

Mutacije FV Leiden, FII G20210A i MTHFR C677T kao faktori rizika za nastanak tromboze dubokih vena u toku trudnoće ili puerperijuma

Valentina Đorđević*, Ljiljana Rakićević*, Miloš Spasić*, Predrag Miljić†, Danijela Miković‡, Mirjana Kovač‡, Dragica Radojković*

*Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd, Klinički centar Srbije, †Institut za hematologiju, Beograd, Institut za transfuziju krvi, ‡Centar za ispitivanje poremećaja hemostaze, Beograd

Cilj. Venske tromboze su jedan od najčešćih uzroka komplikacija i smrti kod trudnica i porođilja. Njihova učestalost se kreće od 1 na 1 000 do 1 na 2 000 porođaja. Mutacije FV G1691A (FV Leiden), FII G20210A i MTHFR C677T predstavljaju značajne genetske faktore rizika za nastanak venskih tromboza. Cilj ove studije bio je utvrđivanje prisustva ovih mutacija u grupi žena sa trombozom dubokih vena u toku trudnoće ili neposredno nakon porođaja. **Metode.** Studija je obuhvatila grupu od 45 žena kod kojih se prva epizoda tromboze dubokih vena pojavila u toku trudnoće ili puerperijuma. Bolesnice kod kojih je otkriven nedostatak proteina C, S ili antitrombina III, kao i maligni ili autoimunski poremećaji, nisu uzimane u razmatranje. Mutacije FV Leiden, FII G20210A i MTHFR C677T su otkrivene umnožavanjem željenog segmenta gena reakcijom lančanog umnožavanja polimerazom i digestijom dobijenih fragmenata odgovarajućim restriktionim enzimima. **Rezultati.** Učestalost FV Leiden mutacije iznosila je 44,4% za heterozigotne nosioce i 2,2% za homozigotne nosioce. Mutacija FII G20210A javila se kod 13,3% bolesnica u heterozigotnom obliku, dok se nije javio ni jedan homozigotni nosilac. Učestalost heterozigota za MTHFR C677T mutacije iznosila je 48,9%, a homozigota 20%. **Zaključak.** Mutacije FV Leiden i FII G20210A predstavljaju značajne faktore rizika i trebalo bi vršiti rutinsko testiranje na njihovo prisustvo kod žena sa trombozom u toku trudnoće ili puerperijuma. Mutacija MTHFR C677T u homozigotnom obliku je manje značajan faktor rizika, ali je takođe treba uzeti u razmatranje, pogotovu u kombinaciji sa drugim faktorima rizika.

K l j u č n e r e č i : geni; mutacija; faktor V; protrombin; krv; poremećaji koagulacije; tromboza; trudnoća; puerperium; faktori rizika.

Uvod

Tromboze dubokih vena (TDV) u toku trudnoće ili puerperijuma javljaju se sa učestalošću od 1 na 1 000 do 1 na 2 000 porođaja i predstavljaju jedan od najčešćih uzroka smrti trudnica i porođilja. U trudnoći je prirodno stanje hiperkoagulabilnosti koje karakteriše povišen nivo fibrinogena, von Willebrandovog faktora, faktora VII, VIII i X, a sniženi nivo proteina S. Usled ovih promena u trudnoći se rizik za pojavu venskih tromboza povećava 2–4 puta (1).

Tromboze su multifaktorno oboljenje koje nastaje interakcijom stečenih i genetskih faktora rizika. Pored trudno-

će najznačajniji stečeni faktori rizika su: traume, hirurški zahvati, imobilizacija, malignitet. Genetski faktori rizika se odnedavno intenzivno proučavaju. Nedostatak inhibitora koagulacije: proteina (C, S) i antitrombina III predstavljaju značajne faktore rizika, ali su veoma retki. Do sada su kao najučestaliji genetski faktori rizika opisane mutacije u genu za faktor V (FV G1691A, poznatija kao FV Leiden), u genu za protrombin (FII G20210A) i genu za metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR C677T) (2, 3).

Mutacija FV Leiden dovodi do zamene arginina glutaminom na 506. mestu u proteinu. Usled ove promene dolazi do smanjene osetljivosti faktora V na inhibitorno dejs-

tvo aktivisanog proteina C (APC), što povećeva poluživot aktivisanog faktora V i finu ravnotežu hemostaznog sistema pomera ka stanju hiperkoagulabilnosti. Mutacija FV Leiden je prisutna kod 15–50% bolesnika sa venskim trombozama i kod oko 5% belaca, dok je kod drugih rasa veoma retka. Heterozigotni nosioci ove mutacije imaju 3–7 puta povećan rizik za nastanak tromboza, dok je kod homozigota ovaj rizik 80–90 puta veći u odnosu na osobe koje nisu nosioci mutacije (4–6).

