

Федеральное медико-биологическое агентство

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»**

**Генетические факторы риска венозного тромбоза у лиц молодого
возраста**

Санкт-Петербург
2015

Предисловие

Методические рекомендации посвящены выявлению генетических факторов риска венозного тромбоза (ВТ) среди лиц молодого возраста. Наряду с “классическими” факторами риска указанной патологии (обширное оперативное вмешательство, травма, иммобилизация, беременность, прием гормональных препаратов и т.д.), генетическая предрасположенность индивидуума играет существенную роль в патогенезе ВТ. Установление генетических факторов риска у пациента может быть использовано для уточнения молекулярных механизмов эпизода ВТ с целью прогнозирования характера его течения, в том числе, более информативной оценки риска осложненного течения тромбоза глубоких вен нижних конечностей (ТГВНК), включая развитие ТЭЛА или/и повторных эпизодов тромбоза, а также при коррекции схем лечения или/и профилактики тромботических осложнений.

Предназначены для специалистов, занимающихся лабораторной диагностикой нарушений системы гемостаза и их осложнений, а также для гематологов, хирургов, кардиологов, неврологов, терапевтов и врачей других специальностей.

Область применения: гематология, онкология, хирургия

Авторы: С.С. Бессмельцев, С.И. Капустин, А.В.Чечеткин, Л.П. Папаян, В.Е. Солдатенков, В.Д. Каргин, В.М. Шмелева, Ж.Ю. Сидорова, О.А. Смирнова, Л.Р. Алексанян

Рецензенты: доктор медицинских наук, профессор Е.Н. Имянитов
доктор медицинских наук, профессор Н.Н. Петрищев

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

Утверждены заместителем руководителя Федерального медико-биологического агентства
Е.Ю. Хавкиной 27.02.2015, Рег.№11-2015

Содержание

Введение	4
Обозначения и сокращения	5
Основные нормативные положения	6
1. Методика проведения исследования	6
1.1 Материалы исследования	6
1.2 Реактивы и оборудование	6
1.3 Подготовка к выполнению исследования	7
1.4 Проведение исследования	9
Заключение	12
Приложение А. Эффективность использования методики	13
Библиография	20

Введение

Развитие эпизодов ВТ представляет значительную проблему в различных областях медицины, причем в последние годы наблюдается омоложение данной патологии. Установление факторов риска тромбоза у лиц молодого возраста представляется весьма актуальной задачей, поскольку указанная группа составляет наиболее трудоспособную и репродуктивную часть населения. Наследственная тромбофилия (НТ), или генетически обусловленная склонность к тромбозу, играет важную роль в патогенезе ВТ. Однако до сих пор отсутствуют четкие представления о ее причинах, распространенности в общей популяции, значении в развитии тромботических осложнений. Установлено, что НТ носит полигенный характер, т.е. обусловлена наличием целого спектра различных молекулярно-генетических аномалий. Наряду с “классическими” детерминантами НТ – дефицитом естественных антикоагулянтов (антитромбина, протеинов С и S), а также мутациями в генах факторов II (G20210A) и V (G1691A, FV Leiden) свертывания крови, существенное влияние на риск возникновения ВТ может оказывать аллельный полиморфизм целого ряда других генов, вовлеченных в регуляцию гемостаза. Отсутствие данных о значимости вариантов указанных генов для индивидуальной оценки вероятности возникновения тромботического эпизода и прогнозирования характера его течения в значительной степени снижает ценность и эффективность молекулярно-генетического тестирования на наличие этих факторов.

В настоящих методических рекомендациях описана последовательность процедуры генотипирования пациента для анализа аллельного полиморфизма 25-ти генов, вовлеченных в регуляцию функциональной активности гемостаза, включая получение геномной ДНК из образцов венозной или капиллярной крови, постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего рестрикционного анализа. Приведены данные об эффективности молекулярно-генетической диагностики при выявлении лиц с риском возникновения ВТ в молодом возрасте, а также при прогнозировании особенностей течения тромботического процесса.

Для проведения генотипирования с помощью описанной методики используется стандартное оборудование, в том числе, отечественных производителей (ООО “ДНК-технология”, ООО “Хеликон”), а также доступные на российском рынке реактивы и расходные материалы. В качестве альтернативы, идентификация ряда описанных в методических рекомендациях генетических факторов риска тромбоза может быть выполнена с помощью коммерческих наборов реагентов и соответствующего специального оборудования, имеющихся на рынке и зарегистрированных на территории Российской Федерации.

Обозначения и сокращения

ВТ	–	венозный тромбоземболизм
ГГЦ	–	гипергомоцистеинемия, увеличение уровня гомоцистеина в плазме крови
Ген	–	единица наследственной информации, детерминирующая развитие того или иного признака, неделимая в функциональном отношении
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
КГ	–	контрольная группа
НТ	–	наследственная тромбофилия
ПДРФ	–	полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
ПТБ	–	посттромботическая болезнь
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РАС	–	ренин-ангиотензиновая система
ТГВНК	–	тромбоз глубоких вен нижних конечностей
ТЭЛА	–	тромбоэмболия легочной артерии
ЭД	–	эндотелиальная дисфункция
ЭДТА	–	этилендиаминтетраацетат натрия
CI	–	доверительный интервал (<i>англ.</i> – confidence interval)
НРА	–	антигенные системы тромбоцитов человека (<i>англ.</i> – human platelet antigens)
NO	–	оксид азота (<i>англ.</i> – nitric oxide)
OR	–	коэффициент “отношения шансов” (<i>англ.</i> – odds ratio)

Основные нормативные положения

1 Методика проведения исследования

1.1 Материалы исследования

Анализ проводится на образцах венозной или капиллярной крови, стабилизированной ЭДТА или цитратом натрия. Возможно проведение генотипирования как непосредственно после отбора крови, так и после ее хранения в соответствующих условиях. Допускается хранить пробирку с кровью в течение не более 1-х суток при комнатной температуре, в течение не более 3-х суток – при температуре от +2°C до +8°C, либо в течение не более 3-х месяцев при температуре от –18°C до –25°C (не допуская размораживания).

