

УДК 616.151.511-056.7

Страмбовская Н.Н., Витковский Ю.А.,
Сизикова О.Н., Паламова Р.Ц.

ПЕРВИЧНЫЕ ТРОМБОФИЛИИ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ

ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия Росздрава (ректор – заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А.В.Говорин)

На сегодняшний день проблема острого нарушения мозгового кровообращения достаточно актуальна для бурятской популяции из-за относительно высокой и постоянно растущей заболеваемости (175,9 в 2004 году до 200,4 на 100 тыс. населения в 2008 году) и смертности (с 48,1 в 2004 году до 62,6 на 100 тыс. населения в 2008 году) из-за этой патологии. В связи с этим особенно остро встает вопрос профилактики, заключающейся, прежде всего, в выявлении факторов риска, лечении лиц предрасположенных к цереброваскулярным болезням и обнаружении этногенетической подоплеки. Наиболее распространеными и хорошо изученными факторами риска острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) по ишемическому типу, которые составляют более 70% всех острых сосудистых мозговых эпизодов, являются артериальная гипертония, патология сердца и магистральных артерий головы, курение, нарушение липидного обмена, сахарный диабет, гиподинамия, ожирение, пол, возраст [3,4]. Однако в последнее десятилетие интенсивно изучаются и генетическая предрасположенность к ишемическому инсульту, но полученные данные о вкладе разных аллелей генов в развитие ишемического нарушения мозгового кровообращения остаются противоречивыми [6]. Перспективной группой генов-кандидатов, которые потенциально могут быть связаны с формированием риска инфаркта мозга, являются гены системы гемостаза и обмена гомоцистеина, сравнительное исследование которых в разных популяциях мира признается весьма актуальной задачей ангионеврологии [6,8,16,19]. В настоящее время известно несколько десятков наследственно ассоциированных тромбофилий, которые объясняют развитие тромбоза, в том числе и артериального, в большинстве случаев его регистрация. Резистентность FV к активированному протеину C (РАПС или APC-R), аномалия в гене протромбина (G20210A), мутация в гене фермента метилентрагидрофолатредуктазы (C677T) – одни из самых распространенных групп генети-

ческих аномалий, приводящих к дефектам в механизмах образования, регуляции и растворения внутрисосудистых кровяных сгустков, которые сочетаются с повышенным тромбообразованием.

Основной целью нашего исследования явилось изучение частоты прокоагулянтных аллельных вариантов FVL, FII(G20210A), MTGFR(C677T) и оценка их клинико-прогностического значения среди лиц, больных ишемическим инсультом разных этнических групп города Улан-Удэ.

Материалы и методы исследования. Методом сплошной выборки в исследование были включены 210 (98 женщин, 112 мужчин) больных ишемическим инсультом. Диагноз ишемического инсульта выставлен на основании жалоб, анамнеза заболевания, данных клинического и неврологического обследования и подтвержден нейровизуализационными методами исследования (МРТ или КТ головного мозга). Возраст наблюдавших пациентов колебался от 19 до 86 лет, в среднем составил - 63,3±11,7. Все больные разделены на 2 этнические группы: русские - 147 пациентов (63,3±10,6 лет), буряты - 63 (60,1±13,4 лет).

В качестве контрольной группы нами обследовано 100 человек (58 женщин, 42 мужчин), проживающих в городе Улан-Удэ в возрасте от 17 до 75 лет, не имеющих на момент исследования острых или обострения хронических заболеваний и считающих себя относительно здоровыми.

Всем обследованным (310 человек) проводился тест для выявления косвенных признаков тромбофилии (тест Manucci P.M., 1997) [19].

