

Abstract

УДК 575.191+616-005.6+616-089+616.13+617.58

R. V. Sabadosh,
V. A. Reshetylo,
N. M. Rizyuk,
A. V. Reshetylo

SHEI "Ivano-Frankivsk National Medical University", 2 Halytska str, Ivano-Frankivsk, Ukraine, 76018;

Ivano-Frankivsk Central City Clinical Hospital, 114 G. Mazepy str, Ivano-Frankivsk, Ukraine, 76018;

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, 9 Dorohozhytska str; Kyiv, Ukraine; 04112

STUDY OF THE GENETIC ASPECTS OF THE RISK OF SHUNT THROMBOSIS AFTER OPERATIONS IN THE LOWER LIMBS ARTERIES

Introduction. Critical limb ischemia is a serious threat, and even after surgery for revascularization, only 45% of those operated on retain both extremities within 1 year. During this time, unfortunately, in 30% of cases, the affected limbs are amputated, and the remaining 25% of critical ischemia cases result in death.

Purpose. In order to improve the treatment outcomes of patients with peripheral arterial disease (PAD), the relationship between hemocoagulation-related gene polymorphism and the risk of shunt thrombosis after reconstructive arterial disease has been studied.

Materials and Methods. The study included 40 patients who had previously undergone open reconstructive surgery for peripheral arterial disease, who were divided into two groups. The main criterion for inclusion of the patient in the main group was thrombosis of the shunt at any time after reconstructive surgery, and in the comparison group – the absence of thrombosis after peripheral arterial bypass at least 1 year after reconstructive surgery. All patients with polymerase chain reaction were analyzed for the presence of the following hereditary thrombophilia: Leiden factor G1691A, prothrombin G20210A, FGB G (-455) A, ITGA2 C807T, ITGB3 T1565C, PAI-1 5G (-675) 4G and MTHFR.

Discussion. The study found a relationship between FGB G (-455) A, ITGA2 C807T and ITGB3 T1565C gene mutations and thrombosis after peripheral arterial bypass. It has been statistically proven that when there is at least one of the thrombophilia such as FGB G (-455) A, ITGA2 C807T and ITGB3 T1565C present in a patient with peripheral arterial disease, the risk of shunt thrombosis will increase in the future.

A prospective direction for further research is the study of the question of how differentiated additional prevention of thrombosis of arterial shunts in patients with PLEAD depending on the detected hereditary thrombophilia will affect the frequency of thrombosis of these shunts. The study found that in patients with peripheral arterial disease who are planning to undergo surgery on peripheral arteries, it is advisable to study the presence or absence of thrombophilia bypass as FGB G (-455) A, ITGA2 C807T and ITGB3 T1565C. If these patients have at least one of these thrombophilia, the risk of bypass thrombosis in them is statistically significant in the future.

A promising direction for further research may be to investigate how differentiated additional prevention of arterial bypass thrombosis in

patients with PAD, depending on the hereditary thrombophilia detected, will affect the frequency of thrombosis of these pass and bypass.

Keywords: peripheral artery disease (PAD), critical limb ischemia (CLI), thrombophilia mutations, thrombosis after peripheral arterial bypass.

Corresponding author: vareshtylo@gmail.com

Резюме

**Р. В. Сабодош,
В. А. Решетило,
Н. М. Ризюк,
А. В. Решетило,**

ДВНЗ Івано-Франківський національний медичний університет, вул. Галицька 2, м. Івано-Франківськ, Україна, 76018;

Центральна міська клінічна лікарня м. Івано-Франківська, вул. Г. Мазепи 114, м. Івано-Франківськ, Україна, 76018;

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112

ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ АСПЕКТІВ РИЗИКУ ТРОМБОЗУ ШУНТІВ ПІСЛЯ ОПЕРАЦІЙ НА АРТЕРІЯХ НИЖНІХ КІНЦІВОК

Критична ішемія є серйозною загрозою для нижніх кінцівок, і навіть після проведених оперативних втручань з метою ревазуляризації тільки 45 % оперованих зберігають обидві кінцівки протягом 1 року. Впродовж цього часу у 30 % випадків уражені кінцівки ампутують, а решта 25 % випадків критичної ішемії закінчуються смертю.

З метою покращення результатів лікування пацієнтів з периферичними захворюваннями артерій нижніх кінцівок (ПАЗНК) було проведено вивчення взаємозв'язку між поліморфізмом генів, пов'язаних з гемокоагуляцією, та ризиком виникнення тромбозів шунтів після реконструктивних артеріальних операцій. Дослідження включало 40 хворих, яким раніше проводилися відкриті реконструктивні операції з приводу периферичного артеріального захворювання нижніх кінцівок, що були розділені на дві групи. Основним критерієм включення хворого в основну групу був тромбоз шунта через будь-який термін після реконструктивної операції, а в групу порівняння – відсутність тромбозу шунта не менше, ніж 1 рік після реконструктивної операції. Всім хворим за допомогою полімеразної ланцюгової реакції проводився аналіз на предмет наявності таких спадкових тромбофілій: фактор Leiden G1691A, протромбін G20210A, FGB G(-455)A, ITGA2 C807T, ITGB3 T1565C, PAI-1 5G(-675)4G і MTHFR C677T.

За результатами дослідження було встановлено, що у пацієнтів з периферичними артеріальними захворюваннями, яким плануються шунтуючі операції на артеріях нижніх кінцівок, доцільно вивчати наявність чи відсутність таких тромбофілій, як FGB G(-455)A, ITGA2 C807T і ITGB3 T1565C. При наявності у згаданих хворих хоча б однієї з таких тромбофілій ризик тромбозу шунта у них в майбутньому статистично значуще зростає.

Перспективним напрямком подальших досліджень може бути вивчення питання, як диференційована додаткова профілактика тромбозів артеріальних шунтів у пацієнтів з ПАЗНК в залежності від виявленої спадкової тромбофілії вплине на частоту тромбозів цих шунтів.

