

© В. В. Никитина, Е. Р. Баранцевич, А. А. Жлоба, 2012
УДК 00000000000000000000000000000000

В. В. Никитина^{1,2} **Е. Р. Баранцевич**¹ **А. А. Жлоба**²

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова

² Научно-исследовательский центр Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

Проявления полиморфизма генов свертывающей, противосвертывающей и патогенетически близких систем для выявления их роли в развитии сосудистых заболеваний у пациентов с гипергомоцистеинемией

В работе представлены результаты исследования метаболической тромбофилии у больных с тромбозом артерий и вен. Выявлена значимость полиморфизмов генов метилентетрагидрофолат редуктазы, тромбоцитарных гликопротеиновых рецепторов, в гене ингибитора активатора плазминогена I типа, гене V фактора (Лейдена) в развитии ишемических расстройств у пациентов с сосудистыми заболеваниями. Обоснована необходимость неврологического, нейропсихологического исследования, определения уровня общего гомоцистеина в плазме крови, молекулярно-генетического типирования системы гемостаза у пациентов до 60 лет с тромбозом артерий и вен.

Ключевые слова: метаболическая тромбофилия, сосудистые заболевания, тромбозы артерий и вен

В патогенезе сосудистых заболеваний нервной системы большую роль играют расстройства коагулографических показателей [1], в частности метаболическая тромбофилия — гипергомоцистеинемия (ГГ) [2]. ГГ представляет собой фактор риска сосудистых заболеваний, вызываемых эндотелиальными повреждениями и системным атеросклерозом [3]. Нарушение процессов реметилирования — образования метионина из общего гомоцистеина, происходящее из-за дефицита ферментов метилентетрагидрофолат редуктазы и метионин-синтазы-редуктазы, — приводит к развитию атеросклероза, атеротромбозов, инфаркта, инсульта [4]. Реметилирование общего гомоцистеина в метионин катализирует цитоплазматический фермент метионин-синтазу. Для работы фермента необходим метилкобаламин, производное витамина B_{12} . Метионин-синтаза обеспечивает преобразование общего гомоцистеина в метионин посредством реакции, в ко-

торой метилкобаламин выступает в роли промежуточного переносчика метильной группы. При этом происходит окисление кобаламина, и метионин-синтаза переходит в неактивное состояние. Восстановление функции фермента возможно в ходе реакции метилирования при участии метионин-синтазы-редуктазы. Донором метильной группы является активированная форма метионина — S-аденозилметионин, который используется также для метилирования других соединений (ДНК, РНК, белков и фосфолипидов). Цель исследования — улучшение диагностики, первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Материалы и методы

Нами проведено наблюдение 36 пациентов. Основным критерием отбора было наличие у больных ГГ разной степени тяжести. Уровень общего гомоцистеина в плазме крови составлял $25,7 \pm 11,5$ ($p < 0,05$) [5] при сопоставлении с контрольной группой из 32 человек 21–26 лет. В группе доноров преобладали женщины, мужчин было 13. Для проведения сравнительного анализа показателей нейропсихологического тестирования была набрана вторая контроль-

Вероника Владленовна Никитина
e-mail: nikitina_veronik@mail.ru

Таблица 1

Характеристика обследованных пациентов

Характеристика	Показатель
Мужчины, абс. число	14
Женщины, абс. число	22
Возраст, лет	52,5±13,4
Пациенты с гипертонической болезнью, абс. число	14
Степень тяжести ГГ, ммоль/л	25,7±11,5 ($p<0,05$)*
MMSE, баллы	26,7±1,8 ($p<0,01$)*
Тест Векслера, в прямом порядке, отн. ед.	41,2±8,9 ($p<0,01$)*
Тест Векслера, в обратном порядке, отн. ед.	29±8,8 ($p<0,01$)*
Тест на цифровую последовательность, с	136,3±44,2 ($p<0,01$)*

* По отношению к обеим контрольным группам

ная группа из 20 здоровых людей в возрасте 21,1±1,2 года, из них трое мужчин. 1/3 обследованных пациентов страдали разной степенью тяжести гипертонической болезни (ГБ). Средний возраст пациентов составил 52,5±13,4 года (табл. 1).

