

**ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА ФАКТОРА
ВИЛЛЕБРАНДА (T2385C), ГЕНА СИНТАКСИН СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА STXBP5
(ASN436SER) , ГЕНА СИНТАКСИНА STX2 (G787A) И ИХ ВЛИЯНИЕ НА УРОВЕНЬ
АКТИВНОСТИ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА И ФАКТОРА VIII У ЗДОРОВЫХ
ЖЕНЩИН В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ**

Колосков А.В.,^{1,2} Филиппова О.И.,^{1,2} Лыщев А.А.,³ Зинкевич И.Т.,³ Батурина О.А.,^{1,3}
Гуляихина Д.Е.,^{1,2} Васильева М.Ю.^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.
Мечникова» Министерства здравоохранения России

191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41, т. (812) 948-09-17

Andrei.Koloskov@szgmu.ru

²СПб ГБУЗ «Городская больница № 26»

196247, Россия, Санкт-Петербург, ул. Костюшко, д. 2, т. (812) 375-30-10

milidoctor@mail.ru

³ООО «МедЛаб СПб»

192029, Россия, Санкт-Петербург, пр. Обуховской обороны, д. 71, т. (812) 360-57-04

laa0209@mai.ru

Резюме: Выполнено исследование частоты встречаемости полиморфизмов гена фактора Виллебранда (ген VWF), гена синтаксин связывающего белка (ген STXBP5) и гена синтаксина (ген STX2) в популяции здоровых женщин, жительниц Санкт-Петербурга, европеоидов и изучена корреляционная связь между полиморфизмом указанных генов и уровнем активности фактора Виллебранда (VWF) и фактора VIII (FVIII). Полиморфизм T2385T гена VWF встречался с частотой 19 %, частота встречаемости полиморфизмов T2385C и C2385C составила 44 % и 37 %, соответственно. Полиморфизм Asn436Asn гена STXBP5 встречался в изучаемой популяции с частотой 28 %, а полиморфизмы Asn436Ser и Ser436Ser с частотой 51 % и 21 %, соответственно. Частота встречаемости полиморфизма G787G гена STX2 составила 46 %, соответственно полиморфизмы G787A и A787A встречались с частотой 34 % и 20 %. Средний уровень активности VWF у индивидуумов, носителей полиморфизмов T2385C и C2385C гена VWF был достоверно ниже, по сравнению с таковым у лиц, носителей полиморфизма T2385T гена VWF. При анализе уровня активности VWF в зависимости от генетических вариаций в генах STXBP5 и STX2

достоверных различий не выявлено. Средний уровень активности VWF у лиц с сочетанием гетерозиготных аллелей (Asn436Ser и A787G), был достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем у лиц с сочетанием гомозиготных аллелей (Ser436Ser и A787A). При всех выявленных корреляционных связях снижение показателя среднего уровня активности VWF сопровождалось снижением среднего уровня активности FVIII.

Ключевые слова: ген фактора Виллебранда, ген STXBP5, ген STX2, фактор Виллебранда, фактор VIII, популяционное исследование

FREQUENCY OF GENETIC POLYMORPHISMS VON WILLEBRAND FACTOR (T2385C), SYNTAXIN BINDING PROTEIN (ASN436SER), SYNTAXIN (G787A) AND THEIR IMPACT ON ACTIVITY OF VON WILLEBRAND FACTOR AND FACTOR VIII IN HEALTHY WOMEN IN SAINT-PETERSBURG

Koloskov A.V.,^{1,2} Philippova O.I.,^{1,2} Lyshchev A.A.,³ Zinkevich I.T.,³ Baturina O.A.,^{1,3} Gulyaikhina D.E.,^{1,2} Vasileva M.Yu.^{1,2}

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St.Petersburg, Russia, e-mail: Andrei.Koloskov@szgmu.ru

