

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ТРОМБОФИЛИИ

*Симанов А.Л.,*

*Руководитель отдела Молекулярные методы анализа и оборудование для научных исследований*

Используемые сокращения: ВТ — венозная тромбоэмболия, ТГВ — тромбоз глубоких вен, АФС — антифосфолипидный синдром, АПС — активированный протеин С, ОК — оральные контрацептивы, ГЗТ — гормонозаместительная терапия, ВА — волчаночные антикоагулянты. Большую часть наследственно детерминированных болезней составляют заболевания с наследственной предрасположенностью, на развитие которых оказывает влияние взаимодействие организма с факторами окружающей среды. В том случае, если в патогенезе участвует несколько генов, заболевания называют мультифакториальными, например, диабет, ишемическая болезнь сердца, гипертония, тромбоэмболии, некоторые формы рака. Выраженность клинических признаков имеет индивидуальный характер, часто изменяется в течение жизни. Болезнь может не проявиться в отсутствие внешних факторов, запускающих процесс. В то же время, недостаточно разработаны методология медико-генетической диагностики и консультационная поддержка лиц с мультифакториальными заболеваниями.

Венозная тромбоэмболия, в частности, тромбоз глубоких вен — проявление нарушений в системе свертывания крови, часто встречающееся в клинике. ВТ может быть как врожденной, вызванной мутациями в генах, кодирующих факторы крови, так и приобретенной, обусловленной другими заболеваниями — онкологическими, антифосфолипидным синдромом или, например, дефицитом витаминов группы В, приводящим к гипергомоцистеинемии.

Наиболее часто встречающаяся наследственная форма ВТ обусловлена мутацией в факторе V свёртывания крови, заменой гуанина на аденин в 1691 нуклеотиде (G1691A, лейденская мутация). Фактор V участвует в конверсии протромбина в тромбин, мутация повышает его устойчивость к расщеплению активированным протеином С, что приводит к накоплению тромбина. В европеоидной популяции гетерозиготы встречаются в среднем с частотой 3-8% (10-15% на севере Европы и в Греции, 2-3% — в Италии и Испании). Среди больных с тромбоэмболией это наиболее широко распространённый наследуемый дефект, который встречается у 15-20% пациентов с первым случаем ТГВ и у 50% — с рецидивным ВТЗ и наследуется по аутосомно-доминантному механизму, т.е. риск тромбофилии повышен даже у гетерозигот.

Ещё одна причина возникновения наследственной тромбофилии — мутация в гене протромбина (фактор II), приводящая к замене гуанина на аденин (G20210A), и, как следствие, к повышению экспрессии гена и накоплению протромбина. Мутация G20210A обнаруживается у 2% популяции.

На тяжесть клинической картины наследственной ВТ оказывают влияние следующие факторы:

1. **Количество аллелей:** относительный риск появления ВТ у гетерозигот увеличивается в 3-8, у гомозигот — в 18-80 раз при появлении признаков в более раннем возрасте.

2. **Другие наследуемые дефекты:** наличие хотя бы одного лейденского аллеля увеличивает риск, ассоциированный с другими генетическими аномалиями — дефицитом протеина C, протеина S или антитромбина, мутацией G20210A в гене протромбина. У двойных гетерозигот по лейденской мутации и G20210A относительный риск возрастает в 20 раз по сравнению с увеличением в 3-8 раз у гетерозигот только по гену фактора V.

3. **Приобретённая тромбофилия:** сочетание наследственной и приобретённой форм тромбофилии также приводит к возрастанию риска ВТ. Повышенный уровень гомоцистеина в плазме наблюдается у 10% пациентов с первым случаем ТГВ. Появление избыточного гомоцистеина в отсутствие мутаций может быть вызвано дефицитом фолата, витаминов B6 и B12, почечной недостаточностью, сахарным диабетом, гипотиреозом, карциномой, болезнью Бирмера, воспалительными процессами в кишечнике, а также терапией теофиллином, метотрексатом или фенитоином. В то же время часто встречающаяся в гене 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы мутация C677T является причиной умеренной формы гипергомоцистеинемии с уровнем гомоцистеина в плазме от 15 до 100 мкмоль/л<sup>7</sup>. Гомозиготы по этой мутации выявляются в популяции с частотой 10-20%. Гипергомоцистеинемия при наличии лейденского аллеля увеличивает риск ВТ в 22 раза. Онкологические заболевания в сочетании с лейденской мутацией также являются дополнительным фактором риска ВТ.