1.2 Реактивы и оборудование

- аппарат для проведения ПЦР в пробирках объемом 0,5-0,6 мл (термоциклер “Терцик” производства ООО “ДНК-технология” или аналогичный);
- пробирки для ПЦР объемом 0,6 мл (Ахуген, США, кат. N PCR-02D-C или аналогичные);
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка не более 3%), и подходящие к ним наконечники с фильтрами;
- центрифуга гематокритная;
- микроцентрифуга, развивающая ускорение 12 000 g;
- смеситель вихревой;
- твердотельный термостат типа «Термит» (“ДНК-технология”, Россия) или аналогичный, поддерживающий заданную температуру от +20°C до +95°C;
- система гель-документации производства Vilber Lourmat (Франция) или аналогичная;
- суховоздушный термостат типа ТС-20 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) или аналогичный, поддерживающий заданную температуру от +25°C до +60°C;
- спектрофотометр СФ-56 (ЛОМО, Россия) или аналогичный, позволяющий проводить измерение оптической плотности раствора при длинах волн 260 нм и 280 нм;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 мл;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 500 мкл;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 1500 мкл;
- штативы для пробирок «рабочее место» производства ООО “Хеликон” (Россия), или аналогичные, для пробирок объемом 500 мкл и 1500 мкл;
- лабораторный холодильник с морозильной камерой, обеспечивающей поддержание

- температуры в пределах от -20°C до -25°C ;
- бумага фильтровальная лабораторная;
 - перчатки резиновые хирургические;
 - трис-аминометан (Sigma, Кат.# T6791-500G);
 - натрия хлорид (Panreac, Кат.# 141659.1211);
 - натрия додецилсульфат (AppliChem, Кат.# A-1502,0250ф);
 - агароза (Panreac, Кат.# 374113.1208);
 - акриламид (AppliChem, Кат.# A-1089,0500ф);
 - масло минеральное (AppliChem, Кат.# A-2135,0100);
 - метилен-бис-акриламид (AppliChem, Кат.# A-3636,0050);
 - аммония персульфат (AppliChem, Кат.# A-1142,0250);
 - аммония хлорид (Amresco, Am-O621-0.5);
 - протеиназа К (Amresco, Am-O706-0,1);
 - натрия этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (AppliChem, Кат.# A-1104,0500);
 - термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза), ООО “Сибэнзим” (Россия), или аналогичная;
 - 10-кратный буфер для Taq-полимеразы, содержащий магния хлорид;
 - дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dANTP, dTTP, dCTP, dGTP);
 - олигонуклеотиды, ЗАО “Синтол” (Россия);
 - эндонуклеазы рестрикции (ООО “Сибэнзим”, МБИ “Fermentas”);
 - этидиум бромид (AppliChem, Кат.# A-1151,0010ф).

1.3 Подготовка к выполнению исследования

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической венозной крови

Для выделения геномной ДНК из периферических лейкоцитов использовали метод, описанный ранее [1]. К 3-4 мл периферической венозной крови, стабилизированной ЭДТА в конечной концентрации 0,25% или трехзамещенным основным цитратом натрия в конечной концентрации 0,38% и перелитой после перемешивания в пробирки вместимостью 15 мл, необходимо добавить 10 мл холодного ($+4^{\circ}\text{C}$) 0,83% раствора аммония хлорида. После этого перемешать содержимое переворачиванием пробирки в течение 30 секунд и оставить при комнатной температуре на 10-15 минут (лизис эритроцитов). Затем центрифугировать пробирку в течение 10 минут при 2000g, надосадочную жидкость (супернатант) слить и добавить к осадку лейкоцитов 2,5 мл раствора, содержащего 10 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 0,4 М NaCl; 2 мМ ЭДТА; 0,5%

додецилсульфат натрия (SDS) и протеиназу К в конечной концентрации 125 мкг/мл. Смесь инкубировать в течение 2-3 суток при 37°C. После полного лизиса лейкоцитов добавить в пробирку 1 мл 5 М NaCl с последующим интенсивным перемешиванием на встряхивателе и центрифугированием в течение 20 мин при 5500g. Аккуратно, не затрагивая верхнюю пленку и плотный осадок, отобрать супернатант в стерильный стеклянный стаканчик на 50 мл или бакпечатку. Осадить ДНК из надосадочной жидкости добавлением 5 мл 96% этилового спирта, намотать ее на стеклянную палочку и после высушивания при комнатной температуре в течение 5-10 минут растворить в 200 мкл бидистиллированной воды. После растворения ДНК в течение суток при +4°C определить ее концентрацию путем измерения оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 260 нм. При необходимости исходные образцы ДНК развести до концентрации 50-100 нг/мкл с помощью бидистиллированной воды перед проведением ПЦР.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов капиллярной крови

Капиллярную кровь в объеме 200-250 мкл отобрать в пробирку на 1500 мкл, содержащую 30 мкл 2,5% раствора ЭДТА, и сразу добавить 1 мл холодного (+4°C) 0,83% раствора аммония хлорида. Перемешать содержимое пробирки ее переворачиванием в течение 30 секунд и оставить пробирку при комнатной температуре на 10-15 минут. Центрифугировать пробирку в течение 10 минут при 2000g, супернатант слить или удалить с помощью водоструйного насоса. Добавить к осадку лейкоцитов 250 мкл раствора, содержащего 10 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 0,4 М NaCl; 2 мМ ЭДТА; 0,5% SDS и протеиназу К в конечной концентрации 125 мкг/мл. После инкубации смеси в течение 16-24 часов при 37°C или 2-3 часов при 55-60°C (до полного лизиса лейкоцитов) добавить в пробирку 100 мкл 5 М раствора NaCl и тщательно перемешать на встряхивателе. Затем центрифугировать в течение 15 мин при 12 000g и отобрать супернатант (200-300 мкл) в стерильную пробирку на 1500 мкл. Добавить к нему 500 мкл 96% этилового спирта и перемешать переворачиванием пробирки 5-6 раз. Центрифугировать 10 мин при 12 000g, затем аккуратно удалить супернатант. Добавить 1 мл 70% этилового спирта комнатной температуры и перемешать на встряхивателе в течение 20-30 секунд. Центрифугировать в течение 3 мин при 12 000g, после чего аккуратно удалить супернатант. Высушить осадок ДНК на твердотельном термостате при 60-65°C до полного испарения спирта и растворить в 120 мкл бидистиллированной воды в течение 16-24 часов при +4°C. Полученный образец ДНК можно использовать без разведения для постановки ПЦР. Перед постановкой ПЦР рекомендуется все образцы ДНК прогревать при 60-65°C в течение 30 минут.

