

На правах рукописи



Пономарёв Виктор Сергеевич

**ОСОБЕННОСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ДЕТЕЙ
НА ФОНЕ НОСИТЕЛЬСТВА ПРОТРОМБОТИЧЕСКИХ
ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ**

3.1.21. – Педиатрия (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2024

Работа выполнена на кафедре пропедевтики детских болезней федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Строзенко Людмила Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, директор Института Педиатрии ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России,

Официальные оппоненты:

Костик Михаил Михайлович - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра госпитальной педиатрии, профессор

Арсентьев Вадим Геннадьевич – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, заведующий кафедрой детских болезней

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «09» декабря 2024 г. в 10-00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.062.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России (194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, д. 39) и на сайте ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России <http://gpmu.org>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Тыртова Людмила Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Геморрагический синдром у детей является одной из актуальных проблем педиатрии и ассоциируется с тяжелыми осложнениями и серьезными нарушениями здоровья ребенка [Закирова Б.И., 2022].

По данным некоторых авторов, дети, страдающие врожденными тромбофилиями, могут в определенные периоды детства страдать проявлениями повышенной кровоточивости. Вероятность сочетания и чередования у пациента эпизодов кровоточивости и тромботических нарушений, создает основу для возникновения тромбозов во все последующие периоды жизни [Пшеничная К.И., 2009].

В настоящее время актуальным вопросом является роль генетических факторов в развитии тромбозов. Во многих случаях тромбообразования удаётся выявить различные полиморфизмы генов, кодирующих белки, участвующие в процессах свёртывания крови [Черкасова С.В., 2022]. Состояние, при котором отмечается склонность к возникновению тромбозов, называется «тромбофилией» [Куценко Л.В., 2020]. Одним из основоположников российской гематологии, профессором З.С. Баркаганом, под тромбофилией предложено понимать все наследственные (генетически обусловленные) и приобретенные (вторичные, симптоматические) нарушения гемостаза, для которых свойственна предрасположенность к раннему появлению и рецидивированию тромбозов, тромбоэмболий, ишемий и инфарктов органов [Воробьева А.И., 2005].

Степень разработанности темы

В современной литературе имеются данные о том, что патологическая склонность к повышенному тромбообразованию или внутрисосудистому свертыванию крови называется тромбофилией [Баранов А.А. и др., 2017; Гублер Е.В. и др., 1973; Строзенко Л.А. и др., 2014; Зубрицкий А.Н и др., 2017; Жилыева Т.В. и др., 2019]. Рядом авторов установлено, что у людей со склонностью к артериальным и венозным тромбозам присутствуют разнообразные варианты полиморфных генов системы гемостаза и фолатного цикла [Строзенко Л.А. и др., 2013]. Наследственная тромбофилия представляет собой нарушение свертываемости крови, связанное с повышенной предрасположенностью к развитию тромбозов [Нугманова А.Ш. и др., 2018]. Однако данных о влиянии генетических полиморфизмов тромбофилии и генов ферментов фолатного цикла на развитие тромботических событий у детей с проявлением геморрагического синдрома на данный момент представлено недостаточно.

Цель исследования

Установить клинические и лабораторные особенности геморрагического синдрома у детей при носительстве генетических протромботических полиморфизмов и определить их прогностическую значимость в реализации сосудистых событий.

Задачи исследования

1. Выявить клинические и лабораторные проявления геморрагического синдрома у детей.
2. Изучить частоту встречаемости генетических протромботических полиморфизмов у детей с геморрагическим синдромом и установить половые особенности.
3. Определить роль протромботических полиморфных вариантов генов в развитии тромботических событий у детей с микроциркуляторным типом кровоточивости и разработать способ прогнозирования риска сосудистых осложнений.
4. Оценить качество жизни детей с геморрагическим синдромом на фоне носительства генетических протромботических полиморфизмов с учетом уровня гомоцистеина в крови.

Научная новизна работы

Впервые среди детей с проявлениями кровоточивости показана роль влияния тромбогенных однонуклеотидных замен в генах системы гемостаза, генов фолатного метаболизма на развитие тромботических событий.

Обнаружено, что встречаемость редкого аллеля A(-455) гена FGB, минорного аллеля T(807) гена ITGA2 и минорного аллеля 4G(-675) PAI-1 чаще регистрировалась у детей с проявлением кровоточивости при сравнении с группой контроля ($p < 0,05$).

Зафиксировано, что комбинация из 7 гетерозигот в компаундном состоянии значимо выше выявлялась в группе детей с проявлением кровоточивости ($p = 0,024$). У детей с проявлением геморрагического синдрома в большинстве случаев встречается сочетание патологического гомозиготного генотипа PAI-1 с гетерозиготными и нормальными гомозиготными полиморфизмами F7 и F13 факторов ($p < 0,05$).

Определено, что уровень качества жизни (КЖ) детей с проявлением геморрагического синдрома ниже, чем у здоровых по шкале социального (13,3), психосоциального здоровья (12,0) и эмоционального функционирования (11,8), ($p < 0,05$).

Прием препаратов фолиевой кислоты у группы детей с геморрагическим синдромом уменьшает величину гомоцистеина в плазме крови и существенно приводит к увеличению критериев качества жизни по шкалам социального функционирования (93,9 балла против 75,5 балла, $p = 0,027$), психосоциального здоровья (81,6 балла против 68,4 балла, $p = 0,025$) и общего балла (80,5 балла против 68,1 балла, $p = 0,023$).

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные в ходе исследования, пополняют современные теоретические данные о распространенности генетических полиморфизмов и их влияние на реализацию тромботических событий у детей с клиническим проявлением геморрагического синдрома. Расширены теоретические знания о комбинациях полиморфных генов тромбофилии среди детского населения. Установлено, что у детей с наличием кровоточивости может отмечаться

носительство ген-генных ассоциаций полиморфизмов генов тромбофилии и ферментов фолатного цикла. Наличие таких сочетаний как: сопутствующая соматическая патология, нарушение сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, проявление дисплазии соединительной ткани показывает, что в реализации образования тромбозов имеет значение мультифакторная составляющая как соматическая, так и генетическая.

Разработанная прогностическая шкала способствует объективной оценке степени риска сосудистых осложнений у детей, что дает возможность своевременно установить диагноз, выбрать оптимальную тактику ведения пациентов и снизить нежелательные последствия. Предложенный способ прогнозирования, разработанный на основании выявленных клинических, лабораторных и генетических предикторов, позволяет с высокой степенью вероятности прогнозировать развитие сосудистых осложнений.

