

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА FV (LEIDENG1691A), ГЕНА F2 (G20210A) И ГЕНА MTHFR (C677T) У БОЛЬНЫХ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ

Ступин Ю.В.^{1,2}, Доржиев В.В.¹, Мироманов А.М.¹, Витковский Ю.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Чита, Россия (672090, Чита, ул. Горького, 39а), e-mail:kafravm-chita@mail.ru

²ГУЗ «Городская клиническая больница № 1», Чита, Россия (672010, Чита, ул. Ленина, 8), e-mail:travma75@mail.ru

Представлены результаты исследования встречаемости генотипов полиморфного маркера гена фактора V Лейден (FV G1691A), гена протромбина II (FII G20210A) и гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR C677T) у больных с черепно-мозговой травмой в Забайкальском крае. В исследование включено 96 пациентов с черепно-мозговой травмой в возрасте от 20 до 40 лет. Контрольную группу составили 100 практически здоровых доноров аналогичного возраста. Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической венозной крови. В работе использовались стандартные наборы праймеров научно-производственной фирмы «Литех»-«SNP» (Москва). Полученные данные обработаны с помощью программы «Statistica 6.1». Статистический анализ полученных данных проведен с использованием критерия χ^2 . Зафиксировано отсутствие связи между развитием венозных тромбоэмболических осложнений при черепно-мозговой травме и наследственными изменениями в системе свертывания крови ввиду отсутствия таковых осложнений, что связано с обязательным профилактическим применением антикоагулянтных препаратов у данной группы больных. Распространенность генотипов полиморфных молекул гена FV-1691G>A, гена FII-20210G>A, гена MTHFR-677C>T и их аллельных вариантов у пациентов с черепно-мозговой травмой не отличается от здоровых лиц.

Ключевые слова: полиморфизм, гены, тромбофилия, черепно-мозговая травма.

POLYMORPHISM OF GENE FV (LEIDEN G1691A), GENE F2 (G20210A) AND GENE MTHFR (C677T) AT PATIENTS WITH A CRANIOCEREBRAL INJURY IN ZABAIKALIAN EDGE

Stupin Y.V.^{1,2}, Dorzheyev V.V.¹, Miromanov A.M.¹, Vitkovsky Y.A.¹

¹Chita State Medical Academy, Chita, Russia (39a, Gorkiy st., Chita, 672090), e-mail:kafravm-chita@mail.ru

²City hospital № 1, Chita, Russia (8, Lenina st., Chita, 672010), e-mail:travma75@mail.ru

Results of research of occurrence of genotypes of a polymorphic marker of a gene of the factor V Leiden (FV G1691A), a gene of a prothrombin II (FII G20210A) and a gene methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) at patients with a craniocerebral injury in Zabaikalian edge are presented. 96 patients are included in research with a craniocerebral injury at the age from 20 till 40 years. The control group was made by practically healthy 100 donors of similar age. As a material for the genetic analysis the samples of DNA allocated from peripheric venous blood served. In work standard sets research-and-production firm "Liteh" - «SNP» (Moscow) were used. The obtained data are processed by means of the program «Statistica 6.1». The statistical analysis of the received data is spent with use of criterion χ^2 . Absence of communication between development of venous thromboembolic episodes is fixed at a craniocerebral injury and hereditary changes in system of coagulation of blood in view of absence of those complications that is bound to obligatory preventive application anticoagulation preparations at the given group of patients. Prevalence of genotypes of polymorphic molecules of gene FV-1691G>A, gene FII-20210G>A, gene MTHFR-677C>T and them allele variants at patients with a craniocerebral injury does not differ from healthy faces.

Keywords: polymorphism, genes, thrombophilia, craniocerebral injury.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из актуальных проблем современной медицины. ЧМТ относится к числу наиболее распространенных повреждений и составляет около 40% от всех видов травм. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения она имеет тенденцию к нарастанию в среднем на 2% в год. При этом

преобладает контингент пострадавших в возрасте от 20 до 50 лет, то есть в период наибольшей трудоспособности [5].

