

observed in peripheral blood of women. It was established that the flow cytometry method is capable of improving informativity of immunological studies under conditions of complex analysis of various immunological parameters in evolution.

**Key words:** endometrial hyperplasia, immune system, diagnostics.

M.I. Pyrohov National Medical University (Vinnytsia)

Рецензент – доц. Г.Д. Коваль

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 3 (75). – P. 7-10

Надійшла до редакції 09.04.2015 року

© Л.З. Базюта, 2015

УДК 616.831-005.4-089:616.133-007.271

*Г.В. Безсмертна, Ю.О. Безсмертний*

## ПОШИРЕНІСТЬ ГЕНЕТИЧНО-ДЕТЕРМІНОВАНИХ ФАКТОРІВ РИЗИКУ ТРОМБОФІЛІЇ В ОСІБ ІЗ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова

**Резюме.** У статті представлені результати оцінки поширеності генетично-детермінованих факторів ризику в 160 осіб із цереброваскулярною патологією (ЦВП). У субпопуляції осіб із ЦВП спостерігається накопичення гетерозиготних та гомозиготних носіїв мутації за метилентетрагідрофолатредуктазою (МТНFR C677T), генетичних аномалій за фактором V Лейден (G1691A), протромбіну (G20210A) та осіб із комбінова-

ними генетичними порушеннями. Серед комбінованих варіантів мутацій найбільш часто поєднуються гетерозиготні варіанти мутації за МТНFR C677T та фактором V Лейден (G1691A).

**Ключові слова:** цереброваскулярна патологія, ішемічний інсульт, фактор V Лейден, протромбін, метилентетрагідрофолатредуктаза.

**Вступ.** Цереброваскулярна патологія (ЦВП) є однією з актуальних проблем сучасної клінічної медицини і знаходиться в центрі уваги неврологів і фахівців суміжних спеціальностей. Це зумовлено як складністю медичного аспекту проблеми, так і низкою соціальних чинників: значною поширеністю, високим відсотком інвалідності і смертності. До основних типів ЦВП відносять початкові прояви неповноцінності кровопостачання мозку, повільно прогресуючі порушення мозкового кровооттоку, гострі порушення мозкового кровооттоку, які включають транзиторні ішемічні атаки (ТІА), мозкові інсульти, гостру гіпертонічну енцефалопатію [2, 3, 5, 16]. Найбільш тяжкою формою ЦВП є інсульт.

Інсульт став всесвітньою пандемією. За даними ВООЗ, щорічно у світі реєструється більше 15 млн випадків інсульту, більш ніж половина із цих пацієнтів помирають протягом першого року [2, 3, 5]. Повторні ішемічні атаки та інсульти після перенесеного первинного інсульту реєструються в 11-32 % [2, 3, 16]. Так, протягом перших 30 діб частота розвитку повторного ішемічного інсульту становить 7-8 %, першого року – 6-20 %, п'яти років – 25-32 %. Серед тих, що вижили, до 80 % залишаються інвалідами і лише 20 % осіб можуть повернутися на роботу.

В останні роки в Україні та за кордоном велику увагу приділяють вивченню факторів ризику розвитку судинних катастроф та їх ролі в прогресуванні ЦВП [1, 3, 4, 7]. Згідно із сучасними уявленнями, крім традиційних факторів ризику

(вік, ожиріння, неконтрольована артеріальна гіпертензія, атеросклероз, цукровий діабет, куріння) широко обговорюється роль набутих та спадкових порушень системи гемостазу – тромбофілічного синдрому [1, 8].

