

О.А. Филиппова^{1, 2}, И.В. Вахлова¹, Н.Н. Кузнецов¹, Т.Б. Аболина¹, Г.А. Цаур^{1, 2}¹ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Российская Федерация² ГАУЗ СО Областная детская клиническая больница, Екатеринбург, Российская Федерация

Ассоциация вариантов генов плазменного (FGB -455 G>A (rs1800790), F2 20210 G>A (rs1799963), F5 1691 G>A (rs6025), F7 10976 G>A (rs6046), F13 G>T (rs5985)), тромбоцитарного (ITGA2 807 C>T (rs1126643), ITGB3 1565 T>C (rs5918)), фибринолитического (PAI-1 -675 5G>4G (rs1799889)) звеньев гемостаза с артериальными или венозными тромбозами у новорожденных: исследование «случай-контроль»

Автор, ответственный за переписку:

Филиппова Олеся Андреевна, аспирант кафедры госпитальной педиатрии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России

Адрес: 620028, Россия, Екатеринбург, ул. Репина, д. 3, тел.: +7 (961) 768-91-65, e-mail: glesenok@yandex.ru

Обоснование. Тяжесть клинического течения тромбозов у новорожденных детей, обуславливающая неблагоприятный прогноз для жизни, исходы в виде инвалидизации и стойких нарушений функций органов диктуют необходимость дальнейшего поиска и изучения предикторов тромботических состояний с целью предупреждения их развития. **Цель исследования** — провести анализ частоты вариантов генов плазменного, тромбоцитарного, фибринолитического звеньев гемостаза и определить их роль в развитии тромбозов у новорожденных детей. **Методы.** В исследование было включено 46 доношенных новорожденных с тромбозами различной локализации, составивших группу «случаи». Критериями включения являлись возраст ребенка 28 и менее суток жизни, гестационный срок более 37 нед, информированное согласие на участие в исследовании. В контрольную группу включали детей I и II групп здоровья. Диагностика тромбозов сосудов осуществлялась при помощи инструментальных визуализирующих методов (ультразвуковое исследование сосудов, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография). Тромбофильный анамнез, состояние здоровья беременной женщины анализировали по историям развития беременности. Молекулярно-генетическое исследование включало определение 8 однонуклеотидных полиморфизмов генов FGB -455 G>A (rs1800790), F2 20210 G>A (rs1799963), F5 1691 G>A (rs6025), F7 10976 G>A (rs6046), F13 G>T (rs5985), ITGA2 807 C>T (rs1126643), ITGB3 1565 T>C (rs5918), PAI-1 -675 5G>4G (rs1799889). **Результаты.** Установлено, что молекулярно-генетическими предикторами развития тромбозов у новорожденных являются варианты гена фибриногена FGB -455 G/A (АП, %=66), гена ингибитора активатора плазминогена PAI-1 -675 4G/4G (АП, %=89), ассоциаций генотипов PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G (АП, %=82), PAI-1 -675 4G/4G + F13 34 G/G (АР, %=63) PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G + F13 34 G/G (АР, %=61), и гена интегрин альфа 2 ITGA2 807 T/T (АП, %=93). «Материнским фактором» развития тромбозов у детей является нарушение маточно-плацентарного кровотока у беременной женщины (АП, %=66). **Заключение.** Определена роль и дана количественная оценка вклада в развитие тромбозов у новорожденных вариантов генов плазменного, тромбоцитарного, фибринолитического звеньев гемостаза.

Ключевые слова: новорожденный, тромбозы, ингибитор активатора плазминогена, фибриноген, интегрин альфа 2

Для цитирования: Филиппова О.А., Вахлова И.В., Кузнецов Н.Н., Аболина Т.Б., Цаур Г.А. Ассоциация вариантов генов плазменного (FGB -455 G>A (rs1800790), F2 20210 G>A (rs1799963), F5 1691 G>A (rs6025), F7 10976 G>A (rs6046), F13 G>T (rs5985)), тромбоцитарного (ITGA2 807 C>T (rs1126643), ITGB3 1565 T>C (rs5918)), фибринолитического (PAI-1 -675 5G>4G (rs1799889)) звеньев гемостаза с артериальными или венозными тромбозами у новорожденных: исследование «случай-контроль». *Педиатрическая фармакология*. 2020;17(5):437–444. doi: 10.15690/pf.v17i5.2163.

ОБОСНОВАНИЕ

В последние 20 лет распространенность венозного тромбоза в Дании и Нидерландах составляет 1,4 случая [1], в Канаде и Гонконге — 0,7 случая на 100 тыс. детского населения в год [2, 3]. В Великобритании частота инсультов среди детей в возрасте от 1 до 18 лет составляет около 13 случаев на 100 тыс. детского населения в год, среди новорожденных — 25 на 100 тыс. в год [4]. В Германии тромботические осложнения при различных заболеваниях наблюдаются у 53 пациентов на 100 тыс. детей, госпитализированных в течение

года [5]. В период с 2001 по 2007 г. в США отмечено увеличение числа случаев венозных тромбозов у детей до 188 на 100 тыс. выписанных из стационара [6, 7]. Причины возникновения тромбозов в детском возрасте, патогенетические и клинические аспекты тромбообразования у новорожденных детей являются предметом изучения и активного обсуждения [8]. Результаты исследований, проведенных в последние годы, демонстрируют связь между тяжелыми сосудистыми акушерскими осложнениями (гестозы, фетоплацентарная недостаточность, антенатальная гибель плода и др.) и клини-

ческими проявлениями венозной тромбоэмболии, обусловленными почти в 90% случаев тромбофильными состояниями у беременных женщин [9].

