УДК 616.15-07: 616.8 - 009

ВКЛАД НАСЛЕДСТВЕННЫХ НАРУШЕНИЙ ГЕМОКОАГУЛЯЦИИ В ФОРМИРОВАНИЕ ПЕРИНАТАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ЦНС ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ

Ковтун О.П. [1], Кузнецов Н.Н. [1], Львова О.А. [2],. Вольхина С.А [2], Баранов Д.А. [1], Пряхина О.П.[3], Зобнина Ю.В. [2]

[1] Кафедра педиатрии и неонатологии ФПК и ПП,
[2] Кафедра неврологии детского возраста и неонатологии
ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздрава России,
[3] Отделение патологии новорожденных ГУЗ СО Областная детская клиническая больница № 1, г.Екатеринбург

Изучены анамнестические и генетические данные по пакетам полиморфизмов генов тромбофилии и фолатного цикла у 30 новорожденных с очагами перивентрикулярной ишемии 2-3 степени. В семейном анамнезе у 80% детей были зафиксированы тромботические эпизоды и сосудистые события у родственников в возрасте до 50 лет. У всех пациентов выявлено от 3 до 8 полиморфизмов (в среднем 4,9). У каждого третьего младенца встречаются сочетания аллельных вариантов по двум звеньям системы гемостаза и, минимум, двух однонуклеотидных замен в генах ферментов фолатного цикла. Следует рекомендовать включить обследование на поиск мультигенных комбинаций у детей тяжелыми формами поражения ЦНС в случае дебюта в раннем возрасте.
Ключевые слова: полиморфизм генов тромбофилии, перинатальное поражение ЦНС, дети.

The significance of genes' polymorphism of hemocoagulation disease and folic acid cycle in infants with periventricular ischemia.

Kovtun O.P., Kuznetsov N.N., Lvova O.A., Volhina S.A., Baranov D.A., Pryahina O.P., Zobnina U.V.

Urals State Medical Academy , Ekaterinburg
Region children hospital #1, Ekaterinburg

Results of gene polymorphisms investigation in 30 children with severe periventricular ischemia are presented. 80% of them had relatives with variety thrombosis under the age of 50 and all of them had 3-8 SNP-mutations. The most dramatic allele F5: G1691A was not registrated. More than 30% of newborns had two polymorphic genes of folic acid and 16,7% showed combination of folic acid with thrombophilia polymorphisms including MTHFR: C677T. We propose the prescribing of thrombophilic and folic acid SNP-mutations investigations for infants in perinatal period with severe and critical neurological brain damages.
Keywords: thrombophilia genes' polymorphism, infants.

Введение

Генетически детерминированная протромботическая преддиспозиция признана в качестве одного из ведущих механизмов поражения нервной ткани у детей, не уступающего по частоте встречаемости и значимости гипоксии. В отечественном научном сообществе так и не сложилось единого мнения, может ли перивентрикулярная ишемия в структуре

перинатального поражения нервной системы (ППЦНС) у младенцев считаться эквивалентом ишемического инсульта, по аналогии со взрослыми пациентами. Известно, что внутрисосудистое тромбообразование или эмболия вследствие наследственной тромбофилии достигает 87% среди причин детского инсульта [14, 22]. В тоже время, анте-, интранатальный и период адаптации новорожденного могут стать ситуациями, провоцирующими дисбаланс в системе гемостаза, настроенного по гиперкоагуляционному сценарию [2, 3, 5, 13].

Несмотря на то, что проблема тромбофильного статуса активно изучается представителями различных медицинских специальностей, сведения о распространенности генетических полиморфизмов, ассоциированных с обменом гомоцистеина, фолатным циклом и тромбофилией, особенностями их фенотипической реализации у детей немногочисленны. В тоже время, взаимосвязь полиморфизма генов системы гемокоагуляции и ППЦНС у пациентов всех возрастных периодов изучена не до конца, существенно отличается в разных популяциях и, наконец, оспаривается рядом исследователей [12, 14, 16, 20]. К настоящему времени значительно расширились представления о нетромботических эффектах сопряженных с генами тромбофилии и о генных сетях, ведущих к поражению церебральных структур. Так, например, сочетание гомозиготного аллеля MTHFR: 677 TT и гена протромбина F2: 20210 G>A увеличивает риск развития тетраплегии у новорожденных всех гестационных сроков, а носительство MTHFR: 677 C>T примерно в 2 раза увеличивает риск развития детского церебрального паралича у недоношенных детей [13].

