

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Курский государственный медицинский
университет» Минздрава РФ

На правах рукописи

Парфенов Евгений Игоревич

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ РАННЕЙ
ТРОМБОТИЧЕСКОЙ ОККЛЮЗИИ У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ
РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА БРЮШНОЙ АОРТЕ И
АРТЕРИЯХ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Специальность 14.01.26

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Лазаренко В.А.

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Чурносов М.И.

Курск – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Хирургические аспекты артериальных реокклюзий.....	14
1.2 Лабораторные показатели в диагностике тромбофилических состояний	17
1.3 Система гемостаза и молекулярно-биологические эффекты факторов свертывания	22
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 Общая характеристика обследованных групп пациентов.....	33
2.2 Молекулярно - генетические методы исследования.....	38
2.3 Генетико-статистические методы исследования.....	44
Глава 3. Результаты собственных исследований	48
3.1 Хирургические и клинические особенности исследуемых групп	48
3.2 Особенности показателей системы гемостаза, липидного профиля и маркеров наследственных тромбофилий в исследуемых группах пациентов	51
3.3 Сравнительный анализ распределения генетических маркеров в исследуемых группах	61
3.4 Анализ ассоциаций генетических полиморфизмов с клинико-лабораторными показателями	66
3.5 Разработка модели прогнозирования развития раннего тромбоза зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей в зависимости от генетических вариантов наследственных тромбофилий и лабораторных показателей	71

Глава 4. Оценка эффективности использования модели прогнозирования риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей в зависимости от генетических вариантов наследственных тромбофилий и клинико-лабораторных показателей.....	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ВЫВОДЫ.....	96
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	98
УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ.....	99

Список использованных сокращений

АББШ - аортобедренное бифуркационное шунтирование
АТ - антитромбин
АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время
БПШ – бедренно-подколенное шунтирование
ДС – диагностическая специфичность
ДЧ – диагностическая чувствительность
ДЭ – диагностическая эффективность
ЛВП - липопротеиды высокой плотности
ЛДФ – линейная дискриминантная функция
ЛНП - липопротеиды низкой плотности
ЛОНП - липопротеиды очень низкой плотности
ЛПИ - лодыжечно-плечевой индекс
ЛПП - липопротеиды промежуточной плотности
МНО - международное нормализованное отношение
ПБА - поверхностная бедренная артерия
ПВ - протромбиновое время
ПЛИ – плече-лодыжечный индекс
ПЦОР - прогностическая ценность отрицательного результата
ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата
ТФ - тканевой фактор
FGB - ген фибриногена β
MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза
TNF – фактор некроза опухолей
VEGF-A - эндотелиальный фактор роста

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В современном мире чрезвычайно актуальной остается проблема лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей. Существует множество патологических процессов, приводящих к стенозированию артериального русла и вызывающих хроническую ишемию нижних конечностей [8, 26, 177], но в подавляющем числе случаев главной причиной является атеросклероз [90]. Медицинская статистика продолжает фиксировать рост сосудистых заболеваний нижних конечностей, которые занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости [8, 64, 166]. Дополнительное внимание к этой проблеме в последние годы привлекает тенденция снижения возраста больных [4, 8], а так же возрастающий уровень инвалидизации и смертности от атеросклероза артерий [64, 94]. Высокая распространенность хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей среди населения привела к увеличению числа и видов выполняемых сосудистых реконструктивно-восстановительных операций на артериях нижних конечностей [95]. Общее число артериальных реконструкций в РФ за 2016 год составило 71810 операций, что на порядок выше, чем за все предыдущие года [64], так как хирургическая прямая реваскуляризация конечностей в настоящее время стала наиболее оптимальным методом лечения пациентов с тяжелыми атеросклеротическими изменениями артериального русла [49]. С другой стороны, с увеличением количества выполняемых сосудистых реконструкций, возросло и число больных, нуждающихся в повторных операциях в связи с развитием реокклюзий и рестенозов в области восстановленного артериального сегмента [4, 35, 113]. По данным Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов (2013г.) наилучшие результаты при выполнении первичных вмешательств отмечены при операциях на аорто-подвздошном сегменте. В 2016 году в РФ выполнено 11778 подобных операций (открытых и эндоваскулярных) [64]. Так же суммарно за 2016 год было выполнено 20965 операций по реваскуляризации нижних конечностей ниже паховой складки [64]. Рост числа первичных реконструктивных вмешательств на аорто-подвздошном сегменте и артериях

нижних конечностей неизбежно ведет к росту и повторных вмешательств, составляющих по данным различных литературных источников от 8 до 11,5% [4, 121]. Самыми частыми причинами для повторного хирургического вмешательства являются рестенозы и тромбозы зоны реконструкции [67]. В национальных рекомендациях по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией (Российский согласительный документ, 2010), тромбоз зоны реконструкции или эндоваскулярного вмешательства как причина острой ишемии нижних конечностей наблюдается приблизительно в 15% случаев. Среди причин развития тромбоза некоторые авторы выделяют ошибки хирургической техники и несостоятельность дистального русла [63]. Значительную роль в развитии тромботических окклюзий играют нарушения свертывающей системы крови [4, 137, 173]. С момента появления технических средств изучения генома человека, ведутся исследования по выявлению генов, влияющих на развитие сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений. Прежде всего это гены, кодирующие липидный обмен и гены, вовлеченные в систему свертывания крови и физиологию стенки сосудов [147]. В основе большинства сосудистых событий (например инфаркт миокарда или ишемический инсульт головного мозга, ишемия нижних конечностей) лежат два процесса – атеросклероз и тромбоз [117]. Если роль атеросклероза в развитии ишемии органов, особенно у пожилых пациентов, является общепринятым фактом, то вопрос о вкладе нарушений в системе коагуляции в развитии сосудистой патологии до сих пор дискуссионный и сильно зависит от этнических, половых и возрастных особенностей исследуемых популяций [90]. Анализ эпидемиологических исследований показывает, что повышение уровня ряда факторов свертывания крови, таких как фибриноген, протромбин, фактор VII свертывания крови, фактор Виллебранда, фактор VIII, увеличение агрегационных свойств тромбоцитов, изменение содержания в крови компонентов фибринолитической системы являются факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [101]. Данные изменения в плазменном и тромбоцитарном звеньях гемостаза генетически детерминируются. Однако вклад мутационных повреждений генов, кодирующих факторы свертывания крови,

тромбоцитарные рецепторы и компоненты системы фибринолиза, в увеличение риска развития артериальных тромбозов к настоящему времени однозначно не определен [121]. Ишемия органов – это полигенное заболевание. Приобретенными факторами риска выступают курение, избыточный вес, нарушения липидного обмена, артериальная гипертензия, стрессы. Логично предположить, что взаимодействие между различными факторами риска, включая генетические детерминанты, обуславливающие склонность к тромбофилии, будут играть ведущую роль в генезе данных заболеваний. Вопрос о том, какие именно взаимодействия приобретенных и генетических факторов, а также ген-генные сочетания, определяют предрасположенность к развитию артериального тромбоза, особенности течения и возможные рецидивы болезни, остается открытым [85]. Увеличение числа артериальных тромбозов может быть связано с комбинацией различных факторов генетического риска тромбоза [181]. Факторы риска тромбообразования и механизмы формирования тромбофилических состояний, создающие высокую вероятность развития тромбозов и тромбоэмболий, во многом определяют дальнейшее течение и последующий прогноз заболевания, как в раннем послеоперационном периоде, так и в отдаленные сроки [141]. Современные диагностические лабораторные методы позволяют выявить нарушения гемостаза на дооперационном этапе, и далее контролировать качество проводимой терапии в послеоперационном периоде. Одним из основных и широко доступных методов исследования и контроля состояния системы гемостаза является коагулограмма [12], а так же некоторые отдельные исследования свертывающей системы крови, такие как антитромбин, D-димер и гомоцистеин, выделяемые из сыворотки крови больного. Гипергомоцистеинемия развивается вследствие повышения концентрации гомоцистеина к плазме крови и участвует в формировании как венозных, так и артериальных тромбозов [132]. Способствуя развитию эндотелиальной дисфункции, активируя тромбоциты, гипергомоцистеинемия приводит к раннему развитию атеросклероза и тромбозу коронарных, церебральных и периферических артерий [84, 88, 92], нарушению липидного обмена [27]. Центральную роль в

ингибировании коагуляции и воспалительных процессов сосудистого эндотелия играет антитромбин, являясь основным ингибитором тромбина и других сериновых протеаз, в том числе факторов Ха и IXa [153]. Изменение его уровня в плазме крови, повышает риск тромбообразования в венозном и артериальном руслах [151, 162]. Роль нарушения обмена липидов в развитии атеросклероза на сегодняшний день не вызывает сомнений. В патогенезе атерогенной дислипидемии ведущую роль играет нарушенный метаболизм липопротеидов, богатых триглицеридами [78]. Продукты такого нарушенного липидного обмена обладают выраженным тромбогенным влиянием на факторы физиологической системы гемостаза [149]. D-димер - это специфический продукт деградации фибрина, является диагностическим маркером активации системы гемостаза, который отражает процессы как образования фибрина, так и его лизиса [100]. Повышение его концентрации выше 500 нг FEU/мл свидетельствует о высоком риске развития тромботических осложнений. Доказана значимая роль генетических факторов наследственных тромбофилий (1691G/A фактора V, 20210G/A протромбина, -455 G/A фибриногена, 677C/T MTHFR и др.) в развитии венозных и артериальных тромбозов любой локализации как в дооперационном, так и в послеоперационном периоде (раннем и позднем) [159, 175, 191]. Работы, посвященные изучению вклада наследственных тромбофилий в развитие тромботических окклюзий зоны реконструкции при операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей немногочисленны и представлены в основном исследованиями зарубежных авторов [111, 156, 187]. В России роль врожденных тромбофилий в развитии тромботических окклюзий зоны реконструкции при операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей не изучена, что диктует необходимость проведения данных исследований в Российской Федерации.

Цель исследования: изучить диагностические возможности наследственных тромбофилий в формировании тромботической окклюзии зоны реконструкции у больных, перенесших операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности клинико-лабораторных показателей у пациентов с тромбозом и без тромбоза зоны реконструкции в первые 6 месяцев после оперативных вмешательств на брюшной аорте и артериях нижних конечностей.
2. Провести анализ ассоциаций генетических вариантов наследственных тромбофилий (1691G/A FV, 20210G/A FII, 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB) с лабораторными показателями у больных, перенесших реконструктивные операции на брюшной аорте, артериях нижних конечностей с развитием тромбоза и без тромбоза зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций.
3. Выявить влияние генетических полиморфизмов генов наследственных тромбофилий на развитие тромбоза зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей.
4. Разработать математическую модель прогноза развития тромбоза зоны реконструкции у больных в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте, артериях нижних конечностей и оценить ее эффективность.

Научная новизна работы. Впервые установлено диагностическое значение генетических полиморфизмов 1691G/A FV, 20210G/A FII, 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB в развитии тромботической окклюзии зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей у мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ.

Выявлены молекулярно-генетические маркеры тромбоза зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей (сочетание генетических вариантов 677 T MTHFR и 455 A FGB). Показаны ассоциации генетических вариантов 20210 GA FII с повышенным уровнем гомоцистеина и D-димера в крови, 677 CT и 677 TT MTHFR с повышенным уровнем триглицеридов в крови и укорочением тромбинового времени, 677 TT MTHFR со сниженным уровнем липопротеидов высокой

плотности в крови. Установлено генотипы 455 GA FGB и 455 AA FGB маркируют повышенный уровень Д-димера в крови.

Разработана математическая модель прогноза развития тромботической окклюзии зоны реконструкции у больных после оперативных вмешательств на брюшной аорте, артериях нижних конечностей и оценена ее эффективность (Патент на изобретение №2617418 от 25.04.2017).

Научно-практическое значение. Результаты проведенных исследований расширяют представления о молекулярно-генетических детерминантах тромбоза зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей. Генетические варианты - аллели 677 Т МТНFR и 455 А FGB могут быть рекомендованы в качестве маркеров для выделения группы риска по формированию тромбоза зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей. Генетические варианты 455 G/A FGB и 677 C/T МТНFR и лабораторные показатели (количество тромбоцитов в крови, уровень Д-димера, гомоцистеина, фибриногена, антитромбина III, ЛПНП и ЛПВП в крови) следует использовать в качестве предикторов развития тромбоза зоны реконструкции. Математическую модель, разработанную на основе выявленных предикторов тромбоза зоны реконструкции после операций на брюшной аорте, артериях нижних конечностей, целесообразно применять у мужчин русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ для прогнозирования развития этого осложнения в первые 6 месяцев послеоперационного периода.

Полученные данные могут стать основой для дальнейших исследований роли генетических факторов в развитии тромботических осложнений у больных после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей. Результаты исследования внедрены в образовательный процесс в ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, в практическую работу ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа» и БМУ «Курская областная клиническая больница».

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: X юбилейной международной научно-практической конференции молодых ученых – медиков (г. Курск, 2016), III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (г. Курск, 2016); Научно-практической конференции, посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета, (г. Курск, 2016 г.); Первом съезде хирургов Приволжского федерального округа с международным участием (г. Нижний Новгород, 2016); Национальном хирургическом конгрессе, совместно с XX юбилейным съездом РОЭХ. Институт хирургии им. А.В. Вишневского (г. Москва, 2017); Первом съезде хирургов центрального федерального округа Российской Федерации, (г. Рязань, 2017 г.).

Личное участие автора. Автором лично определены цель и задачи исследования, разработаны методические подходы для их решения, сформированы группы исследования, проведен сбор данных анамнеза, проведено клиническое обследование исследуемых групп. Автор лично принимал участие в выполнении молекулярно-генетических исследований, проводил обработку и обобщение полученных результатов, подготовку основных публикаций по выполненной работе, написание и оформление рукописи, апробацию результатов исследования. Патент на изобретение №2617418 «Способ прогнозирования развития раннего тромбоза зоны реконструкции после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей в зависимости от генетических вариантов наследственных тромбофилий и клинико-лабораторных показателей» от 25.04.2017.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 в журналах из перечня ВАК Минобрнауки РФ.

Положения, выносимые на защиту.

1. У пациентов с тромбозом зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей статистически значимым является повышение антитромбина III, гомоцистеина, Д-димера,

количества тромбоцитов, фибриногена, триглицеридов, ЛПОНП и снижение уровня ЛПВП в крови по сравнению с группой контроля. У пациентов без тромбоза зоны реконструкции установлено увеличение гомоцистеина, фибриногена, триглицеридов в крови и замедление тромбинового времени.

2. Выявлены значимые ассоциации молекулярно-генетических факторов тромбофилий с лабораторными показателями: генетических вариантов 20210 GA FII с повышенным уровнем гомоцистеина и Д-димера, 455 GA FGB и 455 AA FGB с повышенным уровнем Д-димера, 677 CT и 677 TT MTHFR с повышенным уровнем триглицеридов и укорочением тромбинового времени, 677 TT MTHFR со сниженным уровнем липопротеидов высокой плотности в крови.

3. Генетические факторы 20210 GA FII, 455 GA FGB, - 455 AA FGB, 677 CT и 677 TT MTHFR ассоциированы с развитием с тромботической окклюзии зоны реконструкции у больных после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей.

4. Модель прогнозирования риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции с учетом влияния генетических вариантов (аллели 677 T MTHFR и 455 A FGB) показывает более высокий процент точности в установлении лиц с повышенным риском развития раннего тромбоза зоны реконструкции (97,47%) по сравнению с моделью, рассматривавшую только лабораторные показатели (93,67%) (патент № 2617418 от 25.04.17).

5. Диагностическая эффективность модели прогнозирования риска тромботической окклюзии зоны реконструкции после операций на брюшной аорте, артериях нижних конечностей в практической работе подтверждена с помощью группы оценки эффективности разработанной модели прогнозирования (56 пациентов) и составила 82% для модели с учетом влияния генетических вариантов генов наследственных тромбофилий и 78% для модели, основанной только на лабораторных показателях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, заключения,

выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Результаты исследования обобщены в 18 таблицах, представлены на 27 рисунках. Список литературы содержит 192 источника, из них 93 отечественных и 99 зарубежных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Хирургические аспекты артериальных реокклюзий.

Атеросклеротическое поражение сосудов развивается в результате действия многочисленных этиологических факторов и имеет сложный патогенез [60, 87, 132].

В основе механизма атерогенеза лежит химическая модификация липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и преобразование их в окисленно-модифицированные ЛПНП (омЛПНП) [1]. Ключевым звеном атерогенеза является захват омЛПНП моноцитами макрофагами с последующим формированием пенистых клеток. Этот процесс происходит при участии эндотелиоцитов, моноцитов, нейтрофилов и тромбоцитов, обладающих фагоцитарной активностью [60, 82]. Следующим этапом в развитии патологического процесса является образование атеросклеротической бляшки, развивающейся внутри интимального слоя и содержащей очаг атероматоза и соединительнотканную покрышку [62]. Нарушения в системе гемостаза, которые накапливаются при атеросклеротическом процессе, ярко проявляются при развитии острых ишемических осложнений – острого инфаркта миокарда, ишемического инсульта, критической ишемии нижних конечностей. Именно тромбоз, присоединившийся к атероматозным поражениям сосудистой стенки, является причиной ишемии или полного прекращения кровотока по пораженной артерии [74].