Роль генетических факторов в развитии тромбозов у детей обсуждается как в отдельных публикациях [10], так и в систематических обзорах [11, 12]. В частности, в систематическом обзоре [11] объединение результатов исследований «случай-контроль» не подтвердило связь ишемического инсульта у детей с вариантами гена ингибитора общего активатора плазминогена (PAI-1) (8 исследований) и гена фактора XIII (FXIII) (4 исследования). В другом систематическом обзоре наблюдательных исследований было показано, что артериальный ишемический инсульт и церебральный синовенозный тромбоз у детей, включая новорожденных, ассоциировали с генетическими факторами риска — дефицит протеинов S, C, антитромбина III, факторов V и II, MTHFR C677T, антифосфолипидных антител. В 6 перинатальных исследованиях была подтверждена связь с артериальным ишемическим инсультом фактора V и фактора II (протромбина) [12]. Увеличение риска тромбообразования за счет повышенной агрегации тромбоцитов, обусловленной увеличением плотности коллагенового рецептора на мембране (ITGA2) и повышением аффинности фибриногенового рецептора (ITGB3) показано на примере вариантов генов интегрин A2 (ITGA2) и интегрин B3 (ITGB3) [13].

Представляет научный и практический интерес дальнейшее изучение протромбогенного влияния разно-

образных комбинаций вариантов генов, отвечающих за разнонаправленные механизмы процесса свертывания крови, — фибринолитического и плазменного звеньев гемостаза, и их вклад в клиническую реализацию развития тромбозов.

Цель исследования

Изучить ассоциацию вариантов генов плазменного, тромбоцитарного, фибринолитического звеньев гемостаза с артериальными и венозными тромбозами у новорожденных детей.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено наблюдательное исследование по типу «случай-контроль». Группу «случаи» формировали путем включения в исследование всех новорожденных детей с диагностированными артериальными и/или венозными тромбозами, зарегистрированными в участвующем учреждении в период исследования (сплошная выборка). Группу «контроли» формировали из числа новорожденных детей, относившихся к I и II группам здоровья.

Условия проведения

В группу «случаи» включали детей, находившихся в отделениях новорожденных акушерского наблюдательного отделения, патологии новорожденных и недо-

Olesia A. Filippova^{1, 2}, Irina V. Vakhlova¹, Nikolay N. Kuznetsov¹, Tatiana B. Abolina¹, Grigory A. Tsaur^{1, 2}

¹ Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg, Russian Federation

² Oblast Children's Clinical Hospital, Ekaterinburg, Russian Federation

Association of Gene Variants of Plasmic (FGB -455 G>A (rs1800790), F2 20210 G>A (rs1799963), F5 1691 G>A (rs6025), F7 10976 G>A (rs6046), F13 G>T (rs5985)), Thrombocytic (ITGA2 807 C>T (rs1126643), ITGB3 1565 T>C (rs5918)), Fibrinolytic (PAI-1 -675 5G>4G (rs1799889)) Hemostasis Components with Arterial or Venous Thrombosis in Newborns: Case-Controlled Study

Background. The severity of thrombosis clinical course, poor prognosis, upcoming disability and permanent organ failure in newborns necessitate further search and study of thrombotic conditions predictors in order to prevent them. **Aim of the study** is to analyze the frequency of gene variants of plasmic, thrombocytic and fibrinolytic hemostasis components and determine their role in the thrombosis development in newborn children. **Methods.** The study included 46 full-term newborns with thromboses of different localization – cases group. Inclusion criteria were: child age 28 days or less, gestational period >37 weeks, informed consent on participation in the study. The control group included children of I and II health groups. Vascular thrombosis was diagnosed via instrumental imaging methods: vascular ultrasound, computer tomography, magnetic resonance imaging. Thrombophilic anamnesis and pregnant woman's health condition was analyzed according to pregnancy medical records. The molecular genetic testing included 8 single nucleotide polymorphisms definition of the following genes: FGB -455 G>A (rs1800790), F2 20210 G>A (rs1799963), F5 1691 G>A (rs6025), F7 10976 G>A (rs6046), F13 G>T (rs5985), ITGA2 807 C>T (rs1126643), ITGB3 1565 T>C (rs5918), PAI-1 -675 5G>4G (rs1799889). **Results.** Molecular genetic predictors of thrombosis in newborns have been revealed: variants of fibrinogen gene FGB -455 G>A (AP, %=66), plasminogen activator inhibitor gene PAI-1 -675 4G > 4G (AP, % = 89), genotype associations PAI-1 -675 4G/>4G / F7 10976 G>G (AP, % = 82), PAI-1 -675 4G>4G / F13 34 G>G (AP, % = 63) PAI-1 -675 4G>4G / F7 10976 G>G / F13 34 G>G (AP, % = 61), and integrin alpha 2 gene ITGA2 807 T/T (AP, % = 93). Maternal factor of thrombosis development in children is impaired uteroplacental circulation in pregnant woman (AP, % = 66). **Conclusion.** The role of gene variants of plasmic, thrombocytic and fibrinolytic hemostasis components in development of thrombosis in newborns was determined, as well as quantitative estimation of their contribution was presented.

Keywords: newborn, thrombosis, plasminogen activator inhibitor, fibrinogen, integrin alpha 2.

For citation: Filippova Olesia A., Vakhlova Irina V., Kuznetsov Nikolay N., Abolina Tatiana B., Tsaur Grigory A. Association of Gene Variants of Plasmic (FGB -455 G>A (rs1800790), F2 20210 G>A (rs1799963), F5 1691 G>A (rs6025), F7 10976 G>A (rs6046), F13 G>T (rs5985)), Thrombocytic (ITGA2 807 C>T (rs1126643), ITGB3 1565 T>C (rs5918)), Fibrinolytic (PAI-1 -675 5G>4G (rs1799889)) Hemostasis Components with Arterial or Venous Thrombosis in Newborns: Case-Controlled Study. *Pediatricheskaya farmakologiya — Pediatric pharmacology*. 2020;17(5):437–444. doi: 10.15690/pf.v17i5.2163.

