

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА С677Т В ГЕНЕ МТНFR В ДИАГНОСТИКЕ ГИПЕРКОАГУЛЯЦИОННОГО СИНДРОМА И ОЦЕНКЕ РИСКА РАЗВИТИЯ СОСУДИСТЫХ ТРОМБОЗОВ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИИ

У.Х. Мусашайхов, Х.Т. Мусашайхов

Андижанский государственный медицинский институт

Аннотация.

В данной исследовании было оценено ассоциативный связь полиморфизма С677Т в гене МТНFR в развитии сосудистых тромбозов различных локализации. Выявление мутантного аллеля 677Т и неблагоприятного генотипа С677Т в гене МТНFR у больных с ТЭЗ различных локализации свидетельствует о небольшом риске развития тромбоза. А также обнаружение неблагоприятного маркера Т677Т в гене МТНFR в основной группе не имел вклад на развитию сосудистых тромбозов различных локализации. В целях эффективной профилактики тромбогенных осложнений целесообразно рекомендовать проведение генотипирования полиморфизма С677Т в гене МТНFR не отдельно, а в сочетании с другими генами фолатного цикла и тромбоцитарного звена гемостаза.

Ключевые слова: сосудистые тромбозы, ишемический инсульт, инфаркт миокарда, ТГВНК, фолатный цикл.

ГИПЕРКОАГУЛЯЦИЯ СИНДРОМИ ДИАГНОСТИКАСИ ВА ТУРЛИ ЛОКАЛИЗАЦИЯДАГИ ҚОН ТОМИР ТРОМБОЗИ ХАВФИНИ БАҲОЛАШДА МТНFR ГЕНИДАГИ С677Т ПОЛИМОРФИЗМИНИНГ РОЛИ

У.Х. Мусашайхов, Х.Т. Мусашайхов

Андижон Давлат тиббиёт институти

Аннотация.

Ушбу тадқиқотда МТНFR генидаги С677Т полиморфизмининг турли локализациядаги қон томир тромбозининг ривожланишидаги ассоциатив алоқаси баҳоланди. Турли хил локализациядаги қон томир тромбози билан оғриган беморларда МТНFR генида мутант аллел 677Т ва ноқулай генотип

C677T нинг аниқланиши тромбоз хавфи пастлигини кўрсатади. Шунингдек, асосий гуруҳдаги MTHFR генида ноқулай маркер T677T нинг аниқланиши турли локализациядаги қон томир тромбозининг ривожланишига ҳисса қўшмади. Тромбоген асоратларни самарали олдини олиш учун MTHFR генидаги C677T полиморфизмини алоҳида эмас, балки фолат цикли ва тромбоцитлар гемостазининг бошқа генлари билан биргаликда генотиплашни тавсия этиш мақсадга мувофиқдир.

Калит сўзлар: қон томир тромбози, ишемик инсульт, миокард инфаркти, ОЧВТ, фолат цикли.

THE ROLE OF C677T POLYMORPHISM IN THE MTHFR GENE IN THE DIAGNOSIS OF HYPERCOAGULATION SYNDROME AND RISK ASSESSMENT OF VASCULAR THROMBOSIS OF VARIOUS LOCALIZATION

U.H. Musashaykhov, H.T. Musashaykhov
Andijan State Medical Institute

Abstract.

In this study, the associative relationship of the C677T polymorphism in the MTHFR gene in the development of vascular thrombosis of various localization was evaluated. The detection of a mutant allele 677T and an unfavorable C677T genotype in the MTHFR gene in patients with TED of different localization indicates a low risk of thrombosis. As well as the detection of an unfavorable T677T marker in the MTHFR gene in the main group did not contribute to the development of vascular thrombosis of various localization. In order to effectively prevent thrombogenic complications, it is advisable to recommend genotyping of the C677T polymorphism in the MTHFR gene not separately, but in combination with other genes of the folate cycle and the platelet link of hemostasis.

Key words: vascular thrombosis, ischemic stroke, myocardial infarction, DVT, folate cycle.

Актуальность проблемы. Венозные тромбозы, коронарные и церебральные ишемии, облитерации артерий нижних конечностей, раннее развитие которых чаще всего обусловлено тромбофилиями, прочно занимают в мире первое место среди причин смертности и инвалидизации больных, определяют сокращение средней продолжительности жизни в популяции, существенно [1, 2].

