

Veaceslav Moşin, Alina Hotineanu, Adrian Creţu, Vitalie Scurtu, Iuliana Holban
TROMBOFILIA EREDITARĂ ŞI PATOLOGIA REPRODUCTIVĂ
Centrul Medical „Repromed”

SUMMARY

INHERITED THROMBOPHILIA AND REPRODUCTIVE PATHOLOGY

Keywords: *thrombophilia; factor V (Leiden mutation); prothrombin (factor II) G20210A; Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) 4G/5G; infertility*

Inherited thrombophilia is a genetic disorder of haemostasis that appears to predispose to blood clotting. Thrombosis have a negative impact (directly or indirectly) to any person's life. Genetic mutations in genes such as factor V, factor II and PAI-1 can shift haemostatic balance between pro- and anticoagulant forces in favor of coagulation. There is an evidence that inherited thrombophilia may increase the risk of fetal loss, vascular complications of pregnancy (like intrauterine growth restriction or preeclampsia) and consequently it can be a cause of female infertility. Women affected by infertility or pregnancy loss are advised to undergo genetic testing for mutations involved in thrombophilia in order to estimate the risk of thrombosis and decide whether patients need treatment and intervention on risk factors.

РЕЗЮМЕ

НАСЛЕДСТВЕННАЯ ТРОМБОФИЛИЯ И РЕПРОДУКТИВНАЯ ПАТОЛОГИЯ

Ключевые слова : *тромбофилия, фактор V (мутация Лейден), протромбин (фактор II) G20210A, ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1) 4G/5G, бесплодие*

Наследственная тромбофилия является генетическим заболеванием, которое может произойти у любого человека, наследуется от родителей и происходит из-за мутаций на уровне ДНК. Она характеризуется тем, что повышает риск тромбоза в кровеносных сосудах, которые могут оказать негативное воздействие (прямое или косвенное) на жизнь любого человека. Генетические мутации, участвующие в наследственной тромбофилии, такие как фактор V, фактор II или PAI-1, могут быть причиной женского бесплодия, или могут увеличить риск потери плода. Женщинам, страдающим от бесплодия, рекомендуется проведение молекулярно-генетического тестирования для выявления мутаций ДНК, которые могут привести к тромбофилии, чтобы оценить риск тромбоза и решить, нужно ли им лечение или же вмешательство в отношении факторов с обратимым риском.

Introducere.

Trombofilia este o anomalie a coagulării ce creşte riscul de tromboză formarea de trombi (cheaguri) în vasele sangvine.

Condiții care favorizează coagularea pot fi: sarcina, contraceptivele orale, fumatul, terapia estrogenică, vârsta înaintată, hiperhomocisteinemia, malignitățile, stroke cu pareza extremităților, traumatismele, obezitatea, alimentația neechilibrată, intervențiile chirurgicale majore, diabetul zaharat, lupusul anticoagulant, imobilizarea prelungită, sedentarismul.

Graviditatea se asociază în mod normal cu o stare de hipercoagulabilitate fiziologică, menită să limiteze sângerarea post-partum (după naștere).

Pentru femeile gravide, cărora li s-au depistat mutații ale genelor implicate în trombofilie, dacă sarcina este bine controlată și monitorizată atent de către medicul curant, bebelușul se poate naște sănătos și la termen.

Scopul.

Diagnosticul trombofiliei ereditare se face prin testarea ADN-ului pentru anumite mutații.

Indicații pentru testare:

Analize de genetică moleculară pentru evaluarea unor mutații ce pot cauza:

- ✓ tromboze venoase, paralizie (prin accident vascular cerebral) la vârstă relativ tânără, infarct miocardic;
- ✓ infertilitate, eșec fertilizare in vitro;
- ✓ avorturi spontane;
- ✓ hipotrofie fetală;
- ✓ deces fetal în timpul travaliului;
- ✓ anomalii congenitale multiple la nou-născut;
- ✓ gravide cu preeclampsie severă, abrupția placentei, retard al creșterii intrauterine, mortinatalitate (raportul dintre numărul copiilor născuți morți și nașterile normale) [Price D.T. et al., 1997].

Teste recomandate și semnificația clinică:

- Factorul V (mutația Leiden):

Mutația - o substituție mononucleotidică în gena codificatoare a factorului V în poziția 1691 G>A - are drept consecință înlocuirea argininei cu glutamina în poziția 506 a produsului proteic (R506Q - Leiden). Mutația conferă factorului V activat rezistență la acțiunea proteolitică a proteinei C (care, împreună cu proteina S și cu antitrombina III, formează sistemul anticoagulant), creând astfel premisele formării de trombi [Gerhardt A. et al.,2000].