Окклюзирующие поражения артерий составляют значительную часть в структуре сердечно-сосудистых заболеваний. Для хирургической коррекции этих состояний предложено множество вариантов хирургических вмешательств и реконструкций артерий различными видами протезов. Количество таких артериальных реконструктивных операций в Российской Федерации продолжает увеличиваться. Общее число артериальных реконструкций в РФ за 2016 год составило 71810 операций, что превышает аналогичный показатель за 2014 год (57 105 операций). Наибольшее число реконструктивных операций на аорте и артериях, включая эндартерэктомию и стентирование подвздошных артерий,

выполняется у больных с ишемией нижних конечностей. В 2016 году число реконструкций на аорто-бедренном сегменте составило 11778 операций, включая и ангиопластику со стентированием. За 2016 год суммарно выполнено 3465 операций АББШ (аортобедренное бифуркационное шунтирование), в том числе с применением полузакрытой эндартерэктомии из подвздошных артерий – 1 112 операции, доля АББШ в общем числе операций составила 9,5%. Эндоваскулярные вмешательства при поражении аорты и подвздошных артерий должны быть приоритетным вариантом лечения. На долю бедренно-подколенного шунтирования (БПШ) выше щели коленного сустава приходится до 21,3% (4510) операций, ниже щели коленного сустава 10,3% – (2158), бедренно-тибиального шунтирования – 6,9% (1467), профундопластики/пластики бедренных артерий – 9,3% (1983), подколенно-стопного шунтирования – 0,3% (72), артериализации – 0,4% (92) [64].

Несмотря на совершенствование хирургической техники и применяемых материалов сохраняется большой процент осложнений и связанных с ними повторных реконструктивных вмешательств на магистральных артериях. У части успешно оперированных пациентов в различные сроки после хирургической реваскуляризации развивается реокклюзия восстановленного артериального сегмента, что приводит к рецидиву ишемии конечности. Частота окклюзионных осложнений операций определяется бассейном и возрастает от проксимальных к дистальным артериальным сегментам: брахиоцефальные ветви - 5,8%; висцеральные ветви - 7,3%; аорто-бедренный сегмент - 9,3%; подколенно-тибиальный -12% [4]. Ряд авторов связывает развитие рестеноза в послеоперационном периоде с явлением гиперпролиферации интимы и субинтимальных компонентов артериальной стенки в зоне имплантата, сосудистых анастомозов и дезоблитерированных участков [36], а также изменением региональной гемодинамики, способствующим развитию ретромбоза дистальнее анастомоза [105]. Другие авторы утверждают, что основной причиной повторных облитераций зоны реконструкций является прогрессирование основного заболевания – атеросклероза [79]. На сегодняшний день единого

мнения о влиянии объема хирургической травмы сосудистой стенки на интенсивность развития в ней пролиферативных процессов нет.

Около 20% реконструктивных вмешательств завершается рестенозом и тромбозом протеза [54]. Пятилетняя проходимость реконструированных артериальных сегментов варьирует от 36% до 70%, в зависимости от уровня поражения артерий и типа используемого протеза, влияние ряда молекулярных факторов: фактор некроза опухолей альфа (TNF α), интерлейкины 6,8,10, Ig M и G [11, 45].

Реокклюзии шунтов по срокам их возникновения подразделяют на ранние, формирующиеся в течение трех месяцев после хирургического вмешательства, отсроченные, развивающиеся в сроки до 1,5 лет и поздние, проявляющиеся спустя 1,5 года и более, после операции [35]. По данным Белова Ю.В. (2009), ранними послеоперационными тромбозами считаются тромботические осложнения возникшие в первые шесть месяцев после операции, соответственно, поздние послеоперационные тромбозы, возникшие более шести месяцев после вмешательства [4]. Основными причинами ранней реокклюзии принято считать погрешности в хирургической тактике и технике [54]. К интраоперационным и ранним послеоперационным тромбозам приводят технические погрешности в выполнении анастомозов: несоответствие длины анастомоза и диаметра шунта, избыток или натяжение шунта, его возможный перекрут. Причиной отсроченных окклюзий являются гиперпролиферативные процессы в зоне реконструкции, в то время как причина окклюзий протезов в срок более 1,5 лет от момента операции является следствием прогрессирования атеросклероза [62]. Наиболее часто рестеноз развивается в период от 3 до 12 месяцев после операции [26].

Прогнозирование отдаленных результатов оперативного лечения, ранее выявление стенотических изменений, своевременная их коррекция, является приоритетной задачей современной сосудистой хирургии.

1.2 Лабораторные показатели в диагностике тромбофилических состояний.

В хирургической практике факторы тромбогенного риска и механизмы формирования тромбофилического синдрома (генетически обусловленных или приобретенных сдвигов в гемореологии и системе гемостаза), создающего высокий риск развития венозных тромбозов и тромбоэмболий [29, 77], определяет течение и прогноз заболевания, как в раннем послеоперационном периоде, так и в отдаленные сроки. Современная лабораторная диагностика позволяет изучить механизмы свертывания крови и предотвратить большинство таких осложнений. Количество исследований для оценки системы гемостаза в последние годы уменьшилось, а информативность их возросла. Для исследования показателей системы гемостаза используется определение ряда факторов, выделяемых из венозной крови. В клинической практике для оценки состояния системы гемостаза используются лабораторные методы - в виде коагулограммы или отдельных исследований [12].

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) отражает активность всех факторов свертывания, кроме фактора VII. АЧТВ представляет этапы «внутреннего пути» и общего каскада свертывающей системы крови человека (без участия тканевого тромбопластина). Референтное значение АЧТВ составляет 20 - 45 секунд, и зависит от вида и активности реагентов, от типа оборудования. АЧТВ используется для оценки состояния плазменного гемостаза при различных заболеваниях, в предоперационном периоде и контроле терапии нефракционированным гепарином [189] .

В качестве скринингового теста для оценки внешнего каскада свертывания плазмы, в основном для определения активности фактора VII, контроля за лечением непрямыми антикоагулянтами, широко используется протромбиновое время (ПВ). В нашей стране было принято определять протромбиновый индекс - процентное отношение протромбинового времени здорового человека к протромбиновому времени больного. По данным Первушин Ю.В. и др.,

использование этого показателя не принимается во внимание чувствительность используемого для анализа тромбопластина [37].

Скрининговым методом оценки системы свертывания крови является международное нормализованное отношение (МНО). Это дополнительный способ представления результатов протромбинового теста, рекомендованный для контроля терапии непрямыми антикоагулянтами комитетом экспертов ВОЗ [37].

К важному показателю оценки системы гемостаза относится фибриноген. Наиболее информативным тестом является его количественное определение по методу Клауса. В соответствии с причинами отклонений концентрации фибриногена этот тест используется в оценке плазменного гемостаза, как один из доступных факторов свертывания, для оценки остроты воспалительного процесса, состояния печени, в диагностике синдрома ДВС [12]. При атеросклерозе наблюдается устойчивое увеличение уровня фибриногена, трудно корригируемое лекарственными препаратами. В работах Добровольского А.Б и др. показана значимость сочетания повышенного уровня фибриногена с артериальной гипертонией или гиперлипидемией, приводящее к значительному увеличению риска тромботических осложнений [20]. Отмечено повышение риска сердечно-сосудистых заболеваний с возрастанием исходного содержания фибриногена в интервале 3,0-4,5 г/л. Определение уровня фибриногена крови является наиболее чувствительным и доступным тестом для выявления бессимптомных заболеваний периферических артериальных сосудов [12].

Важная роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений отводится тромбоцитам, чем объясняется большое внимание изучению их функционального состояния [74]. По данным Crowther M., секреция тромбоцитами тромбоцитарного и трансформирующего факторов роста способствует развитию атеросклеротического поражения в зоне повреждения стенки [123]. Концентрация тромбоцитов в периферической крови в норме тромбоцитов колеблется в диапазоне $150 - 400 \times 10^9 / \text{л}$ [12]. По данным литературы, тромбоциты играют важную роль в образовании тромбина *in vivo* [89, 142, 144]. Многие авторы считают, что тромбоциты имеют значение не только

непосредственно в активации свертывания крови, но и во многих близких физиологических процессах [89, 116, 139]. По данным ряда экспериментальных исследований некоторые препараты, назначаемые для коррекции нарушений метаболизма и лечения артериальной гипертензии, могут оказывать и антитромботическое действие, снижая активацию тромбоцитов, образование тромбина и стимулируя фибринолиз [108, 167, 170].

Немаловажную роль в формировании как венозных, так и артериальных тромбозов играет гомоцистеин. Это серосодержащая аминокислота, которая является продуктом метаболизма метионина. В печени гомоцистеин реметилюруется при участии фермента бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазы, при этом донором метильной группы выступает бетаин [134]. При недостатке фолиевой кислоты и витамина В12, происходит блокировка одного из основных путей обмена гомоцистеина, что приводит к увеличению его концентрации [52]. Гипергомоцистеинемия развивается вследствие повышения концентрации гомоцистеина в плазме крови. Men X. et al. в своем исследовании показали значимость сочетанного повышения содержания гомоцистеина и С-реактивного белка, являющиеся прогностическим фактором развития атероматоза [145]. Способствуя формированию эндотелиальной дисфункции и активируя тромбоциты, гипергомоцистеинемия становится фактором развития инфаркта миокарда [117], приводит к раннему развитию атеросклероза и тромбоза коронарных, церебральных и периферических артерий [33, 84, 88, 92], нарушению обмена липидов [27].

Многие исследователи [3, 57, 125] в своих работах широко использовали препараты фолиевой кислоты для коррекции данного состояния. Так, сочетанное применение комплекса витаминов группы В (В6, В9, В12) и фолиевой кислоты в течение года привело к уменьшению толщины интима-медиа сонных артерий [57].

Антитромбин III или просто антитромбин (АТ), представляет собой гликопротеин 65kDa, принадлежащий к группе ингибирующих факторов. Он играет важную роль в ингибировании коагуляции и воспалительных процессов

сосудистого эндотелия [118], является витамин К-независимым гликопротеином и основным ингибитором тромбина и других сериновых протеаз, в том числе факторов Ха и IXa [153]. Изменение уровня АТ в плазме крови повышает риск тромбообразования, как в венозном, так и в артериальном русле [162]. Дефицит АТ может быть наследственным или приобретенным. Врожденный дефицит АТ является наиболее тяжелой наследственной тромбофилией, в 20 раз повышая риск развития венозного тромбоза [118]. В кровеносных сосудах активация антитромбина обеспечивается гликопротеидами люминальной поверхности эндотелия, содержащими гепарансульфат. Связывание антитромбина с этими структурами является механизмом, обеспечивающим антитромботические свойства эндотелия. Антитромбин, как важный компонент антикоагуляционного звена, играет большую физиологическую роль в клинической эффективности гепарина [22, 47]. Риск развития наследственной тромбофилии значительно повышается при сочетании мутации в гене протромбина, связанном с дефицитом антитромбина в сыворотке больного [151].

D-димер - является продуктом деградации фибрина, который образуется за счет последовательных действий трех ферментов: тромбина, фактора XIIIa и плазмина [100]. Вначале тромбин расщепляет фибриноген до мономеров, которые полимеризуясь, служат в качестве «шаблона» для фактора XIIIa и формирования плазмина. Далее, тромбин активирует фактор XIII плазмы, связанный с фибриновыми полимерами, для получения активной трансклутаминазы фактора XIIIa [100]. Фактор XIIIa катализирует образование ковалентных связей между D-доменами полимеризованного фибрина. Наконец, плазмин разрушает «сшитый» фибрин, чтобы освобождая продукты деградации фибрина и подвергнуть высвобождению антигена D-димера, присутствующего в крови у пациентов с ДВС и других тромботических заболеваний [136]. Все современные лабораторные методы обнаружения D-димера основаны на его взаимодействии со специфическими моноклональными антителами [127]. Эти антитела связываются со специфическими эпитопами, появляющимися при изменении конформации D-доменов, в результате образования D-димеров [100]. Каждое из используемых

антител обладает своей уникальной специфичностью, и существующие на сегодняшний день методы идентификации D-димера имеют ограничения, связанные, как с их спецификой и их чувствительностью. Доступные в настоящее время анализы определения концентрации D-димера не являются идентичными, поскольку моноклональные антитела распознают различные эпитопы, поэтому формат анализа, калибровочные стандарты для анализа и приборы различаются [98, 103, 163, 183].

На сегодняшний день роль нарушения обмена липидов в развитии атеросклероза является неоспоримой [1, 15, 24, 40]. По своим физическим свойствам липопротеиды плазмы крови подразделяются на: хиломикроны, липопротеиды очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеиды промежуточной плотности (ЛПП), липопротеиды низкой плотности (ЛНП) и липопротеиды высокой плотности (ЛВП). ЛНП являются самыми атерогенными липопротеидами. В их составе содержится примерно две трети всего холестерина плазмы. В патогенезе атерогенной дислипидемии ведущую роль играет нарушенный метаболизм липопротеидов, богатых триглицеридами [78].

Продукты нарушенного липидного обмена, обнаруживаемые в крови вследствие дислипидемии, обладают выраженным тромбогенным влиянием на факторы физиологической системы гемостаза [149]. Дислипидемия, как правило, сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов вследствие снижения антиоксидантного потенциала. В результате в крови появляются агрессивные формы липидов, в частности липопротеиды низкой плотности (ЛПНП). Среди таких форм липидов могут быть потенциальные лиганды для рецептора тромбоцитов CD36. Взаимодействие лигандов с этим рецептором может активизировать тромбоциты и усилить процесс их агрегации [168]. Таким образом, при дислипидемии в крови появляются в несвойственном для нормального состояния количестве тромбогенные агенты, которые встраиваясь в физиологическую систему, превращают ее в тромбгенирующую, с характерным сдвигом динамического равновесия в сторону тромбофилии [110, 171]. Существует целый ряд других белковых и небелковых факторов

участвующих в каскаде системы гемостаза [138]. Среди них выделяют ряд факторов, изменение в генетической структуре которых влечет за собой развитие тромбофилического состояния [186].

1.3 Система гемостаза и молекулярно-биологические эффекты факторов свертывания.

Под системой гемостаза понимают многокомпонентный комплекс кровеносных сосудов, крови и их взаимодействий, который обеспечивает поддержание целостности кровеносных сосудов, жидкое агрегатное состояние крови в сосудистом русле, предупреждение и остановку кровотечения при повреждении сосуда, реагируя образованием фибринового сгустка [42, 115]. Механизмы гемостаза запускаются при повреждении эндотелия (травмы, операции, другие патологические процессы), когда кровь вступает в контакт с соединительной тканью субэндотелиального слоя.

В норме эндотелий проявляет антикоагулянтные свойства, то есть обладает тромборезистентностью, он способен нейтрализовать активные факторы свертывания крови, ингибировать адгезию и агрегацию тромбоцитов, активировать фибринолиз [49]. При патологических состояниях пораженный эндотелий, например в месте разрыва атероматозной бляшки, трансформируется в мощную прокоагулянтную поверхность. Это происходит за счет выделения прокоагулянтных веществ, включая тканевой фактор и фактор Виллебранда, а также за счет обнажения субэндотелиальных коллагеновых структур. Все это приводит к активации тромбоцитов, изменению их формы, адгезии и агрегации [79]. Тканевой фактор активирует внешний путь системы свертывания крови. Хотя патогенез тромбообразования одинаков в различных участках системы кровообращения, существует значительная разница в механизме формирования артериального и венозного тромба [83]. Одним из основных факторов образования артериального тромба является активация тромбоцитов в месте повреждения эндотелия сосудов. Венозный тромбогенез отличается от артериального типом нарушения равновесия между тромбогенными и защитными механизмами. При венозном тромбозе ведущую роль играет повышенная системная

гиперкоагуляция, т.е. активация свертывания с недостаточностью процессов ингибирования, и стаз крови. Активация тромбоцитов имеет второстепенное значение. Поражение стенки сосуда необязательно, однако является способствующим фактором. В ряде случаев в основе тромботического процесса лежит нарушенный фибринолиз.

Стадии активации свертывания крови, приводящие к образованию тромбоцитарных агрегатов и фибрина, одинаковы как при формировании гемостатической пробки, так и при тромбообразовании [110, 149].

Сложное взаимодействие сосудистой стенки, тромбоцитов и пламенных факторов формирует защитный прокоагулянтный потенциал, который находится в динамическом равновесии с противосвертывающими и фибринолитическими механизмами [74, 82, 115].

Схематично система гемостаза представлена следующими компонентами: сосудистым комплексом (в первую очередь эндотелием) и тромбоцитарным звеном, а так же прокоагулянтным, фибринолитическим звеньями и системой ингибиторов свертывания крови [30].