Ключові слова: периферичні артеріальні захворювання, критична ішемія нижніх кінцівок, спадкова тромбофілія, тромбоз артеріального шунта.

Автор, відповідальний за листування: vareshtylo@gmail.com

Вступ

Периферичні артеріальні захворювання нижніх кінцівок (ПАЗНК) – це патологічні стани, які виникають внаслідок стенотично-оклюзійних змін артерій нижніх кінцівок та черевного відділу аорти. [1] Згідно з даними ВО-ОЗ, серед населення нашої планети ці захворювання мають приблизно 202 мільйони осіб, з яких близько 40 мільйонів – у Європі. [2] За іншими даними, ПАЗНК зустрічаються у близько 19% осіб земної популяції, з яких 11% мають асимптомні форми, 7% – це особи з переміжною кульгавістю та 1,2% – хворі, в яких розвинулася критична ішемія. [3] Критична ішемія є серйозною загрозою для нижніх кінцівок, і навіть після проведених оперативних втручань з метою реваскуляризації тільки 45% оперованих зберігають обидві кінцівки протягом 1 року. Впродовж цього часу, на жаль, у 30% випадків уражені кінцівки ампутують, а решта 25% випадків критичної ішемії закінчуються смертю [4].

На сьогодні вплив генетичних чинників на процеси тромбоутворення широко вивчається у науковій літературі. Насамперед, його вивчають для встановлення причинно-наслідкового зв'язку з ішемічною хворобою серця, розладами мозкового кровообігу, тромбозом глибоких вен нижніх кінцівок та багатьма іншими патологічними станами. Тим не менше, вплив цих чинників на розвиток ПАЗНК вивчений недостатньо. Є повідомлення про взаємозв'язок з тромбозами артерій нижніх кінцівок мутацій плазматичного фактора зсідання крофі V (FV) Leiden і фактора II (FII), або протромбіну, 20210GA, а також станів, що спричиняють дефіцит антитромбіну III, протеїну C і протеїну S [5]. Що ж до інших генетичних чинників, то їх роль у розвитку ПАЗНК залишається маловивченою, а щодо впливу спадкових тромбофілій на тривалість функціонування шунтів після реконструктивних операцій на артеріях нижніх кінцівок – дослідження взагалі не проводилися. На наш погляд, ретельне вивчення ролі генетичних чинників при ПАЗНК може відігравати значну роль як для їх профілактики і лікування, так і для подовження функціонування артеріальних шунтів.

Мета роботи: покращити результати лікування пацієнтів з ПАЗНК шляхом вивчення взаємозв'язку між поліморфізмом генів, пов'язаних з гемокоагуляцією, та ризиком виникнення тро-

мбозів шунтів після реконструктивних артеріальних операцій.

Матеріали і методи. Для вивчення впливу генетичних чинників на функціонування артеріальних шунтів у дослідження були включені 40 хворих, яким раніше проводилися відкриті реконструктивні операції з приводу ПАЗНК (табл. 1): 35 осіб (87,5%) чоловічої статі і 5 осіб (12,5%) – жіночої. Середній вік пацієнтів склав $63,4 \pm 13,7$ року.

Були сформовані 2 групи хворих. Пацієнтів у кожному з груп включали лише при їх письмовій згоді на забір крові для проведення дослідження щодо наявності спадкових тромбофілій. Основним критерієм включення хворого в основну групу був тромбоз шунта через будь-який термін після реконструктивної операції, а основним критерієм включення хворого в групу порівняння – відсутність тромбозу шунта не менше, ніж 1 рік після реконструктивної операції. В результаті, медіана терміну від операції до моменту нашого останнього огляду пацієнтів у групі порівняння склала 662 дні, а міжквартильний інтервал – 530–849 днів, а медіана терміну від операції до тромбозу шунта у основній групі склала 200 днів з міжквартильним інтервалом 105–423 дні. Різниця між цими показниками була статистично значущою ($p < 0,0001$), а отже, тромбоз шунтів у основній групі відбувся в середньому через значно менший термін, ніж міг би теоретично відбутися у пацієнтів групи порівняння, чого ми і хотіли досягнути. Всього в основну групу потрапили 16 пацієнтів, а в групу порівняння – 24. Середній вік хворих у групах статистично значуще не відрізнявся: 60,4 ($\sigma = 8,9$) року у основній групі та 65,4 ($\sigma = 9,6$) року у групі порівняння ($p = 0,11$).

Впливати на розвиток тромбозів шунтів у пацієнтів основної групи могли не лише спадкові тромбофілії та середній вік, а й інші чинники, такі як: стать, ступінь хронічної артеріальної недостатності, обсяг гнійно-некротичних уражень на стопах, сегмент, на якому проводилася артеріальна реконструкція, наявність супутньої патології (цукровий діабет, ішемічна хвороба серця, гіпертонічна хвороба, хронічні обструктивні захворювання легень, цироз печінки, хронічні хвороби нирок, злоякісні новоутвори), та ін. У зв'язку з цим, було вивчено частоту кожного з цих чинників у пацієнтів різних груп (табл. 2).

Таблиця 1 – Спектр реконструктивних операцій на артеріях нижніх кінцівок, виконаних пацієнтам

