

oxygenase (COX) inhibitors for treating preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*2005(2):CD001992.

15. Anotayanonth S, Subhedar NV, Garner P, Neilson JP, Harigopal S. Betamimetics for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*2004(4):CD004352.

16. The Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group. Effectiveness and safety of the oxytocin antagonist atosiban versus beta-adrenergic agonists in the treatment of preterm labour. The Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group. *Br J Obstet Gynaecol*2001;108:133-42.

17. French/Australian Atosiban Investigators Group. Treatment of preterm labour with the oxytocin antagonist atosiban: a double-blind, randomized, controlled comparison with salbutamol. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*2001;98:177-85.

18. Coomarasamy A, Knox EM, Gee H, Khan KS. Oxytocin antagonists for tocolysis in preterm labour—a systematic review. *Med Sci Monit*2002;8:RA268-73.

19. Major CA, Lewis DF, Harding JA, Porto MA, Garite TJ. Tocolysis with indomethacin increases the incidence of necrotizing enterocolitis in the low-birth-weight neonate. *Am J Obstet Gynecol*1994;170(1 Pt 1):102-6.

20. Norton ME, Merrill J, Cooper BA, Kuller JA, Clyman RI. Neonatal complications after the adminis-

tration of indomethacin for preterm labour. *N Engl J Med*1993;329:1602-7.

21. Papatsonis DN, Van Geijn HP, Ader HJ, Lange FM, Bleker OP, Dekker GA. Nifedipine and ritodrine in the management of preterm labour: a randomized multicenter trial. *Obstet Gynecol*1997;90:230-4.

22. Van Geijn HP, Lenglet JE, Bolte AC. Nifedipine trials: effectiveness and safety aspects. *Br J Obstet Gynaecol*2005;112(suppl 1):79-83.

23. Oei SG. Calcium channel blockers for tocolysis: a review of their role and safety following reports of serious adverse events. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*2006;126:137-45.

24. Simhan HN, Caritis SN. Prevention of preterm delivery. *N Engl J Med*2007;357:477-87.

25. Rosen LJ, Zucker D, Oppenheimer-Gazit V, Yagel S. The great tocolytic debate: some pitfalls in the study of safety. *Am J Obstet Gynecol*2001;184:1-7.

26. Venulet J, Bankowski Z. Harmonising adverse drug reaction terminology: the role of the Council for International Organizations of Medical Sciences. *Drug Saf*1998;19:165-72.

27. Meyboom RH, Hekster YA, Egberts AC, Gribnau FW, Edwards IR. Causal or casual? The role of causality assessment in pharmacovigilance. *Drug Saf* 1997;17:374-89.

© K. Boiciuc, D. Badicean, V. Scurtu, Ecaterina Plîngau², Natalia Uşurelu, Victoria Sacară¹

K. Boiciuc¹, D. Badicean¹, V. Scurtu¹, Ecaterina Plîngau², Natalia Uşurelu, Victoria Sacară¹
**TROMBOFILIA EREDITARĂ CA UNA DIN PRINCIPALELE CAUZE ALE PROBLEMELOR
REPRODUCTIVE LA FEMEILE DIN REPUBLICA MOLDOVA**

1-Institutul Mamei și Copilului, (director Ștefan Gațcan, dr. med., conf. cercet.)

2- Universitatea Academiei de Științe a Moldovei

SUMMARY

**HEREDITARY THROMBOPHILIA AS ONE OF THE MAIN CAUSES OF REPRODUCTIVE PROBLEMS
IN WOMEN FROM MOLDOVA**

Cuvintele Cheie: RPL, Trombofilie ereditara, Leiden, Protrombin, gena VKORC1

Miscarriage is considered one of the most common gestational complications and a major problem of contemporary society. Pregnancy losses have multiple causes, while thrombophilic complications have a higher percentage. In the last decade the research of hereditary thrombophilia associations with miscarriages has increased considerable and recently thrombophilia has been postulated as a cause of recurrent pregnancy loss (RPL). Research design was constructed as case-control type. The case group was represented by 274 patients with reproductive losses and control group by 68 patients with two or more births. The aim of this study was to identify genetic factors that lead to the formation of thrombosis (F2 G20210A, G1691A F5, VKORC1 C1173T and G1639A VKORC1), involved in fibrinolysis (PAI-1 4G / 5G), and their association with reproductive disorders. Odd ratio analysis revealed that mutation G1691A of F5 gene (Leiden mutation) (OR 6.86, 95%CI

0.90, 52.48, $p < 0.05$) and G20210A mutation of F2 gene (OR 2.18, 95%CI 0.26, 18.13, $p > 0.05$) were associated with two or more reproductive loss being a major risk factor for normal development of pregnancy. It was determined that the gene polymorphism of plasminogen activator inhibitor (PAI-1 4G/5G), which regulates fibrinolysis process does not influence the normal course of pregnancy. VKORC1 gene is responsible for the activation of vitamin K and therefore would indirectly influence blood homeostasis. Study of VKORC1 gene polymorphisms (C1173T, G1639A) revealed association of homozygous genotype (T1173T, OR 3.26, 95%CI 1.07, 9.91, $p > 0.05$) with increased risk of complications during pregnancy. Obtain results emphasize the necessity of hereditary thrombophilia molecular screening in women with RPL.

РЕЗЮМЕ

НАСЛЕДСТВЕННАЯ ТРОМБОФИЛИЯ, КАК ОДНА ИЗ ОСНОВНЫХ ПРИЧИН НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Ключевые слова: невынашивания беременности, тромбофилия, фибринолиз.

