УДК 615.035.4

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРОТРОМБОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ДЕТЕЙ, ОБСЛЕДОВАННЫХ В ЦЕНТРАХ ЗДОРОВЬЯ

Черепанова Л.А.[1], Строзенко Л.А.[1], Галактионова М.Ю.[2], Лобанов Ю.Ф.[1]

[1]ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул, e-mail: cherepanova80.80@mail.ru
[2]ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. Проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, e-mail: myugal@mail.ru

Включение исследования генетических полиморфизмов генов факторов свёртывания крови и генов фолатного обмена в работу Центров здоровья для детей выявили, что частота аллеля *A 2756G* гена MTR (*p*=0,032) и аллеля *C1565* гена ITGB3 (*p*=0,012) в популяции девочек статистически значимо выше по сравнению с мальчиками. Также определено, что доля аллеля *4G (-675)* гена PAI-1 (*p*=0,028) достоверно чаще выявлялась у мальчиков, в то время как доля аллеля *5G* гена PAI-1 (*p*=0,032) с большей частотой выявлена у девочек. Распределение частот аллелей и генотипов в изученных генах факторов свертывания крови и фолатного обмена было проверено на соответствие равновесию Харди – Вайнберга. В группу детей с факторами тромбогенного риска вошли 27 человек, что составило 6,7 %. Она характеризовалась тем, что встречались сочетания нерационального питания, малоподвижного образа жизни и наличие вегетососудистой дистонии (21,2 %). Подверженность стрессовым ситуациям, курения и наличие положительного тромботического анамнеза у кровных родственников (14,3 %). Нерациональное питание, малоподвижный образ жизни и более трёх эпизодов кровоточивости в течение жизни (21,2 %). У детей данной группы в 64,3 % случаев была определена мутация генотипа GA гена фактора V Лейден, а также 35,7 % детей были с компаундами из гомозиготного аллеля *TT* генотипа *C677T* гена MTHFR и гомозиготного аллеля *AA* генотипа *G(-455)A* гена фибриногена FBG.

Ключевые слова: генетические маркеры, тромбофилия, центры здоровья, дети.

RESULTS OF GENETIC MARKERS PROTHROMBOTIC CHANGES IN CHILDREN EXAMINED AT THE CENTER FOR HEALTH

Cherepanov L.A.[1], Strozenko L.A.[1], Galaktionova M.Yu.[2], Lobanov Yu.F.[1]

[1]FGBOU IN «Altai State Medical University», Health Ministry of Russia, Barnaul, e-mail: cherepanova80.80@mail.ru
[2]FGBOU IN «Krasnoyarsk State Medical University. Prof. VF Voyno-Yasenetsky» Russian Ministry of Health, Krasnoyarsk, e-mail: myugal@mail.ru

Enabling research on genetic polymorphisms of factors, blood clotting, and the genes of folate metabolism in the work of the health center for children revealed that the frequency of allele A 2756G MTR gene (p=0.032) and allele S1565 gene ITGB3 (p = 0.012) in the population of girls was significantly higher than with boys. Also determined that the proportion of 4G allele (-675) PAI-1 gene (p=0.028) was detected significantly more often in boys, while the share of 5G allele gene PAI-1 (p=0.032) with a higher frequency was found in girls. The frequency distribution of alleles and genotypes in the studied genes of coagulation factors and folate metabolism has been tested for compliance with the Hardy-Weinberg equilibrium. In the group of children with thrombogenic risk factors included 27 people, accounting for 6.7%. It is characterized by the fact that there is a combination of irrational nutrition, sedentary lifestyle and the presence of vascular dystonia (21.2 %). Exposure to stressful situations, smoking and the presence of positive history of thrombotic have blood relatives (14.3%). Poor nutrition, sedentary lifestyle and over three bleeding episodes in their lifetime (21.2%). The children in this group in 64.3 % of cases was identified mutation genotype GA factor V Leiden gene, as well as 35.7% of the children were from the compound of the homozygous genotype TT allele C677T MTHFR gene alleles and homozygous AA genotype G (-455) A gene fibrinogen FBG.

Keywords: genetic markers, thrombophilia, health centers, children.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения тромбоз-ассоциированные заболевания занимают одну из лидирующих позиций в структуре заболеваемости и смертности населения всего мира. Раньше тромбоз считался исключительно заболеванием

старшего возраста, но в последние десятилетия появляется все больше сведений о том, что данная патология является актуальной проблемой у лиц молодого возраста, а также детей [1,2,3].