Тромбофилия – это группа нарушений, при которых кровь имеет повышенную склонность к сворачиванию. Нормальный и здоровый ответ на кровотечение для поддержания гемостаза включает образование стабильного сгустка, и этот процесс называется коагуляцией. Гиперкоагуляция описывает патологическое состояние повышенной коагуляции или коагуляции при отсутствии кровотечения. Различные составляющие крови взаимодействуют, образуя тромб. Артериальный тромбоз, такой как инфаркт миокарда и инсульт, отличается от венозных тромбозов, таких как тромбоз глубоких вен (ТГВ) и тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) [4, 5].

Нарушения гиперкоагуляции могут быть приобретенными или наследственными [1] Однако реальный тромбоз возникает из-за взаимодействия как генетических факторов, так и факторов окружающей среды и следует гипотезе множественных ударов, таким образом, объясняя межиндивидуальные различия, наблюдаемые у пациентов с наследственными мутациями [3, 6].

Проанализировав данные мировой литературы, мы выяснили, что нет достаточных сведений о таких полиморфизмах, как: -5Т/С гена гликопротеина Ib альфа (*GP1BA*), Thr312Ala – гена α -фибриногена (*FGA*) и 677С/Т – гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), что и явилось предметом нашего научного интереса.

Изучение *MTHFR* началось в 1970-е годы, когда Кутцбах и Стокстад выделили этот фермент. Исследования выявили связь наследственного дефицита этого фермента с нарушениями обмена гомоцистеина. Примерно в те же годы было показано, что повышение уровня гомоцистеина является независимым фактором риска развития сосудистых осложнений. Начались попытки выяснения генетической природы дефицита *MTHFR*. Клонирование гена *MTHFR* в 1993 г. стало основой для определения мутаций, связанных с различными степенями дефицита данного фермента.

Описано две разновидности гена *MTHFR*. Наиболее изученной является вариант, в котором нуклеотид цитозин (С) в позиции 677, относящейся к 4-му экзону, заменен на тимидин (Т), что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина в сайте связывания фолата. Такой полиморфизм *MTHFR* обозначается как мутация С677Т. У лиц, гомозиготных по данной мутации, отмечается термолабильность *MTHFR* и снижение активности фермента примерно

до 35% от среднего значения. Кроме того, у лиц, гомозиготных по данной мутации, отмечается нарушенное распределение фолатов в эритроцитах, выражающееся в накоплении формильных полиглутаматов тетраглутамата и метилированных дериватов тетрагидрофолата. Наличие этой мутации сопровождается повышением уровня гомоцистеина в крови. Установлено, что гипергомоцистеинемия может вызывать десквамацию эндотелия, пролиферацию гладкомышечных клеток, активацию V фактора, активацию тканевого фактора свертывания крови, снижение активности протеина С, оказывая тем самым тромбогенное действие.



Рисунок 1. Фолатный цикл и цикл метионина.

Несмотря на продолжающийся интенсивный поиск новых генетических детерминант наследственной тромбофилии до настоящего времени остаются много вопросов, требующих своего разрешения относительно целесообразности диагностики определённых полиморфизмов ДНК в клинической практике. Это обуславливает необходимость детального изучения роли некоторых генетических вариантов, которые могут оказывать влияние на функциональную активность системы гемостаза.

Цель исследования. Анализ вклада генетического маркера С677Т в гене MTHFR в риске развития сосудистых тромбозов различных локализации.

Материал и методы исследования. Для выполнения выше указанного цели в качестве материала для молекулярно-генетического исследования было использована периферическая кровь 107 больных с

сосудистыми тромбозами различных локализации (57 мужчины и 50 женщин) таких как ТГВНК n=35, ИИ n=35, ИМ n=37 находившихся в терапевтическом, неврологическом и хирургическом отделениях клиники Андиганского государственного медицинского института и Андиганского филиала Республиканского научного центра экстренной медицинской помощи, которые составили основную группу. Контрольную группу составили 103 «здоровых» лиц без тромбозов в настоящий момент и в анамнезе.

У всех пациентов с ТЭЗ был исследован ген фолатной группы С677Т в гене МТНFR. Молекулярно-генетическое исследование проводилось в лаборатории РСНПМЦ гематологии МЗ РУз. Диагностика тромбозов осуществлялась в соответствии с принятыми в настоящее время клиническими рекомендациями.