Актуальность. Невынашивание беременности является одним из самых распространенных осложнений гестационного периода и главной проблемой современного общества. Выкидыши имеют несколько причин, из которых значительная часть принадлежит тромбофилическим осложнениям. Научная деятельность последних 10 лет в области ассоциации тромбофилией с невынашиванием беременности у женщин заметно увеличилось, а недавно тромбофилия была постулирована как причина выкидышей (RPL). Данное исследование проведено по типу случай-контроль в которой участвовали 274 женщины, включенных в группу больных и 68 женщин из контрольной группы.

Цель изыскания заключалась в изучении молекулярно-генетических факторов, которые приводят к тромбообразованию (F2 G20210A, G1691A F5, VKORC1 C1173T и G1639A VKORC1); к нарушению фибринолиза (PAI-1 4G/5G), и их связь с репродуктивными расстройствами.

Результаты анализа Odd Ratio мутаций G1691A (Leiden) из гена F5 (OR 6.86, 95% CI 0,90, 52,48, $p < 0,05$) и G20210A (OR 2,18, 95% CI 0,26, 18,13, $p > 0,05$) из гена F2 показали ассоциацию с двумя или более выкидышами, будучи основным фактором риска для нормально протекающей беременности. Было установлено, что полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена (PAI-1 4G/5G) который регулирует фибринолиз не влияет на нормальный ход беременности. Ген VKORC1 имеет функцию активации витамина K и, следовательно, может косвенно влиять на гомеостаз крови. Анализ полиморфных вариантов C1173T и G1639A гена VKORC1 показал, что гомозиготный генотип по мутантный аллель T1173T ассоциирован с повышенным риском осложнений во время беременности (OR 3,26, 95% CI 1,07, 9,91, $p > 0,05$).

Выводы. Полученные результаты подчеркивают необходимость молекулярного скрининга факторов наследственной тромбофилии у женщин с повторными выкидышами.

Introducere:

Una dintre cele mai importante probleme ale obstetricii practice o reprezintă avortul spontan recurent. În prezent, în literatura mondială este acceptat termenul de „pierdere recurentă a sarcinii” (Recurrent Pregnancy Loss - RPL), care este definită ca pierderea consecutivă de două sau mai multe ori, a sarcinii, afectând 1% din cuplurile ce încercară să conceapă un copil [6, 7]. Fiziopatologia pierderilor de sarcină este complexă și prost înțeleasă. Pierderile recurente ale sarcinii au multiple cauze printre care se numără: cauze genetice, endocrine, imunologice, infecțioase, patologia uterului, trombofilia. Cu toate acestea, chiar și după investigații detaliate, mai mult de 80% din cazuri rămân inexplicabile [7]. În baza rezultatelor histologice ce au depistat infarct extins și necroze în placentele femeilor cu sindrom antifosfolipidic, s-a presupus că tromboza utero-placentară poate duce la infarct placentar, urmat de deces fetal [8, 4]. Prin urmare, în ultimii 10 ani, interesul studiilor de asociere a trombofiliei cu pierderile de sarcină a crescut remarcabil, iar recent trombofilia a fost postulată ca o cauză a RPL [9, 4].

Trombofilia, la rândul său, poate fi dobândită, ca în cazul sindromului fosfolipidic, sau ereditară și cauzată de: mutațiile Leiden a factorului V de coagulare, G20210A din gena F2, de polimorfismul PAI-1.

Unul dintre cei mai frecvenți factori trombofilici ereditari este mutația Leiden (OMIM 188055). Trombofilia ereditară cauzată de mutația Leiden este moștenită într-o manieră autosomal dominantă, iar expresivitatea este variabilă și influențată de mediu [10,11]. Mutația Leiden este o mutație de tip missense fiind localizată în gena F5 (localizarea pe cromozom – 1q24), și cauzată de substituția G cu A în poziția 1691 a genei care duce la formarea unei proteine rezistente la clivajul și inactivarea de către proteina-C activată [4, 10,11]. Alela mutantă a factorului Leiden poate cauza creșterea riscului de pierdere a sarcinii de două sau chiar trei ori și, eventual, de alte complicații ale sarcinii, cum ar fi preeclampsia, întârzierea creșterii fetale și desprinderea de placentă.

Un alt factor genetic care poate duce la manifestarea trombofiliei ereditare (OMIM 176930) este mutația G20210A din gena F2 (11p11.2) . Această codifică factorul II de coagulare sau protrombina

(EC 3.4.21.5), o glicoproteină dependentă de vitamina K sintetizată în ficat ca zimogen inactiv. Mutația *G20210A* din gena *F2* este cauzată de tranziția *G* cu *A* în poziția 20210 din regiunea 3' netranslată a genei. Aceasta la rândul său duce la creșterea valorilor protrombinei plasmatice și a riscului de tromboză venoasă [1,4,11]. Există ipoteza că nivelele crescute de protrombină ar putea afecta funcțiile placentei prin influențarea mecanismului pivotant, cum ar fi adeziunea celulară, proliferarea mușchiului neted și vasculogeneză [12].