ПЦР-исследование осуществлялось на ДНК лейкоцитов венозной крови, полученной методом фенольной экстракции. Для молекулярно-генетического исследования выбраны 3 точковые мутации: FVL, FII(G20210A), MTGFR(C677T). Условия амплификации участков генов в полимеразной цепной реакции соответствовали стандартным протоколам, разработанным Российской научно-исследовательским институтом гематологии и трансфузиологии г. Санкт-Петербурга. Для диагностики исследуемых мутаций использовали сайт-специфический рестрикционный анализ ампликонов с соответствующими эндонуклеазами - HinfI, HindIII. Визуализация продуктов осуществлялась с помощью электрофореза в 2% агарозном с последующим окрашиванием продуктов бромистым этидием и анализом фрагментов путем сравнения их длин со стандартным маркером - ДНК плазмида pUC19, рестрицион-

ной фрагментом Msp 1. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики для связанных и не связанных между собой наблюдений с помощью пакетов программ Microsoft Excel 2003, STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США), с определением достоверности различий при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. Для сравнения частот применялись: критерий Стьюдента (t-тест), критерий Манна - Уитни (U-тест). Для сравнения групп по качественному бинарному признаку применялся критерий χ^2 (Пирсона). Вычислялась относительная вероятность события (OP).

Результаты исследования и их обсуждение. Распространенность исследуемых аномалий среди жителей города Улан-Удэ:

После проведенного популяционного анализа частоты генных мутаций FVL или FV(R506Q), FII(G20210A), MTGFR(C677T) среди относительно здоровых резидентов установлено, что общая встречаемость этих мажорных аллелей составляет 17%. Среди носителей изучаемых полиморфизмов встретилось 12 женщин (21,1% от исследуемых лиц женского пола) и 5 мужчин (11,6%). При анализе по этническому признаку обнаружено, что мутации выявлялись у 6 бурят (15,8% в субпопуляции) и 11 русских (17,7%).

Аномалия Лейден выявлена в 4 (4%) случаях в гетерозиготном состоянии у двух мужчин и двух женщин. В этнических группах: у европейцев эта мутация обнаружена у 2 лиц (3,2%), у бурят - 2 (5,3%). Преобладание носительства FVL аллеля у бурят на территории Забайкалья также было выявлено А.С. Богдановой, Н.А. Миромановой [2,7]. По данным литературы частота этого полиморфизма составляет от 3 до 7% в популяции [1,2,7,8,11,18,20].

Аномалия в гене протромбина FII(G20210A) в гетерозиготном состоянии, по литературным данным, встречается у 2,3 % людей в общей популяции [8]. По данным Junker R. e. a., [17], час-

тота этой мутации у европейцев варьирует от 0-4%. Отмечено, что эта мутация чаще встречается у европейцев, и редко у азиат [11]. В нашем исследовании гетерозиготная форма аллеля обнаружена в одном случае (1%) у русской женщины 21 года, которая не имела в анамнезе артериальных или венозных тромбозов, но отмечала их наличие у ближайших родственников (ишемический инсульт). Примечательно, что единственная ее беременность закончилась выкидышем на раннем сроке (8 недель).

Аномалия MTGFR(C677T) из изучаемых наиболее распространенная (50% в популяции, а гомозиготное носительство данной мутации среди белого населения планеты составляет от 5 до 12% [10,13,14]) выявлена нами у 12 человек (12%): 10 имели гетерозиготную форму, у 2 отмечалась гомозиготное состояние аллеля. Распределение носителей в субпопуляциях составило: буряты - 4 человек (10,5%), из них - 2 женщины и 2 мужчин; европейцы - 8 человек (12,9%), из них - 1 мужчина и 7 женщин.

Таким образом, выявлено, что в этнических субпопуляциях отмечается незначительное преобладание лиц-носителей аномалии Лейден среди монголоидов, тогда как среди европейского населения в несколько большей мере выявлено носительство термолабильной МТГФР. Также отмечено преобладание мажорных проокоагулянтных мутаций в популяции среди женщин, чем среди мужчин. Настоящие результаты ни в коей мере не популяционные, но дающие возможность в дальнейшем провести сравнительный частотный анализ. Конечно, для достоверных выводов необходимо провести масштабное популяционное исследование, в данном случае в Бурятии, и сравнить его результаты с результатами, полученными на других популяционных группах, в том числе и азиатских.

