

ISSN 0202-0207



ПРОБЛЕМЫ БЕРЕМЕННОСТИ

Научно-Практический журнал

7'2003

В.И. КУЛАКОВ¹, А.В. МУРАШКО¹, Л.З. ФАЙЗУЛЛИН¹, И.А. ШИЛОВ², Т.Н. ЦВЕТКОВА²,
А.С. КАРГИНА², М.В. РАЗУМИХИН², О.В. ВАНЮШЕВА²

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ У БЕРЕМЕННЫХ: ВОЗМОЖНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ?

¹Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН
(директор — академик РАМН, профессор В.И. Кулаков), Москва, Россия
²НПФ "АТГ-Биотех", Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Метилентетрагидрофолатредуктаза (МТНФР) является ключевым ферментом, регулирующим метаболизм промежуточного продукта цикла образования цистеина из метионина — гомоцистеина, оказывающего выраженное повреждающее действие на эндотелий сосудов.

Цель: определить частоту мутации С677Т МТНФР у беременных с варикозным расширением вен.

Материалы и методы: в исследование вошли 38 беременных, страдающих варикозным расширением вен, составивших исследуемую (I) группу, и 24 беременные без признаков варикозного расширения вен — контрольная (II) группа. Средний возраст пациенток I группы составил $31,5 \pm 2,3$ года, во II группе — $30,4 \pm 1,7$ лет. Повторнородящих в I группе было 58%, во II группе — 50%.

Выявление мутаций геномной ДНК, полученной из крови беременных, проводили путем прямого определения нуклеотидной последовательности в области исследуемой мутации, предварительно амплифицированных методом полимеразной цепной реакции.

Результаты: Гетерозиготными по данной мутации в I группе были 63,2% пациенток, в контрольной — 26,9% женщин. Гомозиготных пациенток, имевших мутацию С677Т, в I группе было 5,3%, тогда как в контрольной группе таких пациенток не выявили.

Выводы: такой высокий процент беременных с варикозным расширением вен, имеющих мутацию МТНФР, позволяет предположить ее роль в развитии данного заболевания, возможно, за счет повышения концентраций гомоцистеина, вызывающего дисфункцию эндотелия, сопровождающуюся изменением сосудистой реактивности, активацией каскада внутрисосудистого свертывания, нарушением целостности сосуда.

Известно, что беременность является провоцирующим фактором в развитии хронической венозной недостаточности. Предложено несколько патогенетических механизмов, объясняющих эту взаимосвязь: сдавление беременной маткой нижней полой вены и подвздошных вен, увеличение объема крови во время беременности, изменение реологии крови, воздействие гормональных факторов, недостаточность венозных клапанов [1, 2, 3]. Однако до конца не ясно, почему эти факторы оказывают свое негативное действие не на всех, а лишь на некоторых беременных. С открытием взаимосвязи между повышенными концентрациями гомоцистеина и различными заболеваниями сердечно-сосудистой системы появился интерес к ферментам, участвующим в обмене гомоцистеина, и взаимосвязи их активности с такими патологиями сосудистой системы во время беременности, как тромботические осложнения, гестоз, отслойка плаценты и некоторыми другими [4, 6, 7, 10].

Необходимо отметить, что гомоцистеин — это продукт превращения метионина, одной из восьми незаменимых аминокислот. Из гомоцистеина в дальнейшем может образовываться другая аминокислота — цистеин, не входящая в число незаменимых аминокислот. Накапливающийся в организме гомоцистеин может превращаться обратно в

метионин. Кофакторами ферментов метаболизма метионина в организме выступают витамины, самыми важными из которых являются фолиевая кислота, пиридоксин (витамин В₆), цианокобаламин (витамин В₁₂) и рибофлавин (витамин В₁) [5].

Для превращения избытка гомоцистеина в метионин нужны высокие концентрации активной формы фолиевой кислоты (5-метилтетрагидрофолата). Основным ферментом, обеспечивающим превращение фолиевой кислоты в ее активную форму, является 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза (МТГФР). Снижение активности этого фермента — одна из важных причин накопления гомоцистеина в организме.