Материалы и методы

Нами проанализированы сведения перинатального анамнеза и аллельные варинаты генов системы свертывания крови и фолатного цикла у 30 младенцев с перинатальным поражением центральной нервной системы (МКБ-10: P 91.0-P 91.9) Средний возраст обследованных детей составил 1 ± 0,2 месяца, 16 девочек и 14 мальчиков.

Критериями включения были:

1. Постоянное проживание не менее трех поколений семьи в Свердловской области.
2. Наличие информированного согласия от родителей на участие в исследовании.
3. Осложненное течение послеродовой адаптации новорожденного с формированием среднетяжелой или тяжелой формы ППЦНС.

4. Подтвержденная по результатам нейросонографии перивентрикулярная ишемия.

Пациентам проведено определение аллельных вариантов генов системы гемостаза: F2: 20210G>A, F5: 1691G>A, F7: 10976G>A, F13: G>T(Val34Leu), FGB: -455G>A, ITGA2: 807C>T, ITGB3: 1565 T>C, PAI-1: -675 5G>4G и фолатного цикла MTHFR: 677C>T, MTHFR: 1298A>C, MTRR: 66A>G, MTR: 2756A>G по методу ПЦР real time из цельной крови. Обработка данных проводилась с помощью пакета программ Statistica 6.0. Результаты исследования и обсуждение.

Диагноз тромбофилии у пациентов и в их семьях до факта регистрации ППЦНС установлен не был. В тоже время, при сборе анамнеза в 80% случаев зафиксированы тромботические события у родственников первой линии в возрасте до 50 лет, у 23% пациентов отмечены летальные исходы от них у родственников 1-2 линии родства в возрасте до 55 лет. Можно предположить, что низкий уровень ориентированности врачей – педиатров амбулаторного звена в феноменологии тромбофилии, отсутствие информации о необходимости и возможности обследования на носительство генов привели к недооценке клинической и лабораторной картины болезни.

Результаты и обсуждение

Патологическое течение перинатального периода – основной предиктор формирования ППЦНС у детей. В таблице 1 представлены наиболее вероятные факторы риска, комбинация которых могла привести к развитию гипоксически-ишемических процессов в нервной ткани младенцев. Большинство матерей пациентов имели отягощенный акушерский и соматический анамнез, каждая пятая женщина относилась к категории «пожилая первородящая». Осложненная беременность приводила к преждевременному рождению ребенка с признаками критического состояния, необходимости проведения оперативных родов или протезированию витальных функций у младенцев.

Таблица 1

Структура факторов перинатального анамнеза у детей с ППЦНС, абс (%)

Фактор	ППЦНС, n=30
Отягощенный акушерский и/или гинекологический анамнез до настоящей беременности	29 (96,7)
Пожилая первородящая	6 (20,0)
Соматическая отягощенность матери по заболеваниям (кардиологические, нейроциркуляторная дистония, сахарный диабет)	18 (60,0)
Во время настоящей беременности: угрозы прерывания, ХФПН, анемия, курение, ОРВИ)	20 (66,7)
Оперативные роды по ургентным показаниям со стороны плода	14 (46,7)
Срок гестации: доношенные Недоношенные	11 (36,7) 22 (73,3)
Оценка по шкале Апгар на 1\5 минуте: 6-7 баллов 3-5 баллов	13 (43,3) 17 (56,7)
Интенсивная терапия в роддоме (кислород, ИВЛ, инфузионная терапия, свежезамороженная плазма, кровозаменители)	22 (73,3)
Дети от ЭКО или других репродуктивных технологий	3 (10,0)

Где: ХФПН – хроническая фето-плацентарная недостаточность, ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция, ИВЛ – искусственная вентиляция легких, ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение.

