

УДК 575.224.234:616-053.5-005.6

Л.В. Жданова^{1,2}, Л.И. Патрушев³, В.В. Долгих¹**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ТРОМБОФИЛИЮ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ ТРОМБОЗОВ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ**¹ ФГБУ «Научный центр проблем здоровья и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)² ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (Улан-Удэ)³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (Москва)

Статья посвящена распространенности полиморфизма генов, ответственных за тромбофилию среди детей. В исследование включено 52 ребенка с тромбозами и 59 детей без тромбозов. Определялись мутации фактора V Leiden, G20210A в гене протромбина, мутацию C677T в гене 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы и полиморфизм 4G/5G гена ингибитора активатора плазминогена 1. Мутации генов маркеров тромбофилии обнаружены у 38 из 52 (73 %) детей с тромбозами, и у 36 из 59 (61 %) детей без тромбозов ($p=0,1$). Сочетание нескольких мутаций в генах было у 38 из 69 (55 %) детей с наличием различных полиморфизмов. Наибольший процент (86 %) различных сочетаний мутаций имели дети с венозными тромбозами, при этом наличие мутации фактора V (Leiden) и мутации в гене протромбина не было изолированным, и во всех случаях сочетались между собой или с мутацией в гене MTHFR. Наиболее значимыми в развитии тромбозов являются мутация G20210A в гене протромбина и мутация Лейден. Приведен клинический пример развития тромбоза у девочки с данными мутациями.

Ключевые слова: тромбозы, наследственные тромбофилии, дети

POLYMORPHISM OF GENES RESPONSIBLE FOR THROMBOPHILIA AND THEIR INFLUENCE ON THE DEVELOPMENT OF THROMBOSIS IN CHILDRENL.V. Zhdanova^{1,2}, L.I. Patrushev, V.V. Dolgikh¹¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk² Buryat State University, Ulan-Ude³ Institute of Bioorganic chemistry of M.M. Shemyakin and Y.A. Ovchinikov, Moscow

The article is devoted to the prevalence of polymorphism of genes responsible for thrombophilia among children. The study included 52 children with thrombosis and 59 children without thrombosis. Detects mutations factor V Leiden, G20210A prothrombin gene, the C677T mutation in the gene for 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and 4G/5G polymorphism of gene plasminogen activator inhibitor 1. Mutations thrombophilia markers are detected in 38 of 52 (73 %) children with thrombosis, and 36 of 59 (61 %) children without thrombosis ($p=0,1$). A combination of several mutations in genes had 38 of 69 (55 %) children having different polymorphisms. The highest percentage (86 %) of different combinations of mutations have children with venous thrombosis, wherein the presence of mutations in Factor V (Leiden) mutation and prothrombin gene was isolated, and in all cases with each other or combined with mutation of the MTHFR gene. The most significant in the development of thrombosis are the G20210A mutation in the prothrombin gene mutation and Leiden. An example of clinical thrombosis, the girl with the data mutations.

Key words: thrombosis, hereditary thrombophilia, children

В последние годы большое внимание уделяется наследуемым дефектам белков в системе гемостаза, которые обуславливают предрасположенность к тромбообразованию и являются самостоятельным фактором риска сосудистых осложнений. При этом разнообразие фенотипического проявления мутаций – это результат одного из трех процессов или их сочетаний: полного прекращения экспрессии гена, количественного изменения уровня экспрессии гена, качественного изменения функции гена.

Наиболее часто в европейской и американской популяциях выявляются три точковые генетические мутации: мутация V фактора свертывания крови, мутация G20210A гена протромбина и C677T в гене 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы, приводящий к развитию умеренной гипергомоцистемии [1]. Гетерозиготную мутацию (G1691A) в гене фактора V, получившую название лейденской, обнаруживают у 20 % больных США и Западной Европе. При данной мутации происходит замена одного аргинина на глицин в полипептидной цепи

нуклеотида фактора V и появляется устойчивость фактора к расщеплению активированным протеином C, что сопровождается повышением уровня активированного фактора V в плазме и усилением образования тромбина [3]. Мутация (G20210A) в гене протромбина, обнаруживаемая в гетерозиготном состоянии у 6 % больных с тромбозами, локализована в 3-концевой некодирующей части гена и не изменяет полипептидной цепи протромбина, но, по-видимому, повышает стабильность его мРНК и, соответственно, уровень белка в плазме [4]. Гетерозиготная мутация C677T в гене 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы, фермента, ответственного за метаболизм гомоцистеина, встречается в обсуждаемой популяции наиболее часто (у 50 % больных) и ассоциируется с различными сосудистыми заболеваниями, как венозными, так и артериальными (коронарной болезнью сердца, облитерирующими заболеваниями артерий, диабетической ангиопатией) [1, 5]. Данная мутация приводит к развитию умеренной гипергомоцистемии и является самостоятельным фактором

