

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ
ПАТОЛОГИЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА**

Турсунова М.У., Рахматуллаева Г.К.

Университет Альфрагануса

Аннотация: Актуальность исследований нарушения гемостаза в контексте изучения патогенетических механизмов сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) (ишемической болезни сердца, атеросклероза, гипертонической болезни) и расчёта риска развития осложнений, связанных с инвалидизацией и смертностью, неоспорима. Од- 10 нако существует ряд проблем. С одной стороны, литературные данные подтверждают факт нарушения гемостаза при ССЗ. С другой стороны, нарушения гемостаза носят патогенетически сложный характер и затрагивают несколько звеньев гемостаза, тем самым отражая трудности проведения индивидуальной диагностики и лечения [1]. Известно, что любые события, связанные с замедлением тока крови в венах, увеличивают риск возникновения тромбов. Механизм тромбообразования заключается в гиперактивации тромбоцитов. Данные ряда работ свидетельствуют о повышенной чувствительности тромбоцитов больных с ССЗ к различным индукторам агрегации, включая АДФ, тромбин и коллаген.

Ключевые слова: гемостаз, полиморфизмы генов

Цель: оценить особенности распространенности и вклад полиморфных вариантов в TNF- α genes (rs1800629) при формировании иммунной тромбоцитопении (ИТП) и GP IIb (T2622G) при развитии дезагрегационной тромбоцитопатии (ДТП).

Материалы и методы: в исследование были включены 89 пациентов с ИТП и 71 пациент с дезагрегационной тромбоцитопатией (медиана возраста - $41 \pm 1,7$). Для сравнения группы контролем служили 48 внешне здоровых доноров без патологии системы гемостаза (медиана возраста - $42 \pm 1,4$). Обнаружение TNF- α (rs1800629) и GP IIb (T2622G) полиморфизмы генов были выполнены с помощью SNP-PCR.

Результаты: носительство гетерозиготного G / A генотипа rs1800629 полиморфизм TNF- α ген, связанный с высоким риском развития ИТП, тогда как гомозиготный G / G генотип действует как защитный генотип в патогенезе ИТП. В то же время гетерозиготный T / G генотип этого T2622G полиморфизм GP IIb ген в основной группе и подгруппе наследственной дезагрегационной тромбоцитопатии (НДТП) статистически значимо не связаны с развитием заболевания.

Выводы: результаты молекулярно-генетических исследований могут быть использованы клиницистами при скрининге и прогнозировании ИТП и НДТП.

Ключевые слова: полиморфизм гена, rs1800629 TNF- α , GP IIb (T2622G), иммунная тромбоцитопения (ИТП), дезагрегационная тромбоцитопатия (ДТП), аллель, генотип, патогенез.

1. ВСТУПЛЕНИЕ

Возрастающий интерес современных исследователей связан с изучением механизмов формирования патологий тромбоцитарного звена гемостаза, таких как иммунная тромбоцитопения ИТП - первичное снижение количества тромбоцитов (до $100 \times 10^9/l$ и ниже) и дезагрегационная тромбоцитопатия (RTP - снижение агрегационной функции тромбоцитов), которые объединены общим для этих заболеваний - геморрагическим синдромом, характеризующимся повышенным риском кровотечения [1,3,9,11].

Исследования, проведенные на сегодняшний день для изучения этих патологий, расширили понимание многих аспектов их развития. Однако многие механизмы их образования до сих пор малоизвестны.

В последние годы растущий интерес как отечественных, так и зарубежных учёных с целью раскрытия неясных аспектов патогенетических механизмов ИТП и дезагрегационной тромбоцитопатии проявляется в изучении роли генетических полиморфизмов в патогенезе этих заболеваний. Сегодня, согласно современным литературным данным, известно, что генетические факторы играют важную роль в генезе TP и DTP [5,6,7,10].