Нарушение фетоплацентарного кровообращения и осложненное течение перинатального периода приводят к недостаточному кровоснабжению церебральных структур, что заканчивается формированием очагов инфарктов у плода, новорожденного и ребенка грудного возраста [3, 5, 22]. По мнению некоторых специалистов, натальная травма шейного отдела позвоночника становится площадкой, на которой в дальнейшем становится возможным развитие неполноценной церебральной гемодинамики за счет стеноза и тромбоза сосудов вертебро-базиллярного бассейна. Перинатально сформированная патология может выступить в качестве базы, облегчающей реализацию ишемии для других факторов риска (например, тромбофилии) на любом этапе болезни.

Абсолютно все наши пациенты (100%) были носителями от 3 до 8 полиморфизмов (в среднем 4,9). Дети имели 1-4 аллельных вариантов тромбофилии (2,3±1,0) и 0-4 генов-кандидатов фолатного цикла (2,6±0,8). Структура SNP-мутаций у обследуемых больных представлена в таблице 2.

Таблица 2
Структура полиморфизмов генов системы коагуляции и фолатного циклау детей с ППЦНС (абс/%)

Мутация (полиморфизм)	Норма («дикий» вариант)	Всего мутаций	Гетерозиготный вариант	Гомозиготный вариант
F2: 20210 G>A	28 (93,3)	2 (6,7)	2 (6,7)	0
F5: 1691 G>A	30 (100)	0	0	0
F7: 10976 G>A	23 (76,7)	7 (23,3)	7 (23,3)	0
F13: G>T (Val34Leu)	20 (66,7)	10 (33,3)	8 (26,6)	2 (6,7)
FGB: -455 G>A	19 (63,3)	11 (36,7)	10 (33,4)	1 (3,3)
ITGA2: 807 C>T	13 (43,3)	17 (56,7)	11 (36,9)	6 (19,8)
ITGB3: 1565 T>C	15 (50)	15 (50)	13 (43,5)	2 (6,5)
PAI-1:-675 5G>4G	13 (43,3)	17 (56,7)	12 (40,3)	5 (16,7)
MTHFR: 677 C>T	14 (46,7)	16 (53,3)	12 (40)	4 (13,3)
MTHFR: 1298 A>C	12 (40)	18 (60)	13 (43,2)	5 (16,7)
MTR: 2756 A>G	17 (57)	13 (43)	11 (37)	2 (6,0)
MTRR: 66 A>G	6 (20)	24 (80)	15 (50,4)	9 (29,6)

Количественный анализ показал отсутствие носительства драматической однонуклеотидной замены в гене проакцелерина (F5: 1691G>A, мутация Лейден), которая считается доказанным фактором риска развития ишемического инсульта в неонатальном периоде. Всего двое детей были носителями гетерозиготного варианта протромбина (F2: 20210G>A).

У каждого второго ребенка выявлен синдром «липких тромбоцитов» и мутация по системе фибринолиза (PAI-1: -675 5G>4G). Увеличение плотности коллагеновых рецепторов и повышение их афинности к фибриногену на поверхности тромбоцитов не только активирует их способность к агрегации, но и считается основой резистентности к традиционному препарату вторичной профилактики тромбозов – аспирину [17, 19]. В тоже время, плазменное звено системы гемостаза не осталось интактным – у каждого третьего пациента отмечена однокулеотидная замена в гене фибриногена. Показано, что за счет повышения уровня секреции фибриногена, риск тромботических событий у таких пациентов увеличивается в 2,5 раза [15, 16, 18].