1.4 Проведение исследования

В таблице 1 приведены гены компонентов, вовлеченных в регуляцию гемостаза, а также варианты их аллельного полиморфизма, которые были использованы для анализа в данном исследовании. Типирование полиморфизма проводили на основе амплификации ДНК *in vitro* с помощью ПЦР. Подробно условия проведения ПЦР для каждого гена описаны в библиографических источниках, указанных в таблице 1. Для идентификации аллельных вариантов генов ACE и TPA непосредственно после окончания ПЦР проводили разделение продуктов реакции методом электрофореза в 7% полиакриламидном геле. В остальных случаях, для выявления однонуклеотидных замен, использовался метод ПЦР-ПДРФ, предполагающий обработку ПЦР-продукта специфической эндонуклеазой рестрикции. После проведения рестрикционного анализа фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 7% (а для полиморфизма генов FI-A, PAI-1 и ApoE – в 10%) полиакриламидном геле.

Проведение ПЦР и рестрикционного анализа

Общий объем реакционной смеси составляет 15 мкл. Для постановки ПЦР в пробирку объемом 0,6 мл последовательно вносят: 7 мкл бидистиллированной воды, 3 мкл смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (концентрация каждого в смеси – 1 мМ), 1,5 мкл смеси олигонуклеотидов (концентрация каждого в смеси – 5 мкМ), 1,5 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы, содержащего магния хлорид, 0,2 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл) и 2 мкл образца геномной ДНК (в концентрации 50-100 нг/мкл). Сверху настилают 30-40 мкл минерального масла и помещают пробирки в термоциклер. Далее проводят ПЦР в условиях, которые подробно описаны в указанных в табл.1 источниках. После проведения 40 циклов ПЦР количество и качество образовавшегося продукта анализируют путем электрофореза аликвоты (3 мкл) в 2% агарозном геле. К оставшемуся в ПЦР-пробирке продукту добавляют 8 мкл рестрикционной смеси, содержащей 6 мкл бидистиллированной воды, 2 мкл 10-кратного буфера и 10-15 ед. соответствующей эндонуклеазы рестрикции. После инкубации в течение 16-20 часов при 37°C или 55°C (в зависимости от условий, рекомендуемых производителем для каждой эндонуклеазы рестрикции) продукты анализируют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. По окончании электрофореза гель окрашивают с помощью раствора этидиума бромида в концентрации 1 мкг/мл и визуализируют фрагменты ДНК на трансиллюминаторе. После документирования результатов анализа с помощью системы гель-документации проводят оценку генотипа анализируемых образцов геномной ДНК по количеству и размерам образовавшихся фрагментов рестрикции.

Таблица 1 – Исследованные генетические варианты и методы их идентификации

Ген (сокращение)	Локализация	Полиморфизм	Метод	Источник
<i>Гены плазменных факторов гемостаза:</i>				
Фактор I, β-субъединица (FI-B)	4q28	-455 G/A	ПЦР-ПДРФ	[2]
Фактор II (FII)	11p11-q12	20210 G/A	ПЦР-ПДРФ	[3]
Фактор V (FV)	1q23	1691 G/A	ПЦР-ПДРФ	[4]
Фактор XII (FXII)	5q33-qter	46 C/T	ПЦР-ПДРФ	[5]
Ингибитор активатора плазминогена типа I (PAI-1)	7q21.3-q22	-675 4G/5G	ПЦР-ПДРФ	[6]
Тканевой активатор плазминогена (TPA)	8p12	311 bp I/D	ПЦР	[7]
Фактор I, α-субъединица (FI-A)	4q31	4266 A/G	ПЦР-ПДРФ	[8]
Фактор XIII, A-субъединица (FXIII-A)	6p25	163 G/T	ПЦР-ПДРФ	[9]
Витамин К-эпоксид редуктаза (VKORC1)	16p11	-1639 G/A	ПЦР-ПДРФ	[10]
<i>Гены компонентов тромбоцитарных рецепторов:</i>				
Гликопротеин Ia (GpIa)	5q23-q31	807 C/T	ПЦР-ПДРФ	[11]
Гликопротеин Ib, α-субъединица (GpIbα)	17pter-p12	434 C/T	ПЦР-ПДРФ	[12]
Гликопротеин IIIa (GpIIIa)	17q21.32	1565 T/C	ПЦР-ПДРФ	[12]
Рецептор АДФ (P2RY12)	3q24-q25	H1/H2	ПЦР-ПДРФ	[13]
<i>Гены компонентов, ассоциированных с эндотелиальной дисфункцией:</i>				
Метилентетрагидро- фолат редуктаза (MTHFR)	1p36.3	677 C/T	ПЦР-ПДРФ	[14]
Эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS)	7q35-q36	-786 T/C	ПЦР-ПДРФ	[15]
Аполипопротеин E (ApoE)	19q13.2	E2/E3/E4	ПЦР-ПДРФ	[16]