Полученные результаты при оценке предикторов тромбогенного риска и разработанная прогностическая шкала предоставляют возможность для своевременной профилактики сосудистых событий. Апробированный метод необходимо использовать в работе при формировании профилактических и лечебных программ в педиатрии с целью повышения оказания медицинской помощи.

Методология и методы исследования

За основу методологической базы для проведенного исследования были взяты научные труды зарубежных и отечественных специалистов (педиатров, гематологов, генетиков и неврологов) в области изучения системы гемостаза, диагностики тромбофилических состояний и генетической предрасположенности к тромбофилии. Для выполнения поставленных задач были сформированы группы пациентов с наличием и отсутствием геморрагического синдрома для исследования распространенности SNP замен в генах, регулирующих гемостаз и фолатный обмен.

Определение однонуклеотидных замен проводилось в лаборатории молекулярной генетики. В основе исследования применялся метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) с использованием конкурирующих TagMap зондов, комплементарных полиморфной последовательности ДНК. Определение уровня гомоцистеина проводилось на иммунохимическом анализаторе Alinity i (Abbott, США) методом хемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах (ХИАМ).

Сформированы и зарегистрированы электронные базы данных, лично произведена статистическая обработка материала с использованием методов описательного и аналитического анализа и дано разъяснение полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. У детей с проявлением геморрагического синдрома наиболее часто встречаются минорный аллель А гена (-455) FGB, минорный аллель Т гена 807 ITGA2, минорный аллель 4G гена (-675) PAI-1 ($p < 0,05$). Установлена высокая

частота носительства гомозиготного генотипа 807 TT гена ITGA2-тромбоцитарного рецептора к коллагену и гомозиготного генотипа 4G(-675)4G гена PAI-1 у детей с микроциркуляторным типом кровоточивости. Выявлено, что у мальчиков с наличием кровоточивости значимо чаще регистрируются минорный аллель С гена 1565 GPIIb, а у девочек с большей частотой определяются минорный аллель А гена (-455) FGB G, минорный аллель Т гена 807 ITGA2 ($p < 0,05$).

2. Определены диагностические признаки, разработана методика и прогностическая шкала для отбора детей в группу риска по возникновению сосудистых осложнений у пациентов с проявлением геморрагического синдрома.

3. Параметры качества жизни детей с проявлением геморрагического синдрома ниже, чем у здоровых детей по всем шкалам опросника ($p < 0,05$). У детей с проявлениями кровоточивости прием витамина B₉ уменьшает величину гомоцистеина в плазме крови и существенно приводит к увеличению критериев качества жизни по шкалам социального функционирования, психосоциального здоровья и общего балла ($p < 0,05$).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация по поставленной цели и задачам, полученным результатам соответствует паспорту специальности 3.1.21. Педиатрия, в частности, пунктам 3 и 5. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования данной специальности.

Степень достоверности и апробация работы

Степень достоверности результатов, полученных в ходе выполнения работы, определяется анализом первичной медицинской документации. Все этапы обследования больных и динамическое наблюдение отражены в электронной базе данных. В работе использованы статистические методы, адекватные поставленным цели и задачам исследования. Сформулированные выводы логически вытекают из анализа полученных результатов.

Основные результаты работы были представлены на: IV Дальневосточном международном Медицинском конгрессе (г. Хабаровск, 02-14 октября 2023 г.), XXII Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» с международным участием (Москва, 20-22 сентября 2023 г.), Итоговой конференции НОМУИС «Неделя науки АГМУ» (Барнаул, 25 мая 2023 г.), XII Международном интеллектуальном конкурсе студентов, магистрантов, аспирантов, докторантов «Discovery Science: University – 2023» (Москва, 20 апреля 2023 г.), XVII Всероссийском форуме «Здоровье детей. Современная стратегия профилактики и терапии ведущих заболеваний» (Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2023 г.), Всероссийском конгрессе «Наследие профессора Н.П. Шабалова: константы и переменные педиатрии» (Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2023 г.), Международной научной конференции молодых учёных «Ломоносов – 2023» (Москва, 10-21 апреля 2023 г.), Региональной конференции «Неделя науки АГМУ» (Барнаул, 15 февраля

2023 г.), Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Студеникинские чтения – 2022» (Москва, 2 декабря, 2022 г.), Региональной научно-практической конференции «Молодежь – Барнаулу» (Барнаул, 7 ноября, 2022 г.).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 6 научных статей в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Получены свидетельства о регистрации баз данных «Скрининговое исследование подростков Алтайского края на выявление признаков недифференцированной дисплазии соединительной ткани» (№2023620379 от 26.01.2023 г.), «Скрининговое исследование мальчиков-подростков Алтайского края на выявление признаков тромбофилии» (№2023621527 от 16.05.2023 г.), «Определение уровня качества жизни у детей, проживающих на территории Алтайского края» (№2023623617 от 24.10.2023 г.).

Личный вклад соискателя в разработку темы

Автор индивидуально проводил отбор детей в изучаемые группы, осуществлял обработку материала первичной медицинской документации. Детям исследуемой группы проведены амбулаторные консультации на приеме у врача-педиатра и гематолога. Произведен анализ лабораторных, генетических и инструментальных методов обследования. Для проведения молекулярно-генетического анализа диссертантом был налажен процесс забора и доставки биоматериала в лабораторию. Кроме того, были оформлены и зарегистрированы электронные базы данных. При помощи описательных и аналитических методов произведены статистические расчеты и даны их объяснения.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы внедрены в практическую деятельность КДЦ ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России. Полученные данные включены в учебный процесс специалитета по специальности 31.05.02 Педиатрия ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Диссертационное исследование представляет собой рукопись, которая изложена на 173 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 51 таблицами, 6 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы в количестве 225, включающего 157 отечественных и 68 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

В исследовательскую работу включены 422 ребенка с проявлениями кровоточивости по микроциркуляторному типу в возрасте от 0 до 18 лет (средний возраст – $11,8 \pm 4,74$), из них мальчиков – 287 (68%), девочек – 135 (32%), постоянно проживающих на территории Алтайского края. Группу контроля составили 115 детей без клинических признаков геморрагического синдрома из них: мальчиков – 61 (53,0%), девочек – 54 (47,0%), сопоставимых по полу, возрасту, исследуемому контингенту больных.