По данным литературы, одними из наиболее прогностически неблагоприятных полиморфизмов генов фолатного цикла считают MTHFR [6, 10, 12]. В нашем исследовании частота встречаемости его аллелей практически в 1,5 раза превышает данные Европейского ресурса SNP NCBI: у каждого второго ребенка выявлен полиморфизм MTHFR 677 CT; в единичных случаях – генотип 677 TT, носительство которых в наибольшей степени связывают с развитием гипергомоцистеинемии [1, 6, 9, 23]. Частота других однокулеотидных

замен в генах фолатного цикла также оказалась выше общепопуляционных показателей, представленных в литературе [9]. Частотная характеристика описанных мутаций, их мультигенные комбинации указывают на повышенный риск развития гипергомоцистеинемии, что требует фенотипического подтверждения.

В России отсутствуют популяционные сведения по оцениваемым вариантам генов, тем более, что для Уральского региона, расположенного на границе Европы и Азии, они могут отличаться от общероссийских. В настоящее время недостаточно данных, чтобы судить о представленности тромбофильных аллелей у детей с тромбозами различной локализации или в иных клинических группах. В целом, частотная характеристика полиморфизмов повторяет отраженную в литературе географическую закономерность к нарастанию мутаций фибринолитического звена гемостаза и фолатного цикла по мере приближения к Азиатской части нашего континента.

В ходе исследования мы проанализировали комбинации полиморфизмов генов белковых продуктов, различных по принадлежности и значению в системе гемокоагуляции: плазменных, рецепторных и системы фибринолиза, а также в сочетании с ферментами фолатного цикла (табл. 3).

Таблица 3

Структура вариантов ген-генных сочетаний у детей с ППЦНС, абс (%)

Варианты сочетаний *	ППЦНС	
	n	%
FGB: -455 G>A, F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A + ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C	10	33,3
FGB: -455 G>A, F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A + PAI-1: -675 5G>4G	8	26,7
ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C + PAI-1: -675 5G>4G	12	40
FGB: -455 G>A, F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A + ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C + PAI-1: -675 5G>4G	6	20
MTHFR 677 CT + MTHFR 1298 AC	9	30
MTHFR C677T + MTHFR A1298 C+ MTR A2756G	5	16,6
MTHFR C677T + MTRR A66G + MTR A2756G	6	20
MTHFR C677T + MTHFR A1298 C+ MTRR A66G	7	23,3
MTHFR C677T + MTRR A66G + MTR A2756G + MTHFR A1298 C	0	0
FGB: -455 G>A, F2: 20210 G>A, F5: 1691 G>A + ITGA2: 807 C>T, ITGB3: 1565 T>C + PAI-1: -675 5G>4G + MTHFR: 677 C>T	5	16,6

* - сочетание засчитывалось при наличии хотя бы одного мутантного гена из каждой группы, хотя бы в гетерозиготном состоянии; ППЦНС – перинатальное поражение центральной нервной системы.

У каждого третьего младенца встречаются сочетания аллельных вариантов по двум звеньям системы гемостаза, у каждого третьего – по всем

трем (20,0%). Треть детей имели комбинации минимум двух однонуклеотидных замен в генах ферментов фолатного цикла, а пять новорожденных были носителями трех и более значимых полиморфизмов по системам гемокоагуляции и фолатного цикла (аллельный вариант MTHFR: 677 C>T).

Ухудшение гемореологической ситуации, изменение уровня артериального давления, эндотелиальная дисфункция, системный воспалительный ответ и другие известные типовые патологические процессы, запускаемые гипоксией, могли инициировать гиперкоагуляционное состояние и тромбоз различной локализации. В свою очередь, генетически детерминированный каскадный механизм микротромбообразования драматическим образом влияет на перфузионную ситуацию в месте тромбоза, поддерживая гипоксию, запуская некротические и проапоптотические механизмы гибели нервной клетки.

Именно младенцы с мультигенными формами тромбофилии должны быть отнесены в группу высокого риска по формированию повторных тромботических событий (венозных и артериальных) различной локализации (кардио- и цереброваскулярных, тромбозов вен кишечника, конечностей, почек и пр.), нуждаются в тщательном и персонализированном подборе мер вторичной профилактики.