Mutacija FII G20210A se nalazi u 3'-nekodirajućem regionu i dovodi do povećane ekspresije gena što se manifestuje povišenim nivoom protrombina u krvi. Javlja se kod oko 6% bolesnika sa venskom trombozom i kod oko 2% zdravih belaca i povećava rizik za nastanak venskih tromboza 2–3 puta (7, 8).

Mutacija MTHFR C677T dovodi do sinteze termolabilnog oblika proteina i njegove manje enzimske aktivnosti, usled čega je smanjena konverzija homocisteina u metionin. Kod homozigotnih nosilaca mutacije, koji unose manju količinu folata može da nastane, hiperhomocisteinemija. Mutacija je sa velikom učestalošću prisutna u svim dosad analizovanim populacijama (30–50% heterozigota i oko 9–12% homozigota je prisutno kod zdravih ljudi). Iako je pokazano da hiperhomocisteinemija predstavlja rizik za pojavu venskih tromboza o ulozi MTHFR C677T mutacije u njihovoj patogenezi još uvek postoje suprotna mišljenja (9–11).

Pravilan dijagnostički pristup kod TDV koje se javljaju u toku trudnoće ili puerperijuma, kao i njihova prevencija, od velikog su značaja. Kako se radi o oboljenju, na čiji nastanak utiče više faktora prvi korak u ostvarivanju ovih ciljeva je definisanje faktora rizika i njihovih udela u patogenezi poremećaja. Cilj ove studije je određivanje učestalosti FV Leiden, FII G20210A i MTHFR C677T mutacija u grupi bolesnica kod kojih se prva TDV pojavila u toku trudnoće ili puerperijuma. Kako se radi o prvoj ovakvoj studiji kod nas, njen cilj je i da ukaže na značaj ovih faktora rizika u našoj populaciji.

Metode

Studija je obuhvatila grupu od 45 žena (životne dobi 20–46 godina, medijana 30 godina) kod kojih se prva epizoda TDV pojavila u toku trudnoće ili puerperijuma (šest nedelja nakon porođaja). Grupa je formirana od bolesnica koje su u periodu od 2000. do 2003. godine upućene na testiranje na prisustvo FV Leiden, FII G20210A i MTHFR C677T mutacija u Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Bolesnice kod kojih su otkriveni nedostaci proteina C, S ili antitrombina III, kao i maligni ili autoimunski poremećaji, nisu uzimane u razmatranje.

Uzorci periferne venske krvi bolesnica uzimani su uz Na-citrat kao antikoagulans u odnosu 1 : 9. Kako rezultati testiranja ne zavise od fiziološkog stanja organizma, uzorci su uzimani u različitim periodima nakon pojave tromboze.

Mutacije FV Leiden, FII G20210A i MTHFR C677T su dokazivane umnožavanjem željenog segmenta gena reakcijom lančanog umnožavanja polimerazom (*polimerase chain-reaction* – PCR) direktno iz uzoraka pune krvi, bez prethodne izolacije DNK. Nakon toga vršena je digestija odgovarajućim restriktionim enzimom i elektroforetsko razdvajanje dobijenih fragmenata DNK na gelu od poliakrilamida. Vizuelizacija traka na gelu je vršena bojenjem gela solima srebra.

Reakcije lančanog umnožavanja DNK za analizu FV Leiden i FII G20210A odvijale su se simultano, korišćenjem metode multipleks PCR koja je prethodno standardizovana u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (12). Reakcija lančanog umnožavanja DNK se odvijala u smeši zapremine 25 μ l koja je sadržala: 50 mmol/l Tris-HCl pH 9, 0,1% Triton X-100, 5 mmol/l MgCl₂, 200 μ mol/l dNTPs (Amersham Pharmacia), po 10 pmol graničnika za umnožavanje gena za faktor V i po 4 pmol graničnika za umnožavanje gena za faktor II, 2 U Taq polimeraze (Applied Biosystems) i 1 μ l venske krvi. Reakcija lančanog umnožavanja DNK za analizu prisustva MTHFR C677T mutacije takođe se odvijala u smeši zapremine 25 μ l, sledećeg sastava: 50 mmol/l Tris-HCl pH 9, 0,1% Triton X-100, 5 mmol/l MgCl₂, 200 μ mol/l dNTPs (Amersham Pharmacia), 10 pmol svakog od odgovarajućih graničnika, 1 U Taq polimeraze (Applied Biosystems) i 1 μ l venske krvi. Uslovi umnožavanja, korišćeni prajmeri i reference dati su u tabeli 1. Za digestiju su korišćeni MnlI i HindIII enzimi (New England BioLabs) kad je u pitanju simultano otkrivanje FV Leiden i FII G20210A mutacije i HinFI (New England BioLabs) za otkrivanje MTHFR C677T mutacije. Elektroforetsko razdvajanje je vršeno na 10% poliakrilamidnim gelovima, koji su nakon toga bojeni solima srebra (10, 12, 13).