²City Hospital № 26, St.Petersburg, Russia, e-mail: milidoctor@mail.ru

³ «MedLabSPb» Ltd., St.Petersburg, Russia, e-mail: laa0209@mai.ru

Abstract: The research of frequency genetic polymorphisms von Willebrand factor (VWF), syntaxin binding protein (STXBP5) and syntaxin (STX2) in a population of Saint-Petersburg residents, Caucasian. We have investigated correlation between polymorphisms of these genes and the activity levels of von Willebrand factor (VWF) and factor VIII (FVIII). T2385T VWF polymorphism occurs with a frequency of 19%, the frequency of C2385C and T2385C polymorphism was 44% and 37%, respectively. Asn436Asn STXBP5 met in the study population with a frequency of 28%, and polymorphisms Asn436Ser and Ser436Ser with a frequency of 51% and 21%, respectively. The frequency of polymorphism G787G STX2 - 46%, respectively polymorphisms G787A and A787A occurred at a frequency of 34% and 20%. Mid VWF activity in individuals and carriers of polymorphism T2385C and C2385C VWF gene was significantly lower compared with that of those carriers of polymorphism T2385T VWF. In the analysis of the level of activity of VWF, depending on the genetic variations in genes STXBP5 and STX2 and no significant differences were found. The average level of activity of VWF in patients with heterozygous combination of alleles (Asn436Ser and A787G), was significantly lower compared to

the same period in patients with homozygous combination of alleles (Ser436Ser and A787A). With all the identified correlation relationships decline in the average level of VWF activity was accompanied by a decrease in the average level of activity of FVIII.

Keywords: von Willebrand factor gene, STXBP5 gene, STX2 gene, von Willebrand factor, factor VIII, population-based study

Женщины с наследственными нарушениями свертывающей системы крови имеют риск геморрагических осложнений вследствие нарушений гемостаза во время менструации и родов, проведения антикоагулянтной и антиагрегантной терапии. Болезнь Виллебранда является наиболее распространенным наследственным нарушением свертывающей системы крови с частотой встречаемости клинически выраженных форм до 2 % в общей популяции. Заболевание вызвано дефицитом и/или дисфункцией фактора Виллебранда (VWF), плазменного белка, который опосредует начальную адгезию тромбоцита в местах повреждения сосуда, а также связывает в циркуляции и стабилизирует фактор VIII (FVIII). Понимание роли VWF в системе гемостаза принципиально для стратификации геморрагических и тромботических рисков у женщин детородного возраста [1-3].

Ген фактора Виллебранда (ген VWF) человека находится на коротком плече 12 хромосомы. Он включает в себя 52 экзона, охватывающих 178 kb и дающих начало 9 kb мРНК. В отличие от гемофилии, при которой единственная крупная перестройка гена вызывает тяжелое заболевание, при болезни Виллебранда подобной стабильно повторяющейся мутаций нет. Существует достаточно устойчивая корреляционная связь между местом мутаций в гене VWF и подтипом болезни Виллебранда. Чрезвычайная изменчивость гена VWF влечет за собой фенотипическое разнообразие клинических проявлений при данной патологии [4,5]. Помимо полиморфизма гена VWF, на индивидуальные особенности метаболизма VWF также оказывают влияния полиморфизм других генов. Так полиморфизм гена синтаксин связывающего белка (ген STXBP5) и гена синтаксина (ген STX2) влияет на экзоцитоз фактора Виллебранда из мест хранения - телец Вейбеля-Палладе эндотелиальных клеток [6].

Целью исследования являлось изучение частоты встречаемости полиморфизмов генов VWF, STXBP5 и STX2 в популяции здоровых женщин, жительниц Санкт-Петербурга и выявление возможных корреляционных связей между полиморфизмом указанных генов и уровнем активности VWF и FVIII.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено в группе, состоящей из 100 клинически здоровых женщин в возрасте от 18 до 42 лет (средний возраст $29,8 \pm 6,9$ лет), жительниц Санкт-Петербурга, европеоидов.

Измерение уровня активности VWF и уровня активности FVIII выполнялось на автоматическом коагулометре ACL 7000 (Instrumentation Laboratory, США) с использованием реагентов HemosiIL.

Генотипирование полиморфизма гена VWF проводили с применением метода полимеразной цепной реакции с использованием аллель-специфических праймеров.

Генотипирование полиморфизма гена STXBP5 и гена STX2 проводили с применением метода полимеразной цепной реакции и последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Исследование групповой принадлежности выполнено с использованием моноклонольных антител по стандартной методике.