В процессе остановки кровотечения условно выделяют 2 этапа: первичный (тромбоцитарно-сосудистый) и вторичный (коагуляционный) гемостаз. Под сосудисто-тромбоцитарным гемостазом понимают прекращение или уменьшение кровопотери за счет сокращения травмированного сосуда и образования тромбоцитного агрегата в зоне повреждения сосуда. Кровотечение прекращается лишь частично, так как рыхлая структура тромбоцитного сгустка не образует непроницаемую преграду при кровотечении. Данный каскад гемостатических реакций является лишь первым этапом в остановке кровотечения. В процессе вторичного гемостаза на основе тромбоцитного агрегата формируется сгусток крови, который на завершающей стадии гемостаза подвергается ретракции. Далее тромбоцитный агрегат консолидируется фибрином и подвергается дополнительному уплотнению в процессе спонтанного сокращения сгустка крови [42].

После образования протромбинактиваторного комплекса начинается второй этап гемокоагуляции - переход протромбина (II фактора) в свою активную форму – тромбин, осуществляющийся в 2 этапа: образование мезотромбина и далее протромбина. Тромбин является конечным продуктом второй стадии гемокоагуляции, вызывает активацию кофакторов и тромбоцитов, а так же принимает участие в процессах репарации поврежденных тканей [30]. Образование фибрина и его стабилизация представляют собой третий, финальный, этап формирования тромба.

Нарушения системы гемостаза, сопровождаемые гиперкоагуляцией, играют важную роль в развитии различных патологических состояний и осложнений хирургических вмешательств.

В развитии тромбоза в настоящее время многие исследователи уделяют значительное внимание тромбофилическому синдрому, определяемому как повышенная готовность крови к внутрисосудистому свертыванию и тромбообразованию и встречающемуся при различных патологических процессах [83, 188]. Различают 2 основных вида тромбозов: венозные и артериальные. Основные причины развития венозных тромбозов - стаз и дефицит компонентов системы противосвертывания, артериальных - нарушение структуры сосудистой стенки и активация тромбоцитов [34, 122]. Артериальные тромбозы - причина 95% крупноочаговых инфарктов миокарда, 85% ишемических инсультов, гангрены конечностей, а также инфарктов других органов (почек, кишечника) [6, 18, 32]. Выделяют три типа тромбофилий: врожденные, приобретенные и комбинированные [58].

В 2000 г. Р. Манусси [158] определил наследственную тромбофилию как генетически детерминированную тенденцию к венозному тромбообразованию, которая реализуется уже в молодом возрасте. Тромботические осложнения при этом возникают без очевидной причины и имеют склонность к рецидивированию [135]. Генетический фактор в развитии тромбофилий приводит к недостатку или дефекту тех или иных факторов свертывания крови. Врожденная тромбофилия может быть обусловлена как изолированными, так и комбинированными

генетическими дефектами, которые проявляются в виде первичного дефицита естественных антикоагулянтов, снижением активности фибринолиза, наличием в гемоциркуляции аномальных факторов гемокоагуляции, нечувствительных к естественным антикоагулянтам или фибринолитикам, высоким уровнем протромботических факторов и врожденной гиперфункцией тромбоцитов [138]. Мутации в следующих генах способствуют развитию гиперкоагуляционного состояния и развитию тромбоза: фактора коагуляции V (1691G/A FV), протромбина (20210G/A FII), метилентетрагидрофолатредуктазы (677C/T MTHFR), проконвертина (10976G/A FVII), фибриногена (-455G/A FI), ингибитора активатора пламиногена I типа (4G/5G PAI-1), тканевого активатора пламиногена t-PA (I/D), поверхностных рецепторов тромбоцитов (807C/T GP Ia, 1565 C/T GPIIb, 434 C/T GPIIb) и другие [129, 140, 146, 192].

В основе процесса свертывания крови лежит цепь последовательных превращений фибриногена в фибрин. Образованию фибринового тромба предшествует каскад протеолитических реакций, приводящий к активации фермента тромбина, который и превращает фибриноген в фибрин. Все белки, участвующие в свёртывании крови, называют факторами свёртывания [5, 42]. В ходе реакций свертывания крови все белки-ферменты сначала выступают в роли субстрата, а затем - в роли фермента. В процессе свертывания участвует ряд белков, не обладающих ферментативной активностью, но специфически ускоряющих протекание ферментативной реакции - кофакторы (V и VIII), тканевой фактор и ионы кальция. Несмотря на то, что изучению генетических основ тромбообразования посвящены многочисленные исследования отечественных и зарубежных авторов, на сегодня нет единого мнения в определении значимости отдельных видов полиморфизмов в развитии тромбоэмболизма [50, 56, 186]. По данным целого ряда литературных источников частота генетических форм склонности к тромбообразованию у больных с тромботическими осложнениями варьирует от 8 до 96,3% [7, 86, 93, 104, 152].

Среди факторов свертывающей системы крови, имеющих наибольшее значение в патогенезе сосудистых осложнений является протромбин.

Ген протромбина (F2), который кодирует аминокислотную последовательность белка протромбина. Протромбин или коагуляционный фактор II является предшественником тромбина. Под действием активированной протромбиназы (FXa), находящейся в комплексе с активированным фактором V и ионами кальция, протромбин превращается в тромбин, который в свою очередь стимулирует превращение фибриногена в фибрин с последующим формированием кровяного сгустка (рис. 2). Молекула протромбина представляет собой одноцепочечный гликопротеин, молекулярной массой 72 кДа [42]. Ген коагуляционного фактора II локализуется на 11 хромосоме человека в позиции 11p11-q12 [147] и состоит из 14 экзонов и 13 интронов [126].

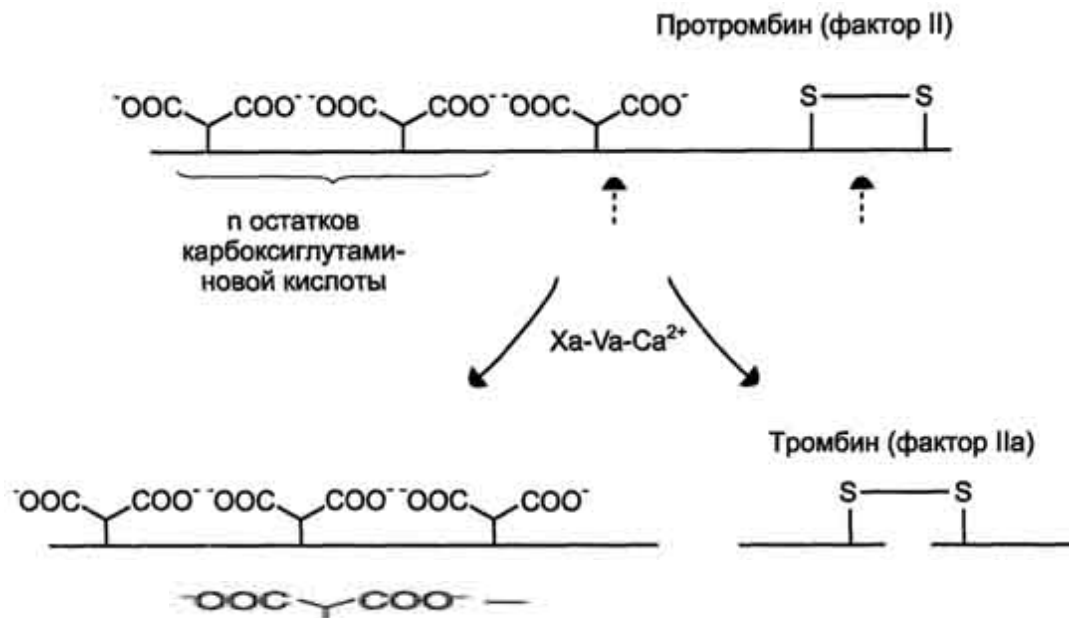


Рис. 2. Протеолитическая активация протромбина фактором Xa протромбиназного комплекса.

Примечание: штрих стрелки указывают положение гидролизуемых в молекуле протромбина пептидных связей. Молекула протромбина состоит из одной полипептидной цепи, а образующийся в результате частичного протеолиза протромбина тромбин состоит из двух полипептидных цепей, связанных между собой одной дисульфидной связью (Северина Е.С., 2003).

Мутация в гене протромбина 20210G/A - вторая по частоте причина повышенного риска тромбообразования, обусловленного генетическими нарушениями. При ее наличии почти в 90% случаев выявляют повышенный уровень протромбина. Риск развития тромбоэмболии у индивидуумов с этой

мутацией возрастает в 3 раза [5]. Гетерозиготными носителями гена являются 2-3% представителей европейской расы. Полиморфизм 20210 G/A, обусловленный заменой нуклеотидного основания гуанина (G) на аденин (A) в позиции 20210 гена F2, приводит в случае варианта A к повышенной экспрессии гена.

Из-за увеличения экспрессии мутантного гена концентрация протромбина повышается в 1,5–2 раза, чем в норме [138]. При возникновении тромбозов мутация 20210A часто встречается в сочетании с мутацией Лейден [16].

Избыточная продукция протромбина является фактором риска инфаркта миокарда [120], ишемического инсульта [65, 80], ишемической болезни сердца [19], венозного тромбоза [42, 48, 119, 184], в том числе в послеоперационном периоде. Вариант полиморфизма 20210G/A наследуется по аутосомно-доминантному типу, обеспечивая повышенный риск тромботических случаев даже в гетерозиготной форме [154]. Риск развития тромбоэмболических послеоперационных осложнений возрастает до 2,8 раза [70].

Коагуляционный фактор V свертывания крови (проакцелерин) является белковым кофактором при образовании тромбина из протромбина. Ген V фактора состоит из 25 экзонов и 24 интронов, локализуется в 1 хромосоме 1q21-25 [155] и является одноцепочечным гликопротеином с молекулярной массой 330 кДа.

В основе мутации проакцелерина лежит развитие APC - резистентности, т. е. устойчивости к активированному протеину C и проявляется отсутствием ингибиторного эффекта при добавлении активированного протеина C в плазму больного [76]. В норме активированный протеин C расщепляет активный фактор V в трех позициях - Arg506, Arg306 и Arg679 [112, 169], а также, инактивирует фактор VIIIa [190]. Причиной C-резистентности является точечная мутация - замена G на A в 1691 нуклеотидной позиции гена фактора V свертывания крови, названная Лейденской [154]. В результате такой однонуклеотидной мутации нарушается сайт расщепления фактора V активированным протеином C и не происходит регулирования образования тромбина по принципу обратной связи, что в дальнейшем приводит к гиперкоагуляции и увеличению риска тромбообразования [70, 101]. Наследование происходит по аутосомно-

доминантному принципу. Частота встречаемости данной мутации в европейской популяции колеблется от 2% до 7%, и крайне редка в странах Азии и Африки. У пациентов с тромбозом глубоких вен частота мутации Leiden достигает 20%, относительный риск развития заболевания у гетерозиготных носителей возрастает в 7 раз, а у гомозиготных - в 80 раз [53, 176].

Многие авторы считают, что наличие мутации Лейден повышает риск первичных и рецидивирующих венозных тромбозов, по крайней мере, в 3-6 раз [14, 50, 80, 186]. В ходе исследования у пациентов с венозной тромбоэмболией был установлен повышенный риск такого осложнения при наличии мутации Лейден в 3,7 раза [14, 99]. По данным литературы среднестатистический риск развития инфаркта миокарда у лиц с мутацией Лейден увеличивается в 1,5 раза, приводя к 2,8 - кратному повышению количества пациентов с инфарктом миокарда без выраженного коронарного стеноза [130]. Наличие аутоантител, направленных против протеина С, приводит к удвоению риска тромбоза [109]. Что касается атеротромботических событий, то в ряде популяционных исследований не было обнаружено значимой ассоциации врожденных нарушений системы гемостаза с их развитием у исходно здоровых лиц [131, 154, 179].

Значительную роль в системе гемостаза играет фибриноген. Его молекула представляет собой гликопротеин, содержащий 3 полипептидные цепи (α , β и γ), участвующих в кодировке 3 различных генов: FGA, FGB и FGG [96]. Ген фибриногена β (FGB) кодирует аминокислотную последовательность бета-полипептидной цепи белка фибриногена [42] и занимает одно из главных мест в свертывающей системе крови, так как из него образуется фибрин.

Полиморфизм -455 G/A гена FGB связан с заменой нуклеотида гуанин (G) на аденин (A) в промоторном участке гена. Вариант A сопровождается повышенной экспрессией гена, что приводит к увеличению содержания фибриногена в крови и повышает вероятность тромботических событий. Распространенность данного варианта в европейских популяциях составляет 5-10%. Наследование мутантного гена происходит по аутосомно-доминантному типу. В ряде исследований показано, что мутация -455A FGB сопровождается

повышенной экспрессией гена, что приводит к повышенному уровню фибриногена в крови, увеличивая риск сосудистых осложнений, связанных с большим риском тромбоза и атеросклероза периферических артерий [133, 137], тромбоемболических осложнениях мерцательной аритмии [73]. В исследовании EUROSTROKE, проведенном среди европейского населения, установлено, что повышенный уровень фибриногена является мощным предиктором инсульта, повышая риски в 2-3 раза при увеличении его концентрации в крови [157, 182]. Аналогичные результаты получены при мета-анализе азиатской популяции [150] и противоположные при исследовании польского населения [185]. Результаты исследований показывают, что протромботические мутации сопряженные с полиморфизмом генов фактора V Leiden, фибриногена следует рассматривать, как высокий фактор риска артериальных или венозных тромбозов у детей перенесших оперативную коррекцию врожденных пороков сердца, сопровождающийся высокой летальностью при их развитии [102]. Уровень фибриногена также повышается при гипергомоцистеинемии. В присутствии повышенной концентрации гомоцистеина происходит изменение в структуре полимеров фибрина, что в дальнейшем приводит к уменьшению их чувствительности в фибринолизе [42].

Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) - фермент, играющий ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. MTHFR катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, который является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для синтеза метионина из гомоцистеина - основного участника метилирования ДНК [16]. Ген MTHFR локализован в 1-й хромосоме (1p36.3). Известно около двух десятков мутаций этого гена, нарушающих функцию фермента. Наиболее изученной мутацией является вариант, в котором нуклеотид цитозин (C) в позиции 677 заменен тимидином (T) [41, 85], что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина (позиция 222) в сайте связывания фолата. У лиц, гомозиготных по данной мутации (генотип TT), отмечается снижение активности фермента MTHFR примерно до 35% от среднего значения. По данным Den Heijer

М., в популяции мутация 677 Т гена МТНFR широко распространена у представителей европейской расы - от 35 до 55 % случаев [128]. Наличие гомозиготного генотипа 677ТТ выявлено у 10–16% европейцев, носителями гетерозиготного варианта 677СТ этого гена являются 56% обследованных лиц [16]. Мутация в гене, кодирующем МТНFR, связана с умеренным повышением уровня гомоцистеина. При гетерозиготном варианте (677С→Т) активность фермента ниже на 30%, а при гомозиготном на 70%, что на фоне пищевой недостаточности фолата приводит к росту уровня гомоцистеина плазмы крови [51]. Полиморфизм 677Т гена МТНFR связан с некоторыми группами мультифакторных заболеваний: сердечно-сосудистыми болезнями [165], дефектами развития плода, онкологическими заболеваниями [161, 180]. В результате замены цитозин на тимин в 677-м положении синтезируется термолабильный фермент, что приводит к развитию гипергомоцистеинемии [46, 91, 107, 124, 164].

Гипергомоцистеинемия может являться независимым фактором риска атеросклероза и атеротромбоза [114], а так же ишемического инсульта кардиоэмболического подтипа [106]. У молодых пациентов с ишемическими состояниями периферических артерий с гомозиготным генотипом 677ТТ встречается в 1,2 раза чаще, чем у здоровых лиц аналогичного возраста [154]. Гомоцистеинемия может выступать фактором риска тромботических осложнений после операций на аорте и магистральных артериях у молодых пациентов [2, 51]. По данным статистического исследования Klerk M. et.al происходит возрастание риска развития ишемической болезни сердца в 1,16 раза при наличии гомозиготной формы 677ТТ по сравнению со здоровыми донорами [164].

Точечные мутации и однонуклеотидные полиморфизмы генов, которые кодируют белки, участвующие в свертывающем и противосвертывающем каскадах, являются важными факторами риска развития послеоперационных тромбозов. Генетическим мутациям коагуляционного звена гемостаза и их роли в формировании реокклюзий сосудистых трансплантантов у больных после реконструктивных операций на артериальном русле посвящены единичные

работы зарубежных исследователей. В российской литературе проблема тромбоза протезов после артериальных реконструкций также представлена незначительным количеством исследований [28], большинство из которых посвящено изучению воспалительных процессов в зоне реконструкции и генетическому полиморфизму провоспалительных цитокинов [44]. Увеличение числа облитерирующих сосудистых заболеваний может быть связано так же с комбинацией различных факторов генетического риска атеросклероза и венозной тромбоэмболии [174, 181].