Продолжение таблицы 1

Ангиотензиноген (AGT)	1q42-q43	704 T/C	ПЦР-ПДРФ	[17]
Ангиотензин-превращающий фермент (ACE)	17q23.3	287 bp I/D	ПЦР	[18]
Рецептор ангиотензина II 1-го типа (ATGR1)	3q22	1166 A/C	ПЦР-ПДРФ	[19]
β 3-субъединица G-белка (GNB3)	12p13	C825T	ПЦР-ПДРФ	[20]
Эндотелиальный рецептор протеина С (EPCR)	20q11	6936 A/G	ПЦР-ПДРФ	[21]
Ген гемохроматоза (HFE)	6p22	G845A	ПЦР-ПДРФ	[22]
Фактор некроза опухоли-альфа (TNFA)	6p21	-308 G/A	ПЦР-ПДРФ	[23]
Интерлейкин-6 (IL-6)	7p15	-176 G/C	ПЦР-ПДРФ	[24]
Интерлейкин-1В (IL-1В)	2q13	-31 T/C	ПЦР-ПДРФ	[25]
Примечание – ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов				

Статистическая обработка результатов

Для установления генетических факторов риска ВТ проводится сравнительный анализ частот встречаемости аллелей и генотипов изученных генов в группах больных и в КГ с использованием точного критерия Фишера. Частоты встречаемости определяют прямым подсчетом. Для оценки степени различий между группами используются следующие показатели: коэффициент “отношения шансов” (OR – *odds ratio*) с 95% доверительным интервалом (CI – *confidence interval*), а также р-значение.

Заключение

В результате анализа аллельного полиморфизма 25-ти генов, вовлеченных в регуляцию гемостаза, в группе из 400 пациентов с ранним дебютом ВТ, установлены новые генетические факторы риска данной патологии у лиц молодого возраста – это генотип FI-A 312Ala/Ala и вариант EPCR Gly219. У женщин самостоятельным фактором риска ВТ в возрасте до 45 лет включительно является также генотип FXIII-A 163ТТ. Диагностика указанных вариантов, а также “классических” детерминант НТ позволяет установить наличие генетического фактора риска более чем у половины больных с ранним дебютом ВТ (в обследованной группе пациентов – у 56,5% мужчин и у 58,8% женщин). Таким образом, наряду с определением мутаций FII G20210A и FV G1691A, всем лицам с ранней манифестацией ВТ в качестве скринингового обследования на наличие НТ рекомендуется типирование полиморфизма генов FI-A и EPCR. Кроме того, у женщин с ВТ целесообразно определять генотип А-субъединицы фактора XIII свертывания крови.

Для уточнения молекулярных механизмов патогенеза и прогнозирования течения тромбоза всем пациентам с дебютом ВТ в возрасте до 45 лет включительно рекомендуется также типирование полиморфизма генов, ассоциированных с уровнем фибриногена в плазме крови (FI-B), фибринолитическим потенциалом индивидуума (PAI-1, FXII), активностью тромбоцитарного звена гемостаза (GpIa, GpIb α , GpIIIa и P2Y₁₂) и развитием эндотелиальной дисфункции (AGT, ACE, ATGR1, eNOS, MTHFR, ApoE, TNF-A и IL-1B).

Совокупная оценка риска возникновения ВТ у лиц молодого возраста, наряду с исследованием генотипа, должна основываться на анализе анамнеза и клинических данных пациента, с учетом всех приобретенных (вторичных) факторов риска тромбоза.

Эффективность использования в клинической практике описанных в настоящих методических рекомендациях молекулярно-генетических методов обусловлена тем, что они способствуют более четкому выделению групп риска по ВТ среди лиц молодого возраста, а также позволяют выявлять в группе больных с ранней манифестацией ВТ пациентов, характеризующихся наследственной предрасположенностью к тромбозу с осложненным течением.

Приложение А (рекомендуемое)

Эффективность использования методики

Оценка роли аллельного полиморфизма генов плазменных факторов гемостаза

Для выявления генетических факторов риска ВТ у лиц молодого возраста был проведен сравнительный анализ распределения генотипов изученных генов в группе пациентов с ранним дебютом ВТ (до 45 лет включительно) и у лиц, не имевших в анамнезе эпизодов венозного или артериального тромбоза (контрольная группа – КГ). В группу пациентов с ВТ вошли 216 женщин и 184 мужчин (средний возраст группы – $35,7 \pm 9,3$ года). Были выбраны следующие критерии отбора в исследуемую группу: наличие в анамнезе хотя бы одного объективно доказанного эпизода ВТ; отсутствие в анамнезе эпизодов артериального тромбоза, иных проявлений артериальной патологии (ишемическая болезнь сердца, облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей, цереброваскулярные заболевания), а также онкологических и гематологических заболеваний. ТГВНК был диагностирован у 339 пациентов, при этом в 245 (72,3%) случаях клинично-инструментальное обследование не выявило признаков ТЭЛА (подгруппа “изолированный ТГВНК”), тогда как у 94 (27,7%) пациентов ТГВНК осложнился развитием ТЭЛА (подгруппа “ТГВНК+ТЭЛА”). У 61 больного, перенесшего ТЭЛА, клинично-инструментальное обследование не выявило признаков ТГВНК (подгруппа “изолированная ТЭЛА”). Рецидивирующий характер течения ВТ был установлен у 134 (33,5%) пациентов. Контрольную группу составили 254 донора крови, соответствовавших по полу и возрасту исследуемой группе больных. Все обследованные лица являлись жителями Северо-Западного региона России.

“Классические” детерминанты НТ – мутации FII G20210A и FV Leiden – были обнаружены у 9,8% и 17,3% больных с ранним дебютом ВТ соответственно, тогда как в КГ доля носителей этих дефектов составила 2,2% и 4,4%. В полном соответствии с данными большинства отечественных и зарубежных исследователей, а также полученными нами ранее результатами, среди всех изученных генетических вариантов указанные мутации в генах факторов II и V явились наиболее значимыми факторами риска развития ВТ в молодом возрасте (OR=4,8; 95%CI: 1,9-12,4; $p=0,0003$ и OR=4,5; 95%CI: 2,3-9,0; $p<0,0001$ соответственно). При этом одновременное гетерозиготное носительство мутаций FII G20210A и FV G1691A наблюдалось у 5 (1,3%) пациентов, а 4 (1,0%) больных являлись гомозиготами по варианту FV Leiden. В целом, доля пациентов, имеющих в генотипе указанные детерминанты НТ, составила 25,8% (против 6,6% в

здоровой популяции Северо-Запада России). Таким образом, скрининг на наличие мутаций FII G20210A и FV G1691A является, безусловно, необходимым этапом при установлении генетических причин предрасположенности к тромбозу у лиц с ранним дебютом ВТ.