ношенных детей, а также в отделении анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии для новорожденных ГАУЗ СО ОДКБ (г. Екатеринбург). В группу «контроли» включали детей отделения новорожденных акушерского наблюдательного отделения ГАУЗ СО ОДКБ.

Продолжительность исследования

Включение в исследование — как в группу «случаи», так и в группу «контроли» — проводили в период с декабря 2017 по март 2019 г.

Критерии соответствия

В группу «случаи» включали детей в возрасте ≤ 28 сут жизни, доношенных (гестационный срок > 37 нед), с установленным тромбозом сосудов артериальной и/или венозной систем (независимо от локализации) при получении информированного добровольного письменного согласия законного представителя ребенка на участие в исследовании. Не включали в исследование новорожденных с врожденной тромбофилией, обусловленной дефицитом физиологических антикоагулянтов — антитромбина, протеина С и протеина S.

В контрольную группу включали здоровых детей I или II групп здоровья в возрасте ≤ 28 сут жизни. Сведения о состоянии здоровья и заключение о группе здоровья получали из истории развития новорожденного. Критерии не включения в группу — наличие у родителей в анамнезе артериальных и/или венозных тромбозов, сахарного диабета I типа, иммунодефицитных состояний, системных заболеваний соединительной ткани, онкологических заболеваний.

Описание критериев соответствия

Наличие тромбоза сосудов у новорожденных верифицировали в рамках обычной клинической практики. С этой целью, помимо клинических данных, использовали результаты следующих визуализирующих методов: ультразвуковое исследование сосудов (аппарат Philips IE 33, Philips, Нидерланды), компьютерная томография (аппарат Brilliance CT, Philips, Нидерланды), магнитно-резонансная томография (аппарат Philips Achieva 1.5T, Philips, Нидерланды). При выборе метода исследования руководствовались Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике, профилактике и лечению тромбозов у детей и подростков [14], а также критериями American College of Radiology [15].

Состояние здоровья беременной женщины анализировали по данным истории развития беременности, аккумулированных в автоматизированной системе «Мониторинг беременных», внедренной в практику учреждений службы родовспоможения Свердловской области в 2013 г. Кроме того, у матерей новорожденных в период их нахождения в стационаре проводили сбор данных анамнеза жизни, акушерского и гинекологического анамнеза.

Для исключения врожденной тромбофилии, обусловленной дефицитом физиологических антикоагулянтов, определяли концентрацию антитромбина, протеинов С и S. Референсные значения уровня антитромбина для детей в возрасте менее 3 сут жизни составляли 58–120%, 3 сут – 1 мес — 60–89%; для протеина С: до 5 сут жизни — 17–53%, 5–30 сут жизни — 20–64%; для протеина S: в возрасте 1 сут – 3 мес — 15–55%. Исследование показателей системы гемостаза проводили на автоматическом коагулометре «Sysmex SA 660» (Sysmex, Япония).

Целевые показатели исследования

Основной показатель исследования

Распределение вариантов генов фибриногена — FGB -455 G>A (rs1800790), протромбина (коагуляционный фактор II) — F2 20210 G>A (rs1799963), фактора Лейден (коагуляционный фактор V) — F5 1691 G>A (rs6025), коагуляционного фактора VII — F7 10976 G>A (rs6046), коагуляционного фактора XIII — F13 G>T (rs5985), интегрин альфа 2 — ITGA2 807C>T (rs1126643), тромбоцитарного рецептора фибриногена гликопротеина 3a — ITGB3 1565T>C (rs5918), ингибитора активатора плазминогена — PAI-675 5G>4G (rs1799889) у новорожденных детей с тромбозами и детей контрольной группы.

Дополнительные показатели исследования

Распределение выбранных комбинаций генотипов у новорожденных детей с тромбозами и детей контрольной группы. Выбор комбинаций генотипов осуществляли на основании гипотезы о совместном влиянии на риск развития тромбоза генов факторов, запускающих коагуляцию (факторы VII и XIII), и факторов, инициирующих фибринолиз (PAI). Таким образом, анализировалось распределение комбинаций генотипов PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G, PAI-1 -675 4G/4G + F13 34 G/G, PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G + F13 34 G/G.

Предикторы развития тромбозов у новорожденных. В качестве потенциальных предикторов развития тромбозов учитывали анамнестические (антенатальные факторы матери) и генетические факторы (отдельные аллельные варианты, комбинации генотипов), изученные в настоящем исследовании.

Молекулярно-генетическое исследование

Варианты генов тромбофилии исследовали в лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии Областной детской клинической больницы (г. Екатеринбург) и лаборатории медицинского центра «Уральский» (г. Екатеринбург).

Венозную кровь в объеме 2 мл забирали в вакуумные пробирки S-Monovette с 1,6 мг ЭДТА (Sarstedt, Германия), затем сразу при комнатной температуре транспортировали в лабораторию, где ее аликвотировали, замораживали и хранили при -25°C . Срок хранения от момента поступления материала в лабораторию до выделения ДНК не превышал 14 сут.