Inhibitorul activatorului de plasminogen endotelial (*PAI-1*) este codificat de gena *SERPINE1* (17q22.1) care este un membru al familiei inhibitorilor de proteaze serinice, inhibă activatorul tisular al plasminogenului (PLAT) și activatorul de plasminogen urokinazic (PLAU). PLAT și PLAU activează proteolitic plasminogenul transformând-l în plasmînă, care descompune cheagurile de fibrină. Astfel, *PAI-1* reglează negativ fibrinoliza și împiedică dezvoltarea cheagurilor [13, 14]. Anterior s-a demonstrat că nivelele plasmatice ridicate de *PAI-1* (OMIM 173360) sunt legate de deleția/inserția a 1-pb de guanină (*4G/5G*) în promotorul genei *SERPINE1*. Alela *4G* este asociată cu o mai mare transcriere și activitate a *PAI-1* plasmatic. Deși ambele alele leagă un activator transcripțional, alela *5G* de asemenea leagă un represor la site-ul de legare suprapus. În absența represorului, alela *4G* induce creșterea nivelului de transcripție a proteinei *PAI-1* [11, 15, 16].

Vitamina K reprezintă un factor necesar pentru o bună funcționare a cascadei de coagulare, fiind în forma sa activă un cofactor endogen pentru un șir de factori de coagulare ca *F2*, *F7*, *F9*, *F10*. Gena *VKORC1* codifică vitamina K epoxid reductaza subunitatea 1 care joacă un rol important în activarea vitaminei K [11, 17]. Cercetările anterioare au arătat o interdependență între polimorfismele genei *VKORC1* și sensibilitatea sau rezistența la Warfarină utilizată în calitate de anticoagulant. Rieder și colab., în 2005, a observat legitatea: cantitatea de ARNm a genei *VKORC1* variază în funcție de haplotip, care este compus dintr-o anumită combinație de polimorfisme ale acestei gene. Astfel, mecanismul molecular al răspunsului față de doza de warfarină poate fi reglată la nivel transcripțional [18]. Mai târziu Limdi (2008) și colab. au stabilit că polimorfismele în gena *VKORC1*, *C1173T* (rs9934438) și *G1639A* (rs9923231), sunt cei mai buni predictorii ai dozei de warfarină [19]. La momentul actual apar articole care se referă la cercetarea polimorfismelor *C1173T* și *G1639A* ale genei *VKORC1* la pacienții cu boli cauzate de hipercoagularea sângelui [20, 21].

Prezentul studiu este de tip caz-control și are ca scop studierea molecular genetică a factorilor ce duc la formarea trombozelor (*F2 G20210A*, *F5 G1691A*, *VKORC1 C1173T* și *VKORC1 G1639A*), identificarea

genelor implicate în fibrinoliză (*PAI1 4G/5G*) și stabilirea asocierii lor cu dereglări reproductive (infertilitate feminină).

Materiale și metode:

Drept material al cercetării au servit 68 de mostre de ADN colectate de la femei cu două sau mai multe sarcini pozitive, care a reprezentat grupul control, și 273 de mostre de ADN făcând parte din grupul de cercetare, care la rândul său a fost divizat în 3 subgrupe:

1. Femei cu nici o sarcină pozitivă (infertilitate) – gr. 0
2. Femei cu o sarcină pierdută – gr. 1
3. Femei cu două sau mai multe pierderi reproductive – gr. 2

Grupurile de cercetare nu se deosebeau de cel de control fiind de o vârstă medie apropiată (tab.1) și făcând parte din aceeași populație.

Identificarea polimorfismelor care determină hipercoagularea sângelui (*FV G1691A*, *FII G20210A*, *PAI1 4G/5G*) și a polimorfismelor genei ce răspunde de activarea vitaminei K (*VKORC1 C1173T*, *G1639A*) a fost realizată prin metoda PCR, urmată de clivarea ADN amplificat cu o restricțază site-specifică (RFLP).

Tabelul 1.

Caracterizarea după vârstă a grupurilor cu pierderi reproductive și grupul control

	Vârsta medie
Femei cu nici o sarcină pozitivă (infertilitate), n=31	34,8±4,4
Femei cu o sarcină pierdută, n=46	32,1±5,1
Femei cu două sau mai multe pierderi reproductive, n=196	33,7±6,1
Grup control, n=68	33,1±5,7

Analiza PCR-RFLP

Reacția de polimerizare în lanț (PCR) s-a realizat cu amplificatorul Eppendorf MastercyclerPro. Amplificarea regiunilor specifice de ADN a fost efectuată într-un amestec de reacție cu volumul de 25μl care conținea: 0,2 mM de fiecare dNTP, 0,6-0,7 U DreamTaq DNA Polymerase, 0,5-1 μg de ADN matriță, 0,25 μM de fiecare primer (forward și reverse), 2,5μl de 10X DreamTaq™ Green Buffer (KCl, (NH₄)₂SO₄), 20 mM MgCl₂.

Restricția (RFLP) a fost executată într-un amestec de reacție care include 5-7 μl de amplificat, 5 U de restricțază (Thermo Scientific, SUA) și 1 μl soluție tampon. Electroforeza fragmentelor restricționate s-a efectuat în PAGE de 8% pentru o rezoluție de separare mai mare.

Mutația Leiden (*F5 G1691A*) este depistată prin amplificarea unui fragment de ADN de 229 pb din gena factorul 5 (*F5*) din cascada de coagulare cu utilizarea primerilor specifici elaborați (5'-gaaaatgatccagctgctt-3' și 5'-ttgaaggaatgccccatta-3') și urmată de

clivarea cu restricțaza *Mnl I*. În cazul alelei normale se obțin 3 fragmente cu mărimile 37 pb, 77 pb, 115 pb, iar în cazul prezenței mutației se pierde un site de restricție și se obțin doar 2 fragmente 77 pb și 152 pb. Pentru determinarea mutației în poziția G20210A din gena factorului 2 (*F2*) se amplifică 345 pb, utilizând primerii descriși în literatura de specialitate [1], apoi se restrictează cu enzima *Hind III*. În cazul prezenței mutației apare site-ul de restricție cu vizualizarea a două fragmente 345 pb și 330 pb. Polimorfismul 4G/5G al factorului *PAI-1* se identifică prin amplificarea PCR în baza praimerilor specifici [2], urmată de analiza restricționară cu *BsII*. Genotipul homozigot după alela normală (*5G/5G*) este caracterizat prin prezența fragmentelor de 77 și 22 pb, iar genotipul homozigot - după alela mutantă (*4G/4G*) 98 pb.