Полученные результаты обрабатывались с использованием статистической программы STATISTICA for Windows (Версия 10). Сравнение частотных характеристик качественных показателей проводилось с помощью непараметрических методов χ^2 , χ^2 с поправкой Йетса (для малых групп), критерия Фишера.

Результаты и обсуждение

Первым этапом исследования с целью оценки репрезентативности выборки нами проанализирована зависимость показателей уровня активности VWF и FVIII от группы крови по системе АВ0 у здоровых женщин в исследуемой нами выборке.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, в исследуемой группе частота

Таблица 1. Уровень активность VWF и FVIII в зависимости от группы крови по системе АВ0 у здоровых женщин.

группа крови	количество наблюдений (n)	уровень активности VWF (%) (M±m)	уровень активности FVIII (%) (M±m)
0	32	77,5 ± 26,7	85,1 ± 31,3
A	34	100,2 ± 30,5 *	111,3 ± 39,9 **
B	21	107,2 ± 29,3 *	103,3 ± 32,0 **
AB	13	101,2 ± 24,3 *	114,7 ± 23,8 **

Примечания: * различие с группой лиц, имеющих группу крови 0, статистически достоверно: лица с группой крови А ($p<0,01$), лица с группой крови В ($p<0,001$), лица с группой крови АВ ($p<0,05$);

** различие с группой лиц, имеющих группу крови 0, статистически достоверно ($p<0,01$);

встречаемости группы крови 0 составила 32%, группы крови А - 34%, группы крови В - 21% и группы крови АВ - 13%, что соответствует распределению частоты встречаемости групп крови в общей популяции жителей Санкт-Петербурга.

Активность VWF и FVIII была достоверно ниже у лиц с группой крови 0 по сравнению с лицами имеющими группу крови А, В или АВ, соответственно.

Полученные результаты подтверждают факт, что лица с группой крови 0 имеют более низкий уровень активности VWF, чем лица с другими группами крови по системе АВ0. Данное обстоятельство связывают с тем, что хотя скорость синтеза VWF не зависит от групповой принадлежности в системе АВ0, но у лиц с группой крови 0 период полураспада фактора Виллебранда короче и равен, примерно, 10 часам против 25,5 часов у лиц с другими группами крови. Кроме того, наглядно продемонстрировано, что у здоровых женщин существует зависимость между уровнем VWF и уровнем FVIII – снижение уровня VWF у индивидуумов с группой крови 0, по отношению к лицам с иными группами крови по системе АВ0, сопровождается снижением уровня FVIII, что представляется закономерным явлением, вследствие недостаточного стабилизирующего действия VWF на FVIII [3].

Таким образом, убедившись, что в исследуемой нами популяции прослеживаются две известных закономерностей метаболизма VWF, мы приступили к поиску других возможных закономерностей.

Как видно из данных, представленных в таблице 2 в изучаемой нами популяции

Таблица 2. Частота встречаемости полиморфизмов гена VWF (T2385C), гена STXBP5 (Asn436Ser) и гена STX2 (G787A) в популяции женщин детородного возраста в Санкт-Петербурге.

ген	полиморфизм	Частота встречаемости (%)
VWF	T2385T	19
	T2385C	44
	C2385C	37
STXBP5	Asn436Asn	28
	Asn436Ser	51
	Ser436Ser	21
STX2	G787G	46
	G787A	34
	A787A	20

полиморфизм T2385T гена VWF встречался с частотой 19 %, частота встречаемости полиморфизмов T2385C и C2385C составила 44 % и 37 %, соответственно. Полиморфизм Asn436Asn гена STXBP5 встречался в изучаемой популяции с частотой 28 %, а Asn436Ser и Ser436Ser с частотой 51 % и 21 %, соответственно. Частота встречаемости полиморфизма G787G гена STX2 составила 46 %, соответственно G787A и A787A встречались с частотой 34 % и 20 %.

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что полиморфизм гена VWF, гена STXBP5 и гена STX2 широко распространенное явление в популяции здоровых женщин, жительниц Санкт-Петербурга, европейской расы.