Выделение ДНК проводили из размороженных образцов цельной крови объемом 100 мкл с использованием набора «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА» (ДНК-Технология, Россия) согласно инструкции производителя. Полученную взвесь объемом 5 мкл без измерения концентрации ДНК использовали в качестве исходного материала для проведения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с набором «КардиоГенетика Тромбофилия» (ДНК-Технология, Россия) на детектирующем амплификаторе DPrime 5M1 (ДНК-Технология, Россия) с последующим автоматическим анализом полученных данных с применением программы RealTime_PCR (Научно-производственное объединение ДНК-Технология, Россия). В состав набора «КардиоГенетика Тромбофилия» входят реактивы для определения 8 однонуклеотидных вариантов: FGB -455 G>A (rs1800790), F2 20210 G>A (rs1799963), F5 1691 G>A (rs6025), F7 10976 G>A (rs6046), F13 34 G>T (rs5985), ITGA2 807 C>T (rs1126643), ITGB3 1565 T>C (rs5918), PAI-1 -675 5G>4G (rs1799889). Каждый из вариантов анализировали в отдельной реакционной пробирке. Одновременно проводилась детекция по трем флуоресцентным каналам: по каналу FAM выявлялся

«дикий» (нормальный) вариант каждого из исследуемых полиморфизмов, по каналу HEX — альтернативный вариант, а по каналу Cy5 оценивался количество внесенной ДНК. Согласно инструкции производителя, для корректной интерпретации результатов пороговое значение (Cp) по каналу Cy5 по каналу у сенной ДНК. Согласно инструкции проиеству ДНК $\geq 1,0$ нг, внесенному в реакционную пробирку. Для оценки собственно вариантов на последнем этапе ПЦР-РВ применялась технология плавления полученных флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов по каналам FAM и HEX. Исходя из известной температуры плавления, программа RealTime_PCR автоматически определяла наличие/отсутствие каждого из 8 исследуемых однонуклеотидных вариантов. Повторную верификацию результатов исследования не проводили. Составы наборов и анализаторы в участвующих лабораториях идентичные.

Этическая экспертиза

Проведение исследования было одобрено на заседании Локального этического комитета при ГАУЗ СО ОДКБ (г. Екатеринбург), протокол № 2 от 15.05.2018.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Предварительный расчет размера выборки не проводился.

Методы статистического анализа данных

Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных программ STATISTICA, версия 10.0 (StatSoft Inc., США). Для описания количественных признаков рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартное отклонение. Оценка статистической значимости различий частот наблюдений в сравниваемых группах проводилась с использованием критерия Пирсона χ^2 и точного двустороннего критерия Фишера.

Оценка связи клинических и генетических факторов с развитием тромбозов проведена с использованием значений отношения шансов (ОШ, 95% ДИ), рассчитываемого как отношение шансов события (тромбоза) в группе, имевшей патогенное воздействие фактора риска, к шансам события в группе, не имевшей патогенного

воздействия фактора риска; атрибутивного риска (АР, %), рассчитываемого как разница частот события (тромбоза) в группе, имевшей патогенное воздействие фактора риска, и в группе без патогенного воздействия фактора риска; атрибутивной (этиологической) пропорции (АП, %), являющейся той долей случаев развития события (тромбозы) в группе, подвергшейся исследуемому патогенному фактору риска, которая непосредственно связана с этим патогенным воздействием. Атрибутивную пропорцию рассчитывали по формуле $АП = [(ОШ-1)/ОШ] \times 100\%$, применимой для исследований «случай-контроль» [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование выборки исследования

В период исследования в участвующем в исследовании стационаре под наблюдением находилось 46 новорожденных с артериальными и/или венозными тромбозами, все без врожденной тромбофилии. Все эти пациенты были включены в группу «случай».

Группу «контроли» составили 57 новорожденных, соответствующих критериям I и II групп здоровья, включавшихся в исследование по мере рождения, с оформлением добровольного письменного согласия законных представителей ребенка на проведение генетического исследования и наблюдавшихся в отделении новорожденных акушерского наблюдационного отделения.

Характеристика участников исследования

Сравниваемые группы были сопоставимы по полу, антропометрическим показателям при рождении, этнической принадлежности, клиническим диагнозам у матерей. Исключением были нарушения маточно-плацентарного кровотока, которые в два раза чаще отмечались у матерей новорожденных с тромбозами (табл. 1).

Структура тромбозов и их локализация представлены в табл. 2. У более половины детей диагностированы артериальные тромбозы, из них у большинства — ишемический инсульт в бассейне средней мозговой артерии. В структуре венозных тромбозов доминировали синус-тромбозы.

Основные результаты исследования

В группе «случай» отмечена более высокая частота тромбогенных вариантов гена фибриногена FGB-455 G/A,

Таблица 1. Показатели перинатального и раннего постнатального периода у новорожденных в группах наблюдения

Table 1. Perinatal and early postnatal indicators in newborns in study groups

Показатель	Группа «случай» (n = 46), абс. (%)	Группа «контроли» (n = 57), абс. (%)	p*
Пол (женский), абс. (%)	16 (35)	25 (44)	0,350
Масса тела при рождении, г	3323±415	3340±321	0,500
Длина тела, см	50,9±1,2	51,5±1,2	0,488
<i>Диагноз у матери во время беременности</i>			
Анемия (D50**)	15 (33)	25 (44)	0,245
Гестационный сахарный диабет (O24.4)	7 (15)	11 (19)	0,588
Вульвовагинит (N76.8)	11 (24)	13 (25)	0,895
Инфекция мочевыводящих путей вне обострения (N39.0)	7 (15)	13 (25)	0,334
Острые респираторные инфекции (J06.9)	9 (20)	11 (19)	0,973
Нарушения маточно-плацентарного кровотока (O43)	18 (39)	10 (18)	0,014

Примечание. *Для категориальных признаков p-значение рассчитано с применением критерия Пирсона χ^2 . **Здесь и ниже в скобках указаны коды МКБ-10.