Одним із визначальних чинників формування підвищеної схильності до спонтанного тромбоутворення (тромбофілії) та тромбоемболічних ускладнень є генетичний поліморфізм за факторами системи гемостазу, рецепторами тромбоцитів та ферментами обміну речовин, здатних впливати на процеси гемокоагуляції, фібринолізу та стан судин. Серед широкого спектра генетично-зумовлених чинників тромбофілічного синдрому найбільш вагомими вважаються Лейденська мутація за фактором V зсідання крові, мутація за геном протромбіну G20210A та поліморфізм за метилентетрагідрофолатредуктазою (МТНFR C677T) – ферменту обміну гомоцистеїну. Доведена тісна залежність між тромбофілічним синдромом та високим ризиком ішемічного інсульту, особливо в молодих пацієнтів та дітей [13, 14].

В останні роки в багатьох країнах світу були розгорнуті масштабні дослідження генетичного поліморфізму чинників тромбофілії, які продемонстрували наявність значних відмінностей щодо частоти та зв'язку з ураженням судин у різних популяціях [6, 9, 10, 11]. На жаль, в Україні епідеміологічна ситуація щодо поширеності генетично-детермінованих факторів ризику тромбофілії в осіб із ЦВП повністю не з'ясована, що істотно обмежує можливості розробки диферен-

ційованих підходів до профілактики, лікування та реабілітації осіб зі спадковими чи набутими чинниками ЦВП.

**Мета дослідження.** Вивчити поширеність генетичного поліморфізму фактору V Лейден, протромбіну G20210A та метилентетрагідрофолатредуктази MTHFR C677T у пацієнтів із цереброваскулярною патологією.

**Матеріал і методи.** Обстежено 160 осіб віком від 37 до 75 років, які перенесли гострі порушення мозкового кровообігу. Серед обстежених пацієнтів чоловіків було 87 (54,4 %), жінок – 73 (45,6 %). Контрольну групу склали 68 практично здорових осіб (без клінічних маніфестацій серцево-судинних захворювань та тромбозів), віком від 17 до 67 років, серед яких було 34 (50 %) чоловіки та 34 (50 %) жінки. До дослідження не залучались особи з онкологічними захворюваннями, тяжкими та декомпенсованими станами (ниркова, печінкова недостатність), цукровим діабетом, інфекційними захворюваннями та вагітні.

Генетичний поліморфізм за білками системи гемостазу – фактору V G1691A (фактор V Лейден), протромбіну G20210A та MTHFR C677T досліджували методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) за наборами “Genotyping kit – Venous Thrombosis” фірми “Technoclone”, Австрія.

Для дослідження використовували венозну кров, стабілізовану 3,8 % розчином цитрату натрію, яку до проведення генотипування зберігали при температурі – 20° С. Процедура аналізу виконана відповідно до інструкції фірми-виробника і складалась із трьох етапів – екстракції ДНК, ампліфікації ДНК методом ПЛР та розділення продуктів ПЛР шляхом гель-електрофорезу. На етапі ампліфікації використовували шість специфічних комбінацій праймерів для виявлення мутацій у трьох різних генах при проведенні одного ПЛР-тесту. Результати електрофорезу візуалізували на приладі Ultroscan і документували фотографуванням.

Статистичний аналіз проводили за допомогою пакета прикладних програм «MS Excel XP» та «Statistica SPSS 10.0 for Windows» (ліцензійний № 305147890). Оцінювали середнє значення, стандартні похибки, достовірність відмінностей.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Проведені дослідження засвідчили наявність у групі осіб із ЦВП носіїв мутації за фактором V Лейден (G1691A), протромбіну G20210A та MTHFR C677T. Так, серед осіб із ЦВП, поряд зі зменшенням частки осіб носіїв дикого генотипу, виявлено зростання частки гетерозиготних носіїв Лейденської мутації (14,4 %) та гетерозиготних носіїв мутації за протромбіном (6,9 %), що істотно перевищує частку таких осіб у контрольній групі. При цьому, серед осіб із ЦВП не виявлено жодного пацієнта з гомозиготним варіантом мутації за фактором V Лейден (G1691A) та протромбіну G20210A.