Сегодня известно, что большое количество генов вовлечено в дифференцировку тромбоцитов, мутации в одном из этих генов потенциально могут привести к тромбоцитопении и тромбоцитопатии из-за снижения образования, сокращения продолжительности жизни и нарушения функции тромбоцитов [5,6,7].

В последние годы в развитии этих патологий зарубежные исследователи все чаще подчёркивают значительную роль таких генетических полиморфизмов, как фактор некроза опухоли (TNF α) и тромбоцитарный гликопротеин (GP IIb).

В то же время имеющиеся данные по изучению взаимосвязи TNF α с формированием ИТП, а также GP IIb с развитием ДТП, приводят к неоднозначным выводам [1,2,4,8,12]. В этой связи необходимы дополнительные исследования для изучения вклада rs1800629 полиморфизм TNF- α ген к риску развития ИТП и GP IIb (T2622G) в развитии ДТП представляется интересным и необходимым.

2. Цель исследования: оценить особенности распространённости и вклад полиморфных вариантов генов TNF- α (rs1800629) в формирование иммунной

тромбоцитопении (ИТП) и GP IIb (T2622G) в развитие дизагрегативной тромбоцитопатии (ДТП).

3. ДАННЫЕ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ: В исследование были включены 89 пациентов с ИТП (средний возраст - $41 \pm 1,7$) и 71 пациент с ДТП (средний возраст - $31,4 \pm 1,18$), находившихся на амбулаторном и стационарном лечении в Республиканском Специализированном Научно-практическом Медицинском Центре Гематологии (РСНМЦГ) в период с 2016 по 2018 год. Все испытуемые были разделены на 2 группы: 1-ю основную и 2-ю группу сравнительного контроля (условно здоровые доноры). Каждая из основных групп подразделена на две подгруппы: для пациентов с ИТП ("А" - 49 пациентов с ИТП с геморрагическими проявлениями и "В" - 40 пациентов с ИТП без геморрагических проявлений); для пациентов с ДТП (НДТП - 39 пациентов с наследственной формой дисагрегационной тромбоцитопатии и ПДТП - 32 пациента с приобретённой формой дисагрегационной тромбоцитопатии). Диагноз ИТП и ДТП был верифицирован на основании рекомендаций международных экспертов (2009) [6].

В качестве сравнительного контроля были использованы условно здоровые доноры без патологии системы гемостаза (медиана возраста - $42,0 \pm 1,4$).

Детекцию полиморфизмов генов TNF- α (rs1800629) и GP IIb (T2622G) проводили методом SNP-ПЦР на программируемом термоциклере фирмы Applied Bio systems 2720 (США) с использованием тест-систем компании "Litekh" (Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Математический анализ результатов проводился с использованием статистического программного пакета "Open Epi, версия 9.3".

4. АНАЛИЗ ДАННЫХ.

Наблюдаемая частота (Hobs) генотипов изучаемых полиморфизмов, выявленных в ходе исследования в общей группе пациентов с ИТП и ДТП, а также в контрольной группе, соответствовала ожидаемому распределению (Hexp) согласно равновесию Харди-Вайнберга ($P > 0,05$).

5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Результаты распределения частот аллеля G полиморфизма rs 1800629 гена TNF- α в основной группе ИТП были следующими: в подгруппе "А" - 83,7%; в подгруппе "В" - 83,8%, а в контрольной группе этот показатель был несколько выше (92,3%). Частота аллели А исследуемого гена в основной группе составила в среднем 16,3%, а в контрольной группе этот показатель был значительно ниже (7,4%).