риска тромбозов (при атеросклерозе, диабете и многих других заболеваниях). Изменение в системе фибринолиза из-за полиморфизма в гене 4G/5G ингибитора активатора плазминогена I также связывают с риском развития сосудистых осложнений. Частота основных наследуемых тромбофилий существенно варьирует внутри здоровой популяции и среди пациентов с тромбозами. В педиатрической практике у детей с соматическими заболеваниями эти данные мало известны.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Проанализировать встречаемость мутаций в генах V, II факторов свертывания крови, в гене ингибитора активатора плазминогена I, в гене 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы у детей с тромбозами сосудов различного калибра и локализаций, неврологических и гематологическими заболеваниями и выявить их влияние на развитие тромбозов в детском возрасте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетическое исследование было проведено 111 детям. Пациенты были разделены на 2 группы: группа с указанием на наличие тромбозов (52 детей) и группа детей без тромбозов (59 детей). В группе детей с тромбозами было 36 девочек и 16 мальчиков. Средний возраст детей с тромбозами 11,9 ± 5,5 года. В группе детей без тромбоза было 28 девочек и 31 мальчик. Средний возраст детей был 7,4 ± 4,8 года. Данные пациенты были обследованы на наличие у них мутаций фактора V Leiden, G20210A в гене протромбина, мутацию C677T в гене 5,10-МТГФР и полиморфизм 4G/5G гена ИАП-1.

Все дети, перед включением их в данное исследование, либо их родители (в случае не достижения 15-летнего возраста), подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соот-

ветствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации последнего пересмотра (Сеул, октябрь 2008).

Статистическая обработка данных осуществлялась на персональном компьютере с помощью электронных таблиц EXCEL, пакета прикладных программ «Statistica for Windows» версии 6.0 (StatSoft, USA). Корреляционный анализ проводился по методу Спирмена. Достоверность различий оценивалась по методу χ^2 . Все различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетические маркеры тромбофилий были выявлены у 38 из 52 (73 %) детей с тромбозами и у 36 из 59 (61 %) детей без тромбозов ($\chi^2 = 1,81, p = 0,1$). В табл. 1 показано частота выявленных полиморфизмов в генах маркерах тромбофилий у обследованных детей.

Как видно из табл. 1, гетерозиготные мутации, выявленные у 77/69 % обследуемых детей встречались чаще, чем гомозиготные (38/34 %) ($p < 0,001$). Наибольший процент выявления маркеров генетических тромбофилий был у пациентов с артериальными тромбозами церебральных сосудов – 21 из 25 (84 %). Гомозиготные мутации определены у 10 из 21 пациента с генетическими тромбофилиями: из них у 3 – мутация в гене МТГФР, у 7 – в гене ИАП-1. Гетерозиготные мутации выявлены у 20 из 21 пациента с ОНМК: у 1 - в гене II фактора, у 9 – в гене МТГФР и у 10 – в гене ИАП-1. У 10 из 17 (59 %) детей с венозными тромбозами были выявлены генетические тромбофилии. Гомозиготные мутации были обнаружены у 2 из 10 детей с мутациями: у 1 – в гене II фактора свертывания крови и в гене ИАП-1 соответственно. Гетерозиготные мутации выявлены у 15 из 10 детей с мутациями: у 3 пациентов – в гене V фактора (Leiden), у 1 – в гене II фактора, у 8 – в гене МТГФР, у 3 – в гене ИАП-1. В 50 % случаев генетические тромбофилии выявлялись у пациентов с ливедо: у 3 паци-

Таблица 1

Встречаемость мутаций у детей с различными диагнозами

Диагноз	Мутация								Всего
	V фактор		протромбин		5,10-МТГФР		4G/5G ИАП-1		
	ГМ	ГТ	ГМ	ГТ	ГМ	ГТ	ГМ	ГТ	
Венозные тромбозы (n = 17)	0	3	1	1	0	8	1	3	10/59 %
Сетчатое ливедо рук и ног (n = 6)	0	0	0	0	1	1	0	3	3/50 %
Хронические язвы голеней (n = 1)	0	0	0	0	0	1	0	1	1
a. tibialis (n = 1)	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Сочетанный тромбоз (n = 2)	0	0	0	0	1	0	1	0	2
ОНМК (n = 25)	0	0	0	1	3	9	7	10	21/84 %
Эпилептиформный синдром (n = 20)	0	0	0	0	0	6	4	7	11/55 %
ИТЦП (n = 22)	0	0	0	0	1	9	8	8	16/77 %
АИГА (n = 17)	0	0	0	0	2	3	6	3	9/53 %
Всего (n = 111)	0	3	1	2	8	37	28	35	74/67 %

Примечание: ГМ – гомозиготная, ГТ – гетерозиготная, ОНМК – острые нарушения мозгового кровообращения, ИТЦП – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия.

