

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С ПЕРИНАТАЛЬНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Лямцева А. К., Костюк С. А., Жевнеронок И. В., Руденкова Т. В.

*Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия
последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Недоношенные дети являются особенно уязвимой группой для возникновения геморрагических и гипоксически-ишемических повреждений головного мозга. В неонатологии улучшение выживаемости данной группы пациентов с высоким риском неблагоприятных неврологических исходов увеличило потребность в обнаружении генов-кандидатов для выявления и создания комплексной системы ранней диагностики патологии нервной системы. В данном исследовании мы оценили возможную связь между полиморфизмом генов, которые

участвуют в пути свертывания крови, и развитием неврологических нарушений у недоношенных детей различного гестационного возраста.

Ключевые слова: полиморфизм генов, факторы свертывания крови, недоношенные дети, неврологические нарушения, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Введение. Перинатальные поражения головного мозга, включая гипоксически-ишемическую энцефалопатию, внутрижелудочковое кровоизлияние (ВЖК) и перивентрикулярную лейкомаляцию (ПВЛ), являются ведущими причинами формирования неврологических расстройств и инвалидирующих заболеваний у недоношенных детей. Риск этих травм тесно связан с гестационным возрастом и массой тела при рождении, при этом глубоко недоношенные дети (до 32 недель гестации) подвергаются наибольшему риску. В большинстве случаев общий путь повреждения вызывается начальным гипоксически-ишемическим или воспалительным поражением, которое вы-

зывает каскад событий, усиливающих перинатальное повреждение головного мозга [1].

Ряд исследований указывают на потенциальный генетический вклад в развитие данных осложнений [2, 3]. В настоящее время в большинстве из них изучается роль полиморфизмов генов, участвующих в процессах антиоксидантной защиты, воспаления и свертывания крови в патогенезе ВЖК и/или ПВЛ. В таблице 1 представлены гены факторов свертывания крови и их полиморфизмы, которые могут модифицировать предрасположенность к воспалению, способствовать развитию ВЖК, ПВЛ и нарушению развития нервной системы.

Таблица 1 — Гены факторов свертывания крови, их локализация и полиморфизм

Ген		Локализация гена	Полиморфизм	
<i>FII</i>	Ген протромбина, фактора II свертывания крови	11p11-q12	20210 G/A	rs1799963
<i>FV</i>	Ген фактора V свертывания крови (фактор Лейдена)	1q21-25	1691 G/A (Arg506Gln)	rs6025
<i>FVII</i>	Ген проконвертина, фактора VII свертывания крови	13q34	10976 G/A (Arg353Gln)	rs6046
<i>FXIII</i>	Ген фактора XIII свертывания крови	6p25.1	13 G/T (Val34Leu)	rs5985

Роль мутаций гена *FV* Лейдена и *FII* 20210 G/A в патогенезе ВЖК, вероятно, является следствием повышенного риска тромбоза тонких кровеносных сосудов в области зародышевого матрикса. Повышение артериального давления в сосудах зародышевого матрикса может привести к разрыву сосудистой стенки и ВЖК. В исследовании J. Petäjä с соавт. проанализировали группу из 51 новорожденного ребенка с очень низкой массой тела при рождении: 22 новорожденных с ВЖК 2–4-й степени и 29 детей в контрольной группе. Выявлено 4 гетерозиготных носителя Arg506Gln гена *FV* и 1 гетерозиготный носитель 20210 G/A гена *FII* в группе 22 новорожденных детей с неонатальной ВЖК 2–4-й степени. Также анализировали возникновение ПВЛ у пациентов с ВЖК. У 4 из 7 недоношенных детей с тромбофильной аномалией были признаки ПВЛ, тогда

как то же самое было верно для 8 из 15 пациентов с ВЖК, но без выявленной тромбофилии [4].

Так, W. Göpel и соавт. указали на ассоциацию мутации фактора Лейдена и *FII* (20210 G/A) с частотой ВЖК 1-й и 2-й степени и с их защитной ролью против прогрессирования и распространения ВЖК у недоношенных детей с массой тела при рождении менее 1500 г [5]. В другом исследовании W. Göpel и соавт. также сообщили о влиянии мутации *FXIII* Val34Leu на частоту и тяжесть ВЖК и ПВЛ в большой когорте детей европеоидной расы с очень низкой массой тела. В этой когорте аллель *FXIII* 34Leu был значительно связан со сниженным риском ПВЛ, однако носительство этого мутантного аллеля ассоциировалось с тенденцией к повышению риска развития ВЖК [6].