Гипергомоцистеинемия может протекать как в тяжелой, так и в легкой форме. Тяжелая форма гипергомоцистеинемии (гомоцистеинурия) обычно вызывается наследственным дефицитом цистатион-бета-синтазы, 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР), метионин-синтазы с аутосомно-рецессивным типом наследования, вследствие аберрации генов, кодирующих эти ферменты метаболизма гомоцистеина. Пациенты, гомозиготные по дефициту цистатион-бета-синтазы или МТГФР, имеют крайне высокий риск сосудистых заболеваний. У 50% пациентов с дефицитом цистатион-бета-синтазы симптомы артериального или венозно-

Перенесенные заболевания

Заболевание	Исследуемая группа	Группа сравнения
Ангина	58%	50%
в/оспа	42%	38%
ОРВИ	34%	29%
Грипп	26%	25%
Корь	26%	25%
Паротит	26%	25%
Гайморит	26%	0%
Миопия	18%	17%
Бронхит	18%	4%
Герпес	8%	8%
Аппендицит	8%	8%
Пневмония	8%	8%
Отит	8%	0%
Холестит	8%	0%
МКБ	8%	0%
ВСД	8%	4%
Незаращение межпредсердной перегородки	8%	0%

го поражения развиваются в возрасте до 30 лет [13]. Легкая форма гипергомоцистеинемии относится не только к факторам риска венозных или артериальных заболеваний [5, 16], но и акушерских осложнений, таких как: дефекты нервной трубки у плода [12], привычное невынашивание [19], патология сосудов плаценты [7] и гестоз [4].

Учитывая вышесказанное, нами было предпринято исследование частоты мутации МТГФР у беременных, страдающих хронической венозной недостаточностью.

Материал исследования

В исследование были включены 38 беременных, страдающих варикозным расширением вен, составивших исследуемую (I) группу, и 24 беременных без признаков варикозного расширения вен, с нормально протекающей беременностью (группа сравнения (II)). Средний возраст пациенток I группы составил $31,5 \pm 2,3$ года, во II группе — $30,4 \pm 1,7$ лет.

В исследуемой группе все женщины страдали варикозным расширением вен (C₃ класс по классификации CEAP).

Основными перенесенными заболеваниями в обеих группах были инфекционные заболевания (ангина, ветряная оспа, ОРВИ, грипп, корь, паротит), инфекционно-воспалительные заболевания дыхательных путей (гайморит, бронхит, пневмония), реже встречались отит, холецистит, мочекаменная болезнь (МКБ), вегетососудистая дистония (ВСД) по гипотоническому типу, а также у двух женщин I группы врожденные пороки развития (незаращение межпредсердной перегородки и наличие неполной внутриматочной перегородки), герпес, цитомегаловирусная инфекция, миопия. Процентное соотношение приведено в табл. 1.

Из гинекологических заболеваний в анамнезе 17% пациенток исследуемой и 17% женщин группы сравнения имели эрозию шейки матки и воспалительные заболевания придатков, порок развития матки (неполная внутриматочная перегородка) встретился только в исследуемой группе в 8% случаев, эндометриоз и миома матки в обеих группах — в 8%.

Первородящих женщин было 58% в I группе и 50% — во II, первобеременных — 18% и 21% соответственно. Более двух беременностей имели 34% женщин I группы и 29% — II, более 2-х родов было у 8% и 4% женщин I и II групп соответственно. Течение беременности осложнилось у пациенток I и II групп: ранним токсикозом у 25% и 20% женщин, угрозой прерывания — 18% и 17%, гестозом — у 18% и 0%, гиперандрогения и носительство вирусной инфекции — по 8% соответственно. Отеки от-

мечались у 42% пациенток I и у 13% беременных II группы.

42% женщин в обеих группах были родоразрешены путем операции кесарева сечения по акушерским показаниям (рубец на матке после кесарева сечения, острая гипоксия плода, анатомически узкий таз и др.). В I группе родилось 36 живых доношенных (одни роды двойней) и 3 живых недоношенных ребенка с оценкой по шкале Апгар 7—9 баллов. Во II группе родилось 24 живых доношенных ребенка с оценкой по шкале Апгар 7—9 баллов.

Средняя кровопотеря в родах составила 238 ± 48 мл и 222 ± 51 мл, во время кесарева сечения — 633 ± 58 мл и 627 ± 36 мл в I и во II группах соответственно.

В I группе средняя масса доношенных и недоношенных новорожденных составила $3102 \pm 258,1$ г и $2035,5 \pm 194,5$ г соответственно, а рост — $49,9 \pm 1,2$ см и $45,0 \pm 4,0$ см. Во II группе все новорожденные были доношенными и их средняя масса составила $3203,2 \pm 232,1$ г.