Statistička obrada podataka urađena je u SPSS programskom paketu. Korišćen je χ^2 test sa nivoom statističke značajnosti od 0,05 i određivani su OR (*Odds Ratio*) i 95% CI (*Confidence Interval*) kao merilo faktora rizika. Faktori rizika su određivani u odnosu na ranije objavljene učestalosti ovih mutacija u zdravoj populaciji u našoj zemlji (14).

Rezultati

Od 45 ispitanica njih 24 (medijana za pojavu prve tromboze 25 godina) je imalo TDV u toku trudnoće, dok je njih 21 (medijana za pojavu prve tromboze 27 godina) imalo TDV nakon porođaja. Dvadeset osam bolesnica (62,2%) je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu, odnosno bar jednu epizodu tromboembolizma kod nekog od bliskih rođaka.

Mutacija FV Leiden u heterozigotnom obliku je detektovana kod 20 bolesnica (44,4%), dok je jedna bolesnica bila homozigotni nosilac ove mutacije (2,2%). Od 20 heterozigotnih nosilaca mutacije njih 10 je imalo trombozu u toku trudnoće (41,7%), a ostalih 10, kao i homozigotni nosilac mutacije, bilo je iz grupe žena sa trombozom nakon porođaja (47,6% i 4,8%) (tabela 2).

Табела 1

Uslovi umnožavanja i korišćeni prajmeri za reakciju lančanog umnožavanja polimerazom			
Analizovana mutacija	Korišćeni prajmeri	PCR	Referenca
FV Leiden i	5' TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC 3'	98°C 3 min	(12)
FII G20210A	5' TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA 3'	55°C 3 min	5×
	5' TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC 3'	98°C 5 min	
	5' ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C 3'	72°C 7 min	← Taq*
		94°C 5 min	
		94°C 1 min	
		57°C 1 min	30×
		72°C 1 min	
		72°C 10 min	
MTHFR	5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3'	98°C 3 min	(10)
C677T	5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'	55°C 3 min	5×
		72°C 7 min	← Taq*
		94°C 5 min	
		94°C 0,5 min	
		60°C 0,5 min	30×
		72°C 0,5 min	
		72°C 10 min	

*Taq polimeraza

Табела 2

Učestalost mutacija FV Leiden, FII G20210A i MTHFR C677T kod bolesnica sa trombozom dubokih vena u toku trudnoće ili u puerperijumu

		Bolesnice sa TDV			*Kontrolna grupa n = 130	†OR 95% CI
		U toku trudnoće n = 24	U puerperijumu n = 21	Ukupno n = 45		
FV Leiden	heterozigoti	10 41,7%	10 47,6%	20 44,4%	7 5,4%	14,1 5,4–36,8
	homozigoti	0	1 4,8%	1 2,2%	0	–
FII G20210A	heterozigoti	3 12,5%	3 14,3%	6 13,3%	6 4,6%	3,1 0,97–10,4
	homozigoti	0	0	0	0	–
MTHFR C677T	heterozigoti	11 45,8%	11 52,4%	22 48,9%	56 43,1%	1,3 0,7–2,6
	homozigoti	4 16,6%	5 23,8%	9 20%	15 11,5%	1,9 0,7–4,7

TDV – tromboze dubokih vena; OR – Odds Ratio; CI – Confidence Interval

* Podaci se odnose na zdravu populaciju (testirani su dobrovoljni davaoci krvi), Đorđević V i saradnici (14).

† OR i 95% CI su izračunavani u odnosu na kontrolnu grupu za ukupan broj bolesnica.