#### 4. Побочные факторы риска:

- Беременность. Естественные физиологические изменения в организме женщины: дефицит протеина C, протеина S, антитромбина III, повышение уровня факторов VIII, IX, XI,
- Направлены на снижение кровопотери в ходе беременности и родов. Их сочетание с наследственной предрасположенностью к тромбозам увеличивает риск тромбообразования в 5-16 раз. Так, лейденский аллель обнаруживается у 20-46% женщин с ВТ, 30% — с привычной невынашиваемостью, 8-26% — с преэклампсией, 8-35% — с замедленным ростом плода, 22-30% — с разрывом плаценты.
- Использование оральных контрацептивов. По сравнению с контрольной группой относительный риск ВТ у женщин, принимающих ОК, возрастает в 4 раза, а у женщин, принимающих ОК и гетерозиготных по лейденской мутации — в 35 раз.
- Гормонозаместительная терапия.
- Пересадка органов. Зарегистрированы случаи дисфункции трансплантата и отторжение пересаженной почки у реципиентов с лейденским аллелем.
- Оперативное вмешательство и использование венозных катетеров.
- Возраст.
- Многочисленные авиаперелёты, связанные с длительной малоподвижностью.

Таким образом, тестирование на предрасположенность к тромбофилии показано в следующих случаях:

- неспровоцированная ВТ, особенно при наступлении первого случая в относительно раннем возрасте (<45 лет);

- наличие мутаций в факторах II и V у родственников беременных женщин или женщин, планирующих применение ОК или ГЗТ, даже в отсутствие симптоматики у пробанда;
- наличие мутаций в факторах II и V у родственников I и II степени родства даже при асимптоматике у пробанда;
- рецидивная ВТ;
- ВТ с нетипичной локализацией (тромбоз сосудов головного мозга, особенно у женщин, принимающих ОК, тромбоз полый нижней вены, почечных и печёночных вен, брыжеечной нижней вены, воротной вены, рецидивный подкожный тромбофлебит);
- ВТ у беременных или в послеродовой период;
- привычная невынашиваемость или выкидыш неясной этиологии в первом триместре при наличии или отсутствии выкидышей во II и III триместрах;
- подготовка к плановым операциям.

В прочих случаях для оптимизации стоимости исследований молекулярное генотипирование рекомендуется для поиска дополнительных факторов риска по результатам первичного селективного скрининга системы гемостаза. Для последнего целесообразно использовать функциональные тесты на активность антитромбина, протеина С и протеина S, фактора VIII; тесты на устойчивость к действию протеина С; определение уровня общего гомоцистеина в плазме (натошак); анализ волчаночных антикоагулянтов и определение уровня антифосфолипидных антител (позволяет дифференциально диагностировать АФС). В идеале во избежание ложноположительных результатов скрининговые тесты лучше проводить через 4-6 недель после острой фазы. На результаты анализа могут оказывать влияние препараты, используемые при терапии — гепарин мешает определению активности антитромбина и анализу ВА; варфарин снижает активность протеинов С и S. При интерпретации результатов следует иметь в виду также, что низкий уровень активности естественных антикоагулянтов может быть обусловлен также заболеваниями печени, поскольку протеин С, протеин S и антитромбин синтезируются в печени. Уровень активности антитромбина редуцируется также при нефротическом синдроме и колите. Активность протеина S может снижаться при развитии ВИЧ-инфекции.

На результаты ДНК-тестов не влияет уровень антикоагулянтов и варфарина, они не зависят от фазы заболевания. Их использование рекомендуется для подтверждения скрининговых тестов и определения гомо- или гетерозиготности.