Состояние всех детей обеих групп после родов удовлетворительное. У одного ребенка исследуемой группы (3%) выявлена аплазия почки.

Послеродовой период протекал без осложнений в обеих группах и составил $6,7 \pm 0,4$ дня и $6,2 \pm 0,7$ дней в I и во II группах соответственно.

Методы исследования

Кровь для исследования забирали у беременных обеих групп в III триместре.

В дальнейшем проводили наблюдение за пациентками и отслеживали акушерские и перинатальные исходы у этих женщин.

Для выявления мутации С677Т в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) геномную ДНК из образцов крови выделяли по стандартной методике с использованием протеиназы К с последующей фенольной экстракцией и осаждением этанолом. Выявление мутации проводили методом полимеразной цепной реакции с помощью флуоресцентно-меченых аллель-специфических праймеров: 5'-JOE-GAGAAGGTGTCTGCGGGCGC-3' (соответствует нормальному аллелю), 5'-JOE-GAGCTGGATCGTCTGA GAAGGTGTCTGCGGGCGT-3' (соответствует мутантному аллелю) и общего обратного праймера 5'-AAG ATC CCG GGG ACG ATG G-3'. ПЦР проводили в 30 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ хлорида калия, 1,5 мМ хлорида магния, 10 мМ Tris-HCl pH 8,5, 250 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, по 20 пмоль каждого праймера и 0,5 ед. *Taq* ДНК-полимеразы. Для амплификации использовался термоциклер "GeneAmp PCR System 2400" фирмы "Perkin-Elmer" (США). Условия ПЦР были следующими: 30 циклов: 94°C — 30 сек, 60°C — 30 сек, 72°C — 1 мин.

Флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК анализировали на приборе для капиллярного электрофореза производства НПФ "АТГ-Биотех". Проводили выборочную проверку результатов анализов мутаций методом прямого секвенирования предварительно амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих область с предполагаемой мутацией.

Результаты и обсуждения

Варикозное расширение вен впервые во время данной беременности было выявлено у 45% беременных исследуемой группы, у 39% женщин впервые варикоз развился во время предыдущей беременности, у остальных — вне беременности. 76% женщин I группы имели наследственную предрасположенность к развитию варикозной болезни, тогда как в контрольной группе лишь 17% беременных имели пробандов с варикозной болезнью. У женщин, страдавших варикозной болезнью до беременности, течение заболевания ухудшилось во время данной беременности, что проявилось в отеках, усилении тянущих болей к III триместру беременности, судорогах и парестезиях, увеличении количества и диаметра варикозно расширенных вен.

Гемостазиограммы пациенток обеих групп представлены в табл. 2 и 3.

Из таблиц 2 и 3 видно несколько более выраженное повышение коагуляционного потенциала в исследуемой группе, особенно в послеродовом периоде (более высокие цифры фибриногена, ИТП, особенно в послеродовом периоде), по сравнению

Таблица 2

Гемостазиограмма пациенток исследуемой группы

Исследуемая группа	Фибриноген (г/л)	АЧТВ (сек)	ПИ (%)	ИТП (у.е)	Агрегация тромбоцитов (10 ³ /л)
До родов	5,0 ± 0,3	35,7 ± 1,9	103,6 ± 3,6	13,0 ± 1,4	32,1 ± 2,9
2-е сут после родов	5,1 ± 2,3	35,3 ± 9,2	99,0 ± 3,9	42,0 ± 5,6	36,4 ± 8,6
5-6 сут после родов	7,1 ± 1,4	24,2 ± 7,4	109,5 ± 2,3	33,7 ± 7,8	32,2 ± 5,3

Таблица 3

Гемостазиограмма пациенток контрольной группы

Исследуемая группа	Фибриноген (г/л)	АЧТВ (сек)	ПИ (%)	ИТП (у.е)	Агрегация тромбоцитов (10 ³ /л)
До родов	5,0 ± 1,2	33,2 ± 2,2	101,1 ± 3,8	20,0 ± 5,7	36,1 ± 3,1
2-е сут после родов	4,9 ± 2,6	34,3 ± 1,9	99,3 ± 4,1	19,0 ± 4,2	34,3 ± 5,6
5-6 сут после родов	4,0 ± 1,7	33,3 ± 2,1	102 ± 3,7	17,0 ± 3,1	33,2 ± 4,5

со II группой. Однако эти различия не достигли статистической достоверности.