Note. * P-value of categorical features is calculated using Pearson's chi-squared test (χ^2). ** Hereinafter ICD-10 diagnosis codes are shown in brackets.

Таблица 2. Локализация артериальных и венозных тромбозов у новорожденных группы «случаи»**Table 2.** Localization of arterial and venous thromboses in newborns of the cases group

Показатель	Частота, абс. (%)
Артериальные тромбозы	28 (61)
• ишемический инсульт в бассейне СМА	17 (37)
• брюшной отдел аорты	3 (7)
• артерии конечностей	4 (9)
• тестикулярная артерия	3 (7)
• селезеночная артерия	1 (2)
Венозные тромбозы	18 (39)
• синус-тромбоз	14 (30)
• вены конечности	4 (9)

Примечание. СМА — средняя мозговая артерия.

Note. MCA (CMA) — middle cerebral artery.

гена активатора плазминогена PAI-1 4G/4G и гена интегрин альфа 2 ITGA2 807 T/T. Напротив, в группе «контроли» обнаружена более высокая частота вариантов гена FGB -455 G/G и гена PAI-1 5G/5G. Различий между группами в частоте генотипов генов других коагуляционных факторов — F2, F5, F7 и F13 — не обнаружено (табл. 3).

Дополнительные результаты исследования

Частота комбинаций генотипов тромбофотического фактора PAI-1-675 4G/4G с вариантами генов F7 10976 (G/G), F13 34 (G/G) была выше в группе новорожденных детей с тромбозами. При этом комбинации генотипов PAI-1 -675 4G/4G + F13 34 G/G и PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G + F13 34 G/G встречались только в группе «случаи» (табл. 4).

Предикторами развития артериальных и венозных тромбозов у детей из числа изученных вариантов генов являлись FGB -455 G/A, PAI-1 -675 4G/4G, 2 ITGA2 807 T/T, а также комбинации вариантов PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G, PAI-1 -675 4G/4G + F13 34 G/G, PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G + F13 34 G/G. «Материнским фактором» развития тромбозов у детей являются нарушения маточно-плацентарного кровотока у беременной женщины (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ограничения исследования

В исследовании использован метод однофакторного анализа, который не позволяет оценить взаимодействие различных клинических и генетических факторов, ассоциированных с изучаемым исходом — развитием артериальных или венозных тромбозов. Очевидно, что окончательный размер эффекта (наличие связи с развитием тромбозов) определяется воздействием комплекса факторов, каждому из которых отводится определенное количество эффекта в суммарном результате воздействия. Следовательно, для окончательного суждения о значимости генетических вариантов в развитии тромбозов у доношенных новорожденных необходимо проведение многофакторного анализа с построением правила прогноза развития тромбофотических осложнений. В данном исследовании не проводилась изолированная оценка связи между исследуемыми факторами и развитием отдельно артериальных или венозных тромбозов. Отчасти это связано с недостаточным объемом выборочной совокупности. Не исключено, что некоторые ассоциации могли бы изменить свою количественную оценку риска формирования тромбозов в зависимости от вида тромбоза.

Таблица 3. Распределение вариантов генов плазменного, тромбоцитарного и фибринолитического звеньев системы гемостаза у доношенных новорожденных в группах наблюдения**Table 3.** Distribution of gene variants of plasmic, thrombocytic and fibrinolytic hemostasis components in full-term newborns in study groups

Гены	Генотип	Группа «случаи» (n = 46), абс. (%)	Группа «контроли» (n = 57), абс. (%)	p*
FGB -455 G>A	-455 (G/G)	27 (59)	48 (85)	0,006
	-455 (G/A)	15 (33)	8 (14)	0,032
	-455 (A/A)	4 (9)	1 (2)	0,169
PAI-1 -675 5G>4G	-675 (5G/5G)	9 (19)	33 (57)	0,001
	-675 (4G/5G)	18 (39)	20 (36)	0,686
	-675 (4G/4G)	19 (41)	4 (7)	0,001
F2 20210 G>A	20210 (G/G)	42 (91)	56 (98)	0,169
	20210 (G/A)	4 (9)	1 (2)	0,169
	20210 (A/A)	0	0	-
F5 1691 G>A	1691 (G/G)	46 (100)	57 (100)	-
	1691 (G/A)	0	0	-
	1691 (A/A)	0	0	-
F7 10976 G>A	10976 (G/G)	40 (87)	53 (93)	0,335
	10976A (G/A)	6 (13)	4 (7)	0,335
	10976 (A/A)	0	0	-
F13 34 G>T	34 (G/G)	30 (65)	41 (71)	0,523
	34 (G/T)	16 (35)	16 (29)	0,523
	34 (T/T)	-	-	-
ITGA2 807 C>T	807 (C/C)	21 (46)	32 (56)	0,325
	807 (C/T)	15 (33)	24 (42)	0,414
	807 (T/T)	10 (22)	1 (2)	0,002
ITGB3 1565 T>C	1565 (T/T)	30 (65)	41 (71)	0,523
	1565 (T/C)	14 (30)	16 (29)	0,829
	1565 (C/C)	2 (4)	0	0,197

Примечание. *p-значения рассчитаны с применением точного критерия Фишера.

Note. *p-values calculated via Fisher exact test.