Polimorfismul *C1173T* al genei *VKORC1* este identificat în baza analizei PCR cu primeri specifici (5'-tgacatggaatcctgacgtg- 3' și 5'-tgattgaggatgctgtcctg-3'), iar ampliconul (290 pb) obținut este supus analizei de restricție cu enzima *Hinf I*. Genotipul homozigot după alela normală (*C1173C*) poate fi identificat prin prezența unei benzi de 290 pb, iar genotipul homozigot după alela mutantă (*T1173T*) - de 250 pb. Pentru determinarea polimorfismului *G1639A* din gena *VKORC1* au fost amplificate 390pb cu utilizarea primerilor specifici [3], urmată de analiza restricționară cu enzima *Msp I*. Genotipul homozigot după alela normală (*G1639G*) se caracterizează prin prezența unei benzi de 390 pb, iar genotipul homozigot după alela mutantă (*A1639A*) - de benzile 260 pb și 130 pb.

Analiza statistică

Analiza statistică a datelor s-a efectuat cu ajutorul testului Chi-pătrat (X^2) utilizat pentru compararea a două distribuții observate în scopul stabilirii omogenității grupurilor de cercetare ($X^2 < 3,84146$ pentru $df=1$).

În plus, a fost calculat raportul de șanse (OR) și intervalele de încredere de 95% între grupurile de cercetare și grupul control, iar valorile $p < 0,05$ au fost considerate semnificative statistic. În statistică, OR reprezintă unul dintre cele trei moduri principale de

cuantificare a prezenței sau absenței asocierii între două proprietăți dintr-o populație anumită și este des utilizat în studiile medicale de tipul caz-control. Valoarea $OR > 1$ demonstrează o asociere puternică între două proprietăți, pe când valori $OR < 1$ o asociere slabă.

Rezultate și discuții:

Au fost identificate și analizate mutațiile ce duc la formarea trombozelor (*F2 G20210A*, *F5 G1691A*, *VKORC1 C1173T* și *VKORC1 G1639A*) și genele implicate în fibrinoliză (*PAI-1 4G/5G*) la femei fără pierderi reproductive.

Mutația Leiden afectează site-ul de interacțiune cu proteina-C activă, astfel obținând rezistență la inactivare și, ca rezultat, crește riscul trombofiliei [4, 10,11]. Studiarea frecvenței mutației Leiden în grupurile de cercetare și cel control, utilizând testul Chi-pătrat, nu a demonstrat o deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg (gr.0 $X^2 = 0,3559$; gr.1 $X^2 = 0,0222$; gr.2 $X^2 = 0,5634$; control $X^2 = 0,0045$; $df=1$, $p > 0,05$).

S-a observat că frecvența alelei după mutația Leiden are o pondere cu mult mai mare în grupurile de cercetare, ea fiind cea mai des întâlnită în subgrupul cu infertilitate feminină (0,097), urmată de grupul cu 2 sau mai multe pierderi reproductive (0,051) și cel cu un avort spontan (0,022), în comparație cu grupul control (0,009) (tab.2).

Prin compararea ponderii genotipurilor genei *F5 G1691A* dintre grupurile de cercetare și cel control se evidențiază o frecvență ridicată a genotipului heterozigot (*G1691A*) la grupul cu infertilitate (0,175), urmată de grupul cu 2 pierderi reproductive (0,096) și cel cu un avort spontan (0,042) decât în cel de control (0,017). S-a observat că în toate loturile cercetate nu au fost identificate genotipuri homozigote după alela mutantă (*F5 G36721G*). Acest fapt poate fi explicat prin creșterea de 5-7 ori a riscului de apariție a trombozei în cazul genotipurilor heterozigote și de 80 de ori la genotipurile homozigote după alela mutantă [22], ceea ce ar majora considerabil riscul de avort spontan.

Tabelul 2.

Frecvența alelică a factorilor genetici ai trombofiliei ereditare (părți procentuale)

Denumirea mutației	Femei cu nici o sarcină pozitivă (infertilitate)		Femei cu o sarcină pozitivă		Femei cu două sau mai multe avorturi spontane		Grupul control	
	Alela normală	Alela mutantă	Alela normală	Alela mutantă	Alela normală	Alela mutantă	Alela normală	Alela mutantă
<i>F5 G1691A</i>	0,9032	0,0968	0,9787	0,0213	0,9492	0,0508	0,9912	0,0088
<i>F2 G20210A</i>	0,9629	0,0371	0,9889	0,0111	0,9798	0,0202	0,9906	0,0094
<i>PAI1 4G/5G</i>	0,4655	0,5345	0,5526	0,4474	0,4699	0,5301	0,4821	0,5179
<i>VKORC1 C1173T</i>	-	-	-	-	0,5769	0,4231	0,6765	0,3235
<i>VKORC1 G1639A</i>	-	-	-	-	0,5714	0,4286	0,5368	0,4632

Pentru a demonstra influența mutației Leiden asupra problemelor reproductive s-a efectuat raportul de șanse la loturilor cercetate. O asociere puternică s-a observat în cazul grupului cu infertilitate OR, având o valoare de 13,44 (95% CI 1,54; 117,58; $p < 0,05$) și în cazul grupului cu 2 sau mai multe pierderi de sarcină (OR 6,33, 95% CI 0,83; 48,22; $p < 0,05$) (tab.3).