Следует, тем не менее, отметить, что, как и в подавляющем большинстве других исследований, доля носителей “классических” детерминант НТ составила менее половины от всех обследованных нами больных. Кроме того, указанные мутации в генах факторов II и V свертывания крови, в целом, не оказывают существенного влияния на тяжесть течения тромботического процесса. Так, в группе пациентов с рецидивирующим течением ВТ мутации FV Leiden и FII G20210A наблюдались у 15,6% и 9,7% соответственно, тогда как у лиц с единственным эпизодом тромбоза в анамнезе их частоты встречаемости составили 18,0% и 10,6%. Повторные эпизоды ВТ были выявлены только у одного из четырех гомозиготных носителей Лейденской мутации. “Классические” детерминанты НТ также не связаны с увеличением риска развития тромбоемболических осложнений. Мутация G20210A в гене протромбина несколько чаще обнаруживалась у пациентов с признаками ТЭЛА (12,3% против 8,2% в группе лиц с неосложненным течением ТГВНК), однако это различие не было статистически значимым. Лейденская мутация, напротив, значительно чаще встречалась в группе пациентов с “изолированным ТГВНК” – 20,8% против 11,6% у больных с наличием ТЭЛА (OR=2,0; 95%CI: 1,1-3,6; p=0,021). У всех 4-х обследованных нами гомозигот по варианту FV Leiden наблюдался неосложненный характер течения ТГВНК (без признаков ТЭЛА). Полученные результаты указывают на важную роль иных генетических вариантов в патогенезе ВТ у лиц молодого возраста, в том числе, и ряда из тех, которые были проанализированы в данном исследовании.

При изучении особенностей полиморфизма генов некоторых других плазменных факторов системы гемостаза было обнаружено, что в группе пациентов с ранним дебютом ВТ значительно чаще, по сравнению с КГ, встречаются гомозиготы по аллелю 4266G гена FI-A, кодирующему вариант α -субъединицы фибриногена, который содержит аланин в 312-ой аминокислотной позиции (Ala312) – 14,0% против 5,0% соответственно (OR=3,1; 95%CI: 1,6-5,9; p=0,0003). Увеличение риска ВТ в молодом возрасте у лиц с указанным генотипом FI-A не зависело от пола индивида: в группе женщин с ВТ доля гомозиготных носителей варианта FI-A Ala312 составила 14,4%, а в группе пациентов мужского пола – 13,6%. Полученные нами данные согласуются с результатами зарубежных исследований, свидетельствующими о связи полиморфизма FI-A Thr312Ala, который оказывает влияние на структуру фибринового сгустка, с развитием ВТ [8]. Стоит отметить, что высокая доля лиц с генотипом FI-A 312Ala/Ala (13,8%) наблюдалась нами среди пациентов, не имевших

“классических” детерминант НТ (OR=3,1; 95%CI: 1,6-6,0; p=0,0007, при сравнении с КГ). Это указывает на самостоятельную значимость указанного генетического варианта как фактора риска возникновения ВТ в молодом возрасте в популяции Северо-Запада России. Кроме того, наличие генотипа FI-A 312Ala/Ala может иметь прогностическое значение у лиц с ранним дебютом ВТ, в частности, указывать на повышенный риск развития ТЭЛА. В обследованной нами группе пациентов максимальная частота встречаемости данного варианта (19,7%) была обнаружена в подгруппе “изолированная ТЭЛА”, а минимальная (12,7%) – у лиц с ТГВНК, не осложненным ТЭЛА.

Наряду с заменой FI-A Thr312Ala, значительное влияние на кинетику образования фибринового сгустка, его структуру и устойчивость к лизису оказывает полиморфизм G163T гена А-субъединицы фибрин-стабилизирующего фактора, или фактора XIII (FXIII-A), следствием которого является аминокислотная замена Val34Leu. Несмотря на данные об увеличении трансклутаминазной активности фактора XIII у лиц с генотипом 34Leu/Leu, большинство исследователей указывают на нейтральный или протективный эффект варианта FXIII-A 34Leu в отношении риска развития ВТ. Тем не менее, в обследованной нами группе пациентов с ВТ доля гомозигот по аллелю 163T гена фактора XIII превышала таковую в КГ (9,5% против 5,9%), хотя это различие не было статистически значимым. Частота встречаемости генотипа 163TT у пациенток с ранним дебютом ВТ (11,6%) была почти в 2 раза выше, чем в здоровой популяции (OR=2,1; 95%CI: 1,1-4,1; p=0,03), тогда как у мужчин этот показатель (7,1%) оказался близким к норме. Наиболее выраженным отличием от КГ характеризовалась группа женщин с ВТ, не имевших “классических” детерминант НТ – мутаций в генах факторов II и V. В этой группе частота встречаемости гомозигот по аллелю FXIII-A 163T составила 13,7%, по сравнению с 5,9% в КГ (OR=2,5; 95%CI: 1,3-5,0; p=0,008). Полученный результат указывает на самостоятельную роль генотипа FXIII-A 163TT как фактора риска ВТ у женщин молодого возраста.