Назва операції	Кількість пацієнтів
Алопротезування аорти та загальних клубових артерій	1
Аорто-біфеморальне алопротезування	3
Аорто-біфеморальне алошунтування	2
Однобічне аорто-стегнове алошунтування	2
Однобічне аорто-поверхневостегново-глибокостегново-підколінне (вище коліна) алоаутошунтування	1
Загальноклубово-глибокостегнове алошунтування	2
Перехресне зовнішньоклубово-підколінне (вище коліна) алошунтування	1
Зовнішньоклубово-глибокостегново-передньовеликогомілкове алоаутошунтування	1
Зовнішньоклубово-загальностегново-підколінне (нижче коліна) алоаутошунтування	1
Зовнішньоклубово-підколінне (вище коліна) алошунтування	1
Перехресне загальностегново-загальностегнове алошунтування	1
Загальностегново-підколінне (вище коліна) алопротезування	1
Загальностегново-підколінне (вище коліна) алошунтування	3
Загальностегново-підколінне (вище коліна) аутовенозне шунтування	7
Загальностегново-підколінне (нижче коліна) алоаутошунтування	3
Загальностегново-підколінне (нижче коліна) алошунтування	1
Загальностегново-підколінне (нижче коліна) аутовенозне шунтування	2
Загальностегново-підколінно (нижче коліна)-малогомілкове алоаутошунтування	1
Поверхневостегново-підколінне (вище коліна) алоаутошунтування	1
Поверхневостегново-підколінне (вище коліна) алошунтування	1
Поверхневостегново-підколінне (нижче коліна) аутовенозне шунтування	1
Поверхневостегново-підколінно (нижче коліна)-тібіоперонеальне аутовенозне шунтування	1
Поверхневостегново-задньовеликогомілкове аутовенозне шунтування	1
Поверхневостегново-передньовеликогомілково-тібіоперонеальне аутовенозне шунтування	1

Тут слід зауважити, що ступінь хронічної артеріальної недостатності у хворих визначали за Rutherford (1997) [6], а місцеві гнійно-некротичні процеси на стопах характеризували за класифікацією WIFI (2014) [7].

Як бачимо з таблиці 2, статистично значущої відмінності за всіма досліджуваними чинниками у групах не було виявлено, хоча і спостерігалася виражена тенденція до частішого тромбування шунтів, які не захоплюють аорто-клубовий сегмент ($p = 0,09$). Відсутність статистично значущого впливу вивчених показників на функціонування шунтів, а також однотипна у всіх хворих післяопераційна профілактика їх тромбозу, розвитку гострих серцевих і мозкових подій та прогресування ПАЗНК, дали нам можливість точніше визначити роль у тромбуванні шунтів природжених тромбофілій.

Серед природжених тромбофілій, які б могли впливати на функціонування шунтів у наших пацієнтів, нами були досліджені наступні (табл. 3).

Вищевказані спадкові тромбофілії діагностували шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), для проведення якої у пацієнтів проводили забір венозної крові.

Функціонування шунтів вивчали на основі ультразвукового тріплексного сканування (апарат «LOGIQ e», GE Healthcare, Великобританія). Шунт вважали тромбованим при відсутності кровотоку в його просвіті (візуалізація у В-режимі тромботичних мас, що повністю перекривають цей просвіт; відсутність у КДК режимі кольорового сигналу; ізоляція з просвіту шунта в D-режимі).

Таблиця 2 – Частота різних чинників, які б могли вплинути на функціонування шунтів у пацієнтів різних груп

Чинник	Основна група (тромбози)		Група порівняння		p
	n	%	n	%	
Стать:					
- чоловіки	15	93,75	20	83,33	0,63
- жінки	1	6,25	4	16,67	
Ступені ХАН за Разерфордом:					
- 3	2	12,50	5	20,83	0,78
- 4	7	43,75	9	37,50	
- 5	7	43,75	10	41,67	
Глибина ураження тканин, критерій W класифікації WIFI:					
- 0	9	56,25	14	58,33	0,91
- 1	3	18,75	6	25,00	
- 2	3	18,75	3	12,50	
- 3	1	6,25	1	4,17	
Операція на сегменті:					
- аорто-клубовому ± стегново-підколінному ± периферичному	3	18,75	12	50,00	0,09
- стегново-підколінному ± периферичному	13	81,25	12	50,00	
Супутня патологія:					
- цукровий діабет	2	13,00	6	25,00	0,44
- ішемічна хвороба серця,	6	37,50	15	63,00	0,19
- гіпертонічна хвороба	11	68,75	17	71,00	1,00
- хронічні обструктивні захворювання легень	7	43,75	6	25,00	0,30
- цироз печінки	0	0,00	1	4,17	1,00
- хронічні хвороби нирок	0	0,00	3	12,50	0,26
- злоякісні новоутвори	0	0,00	1	4,17	1,00

Таблиця 3 – Досліджені нами спадкові тромбофілії

N	Чинник, що впливає на гемостаз	Назва мутації чинника	Генотипи, що зумовлюють тромбофілію	Вплив на систему гемостазу
1	V плазмовий фактор	фактор Leiden G1691A	G/A, A/A	гіперкоагуляція
2	II плазмовий фактор (протромбін)	протромбін G20210A	G/A, A/A	гіперкоагуляція
3	I плазмовий фактор (фібриноген)	FGV G(-455)A	G/A, A/A	гіперкоагуляція
4	Тромбоцитарні рецептори колагену	ITGA2 C807T	C/T, T/T	активація адгезії тромбоцитів
5	Тромбоцитарні рецептори фібриногену	ITGB3 T1565C	T/C, C/C	гіперагрегація
6	Інгібітор активації плазміногену 1 (PAI-1)	PAI-1 5G(-675)4G	5G/4G, 4G/4G	пригнічення фібринолізу
7	Метилентетрагідрофолат редуктаза (MTHFR)	MTHFR C677T	C/T, T/T	покодження судинних стінок

Для статистичної обробки інформації формували базу даних в редакторі «Microsoft Excel 2013» (Microsoft, США), встановлену з підпискою нашого університету на хмаринку «office 365». Крім вищевказаного редактора, для статистичної обробки даних ми використовували компютерні програми «STATISTICA 10» (StatSoft, США) та «R» (R Foundation for Statistical Computing, Austria) [8].

Частота якісних показників була представлена нами абсолютними (n) і відносними (%) частотами.

При порівнянні 2 незалежних груп хворих за якісним бінарним показником використано точний критерій Fisher.

