

Н. В. Кох¹, Е. Н. Воронина¹, Н. М. Пасман², М. Л. Филипенко¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
просп. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

² Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: natashakoch@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ТРОМБОФИЛИИ НА ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ

В работе определяли ассоциации наиболее часто встречающихся наследственных факторов тромбофилии с развитием акушерской патологии (гестоз, невынашивание беременности, фетоплацентарная недостаточность) у женщин в русской популяции, проживающих в Новосибирске. Обследована 251 женщина, из них 156 человек из группы риска. Группу контроля составили 95 женщин, родивших доношенного ребенка и не имевших акушерской патологии. Выявлена ассоциация аллелей 677Т гена *MTHFR* ($OR = 3,7$, $C.I. = 2,270-6,030$, $\chi^2 = 29,78$, $p = 4,849e-08$), 1691А гена V фактора свертывания крови (лейденская мутация) ($OR = 14,532$, $C.I. = 0,851-248,044$, $\chi^2 = 6,85$, $p = 0,00849$) и 20210А гена протромбина ($OR = 9,354$, $C.I. = 0,531-164,708$, $\chi^2 = 4,32$, $p = 0,04835$) с увеличением риска развития осложнений беременности тромбофилического характера. Таким образом, обнаружение данных маркеров у беременных женщин позволит рационально сформировать группы риска и проводить профилактику осложнения.

Ключевые слова: наследственные тромбофилии, метилентетрагидрофолатредуктаза, гомоцистеин, гестоз, самопроизвольный выкидыш.

Повышенное тромбообразование у пациенток в акушерской практике является одной из значимых причин развития осложненной беременности, а иногда и потери плода. Тромбообразование в сосудах плаценты приводит к нарушению жизнедеятельности имплантировавшегося плодного яйца, а на более поздних сроках беременности – плода. Существуют алгоритмы наблюдения и лечения пациенток с тромбофилиями, что позволяет успешно выносить беременность и избежать осложнений.

Можно утверждать, что дефект любого белка, входящего в коагуляционное или тромбоцитарное звено свертывающей системы крови, приводящий к гиперкоагуляции, может выступать в качестве причины тромбоза сосудов плаценты и невынашивания беременности. Поэтому основной проблемой этой части современной медицины является выявление маркеров тромбофилий. К числу наиболее изученных генных маркеров наследственных тромбофилий относятся мутация С677Т гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), лейденская му-

тация G1691А ген V фактора свертывания крови (*FV*) и мутация G20210А гена протромбина (*FII*) [1–3].

MTHFR – это фермент, относящийся к группе флавопротеинов. Дефицит этого фермента связан с нарушениями обмена гомоцистеина [2; 4]. Носительство аллеля 677Т приводит к термолабильности фермента и снижению его активности примерно до 35 % от среднего значения. В результате повышается уровень гомоцистеина. Гипергомоцистеинемия может быть одной из причин развития генерализованной микроангиопатии во второй половине беременности, проявляющейся в виде гестоза (артериальной гипертензии, нефропатии, преэклампсии и эклампсии) [2; 5–8]. Гомоцистеин свободно переходит через плаценту и может оказывать тератогенное и фетотоксическое действие.

Следствием лейденской мутации является резистентность V фактора свертывания крови к активированному протеину С (естественному антикоагулянту). Мутация наследуется по аутосомно-доминантному ти-

пу. Гетерозиготными носителями являются в среднем 3–5 % европейского населения. Случаи гомозиготного носительства лейденской мутации в популяции встречаются крайне редко. Наличие этой мутации повышает вероятность развития целого ряда осложнений беременности: невынашивания беременности (риск повышается в три раза) [2; 7], отставания развития плода, гестоза, фетоплацентарной недостаточности [7; 9; 10].

