов с ОТГВНК, мутации протромбина не обнаружено. Установлена достоверно более высокая, чем у здоровых людей, встречаемость носительства генотипа ТТ полиморфизма C677T гена MTHFR нарушений фолатного цикла с гомоцистеинемией у лиц с ОТГВНК, что может являться особенностью региона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баешко А.А. Факторы риска тромбоза глубоких вен нижних конечностей // *Ангиология сегодня*. 2002. (9). 9–14.
2. Балуда В.П., Балуда М.В., Гольдберг А.П., Салманов П.Л. Претромботическое состояние. Тромбоз и его профилактика. М.: Зеркало-М, 1999. 297 с.
3. Балуда М.В., Деянов И.И. Венозные тромбозы у больных острым инфарктом миокарда и ишемическим инсультом головного мозга, их факторы риска возникновения и профилактика // *Кардиология*. 1996. (5). 63–68.
4. Баркаган З.С. Учение о тромбофилиях на современном этапе // *Консилиум*. 2000. (6). 61–65.
5. Макацария М.А., Джангидзе М.А., Бицадзе В.О. Гормональная контрацепция и тромбофлебические состояния // *Проблемы репродукции*. 2001. 9. (6). 218–221.
6. Овчаренко С.И., Сон Е.А., Окишева Е.А., Королева И.М. Тромбофилия как причина тромбоза легочных артерий // *Трудный пациент*. 2008. (2–3). http://www.t-pacient.ru/archive/tp2-3-08/tp2-3-08_430.html
7. Савельев В.С. Роль хирурга в профилактике и лечении венозного тромбоза и легочной эмболии // *50 лекций по хирургии*. М.: Медиа Медика, 2003. 92–98.
8. Шмелева В.М. Гипергомоцистеинемия и тромбоз // *Тромбоз, гемостаз, реология*. 2000. (4). 26–29.
9. Шостак Н.А., Кириенко А.И., Бабадаева Н.М. Антифосфолипидный синдром в структуре гематогенной тромбофилии у пациентов молодого и среднего возраста с венозными тромбозами // *Терапевт. арх.* 2005. 77. (5). 47–51.
10. Cattaneo M., Martinelli I., Mannucci P.M. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis // *N. Engl. J. Med.* 1996. 334. 759–762.
11. Gardner J. Factor V Leiden with deep venous thrombosis // *Clin. Lab. Sci.* 2003. (1). 6–9.
12. Labropoulos N. Diagnosis of deep venous thrombosis // *Vascular Surgery Highlights* / Ed. A.H. Davies. Oxford: Health Press Limited, 2004. 45–52.
13. Lu Y., Zhao Y., Liu G. et al. Factor V gene G1691A mutation, prothrombin gene G20210A mutation, and MTHFR gene C677T mutation are not risk factors for pulmonary thromboembolism in Chinese population // *Thromb. Res.* 2002. (6). 7–12.
14. Price D.T., Ridker P.M. Factor V Leiden mutation and the risk for thromboembolic disease: a clinical perspective // *Ann. Intern. Med.* 1997. 127. 895–903.

THE ROLE OF MOLECULAR-GENETIC FACTORS IN THE RISK OF DEVELOPMENT OF ACUTE THROMBOSIS OF DEEP VEINS OF LOWER EXTREMITIES

**Denis Nikolaevich ROVENSKIKH³, Vladimir Nikolaevich MAKSIMOV^{1,2},
Nina Pavlovna TATARNIKOVA¹, Stanislav Alexandrovich USOV⁴,
Mikhail Ivanovich VOEVODA^{1,2,5}**

¹ *Municipal Budgetary Institution City Clinical Hospital № 1
630075, Novosibirsk, Zalesskogo str., 6*

² *FSBI "Institute of Internal Medicine" SB RAMS
630089, str. Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

³ *FSBI "Institute of Cytology and Genetics" SB RAS
630090, Novosibirsk, Lavrentiev av., 10*

⁴ *Novosibirsk Military Institute n.a.General of the Army I.K. Yakovlev
630114, Novosibirsk, Klyuch Kamyshenskoe plato, 6/2*

Acute thrombosis of deep veins of lower extremities (ATDVLE) is a global medical and social problem, in view of the fact that it is still one of the causes of morbidity and mortality in Russia and industrially developed countries of the world. The key role in the pathogenesis of the development of ATDVLE is associated with phenomenon thrombophilia. The researches of recent years have greatly expanded our understanding of the molecular mechanisms of formation of thrombophilia. The publications on the analysis of «gene-gene interaction» polymorphic genetic variants remain very rare that can influence the development of ATDVLE.

Materials and methods. The first group consisted of 58 patients in the age from 25 till 60 years, the average age of patients with ATDVLE was 49.48 ± 1.26 years (35 men and 43 women). The control group was selected from two population-based samples (MONICA and aHAPIEE) of the residents of two administrative Novosibirsk districts. The study included: a mutation in the gene prothrombin (G20210A, (rs 179996), a mutation in the gene F5 (Leyden, A506G, (rs 6025), polymorphism C677T (rs 1801133) in a gene MTHFR.

Conclusion. Leiden mutation is detected among two members of the core group, prothrombin mutation is not revealed. The significant increase in occurrence of alleles of polymorphism of C677T gene MTHFR associated with disorders of folate cycle being manifested with homocysteinaemia in patients with ATDVLE has been found that can be a feature of the region.

Key words: acute thrombosis of deep veins of lower extremities, thrombophilia, Leiden mutation, prothrombin, homocysteinatmia.

Rovenskiikh D.N. – physician, surgeon-oncologist

Maksimov V.N. – doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory for molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: medik11@mail.ru

Tatarnikova N.P. – junior researcher of the laboratory for molecular genetic researches and therapeutic diseases

Usov S.A. – doctor of medical sciences, professor

*Voevoda M.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, director,
e-mail: mvoevoda@ya.ru*