Задля кількісної оцінки ефекту при порівнянні відносних показників нами використовувався показник відношення шансів (ВШ), який визначається як відношення шансу настання події (тромбозу) серед осіб, які мали мутацію, що сприяла тромбозу, до шансу настання події у осіб без мутації. Окремі шанси та показник відношення шансів розраховувався за допомогою нижченаведених формул: 1) шанс тромбозу у осіб з мутацією = (кількість осіб з мутацією, які мали тромбоз) / (кількість осіб з мутацією, які не мали тромбозу); 2) шанс тромбозу у осіб без мутації = (кількість осіб без мутації, які мали тромбоз) / (кількість осіб без мутації, які не мали тромбозу); 3) ВШ = (шанс тромбозу у осіб з мутацією) / (шанс тромбозу у осіб без мутації).

З метою проектування отриманих значень ВШ на генеральну сукупність розраховувалися межі його 95% довірчого інтервалу. Значущість взаємозв'язку між подією і чинником ризику вважалася доведеною в разі, якщо довірчий інтервал не включав 1.

Аналізуючи кількісні дані, насамперед, оцінювали характер розподілу значень показника. Для цього використовували Shapiro–Wilk's W тест. При нормальному розподілі кількісних даних результати представлялися у формі «M (a)» (де M – середнє значення показника, а – його середнє квадратичне ненормальному розподілі – у формі «медіана (1 і 3 кuartилі).

У 2 незалежних групах кількісні показники з нормальним розподілом порівнювали за критерієм t Student, а кількісні показники з ненормальним розподілом – за допомогою методу Mann–Whitney U.

При перевірці статистичних гіпотез критичний рівень значущості (p) приймали рівним 0,05.

В дослідженні дотримані принципи Хельсінкської декларації з біомедичних досліджень (1974), адаптованої на 41-й Міжнародній асамблеї у Гонконзі (1989), а також принципи відношення до осіб, які виступають суб'єктами обстеження, викладені у Белмонтській доповіді (18.04.1979). Дотримання біоетичних вимог у науковому дослідженні підтверджено експертним висновком комісії з питань етики Івано-Франківського національного медичного університету.

Результати. Результати досліджень показали, що у обидвох групах пацієнтів не було жодного хворого, який не мав хоча б однієї спадкової тромбофілії. При цьому, єдина тромбофілія, яка не була виявлена у жодного пацієнта жодної з груп, була тромбофілія, зумовлена геном «протромбін G20210A».

У осіб зі спадковими тромбофіліями, пов'язаними з мутаціями генів, що кодують F1, FV та тромбоцитарні рецептори колагену і фібриногену, відсоток тромбозів мав тенденцію до вищих значень у основній групі. Натомість мутації у генах, що кодують PAI-1 та MTHFR, мали тенденцію до частішого виявлення у групі порівняння (рис. 1). Разом з тим, при тромбозах шунтів (основна група) жодна з мутацій не зустрічалася статистично значуще частіше, ніж у осіб без їх тромбозів (група порівняння) (у всіх випадках $p > 0,05$).

Щоб оцінити вплив відносних частот кожної з мутацій на ризик тромбування шунтів після операції кількісно, для кожної з них розраховали відношення шансів виявити мутацію у осіб з тромбозом шунтів та у осіб без їх тромбозу. Цей показник мав тенденцію до найвищих значень для мутацій в генах фібриногену (2,59) та тромбоцитарного рецептору фібриногену (2,27), а найнижчих – для мутацій в генах MTHFR (0,53) та PAI-I (0,62) (табл. 4, рис. 2). Тим не менше, для кожної з мутацій, 95% довірчий інтервал відношення шансів містив одиницю, що свідчило про відсутність статистичної значущості цього показника. Враховуючи те, що жодна з мутацій у осіб з тромбозами не зустрічалася статистично значуще частіше, ніж у осіб без тромбозів, такий результат був цілком закономірним.

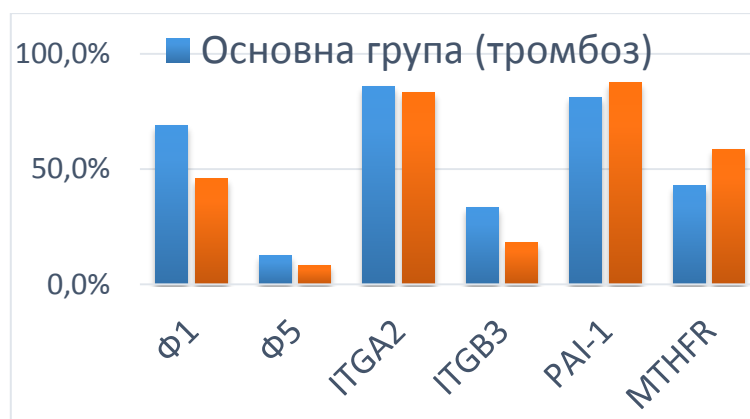


Рисунок 1 – Частота виявлення спадкових тромбофілій у пацієнтів різних груп

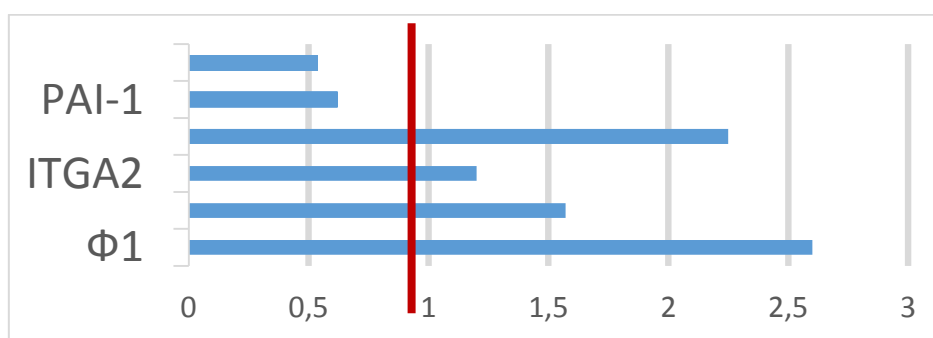


Рисунок 2 – Відношення шансів виявлення різних мутацій у осіб з тромбозами шунтів та без них

Оскільки впливу будь-якої поодинокі мутації на імовірність тромбозів шунтів статистично значуще доведено не було, ми вирішили вивчити питання, як впливатиме на цю імовірність у хворих загальна кількість їх мутацій. З цією метою ми порівняли у різних групах частоту осіб з

1–2 та 3–5 мутаціями (табл. 5). Статистично значущої відмінності між групами знову виявлено не було, але спостерігалася тенденція до частішого тромбування шунтів у осіб з 3–5 мутаціями, ніж у осіб з 1–2 спадковими тромбофіліями: 62,5 % проти 43,75 % ($p = 0,33$).