Мутация гена протромбина G20210A находится в его регуляторной части. Аллель 20210A (мутантный) приводит к увеличению стабильности мРНК данного гена [2]. Уровень протромбина может быть в 1,5–2 раза выше, чем в норме [3]. Мутация наследуется по аутосомно-доминантному типу. Наличие данной мутации является фактором риска всех осложнений, связанных с лейденской мутацией (невынашивание беременности, фетоплацентарная недостаточность, гестозы, задержка развития плода) [1; 7; 11].

Тромбозы, обусловленные наследственной предрасположенностью, часто развиваются при наличии дополнительных факторов риска: беременности, приема гормональных контрацептивов, повышения уровня гомоцистеина, мутаций нескольких генов, антифосфолипидных антител.

Целью работы являлась оценка значимости наследственной предрасположенности к тромбофилии в развитии различных акушерских осложнений у женщин русской национальности, проживающих в г. Новосибирске. Исследование проводилось методом сравнения частот встречаемости аллельных вариантов гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), лейденской мутации (FV фактора свертывания крови) и мутации гена протромбина G20210A в выборках женщин с осложненным протеканием беременности и здоровых матерей, не имевших акушерской патологии.

Материал и методы

В ходе исследования использованы две панели ДНК: экспериментальная ($n = 156$) (1-я группа) и контрольная ($n = 95$) (2-я группа). Экспериментальную группу составляли пациентки с акушерской патоло-

гией (гестоз, фетоплацентарная недостаточность, угроза самопроизвольного выкидыша), а также женщины, имевшие в анамнезе один или более самопроизвольных выкидышей с неуточненной этиологией. Из 1-й группы были исключены женщины, имевшие другие причины развития акушерской патологии (хронические заболевания, такие как СД, аномалии развития матки, миомы, наличие антифосфолипидных антител).

В группу контроля вошли здоровые женщины, родившие доношенного ребенка с оценкой по шкале Апгар 8–10 баллов и не имевших акушерской патологии. Предпочтение отдавалось женщинам, родившим двух и более детей.

В обеих группах проводился забор буккального эпителия. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [12]. Определение генотипа проводили методом ПДРФ анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

ПЦР проводили в конечном объеме 12 мкл, содержащем 65 мМ трис-HCl (pH 8,9), 16 мМ сульфата аммония, 3,6 мМ хлорида магния, 0,01 % раствор Твин 20, 0,2 мМ *dNTP*, 0,2 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров, 20–100 нг ДНК и 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Реакцию для определения всех трех мутаций проводили одновременно в одной пробирке. Последовательности праймеров были следующими: (для гена FV) F: 5'-GTAAGAGCAGATCCCTGGACAGTC, R: 5'-GCAGTGTGGTACTGATAAAAATCG; (для гена FII) F: 5'-GGTTCCCAATAAAAGTGACTCTCATC, R: 5'-CATCTTTAATGCCTGTAAATTCGAC; (для гена MTHFR) F: 5'-GTTACCCCAAAGGCCACCC, R: 5'-GGAAGAATGTGTCAGCCTCGAAG.

ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе («Eppendorf», Германия) с начальной денатурацией при 95 °С в течение 3 мин, далее в течение 35 циклов с денатурацией по 10 с при 95 °С, отжигом праймеров 10 с при 65 °С и элонгацией в течение 15 с при 72 °С. Финальную элонгацию проводили при 72 °С в течение 5 мин. Амплификационные продукты обрабатывались эндонуклеазой рестрикции TaqI. Анализ продуктов гидролиза проводили с помощью электрофореза в 8 % геле ПААГ, который окрашивали бромистым этидием с визуализацией

ДНК УФ светом, затем фотографировали с помощью цифровой камеры. На снимках визуализировались следующие фрагменты ДНК:

- 320 п. н. (амплификационный фрагмент гена *FII* без обработки рестриктазой);
- 299 п. н. (аллель А полиморфного локуса G20210А гена *FII*);
- 274 п. н. (аллель G полиморфного локуса G20210А гена *FII*);
- 233 п. н. (амплификационный фрагмент гена *FV* без обработки рестриктазой);
- 208 п. н. (аллель А полиморфного локуса G1691А гена *FV*);
- 185 п. н. (аллель G полиморфного локуса G1691А гена *FV*);
- 126 п. н. (амплификационный фрагмент гена *MTHFR* без обработки рестриктазой);
- 106 п. н. (аллель С полиморфного локуса С677Т гена *MTHFR*);
- 79 п. н. (аллель Т полиморфного локуса С677Т гена *MTHFR*).