Mutația se moștenește autozomal dominant. Mutația FV Leiden sporește riscul trombozelor. Riscul homozigoților de a dezvolta tromboembolii este de până la 80 de ori mai mare decât cel al populației generale, în timp ce heterozigoții au un risc de doar 5-7 ori mai mare [Asselta R.,2006].

- Protrombina (Factorul II; PTH) G20210A:

Mutație moștenită autosomal dominant. Mutația duce la acumularea protrombinei de câteva ori mai mult decât în mod normal. Induce o stare de hipercoagulabilitate ușoară. Frecvența formei heterozigote a mutației în populația europeană este de 2-3%. Forma homozigotă se întâlnește foarte rar. Riscul de formare a trombilor crește de 4-8 ori [De Stefano V. et al., 2001].

- PAI-1 (Inhibitorul Activatorului Plasminogenului tisular tip 1) 4G/5G:

Inhibitorul activatorului plasminogenului (PAI-1) deține un rol important în procesul fibrinolitic. Acesta inhibă conversia plasminogenului în plasmină, fapt ce reduce fibrinoliza - proces fiziologic de degradare

a cheagului sangvin. Genotipul mutant **4G/4G** este asociat cu creșterea nivelului plasmatic de PAI-1 și scăderea activității fibrinolitice cu o predispoziție la tromboze.

Materiale și metode.

Grupul de cercetare l-au constituit pacientele centrului medical cu probleme ale reproducerii, inclusiv avorturi spontane și pierderi de sarcină recurente. ADN-ul genomic a fost extras după kit-uri specializate (*GeneJet Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit*, „*Fermentas*”) din sânge periferic. Probele de sânge au fost colectate în tuburi de unică folosință cu EDTA, prin puncție venoasă.

Pentru testarea genetică a polimorfismelor FV G1691A, FII G20210A, PAI-1 5G/4G s-au realizat reacțiile PCR/RFLP (reacție de polimerizare în lanț și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție) cu primeri specifici preluați din articolele din literatura de specialitate [Yingying Tang et al., Abukishe et al., Akar N. et al.]. ADN-ul genomic a fost amplificat utilizând polimeraza Dream Taq („*Fermentas*”, *SUA*), la termociclul „TProfessional Basic 96” („*Biometra*”, *Germania*). Condițiile reacției sunt similare pentru toate polimorfismele cu excepția temperaturii de aliniere a primerilor: 55°C pentru FV *G1691A*, 55.6°C pentru FII *G20210A*, 56.2°C pentru PAI-1 *5G/4G*, iar condițiile protocolului standard sunt: denaturare inițială la 95°C - 3 minute, 33 cicluri: la 94°C - 30 secunde, 55-56.2°C - 30 secunde, 72°C - 30 secunde și elongația finală la 72°C - 5 minute.

Ampliconii pentru fragmentul FV au fost supuși restricției timp de 3 ore la 37°C cu enzima specifi-