Критериями включения в основную группу явилось: 1. Наличие в анамнезе проявлений геморрагического синдрома. 2. Отягощенный наследственный тромбоцитический анамнез. 3. Отсутствие врожденных (или онкологических) заболеваний. 4. Отсутствие приема лекарственных препаратов, влияющих на состояние гемостаза. 5. Возраст от 1 до 18 лет. 6. Информированное согласие родителей детей и детей на обследование и обработку полученных данных.

Критериями не включения явились: 1. Отсутствие клинических проявлений кровоточивости. 2. Не отягощенный наследственный тромбоцитический анамнез. 3. Отказ от заполнения добровольного информированного согласия на обработку полученных данных. 4. Возраст – старше 18 лет.

В группу контроля включались здоровые дети при отсутствии проявлений геморрагического синдрома. Обследование проводилось при ежегодном плановом медицинском осмотре перед началом учебного года, а также в рамках гранта губернатора Алтайского края по здоровьесбережения населения. Дополнительно было проведено генетическое исследование для выявления полиморфизмов системы гемостаза, ферментов фолатного цикла и уровня гомоцистеина в сыворотке крови. При получении добровольного информированного согласия родителей детей и самих детей на участие в клиническом исследовании.

Были проанализированы амбулаторные карты «Истории развития ребенка» (форма 112/у) здоровых детей. При сборе информации о пациенте в дополнение к анамнезу и данным объективного осмотра была использована анкета для уточнения данных геморрагического и тромбоцитического анамнезов, а также выявления дополнительных фактор риска их реализации. Оценка соматического статуса детей проходила по методике, предложенной А.А. Барановым и Н.П. Шабаловым [Баранов А.А. и др., 2006]. Для оценки показателей качества жизни (КЖ) был использован русскоязычный опросник PedsQL 4.0 [Varni, J et al., 2002] для возрастной группы детей от 13-18 лет. При помощи этой анкеты можно оценить функционирование следующих параметров: физического, эмоционального, социального и школьного.

Для проведения исследования производился забор материала, которым явилась цельная кровь.

Исследованные полиморфные варианты генов системы гемостаза: F2:

20210G>A (G20210AG>A, rs1799963), F5: 1691G>A (R506QG>A, rs6025), FGB: - 455G>A (G(-455)A, rs1800790), F7: 10976G>A (G10976AG>A, rs6046), F13: 103 G>T (G9TG>T, rs5985), ITGA2: 807C>T (C807T, GPIa), ITGB3: 1565 T>C (T1565C, rs5918), PAI-1: -675 5G>4G (5G(-675)4G, rs1799889).

Исследованы 4 однонуклеотидные замены в генах, регулирующих фолатный обмен: MTHFR: 677C>T (A223V C677T, rs1801133), MTHFR: 1298A>C (E429AA1298C, rs1801131), MTR: 2756A>G (A2756G, rs1805087), MTRR: 66 A>G (A66G, rs1801394).

Определение полиморфизмов проводилась на базе Алтайского краевого диагностического центра г. Барнаула было проведено молекулярно-генетическое исследование, в основе которого лежал метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени (Real-Time PCR) с использованием конкурирующих TagMan зондов.

Выявление признаков недифференцированной дисплазии соединительной ткани проводили на основании таблиц Т.И. Кадуриной и Л.Н. Аббакумовой [Кадурина Т.И. и др., 2018].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Данные анамнеза и объективного обследования

При сборе наследственного тромботического анамнеза было установлено, что тяжелая сосудистая патология в виде инсультов отмечена у 23 (7,7%), инфарктов – у 12 (4%), сосудистых тромбозов – у 2 (2,2%) родственников. В результате диагностического обследования различные генетические полиморфизмы тромбофилии были обнаружены у 4 (1,3%) пациентов.

При анализе личного геморрагического анамнеза было установлено, что наиболее частым проявлением геморрагического синдрома явилось рецидивирующие носовые кровотечения (63,7%), повышенная синячковость (16,2%), десневые кровотечения (8,0%), обильные и длительные кровотечения у девочек в период менструального цикла (5,4%), проявление макро- и микрогематурии (3,4%), кровоизлияния в склеру глаза (3,4%).

Учитывая данные о том, что геморрагический синдром является частью гематомезенхимальной дисплазии была произведена ее оценка по методике Т.И. Кадуриной [Кадурина Т.И. и др., 2018].

Как показывает рисунок 1 наиболее частыми проявлениями дисплазии соединительной ткани явились: аномалии прорезывания зубов (16,8% против 8,7% в контрольной группе, $p=0,042$); выраженный кифоз (19,9% против 4,3% в контрольной группе, $p<0,001$); видимая венозная сеть статистически значимо в большинстве случаев выявлялась в исследуемой группе (10,1% в исследуемой группе, 3,5% в контрольной группе $p=0,028$). У многих детей проявления дисплазии соединительной ткани в виде плоскостопия наблюдались в исследуемой группе и достигали уровня статистической значимости (13,7% против 2,6% в группе контроля, $p=0,020$); гипермобильность суставов чаще

регистрировалась в исследуемой группе (4,4% в исследуемой группе, против 0,9% в контрольной $p=0,049$).

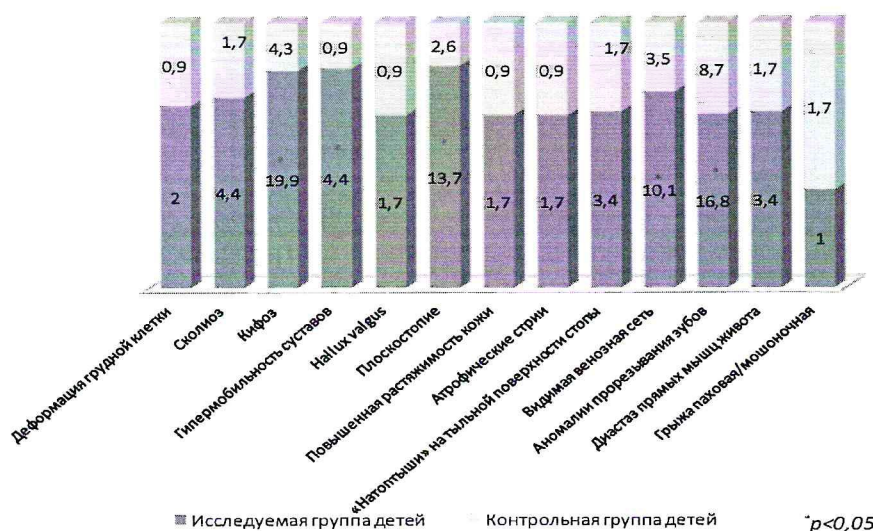


Рисунок 1 – Внешние признаки недифференцированной дисплазии соединительной ткани (%)