Таким образом, полиморфные гены тромбофилий играют значительную роль в инициации и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний и осложнениях оперативных вмешательств, поэтому более детальное исследование их участия в развитии патологического процесса позволит выработать комплекс мероприятий по профилактике тяжелых осложнений и своевременной патогенетической коррекции этих состояний.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1 Общая характеристика обследованных групп

В исследование включены 175 пациентов мужского пола, разделенных на четыре группы: 3 группы исследования (119 человек) и четвертая группа оценки эффективности разработанной модели прогнозирования (56 человек).

Первую (I) группу исследования составили 44 пациента, у которых выявлен тромбоз зоны реконструкции после реконструктивной операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей по поводу облитерирующего атеросклероза в первые 6 месяцев после оперативного вмешательства. Возраст пациентов в этой группе варьировал от 43 до 75 лет (в среднем $60 \pm 8,6$ лет).

Вторую (II) группу исследования составили 40 мужчин после аналогичных операций, не имеющих осложнений тромбоза зоны реконструкции. Возраст больных варьировал от 31 до 72 лет (в среднем $58,6 \pm 7,7$ лет).

Третью (III) группу исследования (группу контроля) составили 35 мужчин в возрасте от 38 до 73 лет (в среднем $54,7 \pm 9,5$ лет), которые не имели клинических и инструментальных признаков облитерирующего атеросклероза брюшной аорты и артерий нижних конечностей.

Группу оценки эффективности математической модели прогнозирования риска развития тромбоза в зоне реконструкции (IV группа) составили 56 пациентов (не из числа групп исследования) после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей (средний возраст $59,2 \pm 5,7$ лет).

В исследование включались мужчины русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющие родства между собой. Всем пациентам было выполнено молекулярно-генетическое обследование. Группы не отличались по возрасту ($p > 0,05$), месту рождения и национальности. Распределение пациентов по возрасту представлено в таблице 1.

Распределение пациентов по возрасту, n (%)

возраст	I группа n=44	II группа n=40	III группа n=35	IV группа n=56
до 60 лет	25 (56,80%)	23 (57,50%)	24 (68,57%)	27 (48,21%)
61-75 лет	19 (43,20%)	17(42,50%)	11 (31,43%)	29 (51,79%)

Все обследуемые пациенты I и II исследуемых групп страдали облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей со II Б - III степенью хронической артериальной недостаточности нижних конечностей по классификации R. Fontaine – А.В. Покровского [62] (таблица 2), которым была выполнена операция прямой реваскуляризации брюшной аорты и артерий нижних конечностей.

Таблица 2

Распределение пациентов I, II и IV групп по степени хронической артериальной недостаточности в дооперационном периоде (классификация R. Fontaine – А.В. Покровского)

Степень хронической артериальной недостаточности	I группа n=44	II группа n=40	IV группа n=56
II Б, n (%)	36 (81,8%)	34 (85%)	48 (85,7)
III, n (%)	8 (18,2%)	6 (15%)	8 (14,3)

Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении между группами.

Распределение пациентов I, II и IV групп по виду оперативного вмешательства представлено в таблице 3.

Бедренно-подколенное шунтирование выполнено всем пациентам в позиции дистального анастомоза выше щели коленного сустава с использованием материала для шунта большой подкожной вены.

В послеоперационном периоде все пациенты получали двойную дезагрегантную терапию: ацетилсалициловая кислота 125 мг + клопидогрель 75 мг ежедневно.

Таблица 3

Оперативные вмешательства, выполненные пациентам I, II и IV групп исследования

Вид оперативного вмешательства	I группа n (%)	II группа n (%)	IV группа n (%)
АББШ	18 (40,9)	24 (60)	18 (32,1)
АБШ	-	-	7 (12,5)
БПШ	23 (52,3)	11 (27,5)	27 (48,2)
Пластика ПБА	3 (6,8)	-	-
Профундопластика	-	1 (2,5)	
АББШ+БПШ	-	3 (7,5)	4 (7,1)
Профундопластика +БПШ	-	1 (2,5)	
Всего	44 (100)	40 (100)	56 (100)

Наблюдение за больными проводили с дооперационного этапа и в течение 6 месяцев после реконструкции.

У пациентов I и II групп исследования имелось мультифокальное поражение (одномоментное поражение брюшной аорты, артерий нижних конечностей, брахиоцефальных артерий и коронарных артерий). В I группе исследования мультифокальным атеросклерозом страдали 8 из 44 (18,2%) пациентов, а во II группе исследования таких пациентов было 6 из 40 (15%). При статистическом анализе достоверных отличий по наличию мультифокального атеросклероза у пациентов I и II групп исследования получено не было ($p > 0,05$).

Клинико-лабораторное обследование пациентов проводилось на базе Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. Все исследования выполняли с информированного согласия пациентов на использование материалов лечебно-диагностических мероприятий для научно-

исследовательских целей и проведены по стандартам этического комитета Российской Федерации. На каждого больного была разработана и заполнена анкета-опросник, включающая возраст, место рождения и жительства, историю заболевания, лечения (вид и сроки оперативного вмешательства, срок развития тромбоза зоны реконструкции, вид повторной операции, его результат) и обследования.

При формировании выборки были определены критерии исключения: женский пол, наличие сопутствующих инфекционных или воспалительных заболеваний (в том числе брюшной аорты и магистральных артерий), сахарного диабета, наличие онкологических заболеваний на момент исследования или в анамнезе, наличие признаков тромбофилии в анамнезе.

Лабораторное исследование включало в себя клинический анализ крови с определением количества тромбоцитов в крови; липидный профиль крови (общий холестерин, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП, триглицериды); коагулограмму (протромбиновый индекс, АЧТВ, ТВ, фибриноген, МНО) и расширенное исследование системы гемостаза (антитромбин-III, гомоцистеин, Д-димер).

Определение уровня тромбоцитов в крови проводилось автоматизированным гематологическим анализатором BC-6800 фирмы Mindray (Китай).

Определение липидного профиля (общий холестерин, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП, триглицериды) проводилось колориметрическим фотометрическим тестом для количественного определения данных показателей в сыворотке или плазме человека на анализаторе OLYMPUS (Япония). Количественное определение Д-димера проводилось иммунотурбидиметрическим методом в плазме человека на анализаторе OLYMPUS (Япония) [Долгов В.В. и др., 2007]. Определение антитромбина III выполнялось кинетическим колориметрическим тестом на аппарате COBAS INTEGRA 800 (Германия-Швейцария). Определение уровня гомоцистеина в крови осуществлялось с помощью ферментативного теста с использованием аппарата COBAS c 501 (Германия-Швейцария) и оригинальных тест-систем.

Для определения показателей коагулограммы использовались автоматический анализатор коагуляции крови Sysmex CA-1500 (фирмы Siemens, Германия) и наборы реагентов (Фибриноген-тест 10/1А для определения уровня фибриногена в крови, Ренампластин ПГ-5/1 – ПГ-5/5 для определения ПТИ и МНО, Тромбин-реагент ПГ-9А для определения тромбинового времени (ТВ) и Коагуло-тест ПГ-6 для определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ)), разработчик и производитель МБООИ Общество больных гемофилией НПО РЕНАМ (г. Москва, РФ) [Козлов А.А. и др., 2013].

Ультразвуковая диагностика брюшной аорты и артерий нижних конечностей выполнялась индивидуумам всех исследуемых групп с помощью аппарата General Electric Logiq E9 (США), методом ультразвукового триплексного сканирования с режимом цветового доплера. Пациентам проводилось измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) - в I и II группах исследования в до и послеоперационном периоде, в III группе - однократно.

Для определения уровня окклюзии и подтверждения тромбоза зоны реконструкции больным первой и второй групп исследования проводилась ангиография брюшной аорты, артерий таза и нижних конечностей. Для проведения этой процедуры использовался следующий инструментарий: Рентген-ангиографическая установка General Electric Innova 3100 (Германия), игла пункционная, диагностический проводник, интродьюсер 6 Fr, диагностический катетер Pig-Tail и Cobra 6Fr (либо JR 6Fr), шприц-инъектор Medrad Mark V ProVis, контрастное вещество - Ультравист-370.

Для оценки состояния русла «оттока» использовали бальную шкалу оценки периферического сопротивления русла «оттока» R.V. Rutherford (Society of Vascular Surgery runoff score) [172].

Всем исследуемым мужчинам проводилось типирование четырех молекулярно-генетических маркеров: фактора коагуляции V (мутация Leiden 1691G/A FV), протромбина (20210G/A FII), метилентетрагидрофалатредутазы (677 C/T MTHFR), фибриногена (455 G/A FGB).

Все системы для исследования стандартизированы для изучения развития тромбоза в сосудистом русле и развитии изучаемого осложнения.

2.2 Молекулярно-генетические методы

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета (руководитель – профессор, д.м.н. М.И. Чурносов).

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 6 мл, взятая из локтевой вены. Забор венозной крови проводили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (pH=8.0).

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции [160] в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляли 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивали и центрифугировали при 4°C, 4000 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензировали. Затем прибавляли 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10мг/мл) и инкубировали образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводили экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 минут. После каждого центрифугирования осуществляли отбор водной фазы. ДНК осаждали из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. Сформированную ДНК растворяли в бидистиллированной, деионизованной воде и хранили при -20°C. Выделенную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Анализ локусов 1691G/A FV, 20210G/A FII, 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР локусов проводилась на аппарате IQ5 (Bio-Rad) для ПЦР в режиме real time с

использованием готовых наборов реагентов производства ООО «Синтол» (таблица 4).

Таблица 4

Наборы, использованные для генотипирования ДНК-маркеров методом ПЦР

Ген	Полиморфизм	Название набора	Серия
Ген V фактора коагуляции (F V)	1691G/A (rs 6025)	Набор реагентов для определения полиморфизма G1691A гена F5 (Factor Leiden) производства ООО «Синтол»	300914
Ген протромбина (F II)	20210G/A (rs 1799963)	Набор реагентов для определения полиморфизма G20210A гена F2 (Protrombin) производства ООО «Синтол»	281014
Ген метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR)	677 C/ T (rs 1801133)	Набор реагентов для определения полиморфизма C677T гена MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) производства ООО «Синтол»	281014
Ген фибриногена (FI)	-455 G/A (rs 1800790)	Набор реагентов для определения полиморфизма -G455A гена FGB (fibrinogen beta chain) производства ООО «Синтол»	281014

Полиморфизм 1691G/A фактора коагуляции V (проакцелерина). Ген фактора V располагается в хромосоме 1q21-25, состоит из 6672 пар оснований, включая нетранслируемый 3'-регион из 163 пар оснований и нетранслируемый 5'-регион из 97 или 103 пар оснований. Кодированный регион содержит информацию о гидрофобном лидирующем пептиде, состоящем из 28 аминокислот, и собственно самом факторе V (709 аминокислот тяжелой цепи, 836 – соединяющего фрагмента и 561 – легкой цепи). Фактор V является предшественником активного фактора акцелерина и входит в состав протромбиназного комплекса (активированные фактор X (фактор Xa) и фактор V (фактор Va), ионы кальция, связанные с фосфолипидными мембранами), возникающий при активации свертывания крови по внешнему или внутреннему пути.

Анализ полиморфизма 1691G/A фактора коагуляции V проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) с использованием готового набора реагентов для определения полиморфизма

G1691A гена F5 (Factor Leiden) производства ООО «Синтол» (серия 300914) в соответствии с инструкцией производителя. При проведении ПЦР в амплификаторе с флуоресцентной детекцией генотипирование осуществлялось методом Tag Man зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда. Зонд с флуоресцентным красителем HEX соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM – аллелю G (рис.3).

Две полосы, вертикальная и горизонтальная, делят график на четыре секции: одна для каждого гомозиготного состояния, одна для гетерозиготного состояния и секция без реакции. Присвоение генотипов неизвестным образцам определяется вычерчиванием RFU для одного флуорофора (на оси x) относительно RFU для другого флуорофора (на оси y) на диаграмме дискриминации аллелей.

Если значения RFU неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы и правее вертикальной полосы, генотип гетерозиготен (GA).

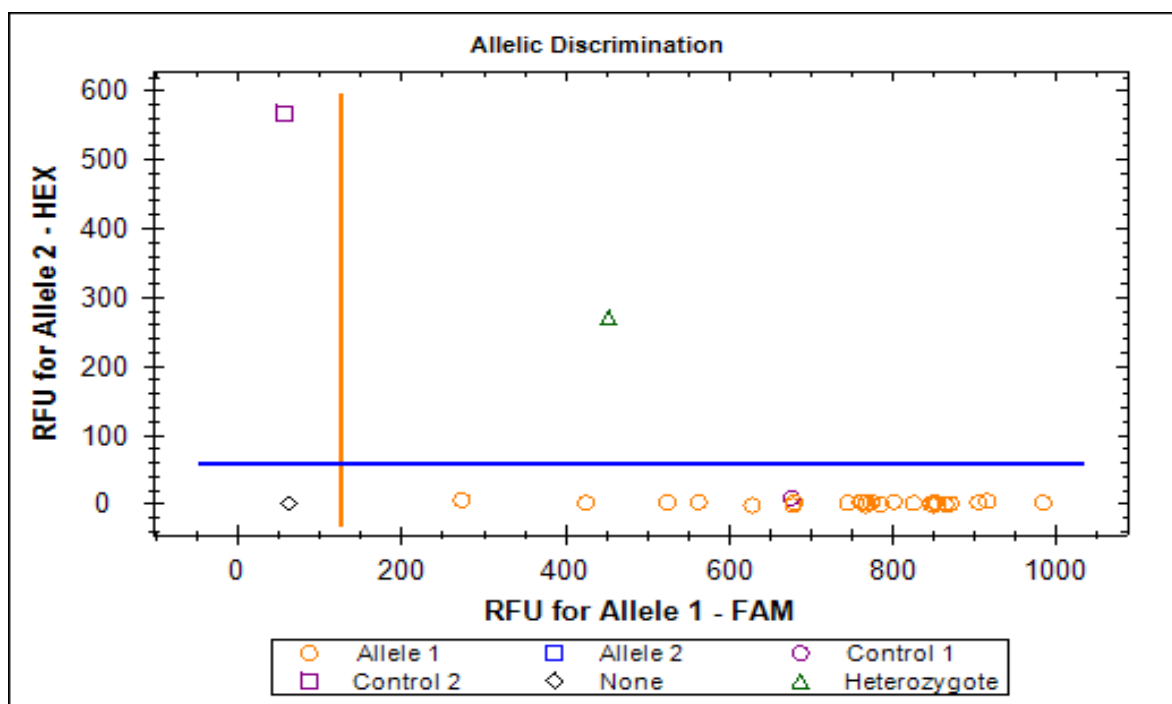


Рис. 3. Дискриминация аллелей по локусу 1691 G/A гена фактора коагуляции V (где \circ - гомозиготы 1691GG FV, \square - гомозиготы 1691AA FV, Δ - гетерозиготы 1691GA FV, \diamond - отрицательный контроль).

Если значения RFU неизвестного образца находятся выше горизонтальной полосы и левее вертикальной полосы, генотип гомозиготен по аллелю А (RFU аллеля А отложены по оси у).

Если значения RFU неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы и правее вертикальной, генотип гомозиготен по аллелю G (RFU аллеля G отложены по оси x).

Если значения RFU неизвестного образца находятся ниже горизонтальной полосы и левее вертикальной, определение генотипа невозможно (в данном случае неопределенный образец – отрицательный контроль).

Полиморфизм 20210G/A фактора коагуляции II (протромбина). Ген протромбина располагается в одиннадцатой хромосоме и содержит 14 экзонов и 13 интронов. Мутация 20210 G/A гена протромбина характеризуется заменой нуклеотида гуанина на нуклеотид аденин в позиции 20210. Замена нуклеотида происходит в 3'-нетранслируемом участке. При наличии данной мутации обнаруживаются повышенные количества химически нормального протромбина. Уровень протромбина может быть в полтора-два раза выше, чем в норме. Под действием фактора Ха в составе протромбиназного комплекса происходит расщепление протромбина с образованием тромбина.

Анализ полиморфизма 20210G/A фактора коагуляции II проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) с использованием готового набора реагентов для определения полиморфизма G20210A гена F2 (Protrombin) производства ООО «Синтол» (серия 281014) в соответствии с инструкцией производителя.

При проведении ПЦР в амплификаторе с флюоресцентной детекцией (на амплификаторе IQ5) генотипирование осуществлялось методом Tag Man зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда. Зонд с флуоресцентным красителем HEX соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM – аллелю G (рис. 4).