În decursul a aproximativ 10 ani cercetările în vederea asocierii trombofiliei ereditare cu pierderile de sarcină au crescut considerabil. Multe studii de tipul caz-control prezintă o asociere între mutațiile genelor trombofilice și RPL, dar altele nu detectează nici o asociere, în funcție de populația studiată. În prezenta cercetare noi am identificat o interlegătură strânsă între mutația Leiden și RPL, mai ales în cazul femeilor cu 2 sau mai multe pierderi reproductive.

Se poate observa că valoarea OR este cea mai mare în cazul grupului cu infertilitate (OR 13,44) (tab.3). Aceasta demonstrează o strânsă legătură între prezența genotipului heterozigot după mutația Leiden și infertilitatea feminină. Același lucru poate fi observat și în cazul femeilor cu două sau mai multe pierderi, numai că asocierea nu este așa de pronunțată (OR 6,33). Din datele obținute de noi se poate concluda că absența mutației G1691A din gena F5 are o influență majoră la decurgerea normală a sarcinii și de aceea ar fi necesară cercetarea acestei mutații la femeile cu două sau mai multe pierderi reproductive pentru tratarea corectă cu anticoagulante.

Mutația *G20210A* din gena *F2* care codifică FII de coagulare sau protrombina duce la creșterea valorilor protrombinei plasmatice și, la rândul său, a riscului de apariție a trombozei venoase [1,4,11] sau a complicațiilor în cursul sarcinii. Testul Chi-pătrat utilizat pentru stabilirea omogenității grupurilor cercetate nu a demonstrat o deviație statistic semnificativă (gr.0 $X^2 = 0,0399$; gr.1 $X^2 = 0,0057$; gr.2 $X^2 = 0,0842$; control $X^2 = 0,0048$; $df=1$, $p > 0,05$).

Analizând frecvența alelică după mutația *F2 G20210A*, am observat o incidență mai mare a alelei mutante în grupul cu infertilitate (0,037), în grupul cu două sau mai multe avorturi spontane (0,0202) și în grupul cu o sarcină pozitivă (0,011) decât în lotul control (0,009) (tab.2).

Totodată, că genotipul homozigot după alela mutantă, la fel ca în cazul mutației Leiden, nu a fost depistat în niciunul din grupurile de cercetare. Cauzele acestui fenomen pot fi aceleași ca și în cazul mutației Leiden. Frecvența genotipului heterozigot în grupul control (0,019) a fost mai mică în comparație cu loturile de cercetare la care frecvența cea mai ridicată a fost identificată la grupul cu infertilitate (0,071), urmată de grupul cu două sarcini (0,039) și grupul cu o sarcină pierdută (0,011).

Analiza raportului de șanse nu a demonstrat o asociere statistic semnificativă a acestei mutații cu pierderile de sarcină, cu toate că valorile OR au fost mai

mari ca 1, ceea ce denotă o acțiune negativă asupra sarcinii. Cea mai mare valoare OR a fost depistată în grupul cu infertilitate (OR 4,16, 95% CI 0,36; 48,08; $p > 0,05$) urmată de grupul cu 2 sau mai multe avorturi (OR 2,19, 95% CI 0,27; 17,9; $p > 0,05$) și cel cu o pierdere de sarcină (OR 1,89, 95% CI 0,07; 19,45; $p > 0,05$) (tab.3).

Cercetările arată că purtătorii mutației *G20210A* din gena *F2* pot avea nivelul protrombinei de 1,5-2 ori mai mare decât în mod normal [5]. Pihusch și colab. (2001) a studiat mutațiile factorilor de coagulare și a constatat că genotipul heterozigot după mutația *G20210A* a avut o frecvență mai mare la pacientele cu avorturi în primul trimestru de sarcină. În afară de activarea fibrinei, trombina activează de asemenea, componente tisulare reprezentate în placentă și induce răspunsuri celulare. În opinia lor nivelele crescute de protrombină ar putea afecta funcția placentară prin influențarea unor mecanisme pivotale, cum ar fi adeziunea celulară, proliferarea mușchiului neted și vasculogeneza [22].

În grupurile de cercetare ale studiului nostru nu s-a demonstrat o asociere statistic veridică între mutația *G20210A* din gena *F2* și RPL, cu toate acestea, se observă o creștere considerabilă a frecvenței alelei mutante la loturile de cercetare în comparație cu grupul de control. Valoarea OR cea mai mică a fost identificată la grupul cu o pierdere, ceea ce înseamnă că în cazul acestui grup de femei prezența mutației în gena *F2* nu poate fi asociată cu una din cauzele avortului.

O influență mare, mutația *F2 G20210A* o poate avea în cazul femeilor cu infertilitate, care este confirmată de valoarea OR de 4,16 și la femeile cu două sau mai multe pierderi reproductive [2,19]. Cu toate că analiza statistică a prezentat valori $p > 0,05$ pentru toate loturile cercetate, mutația *G20210A* din gena *F2* ar putea influența negativ sarcina, această concluzie poate fi sprijinită de faptul că nici în cazul mutației din gena *F2* și nici al mutației Leiden nu au fost depistați homozigoți după alela mutantă.