Кроме того, была произведена оценка висцеральных проявлений НДСТ. По данным рисунка 2, в исследуемых группах чаще всего встречаются следующие висцеральные признаки дисплазии соединительной ткани: пролапс митрального клапана (ПМК) значительно чаще регистрировался в исследуемой группе (11,8%), чем в группе контроля (5,2%) и достигал уровня статистической значимости ($p=0,045$); патология органов зрения была выявлена у 106 (35,7%) детей с проявлениями кровоточивости, а в группе сравнения – у 14 (12,2%) обследуемых ($p<0,001$).

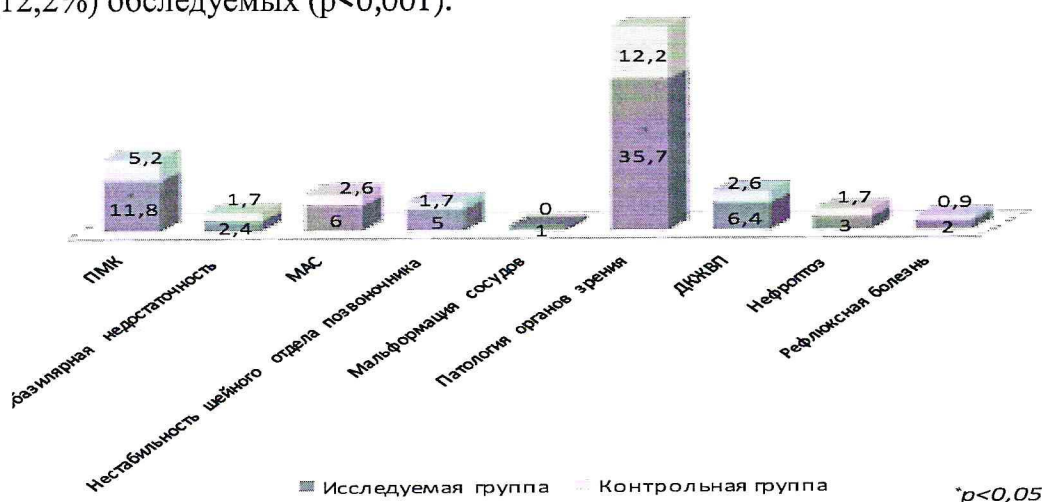


Рисунок 2 – Висцеральные признаки недифференцированной дисплазии соединительной ткани

Результаты генетического обследования детей с проявлением геморрагического синдрома и детей контрольной группы

Проведено исследование шести протромботических, двух протективных полиморфизмов генов факторов системы гемостаза и четырех полиморфизмов генов, связанных с обменом фолатов. Проведен расчет встречаемости аллелей полиморфизмов генов свертывающей системы крови и генов ферментов фолатного обмена у детей исследуемой и контрольной групп.

Полученные результаты позволяют констатировать, что распределение частоты минорного аллеля А (-455) гена FGB значимо выше 31,5% ($p=0,033$) определялось у детей с проявлениями кровоточивости, чем у детей группы сравнения (21,1%). Выявлено, что у детей с проявлением геморрагического синдрома минорный аллель Т 807 гена ITGA2 зафиксирован значимо чаще 46,7% ($p=0,004$), в то же время мажорный аллель С 807 представленного гена значимо выше выявлен 60,8% ($p=0,030$) у здоровых пациентов.

Вместе с тем, частота редкого гомозиготного аллеля 4G (-675) гена PAI-1 фиксировалась выше у детей с проявлениями кровоточивости 80,4% ($p=0,002$), напротив, частый гомозиготный аллель 5G (-675) гена PAI-1 значимо чаще 40,9% ($p<0,001$) определялся у здоровых детей.

Таблица 1 – Изученные полиморфные варианты генотипов генов факторов свертывания крови и ферментов фолатного цикла

Ген	Генотип	Больные n Всего (%)	Здоровые n Всего (%)	p
1	2	3	4	5
FII (Протромбин)	20210 GG	90 (97,8)	111 (96,5)	0,695
	20210 GA	2 (2,2)	4 (3,5)	0,695
	20210 AA	0	0	
		n=92	n=115	
FV (Фактор 5)	1691 GG	88 (95,7)	106 (92,2)	0,393
	1691 GA	4 (4,3)	9 (7,8)	0,393
	1691 AA	0	0	
		n=92	n=115	
FVII (Фактор 7)	10976 GG	71 (77,2)	29 (80,6)	0,813
	10976 GA	18 (19,5)	7 (19,4)	1,000
	10976 AA	3 (3,3)	0	0,559
		n=92	n=36	
FXIII (Фактор 13)	226GG	58 (63,0)	30 (57,7)	0,595
	226 GA	32 (34,8)	19 (36,5)	0,858
	226 AA	2 (2,2)	3 (5,8)	0,352
		n=92	n=52	
FGB Фибриноген	(-455) GG	45 (48,9)	23 (60,5)	0,607
	(-455) GA	36 (39,1)	14 (36,8)	0,845
	(-455) AA	11 (12,0)	1 (2,6)	0,111
		n=92	n=38	