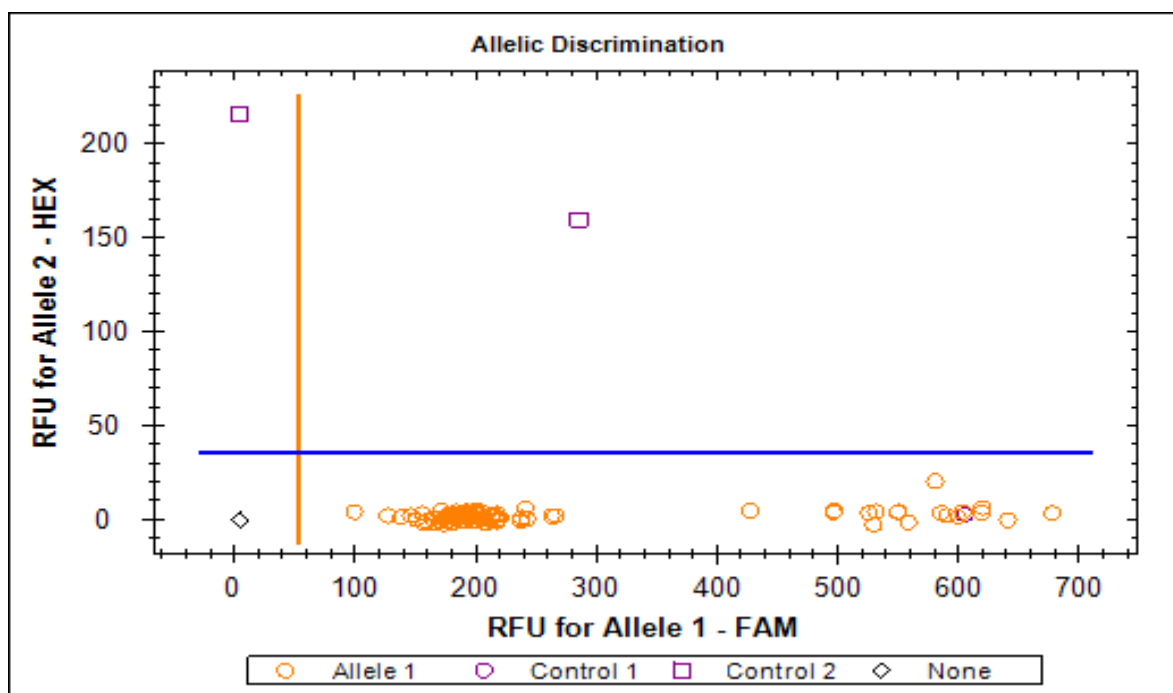


Рис. 4. Дискриминация аллелей по локусу 20210G/A фактора коагуляции II (где o - гомозиготы 20210GG FII, - гомозиготы 20210AA FII, Δ - гетерозиготы 20210GA FII, ◇ - отрицательный контроль).

Полиморфизм -455 G/A фактора коагуляции I (фибриногена)

Последовательности трех полипептидных цепей фибриногена (α , β и γ) закодированы в трех различных генах, расположенных в длинном плече хромосомы 14. Наиболее изученными вариантами полиморфизма гена фибриногена являются Vcl-1 и G(-455)A, расположенные в области промотора β -цепи. Вариант G(-455)A наследуется сцеплено с полиморфизмом C(-148)T в области, регулируемой IL-6. Полиморфизм G(-455)A ассоциируется с повышением уровня фибриногена и увеличением риска сердечно-сосудистых заболеваний, особенно при наличии дополнительных факторов риска.

Анализ полиморфизма -455 G/A фактора коагуляции I проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) с использованием готового набора реагентов для определения полиморфизма -G455A гена FGB производства ООО «Синтол» (серия 281014) в соответствии с инструкцией производителя. Генотипирование осуществлялось методом Tag Man зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого

зонда. Зонд с флуоресцентным красителем HEX соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM – аллелю G (рис. 5).

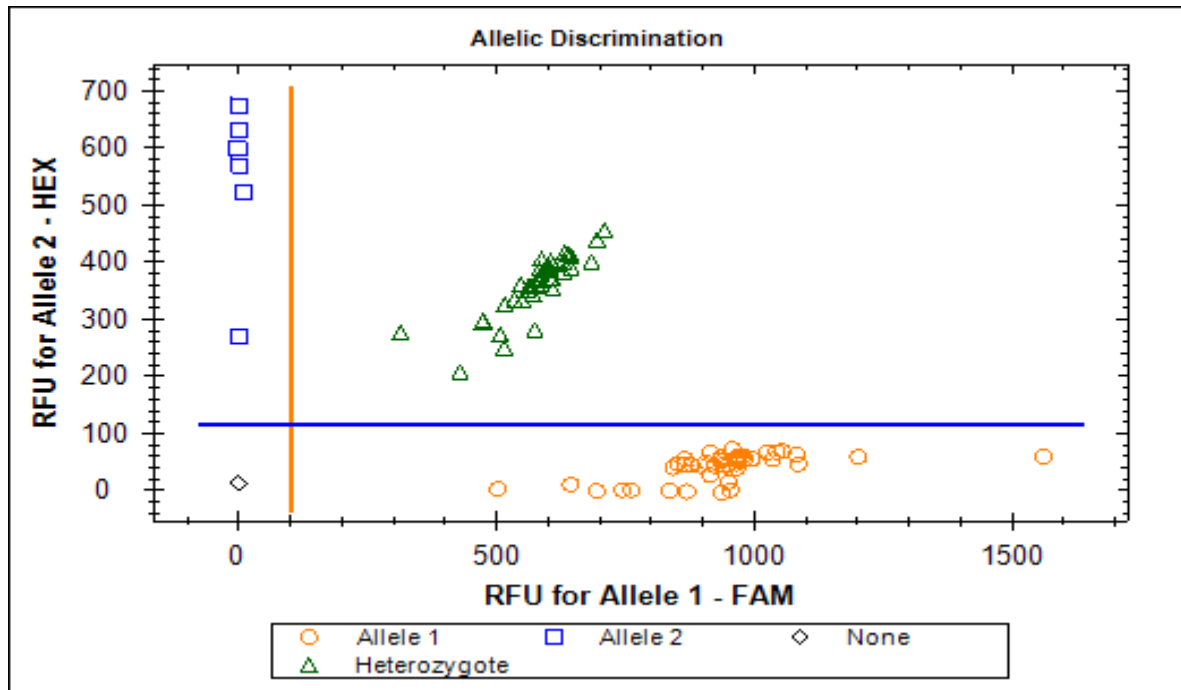


Рис. 5. Дискриминация аллелей по локусу -455 G/A фактора коагуляции I (где \circ - гомозиготы -455GG FI, \square - гомозиготы -455AA FI, Δ - гетерозиготы -455GA FI, \diamond - неопределенный или отрицательный контроль).

Полиморфизм 677 СТ гена метилтетрагидрофолатредуктазы (MTHFR)

Ген MTHFR локализован в хромосоме 1p36.3. Известно около двух десятков мутаций этого гена, нарушающих функцию фермента (катализирующего восстановление 5,10-метиленгидроfolата в 5-метилтетрагидроfolат). Наиболее изученной мутацией является вариант, в котором нуклеотид цитозин (С) в позиции 677 заменен тимидином (Т), что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на остаток валина (позиция 222) в сайте связывания folата. Такой полиморфизм MTHFR обозначается как мутация С677Т. Анализ полиморфизма С677Т гена MTHFR проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) с использованием готового набора реагентов для определения полиморфизма –С677Т гена MTHFR производства ООО «Синтол» (серия 281014) в соответствии с инструкцией производителя. Генотипирование осуществлялось методом Tag Man зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда.

Зонд с флуоресцентным красителем HEX соответствует аллелю А, зонд с красителем FAM – аллелю G (рис. 6).

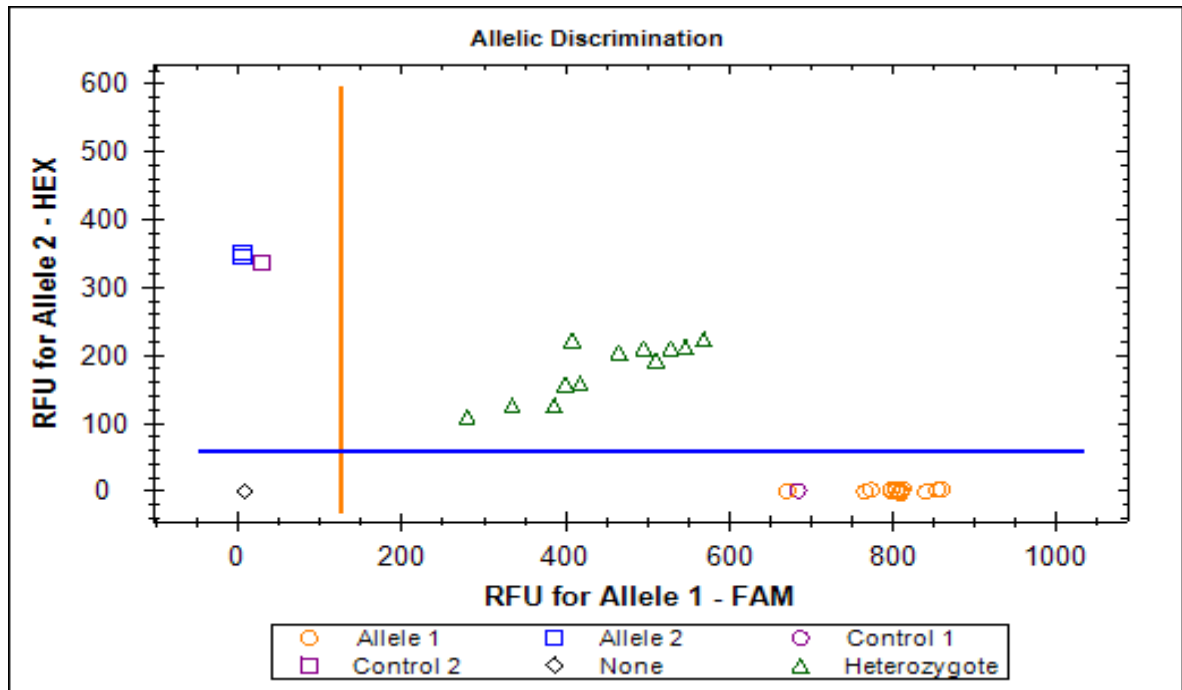


Рис. 6. Дискриминация аллелей по локусу 677 СТ гена MTHFR (где \circ - гомозиготы 677Т гена MTHFR, \square - гомозиготы 677С гена MTHFR, Δ - гетерозиготы 677С/Т гена MTHFR, \diamond - неопределенный или отрицательный контроль).

2.3 Генетико-статистические методы

Расчет фенотипических и генных частот проводили стандартными методами [13, 39].

С целью оценки соответствия наблюдаемого распределения ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использовали критерий χ^2 [39]:

$$\chi^2 = \frac{(N_1 N_3 - 1/4 N_2^2)^2 N}{n_1^2 n_2^2},$$

где N_1 , N_2 , N_3 – численности генотипов AA, Aa, aa в выборке объема N ; n_1 , n_2 - число аллелей A и a.

Расчет наблюдаемого уровня гетерозиготности производили по формуле [13]:

$$H_o = \frac{N_0}{N},$$

$$N_0 = \sum_{i \neq j} \sum N_{ij},$$

где, N_{ij} – численность людей в данной выборке с генотипом A_iA_j по l -му локусу, N – объем выборки.

Ожидаемый уровень гетерозиготности рассчитывали по формуле [13]:

$$H_E = 1 - \sum_i P_{il}^2,$$

где P_{il} – частота i -го аллеля l -го локуса.

Отношение между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью определяли по величине индекса фиксации Райта (D) [13]:

$$D = 1 - \frac{\overline{H}_0}{H_E},$$

где \overline{H}_0 – среднее значение наблюдаемой гетерозиготности, H_E – ожидаемая гетерозиготность.

Для сравнения частот аллелей и генотипов между различными группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Вычисления производили в таблицах сопряженности 2×2 .

Об ассоциации аллелей и генотипов с качественными признаками (наличие тромботической окклюзии зоны реконструкции) судили по величине отношения шансов (OR) [178] – показателю, отражающему, во сколько раз вероятность оказаться в группе с тромбозом зоны реконструкции отличается от вероятности оказаться в группе «контроль» для носителя изучаемого генотипа (аллеля): $OR = (A/B)/(C/D)$, где A и B – количество больных с тромбозом, имеющих и не имеющих мутантный аллель или генотип, соответственно; D и C – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный аллель или генотип, соответственно. $OR > 1$ рассматривали как положительную ассоциацию заболевания с исследуемым генотипом или аллелем (фактор риска) и $OR < 1$ – как отрицательную ассоциацию (фактор устойчивости). Границы 95% доверительного интервала (CI) для OR вычисляли по формулам [178]:

$$OR_{\min} = OR^{(1-1,96\sqrt{\chi^2})} \quad \text{и} \quad OR_{\max} = OR^{(1+1,96\sqrt{\chi^2})}$$

При изучении связей молекулярно – генетических маркеров с количественными признаками, характеризующими клинические и клинико-лабораторные показатели исследуемых (уровень холестерина, фибриногена, активированного частичного тромбинового времени и т.д. в начале с использованием критерия Шапиро-Уилка оценивали характер распределения данных признаков [69]. Дальнейший статистический анализ рассматриваемых признаков проводили с учетом характера их распределения:

1. При нормальном распределении признака для его описания использовали среднее арифметическое значение и его ошибку, а для сравнительного анализа – критерий Стьюдента.

2. При несоответствии закону нормального распределения для описания изучаемых признаков применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25 - Q75), а для сравнительного анализа – критерии Манна-Уитни, Шапиро-Уилка, Колмогорова-Смирнова.

Анализ комбинаций генетических вариантов исследуемых локусов наследственных тромбофилий в формировании ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции после реконструктивной операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей проведен с помощью программного обеспечения APSampler (<http://sources.redhat.com/cygwin/>), использующего метод Монте-Карло мартовскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику [97].

С целью минимизации ошибок 1-го рода, связанных с получением ложноположительных результатов при проведении множественных сравнений, вводили поправку Бонферрони – проводили перерасчет уровня значимости p для множественных парных сравнений по формуле: $p_{cor} = p \times n$, где p – полученный уровень статистической значимости, n – количество парных сравнений [69]. За статистически значимый уровень принимали $p_{cor} \leq 0,05$.

В работе использованы методы математического моделирования (дискриминантный анализ и метод множественной регрессии) с целью прогнозирования риска развития тромботической окклюзии зоны реконструкции [9].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0» [69].

ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований

3.1. Хирургические и клинические особенности исследуемых групп

У пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в I и II групп исследования исходно до операции отмечалось снижение ЛПИ по сравнению с контрольной III группой исследования на 43,5% и 42,6% соответственно ($p < 0,05$) (таблица 5).

Таблица 5.

Среднее значение ЛПИ у пациентов в группах исследования, $M \pm m$

Среднее значение ЛПИ	I группа n=44	II группа n=40	III группа (контрольная) n=35
до операции	0,61±0,08 [#]	0,620±0,12 [#]	1,08±0,06
через 2 месяца после операции	0,74±0,09 ^{* #}	0,79±0,17 ^{* #}	
через 6 месяцев после операции	-	0,78±0,09 [#]	

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к значениям до операции; ** $p < 0,05$ при сравнении между I и II группами; [#] $p < 0,05$ по отношению к группе контроля.

Через 2 месяца после операции у больных I и II групп исследования наблюдался прирост показателя ЛПИ на 17,6% и 21,5% соответственно по сравнению с исходными значениями, составляя в среднем 0,74±0,09 и 0,79±0,17 ($p < 0,05$). Вместе с тем, между I и II группой исследования по уровню ЛПИ не выявлено значимых различий как в дооперационном периоде, так и через 2 месяца после реконструктивного вмешательства ($p > 0,05$). Уровень ЛПИ во II группе исследования через 6 месяцев после оперативного лечения значимо не менялся, составляя в среднем 0,78±0,09 ($p > 0,05$).

Исходное среднее значение балльной оценки периферического сопротивления русла «оттока» по R.V. Rutherford представлено в таблице 6.

Оценка состояния русла «оттока» по R.V. Rutherford, $M \pm m$

Исследуемая группа	I группа n=44	II группа n=40
Средний балл по R.Rutherford	3,8±0,42	3,55±0,37

Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении между группами.

По состоянию путей «оттока» у пациентов I и II групп исследования значимых различий не выявлено ($p > 0,05$).

Локализация тромботических осложнений зоны реконструкции в I группе исследования в зависимости от вида оперативного вмешательства представлена на диаграмме (рис. 7).