Эти результаты указывают на то, что в основной группе аллель G ($\chi^2 = 6,31$; $P = 0,012$; OR = 0,41; 95% CI = 0,20-0,84) встречается несколько реже, чем

в контрольной группе, в то время как аллель А, наоборот, чаще наблюдался в основной группе ($\chi^2 = 6,31$; $P = 0,012$; $OR = 2,43$; $95\% CI = 1,20-4,95$). Анализ распределения частот генотипов полиморфизма rs1800629 гена TNF- α показал, что гомозиготы по мутантному аллелю А/А были выявлены в основной группе (1,1%; $\chi^2 = 1,12$; $P = 0,29$), частота генотипов G/A (30,3% против 14,8%) превышала таковую в контрольной группе (14,8%), в то время как частота генотипа G/G в основной и контрольной группах составила 68,5% против 85,2% (табл. 1).

Таблица 1.

Частота распределения аллелей и генотипов полиморфизма генов TNF- (rs1800629) в контрольной группе и у пациентов с ИТП

Группы	n	Частота аллелей				Частота распределения генотипов					
		G		A		G/G		G/A		A/A	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ИТП основная группа	89	149	83.7	29	16.3	61	68.5	27	30.3	1	1.1
"А" - подгруппа	49	82	83.7	16	16.3	34	69.4	14	28.6	1	2.0
"В" - подгруппа	40	67	83.8	13	16.2	27	67.5	13	32.5	0	0
Контрольная группа	81	150	92.3	12	7.4	69	85.2	12	14.8	0	0

Согласно данным, приведённым в таблице 1., очевидно, что различия в частоте встречаемости аллеля А ($\chi^2 = 6,31$; $P = 0,012$; $OR = 2,43$; $95\% ДИ = 1,20-4,95$ соответственно) и генотипа G/A ($OR = 2,55$; $\chi^2 = 5,98$; $P = 0,014$; $95\% ДИ = 1,19-5,45$) полиморфизм rs 1800629 гена TNF- α между основной (ИТП) и контрольной группами статистически значим.

В подгруппах "А" и "В" анализ разницы в частоте аллеля А полиморфизма rs 1800629 гена TNF- α показал статистически значимое увеличение более чем в 2,44 раза ($\chi^2 = 5,05$; $P = 0,024$; $OR = 2,44$; $95\% CI = 1,10-5,40$) и в 2,43 раза ($\chi^2 = 4,52$; $P = 0,03$; $OR = 2,43$; $95\% CI = 1,05-5,59$) соответственно. Частота генотипа G/A (rs 1800629) гена TNF- α также статистически значимо увеличилась более чем в 2,37 ($OR = 2,37$; $\chi^2 = 3,86$; $P = 0,049$; $95\% CI = 0,99-5,67$) и 2,77 раза ($OR = 2,77$; $\chi^2 = 5,11$; $P = 0,02$; $95\% CI = 1,12-6,82$), соответственно, в подгруппах "А" и "В" пациентов с ИТП. Следовательно, риск развития ИТП при наличии данного полиморфизма исследуемого гена, в целом, статистически значимо повышался в 2,43 (А) и 2,55 (G> А) раза.

Исходя из вышеизложенного, очевидно, что на фоне значительного снижения носительства защитного гомозиготного генотипа G/G в основной группе у пациентов с заболеваниями ИТП наблюдается увеличение доли носителей гетерозиготного генотипа G/A примерно в 1,7 раза - до 25,3%, что, в свою очередь, указывает на наличие достоверной ассоциации между носительством гетерозиготного генотипа G/A полиморфизма rs 1800629 гена TNF- α с развитием ИТР.

Анализируя выраженность различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфизма гена GРIЬ (Т2622G) в основной группе ДТП, было обнаружено незначительное увеличение частоты аллеля G в 1,27 раза ($\chi^2 = 0,80$; P = 0,37; OR = 1,27; 95% CI: 0,75- 2,14), чем в контрольной группе.

Наряду с этим частота встречаемости гетерозигот по полиморфизму GРIЬ (Т2622G) в группе пациентов была менее чем в 1 раз ниже ($\chi^2 = 0.12$; P = 0.72; OR = 0.86; 95% CI: 0.38-1.98).