Распространенность исследуемых аномалий среди больных ишемическим инсультом:

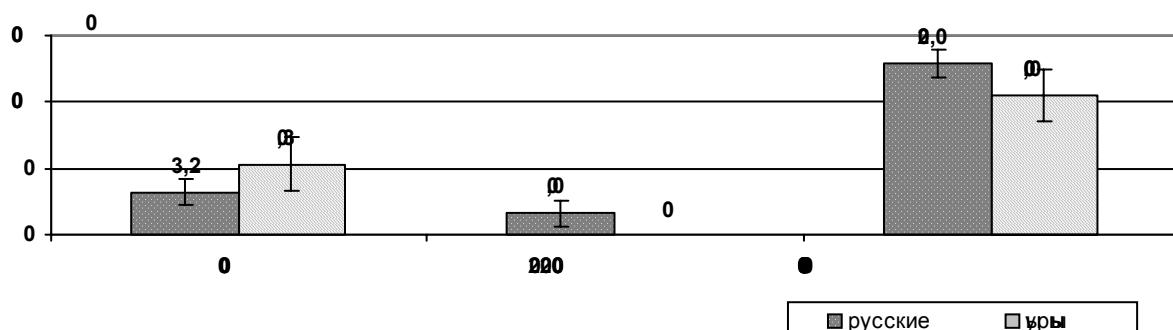


Рис. 1. Частота исследуемых аномалий в этнических субпопуляциях группы контроля, n=100

Попытка установить связь между развитием ишемии мозга и наследственными изменениями в системе свертывания крови была предпринята еще в 1975 году Туняк Ю. С., а затем Давиденковой Е. Ф. (1981). Перед нами же встал вопрос о фенотипической экспрессии и пенетрантности генных вариантов (R506Q (FVL), FII(G20210A), MTGFR(C677T)) у больных ОНМК в популяции города Улан-Удэ с учетом климато-географических особенностей региона, где проживают две большие этнические субпопуляции. Прушеновой С.А. [9], изучающей эпидемиологию мозгового инсульта в открытой популяции 20 - 59 лет города Улан-Удэ отмечена значительно более высокая распространенность этой патологии в Бурятии по сравнению с западно-европейскими регионами Российской Федерации и выявлено, что у русских мужчин распространенность ОНМК была почти в 1,5 раза больше, чем у мужчин бурят.

При молекулярно-генетическом исследовании у больных ишемическим инсультом, ($n=210$) было выявлено 60 случаев искомых мутаций, при чем 2 пациента имели комбинацию из двух аллелей "неблагоприятного" типа. Распространенность мутаций среди всех больных составила - 28,4%, что превышает аналогичный показатель в популяции относительно здоровых лиц. Пациенты без исследуемых мутаций составили 150 человек. Возраст носителей мутаций колебался от 19 до 75 лет, в среднем составил $55,8 \pm 10,9$ лет, что меньше чем среди всех больных инсультом - $63,3 \pm 11,1$ (t , $p < 0,001$).

С аномалией Лейден выявлено 10 пациентов (4,7%). Мутация в гене протромбина G20210A в гетерозиготном состоянии выявлена у 7 (3,3%) больных, дефект MTGFR(C677T) обнаружен в 45 (21,3%) случаях, из них у 6 человек - в гомозиготной форме (\square^2 , $p > 0,05$).

Если рассматривать средний возраст по группам больных носителей, то наиболее "молодые" пациенты $46 \pm 8,5$ лет имели сочетанный полиморфизм исследуемых аномалий (FV(R506Q) +MTGFR(C677T)) - 2 человека.

Из 60 больных ОНМК, у которых, выявлены аномальные гены, мужчины составили 38 человек (63,3%), а женщины - 22(36,7%). Выраженное фенотипическое проявление у мужчин, вероятно, связано с гормональным фоном и значительно большим влиянием таких корректируемых факторов риска инсульта как курение, прием алкоголя; то есть, здесь приемлема теория "двух ударов", согласно которой первый тромбофиличес-

кий фактор ("первый удар") может реализоваться при присоединении дополнительных факторов риска ("второй удар"), после чего происходит формирование тромбозов в определенном месте сосудистого русла [15].