Слід відмітити, що мутація Лейдена успадковується за автосомно-домінантним типом і представлена місенс-мутацією в позиції 1691 G→A, що призводить до заміни аргініну на глутамін у 506 позиції, і є доволі розповсюдженою серед різних популяцій. Частота зустрічальності цієї мутації в європейській популяції коливається від 2 до 15 % [6, 14, 15]. Встановлено, що частота гетерозиготних носіїв Лейденської мутації серед здорових мешканців Подільського регіону становить 2,9 %. Отже, поширеність цього генетичного фактору ризику тромбофілії серед українських хворих із ЦВП практично майже в п'ять разів вища, ніж серед здорових осіб. Вважається, що гетерозиготний варіант Лейденської мутації підвищує ризик тромбозів у 5-10 разів, тоді як у гомозигот він зростає в 50-80 разів і супроводжується високою смертністю в молодому віці, що і зменшує частоту її накопичення в популяції. Так, за даними [18, 19], носійство Лейденської мутації підвищує ризик інсульту в дорослих із відношенням шансів (ВШ)=1,43 (95 %, довірчий інтервал (ДІ) 1.03-1.97). У більшості досліджень показано, що носійство Лейденської мутації не є самостійним фактором ризику розвитку судинних катастроф [6, 17, 18, 19], однак, поряд із цим були виявлені тенденції до підвищення частоти інсультів та рецидивів епізодів порушення мозкового кровообігу [14].

Мутація за протромбіном також успадковується за аутосомно-домінантним типом. Її частота в європейській популяції коливається від 1 до 4 %. Фактор коагуляції – протромбін, відіграє ключову роль у гемостазі та тромбоутворенні, є одним з основних активаторів тромбоцитів і реактантів гострої фази запалення. Протромбін кодується геном F2, який розташований на хромосомі 11 (11p11-q12) [14, 15]. Заміна гуаніну на аденін у положенні 20210 у некодуючій 3'-термінальній ділянці гена протромбіну призводить до зростання вмісту протромбіну в крові, що зумовлює збільшення ризику тромбозів у 3-5 разів. Поліморфізм 20210 G/A, вперше описаний у 1996 році як причина природженої тромбофілії, асоційований із підвищенням рівня протромбіну в плазмі і вважається визначальним генетичним фактором ризику венозних тромбозів [13, 18]. Мутація підвищує ризик тромбозів у 3-5 разів. Так, при обстеженні здорових мешканців подільського регіону виявлено 1,5 % осіб гетерозиготних носіїв поліморфізму за протромбіном. Відмічено, що серед осіб із ЦВП частка осіб гетерозигот із мутацією за протромбіном G20210A у 4,7 раза вища ніж серед здорових осіб.

У цій же групі осіб із ЦВП виявлено 61 (38,1 %) пацієнта з гетерозиготним та 14 (8,8 %) осіб із гомозиготним носійством поліморфізму за MTHFR C677T.

Успадкування поліморфізму за MTHFR C677T відбувається за автосомно-рецесивним типом. Результатом цієї мутації є поява термолабільного варіанта ферменту MTHFR зі зниженою

Таблиця

**Поширеність мутацій за фактором V Лейден, протромбіном та МТГФР у здорових осіб та у хворих із ЦВп**

Мутація гену	Генотип	Здорові особи (n=68)		Хворі з ЦВЗ (n=160)	
		Абс.	%	Абс.	%
Фактор V (G1691A Лейден)	Дикий тип GG	66	97,1	137	85,6*
	Гетерозиготи GA	2	2,9	23	14,4*
	Гомозиготи AA	0	0	0	0
Протромбін (G20210A)	Дикий тип GG	67	98,5	149	93,1
	Гетерозиготи GA	1	1,5	11	6,9
	Гомозиготи AA	0	0	0	0
МТГФР (C677T)	Дикий тип CC	40	58,8	85	53,1
	Гетерозиготи CT	22	32,4	61	38,1
	Гомозиготи TT	6	8,8	14	8,8
Загальна кількість носіїв мутацій		31	45,5	99	61,9*
У тому числі комбінованих мутацій:		0	0	25	15,6*
МТГФР CT + Фактор V Лейден	Гетерозиготи / гетерозиготи	0	0	23	14,3
МТГФР CT + Протромбін GA	Гетерозиготи / гетерозиготи	0	0	2	1,3