Сочетание вариантов мутаций у пациентов с различными диагнозами

Сочетание		Диагноз						
		Венозные тромбозы (n = 7)	Сетчатое ливедо (n = 3)	Хронические язвы голени (n = 1)	ОНМК (n = 21)	Эпилепсия (n = 11)	ИТЦП (n = 17)	АИГА (n = 9)
МТГФР	ИАП-1							
ГМ	ГМ	0	0	0	0	0	1	1
ГМ	ГТ	0	1	0	1	0	0	1
ГТ	ГМ	1	0	0	2	1	5	2
ГТ	ГТ	2	1	1	5	5	4	1
ГТ варианты Лейденского фактора V + протромбин + МТГФР		1	0	0	0	0	0	0
ГТ варианты Лейденского фактора V + МТГФР		1	0	0	0	0	0	0
ГТ варианты Лейденского фактора V + МТГФР + ГМ протромбин		1	0	0	0	0	0	0
ГТ протромбин и ГМ МТГФР		0	0	0	1	0	0	0
Всего n/%		6/86	2/67	1/100	8/38	6/55	10/59	5/56

ентов – гетерозиготная мутация в гене ИАП-1, у 2 – в гене МТГФР (гомозиготная и гетерозиготная). При тромбозе *a. tibialis* у 1 больной выявлена гомозиготная мутация в гене ИАП-1. У детей с сочетанными тромбозами выявлены только гомозиготные мутации в гене МТГФР и в гене ИАП-1. Достаточно высока встречаемость генетических тромбофилий и в группе больных с ИТЦП: у 17 из 22 (77 %). Гомозиготная мутация в гене МТГФР была выявлена у 1 ребенка и в гене ИАП-1 – у 8. В 9 и 8 случаях отмечались гетерозиготные мутации в генах МТГФР и ИАП-1 соответственно. При эпилептиформном синдроме и АИГА выявлялись мутации в генах МТГФР и ИАП-1: у 11 из 20 (55 %) и у 9 из 17 (53 %) соответственно. Клинически значимые гомозиготные мутации у больных с эпилептиформными судорогами были в гене ИАП-1 в 4 случаях, а у больных с АИГА – в 6 случаях и в 2 случаях в гене МТГФР.

Анализ взаимосвязи показал корреляционную связь мутации в гене V фактора (Leiden) и в гене протромбина с развитием тромбозов ($r = 0,17, p = 0,005$). Гетерозиготная мутация МТГФР коррелировала с ПНМК ($r = 0,37, p = 0,04$), а гомозиготная его мутация с тромбозом поверхностных сосудов ($r = 0,23, p = 0,01$).

Сочетание нескольких мутаций в генах было выявлено у 38 из 69 (55 %) детей с генетическими мутациями (табл. 2).

Как видно из табл. 2, наибольший процент (86 %) различных сочетаний мутаций имели дети с венозными тромбозами, при этом наличие мутации фактора V (Leiden) и мутации в гене протромбина не было изолированным, и они во всех случаях сочетались между собой или с мутацией в гене МТГФР.

Комбинации мутаций в генах 5,10-МТГФР и ИАП-1 встречались при различных заболеваниях. Наиболее часто обнаружены сочетания их гетерозиготных форм, и процент выявления одновременного носительства нескольких видов мутаций в кандидатных генах тромбофилий был сопоставим у детей с тромбозами (17/52 %) и у детей без них (19/57 %).

В одном случае гомозиготная мутация в гене протромбина сочеталась с гетерозиготными мутациями в

генах фактора V (Leiden) и МТГФР, кроме того у больной были выявлены антитела к фосфолипидам (аФЛ). Данный клинический случай мы приводим ниже.

Клиническое наблюдение

Больная Е. 14 лет поступила с жалобами на увеличение в объеме правой нижней конечности.

Из анамнеза известно, что неоднократно находилась на лечение с клиникой ТЦП. В анализах крови отмечалось снижение тромбоцитов до 66–77 тыс., ускорение СОЭ до 26 мм/ч. Были выявлены положительные уровни аКЛ и ВА.

Через год от момента начала заболевания у больной появилась боль, цианоз, отек правого бедра, голени. При УЗИ-исследовании сосудов был диагностирован тромбоз глубоких вен правой нижней конечности. Был заподозрен вторичный АФС на фоне СКВ.