Так, К. Ruckman и соавт. исследовали 10 генов-кандидатов на ассоциации с ВЖК у 271 недоношенного ребенка (64 с ВЖК 1–4-й степени и 207 без ВЖК) с массой тела менее 1500 г. Они сообщили, что гетерозиготный генотип и аллель А гена *FV* (rs6025) был связан с повышенным риском развития ВЖК 1-й и 2-й степени, но не 3-й и 4-й степени. Также они не обнаружили значимых ассоциаций с полиморфизмом генов *FII* (rs1799963) или *FXIII* (rs5985) [7].

Таким образом, роль данных полиморфизмов в патогенезе перинатальных поражений головного мозга остается невыясненной. Неоднородность, размер и этническое разнообразие исследованных групп новорожденных являются наиболее вероятным объяснением различий в результатах, также это может свидетельствовать об их вторичной роли, возможно, отягощающей степень, выраженность церебрального повреждения и реакцию глиальных элементов на воспаление. Изучение полиморфизмов генов как факторов риска в развитии перинатального повреждения головного мозга пока не дает сделать вывод об их влиянии на исходы неврологического развития недоношенных детей, однако, по нашему мнению, перинатальное повреждение головного мозга и ПВЛ у недоношенных детей может быть результатом взаимодействия полиморфных генов, связанных с воспалительной реакцией и генетически-средовыми факторами.

Цель работы — оценить частоту встречаемости различных генотипов генов факторов свертывания крови (*FII* 20210 G/A, *FV* 1691G/A, *FVII* 10976 G/A, *FXIII* 13 G/T) у недоношенных детей с врожденной неврологической патологией и у практически здоровых детей.

Материалы и методы. Молекулярно-генетические исследования проводились на базе группы ПЦР-диагностики Научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) исследована клеточная масса крови 32 недоношенных детей с поражением ЦНС различного генеза (перивентрикулярное кровоизлияние (ПВК), ВЖК, энцефалопатия новорожденного, угнетение ЦНС, церебральная депрессия), которые со-

ставили основную группу и 15 практически здоровых детей (контрольная группа). Была определена частота выявления полиморфизмов генов факторов свертывания крови: 20210 G/A (rs1799963) гена *FII*, 1691 G/A (rs6025) гена *FV*, 10976 G/A (rs6046) гена *FVII* и 13 G/T (rs5985) гена *FXIII*.

Выделение ДНК из клеточной массы крови проводили с использованием сорбции ДНК на поверхности мембраны специальной колонки (набор реагентов «АртДНК MiniSpin» («АртБиоТех», Беларусь)). Полученную ДНК использовали для постановки TaqMan ПЦР-РВ с применением наборов реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) для генов факторов свертывания крови *FII* (20210 G/A), *FV* (1691 G/A) («ВекторБест», РФ) и *FVII* (10976 G/A), *FXIII* (13 G/T) («Синтол», РФ). Детекцию результатов по определению генотипов полиморфных генов проводили методом анализа кривых плавления продуктов ПЦР высокого разрешения с использованием термоциклера-амплификатора Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программы Statistica 8.0. Анализ категориальных признаков проводили с помощью критерия χ^2 -Пирсона (χ^2) в таблице сопряженности 2×2. При уровне значимости $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными. Для описания частот выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

Результаты и их обсуждение. При анализе данных анамнеза у недоношенных детей основной группы исследования были охарактеризованы следующие показатели: гестационный возраст, пол, наличие энцефалопатии новорожденных, синдром угнетения ЦНС, ПВК, ВЖК, респираторный дистресс-синдром (РДС) (таблица 2).

Гестационный возраст у недоношенных детей, включенных в исследование, варьировал от 28 и менее недель до 35–37 недель. В группу исследования было включено 15 девочек и 17 мальчиков. Признаки энцефалопатии были выявлены у 22 новорожденных недоношенных детей, синдром угнетения ЦНС у 7 (21,88 %). ПВК 1, 3 и 4-й степени тяжести отмечалось у трех новорожденных детей, ВЖК 2-й степени тяжести — у одного недо-

ношенного новорожденного. Признаки РДС дыхательная недостаточность наблюдались у были обнаружены у 11 недоношенных детей, 59,38 % обследованных детей ($n = 19$).

Таблица 2 — Данные анамнеза недоношенных детей ($n = 32$)

Показатель		Основная группа	
		n	%
Гестационный возраст (недель)	35–37	1	3,12
	32–34	8	25
	29–31	9	28,13
	28 и менее	14	43,75
Пол	Женский	15	46,88
	Мужской	17	53,12
Энцефалопатия новорожденного		22	68,75
Синдром угнетения ЦНС		7	21,88
ПВК		3	9,38
ВЖК		1	3,13
РДС		11	34,38

В образцах клеточной массы крови недоношенных детей основной и контрольной группы была поведена идентификация полиморфного варианта 20210 G/A (rs1799963)

гена *FII* с применением метода ПЦР-РВ. Полученные результаты, характеризующие частоту выявления данного полиморфизма, представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Распределение генотипов полиморфизма 20210 G/A гена *FII* в зависимости от группы исследования