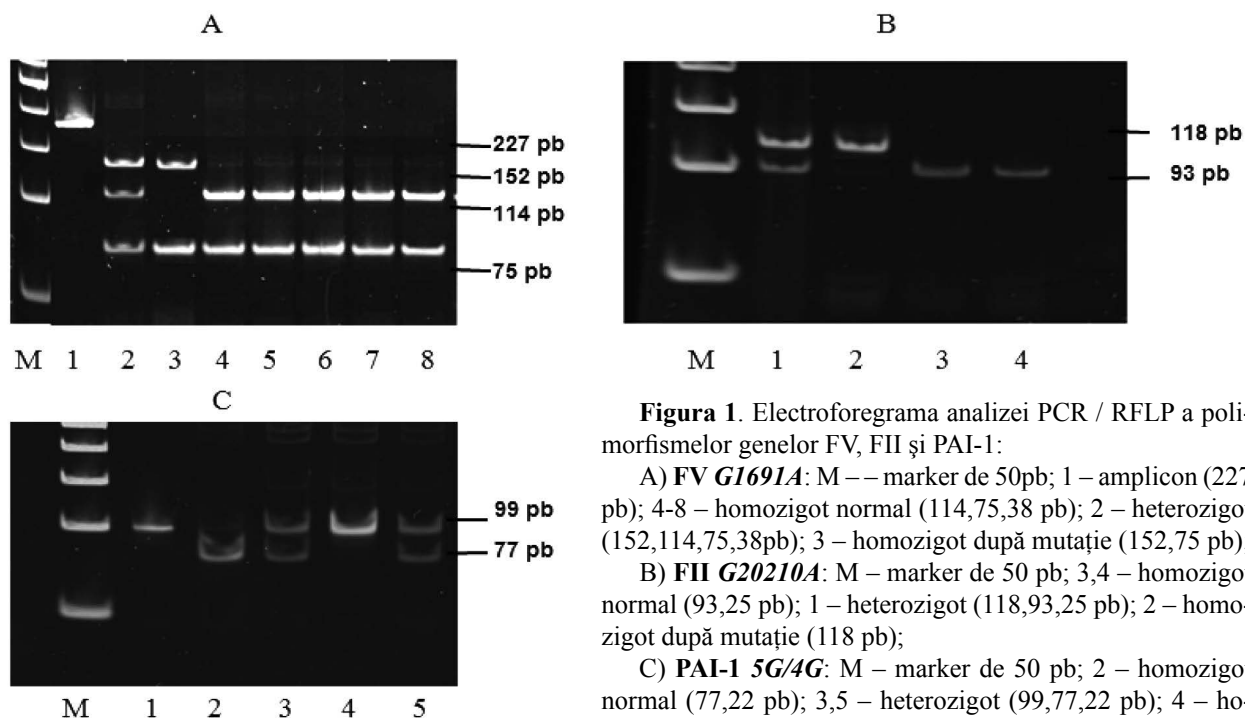


Figura 1. Electroforegrama analizei PCR / RFLP a polimorfismelor genelor FV, FII și PAI-1:

A) **FV G1691A:** M - marker de 50pb; 1 - amplicon (227 pb); 4-8 - homozigot normal (114,75,38 pb); 2 - heterozigot (152,114,75,38pb); 3 - homozigot după mutație (152,75 pb);

B) **FII G20210A:** M - marker de 50 pb; 3,4 - homozigot normal (93,25 pb); 1 - heterozigot (118,93,25 pb); 2 - homozigot după mutație (118 pb);

C) **PAI-1 5G/4G:** M - marker de 50 pb; 2 - homozigot normal (77,22 pb); 3,5 - heterozigot (99,77,22 pb); 4 - homozigot după mutație (99 pb).

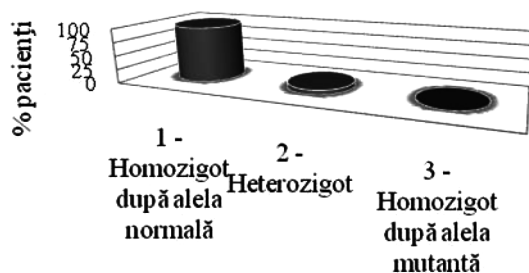
că Mnl I; ampliconii fragmentului FII – la t° de 65°C timp de 1 oră cu restrictaza TaqI, iar fragmentul PAI-1 a fost restrictat cu enzima BseLI la 55°C timp de 2 ore. Verificarea produșilor de restricție s-a efectuat prin electroforeză în gel de PAAG (poliacrilamidă) cu concentrația de 7.5%, în condițiile: 200 V timp de 3 ore. Gelul a fost colorat cu soluție de bromură de etidiu. Rezultatele au fost vizualizate la sistemul - UV SOLO (Germania). Mărimile fragmentelor sunt reflectate în figura 1.

Rezultate și discuții. Datele au fost obținute în perioada 2012 - 2013, după investigarea unui număr total de pacienți:

- pentru *factorul V (Leiden)* – 199 pacienți;
- pentru *factorul II (Protrombina)* – 116 pacienți;
- pentru *PAI-1 (4G/5G)* – 152 pacienți.

Rezultatele genotipării sunt prezentate în diagramele 1, 2 și 3. Pentru evaluarea veridicității rezultatelor obținute au fost utilizate formulele general acceptate din statistica variațională, cu ajutorul programului SISA. În acest context, au fost calculate frecvențele alelelor și claselor genotipice după formula lui Hardy-Weinberg, iar pentru compararea frecvențelor genotipurilor s-a utilizat criteriul lui Pirson – χ^2 .