С целью оценки влияния генетических факторов на уровни активности VWF и FVIII выполнен анализ возможной корреляционной связи между полиморфизмом гена VWF, гена STXBP5 и гена STX2 и уровнем активности указанных клоттинговых белков. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Влияние полиморфизмов генов VWF, STXBP5 и STX2 на уровень активности VWF и FVIII в популяции здоровых женщин.

ген	полиморфизм	уровень активности VWF (%) (M±m)	уровень активности FVIII (%) (M±m)

VWF	T2385T	111,7 ± 27,9	110,8 ± 39,5
	T2385C	89,2 ± 30,3 *	103,5 ± 36,1
	C2385C	92,1 ± 28,6 *	93,4 ± 34,2 *
STXBP5	Asn436Asn	98 ± 33,6	100,6 ± 34,4
	Asn436Ser	89 ± 28,9	96,2 ± 34,2 **
	Ser436Ser	103,3 ± 26,5	116,3 ± 37,2
STX2	G787G	95,6 ± 30,1	102,2 ± 35,5
	G787A	89,4 ± 31,4	95,6 ± 32,4
	A787A	100,6 ± 27,9	112,6 ± 32,4

Примечания: * различие с группой лиц, носителей полиморфизма T2385T, статистически достоверно ($p < 0,05$).

** различие с группой лиц, носителей полиморфизма T2385T, статистически достоверно ($p < 0,05$).

По результатам нашего исследования уровень активности VWF у индивидуумов, носителей полиморфизмов T2385C и C2385C гена VWF был достоверно ниже, по сравнению с таковым у лиц, носителей полиморфизма T2385T гена VWF ($89,2 \pm 30,3$ % и $92,1 \pm 28,6$ % по сравнению с $111,7 \pm 27,9$ %, соответственно) ($p < 0,05$).

Кроме того, уровень активности FVIII у лиц с полиморфизмом C2385C гена VWF был достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем у лиц с полиморфизмом T2385T ($93,4 \pm 34,2$ % и $110,8 \pm 39,5$ %, соответственно) ($p < 0,05$).

Таким образом, нами выявлена взаимосвязь между полиморфизмами T2385C и C2385C гена VWF и более низким фоновым уровнем активности VWF, по сравнению с таковым у лиц, носителей полиморфизма T2385T гена VWF, в популяции здоровых женщин. По нашему мнению, выявленная связь между сниженным уровнем активности FVIII у здоровых женщин с полиморфизмом C2385C, по сравнению с таковым у здоровых женщин с полиморфизмом T2385T гена VWF, не является прямой закономерностью, отражающей непосредственное влияние структуры гена VWF на структуру и функцию клоттингового белка FVIII. Выявленная корреляция отражает известную взаимосвязь между низкими уровнями VWF и FVIII вследствие недостаточной стабилизации FVIII циркулирующим в кровотоке VWF.

Наименьшая активность VWF выявлена нами у лиц, носителей полиморфизма Asn436Ser в гене STXBP5, по сравнению с таковой у лиц, носителей полиморфизма Ser436Ser ($89 \pm 28,9$ % и $103,3 \pm 26,5$ %, соответственно). Однако выявленное отличие было статистически недостоверным ($p < 0,07$). При этом уровень активности фактора FVIII у лиц, носителей полиморфизма Asn436Ser в гене STXBP5 был достоверно ниже по сравнению с уровнем активности у носителей полиморфизма Ser436Ser ($96,2 \pm 34,2$ % и $116,3 \pm 37,2$ %, соответственно) ($p < 0,05$).

При анализе уровня активности VWF и уровня активности FVIII в зависимости от генетических вариаций в гене STX2 достоверных различий не выявлено ($p > 0,05$). Минимальный средний уровень активности VWF отмечен у лиц, носителей аллеля G787A в гене STX2, а максимальный – у носителей аллеля A787A ($89,4 \pm 31,4$ % и $100,6 \pm 27,9$ %, соответственно). Меньший уровень активности FVIII, ожидаемо, отмечался у лиц, носителей аллеля G787A, по сравнению с носителями аллеля A787A в гене STX2 ($95,6 \pm 32,4$ % и $112,6 \pm 32,4$ %, соответственно).