Диагнозы заболеваний у неврологических больных были верифицированы клинически и с помощью методов нейровизуализации — магнитно-резонансной или компьютерной томографии головного мозга. Дополнительно выполняли рентгенологические исследования шейного отдела позвоночника, ультразвуковую диагностику брахиоцефальных артерий (УЗДГ БЦА), транскраниальную доплерографию артерий головного мозга (ТКДГ). Выполняли исследование общего гомоцистеина в плазме крови с помощью ВЭЖХ-анализа на хроматографе Agilent 1100 с фотометрическим детектированием (Лабораторная диагностическая технология выявления гипергомоцистеинемии, Жлоба А. А., Блашко Э. Л., Никитина В. В., № ФС 2009/309 от 04.09.09). После проведения коагулографического исследования крови пациентам в поликлинике по месту жительства, в Диагностическом центре ЦЛД СПбГМУ им.

И. П. Павлова оценивали функциональную активность тромбоцитов. Изучение роли полиморфизма генов свертывающей, противосвертывающей и родственных с ними систем для выявления их значимости в патогенезе тромбоэмболических заболеваний также производили в Диагностическом центре ЦЛД СПбГМУ им. И. П. Павлова (табл. 2). Отклонения гемостаза дополнительно исследовано у шести больных с ГГ, страдавших сердечно-сосудистыми, тромбоэмболическими заболеваниями разной локализации. Статистическая обработка проведена с использованием лицензионной програм-

Таблица 2

Молекулярно-генетическое типирование системы гемостаза у пациентов

Полиморфизм генов свертывающей и противосвертывающей систем крови	Число исследованных пациентов	Заболевания пациентов
Генетические факторы риска дисфункции тромбоцитарного звена гемостаза полиморфизм L 33 P (T>C) гена рецептора тромбоцитов (ITGB3) (гликопротеин 3a) полиморфизм 807 C>T (F224F) гена рецептора тромбоцитов (ITGA2)	1	Гипертоническая болезнь II стадии
	1	Остаточные явления тромбоза глубоких вен нижних конечностей, острого тромбоза подвздошно-бедренного сегмента слева от 2010 г. Дисциркуляторная энцефалопатия I степени
	1	Дисциркуляторная энцефалопатия II степени. Гипертоническая болезнь II стадии. Дегенеративно-дистрофическое заболевание позвоночника. Бронхиальная астма, инфекционно-зависимая, легкой степени тяжести. Дыхательная недостаточность I степени
Генетические факторы риска эндотелиальной дисфункции полиморфизм C677T в гене метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR)	1	Цереброваскулярная болезнь. Гипертоническая болезнь II стадии. Ишемическая болезнь сердца, атеросклеротический кардиосклероз
	1	Остаточные явления тромбоза глубоких вен нижних конечностей, острого тромбоза подвздошно-бедренного сегмента слева от 2010 г. Дисциркуляторная энцефалопатия I степени
	1	ОС-папиллофлебит, вторичный тромбоз нижневисочной ветви центральной вены сетчатки
	1	Варикозная болезнь вен нижних конечностей. Состояние после тромбоза легочной артерии мелких ветвей от 2009 г. Сердечная недостаточность II ФК по NYHA. Гипертоническая болезнь III стадии. Дисциркуляторная энцефалопатия I степени

Окончание табл. 2

Молекулярно-генетическое типирование системы гемостаза у пациентов

Полиморфизм генов свертывающей и противосвертывающей систем крови	Число исследованных пациентов	Заболевания пациентов
Генетические факторы риска дисфункции плазменного звена гемостаза: мутация G1691A (Arg506Gln) в гене фактора V (FV Leiden) полиморфизм 675 4G/5G в гене ингибитора активатора плазминогена I типа (PAI-1)	1	Варикозная болезнь вен нижних конечностей. Состояние после тромбоза легочной артерии мелких ветвей от 2009 г. Сердечная недостаточность II ФК по NYHA. Гипертоническая болезнь III стадии. Дисциркуляторная энцефалопатия I степени
	1	Остаточные явления тромбофлебита глубоких вен нижних конечностей, острого тромбоза подвздошно-бедренного сегмента слева от 2010 г. Дисциркуляторная энцефалопатия I степени
	1	Цереброваскулярная болезнь, мешотчатая аневризма правой передней мозговой артерии, атеросклероз артерий головного мозга. ОВ-тромбоз центральной вены сетчатки от дек. 2009 г.
Полиморфизм 455 G/A гена фибриногена (FCB)	1	Цереброваскулярная болезнь. Гипертоническая болезнь II стадии. Ишемическая болезнь сердца, атеросклеротический кардиосклероз
	1	Остаточные явления тромбофлебита глубоких вен нижних конечностей, острого тромбоза подвздошно-бедренного сегмента слева от 2010 г. Дисциркуляторная энцефалопатия I степени