При исследовании генетического материала выявлено, что гетерозиготными по данной мутации в I группе были 63,2% пациенток, в контрольной — 26,9% женщин. Гомозиготных пациенток, имеющих мутацию С677Т, в I группе было 5,3%, тогда как в контрольной группе таких пациенток не выявили (рис. 1).

В работе [15] так же, как и в данном исследовании, выявилось превалирование мутации МТНФР 677СRT у пациентов, страдающих варикозной болезнью нижних конечностей.

Нами выявлено отсутствие гомозиготной мутации у женщин группы сравнения и невысокая час-



Рис. 1. Наличие мутации в исследуемой группе и контрольной группе

тота ее встречаемости у беременных, страдающих хронической венозной недостаточностью. Суммарное количество несущих мутацию гетеро- и гомозигот в группе с варикозом почти в 3 раза превышало их количество в группе сравнения, без хронической венозной недостаточности (ХВН) (статистически не достоверно). В этой же группе 76% женщин имели близких родственников, страдающих варикозом.

Известен факт, что в Африке хроническая венозная недостаточность встречается гораздо реже, чем в странах Западной Европы, что склонны были объяснять более подвижным уровнем жизни в менее промышленно развитых африканских странах.

В популяционном исследовании [14], выполненном в ЮАР, выявили, что мутация MTHFR 677C/T встречается в белой популяции у 36%, а в негроидной популяции — у 4% населения. Гомозиготные носители данной мутации в "черной" популяции не обнаружены, в "белой" — в 10,5%. Основываясь на этом, авторы делают вывод о том, что различия в частоте встречаемости заболевания сердечно-сосудистой системы различных этнических групп (фактором риска которых считается данная мутация) могут быть обусловлены этими генетическими различиями.

В исследовании [8], проведенном на средиземноморской популяции Испании, была выявлена крайне высокая частота встречаемости мутантных аллелей: 52,2% у гетерозигот и 15,8% у гомозигот. Сами авторы отмечают, что ни в одной другой европейской стране не было выявлено такой высокой частоты встречаемости этой мутации у здорового населения.

Считают, что мутация C677T гена MTHFR является причиной легкой гипергомоцистеинемии среди пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [17]. Эта мутация заключается в замене цитозина на тимин в позиции 677, при которой гомозиготный мутантный ген (ТТ генотип) вырабатывает термолабильный белок MTHFR с пониженной ферментативной активностью, сопровождающейся повышенными концентрациями гомотеина в плазме крови [6]. Также была выявлена [9]

достоверная связь между повышенными концентрациями гомотеина в плазме у лиц с ТТ генотипом и концентрациями фолатов на нижней границе нормы. У лиц с ТТ генотипом с более высокими концентрациями фолатов (в пределах нормальных значений) эта связь была менее выражена [9]. По данным других исследователей средние концентрации фолатов у лиц с ТТ генотипом были достоверно ниже, чем у лиц с другими генотипами (гетерозиготами (СТ), и гомозиготами — диким типом (СС)) [11,18]. Эти результаты предполагают, что лица с генотипом ТТ и, в меньшей степени, СТ имеют генетически predetermined более высокую потребность в фолатах [11,18] и соответственно более высокие концентрации гомотеина, а также повышенный риск развития пораженной сосудистой системы.

Таким образом, беременные, гетерозиготные или гомозиготные по мутации C677T, вероятно, имеют более высокую потребность в фолатах. Поскольку беременность — состояние, связанное с повышенным расходом фолатов, у пациентов, несущих мутацию, наблюдается "сложение" этих факторов и в результате — дефицит фолатов. Дефицит фолатов приводит к повышению концентрации гомотеина, вызывающего дисфункцию эндотелия, сопровождающуюся изменением сосудистой реактивности, активацией каскада внутрисосудистого свертывания, нарушением целостности сосуда и поражению сосудистой системы в целом и венозной в частности у данного контингента беременных.

Возможно, этим объясняется частичный или даже полный регресс симптомов ХВН по завершении беременности, когда нормализуется (снижается) потребность в фолатах и, таким образом, значительно уменьшается их дефицит.

