

Тромбоз. Причины, диагностика.

- ▶ **Тромбоз-прижизненное формирование** внутри кровеносных сосудов свертков крови, препятствующих свободному потоку крови по кровеносной системе.

Тромбоз глубоких вен (ТГВ)



Актуальность

- ▶ В настоящее время по данным отечественных ученых острые тромбозы глубоких вен и их осложнения поражают 1,5 % населения, большая часть которого находится в трудоспособном возрасте.
- ▶ венозная тромбоэмболия занимает третье место среди причин смерти от сердечнососудистых заболеваний, что обуславливает исключительную важность совершенствования ее диагностики, лечения и профилактики.

Важнейшие факторы и маркеры повреждения эндотелия и, следовательно, тромбообразования

Социальные

- ❑ Постоянное нервное перенапряжение
- ❑ Гипертония
- ❑ Курение
- ❑ Гиперхолестеринемия
- ❑ Сахарный диабет
- ❑ Персистирующие инфекции

Молекулярные

- ▶ Эндотелин
- ▶ Гомоцистеин
- ▶ С-реактивный белок
- ▶ Ангиотензин II
- ▶ Окись азота - NO
- ▶ Фибронектин

- ▶ *Исследование генетической предрасположенности к тромбофилии показано в следующих случаях:*
- ▶ Наличие в анамнезе двух и более прерываний беременности на ранних сроках;
- ▶ Наличие в анамнезе тяжёлых осложнений беременности (гестоз, задержка развития плода, внутриутробная гибель плода);
- ▶ Наличие родственников с тромботическими проявлениями в возрасте до 50 лет (инфаркт миокарда, ОНМК, тромбоэмболия лёгочной артерии, тромбоз глубоких вен нижних конечностей и др.);
- ▶ Несколько неудачных попыток ЭКО;
- ▶ Повышение уровня антифосфолипидных антител и/или гомоцистеина;
- ▶ Планирование гинекологических оперативных вмешательств;
- ▶ Назначение оральных гормональных контрацептивов (ОК). Женщинам с эпизодом венозной тромбоэмболии, получающим оральные контрацептивы;
- ▶ Назначение заместительной гормональной терапии. Женщинам с эпизодом венозной тромбоэмболии, получающим заместительную гормональную терапию;
- ▶ Курящим мужчинам в возрасте до 50 лет с эпизодом венозной тромбоэмболии;
- ▶ Наличие тромбофлебита.

- ▶ Комплексный генетический анализ, который позволяет определить риск тромбофилии. Он представляет собой молекулярно-генетическое исследование генов факторов свертываемости крови, тромбоцитарных рецепторов, фибринолиза, обмена фолиевой кислоты, изменение активности которых напрямую или опосредованно обуславливает склонность к повышенному тромбообразованию.

Ген 5 фактора (мутация Лейден) G1691A

Функция: кодирует белок (фактор V), который является важнейшим

КОМПОНЕНТОМ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ.

ГЕНОТИП	Интерпретация
AA	Предрасположенность к невынашиванию беременности. Повышен риск развития венозных тромбозов.
AG	Предрасположенность к невынашиванию беременности. Повышен риск развития венозных тромбозов.
GG	Норма

- ▶ мутация FV Leiden нарушает сайт рестрикции для рестриктазы MnlI

Поэтому рестриктаза может расщеплять в этом месте нормальный, но не мутантный продукт ПЦР.

При отсутствии мутации после электрофореза обнаруживается две низкомолекулярные полосы, образовавшиеся под действием фермента. Полная устойчивость продукта ПЦР к рестриктазе свидетельствует о наличии в анализируемой ДНК гомозиготной мутации FV Leiden, а частичная - гетерозиготной

Ген протромбина (фактор II) G20210A

Функция: кодирует белок (протромбин), который является одним из главных факторов системы свертывания

Локализация гена на хромосоме - 11p11.2

- ▶ G/G - генотип, не предрасполагающий к повышению свертывания крови
- ▶ G/A - генотип, предрасполагающий к повышению свертывания крови, в гетерозиготной форме
- ▶ A/A - генотип, предрасполагающий к повышению свертывания крови, в гомозиготной форме

Данные о полиморфизме:

*частота встречаемости в популяции - 1-4%

*частота встречаемости у беременных с венозной тромбоэмболией в анамнезе- 10-20%

*аутосомно-доминантное наследование 4%

Диагностический набор «ТромбоГЕН-RT» предназначен для выявления наследственной тромбофилии и оценки риска развития тромбозов глубоких вен и тромбоэмболии лёгочной артерии.