Важное место в оценке молекулярно-генетических механизмов патогенеза ВТ у лиц молодого возраста должно отводиться определению маркеров индивидуальной склонности к снижению фибринолитического потенциала. Наибольшее значение при этом имеет установление генотипов PAI-1 и фактора XII. Носительство “неблагоприятных” вариантов указанных генов (-675 4G и 46T, соответственно) само по себе не оказывает существенного влияния на риск возникновения ВТ, однако в значительной степени модифицирует его. Прежде всего, следует отметить полиморфизм генов, ассоциированных с повышенной активацией плазменного или/и тромбоцитарного звеньев гемостаза. Генотипирование PAI-1 и фактора XII, по нашим данным, может иметь и прогностическое значение, поскольку варианты указанных генов, ассоциированные со

снижением фибринолитической активности, наиболее часто обнаруживались у пациентов с признаками ТЭЛА. В частности, максимальная доля лиц с генотипом 4G/4G гена PAI-1 (42,6%) наблюдалась в подгруппе “изолированная ТЭЛА”, что значительно превысило соответствующий показатель у пациентов с неосложненным течением ТГВНК – 28,6% (OR=1,9; 95%CI: 1,0-3,3; p=0,045).

Оценка роли аллельного полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов

При установлении причин индивидуальной склонности к тромбозам большое значение имеет определение генотипа пациента по полиморфизму генов тромбоцитарных рецепторов, участвующих в процессах адгезии и агрегации кровяных пластинок. Наиболее значимыми, с клинической точки зрения, являются однонуклеотидные замены в генах гликопротеинов (Gp) Ia, Ib α , IIIa, а также рецептора АДФ – P2Y₁₂. Сравнительный анализ распределения генотипов по этим генам в обследованной группе больных и в КГ показал, что полиморфизм указанных рецепторов не имеет значительной самостоятельной роли в формировании предрасположенности к ВТ у лиц молодого возраста. Тем не менее, при сочетании с иными факторами риска (как наследственными, так и приобретенными) носительство “неблагоприятных” аллельных вариантов генов GpIa, Ib α , IIIa и P2Y₁₂ может не только увеличивать вероятность возникновения ВТ, но и оказывать влияние на особенности его клинического течения. В частности, одновременное наличие в генотипе индивида аллелей GpIa 807T и MTHFR 677T приводит к увеличению риска развития ВТ примерно в 1,5 раза (OR=1,4; 95%CI: 1,1-2,0; p=0,045). Носительство гаплотипа H2 гена P2Y₁₂ увеличивает вероятность возникновения ВТ в возрасте до 45 лет у лиц с “классическими” детерминантами НТ – FII G20210A и FV Leiden, а в случае мутации в гене протромбина, кроме того, является неблагоприятным прогностическим фактором, поскольку способствует повышению риска развития ТЭЛА.

Особое внимание следует обратить на высокую вероятность раннего дебюта ВТ и тяжелого характера его клинического течения при сочетании протромбогенных вариантов генов тромбоцитарных рецепторов и такого фактора риска, как гипергомоцистеинемия (ГГЦ). В этом случае риск тромботического поражения возрастает многократно, при этом высока вероятность развития повторных эпизодов тромбоза, посттромботической болезни (ПТБ) или/и ТЭЛА. При обнаружении у пациента гомозиготного статуса по редким аллелям генов GpIIIa (1565CC) или/и GpIb α (434TT) следует учесть вероятность наличия антител у лиц с такими генотипами, поскольку полиморфизм указанных генов связан с изменением антигенных свойств соответствующих рецепторов и формированием аллоантигенных систем тромбоцитов (HРА-1 и -2 соответственно). В этих случаях при

развернутом гемостазиологическом обследовании пациента целесообразно проводить диагностику как антифосфолипидных, так и антитромбоцитарных антител в плазме крови. Таким образом, выявление “неблагоприятных” аллельных вариантов генов GrIa, Iba, IIIa и P2Y12 является важным этапом при комплексной оценке риска развития ВТ у лиц молодого возраста, с целью прогнозирования характера течения заболевания и выбора наиболее эффективных схем противотромботической терапии. Косвенным указанием на генетически обусловленную склонность к повышенной активации тромбоцитарного звена гемостаза может являться сочетание в генотипе пациента двух и более “неблагоприятных” аллельных вариантов различных генов указанных тромбоцитарных рецепторов, в том числе, и в гетерозиготном состоянии.

Оценка роли аллельного полиморфизма генов, ассоциированных с эндотелиальной дисфункцией

Наряду с полиморфизмом генов, кодирующих плазменные факторы гемостаза и компоненты тромбоцитарных рецепторов, в последние годы значительная роль в развитии тромбозов отводится различным механизмам (в том числе, молекулярно-генетическим), приводящим к нарушению целостности или/и функциональных свойств сосудистого эндотелия, или эндотелиальной дисфункции (ЭД). В связи с этим, в обследованной группе пациентов с ранним дебютом ВТ нами были изучены особенности распределения аллелей и генотипов по генам, участвующим в регуляции сосудистого тонуса (AGT, ACE, ATGR1, eNOS, GNB3), тромборезистентных свойств эндотелия (EPCR), метаболизме гомоцистеина и липидов (MTHFR, ApoE), формировании провоспалительного статуса (TNF-A, IL-6, IL-1B). Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли полиморфизма ряда генов, ассоциированных с развитием ЭД, в патогенезе ВТ у лиц молодого возраста и целесообразности выявления соответствующих аллельных вариантов в практических целях. Обнаружение генотипа eNOS -786CC, ассоциированного со снижением активности этой NO-синтазы, или/и “неблагоприятных” вариантов генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС) указывает на повышенный риск раннего дебюта ВТ у лиц с Лейденской мутацией. Нарушение регуляции процессов вазоконстрикции и вазодилатации вследствие снижения продукции NO или/и повышенной активности РАС также может оказывать влияние и на характер клинических проявлений ВТ, в том числе, риск развития ТЭЛА. В частности, у пациентов с “изолированной ТЭЛА”, по сравнению с КГ, повышена частота встречаемости генотипа ACE Del/Del, а также аллеля AGT 704C. Сочетание “неблагоприятных” аллельных вариантов РАС с генотипом PAI-1 4G/4G или/и носительством аллеля GrIIIa 1565C характеризуется максимально высоким риском ТЭЛА.