При поступлении состояние девочки удовлетворительное, правильного телосложения, избыточного питания. Вес 79 кг, рост 171 см. Кожные покровы и видимые слизистые чистые. Правая нижняя конечность увеличена в объеме (преимущественно в области бедра), усилена венозная сеть бедра, при аускультации сосудов в паховой области справа выслушивается систолический шум. Полиадений нет. При физикальном осмотре патологии внутренних органов не выявлено. Обращает внимание снижение пульсации на верхних конечностях. ЧСС – 80, АД – 120/70. Печень, селезенка не увеличены. Физиологические отправления – в норме. Суставы внешне и функционально не изменены, движения безболезненные.

В анализах крови и мочи патологических изменений не выявлено. В коагулограмме удлинение АЧТВ до 75 сек. Выявлены положительные уровни IgG-аКЛ – 62,8 GPL и IgM-аКЛ – 11,6 MPL, IgG-а-β2ГП-I более 100 ед.ОП, IgM- а-β2ГП-I – 3,2 ед.ОП. При повторном исследовании в июне 2008 г. – IgG- аКЛ – 44,4 GPL, IgG-а-β2ГП-I – 28,3 ед.ОП.

Антядерные антитела и а-ДНК отрицательные. При дуплексном сканировании вен нижних

конечностей справа *v. vil, fem. comm* – реканализованный кровоток, монофазовый, *v. fem.* – несостоятельность клапана при проведении пробы Вальсальве. *V. popl., tib. post.* – без особенностей. *V. saph. m.* – не расширена, кровенаполнение на всем протяжении слабо фазовое. Слева – глубокие вены бедра – норма, *v. popl.* неустойчивость клапана. При генетическом исследовании выявлена гомозиготная мутация фактора II протромбина, гетерозиготная мутация V фактора Лейден и гетерозиготная мутация МТГФР.

Данный случай демонстрирует, что аФЛ, выявленные у больной, явились провоцирующим фактором развития тромбоза глубоких вен нижних конечностей у больной с наследственной сочетанной тромбофилией. Таким образом, можно было предположить, что сочетание протромботических факторов (наследственных и иммунных) ведет к большему риску развития тромбозов у детей с АФС.

Анализ взаимосвязи, выявил, что комбинации различных мутаций коррелировала с ОНМК ($r = 0,17, p = 0,02$), и с синдромом Снеддона ($r = 0,16, p = 0,04$).

ВЫВОДЫ

1. Маркеры генетических тромбофилий выявляются чаще у детей с тромбозами (73 %), чем у детей без тромботических осложнений (63 %).

Сведения об авторах

Жданова Лариса Владимировна – кандидат медицинских наук, заместитель директора Бурятского филиала ФГБУ «Научный центр проблем здоровья и репродукции человека» СО РАМН, старший преподаватель ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (670018, г. Улан-Удэ, ул. Аргадинская, 10; тел.: 8 (3012451913), 89503844873; e-mail: l.zhdanova@mail.ru)

Патрушев Лев Иванович – доктор биологических наук, заведующий лаборатории генома человека Института биохимической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; тел.: +7 (495) 335-01-00, факс: +7 (495) 335-08-12; e-mail: office@ibch.ru)

Долгих Владимир Валентинович – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора ФГБУ «Научный центр проблем здоровья и репродукции человека» СО РАМН, главный врач Клиники ФГБУ «Научный центр проблем здоровья и репродукции человека» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952) 20-76-36; e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru)

2. Мутации в гене V фактора (Лейден) и G20210A в гене протромбина выявляются в 6 % случаев и ассоциируются с венозными тромбозами.

3. Дети с наследственными тромбофилиями при наличии у них антител к фосфолипидам составляют группу повышенного риска развития тромбозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 285 с.

2. D'Angelo A., Coppola A., Madonna P. et al. The role of vitamin B 12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. A case-control study of patients with early-onset thrombosis events // *Thromb. Haemost.* – 2000. – Vol. 83. – P. 563–570.

3. Lensen R., Rosendaal F., Vandenbouce J., Bertina R. Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families // *Br. J. Haematol.* – 2000. – Vol. 110. – P. 939–945.

4. Renner W., Koppel H., Hoffmann C. et al. Prothrombin G20210A, factor V Leiden, and factor XIII Val34Leu: common mutations of blood coagulation factors and deep vein thrombosis in Austria // *Thromb. Res.* – 2000. – Vol. 99. – P. 35–39.

5. Selhub J., D'Angelo A. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: acquired conditions // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol. 78. – P. 527–531.