Тромбозы относятся к мультифакторным заболеваниям, в основе которых лежит взаимодействие как внешних, так и внутренних, генетически детерминированных факторов риска [4,5,6]. Особый интерес представляют полиморфизмы генов, кодирующих белки, принимающие участие в процессах тромбообразования [7].

Материал и методы исследования

Проведено генетическое исследование двенадцати протромботических полиморфных вариантов генов-кандидатов: метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR (*C677T*), метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR (*A1298C*), метионинсинтазы MTR (*A2756G*), метионинсинтазыредуктазы MTRR (*A66G*), фактора II протромбина (*G20210A*); фактора V Лейден (*G1691A*); коагуляционного фактора VII – проконвертина (F7) – (*G10976A*), фактора XIII свертывания крови (*G226A*); фибриногена *G(-455)A*; гликопротеина (интегрин альфа-2) ITGA2 (*C807T*), тромбоцитарного рецептора фибриногена – *ITGB3-b* интегрин (*T1565C*), ингибитора активатора плазминогена PAI-1 *4G*(*-675)5G*.

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании распределения частот аллелей генов системы свертывания крови было установлено, что частота аллеля *C* 807 гена ITGA2 (*p*=0,0003) в популяции девочек статистически значимо выше по сравнению с мальчиками, напротив, доля аллеля *T* 807 гена ITGA2 с большей частотой выявлена у мальчиков. Вместе с тем доля аллеля *5G* (-675) гена *PAI-1* (*p*=0,001) достоверно чаще определялась у девочек, однако, частота аллеля *4G (-675)* гена *PAI-1* (*p*=0,011) достигала уровня статистической значимости у мальчиков. По остальным частотам аллелей в исследованных полиморфных вариантах генов статистически значимых различий не наблюдалось (табл. 1).

Таблица 1

Распределение частот аллелей генов фолатного метаболизма и факторов свертывания крови у детей

Локус	Аллели	Всего n=396(%)	Девочки n=219(%)	Мальчики n=177(%)	*p*
MTHFR *C677T*	C T	271 (68,5) 124 (31,5)	150 (68,9) 68 (31,1)	120 (68,0) 57 (32,0)	0,897 0,885
MTHFR *A1298C*	A C	286 (72,1) 110 (27,9)	157 (71,8) 62 (28,2)	128 (72,5) 48 (27,5)	1,000 0,888
MTR *A2756G*	A G	289 (73,1) 107 (26,9)	159 (72,7) 60 (27,3)	130 (73,6) 46 (26,4)	1,000 0,888
MTRR *A66G*	A G	164 (41,3) 232 (58,7)	88 (40,3) 131 (59,7)	75 (42,7) 101 (57,3)	0,460 0,588

FII *G20210A*	G A	393 (99,3) 3 (0,7)	217 (99,2) 2 (0,8)	176 (99,4) 1 (0,6)	1,000 1,000
FV *G1691A*	G A	387 (97,8) 9 (2,2)	215 (97,5) 5 (2,5)	174 (98,3) 3 (1,7)	1,000 1,000
FVII *G10976A*	G A	351 (88,7) 45 (11,3)	194 (88,6) 25 (11,4)	157 (88,8) 20 (11,2)	1,000 1,000
FXIII *G226A*	G A	296 (74,8) 100 (25,2)	163 (74,8) 55 (25,2)	132 (74,7) 45 (25,3)	1,000 1,000
FGB *G(-455)A*	G A	308 (77,9) 88 (22,1)	169 (77,5) 49 (22,5)	139 (78,6) 38 (21,4)	0,170 0,427
ITGA2 *C807T*	C T	237 (59,9) 158 (40,1)	144 (66,0) 74 (34,0)	91 (51,7) 85 (48,3)	0,0003 <0,001
ITGB3 *T1565C*	T C	330 (83,4) 65 (16,6)	177 (81,1) 41 (18,9)	153 (86,5) 24 (13,5)	0,687 0,105
PAI-1 *4G(-675)5G*	5G 4G	177 (44,9) 218 (55,1)	104 (47,9) 114 (52,1)	73 (41,0) 104 (59,0)	0,001 0,011

При анализе частоты встречаемости мутаций и полиморфных вариантов генов с учетом половых различий было выявлено (табл. 2), что мутация генотипа *807 TT* гена *ITGA2* с большей частотой определялась у мальчиков (p=0,006) по сравнению с девочками. По остальным полиморфным вариантам генов факторов свертывания крови статистически значимых различий не было выявлено. Определено, что полиморфный вариант *G*1691*A* гена FV Leiden, мутация *G*(-455)*A* гена *FGB,* полиморфизм *4G*(-675)*5G* гена *PAI-1* выявлялись с одинаковой частотой у мальчиков и девочек (p>0,05). В исследованной выборке не было обнаружено минорных аллелей полиморфного варианта *G*20210*A* гена *FII* и полиморфизма *G*1691*A* гена FV Leiden.