Примітка.\* –  $p < 0,05$  відносно здорових осіб

(майже вдвічі) каталітичною активністю, що зумовлює формування гіпергомоцистеїнемії, особливо за наявності інших чинників, у тому числі аліментарного дефіциту вітамінів B6, B9 та B12. Поширеність цієї мутації в європейській популяції є достатньо високою – до 10-13 % гомозигот TT та до 50 % гетерозигот CT [1, 8]. За нашими даними, частота гомозигот TT серед здорових осіб становила 8,8 %, а гетерозигот CT – 32,4 %. Відмічено, що серед осіб із ЦВП відбувається накопичення як гетерозиготних, так і гомозиготних варіантів мутації за MTHFR C677T. При цьому, достовірних відмінностей щодо частоти розподілу різних варіантів поліморфізму гена MTHFR C677T серед здорових осіб та хворих із ЦВП не виявлено.

Висока поширеність зазначених вище мутацій у популяції призводить до накопичення значної частки осіб з одночасним носійством кількох генетичних порушень. З'ясовано, що загальна частка носіїв поліморфних генів серед осіб із ЦВП є досить високою і становить 61,9 % (99 осіб). При цьому, у 25 (15,6 %) осіб виявлені комбіновані генетичні аномалії. Так, у 23 (14,3 %) осіб виявилось поєднання гетерозиготних варіантів мутації за MTHFR C677T та фактору V Лейден (G1691A), а у двох (1,3 %) пацієнтів виявлено поєднання гетерозиготних варіантів мутації за MTHFR C677T та протромбіном G20210A.

Найбільш частим поєднанням є комбінація гетерозиготного носійства мутації за MTHFR CT-677 з мутацією Лейдена (14,3 %). Поєднання гетерозиготного носійства мутації за MTHFR CT-677 з мутацією за протромбіном (1,3 %) реєструвалося в 11 разів рідше.

Таким чином, нами встановлено, що в українській популяції поширеність точкових мутацій за фактором V Лейден та протромбіном у практично здорових осіб варіює в межах 1,5-2,9 %, і в цілому відповідає світовим даним щодо поширеності цих аномалій серед осіб білої раси. Поширеність генетичного поліморфізму за MTHFR C677T є достатньо високою і сягає 41,2 %, з них 8,8 % становить гомозиготний варіант мутації. У субпопуляції осіб із ЦВП спостерігається накопичення генетичних аномалій за фактором V Лейден, протромбіном та комбінованими варіантами мутацій, причому найбільш часто поєднуються Лейденська мутація та гетерозиготний варіант мутації за MTHFR. Незважаючи на відсутність статистично достовірних відмінностей у розподілі частоти окремих генотипів досліджуваних генів системи гемостазу в групах осіб із ЦВП та контролю, робити висновки про їх вклад у розвиток інсульту в українській популяції рано. Так, Р. Bentley зі співавт. (2010) провели мета-аналіз 187 досліджень (37481 випадків інсульту та 95322 контролю) за 43 мутаціями в 29 генах, і для п'яти генів у 28 дослідженнях (46928 чоловік) були виявлені асоціації з поліморфізмом генів та біохімічними параметрами при інсульті [6]. Даний мета-аналіз показав доказові асоціації ішемічного інсульту в тому числі і за генами протромбіну (G20210A) та метилентетрагідрофолатредуктазою (MTHFR C677T). Ці результати відповідають єдиній моделі багатофакторного захворювання, при якому порівняно незначна кількість загальних поліморфізмів, кожний з яких несе невелику небезпеку, в сумі можуть пояснити значну долю відносного ризику захворювання в популя-