мы SPSS16. Данные выражали в виде средних арифметических и их средних ошибок. Сравнение полученных данных осуществляли с использованием критериев знаковых рангов Вилкоксона в случае анализа непараметрических показателей, с критерием Стьюдента — при анализе данных, соответствовавших нормальному распределению по критерию Колмогорова–Смирнова. Корреляционным анализом по Спирмену изучали тесноту связи показателей внутри изученной группы.

Результаты и обсуждение

В работе проведен анализ результатов обследования за 2009–2010 гг. 36 пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, сопровождающихся выраженными мозговыми дисфункциями и тяжелыми нарушениями коагуляции.

В неврологическом статусе пациентов преобладали синдромы поражения интеллектуально-мнестических функций, пирамидной системы в виде центральных гемипарезов, мозжечковой атаксии, корешковые синдромы. У обследованных пациентов регистрировали умеренной степени тяжести ГГ $25,7 \pm 11,5$ ($p < 0,05$). Наблюдали достоверно значимую корреляционную зависимость между уровнями общего гомоцистеина

в плазме крови и тяжестью очаговой неврологической симптоматики у пациентов ($r = 0,31$, $p < 0,05$), общего гомоцистеина в плазме крови и показателями нейропсихологического тестирования — теста Векслера ($r = 0,32$, $p < 0,05$). Обоснована необходимость исследования внутрисосудистой активации тромбоцитов и молекулярно-генетического типирования системы гемостаза у пациентов до 50 лет с тромбозом вен сетчатки. В последующем пациенты получали адекватные дозы витаминов группы B, в частности фолиевой кислоты, витамина B₆ и B₁₂. Дополнительное исследование этих биохимических показателей до начала лечения способствует адекватному назначению патогенетической терапии, включая витамины.

Клиническое наблюдение № 1

Пациентка Р. Н. И., 63 года, была осмотрена неврологом 6.12.2010 г. На момент осмотра были боли и слабость мышц левой ноги, которые усиливались при ходьбе, расстройства речи. Из анамнеза заболевания известно, что в течение последних 30 лет страдает ГБ. Максимальное повышение АД — 260/120 мм рт. ст., рабочее давление — 130/70 мм рт. ст., постоянно получает Нормодипин 10 мг 1 таблетку 1 раз в день, Престариум 5 мг 1 таблетку 1 раз в день.

В 2000 г. перенесла острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) в бассейне пра-

вой средней мозговой артерии по типу ишемии, лечилась в НИИ экспериментальной медицины РАМН. В августе 2009 г. повторно перенесла ОНМК в бассейне левой средней мозговой артерии с моторной афазией, правосторонним центральным гемипарезом, правосторонней гемипестезией. Из анамнеза жизни известно, что страдает фибромиомой матки, родители страдали ГБ, ОНМК. Неврологически: моторная афазия, бульбарно-псевдобульбарный паралич, правосторонний центральный гемипарез, правосторонняя гемипестезия, мозжечковая атаксия. MMSE — 20 баллов, тест на цифровую последовательность — 194 с. Показатели клинического анализа крови, общего анализа мочи были в пределах нормы.

25.12.2010 г. биохимическое исследование уровня общего гомоцистеина 18,7 мкмоль/л. Магнитно-резонансная томография головного мозга (МРТ) от 2009 г. МРТ-картина относительно свежего повторного ОНМК по ишемическому типу в бассейне левой средней мозговой артерии, последствия ОНМК по ишемическому типу в бассейне правой средней мозговой артерии. Множественные очаговые изменения в веществе мозга постишемического и дистрофического характера. Смешанная заместительная гидроцефалия. Признаки атеросклеротических изменений церебральных артерий, снижение кровотока по правой позвоночной артерии. Дуплексное сканирование БЦА от 21.12.2009 г. Атеросклеротические изменения экстракаротидных артерий. Гемодинамически незначимый стеноз общей сонной артерии, внутренней сонной артерии справа. «Свежая» пролонгированная атеросклеротическая бляшка в бифуркации общей сонной артерии с распространением в устье внутренней сонной артерии. Извитость интракраниального отдела правой позвоночной артерии с умеренным ослаблением кровотока, базилярный кровоток компенсирован. Рекомендовано: Ангиовит 1 таблетка 2 раза в день в течение 3 мес, повторный биохимический анализ крови на общий гомоцистеин, фибриноген, АПТВ, МНО, протромбин, ЭЭГ, консультация хирурга по сосудистым болезням, госпитализация в неврологическое отделение стационара через 6–12 мес, анализ крови на исследование внутрисосудистой активации тромбоцитов.