Далее снимки анализировались и по наличию тех или иных фрагментов ДНК делалось заключение о генотипе.

Выявленное распределение частот встречаемости генотипов проверяли на отклонение от равновесия Харди – Вайнберга с использованием критерия χ^2 . Достоверность различий частот генотипов и аллелей в сравниваемых группах определяли с помощью χ^2 с учетом поправки Йетса. Статистически значимым считали различие при величине $p < 0,05$. Для выявления ассоциаций между наличием мутации и заболеванием подсчитывали показатель отношения шансов (odds ratio, *OR*) с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия) по Web-адресу http://ihg.gsf.de/ihg/index_engl.html.

Результаты исследования и обсуждение

Полиморфный локус С677Т гена MTHFR. Полученные нами данные по генотипированию точечной нуклеотидной замены С677Т гена *MTHFR* представлены в табл. Статистически значимые различия между 1-й и 2-й группами наблюдались в распределении как аллелей ($\chi^2 = 29,78$, $p < 0,01$), так и генотипов ($\chi^2 = 38,17$, $p < 0,01$). Аллель

Т, наличие которой приводит к термолабильности *MTHFR* и снижению активности фермента, чаще встречалась в 1-й группе женщин (37 % против 14 % случаев во 2-й группе). Для пациентов с гетерозиготным генотипом *MTHFR* 677Т / 677С риск развития патологии беременности увеличивался в 4,8 раза ($OR = 4,800$, $C. I. = 1,516–15,199$, $\chi^2 = 8,19$, $p = 0,00420$), для гомозигот – в 6,4 раза ($OR = 6,375$, $C. I. = 3,352–12,125$, $\chi^2 = 35,40$, $p = 2,682e-09$). Стоит отметить, что аллель С в гомозиготном состоянии выступает как протектор заболеваемости ($OR = 0,270$, $C. I. = 0,166–0,440$, $\chi^2 = 29,78$, $p = 4,849e-08$).

Таким образом, наши данные свидетельствуют об ассоциации полиморфного локуса С677Т гена *MTHFR* с развитием осложнений беременности тромбофилического характера. Скорее всего, это связано с увеличением уровня гомоцистеина (небольшом у гетерозигот и значительном у гомозигот по аллелю Т), что приводит к повреждению клеток эндотелия и соответственно к микротромбообразованию и нарушению микроциркуляции [7]. Дефекты плацентации и фетоплацентарного кровообращения могут быть причиной невынашивания, а также таких осложнений беременности, как гестоз, отслойка плаценты и гибель плода. Надо отметить, что добавление фолиевой кислоты в рацион питания значительно снижает риск развития осложнений беременности в случае носительства аллеля 677Т [7].

Лейденская мутация G1691A V фактора свертывания крови является точечной нуклеотидной заменой G → A в позиции 1691 гена V фактора свертывания крови. В 1-й группе (156 человек) обнаружено 11 пациентов с гетерозиготными мутациями V фактора (генотип 1691G / 1691A), во 2-й группе все обследуемые женщины имели нормальный генотип (1691G / 1691G) (см. табл.). Гомозиготных мутаций в обеих группах не выявлено. Таким образом, частота встречаемости аллеля 1691А гена *FV* составила 4 % в 1-й группе. Носительство аллеля 1691А в 15 раз увеличивает вероятность развития осложнений беременности тромбофилического характера ($OR = 15,096$, $C. I. = 0,879–259,202$, $\chi^2 = 7,01$, $p = 0,00812$). Соответственно носительство данной мутации является фактором риска развития акушерской патологии.

Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов исследуемых генов в 1-й и 2-й группах

Группа	Частота встречаемости аллеля (n)	Частота встречаемости генотипа (n)	Соответствие закону Харди – Вайнберга, χ^2 *, $df=1$ (p)			
Полиморфный локус С677Т гена <i>MTHFR</i>						
	С	Т	С/С	С/Т	Т/Т	
1-я	0,63 (195)	0,37 (117)	0,35 (55)	0,55 (85)	0,10 (16)	0,058
2-я	0,86 (164)	0,14 (26)	0,77 (66)	0,19 (17)	0,04 (3)	0,052
Полиморфный локус G1691A гена V фактора свертывания крови						
	G	A	G/G	G/A	A/A	
1-я	0,96 (301)	0,04 (11)	0,93 (145)	0,07 (11)	0	0,648
2-я	1,00 (190)	0	1,00 (95)	0	0	0
Полиморфный локус G20210A гена протромбина						
	G	A	G/G	G/A	A/A	
1-я	0,98 (305)	0,02 (7)	0,96 (149)	0,04 (7)	0	0,774
2-я	1,00 (190)	0	1,00 (95)	0	0	0

Примечание: * – критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди – Вайнберга.

Bloomenthal D. и соавт. приводят данные, что 20–50 % женщин, которые имели потери беременности на поздних сроках, являлись носителями лейденской мутации V фактора свертывания крови [9]. Также авторы указывают на повышение риска развития гестоза, отслойки плаценты и венозной тромбоэмболии у носителей лейденской мутации V фактора свертывания крови. Метаанализ 31 исследования показал, что лейденская мутация достоверно ассоциирована с ранним и поздним привычным невынашиванием [13]. Таким образом, наши результаты совпадают с данными литературы об ассоциации аллеля 1691A гена V фактора свертываемости крови с развитием осложнений при беременности.

Мутация гена протромбина G20210A. В 1-й группе (156 человек) было обнаружено 7 пациенток с гетерозиготной мутацией гена протромбина (генотип 20210G / 20210A), во 2-й группе все обследуемые женщины имели нормальный генотип (20210G / 20210G) (см. табл.). Гомозиготных мутаций в обеих группах выявлено не было. Таким образом, частота встречаемости аллеля 20210A гена *FII* составила 2 % в 1-й группе. У женщин, носительниц аллеля 20210A, в 9,5 раз увеличивается вероятность развития осложнений беременности тромбофилического характера ($OR=9,582$, $C.I.=0,541-169,708$, $\chi^2=4,39$, $p=0,03625$).

Мутация G20210A гена протромбина не является фактором риска привычного невы-

нашивания беременности [13], однако ассоциирована с ранним началом и более тяжелым протеканием гестоза [14]. В нашей работе исследуемая группа состояла из женщин с разными нарушениями протекания беременности. При выделении подгрупп с привычным невынашиванием беременности, тяжелыми формами гестоза и фетоплацентарной недостаточностью мы не получили статистически значимых различий в частотах встречаемости мутации G20210A гена протромбина (данные не приведены). Это может быть связано с малым количеством образцов в подгруппах. С другой стороны, в отличие от лейденской мутации, которая может являться причиной образования тромбов как в артериальной, так и в венозной системе, наличие мутации в гене протромбина может только усугубить тромбофилический статус, но не инициировать его. В таком случае, вероятно, полученная нами ассоциация свидетельствует о том, что сама по себе данная мутация не является фактором развития тромбофилических осложнений при беременности, но она приводит к более тяжелому их протеканию.

Заключение

В результате проведенной работы выявлена ассоциация аллелей 677Т гена *MTHFR*, 1691A гена V фактора свертывания крови (лейденская мутация) и 20210A гена протромбина с увеличением риска развития

осложнений беременности тромбофилического характера в популяции женщин, проживающих в Новосибирске.