Анализ с применением этого набора осуществляется методом полимеразной цепной реакции с детекцией накопления продукта в реальном времени (ПЦР Real-Time) с помощью аллель-специфичных флуоресцентных зондов.

Фактор свертываемости крови 7 (F7). Выявление мутации G10976A (Arg353Gln)

Функция гена

Ген F7 кодирует свертывающий фактор VII (проконвертин) - белок, синтезируемый в печени и регулирующий свертывание крови, выступая в качестве активатора факторов свертывания крови X (F10) и IX (F9) в присутствии витамина K.

Локализация гена на хромосоме - 13q34

Возможные генотипы

- ▶ G/G - нормальная активность белка F7
- ▶ G/A - активность белка F7 умеренно снижена
- ▶ A/A - активность белка F7 значительно снижена

Частота встречаемости аллеля A в европейской популяции составляет 10%.

Для данного маркера не существует понятия «норма» и «патология», т. к. исследуется полиморфизм гена.

Фибриноген, бета-полипептид (FGB). Выявление мутации

G(-455)A (регуляторная область гена)

Локализация гена на хромосоме - 4q31.3

Функция гена

Ген *FGB* кодирует бета-полипептидную цепь белка фибриногена, растворимого белка плазмы крови, который относится к группе глобулинов (фактор I свертывания крови). Под действием фермента тромбина этот белок способен превращаться в фибрин и образовывать тромб.

Частота встречаемости минорного (A) аллеля в европейской популяции составляет примерно 20 %.

- Оценка генотипа по маркеру:
- ▶ G/G - нормальная концентрация фибриногена
 - ▶ G/A - концентрация фибриногена умеренно повышена
 - ▶ A/A - концентрация фибриногена значительно повышена

Ингибитор активатора плазминогена (SERPINE1). Выявление мутации 5G(-675)4G

Функция: кодирует белок ингибитор активатора плазминогена, который играет важнейшую роль в регуляции фибринолиза, а также является неотъемлемым компонентом в процессе имплантации плодного яйца. Патология: наличие 4 гуанинов вместо 5 в структуре гена ингибитора активатора плазминогена приводит к повышению его функциональной активности.

Результат - высокий риск тромбозов.

Данные о полиморфизме:

- *частота встречаемости в гетерозиготы 4G/5G популяции - 50%
- *частота гомозиготы 4G/4G - 26%
- *частота встречаемости у беременных с ТФ - 20%
- *аутосомно-доминантное наследование

- ▶ Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) специально разработана система генетического анализа PyroMark Q24, основанная на методе пиросеквенирования.

- ▶ **Ген метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR C677T**
- ▶ **Функция:** кодирует фермент метилентетрагидрофолатредуктазу, который является ключевым ферментом фолатного цикла и катализирует реакцию превращения гомоцистеина в метионин.
- ▶ **Патология:** В норме во время беременности уровень гомоцистеина в плазме понижен. Это можно рассматривать, как физиологическую адаптацию организма матери, направленную на поддержание адекватной циркуляции крови в плаценте.
- ▶ Замена цитозина на тимин в 677 положении приводит к снижению функциональной активности фермента до 35% от среднего значения.

- ▶ Мутация С677Т в гене МТГФР приводит к образованию нового сайта рестрикции для рестриктазы Нт/1

Поэтому рестриктаза может расщеплять в этом месте мутантный, но не нормальный продукт ПЦР. По окончании ПЦР образовавшийся фрагмент ДНК инкубируется с рестриктазой Нт/1 и продукты реакции анализировали электрофорезом в агарозном геле. При наличии мутации обнаруживали появление двух новых низкомолекулярных фрагментов ДНК, образовавшихся под действием фермента. При этом полное расщепление продукта ПЦР свидетельствует о наличии в анализируемой ДНК гомозиготной мутации С677Т, а частичное - гетерозиготной

▶ **Ген GNB3 C825T**

- ▶ **Функция:** является вторичным переносчиком сигнала от рецептора на поверхности клетки в ядро
- ▶ **Патология:** точечная мутация в гене G-белка - замена цитозина (С) на тимин (Т) в 825 положении приводит к нарушению функции этого вторичного переносчика. В результате, сигналы перестают поступать в ядро, и нарушается гуморальная регуляция агрегации тромбоцитов.