Генотипирование полиморфизма С677Т в гене МТНFR осуществляли на основе метода Tag Man-зондов на амплификаторе Rotor-Gene Q (Quagen, Германия), с использованием коммерческого тест-набора ООО «Синтол» (Россия).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью стандартного пакета прикладных программ OpenEpi V.9.2. Анализ отклонения эмпирических частот генотипов от теоретически ожидаемого распределения Харди-Вайнберга осуществляли с помощью пакет программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. Для оценки ассоциации аллелей и генотипов полиморфизма С677Т в гене МТНFR с риском развития сосудистых тромбозов различных локализации использовали критерий χ^2 и отношение шансов с 95% доверительным интервалом. Результаты расчётов исследования отклонения фактических и ожидаемых частот распределения аллелей и генотипов полиморфизма С677Т в гене МТНFR в основной и контрольной группах представлены в таблицах 1 и 2. Расчёты полученных результатов данного исследования показали что, частота С и Т аллелей соответственно составили: 0.66/0.34 - в основной группе и 0.73/0.27- в группе контроля.

Анализ распределения генотипических вариантов С677Т в гене МТНFR показал, что для данного полиморфизма фактическое распределение генотипов в группах пациентов с тромбозами различных локализаций и контроля соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($p < 0.05$).

Таблица 1.

Распределение генотипов полиморфного варианта С677Т в гене МТНFR по РХВ в основной группе.

Аллели	Частота аллелей			
С	0.66			
Т	0.34			
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	Р
	Наблюдаемая	Ожидаемая		
С/С	0.42	0.43	0.05	0.5
С/Т	0.48	0.45	0.18	
Т/Т	0.1	0.12	0.17	
Всего	1.0	1.0	0.39	

В основной группе наблюдаемое частота благоприятного генотипа С/С незначимо понижено по сравнению с теоретическим (0.42 против 0.43, соответственно; $\chi^2=0.05$; $p=0.5$). Напротив, фактическая распределение гетерозиготного генотипа С/Т статистически незначимо выше по сравнению с ожидаемой (0.48 против 0.45, соответственно; $\chi^2=0.18$; $p=0.5$). (таблица 1). Неблагоприятный гомозиготный генотип Т/Т в исследованных группах был обнаружен в незначительных количествах 0.1 против 0.12 ; $\chi^2=0.17$; $p=0.5$.

В контрольной выборке показатели наблюдаемой и ожидаемой частоты гомозиготного генотипа С/С соответствовали $N_{obs}=0.54$ и $N_{exp}=0.53$ ($\chi^2=0.03$ и $p=0.5$), гетерозиготного генотипа С/Т - $N_{obs}=0.37$ против $N_{exp}=0.4$ ($\chi^2=0.18$ и $p=0.5$). Гомозиготный генотип Т/Т - $N_{obs}=0.09$ против $N_{exp}=0.07$ ($\chi^2=0.25$ и $p=0.5$).

В ходе данного исследования, полученные результаты анализов по полиморфизму С677Т в гене МТНFR являются репрезентативными. В исследованных групп пациентов с сосудистыми тромбозами различных локализаций и контрольной выборкой не отмечена гетерогенность между фактически-наблюдаемыми и теоретически-ожидаемыми значениями генотипов полиморфного варианта С677Т в гене МТНFR. В обеих изученных выборках неблагоприятный генотип Т/Т присутствовал в статистически не значимых количествах. Распределение предкового С/С и неблагоприятного А/Г генотипов данного локуса в исследованных выборках соответствовало ожидаемому т.е., в обоих случаях

выполняется равновесие Харди-Вайнберга, Выше указанное подтверждает качественно выполненное генотипирование данного локуса и однородность исследованных выборок (отсутствие ошибок генотипирования).

Таблица 2

Распределение генотипов полиморфного варианта С677Т в гене МТНFR по РХВ в контрольной группе.