В то же время частота гомозиготного генотипа G/G превышала значения в контроле в 1,68 раза, но различия не достигали статистической значимости ($\chi^2 = 0.98$; P = 0.32; OR = 1.68; 95% CI: 0.60-4.73) (table 2).

Table 2.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма Т2622G гена GРIЬ в группах пациентов и контрольной группе

№	Группы	n	Частота аллелей				Частота распределения генотипов					
			Т		G		Т/Т		Т/G		G/G	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	Оснaвная группа	71	76	53,5	66	46,5	24	33,8	28	39,4	19	26,8
a	НДТП	39	38	48,7	40	51,3	11	28,2	16	41,0	12	30,8
b	ПДТП	32	38	59,4	26	40,6	13	40,6	12	37,5	7	21,9
2	Контрольная группа	48	57	59,4	39	40,6	17	35,4	23	47,9	8	16,7

Дальнейший анализ результатов показал, что в группе пациентов с НДТП доля аллеля G была зафиксирована меньше по отношению к контрольной группе (48,7% против 59,4%), в то время как доля аллеля Т была выше (51,3% против 40,6%).

У пациентов с ПДТП доля аллелей G (59,4% против 59,4%) и Т (40,6% против 40,6%) практически не отличалась от таковых в контроле.

Результаты изучения распределения генотипов позволили определить более низкую регистрацию гетерозиготного генотипа T/G, чем в контрольной группе, в 1,08 раза у пациентов с НДТП ($\chi^2 = 0,02$; $P = 0,89$; $OR = 1,08$; 95% CI: 0,40-2,90) и менее чем в 1 время у пациентов с ПДТП ($\chi^2 = 0,56$; $P = 0,45$; $OR = 0,68$; 95% CI: 0,25-1,86).

Более выраженное увеличение частоты мутантного генотипа G/G среди исследуемых групп пациентов с ДТП наблюдалось только у пациентов с НДТП, что оказалось в 2,32 раза выше, чем в контроле ($\chi^2 = 2,01$; $P = 0,16$; $OR = 2,32$; 95% CI: 0,72-7,49).

Несмотря на более высокую регистрацию частоты мутантного генотипа в группе пациентов с НДТП, разница была незначительной.

Таким образом, обобщая приведённые выше данные по изучению особенностей полиморфизма гена TNF- α (rs1800629) в контрольной группе и в группе пациентов с ИТП, можно сделать вывод, что существует статистически значимая высокая ассоциация между носительством неблагоприятного аллеля A и генотипом G/A у пациентов с ИТП. полиморфизм гена TNF- α (rs1800629) и развитие ИТР. В связи с этим носительство минорного аллеля A и неблагоприятного генотипа G/A полиморфизма гена TNF- α (rs1800629) можно рассматривать как прогностически неблагоприятный маркер, способствующий высокому риску развития ИТП среди лиц узбекской национальности.

Более того, полученные результаты исследования по изучению особенностей распределения частот аллелей и генотипов генетического полиморфизма GPIIb (T2622G) у пациентов с дорожно-транспортными происшествиями и условно здоровых лиц узбекской национальности показали отсутствие статистически значимой ассоциации неблагоприятного аллеля G ($\chi^2 = 1,80$; $P = 0,37$) и мутантный генотип G/G ($\chi^2 = 0,98$; $P = 0,32$) с повышенным риском наследственных и приобретенных форм дорожно-транспортных происшествий. В то же время тенденция к развитию заболевания была выявлена у пациентов с наследственной формой дисагрегационной тромбоцитопатии ($\chi^2 = 2,01$; $P = 0,16$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

1. Носительство минорного аллеля A и гетерозиготного генотипа G/A полиморфизма rs1800629 гена TNF- α ассоциировано с высоким риском развития ИТП, что позволяет клиницистам использовать эти результаты при скрининге и прогнозировании ИТП.