- ▶ Для проведения рестрикционного анализа ПЦР продукт инкубировали с 1 ед. рестриктазы BseDI (фирма «Fermentes», Литва) Рестрикционный анализ позволял идентифицировать аллели С825 и Т825. В случае аллеля С825 получали два фрагмента ДНК длиной 154 п.н. и 114 п.н., в случае аллеля Т825 сайт узнавания для рестриктазы BseDI отсутствовал и оставался один фрагмент длиной 268 п.н

Ген тромбоцитарного рецептора фибриногена ITGB3 1a/1b (Leu33Pro)

Функция: кодирует бета-3 субъединицу интегрин-комплекса поверхностного рецептора тромбоцитов GPIIb/IIIa, известную также как гликопротеин-3a (GPIIIa). Она обеспечивает взаимодействие тромбоцита с фибриногеном плазмы крови, что приводит к быстрой агрегации (склеиванию) тромбоцитов и, таким образом, к последующему купированию поврежденной поверхности эпителия.

Патология: замена нуклеотида во втором экзоне гена GPIIIa, что приводит к замене лейцина на пролин в 33 положении.

частота встречаемости в популяции - 16-25%

Ген NO-синтазы NOS3 (4a/4b)

Функция: кодирует синтазу окиси азота (NOS), которая синтезирует окись азота, принимающую участие в вазодилатации (расслаблении васкулярной мускулатуры), влияет на ангиогенез и свертывание крови.

Патология: наличие четырех повторов нуклеотидной последовательности (4a) вместо пяти (4b) в гене синтазы оксида азота приводит к уменьшению выработки NO, основного вазодилататора, препятствующего тоническому сокращению сосудов нейронального, эндокринного или локального происхождения.

Данные о полиморфизме:

Частота встречаемости в популяции гомозиготы 4a/4a - 10-20%

Интегрин альфа-2 (гликопротеин Ia/IIa тромбоцитов) (ITGA2).

Выявление мутации C807T (нарушение синтеза белка)

локализация гена на хромосоме - 5q11.2

Функция гена

Ген *ITGA2* кодирует белок интегрин альфа-2 - мембранный гликопротеин, известный как GPIa (platelet glycoprotein Ia, или very late activation protein (VLA), экспрессирующийся на мембранах различных клеток, включая мегакариоциты, фибробласты и тромбоциты. На мембране тромбоцитов GPIa образует комплекс с GPIIa, представляющий собой один из рецепторов коллагена.

Оценка генотипа по маркеру:

C/C - нормальная скорость адгезии тромбоцитов

C/T - скорость адгезии тромбоцитов повышена, по сравнению с генотипом C/C

T/T - скорость адгезии тромбоцитов повышена, по сравнению с генотипами C/C и C/T

- ▶ **Полиморфизмы, отвечающие за дефицит протеина С**
- ▶ **Функция:** протеин С является основным ингибитором тромбоза. Вместе с другими компонентами образуют комплекс, препятствующий избыточному тромбообразованию.
- ▶ **Патология:** Потеря взаимодействия между этим антитромботическим комплексом и факторами каскада свертывания ведет к нерегулируемой прогрессии каскада свертывания и избыточному тромбообразованию.
- ▶ **Данные по дефициту протеина С:**
 - *частота встречаемости в популяции - 0,2-0,4%
 - *частота встречаемости у беременных с ВТЭ - 1-5%

- ▶ **Полиморфизмы, отвечающие за дефицит протеина S**
- ▶ **Функция:** протеин S является основным ингибитором тромбоза. Вместе с другими компонентами образуют комплекс, препятствующий избыточному тромбообразованию.
- ▶ На сегодняшний день известно множество мутаций, предрасполагающих организм к дефициту протеина S, однако выделить из них тот полиморфизм, который является ведущим, пока не представляется возможным. Совсем недавно открыт полиморфизм, в 95% случаях вызывающий дефицит протеина S первого типа. Это мутация в гене рецептора протеина S PROS1. Однако роль данной мутации в развитии акушерской патологии пока не достаточно ясна.

- ▶ Молекулярную диагностику этих генетических дефектов можно проводить при помощи прямого секвенирования ПЦР-продуктов.