При распределении по расовой принадлежности выявлено, что бурят насчитывалось 17 человек, что составило 27,9% в субпопуляции (18 случаев, среди которых 1 человек сочетал 2 мутации). Среди русских у 43 больных обнаружено 44 случая мутаций (1 пациент имел 2 мутации), что составило 29,3% в субпопуляции. Полученные данные сопоставимы с данными в группе контроля.

Аномалия Лейден сравнительно "мягкая" для развития артериального тромбоза и среди пациентов с ОНМК чаще встречаются больные, имеющие не только APC-R, но и другую наследственную патологию гемостаза сопровождающуюся прокоагулянтной активностью [16]. Среди носителей аномалии Лейден 3 из 10 человек, страдающих ОНМК, принадлежали к монголоидной расе ($R=0,3$), которые составили 17,6% из всех больных-азиат, имеющих исследуемые мутации. Среди русских пациентов с ОНМК этот аллель встречался в 16,3% от числа всех носителей-европейцев аномальных генов. Среди всех больных ишемическим инсультом бурят носители FVL составили 4,9%, тогда как среди русских пациентов - 4,8%.

Среди больных ОНМК, имеющих точечную мутацию в гене протромбина, 2 из 7 человек принадлежали к монголоидной, а 5 человек - к европейской расе, что составило 11,8% и 11,6% соответственно в субпопуляциях носителей больных ишемическим инсультом, и 3,3% и 3,4% в субпопуляциях среди всех больных ОНМК. Мутация в гене протромбина достаточно экспрессивна и в молодом и детском возрасте приводит к развитию инфаркта мозга, а также синус-тромбозу и острой окклюзии церебральных вен [11,17,21] В исследовании, выполненном на больных инсультом в популяции города Улан-Удэ "самыми молодыми" были больные-носители G20210A-аномалии $49,6 \pm 18,1$ лет (FVL - $54,6 \pm 9,4$ лет, C677T - $56,6 \pm 11,5$ лет).

Аномальный ген МТГФР выявлялся чаще, чем остальные - в 45 случаях. Среди бурят 13 человек обладали этой мутацией, что составило 21,3% от всех больных ОНМК в этой этнической субпопуляции, а среди русских - 32 человек - 28,6% от всех европейцев, пациентов ОНМК. Следует отметить, что гомозиготное состояние

Таблица 1
Относительная вероятность выявления проокоагулянтных аномалий (FVL, G20210A, МТГФР (C677T)) у больных ишемическим инсультом в г. Улан-Удэ, а также риск развития ишемического инсульта у носителей точковых мутаций

Мутации	Относительная вероятность выявления (ОР) проокоагулянтных аномалий у больных ОНМК	Риск развития ишемического инсульта у носителей точковых мутаций
MTGFR(C677T)	1,8	1,6
FVL	1,3	1,2
FII(G20210A)	3,3	2,7

Примечание: сравнение бинарного признака в двух независимых группах.

наблюдалось у 4 европейцев (2,7%) и 2 азиат (3,3%). Наследственная гипергомоцистеинемия, которая наблюдается, в том числе и при носительстве MTGFR(C677T), вызывает в большинстве случаев артериальные тромбозы и является высоким фактором риска в развитии ишемического инсульта и болезни Альцгеймера [16]. Вероятно, это связано с увеличенным риском развития атеросклероза, подтвержденное многочисленными исследованиями [5,6,10,13,14].

Учитывая, что основной механизм воздействия ГГЦ это ускорение атерогенеза, и как следствие развитие атеросклероза экстра- и интракраниальных артерий с последующим развитием ОНМК, можно предположить, что носителей мутации C677T среди больных ишемическим инсультом должно быть значительно больше, чем носителей других мутаций (FVL, FII(G20210A)), что мы и наблюдали у пациентов с ишемическим инсультом, особенно моложе 50 лет: 12,5% в популяции здоровых против 47,8% среди больных ОНМК.