Анализ результатов клиническо-неврологического, инструментального исследований паци-

ента подтверждает данные наблюдений ученых, которые изучали прогрессирование нейрофизиологического дефицита у 128 пациентов с инсультами и с когнитивными расстройствами и без них с помощью Mini-Mental State Examination (MMSE) [6]. У пациентов с цереброваскулярными заболеваниями наблюдали замедление интеллектуально-мнестических расстройств при отсутствии повторных инсультов и/или транзиторных ишемических атак. Также регистрировали обратную ситуацию при наличии у пациентов повторных инсультов и/или транзиторных ишемических атак. Высокий уровень образования играл протективную защитную роль при формировании различных расстройств у этих пациентов.

Клиническое наблюдение № 2

Н. Н. Э., 21 год. Осмотрена неврологом 7.12.2010 г. Предъявляла жалобы на повышенную утомляемость. Из анамнеза заболевания известно, что 6 мес назад через 7 дней после родов повысилась температура тела до 40° С, осмотрена хирургом, поставлен диагноз тромбоз глубоких вен нижних конечностей, острый тромбоз подвздошно-бедренного сегмента слева. Получала варфарин 2,5 мг по 3 ¼ таблетки в день. Из анамнеза жизни известно, что отец пациентки страдал варикозной болезнью вен нижних конечностей. Неврологически: левосторонняя пирамидная недостаточность. Показатели клинического анализа крови, общего анализа мочи были в пределах нормы.

25.10.2010 г. на фоне приема варфарина выполнено исследование по определению внутрисосудистой функциональной активности тромбоцитов, уровень общего гомоцистеина 18,7 мкмоль/л. Заключение: умеренная гипокоагуляция, показатели уровня индуцированной агрегации тромбоцитов в норме. 27.10.2010 г. молекулярно-генетическое исследование. Заключение: выявлены маркеры, ассоциированные с повышением функциональной активности тромбоцитов, ГГ, гиперфибриногенемией. 27.10.2010 г. антитела к кардиолипину класса IgG, IgM в норме, диагностические тесты на наличие первичного антифосфолипидного синдрома (антитела к бета-2 гликопротеину I класса IgG) в норме. Диагноз: дисциркуляторная энцефалопатия I степени. Наследственная метаболическая тромбофилия (ГГ). Рекомендовано: УЗДГ БЦА, ТКДГ, МРТ головного мозга,

рентгенограмма шейного отдела позвоночника с функциональными пробами, контроль биохимического анализа крови на общий гомоцистеин через 3 мес, повторная консультация невролога, Ангиовит 5 мг 1 таблетка 1 раз в день 3 мес, Фенотропил 100 мг 1 таблетке 1 раз в день 1 мес по утрам; Танакан или Билобил или Кавинтон 1 таблетка 3 раза в день 3 мес, лечебная физкультура.

Выводы

На основании полученных данных исследований, у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и гипергомоцистеинемией разной степени тяжести, помимо нарушений в генах, кодирующих белки метаболизма общего гомоцистеина, встречаются также и нарушения в генах факторов коагуляции и рецепторов тромбоцитов. Следует отметить, что в данной группе клиническая картина течения заболевания была особенно тяжелой. По-видимому, помимо прямого влияния гипергомоцистеинемии на коагуляцию-фибринолиз, следует учитывать также и то, что у пациентов с изученными болезнями часто встречаются и нарушения факторов тромбообразования.

При гипергомоцистеинемии не следует ограничиваться только монотерапией этого состояния. На примере фолатного цикла можно увидеть механизм запуска дестабилизации генома. Фолатный цикл является сложным каскадным процессом. В нем задействовано большое количество ферментов, для успешной работы которых необходимо наличие фолиевой кислоты в достаточном количестве и витаминов группы В. В этом цикле происходит перенос метильных групп, осуществляется метаболизм общего гомоцистеина, избыток которого превращается в незаменимую аминокислоту метионин.