Профилактикой развития осложнений течения беременности у данных пациенток является назначение малых доз аспирина и подкожные инъекции небольших количеств низкомолекулярных гепаринов [15]. Такая терапия является безопасной для плода и позволяет значительно снизить шансы неблагоприятного исхода беременности. Профилактикой для носительниц мутаций в гене *MTHFR* является назначение фолиевой кислоты. При выборе терапии необходимо учитывать анамнез, наличие клинических проявлений тромбофилии, изменение показателей гемостаза.

Список литературы

1. *Intermediate* homocysteinemia: a thermostable variant of methylenetetrahydrofolate reductase / S. S. Kang, J. Zhou, P. W. Wong et al. // *AJHG*. 1988. Vol. 43. P. 414–421.
2. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., 2001.
3. Lane D. A., Grant P. J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease // *Blood*. 2000. Vol. 95. P. 1517–1532.
4. *Relation* between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations / P. F. Jacques, A. G. Bostom, R. R. Williams et al. // *Circulation*. 1996. Vol. 93. P. 7–9.
5. Савельева Г. М. и др. Осложненное течение беременности и гипергомоцистеинемия / Г. М. Савельева, В. С. Ефимов, А. З. Кашежева // *Акушерство и гинекология*. 2000. № 3. С. 3–5.
6. *Гипергомоцистеинемия* и осложнение беременности / А. Д. Макацария, Е. В. Белобородова, С. М. Баймурадова и др. М., 2005.
7. Бицадзе В. О., Макацария А. Д. Тромбофилические состояния в акушерской практике. М., 2001.
8. *Plasma total homocysteine, pregnancy complications and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study* / S. E. Vollset, H. Refsum, L. M. Irgens et al. // *AJCN*. 2000. Vol. 71. P. 962–968.
9. *The effect of factor V Leiden carriage on maternal and fetal health* / D. Bloomenthal, P. von Dadelszen, R. Liston et al. // *Cmaj*. 2002. Vol. 167. P. 48–54.
10. *Increased risk for fetal loss in carriers of the factor V Leiden mutation* / J. R. Meinardi, S. Middeldorp, P. J. de Kam et al. // *Ann. Intern. Med.* 1999. Vol. 130. P. 736–739.
11. Kupferminc M. J., Eldor A. Inherited thrombophilia and gestational vascular complications // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2003. Vol. 29. P. 185–194.
12. Маниатис Т. и др. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. Пер. с англ. М., 1984.
13. *Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis* / E. Rey, S. R. Kahn, M. David et al. // *Lancet*. 2003. Vol. 361. P. 901–908.
14. *The G20210A prothrombin-gene mutation and the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 5G / 5G genotype are associated with early onset of severe preeclampsia* / A. Gerhardt, T. W. Goecke, M. W. Beckmann et al. // *J. Thromb. Haemost.* 2005. Vol. 3. P. 686–691.
15. Бицадзе В. О., Макацария А. Д. Применение низкомолекулярных гепаринов в акушерской практике // *Рус. мед. журн.* 2000. Т. 8, № 18. С. 775–778.

Материал поступил в редколлегию 02.03.2008

N. V. Kokh, E. N. Voronina, N. M. Pasman, M. L. Philipenko

Inherited Thrombophilia May Pre-Dispose to Adverse Pregnancy Outcome

The strength of association between congenital thrombophilia and preeclampsia, placental abruption, idiopathic recurrent miscarriage in Russian population was assessed. The examined group consisted of 156 women and control group consisted of 95 healthy Russian individuals without thrombosis and obstetric complications. Factor V Leiden, prothrombin G20210A mutation were associated with thrombotic complication at pregnancy. Thus, detection of the given markers at pregnant women will allow to generate rationally groups of risk and to prevent development of complication.

Keywords: inherited thrombophilia, prothrombin, factor V-Leiden, methylenetetrahydrofolate reductase, homocystein, pre-eclampsia, miscarriage.