Аллели	Частота аллелей			
С	0.73			
Т	0.27			
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	Р
	Наблюдаемая	Ожидаемая		
С/С	0.54	0.53	0.03	0.5
С/Т	0.37	0.4	0.18	
Т/Т	0.09	0.07	0.25	
Всего	1.0	1.0	0.47	

В исследованной объединенной группе пациентов и группе контроля частота С и Т аллелей составила 65.9% и 34.1% против 72.8% и 27.2% соответственно, а их распределение не противоречило закону Харди-Вайнберга ($p < 0.05$). При статистической обработке результатов, несмотря на незначимые различия, выявлена уменьшение частоты дикого аллеля С и обнаружено тенденция к увеличению мутантного аллеля Т у больных с сосудистыми тромбозами различных локализаций по сравнению условно-здоровыми донорами. Носительство Т аллеля ассоциировано с 1.4-кратным увеличением риска развития тромботических осложнений в группе больных по сравнению у представителей контрольной группы ($\chi^2=2.4$; $P=0.12$; $OR=1.4$; $95\%CI:0.91-2.10$).

Частоты С/С, С/Т, Т/Т генотипов С677Т в гене МТНFR в исследованных группах пациентов с сосудистыми тромбозами различных локализаций и контроля составили: 42.1%, 47.7% и 10.3% против 54.4%, 36.9% и 8.7% соответственно. (рис.2, 3). Как видно из таблицы 3, частота неблагоприятного генотипа Т/Т среди пациентов с сосудистыми тромбозами различных локализаций оказалась незначимо выше, чем в контрольной группе (10.3% против 8.7% соответственно, при $\chi^2=0.73$;

$P=0.4$; $OR=1.5$; $95\%CI:0.58- 3.99$. $RR=1.23$; $95\%CI:0.79- 1.94$). Выше перечисленные расчеты анализов показали, что риск развития тромбоэмболии сосудов различной локализации отсутствуют при наличии этого генотипа в группе пациентов в чем группе контроля.

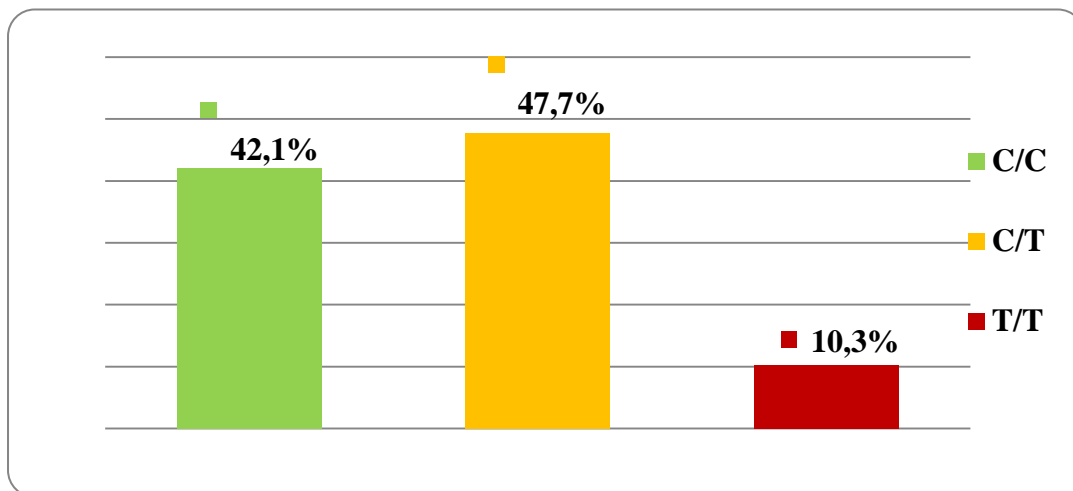


Рисунок 2. Распределение генотипов полиморфизма С677Тв гене метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) в основной группе (n=107)