В настоящее время известно, что в популяции здоровых людей число описанных полиморфизмов, как правило, не превышает двух [5]. В тоже время, количество однонуклеотидных замен не всегда играет решающую роль в развитии заболевания (за исключением некоторых гомозиготных вариантов), следует рассматривать индивидуальные генные сети, варианты их фенотипической реализации в системе гемостаза, уровне гомоцистеина, фолиевой кислоты или пиридоксина.

Нами зафиксирована высокая частота выявления аллельных вариантов генов системы гемокоагуляции и ферментов фолатного цикла у грудных детей. Нарушение баланса в системе свертывания крови и гипергомоцистеинемия, обусловленные SNP-мутациями, могут стать факторами, ощутимо влияющими на микроциркуляторную ситуацию в нервной ткани. Осознание этого положения диктует необходимость введения генотипирования по пакету «тромбофилия» и «фолатный цикл» у младенцев с тяжелыми формами поражения нервной системы в грудном возрасте. Лабораторный мониторинг системы гемостаза, уровня гомоцистеина,

назначение курсов фолиевой кислоты и витаминов группы В также могут стать неотъемлемой частью медицинского сопровождения маленьких пациентов в течении критических этапов роста и развития [10].

Заключение

Таким образом, неблагополучное течение анте-, интра- и неонатального этапа адаптации остается ведущим этиологическим фактором поражения нервной системы в перинатальном и грудном периоде. Соматические заболевания матери до и во время беременности, ее осложненное течение в совокупности с естественным фоном гиперкоагуляции беременной женщины создает возможность для реализации у ребенка наследуемого протромботического сценария [3, 5, 11, 21]. Комбинация гипоксически-ишемических процессов, системного воспаления и тромбофильности приводит к лавинообразному запуску процессов микротромбообразования, катастрофическому ухудшению гемореологической ситуации, гибели клеток нервной ткани у младенцев. Это неблагополучие более ассоциировано с перинатальным поражением и, возможно, с фетальным инсультом [22].

Вклад генетически детерминированных тромбофилий, в случае образования ишемических очагов в нервной системе на ранних этапах жизни ребенка, очевиден. В тоже время, наличие таких мутаций не является роковым фактором, неизбежно ведущими к сосудистым событиям. Роль каждого гена, генных сочетаний, комбинаций с мутациями других систем, контролирующих состояние сосудистой стенки и ее атромбогенность, еще предстоит изучить. Детям, которые проживают критические состояния и формируют массивные перивентрикулярные ишемические очаги, пациентам с подозрением на фетальный, перинатальный и детский инсульт необходимо активно внедрять в блок обследования поиск однокулеотидных замен в генах системы гемостаза, фолатного цикла, оксид-синтаз, липидного спектра и т.д. Высокая частота выявления дефектных генов, ассоциированных с нарушением баланса по системе свертывание – противосвертывание, требует клинико-лабораторного мониторинга во время критических периодов роста и развития ребенка (неонатальном, вакцинации, ростовых скачков, пубертатном периоде, беременности и т.д.). Идентификация генов-кандидатов и отслеживание вариантов их фенотипической реализации у каждого конкретного больного может стать отправной точкой для подбора адресной, персонализированной фармакотерапии.

Список литературы

1. Болдырев А.А. Молекулярные механизмы токсичности гомоцистеина // Биохимия. 2009. Т. 74, № 6. С. 725 - 736.

2. Гомеля М.В., Большакова С.Е., Филиппов Е.С. и др. Изменчивость генетических маркеров протромботических нарушений у детей // Сибирский медицинский журнал. 2009. № 8. С. 5 -7.

3. Корнюшина Е.А., Зайнулина М.С. Нарушения системы гемостаза, методы их коррекции и исходы беременности у больных с невынашиванием и тромбофилией // Журнал акушерства и женских болезней. 2008. LVII, № 4. С. 89-95.