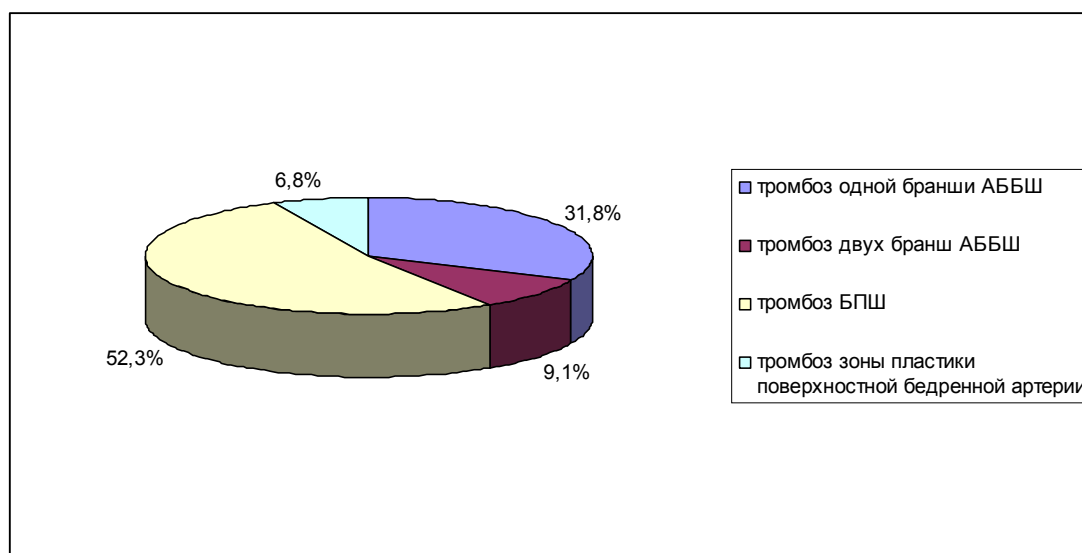


Рис. 7. Распределение оперативных вмешательств по локализации тромбоза зоны реконструкции у пациентов I группы (n=44).

Как видно из диаграммы, наибольший процент тромботических осложнений наблюдался у пациентов I группы после бедренно-подколенного шунтирования (23 пациента (52,3%)). Тромбоз зоны реконструкции после АББШ отмечался у 18 пациентов (42,9%).

В I группе исследования клинически тромбоз зоны реконструкции проявлялся резким прогрессированием степени хронической ишемии нижних конечностей по сравнению с исходным уровнем (в первые 2 месяца после

операции). Из 44 пациентов II Б степень хронической артериальной недостаточности по классификации Фонтейна – А.В. Покровского наблюдалась у 29 больных (65,9%), III степень - у 13 пациентов (29,6%), а IV степень хронической ишемии нижних конечностей возникла у 2 больных (4,5%).

В I группе исследования при развитии тромбоза зоны реконструкции в 95,45% случаев (42 пациента) потребовалось выполнение повторных оперативных вмешательств реваскуляризации нижних конечностей. Характер повторных реконструктивных операций представлен в таблице 7.

Таблица 7

Характер повторных реконструктивных операций (n=42)

Вид повторной реконструктивной операции	n	%
Тромбэктомия из одной бранши АББШ	14	33,3
Тромбэктомия из двух бранш АББШ	4	9,5
Тромбэктомия из БПШ	18	42,9
Повторное БПШ ниже щели коленного сустава	4	9,5
Тромбэктомия из зоны пластики ПБА	2	4,8
Всего	42	100

Один пациент с тромбозом БПШ со II Б степенью хронической ишемии нижней конечности от предложенного повторного реконструктивного вмешательства отказался. 1 пациенту после открытой пластики ПБА с диагностированным тромбозом зоны пластики выполнена ампутация нижней

конечности по жизненным показаниям в связи с развившимися явлениями некроза мышц голени.

Таким образом, установлено, что I группа исследования с тромбозом зоны реконструкции достоверно не отличается от II группы (без тромбоза зоны реконструкции) по степени хронической артериальной недостаточности в дооперационном периоде, состоянию артерий «оттока». Частота ранних тромботических окклюзий у больных, перенесших реконструктивную операцию на аорто-подвздошном сегменте значимо ниже (на 17,6%), чем у больных, перенесших реконструктивную операцию при облитерирующем атеросклерозе бедренно-подколенного сегмента (42,9% и 60,5% соответственно) ($p < 0,05$).

3.2 Особенности показателей системы гемостаза, липидного профиля и маркеров наследственных тромбофилий в исследуемых группах пациентов

Изучены особенности лабораторных показателей, характеризующих липидный обмен, систему гемостаза и маркеры наследственных тромбофилий в I, II и III группах исследования (пациенты с ранним тромбозом после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей, пациенты без развития тромбоза после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей и контрольная группа).

Распределение всех исследуемых клинико-лабораторных показателей отличалось от нормального (уровень значимости для критерия Шапиро-Уилка $p < 0,05$). В связи с этим, для описания данных количественных показателей применяли медиану (M_e) и интерквартильный размах (Q25-Q75) [69] (таблица 8).

Таблица 8

Параметры распределения лабораторных показателей у индивидуумов исследуемых групп (n=119) (начало)

Лабораторные показатели	Q25	M_e	Q75	W	p
Антитромбин III, %	91,2	102,9	114,0	0,97	0,02
Гомоцистеин, мкмоль/л	10,4	12,4	15,8	0,93	0,00001
Д-димер, мкг/мл	0,39	1,06	2,1	0,84	0,00000

Параметры распределения лабораторных показателей у индивидуумов исследуемых групп (n=119) (окончание).

Лабораторные показатели	Q25	Me	Q75	W	p
Фибриноген, г/л	3,6	4,0	5,0	0,87	0,00000
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л	289	256	323	0,97	0,007
ПТИ, %	94,0	100,0	100,0	0,51	0,00000
АЧТВ, сек	31	32	34	0,64	0,00000
ТВ, сек	15,0	16,0	16,0	0,90	0,00000
МНО	1,00	1,00	1,08	0,33	0,00000
Холестерин, ммоль/л	3,6	4,3	5,2	0,97	0,015
Триглицериды, ммоль/л	1,2	1,5	1,9	0,93	0,00001
ЛПВП, ммоль/л	0,91	1,10	1,28	0,97	0,01
ЛПНП, ммоль/л	1,5	2,3	3,4	0,97	0,004
ЛПОНП, ммоль/л	0,5	0,7	1,1	0,79	0,00000

Примечание: указаны медиана (M_e), интерквартильный размах - 25-й и 75-й процентиля (Q25-Q75), критерий Шапиро-Уилка (W) и уровень его значимости (p)

Распределение лабораторных показателей в I, II и III группах исследования представлены в таблице 9.

Таблица 9

Распределение лабораторных показателей в исследуемых группах индивидов M_e (Q-25 – Q75) (начало)

Лабораторные показатели	I группа исследования (n=44)	II группа исследования (n=40)	III группа исследования (n=35)	Значение P		
				I-II	I-III	II-III
Антитромбин III, %	102,5 (97,25-114,6)	111 (100,3-114,7)	91,2 (82-110)	0,22	0,003	< 0,001
Гомоцистеин, мкмоль/л	15,9 (12,25-17,75)	12,3 (10,45-14,95)	10,3 (8,8-11,9)	0,001	< 0,001	0,002

Распределение лабораторных показателей в исследуемых группах индивидов М_с
(Q-25 – Q75) (окончание)

Лабораторные показатели	I группа исследования (n=44)	II группа исследования (n=40)	III группа исследования (n=35)	Значение P		
				I-II	I-III	II-III
Д-димер, мкг/мл	2,0 (1,04-2,98)	1,26 (0,95-2,07)	0,33 (0,23-0,4)	0,08	< 0,001	< 0,001
Тромбоциты, x10 ⁹ /л	302,5 (282,5-330)	302 (280-353,5)	234 (195-271)	0,18	< 0,001	< 0,001
Фибриноген, г/л	4,7 (3,75-5,2)	3,7 (3,56-4,6)	4,0 (3,3-5,2)	0,007	0,007	0,17
ПТИ, %	100 (96-100)	100 (94-100)	100 (94-100)	0,6	0,28	0,66
АЧТВ, сек	32 (30-34)	33 (31,5-34)	32 (30-34)	0,08	0,13	0,02
ТВ, сек	15 (15-16)	16 (15-16)	16 (15-16)	0,04	0,4	0,77
Холестерин, ммоль/л	4,4 (3,6-5,4)	4,4 (3,7-5,5)	4,3 (3,6-4,9)	0,59	0,34	0,25
Триглицериды, ммоль/л	1,67 (1,27-2,21)	1,43 (1,16-1,96)	1,43 (1,2-1,68)	0,006	< 0,001	0,7
ЛПНП, ммоль/л	2,7 (2,25-3,75)	2,95 (2,1-3,7)	2,4 (1,5-3,3)	0,27	0,08	0,06
ЛПОНП, ммоль/л	0,8 (0,6-1,25)	0,7 (0,5-0,95)	0,7 (0,5-0,9)	0,09	0,03	0,26
ЛПВП, ммоль/л	1,08 (0,91-1,29)	1,03 (0,93-1,21)	1,13 (0,9-1,3)	0,77	0,008	0,41

Примечание: указаны медиана (M_с), интерквартильный размах - 25-й и 75-й процентиля (Q25-Q75)

Установлено, что уровень антитромбина III в крови пациентов I группы исследования ($M_e=102,5\%$; $Q25=97,25\%$; $Q75=114,6\%$) и II группы исследования ($M_e=111\%$; $Q25=100,3\%$; $Q75=114,7\%$) достоверно выше, чем в III контрольной группе ($M_e = 91,2\%$; $Q25=82\%$; $Q75=110\%$, $p=0,003$ и $p=0,0004$, соответственно) (рис.8).

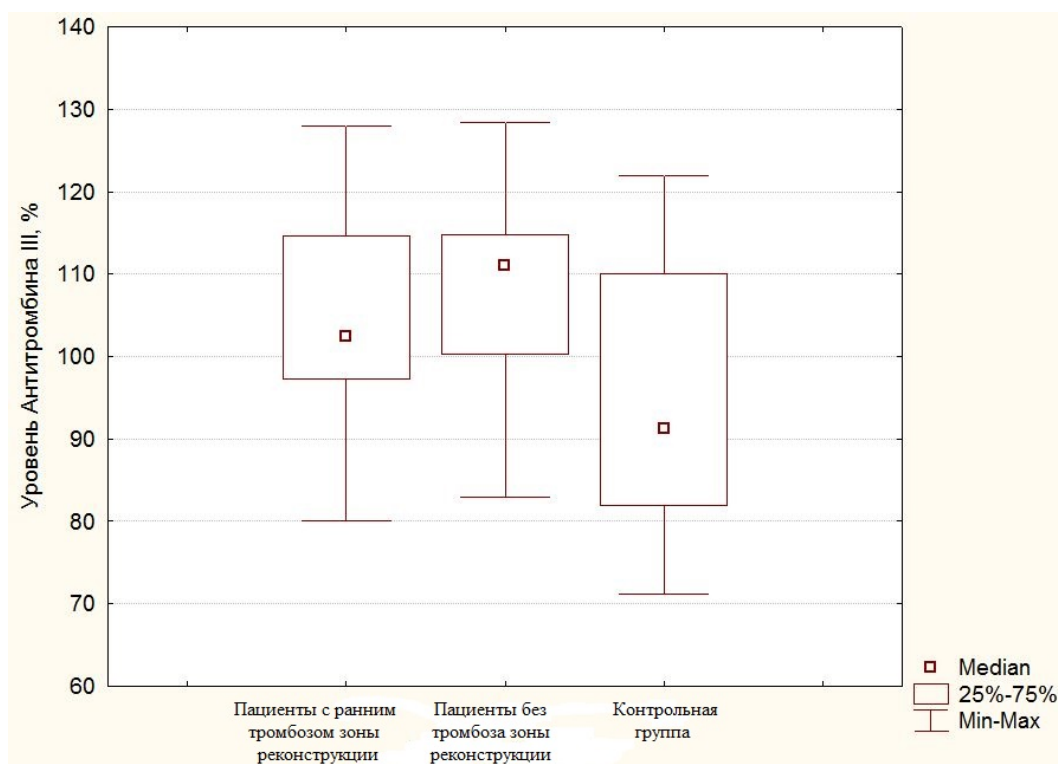


Рис.8. Уровень антитромбина III в крови пациентов групп исследования

Следует отметить статистически значимые различия в уровне гомоцистеина в крови между тремя изучаемыми группами. Среди пациентов I группы исследования ($M_e=15,9$ мкмоль/л; $Q25=12,25$ мкмоль/л; $Q75=17,75$ мкмоль/л) и II группы исследования ($M_e=12,3$ мкмоль/л; $Q25=10,45$ мкмоль/л; $Q75=14,95$ мкмоль/л) уровень гомоцистеина в крови был выше, чем в III контрольной группе ($M_e=10,3$ мкмоль/л; $Q25=8,8$ мкмоль/л; $Q75=11,9$ мкмоль/л, $p < 0,001$ и $p=0,002$, соответственно), при этом во I группе исследования этот показатель достоверно выше, чем в II группе исследования ($p=0,001$) (рис. 9).

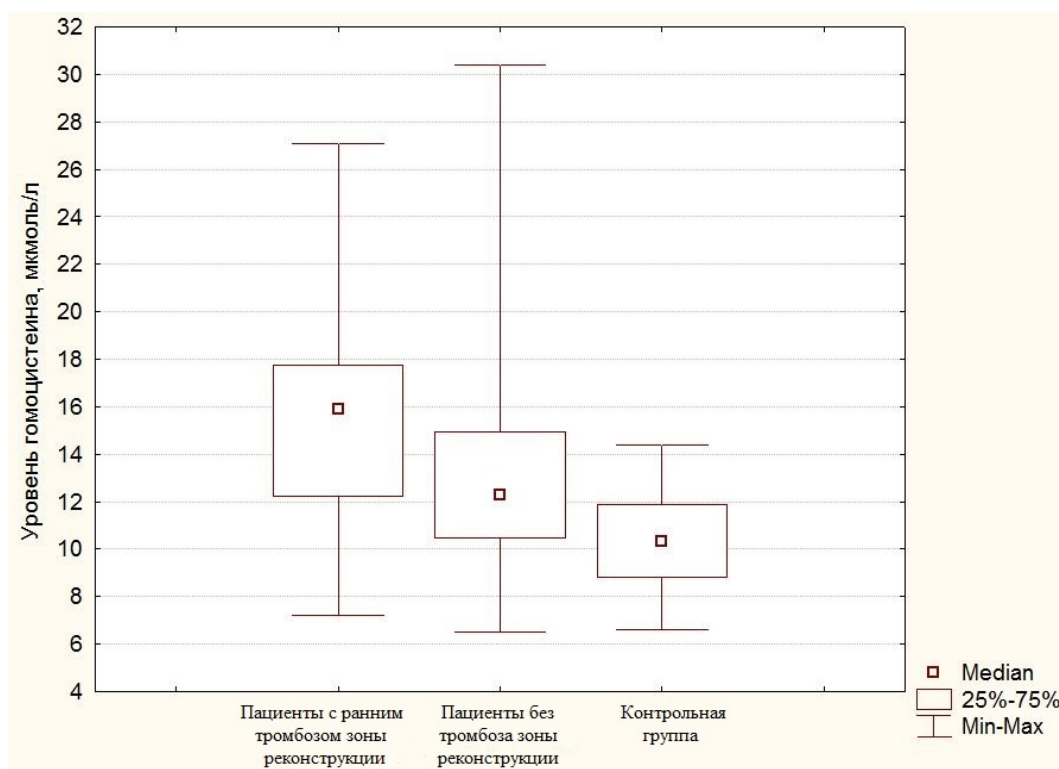


Рис. 9. Уровень гомоцистеина в крови пациентов групп исследования

Уровень Д-димера в крови у пациентов I группы исследований ($M_e=2,0$ мкг/мл; $Q_{25}=1,04$ мкг/мл; $Q_{75}=2,98$ мкг/мл) и II группы исследований ($M_e=1,26$ мкг/мл; $Q_{25}=0,95$ мкг/мл; $Q_{75}=2,07$ мкг/мл) достоверно выше, чем в III контрольной группе ($M_e=0,33$ мкг/мл; $Q_{25}=0,23$ мкг/мл; $Q_{75}=0,4$ мкг/мл, $p<0,001$), причем у пациентов I группы исследования уровень Д-димера максимальный в сравнении с двумя другими группами исследования (рис. 10).

Установлено, что уровень тромбоцитов в крови достоверно выше в I группе исследования ($M_e=302,5 \times 10^9/\text{л}$; $Q_{25}=282,5 \times 10^9/\text{л}$; $Q_{75}=330 \times 10^9/\text{л}$) и II группе исследования ($M_e=302 \times 10^9/\text{л}$; $Q_{25}=280 \times 10^9/\text{л}$; $Q_{75}=353,5 \times 10^9/\text{л}$), чем в III контрольной группе ($M_e=234 \times 10^9/\text{л}$; $Q_{25}=195 \times 10^9/\text{л}$; $Q_{75}=271 \times 10^9/\text{л}$, $p<0,001$) (рис.11).