Conform datelor științifice, mutațiile *F5 Leiden* și *F2 G20210A* sunt cele mai comune și responsabile de hipercoagularea sângelui în populația caucaziană din nordul Europei [23]. Martinelli și colab. (2000), într-un studiu caz-control, observă că portajul ambelor alele mutante (*F5 Leiden* și *F2 G20210A*) este asociat cu triplarea riscului de pierderi fetale [24]. În grupul nostru de cercetare au fost identificate 3 femei (1,099%) care aveau în istoric 3-4 avorturi spontane.

Polimorfismul *4G/5G* din gena *SERPINE I* sau *PAI-1* este amplsat în promotorul genei și, prin urmare, asociat cu creșterea sau scăderea nivelelor plasmatice ale proteinei *PAI-1*. Conform literaturii de specialitate, alela *4G* este asociată cu o mai mare transcriere și activitate a *PAI-1* plasmatic și deci cu o activitate fibrinolitice scăzută. Frecvențele polimorfismului *4G/5G PAI-1* au fost cercetate prin intermediul

testului Chi-pătrat care nu a identificat deviații de la echilibrul Hardy-Weinberg în niciunul dintre grupurile cercetate (gr.0 $X^2 = 0,0451$; gr.1 $X^2 = 0,1577$; gr.2 $X^2 = 2,0811$; control $X^2 = 2,1921$; $df=1$, $p>0,05$)

Analizând frecvența alelică după polimorfismul

4G/5G PAI-1, am observat că ponderea alelei 4G în grupurile de cercetare (gr.0-0,534; gr.1-0,447; gr.2-0,53) este aproximativ aceeași ca în lotul control (0,518) (tab.2).

Tabelul 3.

Rezultatele analizei raportului de șanse în grupurile cercetate

Genotipurile cercetate	Grupul cercetat %	Grupul control %	Raportul de șanse (OR)	95% Intervalul de încredere (95% CI)	Valoarea (p)
FV gr. 0					
G36721G	80,65%	98,25%	1,00	Ref	
G36721A	19,35%	1,75%	13,44	1,54 - 117,58	p<0,05
A36721A	0%	0%	-	-	-
FV gr. 1					
G36721G	95,74%	98,25%	1,00	Ref	
G36721A	4,26%	1,75%	2,49	0,22 - 28,34	p>0,05
A36721A	0%	0%	-	-	-
FV gr. 2					
G36721G	89,85%	98,25%	1,00	Ref	
G36721A	10,15%	1,75%	6,33	0,83 - 48,22	p<0,05
A36721A	0%	0%	-	-	-
FII gr. 0					
G20210G	92,59%	98,11%	1,00	Ref	
G20210A	7,41%	1,89%	4,16	0,36 - 48,08	p>0,05
A20210A	0%	0%	-	-	-
FII gr. 1					
G20210G	97,78%	98,11%	1,00	Ref	
G20210A	2,22%	1,89%	1,18	0,07 - 19,45	p>0,05
A20210A	0%	0%	-	-	-
FII gr. 2					
G20210G	95,96%	98,11%	1,00	Ref	
G20210A	4,04%	1,89%	2,19	0,27 - 17,9	p>0,05
A20210A	0%	0%	-	-	-
PAI-1 gr.0					
5G/5G	20,69%	16,07%	1,00	Ref	
4G/5G	51,72%	64,29%	0,63	0,19 - 2,07	p>0,05
4G/4G	27,59%	19,64%	1,09	0,28 - 4,32	p>0,05
PAI-1 gr.1					
5G/5G	28,95%	16,07%	1,00	Ref	
4G/5G	52,63%	64,29%	0,45	0,16 - 1,28	p>0,05
4G/4G	18,42%	19,64%	0,52	0,14 - 1,9	p>0,05
PAI-1 gr.2					
5G/5G	24,62%	16,07%	1,00	Ref	
4G/5G	44,72%	64,29%	0,45	0,2 - 1,02	p=0,05
4G/4G	30,65%	19,64%	1,02	0,39 - 2,65	p>0,05
VKORC1 G1639A gr.2					
G1639G	34,07%	26,47%	1,00	Ref	
G1639A	46,15%	54,41%	0,66	0,32 - 1,37	p>0,05
A1639A	19,78%	19,12%	0,80	0,32 - 2,02	p>0,05
VKORC1 C1173T gr.2					
C1173C	35,16%	42,65%	1,00	Ref	
C1173T	45,05%	50%	1,09	0,55 - 2,15	p>0,05
T1173T	19,78%	7,35%	3,26	1,07 - 9,91	p<0,05

Spre deosebire de frecvența alelică, frecvența genotipică diferă. Comparând frecvențele genotipurilor homozigot după alela 4G a genei PAI-1 se observă că ponderea este mai mare în grupurile de cercetare decât în grupul control (0,196) (tab.2), iar diferența cea mai mare a fost identificată în grupul cu două sarcini pierdute (0,307), urmată de grupul cu infertilitate (0,276). Spre deosebire de frecvența genotipului mutant care este în creștere în comparație cu controlul, ponderea genotipului heterozigot este mai mică ca cea depistată în grupul control (0,643). Diferența cea mai mare este depistată în grupul cu două sarcini pierdute (0,447) și cel cu infertilitate (0,517). Grupul cu o sarcină pierdută, este asemănător cu grupul control după ambele genotipuri, având frecvența genotipului homozigot mutant și cel heterozigot scăzut neesențial (0,184 și 0,526).

Frecvențele obținute au fost utilizate pentru analiza raportului de șanse care a prezentat lipsa asocierii (OR 0,45, 95% CI 0,2; 1,02) în cazul genotipului heterozigot în grupul cu 2 sarcini pierdute ($p=0,05$). În celelalte grupuri de cercetare nu s-a demonstrat o asociere statistic veridică între genotipurile studiate și avorturile spontane în timpul sarcinii (tab.3).