Необходимо проведение дополнительных популяционных исследований, чтобы дать окончательный ответ о связи хронической венозной недостаточности и C677T-мутации в гене MTHFR, а также подтверждения или опровержения нашего предположения.

SUMMARY

V.I. Kulakov, A.V. Mourachko, L.S. Faisullin, I.A. Shylov, A.V. Demchinskaya, A.S. Kariagina, O.V. Vanjusheva

GENETICAL PREDISPOSITION FOR VARICOSE VEINS IN PREGNANT WOMEN: POSSIBLE EVIDENCE?

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme regulating metabolism of intermediate product of methionin-cystein cycle — homocystein, which is known to destroy vessel endothelium.

Aim: to evaluate C677T MTHFR mutation rate in pregnant patients with varicose veins.

Material and methods: I group consisted of 38 pregnant patients with varicose veins, the II one included 24 pregnant with normal pregnancy without varicose veins. Mean age was $31,5 \pm 2,3$ years and $30,4 \pm 1,7$ years in the I and the II groups, accordingly. Multipara women were 58% and 50% in the I and the II groups, accordingly.

Genomic DNA was detected by direct assess of nucleotide sequence in studying mutation region previously amplified by polymerize cyclic reaction.

Results: Heterozygous patients were 63,2% and 26,9% in the I and the II groups, accordingly. Homozygous patients were seen only in the studying group in 5,3%.

Conclusion: The higher rate of C677T MTHFR mutation in pregnant patients with varicose veins compared with control ones allows to propose a role of that mutation in development of varicose veins. Possible mechanism of action could be explained by increase of blood homocystein levels in such patients leading to endothelial dysfunction, which results in change of vessel reactivity, activation of clotting and destroying of vessel's integrity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кириенко А.И., Богачев В.Ю., Золотухин И.А. Хроническая венозная недостаточность с точки зрения врача общей практики // Русский мед. журнал, 1998. — Том 6. — №8 (68). — С. 516—522.
2. Кулаков В.И. Заболевания венозной системы нижних конечностей у беременных, рожениц и родильниц. // Автореф. ... дис. докт. мед. наук. — 1976. — 30 с.
3. Макаров О.В., Озолина Л.А. "Венозные тромбозы в акушерстве и гинекологии". — М., 1998. — 261 с.
4. Dekker GA, De Vries JJ, Doelitzsch PM, Huijgens PC, Von Blomburg BM, Jakots C, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia // *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1042—8.
5. Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis // *N Engl J Med* 1996;334:759—62.
6. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase // *Nat Genet* 1995;10:111—3.
7. Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;66:23—9.
8. Guillen M, Corella D, Portoles, Gonzalez JJ, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors // *Eur J Epidemiol* 2001;17(3): 255—61.
9. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations // *Circulation* 1996;93:7—9.
10. Kluijtmans LA, Van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, Van Oost A, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease // *Am J Hum Genet* 1996;58:35—41.
11. Malinow MR, Nieto FJ, Kruger WD, Duell PB, Hess DL, Gluckman RA, et al. The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1157—62.
12. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects // *Lancet* 1995;345:149—51.
13. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease* // New York: McGraw-Hill; 1995. p. 1279—327.
14. Scholtz CL, Odendaal HJ, Thiart R, Loubser L, Hillermann R, Delport R, Vermaak WJ, Kotze MJ. Analysis of two mutations in the MTHFR gene associated with mild hyperhomocysteinemia—heterogeneous distribution in the South African population // *S Afr Med J* 2002 Jun;92(6):464—7.
15. Sverdlova AM, Bubnova NA, Baranovskaya SS, Vasina VI, Avitishjan AO, Schwartz EI. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation in patients with varicose veins of lower limbs // *Mol Genet Metab* 1998 Jan;63(1):35—6.
16. Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. Plasma homocysteine and cardio-vascular disease. In: *Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis and endothelial function*. Editor: Francis RB, New York: Marcel Dekker; 1992, p. 183—36.
17. Van der Molen E.F., Arends G.E., Nelen WLDM, van der Put NJM, Heil SG, Eskes TK, Blom HJ A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy // *American Journal of Obstetrics and Gynecology Volume 182 — Number 5—May 2000*.
18. Van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels JM, Eskes TK, Van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida // *Lancet* 1995; 346:1070—1.
19. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss // *Fertil Steril* 1993; 60:120—5.