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5
ITGA2 (Тромбоцитарный рецептор коллагена)	807 CC	35 (38,1)	33 (39,7)	0,877
	807 CT	28 (30,4)	35 (42,2)	0,117
	807 TT	29 (31,5)	15 (18,1)	0,050
		n=92	n=83	
GPIIa Тромбоцитарный рецептор фибриногена	1565 TT	61 (66,3)	40 (75,5)	0,267
	1565 TC	26 (28,3)	12 (22,6)	0,558
	1565 CC	5 (5,4)	1 (1,9)	0,416
		n=92	n=53	
PAI-1 Ингибитор активатора плазминогена	(-675) 5G5G	5 (5,4)	20 (17,4)	0,009
	(-675) 4G5G	26 (28,3)	54 (47,0)	0,007
	(-675)4G4G	61 (66,3)	41 (35,6)	0,0001
		n=92	n=115	
Метилентетрагидрофолатредуктаза (C677T)	677CC	62 (67,4)	66 (57,4)	0,152
	677 CT	26 (28,3)	39 (33,9)	0,452
	677 TT	4 (4,3)	10 (8,7)	0,272
		n=92	n=115	
Метилентетрагидрофолатредуктаза (A1298C)	1298 AA	54 (58,7)	24 (46,1)	0,166
	1298 AC	35 (38,0)	25 (48,1)	0,292
	1298 CC	3 (3,3)	3 (5,8)	0,668
		n=92	n=52	
Метионин-синтаза (A2756G)	2756 AA	61 (66,3)	30 (66,7)	1,000
	2756 AG	26 (28,3)	13 (28,9)	1,000
	2756 GG	5 (5,4)	2 (4,4)	1,000
		n=92	n=45	
Метионин-синтаза-редуктаза (A66G)	66 AA	38 (41,3)	15 (30,0)	0,207
	66 AG	36 (39,1)	14 (28,0)	0,202
	66 GG	18 (19,6)	21 (42,0)	0,006
		n=92	n=50	

Примечание: в скобках –%; p – точный критерий Фишера (ТКФ).

Анализ распределения полиморфизмов генов факторов системы гемостаза и ферментов фолатного цикла (Таблица 1) показывает, что гомозиготный генотип (редкий аллель) 807 TT гена ITGA2 (31,5%) и гомозиготный генотип 4G(-675)4G гена PAI-1 (66,3%) у пациентов с проявлениями кровоточивости выявлялись значимо выше, чем у здоровых детей ($p < 0,050$). Тем не менее, гомозиготный генотип (частый аллель) 5G(-675)5G (17,4%) и гетерозиготный генотип 4G(-675)5G гена (47,0%) PAI-1 с большей частотой регистрировались у здоровых пациентов ($p < 0,001$). Так же удалось установить, что гомозиготный вариант (редкий аллель) 66 GG MTRR у здоровых детей регистрировался значимо чаще при сравнении с детьми с клиническим проявлением геморрагического синдрома (42,0% соответственно 19,6%, $p = 0,006$).

При сравнении параметров качества жизни между двумя группами получен следующий результат (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнение параметров качества жизни у детей исследуемых групп

Группы подростков	Параметры КЖ					
	ФФ	ЭФ	СФ	ШФ	ПСЗ	ОБ
	М ± σ; 95% ДИ	М ± σ; 95% ДИ	М ± σ; 95% ДИ	М ± σ; 95% ДИ	М ± σ; 95% ДИ	М ± σ; 95% ДИ
Основная группа (n=30)	78,2±16,2 (71,8-84,7)	65,7±19,4 (58,3-73,1)	75,7±24,7 (66,3-85,1)	65,5±17,3 (58,8-72,2)	68,2±19,5 (60,9-75,6)	70,1±17,7 (63,4-76,9)
Контрольная группа (n=67)	85,4±11,9 (82,4-88,3)	77,5±18,5 (72,9-81,9)	89,0±12,3 (86,0-92,0)	74,0±14,9 (70,4-77,6)	80,2±12,2 (77,2-83,1)	81,5±11,4 (78,7-84,3)
p	=0,049	=0,004	= 0,016	= 0,021	=0,003	=0,004

Примечание: М – среднее по совокупности, σ – стандартное отклонение; ДИ – 95%доверительный интервал; p – критерий Манна-Уитни (U-критерий).

Самые высокие показатели КЖ были получены у детей без проявления кровоточивости по шкалам социального функционирования (89,0; 95% ДИ от 86,0 до 92,0) и физического функционирования (85,4; 95% ДИ от 82,4 до 88,3). Минимальные значения были зафиксированы по шкалам эмоционального (77,5; 95% ДИ от 72,9 до 81,9) и школьного (74,0; 95% ДИ от 70,4-77,6) функционирования. Разница различий между максимальным и минимальным значением составила 15 баллов, что значимо ниже при сравнении с показателем социального функционирования ($p < 0,05$).

Были сформированы две группы детей с проявлениями геморрагического синдрома. В первой группе уровень ГЦ был в пределах нормы, во второй группе установленная ГГЦ. За нормальное значение уровня ГЦ принят параметр для детей подросткового возраста – 7 мкмоль/л. Распределение показателей качества жизни в зависимости от уровня гомоцистеина в крови отображает рисунок 3.

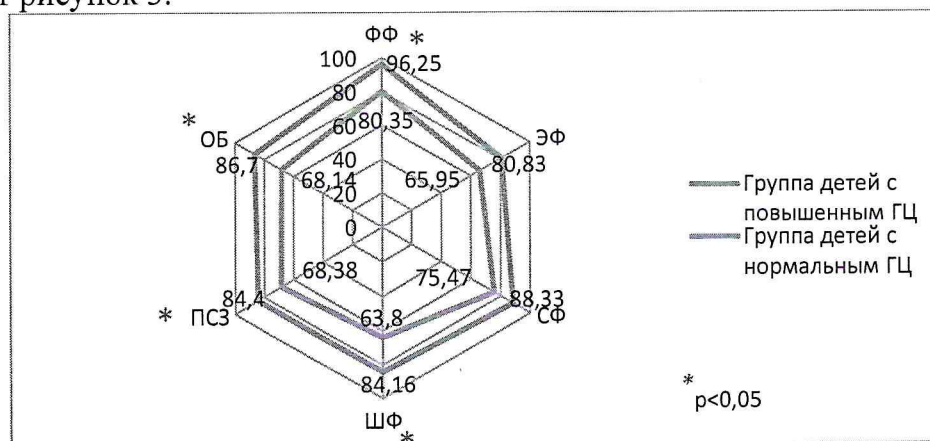


Рисунок 3 – Параметры качества жизни у детей с проявлениями геморрагического синдрома с различным уровнем гомоцистеина в плазме крови

При определении параметров качества жизни у детей с проявлениями кровоточивости было установлено, что в группе обследованных с ГЦ было значительное снижение шкалы физического функционирования (96,25 балла против 80,35 балла, $p=0,005$), школьного функционирования (84,16 баллов против 63,8 баллов, $p=0,010$), психосоциального здоровья (84,40 балла против 68,38 баллов, $p=0,026$) и общего балла (86,70 балла против 68,14 балла, $p=0,012$), чем у детей с уровнем ГЦ в плазме крови в пределах возрастной нормы, по другим показателя достоверных различий обнаружено не было ($p>0,05$).