Există multe studii ce indică o asociere a alelei 4G a genei PAI-1 cu pierderile reproductive care poate fi cauzată de supraexpresia genei care reglează negativ fibrinoliza și împiedică dezvoltarea cheagurilor. Cu toate acestea, în prezentul studiu nu a fost demonstrată asocierea polimorfismului PAI-1 cu avorturile spontane.

Dacă celelalte mutații influențează direct asupra coagulogramei, atunci gena VKORC1 este un factor indirect. Produsul genei VKORC1 răspunde de activarea vitaminei K, care este un cofactor al factorilor de coagulare K-dependenți. În prezentul studiu au fost cercetate 2 polimorfisme ale genei VKORC1 *C1173T* și *G1639A* la femeile cu două sau mai multe pierderi reproductive.

Distribuția genotipurilor după polimorfismele *G163A*, *C1173T* și frecvența alelelor în grupul de cercetare (*G1639A* $X^2 = 0,3029$; *C1173T* $X^2 = 0,5403$; $df=1$, $p>0,05$) și de control (*G1639A* $X^2 = 0,6028$; *C1173T* $X^2 = 1,3768$; $df=1$, $p>0,05$) nu au prezentat deviații de la echilibrul Hardy-Weinberg.

În cazul polimorfismului *G1639A* al genei *VKORC1* frecvența alelei mutante este mai mică în grupul cercetat (0,429) decât în grupul control (0,463), iar în cazul polimorfismului *C1173T* alela mutantă este mai frecventă în grupul cu 2 pierderi (0,423 vs 0,324). Analizând frecvența genotipică a polimorfismului *G1639A*, observăm că frecvența genotipului *A1639A* este aproximativ aceeași în ambele grupuri (0,198 vs 0,191) (tab.2), iar a genotipul heterozigot în grupul de cercetare este mai mic decât în cel de control (0,461 vs 0,544). În cazul polimorfismului *C1173T* frecvența genotipului homozigot după alela mutantă este de 2,6 ori mai mare decât în grupul

control (0,198 vs 0,074), dar nu sunt observate mari diferențe între frecvența genotipurilor heterozigote în grupul de cercetare (0,451) și cel de control (0,500).

Analiza raportului de șanse a demonstrat o asociere, statistic semnificativă, cu avorturile spontane în timpul sarcinii numai în cazul genotipului homozigot *T1173T* al genei *VKORC1*, indicând o valoare OR de 3,26 (95% CI 1,07; 9,97; $p<0,05$). Celelalte genotipuri au prezentat o asociere slabă cu RPL și nu au fost statistic veridice (tab.3).

În literatura de specialitate sunt puține lucrări privind asocierea dintre polimorfismele *C1173T* și *G1639A* din gena *VKORC1* și apariția trombozilor și asocierea lor cu RPL. S-a demonstrat că cantitatea de ARNm a genei *VKORC1* variază în funcție de polimorfismele acestei gene, ceea ce la rândul său poate duce la creșterea sau reducerea cantității de vit. K activă. Această ipoteză ar putea explica diferențele între valorile OR observate între aceste 2 polimorfisme (*G1639A* OR-0,66 vs *T1173T* OR-3,26), adică genotipul homozigot *T1173T* este statistic asociat cu avorturile spontane în timpul sarcinii, pe când genotipul heterozigot *G1639A* nu influențează sarcina.

În plus, polimorfismele *C1173T* și *G1639A* sunt intens studiate în cadrul farmacogeneticii din motivul că, în funcție de genotipul pacientului, după locusul *VKORC1*, poate varia doza de warfarină, care este un anticoagulant des utilizat în tratarea trombozelor. Stabilirea dozei optime de warfarină este esențială în timpul sarcinii: o doză mai mică nu va duce la nici un efect; o doză mai mare va genera hemoragii și alte complicații legate de hipocoagularea sângelui.

Limdi și colab. (2008) au determinat ca variațiile în gena *VKORC1* pot cauza variabilitatea dozării warfarinei cu 5%-18%, iar cei mai buni predicatori sunt polimorfismele *C1173T* și *G1639A* [19]. Polimorfismul *G1639A*, localizat în promotor, este asociat cu sensibilitatea la warfarină, fiind necesare doze mai mici, și cu riscuri mai mari de sângerări [25, 26], fapt care accentuează necesitatea cercetării mai profunde a acestor polimorfisme la femeile cu pierderi reproductive.

Concluzii:

1. Conform analizei raportului de șanse, mutațiile *G1691A* (Leiden) din gena F5 (OR 6.86, 95% CI 0.90, 52.48, $p<0,05$) și *G20210A F2* (OR 2.18, 95% CI 0.26, 18.13, $p>0,05$) reprezintă un factor de risc major asociat cu pierderi reproductive.

2. Analiza polimorfismului genei inhibitorului activatorului de plasminogen (PAI1 4G/5G) nu a demonstrat o asociere cu derularea anormală a sarcinii.

3. Polimorfismul *T1173T* al genei *VKORC1* este asociat (OR 3.26, 95% CI 1.07, 9.91, $p>0,05$) cu creșterea riscului de complicații pe parcursul sarcinii.

4. Conform rezultatelor studiului, se recomandă de efectuat screeningul molecular la factorii trombofiliei ereditare (*F2 G20210A*, *F5 G1691A*, *VKORC1 C1173T* și *G1639A*) la femeile cu pierderi de sarcină recurente.