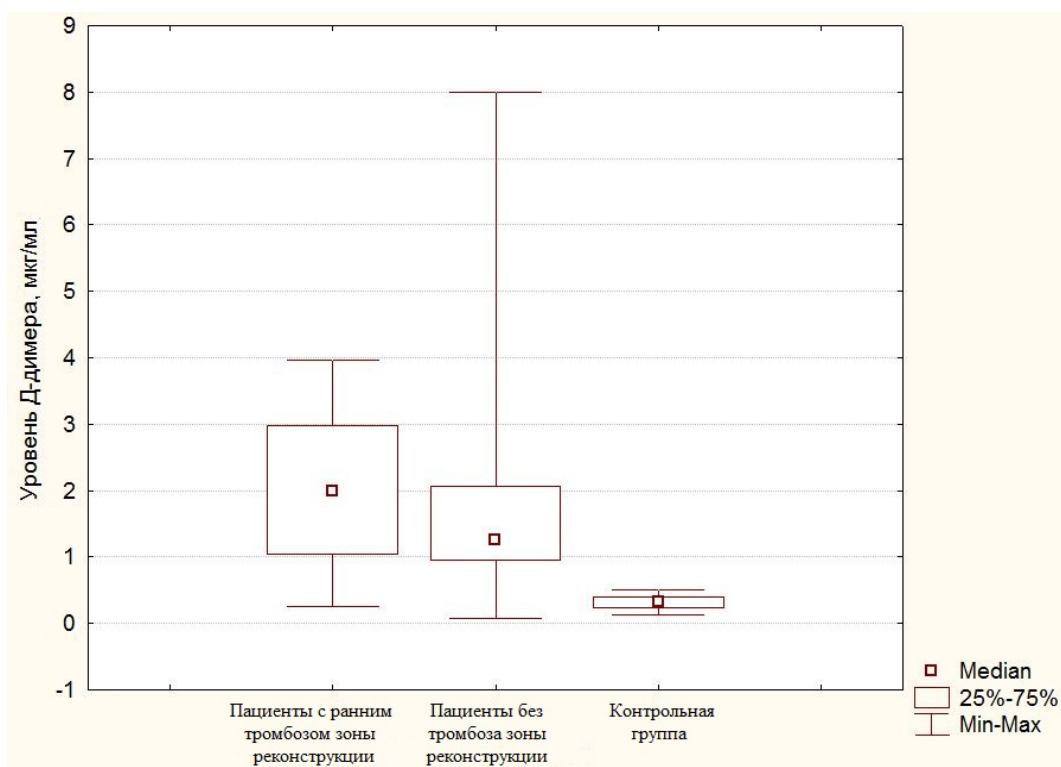


Рис.10. Уровень Д-димера в крови пациентов групп исследования

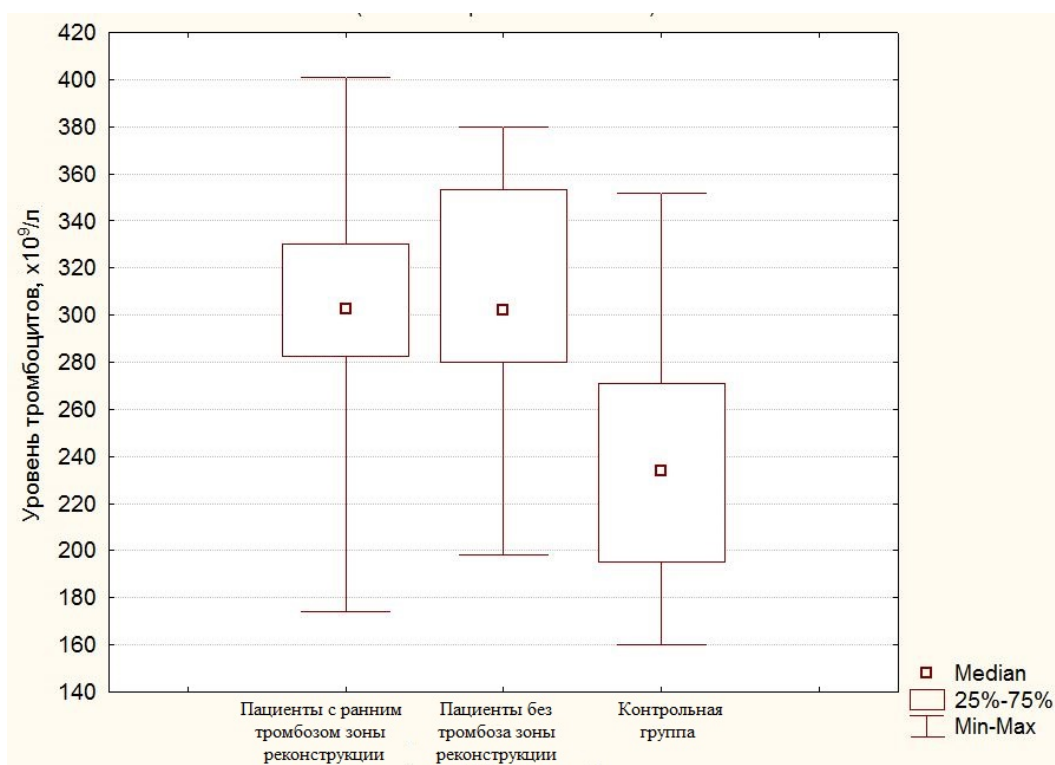


Рис. 11. Количество тромбоцитов в крови пациентов групп исследования

Выявлено статистически значимое увеличение уровня фибриногена в крови пациентов I группы исследования ($M_e=4,7$ г/л; $Q_{25}=3,75$ г/л; $Q_{75}=5,2$ г/л) по сравнению с пациентами II группы исследования ($M_e=3,7$ г/л; $Q_{25}=3,56$ г/л;

Q75=4,6 г/л, $p=0,007$) и пациентами III контрольной группы ($M_e = 4,0$ г/л; Q25=3,3 г/л; Q75=5,2 г/л, $p=0,007$) (рис.12).

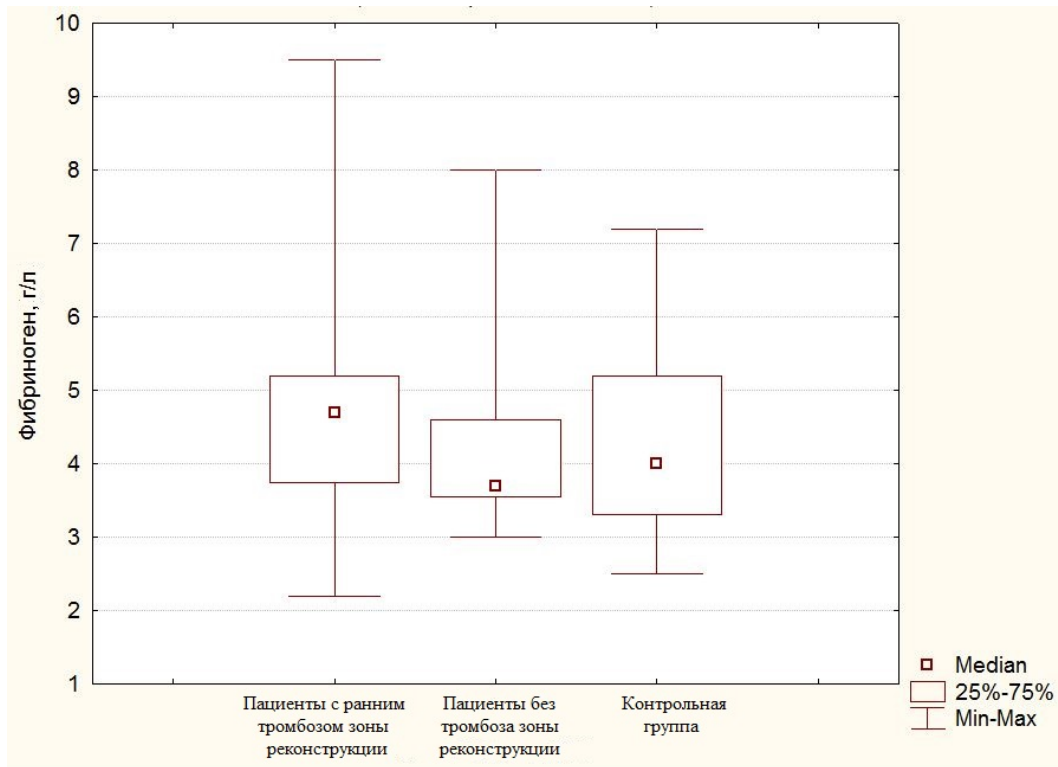


Рис.12. Уровень фибриногена в крови пациентов групп исследования

Установлено достоверное удлинение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) у пациентов II группы исследований ($M_e=33$ сек; Q25=31,5 сек; Q75=34 сек) по сравнению с III контрольной группой ($M_e=32$ сек; Q25=30 сек; Q75=34 сек, $p=0,02$) (рис.13).

Также установлено значимое удлинение тромбинового времени (ТВ) у пациентов II группы исследования ($M_e=16$ сек; Q25=15 сек; Q75=16 сек) по сравнению с пациентами I группы исследования ($M_e=15$ сек; Q25=15 сек; Q75=16 сек, $p=0,04$) (рис.14).

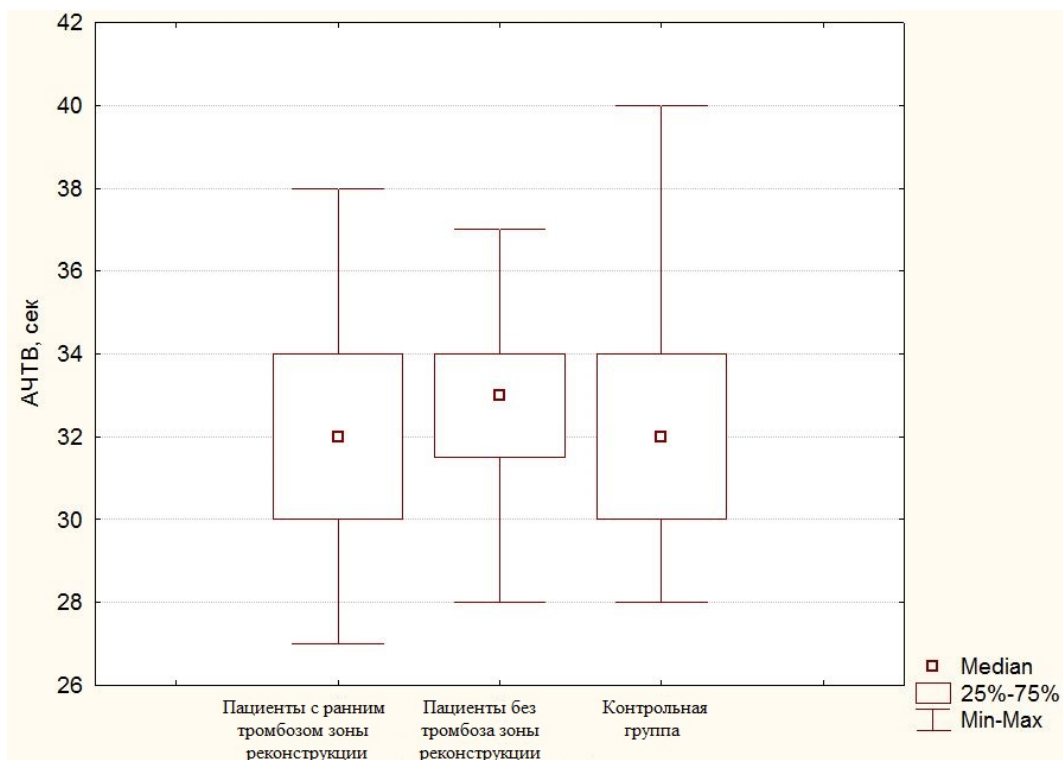


Рис. 13. Показатель АЧТВ у пациентов групп исследования

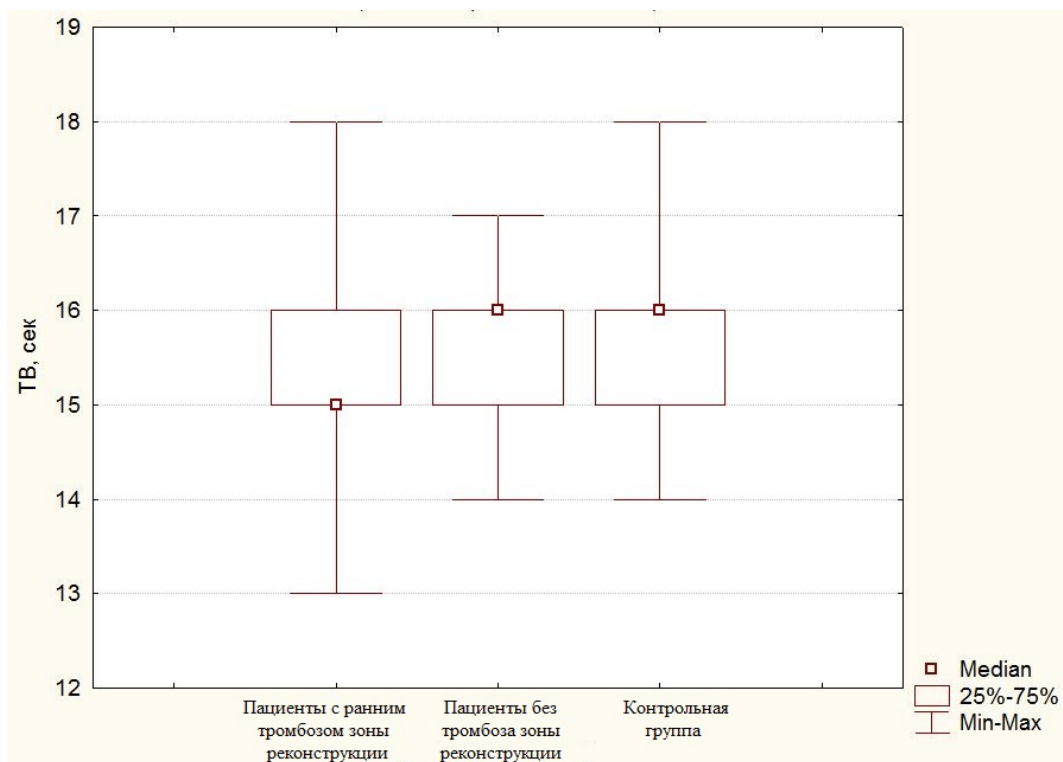


Рис. 14. Показатель ТВ у пациентов групп исследования

Наблюдается достоверное увеличение уровня триглицеридов в крови пациентов I группы исследования ($M_e=1,67$ ммоль/л; $Q_{25}=1,27$ ммоль/л; $Q_{75}=2,21$

ммоль/л) как по сравнению с пациентами II группы исследования ($M_e=1,43$ ммоль/л; $Q_{25}=1,16$ ммоль/л; $Q_{75}=1,96$ ммоль/л, $p=0,006$), так и с пациентами III контрольной группы ($M_e=1,43$ ммоль/л; $Q_{25}=1,2$ ммоль/л; $Q_{75}=1,68$ ммоль/л, $p < 0,001$) (рис. 15).

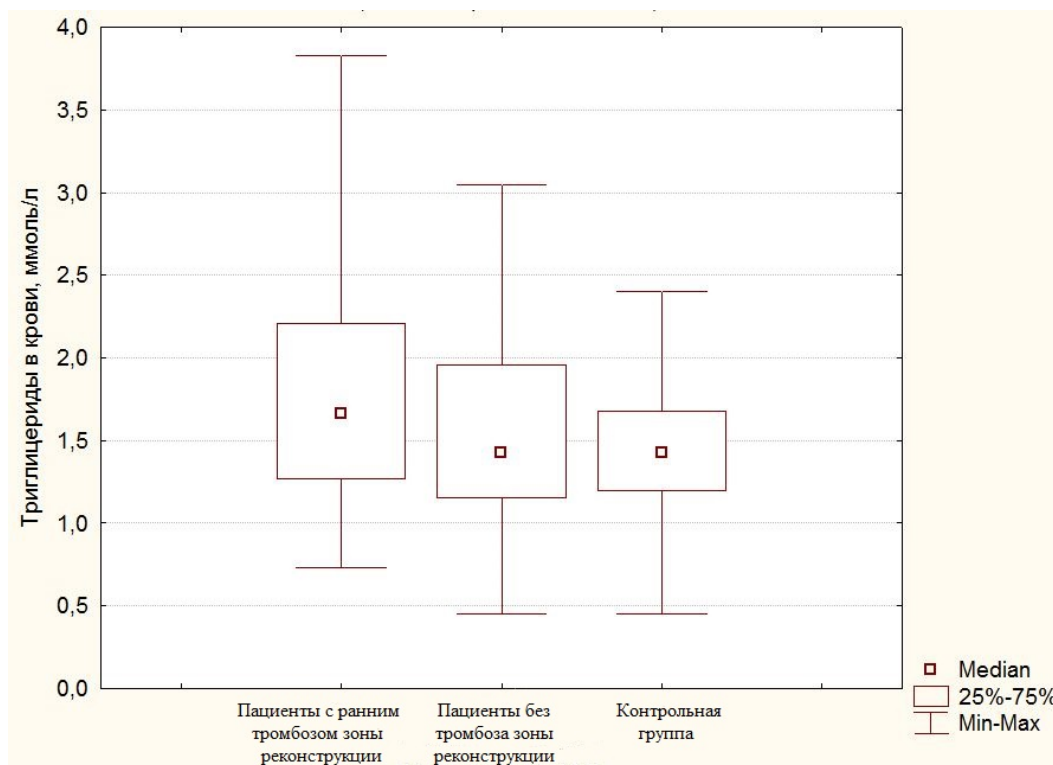


Рис. 15. Уровень триглицеридов в крови пациентов групп исследования

Установлено статистически достоверное увеличение уровня ЛПОНП в крови пациентов I группы исследования ($M_e=0,8$ ммоль/л; $Q_{25}=0,6$ ммоль/л; $Q_{75}=1,25$ ммоль/л) по сравнению с пациентами III контрольной группы ($M_e=0,7$ ммоль/л; $Q_{25}=0,5$ ммоль/л; $Q_{75}=0,9$ ммоль/л, $p=0,03$) (рис. 16).