Учитывая высокие показатели уровня ГЦ в крови, нами была поставлена задача эффективного его снижения у детей исследуемой группы с помощью фолиевой кислоты. Базовой схемой для коррекции выбран стандартный двухмесячный курс фолиевой кислоты [Румянцев А.А., 2015]. Доза фолиевой кислоты с учетом уровня ГЦ в крови составляла 2 мг/сут. [Кузник Б.И., 2012].

После коррекции уровня ГЦ было проведено повторное анкетирование детей для определения параметров КЖ, полученные результаты представлены на рисунке 4.

Было определено, что после приема витамина В₉ у детей значительно улучшились показатели социального функционирования (93,90 балла против 75,47 балла, $p=0,027$), психосоциального здоровья (81,60 балла против 68,38 балла, $p=0,025$) и общего балла (80,50 балла против 68,14 балла, $p=0,023$). По шкалам школьного и эмоционального функционирования отмечалось увеличение количества баллов, но достоверных различий обнаружено не было ($p=0,05$).

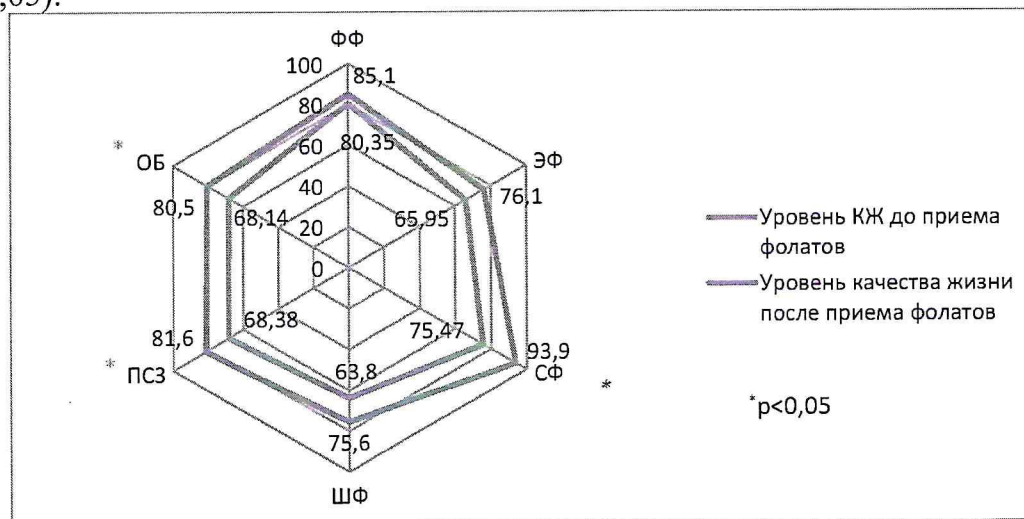


Рисунок 4 – Показатели качества жизни до и после приема фолиевой кислоты

Учитывая полученные результаты выявленных неуправляемых факторов риска, было проведено сравнение частот признаков в обеих группах и проведен расчет информативности и процента риска изученных факторов. По результатам анализа можно констатировать, что среди неуправляемых (генетических) факторов риска по сосудистым осложнениям высокую

информативность имеет наследственный тромботический анамнез [0,486 бит]. Среди предикторов реализации генетической тромбофилии большой информативностью обладает редкий гомозиготный вариант PAI-1(-675) 4G4G [0,461 бит], наименьшей информативностью обладает редкий гомозиготный вариант ITGA2 807 TT [0,134 бит], большой информативностью обладают ген-генные ассоциации полиморфизмов, особенно PAI-1-6754G/4G + F13 Val34Leu G/T [0,634 бит], PAI-1-675 4G/4G+ F7 1097 G/G [0,432 бит], PAI-1-6754G/4G + F13 Val34Leu G/G [0,472 бит].

Среди фенотипических проявлений НДСТ у детей при сравнении исследуемой и контрольной групп наибольшей информативностью обладали следующие показатели: экхимозы, петехии, носовые кровотечения [4,530 бит], кифоз [0,468 бит], плоскостопие [0,389 бит]. При оценке лабораторных показателей плазменного звена гемостаза было установлено, что высокая информативность отмечается и при повышенном уровне РФМК [0,501].

При расчете относительного риска (ОР) выявлено, что у пациентов с проявлением кровоточивости частота генетических полиморфизмов системы гемостаза была значимо выше, чем у детей группы сравнения. Так, ОР полиморфного варианта PAI-1(-675) 4G4G составила 1,86 [95% ДИ: 1,40-2,47 ($z=4,259/0,000$)], частота полиморфизма ITGA2 807 TT у детей исследуемой группы была в 1,7 раза выше чем у детей группы сравнения [ОР=1,74; 95% ДИ: 1,01-3,02; ($z=1,989$; $p=0,046$)]. Вместе с тем, ассоциации полиморфизмов MTHFR: 677 T/T+ MTRR: 66 G/G в группе больных детей встречалась в 9 раз чаще, чем среди здоровых [ОР=8,530; 95% ДИ: 1,01-71,92; ($z=1,971$; $p=0,048$)].

При расчете ОШ получены доказательные результаты, свидетельствующие о том, что носительство исследованных протромботических полиморфизмов связано с высокой вероятностью реализации сосудистых событий у детей с проявлением геморрагического синдрома по сравнению с детьми контрольной группы. Так, ОШ полиморфизмов 807 TT гена ITGA2 составили 2,09; 95% ДИ: 1,02-4,25 ($z=1,873$; $p=0,049$), что увеличивает риск вероятности развития тромботических событий в 2 раза ($p=0,049$). Вместе с тем интересно, что в исследуемой группе при носительстве комбинации полиморфизмов MTHFR: 677 T/T+ MTRR: 66 G/G вероятность развития тромбозов увеличивалась почти в 9 раз ($p=0,050$), а комбинация полиморфизмов PAI-1-6754G/4G + F13 Val34Leu G/T приводит к увеличению риска формирования тромбозов почти в 7 раз ($p<0,001$).