Od 45 bolesnica njih 6 su bile heterozigotni nosioci FII G20210A mutacije (13,3%). Homozigotnih nosilaca FII G20210A mutacije nije bilo. Od 6 nosilaca mutacije po 3 su bile u grupi sa trombozama u toku trudnoće i u grupi kod koje je tromboza detektovana posle porođaja (12,5% i 14,3%) (tabela 2).

Mutacija MTHFR C677T je u homozigotnom obliku utvrđena kod 9 bolesnica (4 u grupi sa trombozom u toku trudnoće i 5 u grupi sa trombozom u puerperijumu), dok su njih 22 bile heterozigotni nosioci (po 11 u svakoj grupi). To

daje učestalost od 20% (16,6 i 23,8%) za homozigotne nosioce i 48,9 (45,8 i 52,4%) za heterozigotne nosioce (tabela 2).

Kod 84,4% bolesnica je prisutna bar jedna od analiziranih mutacija, dok su njih 7 nosioci kombinovanih mutacija (1 heterozigotni nosilac FV Leiden i FII G20210A mutacije, 4 heterozigotna nosioca za FV Leiden i homozigotna nosioca za MTHFR C677T mutaciju, 1 heterozigotni nosilac za FII G20210A i homozigotni nosilac za MTHFR C677T mutaciju, dok je jedna bolesnica nosilac sve tri mutacije).

Diskusija

U ispitivanoj grupi bolesnica dobijena je visoka učestalost svih analizovanih mutacija. Kako je grupa formirana po kriterijumu koji isključuje bolesnice sa malignim i autoimunskim poremećajima, kao i bolesnice sa nedostatkom inhibitora koagulacije, njihova visoka učestalost ukazuje na veliki značaj ovih mutacija kod tzv. idiopatskih tromboza u trudnoći.

Mutacija FV Leiden je prisutna kod čak 44,4% bolesnica. Dobijena učestalost se poklapa sa dosad objavljenim podacima o zastupljenosti ove mutacije kod 43–46% bolesnica sa trombozom u toku trudnoće (15, 16). Ako učestalost FV Leiden mutacije posmatramo posebno u grupi žena sa trombozom u toku trudnoće, dobijamo vrednost od 41,6%, dok u grupi žena sa trombozom u puerperijumu taj procenat iznosi 47,6%. Između ovih grupa nema statistički značajne razlike u zastupljenosti FV Leiden mutacije (tabela 2). Razlog zašto jedna mutacija dovodi do tromboze u toku trudnoće kod jedne grupe bolesnica, a kod druge tek nakon porođaja treba tražiti u činjenici da se radi o multifaktornom oboljenju u čijem nastanku ima udela veći broj gena. Kada se dobijena učestalost uporedi sa učestalošću u zdravoj populaciji u našoj zemlji od 5,4% (14), dobija se da je FV Leiden mutacija faktor rizika od 14,1 (95% CI 5,4–36,8; $p < 0,001$) za pojavu tromboze u trudnoći ili puerperijumu. Dobijeni faktor rizika je znatno veći od onog koji je dobijen u poređenju kontrolne grupe sa neselektovanom grupom bolesnika sa TDV, koji iznosi 7,5 (95% CI 3,2–17,7) (14).

Kada se dobijena učestalost za FII G20210A mutaciju od 13,3% uporedi sa učestalošću dobijenom u zdravoj populaciji (4,6%), dobija se faktor rizika od 3,1 (95% CI 0,97–10,4; $p = 0,046$), što je takođe veći faktor rizika od

dobijenog za neselektovanu grupu bolesnika sa TDV – 2,5 (95% CI 0,92–6,8) (14). Učestalost FII G20210A mutacije je vrlo slična u obe analizovane grupe (tabela 2).

Kod MTHFR C677T mutacije u poređenju sa zdravom populacijom u našoj zemlji dobijamo faktore rizika od 1,9 (95% CI 0,7–4,7; $p = 0,155$) za homozigotne nosioce i 1,3 (95% CI 0,7–2,6; $p = 0,443$) za heterozigotne, što su takođe veći faktori rizika od onih dobijenih za neselektovanu grupu bolesnika. Ukupna učestalost MTHFR C677T alela je veća kod bolesnica sa trombozom u toku puerperijuma (50%) u odnosu na grupu bolesnica sa trombozom u toku trudnoće (39,6%). Razlika nije statistički značajna, ali možda ima uzrok u različitom nivou raspoloživog folata u toku same trudnoće i nakon porođaja.