Таблиця 4 – Частота різних генотипів у досліджуваних групах пацієнтів

Ген та його поліморфізм	Генотипи	Основна група		Група порівняння		p	OR	95% CI
		n	%	n	%			
FGV G(-455)A	G/A, A/A	11	68,7	11	45,8	0,13	2,59	0,68–9,8
	G/G	5	31,3	13	54,2			
фактор Leiden G1691A	G/A, A/A	2	12,5	2	8,3	0,52	1,57	0,20–12,47
	G/G	14	87,5	22	91,7			
тромбоцитарні рецептори колагену ITGA2 C807T	C/T, T/T	6	85,7	10	83,3	0,7	1,20	0,08–16,24
	C/C	1	14,3	2	16,7			
тромбоцитарні рецептори фібриногену ITGB3 T1565C	T/C, C/C	5	33,3	4	18,2	0,25	2,27	0,49–10,34
	T/T	10	66,7	18	81,8			
інгібітор активації плазміногену I PAI-1 5G(-675)4G	5G/4G, 4G/4G	13	81,3	21	87,5	0,83	0,62	0,10–3,54
	5G/5G	3	18,7	3	12,5			
метилентетра-гідрофолат редуктаза MTHFR C677T	C/T, T/T	3	42,8	7	58,3	0,87	0,53	0,08–3,53
	C/C	4	57,2	5	41,7			

Таблиця 5 – Частота осіб з різною загальною кількістю спадкових тромбофілій у різних групах пацієнтів

Кількість генів, що зумовлюють спадкову тромбофілію	Основна група		Група порівняння		p	OR	95% CI
	n	%	n	%			
1–2	7	43,75	15	62,5	0,33	0,47	0,13–1,69
3–5	9	56,25	9	37,5			

Враховуючи те, що на відсутність статистичної значущості різниці між цими показниками могли впливати ті 2 тромбофілії, які серед наших пацієнтів зустрічалися частіше у групі порівняння, ми вирішили вивчити, як впливає на імовірність тромбозу шунта наявність різних комбінацій з тих тромбофілій, які у основній групі зустрічалися частіше: FGB G(-455)A, фактор Leiden G1691A, тромбоцитарні рецептори колагену ITGA2 C807T та тромбоцитарні рецептори фібриногену ITGB3 T1565C.

Насамперед, нами було вивчено наступне питання: якщо б у пацієнтів визначати наявність чи відсутність лише цих 4 тромбофілій, чи зустрічалися б тромбози шунтів частіше при наявності хоча б однієї з них. Результати дослідження показали, що осіб, які мають хоча б одну з цих тромбофілій статистично значуще більше у основній групі (табл. 6). При цьому, у основній групі (пацієнти з тромбозами шунтів) не було жодного пацієнта, який не мав би хоча б однієї з цих 4 тромбофілій, тоді як у групі порівняння не мали жодної з цих тромбофілій 33,3 % хворих (p = 0,013).

Цікаво, що мутація фактор Leiden G1691A як у основній групі, так і у хворих з групи порів-

няння завжди поєднувалася з якоюсь іншою з решти 3 мутацій, а тому, при розрахунку ідентичних показників без врахування цієї мутації, ми отримали аналогічні результати: 100,0 % осіб групи порівняння мали хоча б одну з таких 3 мутацій, як FGB G(-455)A, ITGA2 C807T і ITGB3 T1565C, а у основній групі – лише 66,7 % (p = 0,013). Все це свідчило про те, що наявність мутації фактор Leiden G1691A у наших хворих не підвищувала ризик тромбозу шунтів, а отже, при його оцінці її наявність можна не враховувати.

Наші спроби не враховувати ще якусь з вищевказаних мутацій задля мінімізації кількості тестів для оцінки ризику тромбозу шунтів позитивного результату не дали. При попарному вивченні цих мутацій діагностична цінність методу знижувалася, втрачаючи статистичну значущість (у всіх випадках p>0,05). А отже, серед вивчених нами спадкових тромбофілій найвищу діагностичну цінність щодо імовірності тромбозу шунта мала оцінка наявності у пацієнтів таких 3 тромбофілій, як FGB G(-455)A, ITGA2 C807T і ITGB3 T1565C. Якщо у хворого виявляється хоча б одна з цих тромбофілій, то ризик розвитку тромбозу шунта у нього зростає.

Таблиця 6 – Частота осіб без мутацій FGB G(-455)A, фактор Leiden G1691A, ITGA2 C807T і ITGB3 T1565C та хоча б з однією з цих мутацій у різних групах пацієнтів

Кількість мутацій генів, що зумовлюють спадкову тромбофілію	Основна група		Група порівняння		p
	n	%	n	%	
Хоча б одна з таких мутацій, як FGB G(-455)A, фактор Leiden G1691A, ITGA2 C807T та ITGB3 T1565C	16	100,0	16	66,7	0,013
Без таких мутацій	0	0,0	8	33,3	

Обговорення

На сьогоднішній день відомо чимало причин тромбозів шунтів після реконструктивних операцій з приводу периферичних артеріальних захворювань нижніх кінцівок: технічні помилки, недостатність притоку чи відтоку, травми, про-

гресування атеросклерозу, порушення в системі гемостазу та ін. [9]. Однак, нерідко тромбози шунтів відбуваються і тоді, коли видимих причин не спостерігається. У цьому контексті, вивчення впливу природжених тромбофілій на імовірність тромбозу шунтів є особливо ціка-

вим, тим більше, що наукових праць, присвячених саме цьому питанню, в доступній літературі нами виявлено не було.