Отягощенный наследственный анамнез по тромботическим событиям в 8 раз увеличивает риск развития тромбозов у детей исследуемой группы ($p=0,002$).

Среди лабораторных данных наибольшие показатели ОШ получены по показателям РФМК, которые увеличивают вероятность развития тромбов в 17 раз ($p<0,001$).

В результате проведенных исследований, на основании статистического анализа разработана, дополнена и внедрена в практическую деятельность прогностическая таблица для включения детей с кровоточивостью в группу риска по развитию сосудистых осложнений.

Таблица 3 – Прогностическая таблица для отбора пациентов с наличием геморрагического синдрома в группу риска по развитию сосудистых осложнений

№ п/п	Диагностический показатель	Градация признака	Баллы диагностического коэффициента
1	2	3	4
1	Наследственные тромботические события (инсульты, транзиторные ишемические атаки, инфаркты)	Наличие Отсутствие	+9 -1
Проявление недифференцированная дисплазия соединительной ткани			
2	Кифоз	Наличие Отсутствие	+6 -1
3	Гипермобильность суставов	Наличие Отсутствие	+6 -0,5
4	Плоскостопие	Наличие Отсутствие	+7 -0,5
5	Видимая венозная сеть	Наличие Отсутствие	+4 -0,5
6	Аномалии прорезывания зубов	Наличие Отсутствие	+2 -0,5
7	Пролапс митрального клапана	Наличие Отсутствие	+3 -0,5
8	Патология органов зрения	Наличие Отсутствие	+2 -1
Обнаружение генетических полиморфизмов тромбофилии			
9	Тромбоцитарный рецептор коллагена (TGA2 807 TT)	Наличие Отсутствие	+2 -1
10	Ингибитор активатора плазминогена PAI-1(-675) 4G4G	Наличие Отсутствие	+3 -2
11	Комбинация ферментов фолатного метаболизма (MTHFR: 677 T/T+MTRR: 66 G/G)	Наличие Отсутствие	+9 -0,5
Повышение показателей плазменного звена гемостаза			
12	Повышенный уровень Д-димера	Наличие Отсутствие	+5 -1
13	Повышенный уровень РФМК	Наличие Отсутствие	+10 -2
14	Повышенный уровень фибриногена	Наличие Отсутствие	+4 -0,5
15	Повышенный уровень гомоцистеина	Наличие Отсутствие	+4 -0,5

ВЫВОДЫ

1. Основными клиническими проявлениями геморрагического синдрома у детей исследуемой группы явилось наличие носовых кровотечений (63,7%), десневых кровотечений (8%), кровоизлияния в склеру глаза (3,4%), склонность к повышенному образованию петехий и экхимозов (16,2%), обильных и

длительных кровотечений у девочек пубертатного возраста в период менструального цикла (5,4%).

Следует отметить, что у детей с проявлениями кровоточивости показатели Д-димера, РФМК, фибриногена, гомоцистеина и фактора Виллебранда были статистически выше, чем у детей контрольной группы ($p < 0,001$). При оценке агрегационной функции тромбоцитов на различные индукторы установлено, что в исследуемой группе эти показатели были значимо ниже при сравнении с группой контроля ($p < 0,001$).

2. У детей с проявлением геморрагического синдрома наиболее часто встречаются минорный аллель А гена (-455) FGB, минорный аллель Т гена 807 ITGA2, минорный аллель 4G гена (-675) PAI-1 ($p < 0,05$). В исследуемой группе установлена высокая частота носительства гомозиготного генотипа 807 TT гена ITGA2-тромбоцитарного рецептора к коллагену и гомозиготного генотипа 4G(-675)4G гена PAI-1 у детей с микроциркуляторным типом кровоточивости. Выявлено, что у мальчиков с наличием кровоточивости значимо чаще регистрируется минорный аллель С гена 1565 GPIIb, а у девочек с большей частотой определяются минорный аллель А гена (-455) FGB G, минорный аллель Т гена 807 ITGA2 ($p < 0,05$).

3. Разработана прогностическая шкала для детей с геморрагическим синдромом для включения их в группу риска по сосудистым осложнениям. Содержательными критериями оказались генетические предикторы сосудистых осложнений ITGA2 (его прогностический коэффициент в диагностической таблице составил +2 балла), PAI-1 (прогностический коэффициент +3 балла), ассоциации полиморфизмов MTHFR: 677 T/T+MTRR: 66 G/G (прогностический коэффициент равен +9 баллов). Кроме того, высокие показатели диагностических баллов были установлены при наличии НДСТ: кифоз +6 баллов, гипермобильность суставов + 6 баллов, плоскостопие +7 баллов, видимая венозная сеть +4 балла, аномалии прорезывания зубов +2 балла, пролапс митрального клапана +3 балла, патология органа зрения +2 балла. На основании результатов проведенной работы была сформирована группа риска по развитию сосудистых осложнений.

4. Качество жизни у детей с проявлением геморрагического синдрома ниже, чем качество жизни у детей контрольной группы по всем исследованным показателям: ФФ ($p = 0,049$), ЭФ ($p = 0,004$), СФ ($p = 0,016$), ШФ ($p < 0,021$), ПСЗ ($p = 0,003$). Высокий уровень ГЦ снижает показатели уровня КЖ по ФФ ($p = 0,005$), ШФ ($p = 0,010$), ПСЗ ($p = 0,026$) и ОБ ($p = 0,012$) у детей с наличием кровоточивости. Прием фолиевой кислоты значимо снижает уровень гомоцистеина в сыворотке крови и повышает качество жизни по шкалам СФ ($p = 0,027$), ПСЗ ($p = 0,025$), ОБ ($p = 0,023$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Врачам-педиатрам и врачам узких специальностей необходимо применять разработанную прогностическую шкалу для включения детей с проявлением геморрагического синдрома в группу риска по развитию тромботических событий. На основании разработанной таблицы производить

подсчет диагностических критериев. При сумме баллов +13 и более пациента необходимо внести в группу риска по сосудистым осложнениям.

2. Если индекс расчета равен + 12 баллов, то специалист самостоятельно принимает решение о включении пациента в группу риска по сосудистым осложнениям, принимая во внимание клинико-анамнестические данные, результаты лабораторных маркеров тромботической готовности.