Варфарин — наиболее часто используемый антикоагулянт орального применения. В то же время значение оптимальной для пациентов дозы существенно варьирует, что может приводить либо к кровотечениям, особенно в первые недели терапии, либо к тромбообразованию. На значение эффективной дозы большое влияние оказывает скорость выведения ксенобиотика из организма, зависящая от активности, главным образом, двух ферментов лекарственного метаболизма — изоформы цитохрома P450 2C9 (CYP2C9) и комплекса эпоксидредуктазы витамина К (VKORC1).

CYP2C9 участвует в выведении S-энантиомера варфарина. Полиморфизмы C430T (CYP2C9\*2) и A1075C (CYP2C9\*3) встречаются с частотой 11% и 5% и кодируют ферменты, обладающие, соответственно, 12 и 5% активности фермента дикого типа (CYP2C9\*1), в связи с чем стандартные дозы варфарина могут оказаться избыточными для пациентов с этими гаплотипами, приводя к геморрагическим осложнениям. Полиморфизм -1639G>A в промоторной области гена субъединицы I комплекса эпоксидредуктазы витамина K встречается с частотой 32% и ассоциируется с потребностью в пониженной дозе варфарина.

При назначении стандартной дозы 5 мг варфарина (35 мг в неделю) у пациентов с *VKORC1* дикого типа значение международного нормализованного отношения достигало терапевтического диапазона (1,8-3,5) в среднем за 15 суток, а у гомозигот по полиморфизму -1639G>A — за 7; у пациентов, гомозиготных по *CYP2C9\*1* — за 12 суток, а у гомозигот по *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3* или смешанных гетерозигот по этим аллелям — за 9 суток.

Периодически предлагаются алгоритмы подбора оптимальной дозы варфарина, учитывающие наиболее важные факторы чувствительности к этому лекарству. Последний, предложенный в 2009 г. Международным консорциумом по фармакогенетике варфарина и размещённый в интернете, с большей точностью идентифицирует пациентов, чья потребность в антикоагулянте составляет менее 21 мг/нед, поскольку учитывает помимо общеклинических данных результаты генотипирования.

Таким образом, молекулярно-генетическое тестирование наследственной предрасположенности позволяет учесть риск возможных осложнений, заранее подобрать способы их купирования и существенно повысить эффективность лечения.

## Литература

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика. — М., «Медицина», 1997. — с. 131.
2. Руководство по педиатрии. Врождённые и наследственные заболевания / под ред. проф. П.В. Новикова. — М., ИД «Династия», 2007. — с. 531.
3. Jody L Kujovich. Factor V Leiden Thrombophilia, GeneReviews, Last Update: 12 February 2007, [www.genetests.org](http://www.genetests.org)
4. Juul K, et al. Factor V Leiden and the risk for venous thromboembolism in the adult Danish population, Ann Intern Med (2004) 140, p. 330.
5. Emmerich J, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin G20210A on the risk of venous thromboembolism — pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls, Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism, Thromb Haemost (2001) 86, p. 809.
6. Steven R. Deitcher, Marcelo P. V. Gomes: Hypercoagulable States, The Cleveland Clinic Disease Management Project, 2003:  
<http://www.clevelandclinicmeded.com/diseasemanagement/hematology/hyperco/hyperco.htm>
7. De Stefano V, et al. Interaction between hyperhomocysteinemia and inherited thrombophilic factors in venous thromboembolism, Semin Thromb Hemost (2000) 26, p. 305.

8. *Ridker P M, et al.* Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss, *Ann Intern Med* (1998) 128, p. 1000.
9. *Mello G, et al.* Thrombophilia is significantly associated with severe preeclampsia: results of a large-scale, case-controlled study, *Hypertension* (2005) 46, p. 1270.
10. *Kupferminc MJ, et al.* Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy, *N Engl J Med* (1999) 340, p. 9.
11. *Van Cott M, Laposata M.* Laboratory evaluation of hypercoagulable states, *Hematol Oncol Clin North Am* (1998) 12, p. 1141.
12. *Schwarz UI, et al.* *N Engl J Med* (2008) 358, p. 999.
13. *Sconce EA, et al.* *Blood* (2005) 106, p. 2329.
14. *Taube J, et al.* *Blood* (2000) 96, p. 1816.
15. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. *N Engl J Med* (2009) 360, p. 753. 16. [www.warfarindosing.org](http://www.warfarindosing.org).