Таблица 4. Распределение комбинаций генотипов плазменного, тромбоцитарного и фибринолитического звеньев системы гемостаза у доношенных новорожденных в группах наблюдения

Table 4. Distribution of genotype combinations of plasmic, thrombocytic and fibrinolytic hemostasis components in full-term newborns in study groups

Гены	Генотип	Группа «случаи» (n = 46), абс. (%)	Группа «контроли» (n = 57), абс. (%)	Двусторонний критерий Фишер
PAI-1 -675 5G>4G F7 10976A G>A	-675 (4G/4G) + 10976 (G/G)	14 (30,4)	4 (7)	0,003
PAI-1 -675 5G>4G F13 34 G>T	-675(4G/4G) + 34 (G/G)	13(28,2)	0	0,00001
PAI-1 -675 5G>4G F7 10976 G/A F13 34 G>T	-675(4G/4G) + 10976 (G/G) + 34 (G/G)	9 (19,6)	0	0,0004

Таблица 5. Предикторы развития артериальных или венозных тромбозов у доношенных новорожденных

Table 5. Independent predictors of arterial or venous thromboses in full-term newborns

Показатель	ОШ (95% ДИ)	АП, %	АР, %
Аntenатальные факторы матери			
Нарушения маточно-плацентарного кровотока (O43)	3,0 (1,2–7,5)	66,7	27
Генотипы			
FGB -455 G/A	2,96 (1,12–7,80)	66,7	19
PAI-1 -675 4G/4G	9,3 (2,8–30,1)	89,2	49
ITGA2 807 T/T	15,56 (1,91–126,76)	93,6	52
Комбинации генотипов			
PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G	5,8 (1,7–19,1)	82,8	40
PAI-1 -675 4G/4G + F13 34 G/G	–	–	63
PAI-1 -675 4G/4G + F7 10976 G/G + F13 34 G/G	–	–	61

Примечание. АП — атрибутивная пропорция, АР — атрибутивный риск.
Note. AP (AP) — attributive proportion, AR (AP) — attributive risk.

В качестве контроля были использованы данные здоровых детей, что делало невозможным проведение оценки влияния на вероятность развития тромбоза таких ассоциированных состояний, как сепсис, нарушение мозгового кровообращения, респираторный дистресс-синдром. Не исключено, что включение в группу «контроли» больных с перечисленными состояниями, но без тромбозов позволило бы получить более точную оценку роли генетических факторов в развитии последних.

Обсуждение основного результата исследования

Анализ течения антенатального периода у новорожденных детей с тромбозами позволил определить фактор нарушения маточно-плацентарного кровотока у беременной женщины как предиктор клинической реализации тромбозов у новорожденных. Этиологический, или атрибутивный, вклад данного фактора в развитие тромбоза составлял 66% (АП, % = 66,7). Это означает, что если хроническая фетоплацентарная недостаточность (ХФПН) имеет причинную значимость с точки зрения риска развития тромбозов у новорожденных, то среди детей с тромбозами, родившихся от матерей с ХФПН, 66% случаев тромбозов связано с изолированным влиянием ХФПН. Полученный результат косвенно согласуется с данными о причинной значимости тромбофильных состояний у беременных женщин в развитии ХФПН [9]. Можно предположить, что процент атрибутивного риска (66%) в развитии тромбозов у новорожденных, связанного с изолированным влиянием ХФПН, как раз отража-

ет этиологический вклад тромбофилии матери в реализацию тромбоза у ребенка. Молекулярно-генетическое исследование вариантов генов системы гемостаза установило, что гомозиготный генотип FGB -455G/G гена фактора I, свидетельствующий о нормокоагуляции в плазменном гемостазе, значимо чаще встречался у здоровых детей. Таким образом, можно предположить, что риск развития тромбоза снижался в 4 раза, если ребенок имел данный генотип (ОШ = 3,75 [1,49,44]). Напротив, гетерозиготный генотип FGB -455 G/A достоверно чаще имел место в группе детей с тромбозами. Его наличие увеличивало вероятность развития тромбоза почти в 3 раза (ОШ = 2,96 [1,12,80]) с этиологическим вкладом данного генотипа до 66% в развитие тромбозов у новорожденных детей.

Частоты вариантов генов F2 и F5 не различались в группах исследования, что противоречит тем данным, которые были представлены в проанализированных источниках и свидетельствовали о тесной связи между наличием полиморфизмов указанных генов и развитием ишемических инсультов и венозных синус-тромбозов у детей, включая новорожденных [12].

Ген ингибитора активатора плазминогена PAI-1, являющегося одним из компонентов фибринолитического звена гемостаза и отвечающего за образование плазмина и таким образом подавляющего фибринолиз кровяных сгустков, существенно чаще встречался у здоровых детей с генотипом PAI-1 -675 5G/5G. Следует предположить, что риск развития тромбоза снижался почти в 6

раз, если ребенок имел данный генотип ($ОШ = 5,65 [2,30-13,88]$). Одновременно с этим генотип *PAI-1* -675 4G/4G значимо чаще встречался у детей с тромбозами: было установлено, что наличие варианта *PAI-1* -675 4G/4G увеличивало атрибутивный риск развития тромбоза у новорожденных на 48,8%, $p \leq 0,001$; повышало вероятность развития тромбоза в 9 раз. Это также не согласуется с выводами метаанализов об отсутствии влияния полиморфизмов генов *PAI-1*, включая генотип 4G/4G аллеля 4G, на возникновение ишемического инсульта у детей [11]. Следует заметить, что в данном обзоре речь шла об ишемическом инсульте, причина которого заключалась в артериальном тромбозе. Следовательно, роль полиморфизмов генов *PAI-1* и фактора XIII в данном обзоре в развитии венозных тромбозов не обсуждалась.

Варианты генов *F7* и *F13* не показали значимых различий в сравниваемых группах в моноварианте. В то же время известно, что варианты генов факторов *F7* и *F13* имеют протективный эффект относительно риска развития тромбозмболий [16, 17].