3. Отобранные пациенты в группу риска по сосудистым осложнениям берутся на диспансерный учет педиатром, узким специалистом (гематологом), вносятся в региональный регистр с последующим обследованием и проведением индивидуальных мероприятий первичной профилактики.

4. Врачам-педиатрам и врачам узкой направленности необходимо проводить работу по выявлению факторов тромбогенного риска в семьях с предрасполагающими факторами по развитию тромбозов (у родственников I-й и II-й степени родства), проведение генетического обследования, определение состояния тромботической готовности, исследования уровня гомоцистеина для своевременной первичной профилактики риска возникновения тромбоза.

5. Детям с наличием ГГЦ необходимо проводить курсы приема фолиевой кислоты в дозе 1 мг 1 раз в сутки в течение 2 мес. с последующим контролем уровня ГЦ и определения параметров качества жизни. Данные рекомендации необходимо выполнять 1 раз в 6 месяцев.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Строзенко, Л.А. Генетические предикторы сосудистых осложнений у подростков, занимающихся спортом / Л.А. Строзенко, О.А. Снигирь, Ю.Ф. Лобанов, Г.И. Выходцева, В.С. Пономарев // **Российский педиатрический журнал**. – 2020. – Т. 23, № 4. – С. 240-247.

2. Строзенко, Л.А. Распределение протромботических полиморфизмов у детей с микроциркуляторным типом кровоточивости на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани / Л.А. Строзенко, Е.В. Скударнов, Ю.Ф. Лобанов, Г.И. Выходцева, Н.А. Дорохов, О.А. Зенченко, В.С. Пономарев // **Российский педиатрический журнал**. – 2020. – Т. 23, № 2. – С. 85-94.

3. Пономарев, В.С. Выявление клинико-анамнестических факторов тромбогенного риска у детей / В.С. Пономарев, Е.В. Скударнов / Тезисы научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Студеникинские чтения». Москва, 2 декабря 2022 // **Российский педиатрический журнал**. – 2022. – Т. 25, № 6. – С. 427-428.

4. Ровда, Ю.И. Изменение уровня гомоцистеина крови на фоне дисплазии соединительной ткани у детей / Ю.И. Ровда, Н.А. Дорохов, Е.В. Скударнов, Л.А. Строзенко, О.М. Малюга, О.А. Зенченко, В.С. Пономарёв, Л.С. Голых // **Бюллетень медицинской науки**. – 2022. – № 4(28). – С. 5-12.

5. Пономарев, В.С. Теоретико-методологические вопросы исследования генетических полиморфизмов тромбофилии у детей на фоне геморрагического синдрома / В.С. Пономарев // **Межкультурная коммуникация в образовании и медицине**. – 2023. – № 2. – С. 122-126.

6. Пономарев, В.С. Влияние фолиевой кислоты на качество жизни подростков / В.С. Пономарев, Ю.Ф. Лобанов / Тезисы V научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Студеникинские чтения». Москва, 6 декабря 2023 // Российский педиатрический журнал. – 2023. – Т. 26, № S5. – С. 53.

7. Пономарев, В. С. Анкетирование подростков для выявления признаков недифференцированной дисплазии соединительной ткани / В. С. Пономарев, Е. В. Скударнов, Ю. Ф. Лобанов / Тезисы всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых Сперанские чтения-2023. Москва, 15 марта 2023 // Российский педиатрический журнал. – 2023. – Т. 23, № S1. – С. 39.

8. Пономарев, В.С. Скрининг факторов тромбогенного риска у детей Алтайского края / В.С. Пономарев, Е.В. Скударнов, Л.А. Строзенко [и др.] // **Российский педиатрический журнал**. – 2023. – Т. 26, № 1. – С. 61-66.

9. Пономарев, В.С. Влияние гипергомоцистеинемии на качество жизни мальчиков-подростков / В.С. Пономарев, Л.А. Строзенко, Ю.Ф. Лобанов, Н.А. Дорохов / Тезисы XXII Российского конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». Москва, 20-22 сентября 2023 // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2023. – Т. 68, № S4. – С. 333-334.

10. Пономарев, В.С. Влияние дефицита витаминов группы В на качество жизни детей-подростков / В.С. Пономарев, Л.А. Строзенко, Ю.Ф. Лобанов, Н. А. Дорохов / Тезисы XXII Российского конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». Москва, 20-22 сентября 2023 // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2023. – Т. 68, № S4. – С. 334-335.

11. Пономарев, В.С. Генетические предикторы тромбогенного риска у детей с микроциркуляторным типом кровоточивости / В.С. Пономарев, Л.А. Строзенко, Ю.Ф. Лобанов [и др.] / Тезисы XXII Российского конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». Москва, 20-22 сентября 2023 // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2023. – Т. 68, № S4. – С. 334.

12. Строзенко, Л.А. Изменения качества жизни подростков, обучающихся в общеобразовательных учреждениях закрытого типа / Л.А. Строзенко, В.С. Пономарев, Ю.Ф. Лобанов [и др.] // **Российский педиатрический журнал**. – 2023. – Т. 26, № 5. – С. 347-352.

13. Строзенко, Л.А. Полиморфные замены в генах фолатного цикла как предикторы гипергомоцистеинемии / Л.А. Строзенко, В.С. Пономарев, Ю.Ф. Лобанов [и др.] // **Российский педиатрический журнал**. – 2024. – Т. 27, № 1. – С. 34-39.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГМУ – Алтайский государственный медицинский университет
ВАК – высшая аттестационная комиссия
ВРСО – высокий риск сосудистых осложнений
ГЦ – гомоцистеин
ГГЦ – гипергомоцистеинемия
ДИ – доверительный интервал
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
КГБУЗ – краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения
КЖ – качество жизни
НДСТ – недифференцированная дисплазия соединительной ткани
ОР – относительный риск
ОШ – отношение шансов
ПМК – пролапс митрального клапана
ПЦР - полимеразная цепная реакция
РФМК – растворенные фибрин мономерные комплексы
США – соединенные штаты Америки
ТКФ – точный критерий Фишера
ХИАМ – метод хемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах
FGB – фибриноген (I фактор свертывания крови)
FVII – седьмой фактор свертывания
FXIII – тринадцатый фактор свертывания
GPIIa – тромбоцитарный рецептор фибриногена
ITGA2 – тромбоцитарный рецептор коллагена
MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза
PAI-1 – тканевой ингибитор активатора плазминогена