4. Наследственные нарушения нервно-психического развития детей. Руководство для врачей / Под ред. П.А. Темина, Л.З. Казанцевой. М.: Медицина, 2001. С. 44 – 52.

5. Плаксина А.Н. Прогнозирование здоровья и качества жизни детей, рожденных с помощью вспомогательных репродуктивных технологий. Автореф дис. … канд. мед. наук. Екатеринбург, 2011. 27с.

6. Спиридонов М.Г., Степанов В.А., Пузырев В.П. О роли полиморфных вариантов гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний // Клиническая медицин. 2001. № 2. С. 10–16.

7. Тадтаева З.Г., Кацадзе Ю.Л. Полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы, гипергомоцистеинемия и возможности ее медикаментозной коррекции при мигрени у детей // Казанский медицинский журнал. 2007. 88(1). С. 16-20.

8. Шевченко О.П., Олефиренко Г.А., Червякова Н.В. Гомоцистеин. М.: Медицина, 2002. 48 с.

9. Электронный ресурс. Режим доступа.URL: http://www.ncbi.nlm.gov.projects/SNP (дата обращения 17.10.2012).

10. De Stefano V., Casorelli I., Rossi E., Zappacosta B., Leone G. // Semin Thromb Hemost. -2000. V.26(3). P. 305 - 311.

11. Dunkel-Schetter C. Maternal stress and preterm delivery // Prenatal Neonatal Med. 1998. V.3. P. 39 – 42.

12. Franco R.F., Araujo A.G., Guerreiro J.F. et al. Analysis of the 677C-T mutation of the methylentetrahydrofolate reductase gene in different ethnic group // Thromb Haemost. 1998. V. 79 (1). P. 119–121.

13. Gibson C.S., MacLennan A.H., Hague W.M. et al. Associations between inherited thrombophilias, gestational age, and cerebral palsy // American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2005. V.193(4). P. 1437.e1-1437.e12.

14. Kirkham F.J. Is there a genetic basis for pediatric stroke? // Curr Opin Pediatr. 2003. V.15(6). P. 547 - 558.

15. Laffan M.A. Fibrinogen polymorphisms and disease // Eur Heart J. 2001. V. 22(24). P. 2224 - 2226.

16. Liu Y., Pan J., Wang S. beta-fibrinogen gene -455A/G polymorphism and plasma fibrinogen level in Chinese stroke patients // Chin Med J. 2002. V.115. P. 214-216.

17. Macchi L., Christiaens L., Brabant S. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PlA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalpha) polymorphisms // J Am Coll Cardiol. 2003. V. 42 (6). P. 1115 - 1119.

18. Martiskainen M., Pohjasvaara T., Mikkelsson J. et al. Fibrinogen gene promoter -455 A allele as a risk factor for lacunar stroke // Stroke. 2003. V.34(4). P. 886 - 891.

19. McKee S.A., Sane D.C., Deliargyris E.N. Aspirin resistance in cardiovascular disease. A review of prevalence, mechanisms, and clinical significance // Thromb Haemost. 2002. V.88. P. 711 - 715.

20. Miller Steven P., Wu W., Lee J. et al. Candidate gene polymorphisms do not differ between newborns with stroke and normal controls // Stroke. 2006. V.37. P. 2678 - 2682.

21. Otamari G. Delayed neurological adaptation in infants delivered elective caesarean section // Early human Development. 1991. V.26. P.51-60.

22. Scher M.S., Wiznitzer M., Bangert B.A. Cerebral infarctions in the fetus and neonate. P. maternal-placental-fetal considerations // Clin Perinatol. 2002. V.29. P. 693 - 724.

23. Welch G., Loscalzo J. Homocysteine and aterothrombosis // N Emgl J Med. 1998. V. 338 (15). P. 1042–1050.

Львова Ольга Александровна - заведующая кафедрой неврологии детского возраста и неонатологии ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития России, к.м.н., доцент, 620219, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3,тел. (343)3723259, факс – (343)3716400, e-mail:olvova@bk.ru