Учитывая полученные нами данные, риск развития ишемического нарушения мозгового кровообращения у носителей "неблагоприятных" аллелей в среднем в 1,6 раза выше, чем у лиц, не имеющих изучаемые мутации (таблица 2).

Интересно, что по данным анамнеза (тест Manucci P.M.) частота перенесенных инфаркта миокарда или, в особенности, ишемического инсульта среди носителей проокоагулянтных аномалий выше, чем в исследуемой популяции больных ОНМК (\square^2 , $p<0,05$). Если рассматривать каждую мутацию в отдельности, то среди носителей аномального протромбина выявляется больше лиц, перенесших инфаркт миокарда, а среди пациентов, имеющих термолабильную МТГФР зна-

чительно больше людей, перенесших как инфаркт миокарда (\square^2 , $p<0,05$), так и инфаркт мозга (\square^2 , $p<0,005$). Причем частота этих повторных сосудистых катастроф значительно выше у носителей MTGFR(C677T), чем среди других носителей мутаций и в популяции больных в целом. Так же отмечается существенно большая частота развития флегботромбоза в остром периоде ишемического инсульта, преимущественно в паретичных конечностях, в группе носителей мутаций, нежели чем в группе без первичной тромбофилии.

При проведении нейровизуализационных методов исследования очаг ишемии обнаружен в 68,4% случаев у лиц-носителей мутаций (в популяции в 59,9%) с преобладанием у них количества инфарктов объемом более 50 см³ (\square^2 , $p<0,05$). В острый период ишемического инсульта у пациентов носителей проокоагулянтных генов почти в 3 раза чаще выявлялась госпитальная пневмония (\square^2 , $p<0,05$), 2,5 раза чаще регистрировался респираторный дисстресс-синдром и острый инфаркт миокарда, пролежни развивались чаще в 1,8 раза. Отчасти это объясняется результатами исследований, которые показывают, что наличие генетических или приобретенных тромбофилий предполагает более выраженные сдвиги в иммунитете (имmunограмма характеризуется более выраженным уменьшением концентрации общего IgG, дисгаммаглобулинемией за счет снижения содержания подклассов IgG₁ и IgG₃, значительно более резким снижением количества лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов) что, в конечном итоге, отражается на течении заболевания [2,7].

Заключение: Выявленные в результате исследования данные настраивают, в первую очередь, на скрининговом изучении тромбофилического анамнеза у больных ишемическим нарушением мозгового кровообращения и при выявлении последнего, проведении генотипирования с выявлением мутаций в генах факторов свертывания крови и обмена гомоцистеина, а также на осуществлении медико-генетического консультирования лиц из группы риска в отягощенной сердечно-сосудистыми эпизодами семьи. Этот анализ молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с повышенным риском заболевания, даёт возможность рекомендовать их носителям меры профилактики задолго до появления первых симптомов заболевания и, таким образом, если не предотвратить его развитие, то хотя бы существенно отодвинуть срок его начала или умень-

шить тяжесть клинических проявлений.