2. У пациентов с НДТП наблюдалась тенденция к увеличению доли генотипа G/G полиморфизма GPIIb (T2622G) по сравнению с контрольной выборкой ($\chi^2 = 2,01$; $P = 0,16$; $OR = 2,32$; 95% CI: 0,72-7,49), эти данные указывают на то, что данный генотипический вариант оказывает

предрасполагающее влияние на формирование нарушений регуляции агрегации и развитие НДТП у пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Annabel Maclachlan, Steve P. Watson at all, Inherited platelet disorders: Insight from platelet genomics using next-generation sequencing Platelets. 2017 Jan 2; 28(1): 14–19.
2. Ezzat D. A., Hammam A. A., El Malah W. M., Hussein S. A. DNA methyltransferase 3B gene promotor and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms in Egyptian children with immune thrombocytopenic purpura. *Egyptian journal of Haematology*. 2016 | Volume : 41 |Issue : 3| Page : 121-127.;
3. Fatma E.S., Ahmed K.S., Nihal E.K.S., Salwa H.Y. Cytokines and immunoglobulin derangement in egyptian children with primary immune thrombocytopenic purpura. *Egypt J Haematol [serial online]* 2018 [cited 2019 Oct 20]; 43:1-4. Available from: <http://www.ehj.eg.net/text.asp?2018/43/1/1/238541>;
4. Katalin Koltai, Gabor Kesmarky at all, Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications Int J Mol Sci. 2017 Aug; 18(8): 1803.
5. Kim J. IL-1B-31 and IL-1Ra polymorphisms associated with increased host susceptibility to immune thrombocytopenia/ *Blood Res* 2017;52:264-9. <https://doi.org/10.5045/br.2017.52.4.235>.
6. Kuhne T., Berchtold W., Michaels L.A., Wu R., Donato H., Espina B., Tamary H., Rodeghiero F., Chitlur M., Rischewski J. et al. Newly diagnosed immune thrombocytopenia in children and adults: a comparative prospective observational registry of the Intercontinental Cooperative Immune Thrombocytopenia Study Group. *Haematologica*. 2011;96(12):1831–7.
7. Li H., Zhou Z., Tai W., Feng W., Zhang D., Gu X. et al. Decreased frequency of IL-17F rs763780 site allele G is associated with genetic susceptibility to immune thrombocytopenia in a Chinese population. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017 Jul 30;23(5):466-471.
8. Lingjia Y, Chunmei Z, Liping Z, Yongyu S, Xuebin J. Biomarkers for immune thrombocytopenia. *Biomark Res*. 2015;3:19.
9. Vilela, Josie Fadul. Investigation of interleukin-1 (IL-1), IL1RN, IL-4, IL-6 and IL-10 gene polymorphism adult patients with immune thrombocytopenic purpura. 2012. 146 p.].
10. Yadav D. K., Tripathi A. K., Gupta D., Shukla S., Singh A. K., Kumar A., Agarwal J., Prasad K. N. Interleukin-1B (IL-1B-31 and IL-1B-511) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphisms in primary immune

thrombocytopenia. *Blood Res.* 2017 Dec; 52(4):264-269. English.

<https://doi.org/10.5045/br.2017.52.4.264>.

11. Zotova I. I. Klinicheskie i molekularno-geneticheskie pokazateli tyajesti techeniya i effektivnosti terapii u bolnykh immunnoy trombotsitopeniey. Avtoref. dis. S-Peterburg, 2018. S. 22.
12. Zotova I.I. Osobennosti allelnogo polimorfizma genov nekotorykh sitokinov u bolnykh khronicheskoy immunnoy trombotsitopeniey/ I.I. Zotova, S.I. Kapustin, Yu.S. Drijun, S.P. Svitina, A.A. Pavlova, I.Ye. Pavlova, S.S. Bessmelsev, A.V. Chechetkin, S.V.Gritsaev // *Vestnik gematologii.* – 2017. – T. 13, №3. – S.31.