В свою очередь, метионин превращается в S-аденозилметионин, который является в клетке основным донором метильных групп, необходимых для синтеза и метилирования ДНК, РНК, белков и фосфолипидов. Дефицит фолиевой кислоты и витаминов группы В, связанный с особенностями диеты, а также мутации в генах фолатного обмена, обуславливающие снижение активности ферментов, приводят к избыточному накоплению общего гомоцистеина в крови и, как следствие, нарушению процессов метилирования в клетках.

Поступающие в организм химические вещества, как известно, преобразуются в циклах, которые содержат определенное количество ступеней превращения. Каждая ступень превращения продукта требует участия определенного фермента, с помощью которого образуется новый продукт. Для нормального биосинтеза белка, таким образом, требуется, чтобы гены, которые кодируют ферменты, не имели мутаций, а кофакторы поступали в организм в достаточном количестве и адекватно усваивались. В противном случае, нарушение работы фолатного цикла сказывается на жизнедеятельности клетки, органа, организма и популяции.

В последние три десятилетия нарушение фолатного цикла широко обсуждается как возможная причина манифестации распространенных заболеваний, о чем свидетельствует более тысячи статей, опубликованных в мировой печати, по проблеме нарушения обмена метионина и о полиморфных генах фолатного цикла. Установлено, что метилирование ДНК определяет взаимодействие ДНК и белков, распознающих модифицированные основания, регулирует генную экспрессию через механизм компактизации-декомпактизации хроматина, являясь основным модификатором генома. Гипометилирование может приводить к нестабильности хромосом, потере защиты от вредных рецессивных мутаций и, возможно, к глобальному снижению активности генома, что сказывается на клинической манифестации наблюдаемых больных.

Пациентам, которые наблюдаются терапевтами, неврологами по поводу сердечно-сосудистых заболеваний, необходимо проводить неврологическое, нейропсихологическое исследования, мониторинг коагулографических показателей, изучать у них внутрисосудистую функциональную активность тромбоцитов в крови. Выполнение всех перечисленных диагностических тестов позволяет улучшить диагностику, первичную и вторичную профилактику патологических состояний, в частности осуществлять адекватный подбор антикоагулянтных, антиагрегантных, витаминсодержащих лекарственных средств у больных с генетически обусловленной метаболической тромбофилией.

Литература

1. Тиц Н. У. Клиническая оценка лабораторных тестов. М.: Медицина, 1986. С. 41–57.
2. McKay D. L., Perrone G., Rasmussen H. et al. Multivitamin/Mineral Supplementation Improves Plasma B-Vitamin Status and Homocysteine Concentration in Healthy Older Adults Consuming a Folate-Fortified Diet // J. Nutrition. 2000. Vol. 130. P. 3090–3096.
3. Bostantjopoulou S., Katsarou Z., Frangia T. et al. Endothelial function markers in parkinsonian patients with hyperhomocysteinemia // J. clin. Neurosci. 2005. Vol. 12. № 6. P. 669–672.
4. Фетисова И. Н., Добролюбов А. С., Липин М. А., Поляков А. В. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека // Вестн. новых мед. технологий. 2007. Т. X. № 1.
5. Zhloba A. A., Blashko E. L. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2004. Vol. 800. № 1–2. P. 275–280.
6. Sachdev P. S., Brodaty H., Valenzuela M. J. et al. Progression of cognitive impairment in stroke patients // Neurology. 2004. Vol. 63. P. 1618–1623.

V. V. Nikitina ^{1,2}, E. R. Barantsevich ¹, A. A. Zhloba ²

¹ I. P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg

² Research Center of I. P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg

Gene polymorphism of coagulation, anticoagulation and pathogenetically similar systems to identify their role in the pathogenesis of vascular diseases in patients with hyperhomocysteinemia

In our work the results of the research of metabolic thrombophilia at patients with a thrombosis of arteries and veins is presented. The importance of genes polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase, receptors of thrombocyte glycoprotein receptors, in a gene of inhibitors the activator of plasminogen I type, a gene of V factor (Leiden) in development of ischemic disorders in patients with vascular diseases was revealed. The necessity of neurologic, neuropsychological investigation, determining of level of the general homocysteine in plasma of blood, molecular-genetic investigations of a hemostasis system at patients till 60 years old with a thrombosis of arteries and veins was established.

Key words: *metabolic thrombophilia, vascular diseases, thrombosis of arteries and veins*