Несмотря на многочисленные исследования в области патогенеза первичных и вторичных повреждений головного мозга, разработку современных методов диагностики, лечения и реабилитации таких больных, летальность в последние годы существенно не изменилась и остается на уровне 35-68%. Наряду с этим у большинства выживших (60-70%) в результате тяжелой черепно-мозговой травмы наблюдается снижение работоспособности или инвалидизация [1, 5, 10, 11, 12].

В настоящее время общепризнанна роль тромбофилий в возникновении осложнений и отягощении течения различных заболеваний. Установлено, что большая часть хирургической патологии протекает на фоне нарушений в системах гемостаза и иммунитета. Состояние последних оказывает значительное влияние на течение заболеваний, эффективность лечения и исход. К сожалению, Забайкальская популяция людей в этом отношении является далеко неизученной. Под руководством Ю.А. Витковского выполнены популяционные исследования частоты протромботических мутаций FV (ЛейденG1691A), мутация в гене протромбина II(G20210A), в гене МТГФР (С677Т) среди здоровых и больных сосудистыми заболеваниями головного мозга, инфекционными заболеваниями у детей, опухолях легких в этническом и возрастном аспектах. Однако эти исследования не коснулись больных с ЧМТ. Травма является триггером ферментного каскада системы гемостаза, при этом у пациентов, страдающих тромбофилией, происходит срыв резервных возможностей организма, что неизбежно приводит к грубым патофизиологическим сдвигам [2].

В связи с вышесказанным, изучение генетического полиморфизма молекул, принимающих участие в механизмах регуляции межклеточных взаимодействий у больных при ЧМТ, а также поиски генетических маркеров развития осложнений представляется перспективным как в теоретическом, так и практическом отношениях.

Цель исследования – изучить частоту встречаемости генотипов полиморфного маркера гена фактора V Лейден (FV Leiden G1691A), гена протромбина (FII G20210A) и гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНФР С677Т) у больных с черепно-мозговой травмой в Забайкальском крае.

Материалы и методы

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2011 – поправки) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003г. № 266. Проведено обследование 96 пациентов в возрасте от 20 до 40 лет с

черепно-мозговой травмой. Полученные данные сравнивались с результатами исследований, проведенных у 100 практически здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет. В работе с ЧМТ использовалась общепринятая классификация. Диагноз выставлялся на основании жалоб, факта травмы, данных клинического и неврологического обследования и подтвержден нейровизуализационными методами исследования (КТ головного мозга)[5, 12].

Из клинической группы исключались пациенты с какой-либо сопутствующей патологией.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической венозной крови. Для исследования выбрана точковая мутация FV в позиции 1691(G>A), мутация FII в позиции 20210 (G>A) и мутация MTHFR в позиции 677 (C>T). Амплификацию фрагмента исследуемых генов проводили в термоцикле (модель Ре «Бис» – M111 (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе использовались стандартные наборы праймеров научно-производственной фирмы «Литех»-«SNP» (Москва). Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в проходящем в ультрафиолетовом свете [7].

Полученные данные обработаны с помощью программы «STATISTICA 6.1». Статистический анализ полученных данных проведен с использованием критерия χ^2 . Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки ассоциаций аллелей с генотипом рассчитывали относительный риск (OR) [8].

Результаты исследования и их обсуждение

Распределение распространенности генотипов полиморфного локуса G1691A гена FV и локуса G20210A гена FII у больных с черепно-мозговой травмой и контрольной группы, соответствовало ожидаемому равновесию Харди-Вайнберга, тогда как распределение полиморфного локуса C677T гена MTHFR, напротив, не подчинялось данному равновесию, в результате чего, для расчета полученных данных нами использована аддитивная модель – тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов (табл. 3).