Учитывая механизмы протромбогенного влияния *F7* и *F13*, а также механизм фибринолитического влияния ингибитора активатора плазминогена *PAI-1*, нами была проведена попытка оценить влияние на тромбообразование комбинаций вариантов генов *PAI-1* и вариантов генов *F7* и *F13*, предполагающих феномен «уравновешивания» в совместном влиянии данных вариантов генов на развитие тромботических состояний. Было установлено, что носительство комбинации генотипов *PAI-1* -675 4G/4G и *F7* 10976 G/G сопровождалось повышением вероятности развития тромбоза практически в 6 раз. Этиологический вклад в развитие тромбозов у новорожденных детей данной комбинации составлял 82%. Это означает, что у новорожденных детей с тромбозами, имевших данную комбинацию генотипов, в 82% случаев развитие тромбоза изолированно было связано именно с этой комбинацией генотипов — *PAI-1* -675 4G/4G + *F7* 10976 G/G.

Комбинация генотипов *PAI-1* -675 4G/4G + *F13* 34 G/G встречалась только в группе детей с тромбозами, ее наличие повышало атрибутивный риск развития тромбоза на 63%, $p \leq 0,00001$.

Комбинация генотипов *PAI-1* -675 4G/4G + *F7* 10976 G/G + *F13* 34 G/G также имела место только в группе детей с тромбозами, повышая атрибутивный риск развития тромбоза на 61%, $p \leq 0,0004$. Таким образом, несмотря на предполагаемый механизм «уравновешивания», установлено, что даже эти комбинации генотипов не снижали риск развития тромбозов. Другими словами, протективного влияния вариантов генов *F7* и *F13* на риск тромбообразования в сочетании с генотипом *PAI-1* -675 4G/4G не прослеживалось.

Ген интегрин *A2* — *ITGA2* 807 C>T, относящийся к регуляции системы тромбоцитарного гемостаза, с генотипом 807 T/T, ассоциирующегося со скоростью адгезии тромбоцитов, значимо чаще встречался в группе новорожденных с тромбозами. Наличие варианта *ITGA2* 807 T/T увеличивало атрибутивный риск развития тромбоза у новорожденных на 52%, $p \leq 0,002$; повышало вероятность развития тромбоза в 15,6 раз ($OR = 15,56 [1,91-126,76]$). Показано, что гомозиготный генотип *ITGA2* 807 T/T имел сильную причинную значимость в реализации тромбоза, о чем свидетельствовала высокая атрибутивная, или этиологическая, фракция — 93%. Одновременно с этим варианты гена интегрин *B3* — *ITGB3* 1565 T/C, действие которого ассоциировано с процессами адгезии тромбоцитов, не имели различий в исследуемых груп-

пах, что свидетельствует об отсутствии влияния данных генетических вариантов на развитие тромбоза у детей периода новорожденности.

Таким образом, выявленные ассоциативные связи между носительством вариантов генов плазменного, тромбоцитарного, фибринолитического звеньев гемостаза и фактом тромбоза у новорожденных детей позволяют считать предикторами развития артериальных и венозных тромбозов в период новорожденности варианты гена фибриногена *FGB* -455 G/A (АП, % = 66), гена ингибитора активатора плазминогена *PAI-1* -675 4G/4G (АП, % = 89), ассоциаций генотипов *PAI-1* -675 4G/4G + *F7* 10976 G/G (АП, % = 82), *PAI-1* -675 4G/4G + *F13* 34 G/G (АР, % = 63) *PAI-1* -675 4G/4G + *F7* 10976 G+G + *F13* 34 G/G (АР, %=61) и гена интегрин альфа 2 *ITGA2* 807 T/T (АП, % = 93).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования продемонстрировали роль вариантов генов фибриногена *FGB* -455 G/A (плазменное звено), ингибитора активатора плазминогена *PAI-1* -675 4G/4G (фибринолитическое звено), интегрин альфа 2 *ITGA2* 807 T/T (тромбоцитарное звено), комбинаций генотипов генов плазменного и фибринолитического звеньев гемостаза — *PAI-1* и *F7* и *F13* в развитии тромбозов у новорожденных. Вопреки данным других исследований [11, 12, 14], результаты не подтвердили роль полиморфизмов генов *F2*, *F5*, *F7* и *F13* и, напротив, продемонстрировали высокую значимость варианта гена *PAI-1* в развитии тромбозов у новорожденных. Сила влияния варианта гена *PAI-1* -675 4G/4G, возможно, нивелировала протективный эффект вариантов генов *F7* и *F13*, что выражалось в высоком атрибутивном вкладе комбинаций генотипов *PAI-1* и *F7* и *F13* в развитие тромбоза. Установленная связь между нарушениями маточно-плацентарного кровотока у беременной женщины и развитием тромбоза у новорожденного косвенно подтверждает роль тромбофильного статуса матерей в повышении протромбогенного риска у их новорожденных детей.

В то же время необходимо отметить, что выводы работы базируются на однофакторном анализе, не позволяющем получить интегральную оценку факторов риска в клинической реализации тромбозов у новорожденных детей. Данное ограничение будет являться предметом анализа на последующих этапах исследования клинического значения вариантов генов гемостаза для периода новорожденности.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

FINANCING SOURCE

Not specified.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

CONFLICT OF INTERESTS

Not declared.