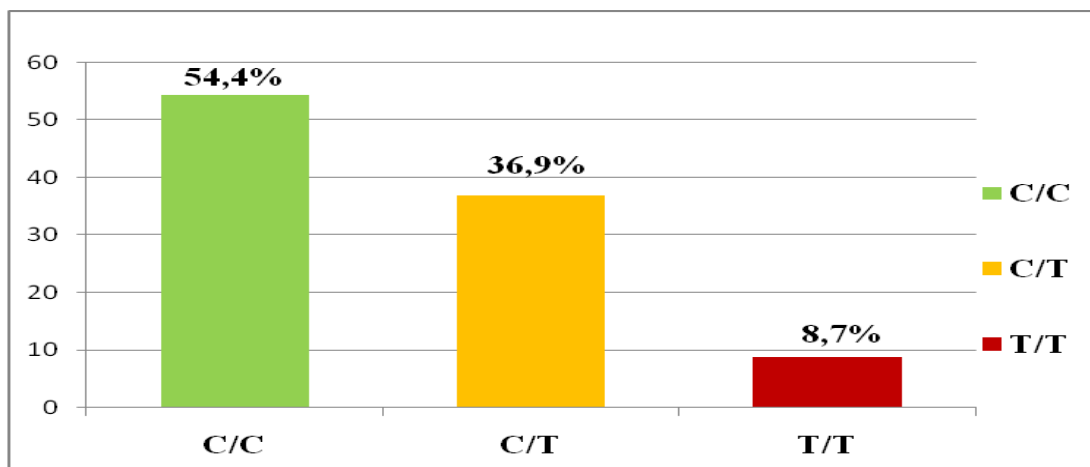


Рисунок 3. Распределение генотипов полиморфизма С677Тв гене метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) в контрольной группе (n=103)

Обнаружена тенденция к увеличению количества неблагоприятного маркера С/Т в исследуемой группе, что свидетельствует о повышением (1.7 раза) риска развития в отношении формирования ТГВНК, ИИ, ИМ ($\chi^2=3.08$; $P=0.08$; $OR=1.7$; $95\%CI: 0.94- 2.97$). Частота дикого генотипа С/С среди больных оказалась незначимо ниже, чем в контрольной группе (42.1% против 54.4% соответственно, при $\chi^2=3.2$; $P=0.07$; $OR=0.6$; $95\%CI: 0.35 - 1.05$).

Таблица 3.

Ассоциативная связь между полиморфизмом С677Т в гене МТНFR в группах пациентов и контроля.

Исследуемые группы	Аллели и генотипы	Статистическое различие в отношении контрольной группы			
		Odds ratio		χ^2	p-value
		OR	95% CI:		
Основная группа (n=107)	С	0.7	0.48 – 1.09	2.4	0.1
	Т	1.4	0.91 – 2.10		
	С/С	0.6	0.35 – 1.05	3.2	0.07
	С/Т	1.7	0.94 – 2.97	3.08	0.08
	Т/Т	1.5	0.58 – 3.99	0.73	0.4

Заключение. Полученные данные исследования показали, что обнаружение мутантного аллеля Т и функционально значимые связанные с ним неблагоприятного генотипа С/Т риск развития сосудистых тромбозов различных локализации был низким. И практически не оказывают существенного влияния на развитие сосудистых тромбозов, приводящих к таким заболеваниям как ТГВНК, ИИ и ИМ.

Никакой значительной связи между маркером Т/Т полиморфизма С677Т в гене МТНFR в развитии тромбоэмболия сосудов различных локализации не наблюдалось. Как многофакторное заболевание, развитие ТЭЗ может быть результатом множества факторов, синергетически влияющих на его возникновение. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, чтобы попытаться лучше оценить эти ассоциации. В целях эффективной профилактики тромбогенных осложнений целесообразно рекомендовать проведение генотипирования полиморфизмом С677Т в гене МТНFR не отдельно, а в сочетании с другими генами фолатного цикла и тромбоцитарного звена гемостаза.

Использованная литература:

1. Connors JM. Thrombophilia Testing and Venous Thrombosis. N Engl J Med. 2017 Sep 21;377(12):1177-1187. doi: 10.1056/NEJMra1700365.

2. Dautaj A, Krasi G, Bushati V, Precone V, Gheza M, Fioretti F, Sartori M, Costantini A, Benedetti S, Bertelli M. Hereditary thrombophilia. *Acta Biomed.* 2019 Sep 30;90(10-S):44-46. doi: 10.23750/abm.v90i10-S.8758.
3. Linnemann B, Hart C. Laboratory Diagnostics in Thrombophilia. *Hemostaseologie.* 2019 Feb;39(1):49-61. doi: 10.1055/s-0039-1677840.
4. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus.* 2011 Apr;9(2):120-38. doi: 10.2450/2010.0066-10.
5. Stern RM, Al-Samkari H, Connors JM. Thrombophilia evaluation in pulmonary embolism. *Curr Opin Cardiol.* 2019 Nov;34(6):603-609. doi: 10.1097/HCO.0000000000000668.
6. Zöller B, Svensson PJ, Dahlbäck B, Lind-Hallden C, Hallden C, Elf J. Genetic risk factors for venous thromboembolism. *Expert Rev Hematol.* 2020 Sep;13(9):971-981. doi: 10.1080/17474086.2020.1804354.