Важную роль в обеспечении антикоагулянтной функции гемостаза играет система протеина С. Активация этого естественного антикоагулянта происходит на поверхности эндотелиальных клеток, экспрессирующих рецептор протеина С – EPCR. Полиморфизм EPCR Ser219Gly ассоциирован с повышенным уровнем в плазме крови растворимой формы этого рецептора и, как следствие, снижением антикоагулянтного и противовоспалительного эффекта протеина С. Сравнительный анализ распределения генотипов EPCR в обследованной нами группе пациентов и в КГ показал, что наличие аллеля, кодирующего вариант EPCR Gly219, ассоциировано с существенным увеличением риска возникновения ВТ в молодом возрасте (OR=1,7; 95%CI: 1,2-2,6; p=0,008). Данное наблюдение оказалось справедливым даже для лиц с гетерозиготным генотипом EPCR, который был обнаружен у 26,3% пациентов с ВТ и 17,7% здоровых лиц (OR=1,7; 95%CI: 1,1-2,5; p=0,02). В группе пациентов, не имевших “классических” детерминант НТ, доля носителей варианта EPCR Gly219 значительно превышала таковую в КГ (28,3% против 18,7%, OR=1,7; 95%CI: 1,1-2,6; p=0,015), что свидетельствует о его самостоятельной значимости как фактора риска ВТ у лиц молодого возраста. Следует также отметить, что максимальная частота встречаемости гетерозигот по гену EPCR была зафиксирована нами в подгруппе “ТГВНК+ТЭЛА” – 35,1%, по сравнению с 24,1% у пациентов с ТГВНК, не осложненным ТЭЛА (OR=1,7; 95%CI: 1,0-2,9; p=0,056), и 21,3% у лиц с “изолированной ТЭЛА” (OR=2,0; 95%CI: 0,9-4,2; p=0,074).

Полиморфизм С677Т гена MTHFR является наиболее значимым генетическим предиктором уровня в плазме крови гомоцистеина – аминокислоты, обладающей целым рядом протромботических свойств. Многие авторы считают генотипирование данного полиморфизма целесообразным при установлении причин тромбофилического статуса. Однако следует помнить, что ГГЦ не является формой НТ, поскольку обусловлена, как правило, сочетанием генетических и приобретенных факторов. Поэтому определение уровня гомоцистеина в плазме крови, в частности, у больных с ранним дебютом ВТ должно проводиться независимо от результатов молекулярно-генетического тестирования полиморфизма гена MTHFR. При отсутствии адекватной терапии, направленной на снижение уровня гомоцистеина, пациенты с генотипом MTHFR 677ТТ, как правило, имеют стойкую ГГЦ, которая приводит к выраженной ЭД. Как следствие, у лиц с этим генотипом часто наблюдается тяжелый характер течения ВТ (повторные тромботические эпизоды, ПТБ, ТЭЛА), особенно при сочетании с “неблагоприятными” вариантами генов тромбоцитарных рецепторов, PAI-1, β-субъединицы фибриногена.

Полиморфизм E2/E3/E4 гена ApoE в значительной степени определяет особенности липидного профиля индивида и является одним из наиболее изученных генетических

маркеров атеросклероза и артериального тромбоза. У носителей аллеля E4 наблюдаются максимальные показатели холестерина липопротеинов низкой плотности. Кроме того, вариант аполипопротеина E, кодируемый аллелем E4, в наибольшей степени подвержен окислению под действием активных форм кислорода. Это приводит к высокому риску развития ЭД, обусловленной оксидативным стрессом, у лиц, содержащих в генотипе данный вариант ApoE. Анализ полиморфизма гена ApoE в обследованной нами группе пациентов выявил положительную ассоциативную связь между аллелем E4 и генотипом MTHFR 677TT, ассоциированным с ГГЦ. Полученный результат косвенно подтверждает данные о высокой окислительной способности гомоцистеина и указывает на значимость процессов перекисного окисления липидов в патогенезе ВТ у лиц молодого возраста. Полиморфизм гена ApoE оказывает влияние и на характер течения тромботического процесса. В частности, у лиц с мутацией FII G20210A наличие в генотипе аллеля ApoE E4 значительно повышает риск развития ТЭЛА, тогда как сочетание указанной мутации с генотипом E2/E3 более характерно для неосложненного течения ТГВНК. Высокий риск развития ТЭЛА на фоне ТГВНК отмечается также у лиц, одновременно являющихся носителями генотипа MTHFR 677TT, аллелей ApoE E4 и GrIIIa 1565C.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что важную роль в патогенезе ВТ у лиц молодого возраста играет аллельный полиморфизм генов некоторых цитокинов. В частности, установлено, что наличие в генотипе вариантов генов TNFA, IL-6 и IL-1B, ассоциированных с повышенной продукцией этих факторов, приводит к существенному увеличению риска развития ТЭЛА, ПТБ или/и повторных тромботических эпизодов. Так, доля носителей аллеля -308A гена TNFA среди обследованных пациентов с ВТ оказалась в 1,5 раза выше в подгруппе “ТГВНК+ТЭЛА”, чем у лиц с “изолированным ТГВНК” (30,9% против 20,0% соответственно; OR=1,8; 95%CI: 1,0-3,1; p=0,043). В подгруппе “изолированная ТЭЛА” данный вариант гена TNFA обнаруживался почти у четверти пациентов (24,6%). Кроме того, в группе лиц, перенесших ТЭЛА, была повышена частота встречаемости генотипа IL-1B -31CC (12,9% против 6,1% у пациентов с неосложненным ТГВНК; OR=2,3; 95%CI: 1,1-4,6; p=0,028). В подгруппе “ТГВНК+ТЭЛА” доля лиц с этим вариантом составила 13,8%, а у пациентов с “изолированной ТЭЛА” – 11,5%. Генотип -31CC гена IL-1B также встречался заметно чаще в группе пациентов с рецидивирующим течением ВТ – 12,7%, по сравнению с 7,0% у лиц с единственным эпизодом тромбоза в анамнезе (OR=1,9; 95%CI: 0,9-3,9; p=0,089). Это позволяет говорить о возможности использования типирования полиморфизма IL-1β -31C/T при прогнозировании повторных эпизодов ВТ.