ORCID

О.А. Филиппова

<https://orcid.org/0000-0002-6592-3784>

И.В. Вахлова

<http://orcid.org/0000-0002-5274-4699>

Г.А. Цаур

<https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCE

1. Van Ommen CH, Heijboer H, Buller HR, et al. Venous thromboembolism in childhood: a prospective two-year registry in the Netherlands. *J Pediatr*. 2001;139(5):676–681. doi: 10.1067/mpd.2001.118192.
2. Lee ACW, Li CH, Szeto SC, Ma ESK. Symptomatic venous thromboembolism in Hong Kong Chinese Children. *Hong Kong Med J*. 2003;9(4):259–262.
3. Monagle P, Adams M, Mahoney M, et al. Outcome of pediatric thromboembolic disease: a report from the Canadian Childhood Thrombophilia Registry. *Pediatr Res*. 2000;47(6):763–766. doi: 10.1203/00006450-200006000-00013.
4. Williams AN. Childhood stroke — beyond re-inventing the wheel. *Eur J Paediatr Neurol*. 2000;4(3):103–107. doi: 10.1053/ejpn.2000.0276.
5. Nowak-Gottl U, Duering C, Kempf-Bielack B, Strater R. Thromboembolic diseases in neonates and children. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003/2004;33(5–6):269–274.
6. Raffini L, Huang YS, Witmer C, Feudtner C. Dramatic increase in venous thromboembolism in children's hospitals in the United States from 2001 to 2007. *Pediatrics*. 2009;124(4):1001–1008. doi: 10.1542/peds.2009-0768.
7. Setty B, O'Brien SH, Kerlin BA. Pediatric venous thromboembolism in the United States: a tertiary care complication of chronic diseases. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(2):258–264. doi: 10.1002/pbc.23388.
8. Сви́рин П.В., Румянцев С.А., Ларина Л.Е., и др. Лечение неонатальных тромбозов: проект клинического протокола // Неонатология: новости, мнения, обучение. — 2013. — № 1. — С. 76–84. [Svirin PV, Rumyantsev SA, Larina LE, et al. Neonatal thrombosis: treatment regimen. *Neonatology: News, Opinions, Training*. 2013;(1):76–84. (In Russ).]
9. Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х. и др. Тромбопрофилактика у беременных с тромбофилией и тромбозами в анамнезе // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. — 2013. Т. 33. — № 6. — С. 99–109. [Makatsariya AD, Bitsadze VO, Khizroeva DKh, et al. Thromboprophylaxis in pregnant women with thrombophilia and thrombosis in anamnesis. *The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2013;33(6):99–109. (In Russ).]
10. Girolami A, Cosi E, Ferrari S, Girolami B. Prothrombin: Another Clotting Factor After FV That Is Involved Both in Bleeding and Thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018;24(6):845–849. doi: 10.1177/1076029618770741.
11. . . . Lack of Associations Between PAI-1 and FXIII Polymorphisms and Arterial Ischemic Stroke in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019;25:1076029619869500. doi: 10.1177/1076029619869500.
12. Kenet G, Lütkehoff LK, Albisetti M, et al. Impact of Thrombophilia on Risk of Arterial Ischemic Stroke or Cerebral Sinovenous Thrombosis in Neonates and Children A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Circulation*. 2010;121:1838–1847.
13. Jzenberg N, Berroeta C, Philip I, et al. Association of the -92C/G and 807C/T polymorphisms of the alpha2 subunit gene with human platelets alpha2beta1 receptor density. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1756–1760. doi: 10.1161/01.ATV.0000173308.13054.4f.
14. Румянцев А.Г., Масчан А.А., Жарков П.А., Сви́рин П.В. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению тромбозов у детей и подростков. — М.; 2015. — 113 с. [Rumyantsev AG, Maschan AA, Zharkov PA, Svirin PV. *Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike, profilaktike i lecheniyu trombozov u detei i podrostkov*. Moscow; 2015. 113 p. (In Russ).] Доступно по: <https://nodgo.org/sites/default/files/34.%20%D0%A2%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B1%D0%BE%D0%B7%D1%8B.pdf>. Ссылка активна на 10.11.2020.
15. Appropriateness Criteria. In: American College of Radiology ACR. Clinical Resources. Available online: <https://www.acr.org/Clinical-Resources/ACR-Appropriateness-Criteria>. Accessed on November 10, 2020.
16. Кельмансон И.А. Принципы доказательной педиатрии. — СПб.: Фолиант; 2004. — 240 с. [Kel'manson I.A. *Printsipy dokazatel'noi pediatrii*. St. Petersburg: Foliant; 2004. — 240 p. (In Russ).]
17. Генетический паспорт как основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В.С. Баранов. — СПб.: «Издательство Н-Л»; 2009. — 528 с. [Geneticheskii pasport kak osnova individual'noi i prediktivnoi meditsiny. Baranov VS, ed. St. Petersburg: "Izdatel'stvo N-L"; 2009. 528 p. (In Russ).]

Статья поступила: 24.03.2020, принята к печати: 09.10.2020

The article was submitted 24.03.2020, accepted for publication 09.10.2020

ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ДЕТЯМ. Советы для тех, кто хочет помочь, когда ребенку плохо

Под редакцией: А.А. Баранова, Л.С. Намазовой-Барановой

Вданной брошюре описаны способы оказания первой помощи детям при неотложных состояниях, таких как потеря сознания, остановка дыхания и кровообращения, кровотечения, травмы, ожоги, отравления и др.

Издание рассчитано на широкий круг читателей и будет полезно не только медицинским работникам, педагогам и родителям, но и подросткам с активной жизненной позицией. Оно позволит расширить кругозор в области оказания первой помощи пострадавшему и необходимых действий в конкретной сложившейся ситуации. Мы очень надеемся, что, изучив нашу книгу и став случайным свидетелем экстренной ситуации, и вы своими действиями спасете жизнь какому-то конкретному человеку.