Zaključak

Mutacije FV Leiden i FII G20210A predstavljaju značajne faktore rizika za pojavu TDV u toku trudnoće i u puerperijumu i svakako ih treba uključiti u rutinsko testiranje. To je naročito značajno kod bolesnica sa pozitivnom porodičnom anamnezom jer bi se time omogućila prevencija oboljenja.

Mutacija MTHFR C677T u homozigotnom obliku je manje značajan faktor rizika, ali bi je trebalo razmatrati kao dodatni faktor rizika u kombinaciji sa drugim mutacijama ili kod bolesnica sa manjim unosom folata.

Zahvalnost

Ovaj rad je finansiralo Ministarstvo za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije, preko projekta 1417.

L I T E R A T U R A

1. Eldor A. Thrombophilia, thrombosis and pregnancy. *Thromb Haemost* 2001; 86(1): 104–11.
2. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353(9159): 1167–73.
3. Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86(1): 395–403.
4. De Stefano V, Leone G. Resistance to activated protein C due to mutated factor V as a novel cause of inherited thrombophilia. *Haematologica* 1995; 80(4): 344–56.
5. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369(6475): 64–7.
6. Bertina RM, Reitsma PH, Rosendaal FR, Vandembroucke JP. Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; 74(1): 449–53.
7. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. 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* 1996; 88(10): 3698–703.
8. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aitach M, Siscovick DS, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79(4): 706–8.
9. Boers GH. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for arterial and venous disease. A review of evidence and relevance. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 520–2.
10. 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(1): 111–3.
11. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol* 2000; 13(1): 20–33.
12. Dorđević V, Rakičević Lj, Gagić M, Nikolić A, Savić A. Simultaneous detection of factor V Leiden and factor II

- G20210A variant by a multiplex PCR on whole blood. *Balc J Med Gen* 2001; 4(1, 2): 15–7.
13. *Radojković D, Kusić J.* Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem* 2000; 46(6 Pt 1): 883–4.
14. *Đorđević D, Rakićević Lj, Miković D, Kovač M, Radojković D, Savić A.* The FV Leiden, FII G20210A and MTHFR C677T mutations in healthy and thrombophilic Yugoslav population. *J Thromb Haemost* 2003; 1(1): 338.
15. *Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M,* 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): 374–80.
16. *Martinelli I, De Stefano V, Taioli E, Paciaroni K, Rossi E, Mannucci PM.* Inherited thrombophilia and first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium. *Thromb Haemost* 2002; 87(5): 791–5.

Rad je primljen 23. III 2004. god.

Abstract

Đorđević V, Rakićević Lj, Spasić M, Miljić P, Miković D, Kovač M, Radojković D. *Vojnosanit Pregl* 2005; 62(3): 201–205.

FACTOR V LEIDEN, FII G20210A, MTHFR C677T MUTATIONS AS RISK FACTORS FOR VENOUS THROMBOSIS DURING PREGNANCY AND PUERPERIUM

Background. Venous thrombosis is the most common cause of obstetric morbidity and mortality during pregnancy and puerperium. The incidence of pregnancy-associated venous thrombosis varies from 1 in 1000 to 1 in 2000 deliveries. Factor V G1691A (FV Leiden), FII G20210A and MTHFR C677T mutations are the most common genetic risk factors for thromboembolism. The aim of this study was to establish the presence of these risk factors in a group of women with an episode of deep venous thrombosis during pregnancy or puerperium. **Methods.** The study was carried in a group of 45 women with the first episode of deep venous thrombosis during pregnancy or puerperium. The patients with antiphospholipid antibodies, antithrombin III, protein C or protein S deficiency, and autoimmune and malignant diseases were excluded from the study. FV Leiden, FII G20210A, and MTHFR C677T mutations were detected by polymerase chain reaction, followed by digestion with specific restriction enzymes. **Results.** Twenty heterozygous carriers of the FV Leiden mutation and one homozygous carrier were detected, which represents the frequencies of 44.4% and 2.2%, respectively. For the FII G20210A mutation, six heterozygous carriers were identified, giving the frequency of 13.3%. The MTHFR C677T mutation was observed in 31 patients (22 heterozygous and 9 homozygous carriers) which represents the frequencies of 48.9% and 20%, respectively. **Conclusion.** Our study suggested that the obligatory testing for FV Leiden and FII G20210A mutations was strongly recommended in women with history of venous thrombosis during pregnancy and puerperium. We found a slight effect of MTHFR 677T allele, but it should be considered in association with other risk factors.

Key words: genes; mutation; factor V; prothrombin; blood coagulation disorders; thrombosis; pregnancy; puerperium; risk factors.