Характеристика распределения частоты аллелей и генотипов гена *FV-1691G>A* у пациентов с ЧМТ и группой здоровых лиц представлена в таблице 1.

Таблица 1

Частота аллельных вариантов гена *FV-1691G>A* и его генотипов среди здоровых резидентов и пациентов с черепно-мозговой травмой (χ^2 , df=1)

Аллели/Генотипы	Контроль	ЧМТ	χ^2	p	OR	
	n=100	n=96			знач.	95% CI
Аллель G	0,995	0,979	1,95	0,16	0,24	0,03-2,13

Аллель А	0,005	0,021			4,23	0,47-38,23
Генотип GG	0,990	0,969	1,44	0,49	0,31	0,03-3,06
Генотип GA	0,010	0,021			2,11	0,19-23,62
Генотип AA	0,000	0,010			3,16	0,13-78,46

Аномалия Лейден выявлена в 1 (1,04%) случае только в клинической группе, а в гетерозиготном состоянии у 2 (2,08%) пациентов и 1 здорового резидента (1%). По данным литературы частота этого полиморфизма составляет от 3 до 7% в популяции [4, 6,14, 17]. Низкая распространенность мутантной гомозиготы в нашем исследовании объясняется малой выборкой (не популяционной), хотя и позволит в дальнейшем проводить сравнительный частотный анализ.

Распределение распространенности аллелей и генотипов гена *FII-20210G>A* среди пациентов с ЧМТ и здоровых лиц представлено в таблице 2.

Таблица 2

Частота аллельных вариантов гена *FII-20210G>A* и его генотипов среди здоровых резидентов и пациентов с черепно-мозговой травмой (χ^2 , df=1)

Аллели/Генотипы	Контроль	ЧМТ	χ^2	p	OR	
	n=100	n=96			знач.	95% CI
Аллель G	0,99	0,979	0,76	0,38	0,47	0,09-2,62
Аллель А	0,01	0,021			2,11	0,38-11,64
Генотип GG	0,980	0,958	0,77	0,68	0,47	0,08-2,62
Генотип GA	0,020	0,042			2,13	0,38-11,91
Генотип AA	0,000	0,000			1,04	0,02-53,01

Аномалии в гене *FII-20210G>A(-20210A/A)* нами не выявлено, тогда как носительство генотипа – 20210G/A гена FII зарегистрировано у 2 лиц контрольной группы и 4 пациентов с ЧМТ. Встречаемость генотипа – 20210A/A гена FII в общей популяции регистрируется в среднем у 2,3% людей [6]. Поданным JunkerR. etall. [16], частота этой мутации у европейцев варьирует от 0,4%. Отмечено, что эта мутация чаще встречается у европейцев, и редко у азиат [14].

Распределение генотипов гена *MTHFR-677C>T* у здоровых лиц и у пациентов с ЧМТ представлено в таблице 3.

Таблица 3

Частота генотипов гена *MTHFR-677C>T* среди здоровых резидентов и пациентов с черепно-мозговой травмой (χ^2 =[0,1,2],df=1)

Генотипы	Контроль	ЧМТ	χ^2	p	OR	
	n=100	n=96			знач.	95% CI

Генотип СС	0,450	0,417	0,00	0,97	0,87	0,5-1,54
Генотип СТ	0,440	0,510			1,33	0,76-2,33
Генотип ТТ	0,110	0,073			0,64	0,24-1,72

Носительство генотипа – 677С/Т гена MTHFR отмечено у 44 (44%) здоровых лиц и 49 (51%) пациентов с ЧМТ, а частота генотипа – 677Т/Т выявлена у 11 (11%) и 7 (7,3%) человек, соответственно, что согласуется с литературными данными, поскольку генотип-677С/Т гена MTHFR встречается в популяции в 50%, а гомозиготное носительство данной мутации среди белого населения планеты составляет от 5 до 12% [13, 15].