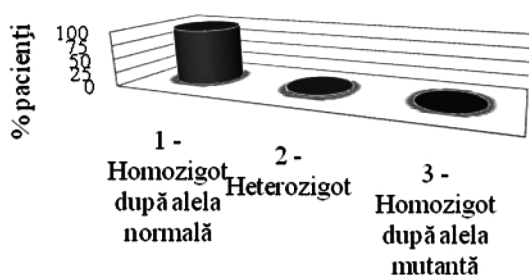
Factorul V (Leiden) (199 pacienți)



	1 - Homozigot după alela normală	2 - Heterozigot	3 - Homozigot după alela mutantă
■ % din nr. total	96%	4%	0%
■ Numărul pacienților	191	8	0

Diagrama 1. Repartiția frecvenței claselor genotipice după polimorfismul G1691A al factorului V

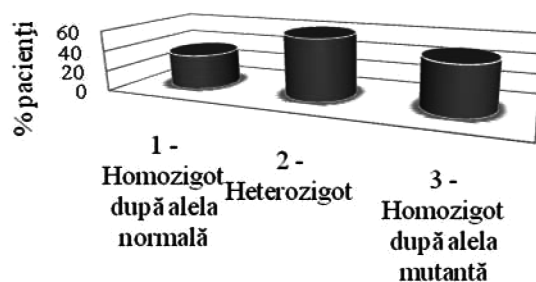
Factorul II (Protrombina) G20210A (116 pacienți)



	1 - Homozigot după alela normală	2 - Heterozigot	3 - Homozigot după alela mutantă
■ % din nr. total	96.5%	3.5%	0%
■ Numărul pacienților	112	4	0

Diagrama 2. Repartiția frecvenței claselor genotipice după polimorfismul G20210A al factorului II

PAI-1 4G/5G (152 pacienți)



	1 - Homozigot după alela normală	2 - Heterozigot	3 - Homozigot după alela mutantă
■ % din nr. total	22.4%	46.7%	30.9%
■ Numărul pacienților	34	71	47

Diagrama 3. Repartiția frecvenței claselor genotipice după polimorfismul 4G/5G al PAI-1

La compararea repartiției frecvenței genotipurilor observate în raport cu cele teoretic așteptate prin testul X^2 nu a fost elucidată deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg nici pentru un polimorfism studiat: FV *G1691A* ($X^2=0.084$; $p>0.05$);

FII *G20210A* ($X^2=0.036$; $p>0.05$); PAI-1 *5G/4G* ($X^2=0.527$; $p>0.05$).

Femeile gravide au un risc sporit pentru tromboză venoasă, embolismul pulmonar fiind o cauză majoră a mortalității materne.

Riscul de tromboză [University of Illinois, Hematology Resource Page]

Statut trombotic	Risc	Statut trombotic	Risc
Normal	1	Mutația heterozigotă a protrombinei G20210A	3
COC (Contraceptive orale)	3	Mutația heterozigotă a protrombinei G20210A + COC	16
Factor V Leiden heterozigot	5-7	Hiperhomocisteinemie	2-4
Factor V Leiden homozigot	80	Hiperhomocisteinemie + Factor V Leiden heterozigot	20
Factor V Leiden heterozigot + COC	30-35	COC + Factor V Leiden heterozigot + Hiperhomocisteinemie	50-60
Factor V Leiden homozigot + COC	>100		

Riscul trombozei venoase

La negravidă	
Factorul V (mutația Leiden)	5-6 ori
Mutația protrombinei G20210A	2-3 ori
Mutația MTHFR	1-2 ori
La gravide	
Factorul V (mutația Leiden)	9-12 ori
Mutația protrombinei G20210A	8-10 ori
Mutația MTHFR	2-3 ori

Complicații obstetricale ale trombofiliei [Moșin Veaceslav, 2010] :

- Dereglări de implantare și eșecuri repetate FIV;
- Avorturi spontane habituale;
- Preeclampsia (hipertensiunea arterială indusă de sarcină);
- Retard în dezvoltarea intrauterină a fătului;
- Oligohidroamnios;
- Dezlipirea precoce a placentei;

- Moarte intrauterină inexplicabilă a fătului;
- Tromboflebită în timpul sarcinii;
- Tromboembolism post-partum de 3-8 ori mai frecvent ca antepartum.