Обрані нами для вивчення спадкові тромбофілії були не випадковими. В дослідженні ми хотіли охопити генетичні проблеми у всіх основних ланках системи гемостазу. А це: 3 фази коагуляційного гемостазу, основні елементи судинно-тромбоцитарного гемостазу (адгезія і агрегація тромбоцитів та пошкодження судинних стінок) та фібринолітична система крові.

Серед генетичних проблем 1 фази коагуляційного гемостазу, при якій плазмовий фактор зсідання крові V у комплексі з X фактором утворюють протромбіназу, найбільш відомою є мутація фактор V Leiden G1691A. Ця мутація призводить до зміни конфігурації рецептора фактора V до активованого протеїну C. Це призводить до того, що протеїн C не може приєднатися до цього фактора і його інактивувати, що підвищує ризик тромбоутворення [10].

Найвідомішою спадковою тромбофілією, що потенціює 2 фазу коагуляційного гемостазу, під час якої протромбіназа перетворює протромбін (II фактор зсідання крові) на тромбін, є мутація гена протромбіну G20210A. Ця мутація локалізується в регуляторній частині гена, що призводить до підвищеного синтезу протромбіну у гомозигот та гетерозигот з алеллю A [11]. Як наслідок, ризик тромбоутворення зростає. Останнє підтверджують також дані метааналізу, в якому робиться висновок, що мутація протромбіну G20210A може бути пов'язана з ризиком коронарних захворювань [12].

Найважливішим фактором 3 фази коагуляційного гемостазу є фібриноген, який під впливом тромбіну перетворюється на фібрин. Тут слід відзначити, що фібриноген є також посередником для агрегації тромбоцитів [13]. Фібриноген складається з 1 центрального та 2 бічних доменів та ланцюгів α , β та γ . Поліморфізм FGB G(-455)A підвищує експресію гена, що відповідає за синтез ланцюга β , а крім того, наявність алелі A в цьому гені пов'язана із підвищеним рівнем фібриногену в плазмі крові [14], що підвищує ризик тромбозів.

Мембрана тромбоцита має не менше, ніж 10 типів рецепторів. Однак, за даними літератури, поліморфізм генів тільки 2 з них сприяє адгезії або агрегації тромбоцитів. До них належать зміни у генах інтегрину $\alpha 2/\beta 1$ та інтегрину $\alpha IIb/\beta 3$, що відповідають за прикріплення тромбоцита до

колагену I типу та до фібриногену, відповідно [15].

Рецептор до колагену – інтегрин $\alpha 2/\beta 1$ – складається з субодиниць $\alpha 2$ та $\beta 1$. Ген ITGA2 кодує субодиницю $\alpha 2$. У гомозигот та гетерозигот за аллелю T у 807 локусі цього гена (генотипи T/T та T/C) була виявлена підвищена експресія рецепторів до колагену на поверхні тромбоцитів, в той час як у гомозигот за аллелю C (генотип C/C) спостерігалось зниження їх експресії [16]. Наявність T-алелі асоціюється з підвищеним ризиком тромбозів [17]. Причиною цього, очевидно, є збільшення швидкості адгезії тромбоцитів за рахунок підвищеної експресії рецепторів до колагену на їх поверхні. Доказом підвищеного ризику тромбозів при наявності алеля C є дані одного з метааналізів, у який ввійшли 4650 пацієнтів з 15 досліджень. Цей аналіз довів, що існує зв'язок між поліморфізмом C807T і ризиком ішемічного інсульту в загальній популяції і в підгрупі людей, що перебувають у стаціонарі [18].

Рецептор до фібриногену – інтегрин $\alpha IIb/\beta 3$ – представлений субодиницями αIIb (яку ще називають глікопротеїном GPIIb) та $\beta 3$ (або GPIIa). Ген ITGB3 кодує субодиницю $\beta 3$. При пошкодженні стінки судини тромбоцити завдяки присутності на мембрані згаданого рецептора, взаємодіють з фібриногеном плазми крові, в результаті чого відбувається їх агрегація і формується тромб [19]. За даними літератури, генотипи TC та CC в локусі 1565 гена ITGB3 асоційовані з вищою здатністю тромбоцитів до агрегації, і як наслідок, з підвищеним ризиком тромботичних серцево-судинних ускладнень [20].

Підвищений рівень гомоцистеїну крові, що призводить до пошкодження судинних стінок, є відомим чинником ризику тромботичних захворювань. Метилентетрагідрофолатредуктаза (MTHFR) – внутрішньоклітинний фермент, який бере участь у перетворенні гомоцистеїну в метіонін. Серед змін гена, який кодує цей фермент, найбільш вивченим є варіант, в якому цитозин (C) в позиції 677 замінений на тимідин (T). Такий поліморфізм MTHFR позначається C677T і супроводжується зниженням активності ферменту, внаслідок чого підвищується рівень гомоцистеїну крові [21].

Найбільш відомою генетичною проблемою фібринолітичної системи крові є така мутація гена, що кодує PAI-1, як поліморфізм цього гена 5G(-675)4G, що характеризується зміною кількості нуклеотидів гуаніну в регуляторній части-

ні гена. Існує два варіанти гена з різною кількістю гуаніну (G) в позиції -675: 5G і 4G. У гомота гетерозигот за алеллю 4G виявляють підвищену концентрацію білка PAI-1 в плазмі крові. Це призводить до надмірної інактивації тканинного активатора плазміногену і, як наслідок, до сповільнення переходу плазміногену в плазмін. Зниження рівня плазміну крові сповільнює фібриноліз і перешкоджає розчиненню тромбів. Ризик внутрішньосудинного тромбозу – зростає [22].