Попытка установить связь между развитием венозных тромбоэмболических осложнений при ЧМТ и наследственными изменениями в системе свертывания крови не увенчалась успехом ввиду отсутствия таковых осложнений, что, вероятно, связано с обязательным профилактическим применением антикоагулянтных препаратов у данной группы больных [3, 9].

Таким образом, полученные результаты создают предпосылки для продолжения исследования генетического полиморфизма молекул принимающих участие в механизмах регуляции межклеточных взаимодействий, что позволит более детально и достоверно оценить вклад генетических факторов не только изучаемых аллельных вариантов, но и их комбинаций в развитие наиболее грозных осложнений при ЧМТ и в дальнейшем поможет разработать программы по их профилактике на основе формирования групп повышенного риска.

Вывод

Распространенность генотипов полиморфных молекул гена *FV-1691G>A*, гена *FII-20210G>A*, гена *MTHFR-677C>T* и их аллельных вариантов у пациентов с черепно-мозговой травмой не отличается от здоровых лиц.

Список литературы

1. Агаджанян В.В. Политравма. Неотложная помощь и транспортировка. - Новосибирск: Наука, 2008. – 320 с.
2. Доржеев В.В. Некоторые генетические и иммунологические механизмы развития гемокоагуляционных осложнений у пациентов с политравмой: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Чита, 2015. – 22 с.
3. Мироманов А.М. Венозные тромбоэмболические осложнения при патологии опорно-двигательного аппарата: учебное пособие. - Москва, 2014. – 64 с.

4. Мироманова Н.А. Особенности иммунитета и гемостаза у детей при некоторых инфекционных заболеваниях отягощенных и неотягощенных тромбофилией: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Чита, 2006. – 20 с.
5. Неврология: национальное руководство / под ред. Е.И. Гусева [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 1040 с.
6. Патрушев Л.И. Генетические механизмы наследственных нарушений гемостаза / Биохимия. – 2002. - № 1. – С. 40-56.
7. Полиморфизм гена TNF- α (G-308A) у больных с гнойно-воспалительными осложнениями при переломах длинных костей конечностей в Забайкальском крае [Электронный ресурс] / А.М. Мироманов и [др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2013. – № 1. – С. 41-45. – Режим доступа: <http://chitgma.ru/zmv2>.
8. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
9. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоэмболических осложнений. – М.: Планида, 2012. – 114 с.
10. Соколов В.А. Множественные и сочетанные травмы. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 512 с.
11. Терещенко С.Н. Тромбоэмболия легочной артерии: руководство. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 96 с.
12. Травматология: национальное руководство / под ред. Г.П. Котельникова, С.П. Миронова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 1104 с.
13. Шмелева В.М. Гипергомоцистеинемия – значимый фактор риска артериальных и венозных тромбозов / В.М. Шмелева, С.И. Капустин, М.Н. Блинов // Медицинский академический журнал. – 2003. - № 4. – С. 28-34.
14. Bauer K.A. Management of thrombophilia // Thromb. Haemost. – 2003. - № 7. – P. 1429-1433.
15. Driscoll C.M. The methylantetrahydrofolate Reductase Gene C677T mutant and ischemic stroke in Sickle Cell disease C.M. Driscoll, R. Prauner / Thromb. Haemost. – 1999. - № 6. – P. 1780-1781.
16. Junker R. Prothrombin G20210A gene mutation and laurtherprothrombotic risk factors in childhood thrombophilia / R. Junker, H.-G. Koch, K. Auberger/ Arteriosclerosis, Thrombosis and Vask. Biol. – 1999. - № 10. – P. 2568-2572.
17. Kalafatis M. Factor V (Leiden) and thrombophilia / M. Kalafatis, K.G. Mam // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vask. Biol. – 1997. - № 4. – P. 620-627.

Рецензенты:

Цыбиков Н.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Чита;

Намоконов Е.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и специализированной хирургии с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Чита.