Генотип	Частота выявления				χ^2	p
	Основная группа ($n = 32$)		Контрольная группа ($n = 15$)			
	n	%	n	%		
GG	32	100	15	100	—	1,00
GA	0	0	0	0	—	1,00
AA	0	0	0	0	—	1,00

В ходе анализа результатов, полученных при изучении частоты выявления полиморфизма 20210 G/A гена *FII*, у обследованных детей основной группы доминирующим генотипом была нормальная гомозигота — GG (100 %, $n = 32$), гетерозиготный (GA) и мутантный (AA) генотипы не были выявлены. В биологическом материале пациентов контрольной группы полиморфизм 20210 G/A в гене *FII* не был выявлен.

Статистический анализ с использованием критерия χ^2 не выявил ассоциации между распределением генотипов полиморфизма 20210 G/A гена *FII* и заболеванием ($p > 0,05$).

Полученные результаты, характеризующие частоту выявления различных генотипов полиморфизма 1691 G/A (rs6025) гена *FV*, представлены в таблице 4.

Таблица 4 — Распределение генотипов полиморфизма 1691 G/A гена *FV* в зависимости от группы исследования

Генотип	Частота выявления				χ^2	p
	Основная группа ($n = 32$)		Контрольная группа ($n = 15$)			
	n	%	n	%		
GG	31	96,88	14	93,33	0,31	0,58
GA	1	3,12	1	6,67	0,31	0,58
AA	0	0	0	0	—	1,00

В ходе анализа результатов, полученных при изучении частоты выявления полиморфизма 1691 G/A в гене *FV*, у обследованных детей доминирующим был генотип нормальная гомозигота — GG (96,88 %, $n = 31$), гетерозиготный (GA) генотип был выявлен в 3,12 % ($n = 1$) случаев. Мутантная гомозигота AA у обследованных пациентов не была выявлена.

Среди обследованных недоношенных детей контрольной группы распространенность полиморфизма 1691 G/A составила: GG (нормальная гомозигота) — 93,33 % ($n = 14$) случаев, гетерозиготный генотип GA — 6,67 % ($n = 1$) случаев. Мутантный генотип AA у обследованных пациентов не был выявлен.

В изученных образцах преобладал генотип нормальная гомозигота, частота выявления которого в обеих группах была выше 90 %, количество образцов, в которых были идентифицированы гетерозиготные и мутантные генотипы, составило от 0 до 6,67 %. Статистический анализ позволил установить отсутствие взаимосвязи между присутствием различных генотипов полиморфизма 1691 G/A гена *FV* и заболеванием ($\chi^2 = 0,31$; $p = 0,58$).

На следующем этапе нами были проведены молекулярно-генетические исследования по определению генотипов (установлению спектров гомо- и гетерозигот) полиморфизма 10976 G/A (rs6046) гена *FVII* с учетом групп исследования (таблица 5).

Таблица 5 — Распределение генотипов полиморфизма 10976 G/A гена *FVII* в зависимости от группы исследования

Генотип	Частота выявления				χ^2	p
	Основная группа ($n = 32$)		Контрольная группа ($n = 15$)			
	n	%	n	%		
GG	24	75	12	80	0,14	0,71
GA	6	18,75	3	20	0,01	0,92
AA	2	6,25	0	0	0,98	0,32

При проведении анализа результатов, полученных для полиморфизма 10976 G/A (rs6046) гена *FVII*, было установлено, что среди детей основной группы исследования преобладают носители генотипа нормальная гомозигота — GG (75 %, $n = 24$), гетерозиготный (GA) и мутантный (AA) генотипы были выявлены в 18,75 % ($n = 6$) и 6,25 % ($n = 2$) случаев соответственно.

Среди пациентов контрольной группы распространенность полиморфизма 10976 G/A гена *FVII* составила: GG — 80 % ($n = 12$) случаев, GA — 20 % ($n = 3$) случа-

ев. Мутантный (AA) генотип не был выявлен.

Анализ частоты данного полиморфизма среди пациентов основной и контрольной групп, позволил установить, что доминирующим генотипом была нормальная гомозигота с частотой более 70 %. Ассоциации между присутствием полиморфного варианта 10976 G/A в гене *FVII* и заболеванием установлено не было ($p > 0,05$).

В таблице 6 представлены данные по определению частоты генотипов полиморфизма 13 G/T (rs5985) гена *FXIII* с учетом групп исследования.