Распределение частот аллелей и генотипов в изученных генах факторов свертывания крови проверено на соответствие равновесию Харди – Вайнберга. Как видно из табл. 4, что распределение частот восьми генотипов генов факторов свертывания крови соответствует соотношению Харди – Вайнберга, то есть наблюдаемое распределение генотипов *G20210A FII*, *G1691A FV*, G10976A *FVII*, G226A *FXIII*, *G*(-455)*A FGB, C*807*T ITGA2*, *T*1565*C ITGB3, 4G (-675)5G PAI-1* согласуется с ожидаемыми частотами распределения. При анализе соответствия распределению частот аллелей и генотипов в популяции детей установлено, что фактическое распределение генотипов генов факторов свертывания крови согласуется с теоретическим, статистически значимых различий выявить не удалось.

Таблица 2

Распределение генотипов и аллелей генов факторов свертывания крови у детей

Локус	Генотип	N.O. %	N.E. %	χ^2, d.f.=1
FII *G20210A*	GG	98,6	98,5	0,011 p=0,916
	GA	1,4	1,4	
	AA	0	0,01	

FV *G1691A*	GG	95,7	95,7	0,102 *p*=0,750
	GA	4,3	4,2	
	AA	0	0,05	
FVII *G10976A*	GG	79,3	78,7	0,866 *p*=0,352
	GA	18,8	20,0	
	AA	1,9	1,3	
FXIII *G226A*	GG	56,7	55,9	0,413 *p*=0,520
	GA	36,1	37,7	
	AA	7,2	6,4	
FGB *G(-455)A*	GG	56,7	55,9	0,413 *p*=0,520
	GA	36,1	37,7	
	AA	7,2	6,4	
ITGA2 *C807T*	CC	37,0	35,8	0,512 *p*=0,474
	CT	45,7	48,1	
	TT	17,3	16,1	
ITGB3 *T1565C*	TT	69,2	69,6	0,131 *p*=0,717
	TC	28,4	27,7	
	CC	2,4	2,7	
PAI-1 *4G (-675)5G*	5G/5G	19,5	19,0	0,177 *p*=0,828
	4G/5G	51,3	42,2	
	4G/4G	29,2	31,8	

Примечание: N.O. – наблюдаемые частоты генотипов; N.E. – ожидаемые частоты генотипов; критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди – Вайнберга; d.f. – число степеней свободы.

При исследовании частоты встречаемости генотипов и аллелей генов фолатного метаболизма в популяции детей установлено, что распределение частот четырех генотипов *C677T* и *A1298C* гена *MTHFR*, *A2756G* гена *MTR* и генотипа *A66G* гена *MTRR* соответствовало равновесию Харди – Вайнберга. Отклонений в распределении данных генотипов в популяции детей зафиксировано не было.

На основании данных о наличии трёх и более признаков отягощенного тромбогенного анамнеза была сформирована группа с высокими факторами тромбогенного риска. В группу детей с высокими факторами тромбогенного риска вошли 27 человек, что составило 6,7 % от общего количества исследованных. Из них было 17 девочек и 10 мальчика. У детей этой группы встречались сочетания нерационального питания, малоподвижного образа жизни и наличие вегетососудистой дистонии (21,2 %). Подверженность стрессовым ситуациям, курения и наличие положительного тромботического анамнеза у кровных родственников (14,3 %). Нерациональное питание, малоподвижный образ жизни и более трёх эпизодов кровоточивости в течение жизни (21,2 %), а также наличие генетической предрасположенности к тромбозам.

Таблица 3

Характеристика группы с высокими факторами тромбогенного риска

Признак	Всего (n=27)	Девочки (n=17)	Мальчики (10)
Более трёх эпизодов кровоточивости в течение жизни	8 (28,5%)	3 (20,0%)	5 (50,0%)
Наличие положительного тромботического анамнеза у кровных родственников	6 (21,4%)	3 (20,0%)	2 (25,0%)
Наличие остеохондроза, ожирения и/или вегетососудистой дистонии	6 (21,4%)	3 (20,0%)	2 (25,0%)
Наличие установленного диагноза тромбофилия	0	0	0
Наличие активного и/или пассивного курения	8 (28,5%)	2 (10,0%)	7 (75,0%)*
Занятия игровыми видами спортом	2 (7,1%)	2 (10,0%)	0
Приём оральных контрацептивов	0	0	-
Повышенное артериальное давление	0	0	0
Малоподвижный образ жизни	6 (21,4%)	3 (20,0%)	2 (25,0%)
Подверженность стрессовым ситуациям	5 (17,2%)	2 (10,0%)	2 (25,0%)
Нерациональное питание	10 (35,7%)	5 (30,0%)	5 (50,0%)
Отягощенный гинекологический анамнез у девушек	0	0	0

Примечание: * – статистически значимые различия показателей у мальчиков и девочек ($p<0,05$).