Таким образом, в полученных результатах исследования прослеживалась тенденция снижения уровня активности VWF и уровня активности FVIII у лиц с генетическими полиморфизмами Asn436Ser в гене STXBP5 и G787A в гене STX2 (гетерозиготные аллели), по сравнению с носителями гомозиготных аллелей Ser436Ser в гене STXBP5 и A787A в гене STX2. В связи с чем, на следующем этапе исследования был выполнен анализ влияния сочетания носительства двух гетерозиготных аллелей Asn436Ser в гене STXBP5 и G787A в гене STX2 на уровни активности VWF и FVIII по сравнению с таковыми у лиц – носителей гомозиготных аллелей Ser436Ser в гене STXBP5 и A787A в гене STX2. Как видно из данных представленных в таблице 4, средний уровень

Таблица 4. Уровень активности VWF и FVIII у лиц с сочетанием носительства гетерозиготных и гомозиготных в генах STXBP5 и STX2

уровень активности (%) ($M \pm m$)	генетический полиморфизм	
	группа 1 (Asn436Ser и A787G) n=21	группа 2 (Ser436Ser и A787A) n=6
VWF	$84,9 \pm 32,5$ *	$115,3 \pm 30,3$
FVIII	$92,8 \pm 34,3$ *	$145,8 \pm 43,5$

Примечание: * различие между группами 1 и 2 статистически достоверно ($p < 0,05$).

активности VWF у лиц с сочетанием гетерозиготных аллелей (Asn436Ser и A787G), был достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем у лиц с сочетанием гомозиготных аллелей (Ser436Ser и A787A) ($84,9 \pm 32,5$ % и $115,3 \pm 30,3$ %, соответственно) ($p < 0,05$). Ожидаемо, подобная закономерность была выявлена и в отношении уровня активности FVIII ($92,8 \pm 34,3$ % и $145,8 \pm 43,5$ % для гетерозиготных и гомозиготных носителей, соответственно) ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о наличии взаимосвязи между полиморфизмом генов VWF, STXBP5 и STX2 и уровнем активности VWF в популяции здоровых женщин, жительниц Санкт-Петербурга.

Выводы

1. Полиморфизм гена VWF, гена STXBP5 и гена STX2 широко распространенное явление в популяции здоровых женщин, жительниц Санкт-Петербурга, европеоидов.
2. Средний уровень активности VWF у индивидуумов, носителей полиморфизмов T2385C и C2385C гена VWF был достоверно ниже, по сравнению с таковым у лиц, носителей полиморфизма T2385T гена VWF.
3. При анализе уровня активности VWF в зависимости от генетических вариаций в генах STXBP5 и STX2 достоверных различий не выявлено.
4. Средний уровень активности VWF у лиц с сочетанием гетерозиготных аллелей (Asn436Ser и A787G), был достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем у лиц с сочетанием гомозиготных аллелей (Ser436Ser и A787A).
5. При всех выявленных корреляционных связях снижение показателя среднего уровня активности VWF сопровождалось снижением среднего уровня активности FVIII.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Колосков А.В., Столица А.А., Филиппова О.И. Болезнь Виллебранда у женщин // MEDLINE.RU: сетевой журнал. - 2013. - Том 14. - С. 113 – 134. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom14/art10.html>
2. Колосков А.В., Батурина О.А., Лышев А.А. и др. Тромботические и геморрагические риски у беременных женщин // MEDLINE.RU: сетевой журнал. - 2013. - Том 14. - С. 880 – 890. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom14/art69.html>

3. Колосков А.В. Особенности течения болезни Виллебранда у женщин: - СПб: «Коста», 2014. – 32 с.
4. Laffan M. Brown S.A., Collins P.W. et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization // Haemophilia. - 2004. – V.10. – P. 119-217.
5. Колосков А.В. Диагностика болезни Виллебранда: - СПб: «Коста», 2014. – 40 с.
6. Giblin J.P., Hewlett L.J., Hannah M.J. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells // Blood. – 2008. – V. 112. – P.957-964.