Trombofilia și patologia sarcinii:

- **Trimestrul I (defecte de implantare):**
 - Mutația factorului V Leiden
 - Sindromul antifosfolipidic
 - Hiperhomocisteinemia
- **Trimestrul II (tromboză placentară):**
 - Mutația factorului V Leiden
 - Mutația genei protrombinei G20210A
 - Sindromul antifosfolipidic
- **Patologia sarcinii (retard în dezvoltarea fătului, preeclampsie, dezlipirea placentei):**
 - Deficiența antitrombinei, proteinei C sau proteinei S
 - Hiperhomocisteinemia
 - Mutația factorului V Leiden

- Mutația genei protrombinei G20210A
- Sindromul antifosfolipidic.

Tratamentul trombofiliei:

Nu toate femeile depistate cu mutații pentru trombofilia ereditară au nevoie de tratament în timpul sarcinii. Gravidele ar trebui să primească o consultație la medicul specialist despre riscurile care pot apărea din cauza cheagurilor și despre complicațiile din timpul sarcinii, dar și despre severitatea trombofiliei, înainte de a decide dacă au nevoie de tratament. Pentru fiecare caz în parte schema tratamentului poate fi absolut diferită.

Factori de risc reversibili:

- Nutriție echilibrată: fructe, legume, pește, carne grasă;
- Stoparea fumatului;
- Evitarea consumului de cafea;
- Scăderea greutății, exerciții fizice, mișcare;
- Controlul hipertensiunii;
- Scăderea colesterolului;
- Evitarea folosirii estrogenilor;
- Reducerea stresului.

Terapia se va recomanda preconcepțional, pe parcursul sarcinii și postnatal, cu ajustarea dozelor pentru fiecare perioadă:

- **anticoagulantă** (mutații prezente în FV, F-II, PAI-1): Heparină, Warfarină;
- **antiagregantă** (mutații în genele glicoproteinelor receptorilor trombocitari): Aspirină, Dipiridamol, Curantil.
- Terapie de corecție a **metabolismului homocisteinei** (Hcy):
 - Acid folic (1-4 mg/zi);
 - Vitamina B6;
 - Vitamina B12;
 - Acizi grași polinesaturați (Omega-3);
 - Limitarea aportului metioninei prin dietă, aport controlat al aminoacizilor prin reducerea ingerării proteinelor.

Concluzii.

Testarea ADN-ului în vederea depistării purtătorilor mutațiilor a genelor care pot cauza trombofilia, reprezintă o condiție obligatorie în cazul în care istoricul personal sau familial al celor ce urmează să fie expuși la factori ambientali care cresc coagulabilitatea conține elemente sugestive pentru existența unei trombofilii ereditare sau dobândite.

Bibliografie.

1. Abukishe A. et al., *Molekulargenetische Diagnostik von Mutationen im Faktor-II und Faktor-V-Gen*, Hämostaseologie 2006; 26: 197–200
2. Akar N. et al., *Effect of Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism in Turkish Deep Vein Thrombotic Patients with and without FV1691 G-A*, Thrombosis Research 97 (2000) 227–230
3. Asselta R, Tenchini ML, Duga S. *Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006; 4: 26–34.
4. Colman R.W., *Hemostasis and thrombosis : basic principles and clinical practice*. 4th ed. 2001, Philadelphia
5. De Stefano V. et al., *The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation*. Br J Haematol, 2001. 113(3): p. 630-5
6. Dilara Fatma Akın, et al., *Factor V Leiden and Prothrombin 20210A Mutations among Turkish Pediatric Leukemia Patients*. Leukemia Research and Treatment, Volume 2012, Article ID 250432, 4 pag.
7. Gerhardt A. et al., *Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium*. N Engl J Med, 2000. 342(6): p. 374-80
8. Kupfermanc M.J. et al., *Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy*. N Engl J Med, 1999. 340(1): p. 9-13
9. Moșin Veaceslav, *Ginecologie reproductivă*, Chișinău, 2010, 856 p.
10. Price D.T. and P.M. Ridker, *Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective*. Ann Intern Med, 1997. 127(10): p. 895-903
11. Rees D.C., M. Cox, and J.B. Clegg, *World distribution of factor V Leiden*. Lancet, 1995. 346(8983): p. 1133-4
12. University of Illinois - Hematology Resource Page - <http://www.med.illinois.edu/hematology/Downloads.htm>
13. Yingying Tang et al., *Mutation analysis in fatal pulmonary thromboembolism - postmortem validation study and beyond*, International Congress Series 1288 (2006) 786–788