ції [12]. Ризик розвитку ЦВП збільшується не тільки під впливом поліморфізму одного гена, але й при поєднанні алелів декількох генів із формуванням полігенної спадкової схильності до тромботичних уражень мозкових судин [4]. Для визначення сумарного вкладу досліджуваних поліморфізмів у розвитку ЦВП необхідно створення загальної методологічної платформи математичного аналізу отриманих даних, які можуть бути відправними для подальшого вивчення та пошуку генетичних факторів ризику ЦВП в українській популяції.

### Висновки

1. В українській популяції осіб із цереброваскулярною патологією частота гетерозиготних варіантів точкових мутацій за фактором V Лейден (G1691A) та протромбіном G20210A становить 14,4 та 6,9 % відповідно, що практично в п'ять разів перевищує частоту цих генетичних аномалій у здорових осіб.

2. Серед осіб із цереброваскулярною патологією спостерігається накопичення гетерозиготних та, особливо, гомозиготних носіїв мутації за MTHFR C677T. Особливістю субпопуляції осіб із цереброваскулярною патологією є накопичення осіб із комбінованими генетичними порушеннями. При цьому найбільш часто поєднуються гетерозиготні варіанти мутації за MTHFR C677T та фактором V Лейден (G1691A).

**Перспективи подальших досліджень** направлені на з'ясування впливу різних варіантів мутацій генів MTHFR C677T, фактору V Лейден, протромбіну та їх поєднань на розвиток та клінічний перебіг ЦВП.

### Література

1. Взаимоотношения гомоцистеина с системой гемостаза и возможности медикаментозной коррекции у пациентов с цереброваскулярной патологией и факторами риска ее развития / Д.А. Филимонов, С.К. Евтушенко, Д.Ш. Дюба, В.А. Симонян // Укр. вісн. психоневрол. – 2012. – Т. 20, № 3 (72). – С. 147.
2. Евтушенко С.К. От этиологии и подвидов инсультов у лиц молодого возраста – к их эффективному лечению и профилактике / С.К. Евтушенко: матеріали XII Міжнародної конференції [«Актуальні напрямки в неврології: сьогодні та майбутнє»]. – Судак, 2010. – С. 12-18.
3. Мищенко Т.С. Факторы риска и клинические особенности у больных с различными подтипами ишемического инсульта / Т.С. Мищенко, Н.В. Овсянникова, В.В. Лебединец // Междунар. мед. ж. — 2011. – № 3. – С. 27-32.
4. Полиморфизм генов фибриногена у больных с ишемическим инсультом / Е.И. Гусев, О.О. Фаворова, М.А. Судомоина [и др.] // Ж. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2008. – №4. – С. 27-30.
5. Торгалло Є.О. Інсульти: фактори ризику та методи лікування / Є.О. Торгалло, Л.І. Остапченко // Фізика живого. – 2010. – Т. 18, № 3. – С. 39-41.
6. Causal relationship of susceptibility genes to ischemic stroke: comparison to ischemic heart disease and biochemical determinants / P. Bentley, G. Peck, L. Smeeth [et al.] // PLoS. – 2010. – Vol. 5, № 2. – P. 1-15.
7. Dyslipidemia as a risk factor for ischemic stroke / K. Tziomalos, V.G. Athyros, A. Karagiannis, D.P. Mikhailidis // Curr. Top Med. Chem. – 2009. – № 9 (14). – P. 1291-1297.
8. Efficacy of homocysteine lowering therapy with folic acid in stroke prevention: a meta-analysis / M. Lee, K.S. Hong, S.C. Chang [et al.] // Stroke. – 2010. – № 41. – P. 1205-1212.
9. Genetic polymorphisms for the study of multifactorial stroke / A. Bersano, E. Ballabio, N. Bresolin, L. Candelise // Human mutation. – 2008. – Vol. 29, № 6. – P. 776-795.
10. Genomewide association studies of stroke / M. Ikram, S. Seshadri, J. Bis [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 360. – P. 1718-1728.
11. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke / M. Dichgans // Lancet Neurol. – 2007. – № 6. – P. 149-161.
12. How many genes underlie the occurrence of common complex diseases in the population? / Q. Yang, M. Houry, J. Friedman [et al.] // Int. J. Epidemiol. – 2005. – Vol. 34. – P. 1129-1137.
13. Inherited thrombophilic disorders in young adults with ischemic stroke and patent foramen ovale / A. Pezzini, E. Del Zotto, M. Magoni [et al.] // Stroke. – 2003. – Vol. 34. – P. 28-33.
14. Kim R. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: A meta-analysis of published studies / R. Kim, R. Becker // Am Heart J. – 2003. – Vol. 146. – P. 948-957.
15. MacCallum P. Markers of hemostasis and systematic in and atherosclerosis in smokers / P. MacCallum // Proceeding of the American cardiac society. – 2005. – Vol. 2. – P. 34-43.
16. Role of acute stroke / W.Z. Abdullah, S.Z. Idris, S. Bashkar [et al.] // Singapore Med. J. – 2009. – Vol. 50(6). – P. 604-609.
17. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls / Z. Ye, E. Liu, J. Higgins [et al.] // Lancet. – 2006. – Vol. 367 (9511). – P. 651-658.
18. Wu A. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases / A. Wu, G. Tsongalis // Am. J. Cardiol. – 2001. – Vol. 87. – P. 1361-1366.
19. Xu M. Quantitative assessment of the effect of angiotensinogen gene polymorphisms on the risk of coronary heart disease / M. Xu, Z. Ye, F. Hu, L. He // Circulation. – 2007. – Vol. 116, № 12. – P. 1356-1366.