Как видно из табл. 3, в группе детей с высокими факторами тромбогенного риска, статистически чаще среди мальчиков встречалось наличие активного и/или пассивного курения ($p<0,05$). По остальным признакам достоверных различий не было обнаружено.

В ходе исследования были определены 27 человек (что составляет 6,7 % от общего количества исследованных детей), которые набрали прогностический коэффициент (ПК) равный или больше +13. По абсолютному критерию отнесения ребенка в группу высокого тромбогенного риска является наличие полиморфных вариантов гена фактора V Лейден (*G1691A*) генотипа *GA, AA* или гена протромбина *FII* (*G20210A*) генотипа *AA.*

Те дети, которые набирали по сумме при подсчете прогностического коэффициента от -12 до + 12 баллов были отнесены в группу с факторами тромбогенного риска либо в группу без факторов риска на усмотрение врача, который беседовал с пациентом, выясняя подробнее

о наличии отягощённого семейного анамнеза в отношении тромбоз ассоциированных заболеваний. А также наличия таких временных факторов риска, как ожирение, курение, занятие силовыми видами спорта, приём оральных контрацептивов, повышенное АД, малоподвижный образ жизни, подверженность стрессам, нерациональное питание, более трёх эпизодов кровоточивости в течение жизни, установленный диагноз тромбофилия. И, конечно, наличие генетической предрасположенности являлось решающим для отнесения в ту или иную группу. Решение принималось индивидуально по каждому ребёнку.

Таким образом, на основании критериев включения и исключения, данных тромбогенного анамнеза и с учетом распределения полиморфных вариантов протромботических генов были сформированными две группы для исследования. В группу без факторов тромбогенного риска вошли 369 человек, то составило 93,3 % от всех участников исследования. У детей данной группы были зафиксированы менее трёх признаков отягощенного тромбогенного анамнеза, а также отсутствовало носительство полиморфизмов генов фолатного обмена и факторов свёртывания крови. В группу детей с факторами тромбогенного риска вошли 27 человек, что составило 6,7 %. Она характеризовалась тем, что встречались сочетания нерационального питания, малоподвижного образа жизни и наличие вегетососудистой дистонии (21,2 %). Подверженность стрессовым ситуациям, курению и наличие положительного тромботического анамнеза у кровных родственников (14,3 %). Нерациональное питание, малоподвижный образ жизни и более трёх эпизодов кровоточивости в течение жизни (21,2 %). У детей данной группы в 64,3 % случаев была определена мутация генотипа *GA* гена фактора V Лейден, а также 35,7 % детей были с компаундами из гомозиготного аллеля *TT* генотипа *C677T* гена *MTHFR* и гомозиготного аллеля *AA* генотипа *G(-455)A* гена фибриногена *FBG*.

Заключение

Таким образом, в деятельность работы Центра здоровья для детей включены исследования генетических полиморфизмов генов факторов свёртывания крови и генов фолатного обмена. Результаты генотипирования выявили, что частота аллеля *A 2756G* гена MTR (p=0,032) и аллеля *C1565* гена ITGB3 (p=0,012) в популяции девочек статистически значимо выше по сравнению с мальчиками. Также определено, что доля аллеля *4G (-675)* гена PAI-1 (p=0,028) достоверно чаще выявлялась у мальчиков, в то время как доля аллеля *5G* гена PAI-1 (p=0,032) с большей частотой выявлена у девочек. Доля аллеля G (-455) гена FGB статистически чаще встречалась у мальчиков (p=0,042), а аллеля A (-455) гена FBG достоверно чаще у девочек (p=0,041). Подобная ситуация наблюдалась в гене ITGA2: аллель *C807* достоверно чаще встречается в популяции девочек (p=0,001), а аллель *807T* – у

мальчиков (p=0,002). Частоты аллелей исследованных полиморфных вариантов генов фолатного цикла статистических различий не имеют (p>0,05).