Полученные нами результаты создают предпосылки для продолжения данного исследования в плане увеличения объема выборки, что позволит более детально и достоверно оценить вклад генетических факторов не только изучаемых аллельных вариантов, но и их комбинаций в развитие ишемического нарушения мозгового кровообращения и в дальнейшем поможет разработать программы по профилактике цереброваскулярных заболеваний на основе формирования групп повышенного риска.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З. С. Распространенность, диагностика и клиническое значение тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора V к активированному протеину C / З.С. Баркаган, Л. Н. Цывкина, А. М. Мамаев // 1997. - С. 39 - 41.
2. Богданова А. С. Содержание цитокинов у детей с нарушениями гемостаза / А.С. Богданова, И.Г. Богданов, Н.А.Мироманова // Тез.докл. I съезда физиологов. - Сочи, 2005. - С.190.
3. Верещагин Н. В. Гетерогенность инсульта: взгляд с позиции клинициста / Н. В. Верещагин // Журнал. невр. и псих. им. Корсакова. - 2003. - №9, прил. - С. 8 - 9.
4. Гусев Е. И. Проблема инсульта в России / Е. И. Гусев // Журнал. невр. и псих. им. Корсакова. - 2003. - №9, прил. - С.3 - 5.
5. Ефимов В.С. Гомоцистеинемия в патогенезе тромбоваскулярной болезни и атеросклероза / В.С. Ефимов, А.К. Цакалов // Лабораторная медицина. - 1999. - №2. - С. 44-48.
6. Зорилова И. В. Генетически обусловленные нарушения обмена метионина как фактор риска развития ишемического инсульта / И. В. Зорилова, З. А. Суслина, С. Н., Иллариошкин// Журнал. невр. и псих. им. Корсакова. - 2003. - №9, прил. - С.130.
7. Мироманова Н. А. Особенности иммунитета и гемостаза у детей при некоторых инфекционных заболеваниях отягощенных и неотягощенных тромбофилией: Автореф. дис. канд. мед. наук: 14. 00. 16/ГОУ ВПО ЧГМА. - Чита, 2006. - 20 с.
8. Патрушев Л.И. Генетические механизмы наследственных нарушений гемостаза / Л. И. Патрушев // Биохимия. - 2002. - №1. - С. 40-56.
9. Прушенова С. А. Эпидемиология цереброваскулярных заболеваний в Бурятии: Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.13. /ГМИУВ. - Иркутск, 2001. - 21 с.
10. Шмелева В. М. Гипергомоцистеинемия - значимый фактор риска артериальных и венозных тромбозов / В.М. Шмелева, С.И. Капустин, М.Н. Блинов, Л.П. Папаян // Медицинский академический журнал. - 2003. - Т.3.- С. 28-34.
11. Bauer K.A. Management of thrombophilia / K.A. Bauer // Thromb. Haemost. - 2003. - 7. - P.1429-1433.
12. Carrilho I. Prothrombotic study in full term neonates with arterial stroke / I. Carrilho, E.Costa, M.S.Barreirinho, M.Santos, C.Barbot e.a. // Haematologica. - 2001. - 86(8). - P.16.
13. Catherine Driscoll M. The methylenetetrahydrofolate Reductase Gene C677T mutant and ischemic stoke in Sickle Cell disease / Catherine Driscoll M., Ronald Prauner. // Thromb Haemost. - 1999. - №6. - P.1780-1781.
14. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis / M. Cattaneo // Thromb. Haemost. - 1999. - v. 81. - P. 65-67.
15. Chant H. Strok in young adults: The role of paradoxical Embolism / H. Chant, Mc C.Collum // Thromb Haemost. - 2001. - №1. - P.22-29.
16. Geen D. Thrombophilis and stroke / D.Geen // Top. Stroke Rehabil. - 2003. - №10 (3). - P. 21-33.
17. Junker Ralf. Prothrombin G20210A gene mutation and laurther prothrombotic risk factors in childhood thrombophilia / Junker Ralf, Koch Hans-Georg, Auberger Karin, Munshow Nicole. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vask. Biol. - 1999. - №10. - P. 2568-2572.
18. Kalafatis M. Factor V (Leiden) and thrombophilia / Kalafatis Michael, Mam Kenneth G. // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vask. Biol. - 1997. - №4. - P. 620-627.
19. Mannucci P.M. The measurement of multifactorial thrombophilia / P.M. Mannucci // Thromb. Haemost. - 2002. - №1. - P.1-2.
20. Mohanty S. Activated protein C (APC) resistance in young stroke patients / S.Mohanty, R.Saxena, M. Behary // Thromb Haemost. - 2000. - №1. - P.32-33.
21. Vicente V. The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism / V. Vicente, R. Gonzalez-Conejero, J. Rivera et al. // Haematologica. - 1999. - v. 84. - P. 29.