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИ-ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ ФАКТОРОВ РИСКА ТРОМБОФИЛИИ У БОЛЬНЫХ С ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

*Г.В. Бессмертная, Ю.А. Бессмертный*

**Резюме.** В статье представлены результаты оценки распространенности генетически-детерминированных факторов риска у 160 больных с цереброваскулярной патологией (ЦВП). В популяции лиц с ЦВП отмечается накопление гетерозиготных и гомозиготных носителей мутации по метилентетрагидрофолатредуктазе (MTHFR C677T), генетических аномалий по фактору V Лейден (G1691A), протромбину (G20210A) и лиц с комбинированными гене-

тическими порушеннями. Среди комбинированных вариантов мутаций наиболее часто сочетаются гетерозиготные варианты мутаций по MTHFR C677T и фактору V Лейден (G1691A).

**Ключевые слова:** цереброваскулярная патология, ишемический инсульт, фактору V Лейден, протромбин, метилентетрагидрофолатредуктаза.

### SPREAD OF GENETICALLY-DETERMINED THROMBOPHILIA RISK FACTORS IN PATIENTS WITH CEREBROVASCULAR DISEASE

*G.V. Bezsmertna, I. A. Bezsmertnyi*

**Abstract.** The article presents the results of the evaluation of genetic risk factors in 160 patients with cerebrovascular pathology (CVP). In the population of individuals with the CVP we marked accumulation of heterozygous and homozygous agents of mutation of methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR C677T), Factor V Leiden (G1691A), prothrombin (G20210A) and persons with combined genetic disorders. Among the options of combined mutations most often combined were heterozygous variants of MTHFR C677T mutations and Factor V Leiden (G1691A).

**Key words:** cerebrovascular pathology, ischemic stroke, factor V Leiden, prothrombin, methylenetetrahydrofolatereductase.

Scientific research institute of invalid rehabilitation of Pyrohov National Medical University (Vinnitsia)

Рецензент – д. мед. н. І.І. Кричун

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 2 (74). – P. 10-14

Надійшла до редакції 03.04.2015 року