Факт того, що у обидвох групах досліджуваних нами пацієнтів не було жодного хворого, який не мав хоча б однієї спадкової тромбофілії, свідчив про те, що спадкові тромбофілії далеко не рідкісне явище, і абсолютна більшість осіб у популяції має ту чи іншу спадкову тромбофілію. Останнє підтверджується також даними літератури, у якій представлена частота досліджуваних нами протромботичних генотипів в європейській популяції: фактор Leiden G1691A – 8 % [23], протромбін G20210A – від 1 до 6 % [24], FGB G(-455)A – 22 % [25], ITGA2 C807T – близько 40 % [26], ITGB3 T1565C – близько 15 % [27], MTHFR C677T – близько 27 % [28] та PAI-1 5G(-675)4G – 58 % [29]. Якщо додати частоти всіх вищевказаних спадкових тромбофілій, то сума відсотів далеко перевищить 100 %, що підтверджує отримані нами дані. Отже, факт наявності якоїсь однієї невизначеної спадкової тромбофілії у наших пацієнтів не міг свідчити про їх підвищену схильність до тромбоутворення, порівняно з іншими хворими, оскільки кожен з них мав як мінімум 1 тромбофілію.

Тут слід зауважити, що єдина тромбофілія, яка не була виявлена у жодного нашого пацієнта жодної з груп, була тромбофілія, зумовлена геном «протромбін G20210A». Це теж було цілком закономірно, адже вищевказані частоти свідчать про те, що саме ця тромбофілія зустрічається найрідше.

Жодна з мутацій не зустрічалася статистично значуще частіше у осіб з тромбозами шунтів (чотири тромбофілії мали тенденцію до частішого виявлення у осіб з тромбозами, а решта дві – у осіб без тромбозів), а також для кожної з мутацій 95% довірчий інтервал відношення шансів мати тромбоз при наявності та відсутності певної тромбофілії містив одиницю, що свідчило про відсутність статистичної значущості цього показника. Все це свідчило про те, що оцінка будь-якої поодинокі генної мутації у пацієнтів, яким плануються шунтуючі операції на артеріях

нижніх кінцівок, не дасть відповіді на питання, чи є ризик тромбозу шунта у цих пацієнтів вищий.

Враховуючи це, ми вирішили вивчити питання, як впливатиме на цю імовірність у хворих загальна кількість їх мутацій. Статистично значущої відмінності між групами пацієнтів з тромбозами шунтів і без них щодо частоти осіб з 1–2 та 3–5 мутаціями знову виявлено не було, але у осіб з тромбозами шунтів все ж спостерігалася тенденція до частішого виявлення 3–5 мутацій.

Аналізуючи цей результат, ми побачили, що на нього могли впливати ті 2 тромбофілії, які серед наших пацієнтів зустрічалися частіше у групі порівняння. У зв'язку з цим, ми вирішили вивчити, як впливає на імовірність тромбозу шунта наявність різних комбінацій лише з тих 4 тромбофілій, які у основній групі зустрічалися частіше: FGB G(-455)A, фактор Leiden G1691A, тромбоцитарні рецептори колагену ITGA2 C807T та тромбоцитарні рецептори фібриногену ITGB3 T1565C.

Результати дослідження показали, що осіб, які мають хоча б одну з цих тромбофілій, статистично значуще більше у основній групі. При цьому, серед пацієнтів з тромбозами шунтів не було жодного, який не мав би хоча б однієї з цих 4 тромбофілій, тоді як у групі порівняння не мала жодної з цих тромбофілій аж третина хворих – 33,3 % ($p = 0,013$). Цей результат продемонстрував, що, якщо у пацієнтів, яким плануються шунтуючі операції на артеріях нижніх кінцівок, дослідити наявність чи відсутність цих 4 тромбофілій, то при наявності хоча б однієї з них імовірність тромбозу шунтів у них зростає.

Але чи можна обійтися визначенням меншої кількості показників? Як виявилось, оскільки мутація фактор Leiden G1691A у хворих як основної групи, так і групи порівняння завжди поєднувалася з якоюсь іншою з решти 3 згаданих мутацій, то її наявність у наших хворих не підвищувала ризик тромбозу шунтів. Отже, при його оцінці наявність цієї мутації можна не враховувати. Спроби не враховувати ще якусь з вищевказаних мутацій задля мінімізації кількості тестів для оцінки ризику тромбозу шунтів позитивного результату не дали.

В результаті, проведені нами дослідження показали, що у осіб, яким плануються шунтуючі операції на артеріях нижніх кінцівок, доцільно вивчати наявність чи відсутність лише таких тромбофілій, як FGB G(-455)A, ITGA2 C807T і

ITGB3 T1565C. При виявленні у хворого хоча б однієї з них, ризик розвитку тромбозу шунта у нього зростає.

Отримані нами результати вперше підтверджують те, що у осіб, яким плануються шунтуючі операції на артеріях нижніх кінцівок, вивчення наявності таких тромбофілій, як FGB G(-455)A, ITGA2 C807T і ITGB3 T1565C може бути корисним для прогнозування ризику тромбозу шунта, і свідчать про те, що у пацієнтів з

наявністю хоча б однієї з цих тромбофілій, додаткова профілактика тромбозу шунта теоретично могла б зменшити його ризик. Тут, однак, слід відзначити, що згадані 3 тромбофілії впливають на різні ланки системи гемостазу, а отже, профілактика тромбозу шунтів у пацієнтів з різними тромбофіліями, очевидно, повинна б бути різною. Останнє питання планується нами до подальшого вивчення.

Висновки

1. У пацієнтів з периферичними артеріальними захворюваннями, яким плануються шунтуючі операції на артеріях нижніх кінцівок, доцільно вивчати наявність чи відсутність таких тромбофілій, як FGB G(-455)A, ITGA2 C807T і ITGB3 T1565C.

2. При наявності у хворого з периферичним артеріальним захворюванням хоча б однієї з таких тромбофілій, як FGB G(-455)A, ITGA2 C807T і ITGB3 T1565C, ризик тромбозу шунта в майбутньому у нього зростає.

Перспективи подальших досліджень

Перспективним напрямком подальших досліджень вважаємо вивчення питання, як дифе-

ренційована додаткова профілактика тромбозів артеріальних шунтів у пацієнтів з ПАЗНК в залежності від виявленої спадкової тромбофілії вплине на частоту тромбозів цих шунтів.