Bibliografie

1. **Poort S.R., Rosendaal F.R., Reitsma P.H., Bertina R.M.** „A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis” *Blood*, Vol88, No 10, p. 3698-370, 1996.
2. **Isordia-Salas I., Leñanos-Miranda A., Sainz I. M., Reyes-Maldonado E., Borrayo-Sánchez G.** „Association of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene 4G/5G Polymorphism With ST Elevation Acute Myocardial Infarction in Young Patients”. *Rev Esp Cardiol*.62(4):365-72, 2009.
3. **Nowak-Göttl U., Dietrich K., Schaffranek D.** „In pediatric patients, age has more impact on dosing of vitamin K antagonists than VKORC1 or CYP2C9 genotypes”. *Bloodjournal* vol 116, num. 26, pag 6101-6105, 2010.
4. **Altintas A., Pasa S., Akdeniz N.** „Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations in patients with recurrent pregnancy loss: data from the southeast of Turkey”. *Ann Hematol* 86:727-731, 2007.
5. **Малышева О. В., Беспалова О. Н., Иващенко Т. Э.** „Невынашивание беременности и полиморфизм генов системы свертывания крови”. *Журнал акушерства и женских болезней* том 56, стр. 21-27, 2007.
6. **Santis MD, Cavaliere AF, Straface G, Gianantonio ED, Caruso A.** „Inherited and acquired thrombophilia: pregnancy outcome and treatment”. *Reprod Toxicol* 22:227-233, 2006.
7. **Regan L, Rai R.** „Thrombophilia and pregnancy loss”. *J Reprod Immunol* 55:163-180, 2002.
8. **Dizon-Townson DS, Kinney S, Branch DW, Ward K.** „The factor V Leiden mutation is not a common cause of recurrent miscarriage”. *J Reprod Immunol* 34:217-223, 1997.
9. **Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir L.** „Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause”. *Thromb Haemost* 82:6-9, 1999.
10. **Kujovich L Jody** „Factor V Leiden Thrombophilia”. *GeneReviews*®, March 9, 2010.
11. *Catalogul online al genelor umane și al tulburărilor genetice OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) - <http://www.omim.org/>*
12. **Pihusch R., Buchholz T., Lohse P., Rubsamen H., Rogenhofer N., Hasbargen U., Hiller E., Thaler C. J.** „Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester”. *Am. J. Reprod. Immunol.* 46: 124-131, 2001
13. **Ginsburg D., Zeheb R., Yang A. Y., Rafferty U. M., Andreasen P. A., Nielsen L., Dano K., Lebo R. V., Gelehrter T. D.** „cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells”. *J. Clin. Invest.* 78: 1673-1680, 1986.
14. **Mehta R., Shapiro A. D.** „Plasminogen activator inhibitor type 1 deficiency”. *Haemophilia* 14: 1255-1260, 2008.
15. **Dawson S. J., Wiman B., Hamsten A., Green F.** „The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells”. *J. Biol. Chem.* 268: 10739-10745, 1993
16. **Eriksson P., Kallin B., Bavhenolm P., Hamsten A.** „Allelic-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction”. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 1851-1855, 1995.
17. **Gonzalez-Conejero R., Corral J., Rolda V.** „The genetic interaction between VKORC1 C1173T and calumenin A29809G modulates the anticoagulant response of acenocoumarol”. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5: 1701-1706, 2007
18. **Rieder M. J., Reiner A. P., Gage B. F., Nickerson D. A., Eby C. S., McLeod H. L., Blough D. K., Thummel K. E., Veenstra D. L., Rettie A. E.** „Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose”. *New Eng. J. Med.* 352: 2285-2293, 2005.
19. **Limdi N. A., Beasley T. M., Crowley M. R., Goldstein J. A., Rieder M. J., Flockhart D. A., Arnett D. K., Acton R. T., Liu N.** „VKORC1 polymorphisms, haplotypes and haplotype groups on warfarin dose among African-Americans and European-Americans”. *Pharmacogenomics* 9: 1445-1458, 2008.
20. **Demir HD, Ortak H, Şahin Ş, Ateş Ö, Benli I, İnanır A.** „VKORC1 C1173T and VKORC1 G-1639A gene polymorphisms in Turkish Behçet's patients with ocular and non-ocular involvement”. *Ophthalmic Genet.* 35(1):7-11, 2014.
21. **Ortak H, Söğüt E, Demir H, Ardagil A, Benli I, Sahin S.** „Predictive value of the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 G-1639A and C1173T single nucleotide polymorphisms in retinal vein occlusion”. *Clin Experiment Ophthalmol.* 40(7):743-8, 2012.
22. **Asselta R., Tenchini M. L., Duga S.** „Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side”. *Journal of Thromb Haemost* 4(1):26-34, 2006.
23. **Deitcher S.R., Caiola E., Jaffer A.** „Demystifying two common genetic predisposition to venous thrombosis”. *Clevel Clin J Med* 67:825-836, 2000.
24. **Martinelli I., Taioli E., Cetin I., Marinoni A., Gerosa S., Villa M. V., Bozzo M., Mannucci P. M.** „Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss”. *New Eng. J. Med.* 343: 1015-1018, 2000.
25. **Scott S. A., Edelman L., Kornreich R., Desnick R. J.** „Warfarin pharmacogenetics: CYP2C9 and VKORC1 genotypes predict different sensitivity and resistance frequencies in the Ashkenazi and Sephardi Jewish populations”. *Am. J. Hum. Genet.* 82: 495-500, 2008.
26. **Ross K. A., Bigham A. W., Edwards M., Gozdzik A., Suarez-Kurtz G., Parra E. J.** „Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements”. *J. Hum. Genet.* 55: 582-589, 2010.