Библиография

- [1] Miller S.A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky // Nucl Acid Res. – 1988. – Vol. 16. – P. 1215-1218.
- [2] Thomas A. Variation in the promoter region of the β fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers / A. Thomas, F. Green, C. Kelleher, H.C. Wilkes, P.J. Brennan, T.W. Meade, S.E. Humphries // Thromb Haemost. – 1991. – Vol. 65. – P. 487-490.
- [3] Poort S.R. A common genetic variation of the 3' untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis / S.R. Poort, F.R. Rosendaal, P.H. Reitsma, R.M. Bertina // Blood. – 1996. – Vol. 88. – P. 3698-3703.
- [4] Gandrille S. A rapid screening method for the factor V Arg⁵⁰⁶→Gln mutation / S. Gandrille, M. Alhenc-Gelas, M. Aiach // Blood Coagul Fibrinolysis. – 1995. – Vol. 6. – P. 245-248.
- [5] Kohler H.P. FXII (46C→T) polymorphism and in vivo generation of FXII activity / H.P. Kohler, T.S. Futers, P.J. Grant // Thromb Haemost. – 1999. – Vol. 81. – P. 745-747.
- [6] Margaglione M. An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing / M. Margaglione, E. Grandone, G. Cappucci // Thromb Haemost. – 1997. – Vol. 77. – P. 605-606.
- [7] Hooper W.C. The relationship between the tissue plasminogen activator Alu I/D polymorphism and venous thromboembolism during pregnancy / W.C. Hooper, M. El-Jamil, A. Dilley, C. Philipp, D. Ellingsen, D. Phillips, B.L. Evatt // Thromb Res. – 2001. – Vol. 102. – P. 33-37.
- [8] Carter A.M. The association of the α -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with post-stroke mortality in subjects with atrial fibrillation / A.M. Carter, A.J. Catto, P.J. Grant // Circulation. – 1999. – Vol. 99. – P. 2423-2426.
- [9] Corral J. Factor XIII Val34Leu polymorphism in primary intracerebral haemorrhage / J. Corral, J.A. Iniesta, R. González-Conejero // Hematol J. – 2000. – Vol. 4. – P. 269–273.
- [10] Sconce E.A. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen / E.A. Sconce, T.I. Khan, H.A. Wynne // Blood. – 2005. – Vol. 106. – P. 2329-2333.
- [11] Corral J. Role of the 807 C/T polymorphism of the α_2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function. Effect in thromboembolic diseases / J. Corral, R. Gonzalez-

Conejero, J. Rivera, F. Ortuno, P. Aparicio, V. Vicente // *Thromb Haemost.* – 1999. – Vol. 81. – P. 951-956.

[12] Bray P.F. Rapid genotyping of the five major platelet alloantigens by reverse dot-blot hybridization / P.F. Bray, Y. Jin, T. Kickler // *Blood.* – 1994. – Vol. 84. – P. 4361-4367.

[13] Fontana P. P2Y₁₂ H2 haplotype is associated with peripheral artery disease. A case-control study / P. Fontana, P. Gaussem, M. Aiach, J.N. Fiessinger, J. Emmerich, J.L. Reny // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108. – P. 2971-2973.

[14] Arruda V.R. The mutation Ala677→Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis / V.R. Arruda, P.M. von Zuben, L.C. Chiaparin // *Thromb Haemost.* – 1997. – Vol. 77. – P. 818-821.

[15] Colombo M.G. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease / M.G. Colombo, U. Paradossi, M.G. Andreassi, N. Botto, S. Manfredi, S. Masetti, A. Biagini, A. Clerico // *Clin Chem.* – 2003. – Vol. 49. – P. 389-395.

[16] Hixson J.E. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI / J.E. Hixson, D.T. Vernier // *J Lipid Res.* – 1990. – Vol. 31. – P. 545-548.

[17] Jeunemaitre X. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen / X. Jeunemaitre, F. Soubrier, Y.V. Kotelevtsev, R.P. Lifton, C.S. Williams, A. Charru, S.C. Hunt, P. N. Hopkins, R.R. Williams, J.M. Lalouel // *Cell.* – 1992. – Vol. 71. – P. 169-180.

[18] Rigat B. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1) / B. Rigat, C. Hubert, F. Alhenc-Gelas, F. Cambien, P. Corvol, F. Soubrier // *Nucl Acid Res.* – 1992. – Vol. 20. – P. 1433.

[19] Bonnardeaux A. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension / A. Bonnardeaux, E. Davies, X. Jeunemaitre // *Hypertension.* – 1994. – Vol. 24. – P. 63-69.

[20] Sun A. Quantification of allele-specific G-protein beta3 subunit mRNA transcripts in different human cells and tissues by pyrosequencing / A. Sun, J. Ge, W. Siffert // *Eur J Hum Genet.* – 2005. – Vol. 13. – P. 361-369.

[21] Saposnik B. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis / B. Saposnik, J.L. Reny, P. Gaussem // *Blood.* – 2004. – Vol. 103. – P. 1311-1318.

[22] Cukjati M. Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high-throughput genotyping assay / M. Cukjati, T. Vaupotic, R. Ruprecht // *BMC Med Genet.* – 2007. – Vol. 8. – P. 69-74.

[23] Ozen S. Tumour necrosis factor alpha G-->A -238 and G-->A -308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis / S. Ozen, M. Alikasifoglu, A. Bakkaloglu // Rheumatology. – 2002. – Vol. 41. – P. 223-227.

[24] Vickers M.A. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein / M.A. Vickers, F.R. Green, C. Terry // Cardiovasc Res. – 2002. – Vol. 53. – P. 1029-1034.

[25] Ohashi J. A functional polymorphism in the IL1B gene promoter, IL1B -31C>T, is not associated with cerebral malaria in Thailand / J. Ohashi, I. Naka, A. Doi // Malar J. – 2005. – Vol. 4. – P. 38.