References (список літератури)

1. Emile R. Mohler, Michael R. Jaff. [Peripheral Artery Disease]. John Wiley & Sons. 2017; 10(2), 1118776097, 9781118776094. 208 p.
2. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UK, Williams LJ, Mensah GA, Criqui MH. [Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis]. *Lancet*. 2013;382:1329–40.
3. Sigvant B, Wiberg-Hedman K, Bergqvist D, Rolandsson O, Andersson B, Persson E, Wahlberg E. [A population-based study of peripheral arterial disease prevalence with special focus on critical limb ischemia and sex differences]. *J. Vasc. Surg.* 2007;45:1185–1191.
4. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR. [Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II)]. *Journal of vascular surgery*. 2007;45(1):S5-S67.
5. De Moerloose Philippe, Boehlenn Françoise. Inherited thrombophilia in arterial disease: a selective review. In: *Seminars in hematology*. WB Saunders. 2007; pp. 106-113.
6. Robert B, Rutherford J, Dennis Baker, Calvin Ernst K, Wayne Johnston, John M Porter, Sam Ahn, Darrell N Jones. [Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: Revised version]. *J. Vasc. Surg.* 1997;26:517-38.
7. Joseph L Mills, Sr Michael S Conte, David G Armstrong, Frank B Pomposelli, Andres Schanzer, Anton N Sidawy, George Andros. [The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification System: Risk stratification based on Wound, Ischemia, and foot Infection (WIFI)]. *J. Vasc. Surg.* 2014;59:220-34.
8. R Development Core Team. *R. A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from: <http://www.R-project.org/>
9. Richa Handa, Sanjiv Sharma. CA Vascular Graft Failure of Leg Arterial bypasses - a Review. *Journal of Hypertension and Cardiology*. 2014;1(3):17-21. doi: 10.14302/issn.2329-9487, jhc-14-404

10. Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *American Journal of Hematology*. 2015;91(1):46–49. doi: 10.1002/ajh.24222
11. Poort, Swibertus R., et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88(10): 3698-3703.
12. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, et al. [Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls]. *Lancet*. 2006;367(9511):651–8.
13. Laki K, Gladner JA. [Chemistry and Physiology of the Fibrinogen-Fibrin Transition].
1. *Physiological Reviews*. 1964;44(2):127–160. doi: 10.1152/physrev.1964.44.2.127
14. Lee SH, Kim MK, Park MS, Choi SM, Kim JT, Kim BC, Cho KH. [beta-Fibrinogen Gene -455 G/A Polymorphism in Korean Ischemic Stroke Patients]. *J. Clin. Neurol*. 2008;Mar;4(1):17-22. doi: 10.3988/jcn.2008.4.1.17
15. Alan D. *Platelets*. Third Edition [3 ed.]. Academic Press, 2013. 1398 p.
16. Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. [Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence]. *Blood*. 1997;89:1939–1943.
17. Kunicki TJ. [The Influence of Platelet Collagen Receptor Polymorphisms in Hemostasis and Thrombotic Disease]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22(1):14-20.
18. Guangliang Wu, Yujing Xi, Li Yao, Li Su, Yan Yan, Minzhi Li, Lian Gu. [Genetic polymorphism of ITGA2 C807T can increase the risk of ischemic stroke]. *International Journal of Neuroscience*. 2014;124(11):841-851.
19. Bennett JS. [Structure and function of the platelet integrin alpha II b beta 3]. *J Clin Investig*. 2005;115(12):3363–9.
20. Galasso G, Santulli G, Piscione F, De Rosa R, Trimarco V, Piccolo R, Chiariello M. [The GPIIIA PIA2 polymorphism is associated with an increased risk of cardiovascular adverse events]. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2010;10(1). doi: 10.1186/1471-2261-10-41
21. Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM. [Thrombotic risk factors: basic pathophysiology]. *Crit Care Med*. 2010;38(2):3–9.
22. Tsantes, Argirios E, et al. [The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk]. *Thrombosis research*. 2008;122(6):736-742.
23. Bowen Derrick John, Bowley S, John M, Collins PW. [Factor V Leiden (G1691A), the Prothrombin 3'-Untranslated Region Variant (G20210A) and Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase (C677T): A Single Genetic Test Genotypes all Three Loci–Determination of Frequencies in the S. Wales Population of the UK]. *Thromb Haemost*. 1998;79(5):949-54.
24. Zivelin Ariella, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C, Horellou MH, Seligsohn U. [A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene]. *Blood*. 1998;92(4):1119-1124.; *Thrombosis and haemostasis*. 1998;79(05):949-954.
25. Iso Hiroyasu et al. [Polymorphisms of the beta fibrinogen gene and plasma fibrinogen concentration in Caucasian and Japanese population samples]. *Thrombosis and haemostasis*. 1995;73(1):106-111.
26. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Vaiopoulos G, Travlou A. [Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: A meta-analysis]. *International Journal of Cardiology*. 2007;118(2):189–196. doi: 10.1016/j.ijcard.2006.06.047
27. Shan Wang-Gohrke, Jenny Chang-Claude. [Integrin β 3 Leu33Pro polymorphism and breast cancer risk: a population-based case-control study in Germany]. *Breast cancer research and treatment*. 2004;88(3):231-237.
28. Luhm R, Pearson S, Endean D, Friedman K, Montgomer R, Hessner M. [Prevalence of Prothrombin G20210A, Factor V G1691A (Leiden), and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T in Seven Different Populations Determined by

- Multiplex Allele-specific PCR]. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999;81(5):733–738. doi: 10.1055/s-0037-1614563
29. Naran NH, Chetty N, Crowther NJ. [The influence of metabolic syndrome components on plasma PAI-1 concentrations is modified by the PAI-1 4G/5G genotype and ethnicity]. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):155–163. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.024

(received 24.08.2019, published online 29.09.2019)

(одержано 24.08.2019, опубліковано 29.09.2019)