Таблица 6 — Распределение генотипов полиморфизма 13 G/T гена *FXIII* в зависимости от группы исследования

Генотип	Частота выявления, n (%)				χ^2	p
	Основная группа ($n = 32$)		Контрольная группа ($n = 15$)			
	n	%	n	%		
GG	14	43,75	8	53,33	0,38	0,54
GT	15	46,88	7	46,67	0	0,99
TT	3	9,37	0	0	1,50	0,22

Генотипный профиль полиморфизма 13 G/T гена *FXIII* характеризовался следую-

щим распределением: в основной группе GG (нормальная гомозигота) — 43,75 % ($n = 14$)

случаев, гетерозигота GT — 46,88 % ($n = 15$) случаев; в контрольной группе GG — 53,33 % ($n = 8$) случаев, GT — 46,67 % ($n = 7$) случаев. В основной группе генотипный профиль характеризовался наличием мутантного (TT) генотипа у трех пациентов (9,37 %), в контрольной группе данный генотип не был выявлен.

Анализ результатов по выявлению генотипов для данного полиморфизма, позволил установить, что гетерозиготный генотип был преобладающим у пациентов основной группы исследования, в контрольной группе доминирующим генотипом была нормальная гомозигота. Статистический анализ не выявил взаимосвязи данного полиморфизма 13 G/T гена *FXIII* с развитием заболевания ($p > 0,05$).

В ходе исследования мы проанализировали комбинации полиморфизмов генов факторов свертывания крови. По полученным результатам можно сделать вывод, что

чаще всего встречаются сочетания вариантов по двум звеньям системы гемостаза: *FVII* + *FXIII* (21,88 %, $n = 7$), также встречалась комбинация из трех генов: *FV* + *FVII* + *FXII* (3,13 %, $n = 1$).

Заключение. Таким образом, при проведении анализа частоты выявления полиморфизмов генов факторов свертывания крови *FII* (20210 G/A), *FV* (1691 G/A), *FVII* (10976 G/A) и *FXII* (13 G/T) не выявлено статистически значимых различий между исследуемыми группами. Результаты, полученные в ходе данного исследования, служат основанием для дальнейших исследований генотипов, которые позволят предоставить новую информацию для разработки современных подходов ранней диагностики перинатальной патологии головного мозга у недоношенных детей и позволят усовершенствовать подходы в терапии новорожденных с неблагоприятными неврологическими исходами.

Список цитированных источников

1. Allen, M. C. Neurodevelopmental outcomes of preterm infants / M. C. Allen // *Curr. Opin. Neurol.* — 2008. — Vol. 21, № 2. — P. 123–128. DOI: 10.1097/WCO.0b013e3282f88bb4.
2. Baier, R. J. Genetics of perinatal brain injury in the preterm infant / R. J. Baier // *Front. Biosci.* — 2006. — Vol. 11. — P. 1371–1387. DOI: 10.2741/1890.
3. Поражение центральной нервной системы у новорожденных детей: новые возможности персонифицированной диагностики [Электронный ресурс] / Е. Б. Павлинова [и др.] // *Современные проблемы науки и образования.* — 2019. — № 6. — Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29480>. — Дата доступа: 20.04.2023.
4. Petäjä, J. Increased risk of intraventricular hemorrhage in preterm infants with thrombophilia / J. Petäjä, L. Hiltunen, V. Fellman // *Pediatr. Res.* — 2001. — Vol. 49, № 5. — P. 643–646. DOI: 10.1203/00006450-200105000-00006.
5. Low prevalence of large intraventricular haemorrhage in very low birthweight infants carrying the factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation / W. Göpel [et al.] // *Act. Paediatr.* — 2001. — Vol. 90, № 9. — P. 1021–1024. DOI: 10.1080/080352501316978101.
6. Genetic Factors in Neonatology Study Group. The effect of the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene in infants with a birth weight below 1500 g / W. Göpel [et al.] // *J. Pediatr.* — 2002. — Vol. 140, № 6. — P. 688–692. DOI: 10.1067/mpd.2002.123666.
7. Replication of genetic associations in the inflammation, complement, and coagulation pathways with intraventricular hemorrhage in LBW preterm neonates / K. K. Ryckman [et al.] // *Pediatr. Res.* — 2011. — Vol. 70, № 1. — P. 90–95. DOI: 10.1203/PDR.0b013e31821ceb63.

Polymorphisms in coagulation factor genes in preterm infants with perinatal brain lesions

Lyamtseva A. K., Kostiuk S. A., Zhevneronok I. V., Rudenkova T. V.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Premature infants are particularly vulnerable to haemorrhagic and hypoxic ischemic brain damage. In neonatology, improving the survival of this group of children at high risk of adverse

neurological outcomes has increased the need for the discovery of candidate genes to identify and establish a comprehensive system for early diagnosis of neurological pathology. In this study, we assessed the possible *correlation* between the polymorphisms of genes that are involved in the clotting pathway and the development of neurological disorders in preterm infants of different gestational ages.

Keywords: gene polymorphism, blood coagulation factors, preterm infants, neurological disorders, PCR.

Поступила 29.05.2023