Частота гомозиготного аллеля *677T* гена MTHFR у детей, обследованных в Центре здоровья, составила 9,6 %. У девочек достоверно чаще (45,9 %) встречается вариант гетерозиготного аллеля *C677T* гена MTHFR (p=0,032). Геторозиготный вариант аллеля *A2756G* чаще (38,8 %) встречается среди лиц мужского пола (p=0,012), а гомозигота *2756G* гена MTR достоверно чаще (11,4 %) встречается у лиц женского пола (p=0,023). Мутация генотипа *807TT* гена ITGA2 с большей частотой определялась у мальчиков-подростков (p=0,002), гетерозиготная форма полиморфизма с большей частотой регистрировалась у девочек (p=0,001), а генотип *807CC* – у мальчиков (p=0,001). Генотип *1565CC* гена ITGB3 (p=0,012) у девочек статистически значимо выше по сравнению с мальчиками. Мутация гена FGB *(-455)AA* и *(-455) GA* чаще встречались у девочек (p=0,04), а вариант *(-455) GG* – у мальчиков (p=0,04). Полиморфизм *4G(-675)5G* гена PAI-1 выявлялся: гетерозиготный вариант *(-675) 4G5G* и гомозиготный вариант *(-675) 4G4G* статистически значимо чаще встречался у мальчиков (p=0,02), а гомозигота *(-675) 5G5G* – у девочек (p=0,03).

Распределение частот аллелей и генотипов в изученных генах факторов свертывания крови и фолатного обмена было проверено на соответствие равновесию Харди – Вайнберга. Определилось отклонение для частот генотипов *G(-455)A* гена FBG (χ^2=7,832; p=0,02), *T(1565)C* гена ITGB3 (χ^2=8,079; p=0,01), а также для генотипа *A2756G* гена MTR (χ^2=4,342; p=0,043).

На основании критериев включения и исключения, данных тромбогенного анамнеза и с учетом распределения полиморфных вариантов протромботических генов были сформированы две группы для исследования. В группу без факторов тромбогенного риска вошли 369 человек, что составило 93,3 % от всех участников исследования. У детей данной группы были зафиксированы менее трёх признаков отягощенного тромбогенного анамнеза, а также отсутствовало носительство полиморфизмов генов фолатного обмена и факторов свёртывания крови. В группу детей с факторами тромбогенного риска вошли 27 человек, что составило 6,7 %. Она характеризовалась тем, что встречались сочетания нерационального питания, малоподвижного образа жизни и наличие вегетососудистой дистонии (21,2 %). Подверженность стрессовым ситуациям, курению и наличие положительного тромботического анамнеза у кровных родственников (14,3 %). Нерациональное питание, малоподвижный образ жизни и более трёх эпизодов кровоточивости в течение жизни (21,2 %). У детей данной группы в 64,3 % случаев была определена мутация генотипа GA гена фактора V Лейден, а также 35,7 % детей были с компаундами из гомозиготного аллеля *TT* генотипа *C677T* гена MTHFR и гомозиготного аллеля *AA* генотипа *G(-455)A* гена фибриногена FBG.

Список литературы

1. Кочерова В.В., Щербак В.А. Задержка внутриутробного развития плода: факторы риска, диагностика, отдаленные последствия // Российский педиатрический журнал. – 2015. – Т. 18, № 2. – С. 36-42.
2. Основы формирования здоровья детей: учебник / Р.Р. Кильдиярова, В.И. Макарова, Ю.Ф. Лобанов. – Москва, 2016. (2-е изд., испр. и доп.).
3. Строзенко Л.А., Гордеев В.В., Лобанов Ю.Ф., Момот А.П. Распределение полиморфных вариантов генов факторов свертывания крови и генов фолатного метаболизма у подростков Алтайского края // Российский педиатрический журнал. – 2015. – Т. 18, № 4. – С. 19-25.
4. Строзенко Л.А., Лобанов Ю.Ф., Черепанова Л.А. Первичная профилактика тромбоз-ассоциированных заболеваний у детей в центрах здоровья. Монография / Л.А. Строзенко, Ю.Ф. Лобанов, Л.А. Черепанова. – Барнаул, 2015. – 211 с.
5. Stegnar, M. Review: Thrombophilia screening - at the right time, for the right patient, with a good reason / M. Stegnar // Clin. Chem. Lab. Med. – 2010. – Vol. 48, № 1. – С.105-113.
6. Walker, P. Screening, testing, or personalized medicine: where do inherited thrombophilias fit best? / P. Walker, A.R. Gregg // Obstet. Gynecol. Clin North Am. – 2010. – Vol. 37, № 1. – P.87-107.
7. Zangari, M. Thrombophilia / M. Zangari, F. Elice et al. // Drug Target Insights. – 2008. – № .3. – С.87-97.