Наблюдается достоверное увеличение уровня ЛПВП в крови пациентов III контрольной группы ($M_e=1,13$ ммоль/л; $Q_{25}=0,9$ ммоль/л; $Q_{75}=1,3$ ммоль/л) по сравнению с I группой исследования ($M_e=1,08$ ммоль/л; $Q_{25}=0,91$ ммоль/л; $Q_{75}=1,29$ ммоль/л, $p=0,008$) (рис. 17).

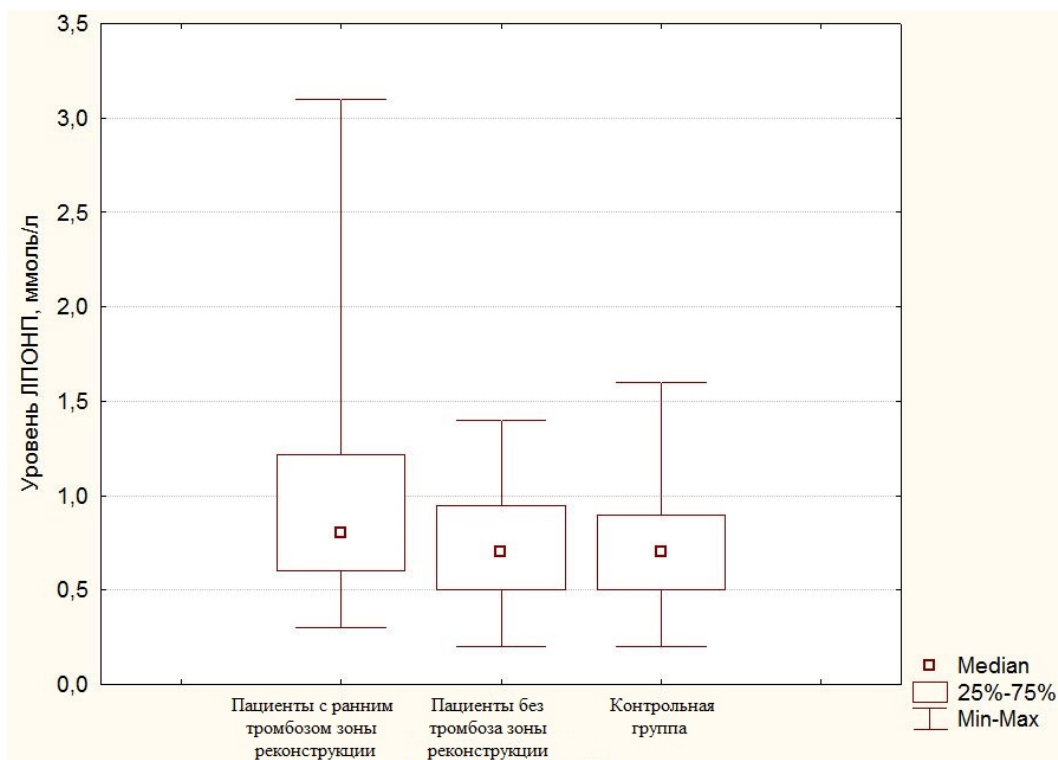


Рис. 16. Уровень ЛПО в крови пациентов групп исследования

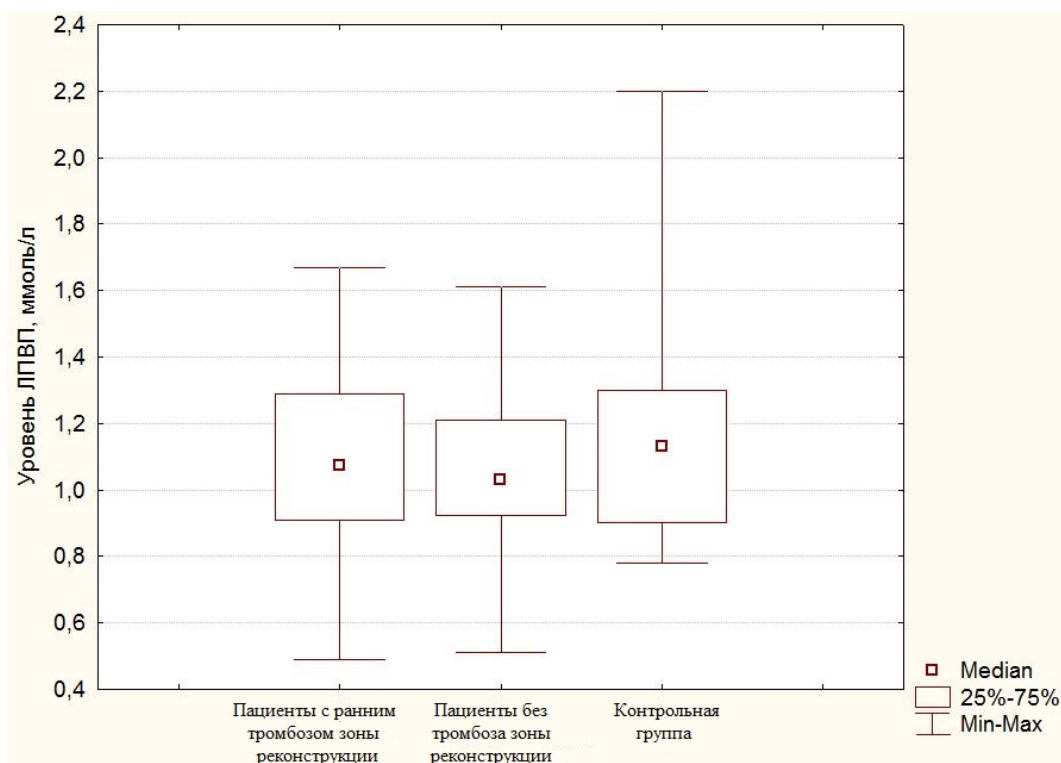


Рис. 17. Уровень ЛПВП в крови пациентов групп исследования

Резюмируя полученные результаты, можно сделать вывод о наличии статистически достоверных отличий по лабораторным показателям между изучаемыми группами пациентов. Выявлено, что пациенты I группы

исследования отличаются от пациентов III контрольной группы исследования повышенным уровнем антитромбина III, гомоцистеина, Д-димера, тромбоцитов, фибриногена, триглицеридов, ЛПОНП в крови и сниженным уровнем ЛПВП в крови. У больных II группы исследования (без тромбоза зоны реконструкции) по сравнению с III контрольной группой исследования отмечалось значимое увеличение уровня антитромбина III, гомоцистеина, Д-димера, тромбоцитов в крови и удлинение АЧТВ. Установлено, что пациенты I группы исследования статистически достоверно отличается от пациентов II группы исследования увеличенным уровнем гомоцистеина, фибриногена, триглицеридов в крови и замедлением тромбинового времени.

3.3 Сравнительный анализ распределения генетических маркеров в исследуемых группах

Популяционно – генетический анализ распределения изучаемых полиморфных маркеров генов наследственных тромбофилий проводили на выборке из 119 человек. Результаты генотипирования данных индивидуумов по локусам 1691G/A FV, 20210G/A FII, 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB представлены в таблицах 10 и 11.

Исследование распределения генотипов изучаемых полиморфных маркеров наследственных тромбофилий показало, что для всех рассмотренных генетических полиморфизмов, эмпирическое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Уровень аллельного разнообразия по изученным локусам варьировал от $H_0=0,02$ (для локуса 1691G/A FV) до $H_0=0,46$ (для локуса 20210G/A FII) среди больных I группы исследования (с ранней тромботической окклюзией зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей) (табл. 10). Среди больных II группы исследования, перенесших реконструктивные операции без развития ранней тромботической окклюзии в зоне реконструкции этот показатель составил $H_0=0,48$ (для локусов 677 C/T

МТНFR и 455 G/A FGB), а в контрольной группе он был равен $H_0=0,34$ (для локусов 677 C/T МТНFR и 455 G/A FGB).

Таблица 10

Распределение генотипов, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, индекса фиксации полиморфных маркеров генов-кандидатов в группах исследования (начало)

Локусы, показатели	I группа исследования	II группа исследования	III группа исследования
1691G/A FV			
ΣN	44	40	35
N_0			
1691 GG	43	40	35
1691 GA	1	0	0
1691 AA	0	0	0
N_E			
1691GG	43,01	-	-
1691GA	0,99	-	-
1691AA	0,01	-	-
$\chi^2_{(HWE)}$	0,01	-	-
p	>0,05	-	-
H_0	0,02	-	-
H_E	0,02	-	-
D	+0,01	-	-
t	0,01	-	-
677 C/T МТНFR			
ΣN	44	40	35
N_0			
677 TT	4	3	1
677 CT	19	19	12
677 CC	21	18	22
N_E			
677 TT	4,14	3,91	1,40
677 CT	18,72	17,19	11,20
677 CC	21,14	18,91	22,40
$\chi^2_{(HWE)}$	0,01	0,44	0,18
p	>0,05	>0,05	>0,05
H_0	0,43	0,48	0,34
H_E	0,42	0,43	0,32
D	+0,02	+0,1	+0,07
t	0,08	0,51	0,23

Примечание: ΣN – объем выборки; N_0 – наблюдаемое распределение фенотипов; N_E – ожидаемое распределение фенотипов; $\chi^2_{(HWE)}$ – показатель соответствия наблюдаемого распределения ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга; p – достигнутый уровень значимости для $\chi^2_{(HWE)}$; H_0 – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; D – индекс фиксации Райта; t – критерий Стьюдента, характеризующий индекс фиксации

Распределение генотипов, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, индекса фиксации полиморфных маркеров генов-кандидатов в группах исследования (окончание)

Локусы, показатели	I группа исследования	II группа исследования	III группа исследования
20210 G/A FII			
ΣN	44	40	35
N_0			
20210 GG	42	40	35
20210 GA	2	0	0
20210 AA	0	0	0
N_E			
20210 GG	42,02	-	-
20210 GA	1,95	-	-
20210 AA	0,02	-	-
$\chi^2_{(HWE)}$	0,02	-	-
p	>0,05	-	-
H_0	0,46	-	-
H_E	0,44	-	-
D	+0,01	-	-
t	0,02	-	-
455 G/A FGB			
ΣN	44	40	35
N_0			
455 GG	24	19	22
455 GA	18	19	12
455 AA	2	2	1
N_E			
455 GG	24,75	20,31	22,40
455 GA	16,50	16,39	11,20
455 AA	2,75	3,31	1,40
$\chi^2_{(HWE)}$	0,36	1,02	0,18
p	>0,05	>0,05	>0,05
H_0	0,41	0,48	0,34
H_E	0,38	0,41	0,32
D	+0,09	+0,16	+0,07
t	0,39	0,73	0,23

Примечание: ΣN – объем выборки; N_0 – наблюдаемое распределение фенотипов; N_E – ожидаемое распределение фенотипов; $\chi^2_{(HWE)}$ – показатель соответствия наблюдаемого распределения ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга; p – достигнутый уровень значимости для $\chi^2_{(HWE)}$; H_0 – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; D – индекс фиксации Райта; t – критерий Стьюдента, характеризующий индекс фиксации

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов
1691G/A FV, 677 C/T MTHFR, 20210 G/A FII, 455 G/A FGB в группах

исследования

Полиморфизм	Аллели, генотипы	Пациенты с тромбозом зоны реконструкции (n=44)		Пациенты без тромбоза зоны реконструкции (n=40)		Контрольная группа (n=35)		OR (95% CI), χ^2 , p	OR (95% CI), χ^2 , p
		n _i	%	n _i	%	n _i	%		
1691G/A FV	1691G	87	98,86	80	100	70	100	0,001 (0,55-21,6) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$	- $\chi^2 = 0,01; p=1,01$
	1691A	1	1,14	0	0	0	0	Infi (0,053-0,054) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$	- $\chi^2 = 0,01; p=1,01$
	1691 GG	43	97,73	40	100	35	100	0,01 (0,5-21,89) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$	- $\chi^2 = 0,01; p=1,01$
	1691 GA	1	2,27	0	0	0	0	Infi (0,046-0,047) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$	- $\chi^2 = 0,01; p=1,01$
	1691 AA	0	0	0	-	0	0	-	-
677 C/T MTHFR	677 T	27	30,68	25	31,25	14	20,0	1,77(0,79-3,97) $\chi^2 = 1,79; p=1,18$	1,82 (0,81-4,14) $\chi^2 = 1,91; p=0,17$
	677 C	61	69,32	55	68,75	56	80,0	0,56(0,25-1,26) $\chi^2 = 1,79; p=1,18$	0,55 (0,24-1,24) $\chi^2 = 1,91; p=0,17$
	677 TT	4	9,10	3	7,5	1	2,86	3,40(0,33-82,41) $\chi^2 = 0,44; p=0,5$	2,76 (0,23-71,22) $\chi^2 = 0,14; p=0,71$
	677 CT	19	43,18	19	47,5	12	34,28	1,45(0,53-4,05) $\chi^2 = 0,33; p=0,52$	1,73 (0,62-4,92) $\chi^2 = 0,85; p=0,36$
	677 CC	21	47,72	18	45,0	22	62,86	0,54 (0,19-1,47) $\chi^2 = 1,24; p=0,26$	0,48 (1,17-1,35) $\chi^2 = 1,73; p=0,19$
20210 G/A FII	20210 G	86	97,73	80	100	70	100	0,001 (0,55-21,6) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$	- $\chi^2 = 0,01; p=1,01$
	20210 A	2	2,27	0	0	0	0	Infi (0,053-0,054) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$	- $\chi^2 = 0,01; p=1,01$
	20210 GG	42	95,45	40	100	35	100	0,01 (0,55-5,23) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$	- $\chi^2 = 0,01; p=1,01$
	20210 GA	2	4,55	0	0	0	0	Infi (0,046-0,047) $\chi^2 = 0,31; p=0,58$	- $\chi^2 = 0,01; p=1,01$
	20210 AA	0	-	0	-	0	-	-	-
455 G/A FGB	455 G	66	75,0	23	73,08	56	80,0	0,75 (0,33-1,71) $\chi^2 = 0,31; p=0,58$	0,62 (0,27-1,41) $\chi^2 = 1,10; p=0,29$
	455 A	22	25,0	57	26,92	14	20,0	1,33 (0,58-3,03) $\chi^2 = 0,31; p=0,58$	1,62 (0,71-3,70) $\chi^2 = 1,10; p=0,29$
	455 GG	24	54,55	19	47,50	22	62,86	1,71 (0,26-1,93) $\chi^2 = 0,27; p=0,61$	0,54 (0,19-1,49) $\chi^2 = 1,21; p=0,27$
	455 GA	18	40,90	19	47,50	12	34,28	1,32 (0,48-3,69) $\chi^2 = 0,13; p=0,71$	1,73 (0,62-4,91) $\chi^2 = 0,85; p=0,36$
	455 AA	2	4,55	2	5,0	1	2,86	1,61 (0,11-46,69) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$	1,73 (0,12-50,25) $\chi^2 = 0,01; p=1,01$

При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов наследственных тромбофилий 1691G/A FV, 20210G/A FII, 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB во всех трех группах исследования статистически достоверных различий выявлено не было (таблица 11).

Далее мы проанализировали роль комбинаций генетических вариантов исследуемых локусов наследственных тромбофилий в формировании ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции после реконструктивной операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей. Исследование проведено с помощью программного обеспечения APSampler [<http://sources.redhat.com/cygwin/>], использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику [97].

Следует отметить, что в формировании значимой комбинации генетических вариантов, отличающих I группу исследования от III контрольной группы исследования участвуют два рассмотренных генетических полиморфизма: 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB.

Установлена ассоциация сочетания генетических вариантов – аллеля 677 T MTHFR и аллеля 455 A FGB с формированием ранней тромботической окклюзии в зоне реконструкции. У 27,27% больных I группы исследования данное сочетание генетических вариантов, тогда как в III контрольной группе исследования оно выявлено у 8,57% ($p=0,03$), а среди больных, II группы исследования данное сочетание генетических вариантов выявлено у 12,50% (рис.18). Данная комбинация полиморфных вариантов генов наследственных тромбофилий является фактором риска развития ранней тромботической окклюзии у больных, перенесших реконструктивную операцию на брюшной аорте и артериях нижних конечностей (OR=4,0; 95% CI 1,03-15,53).

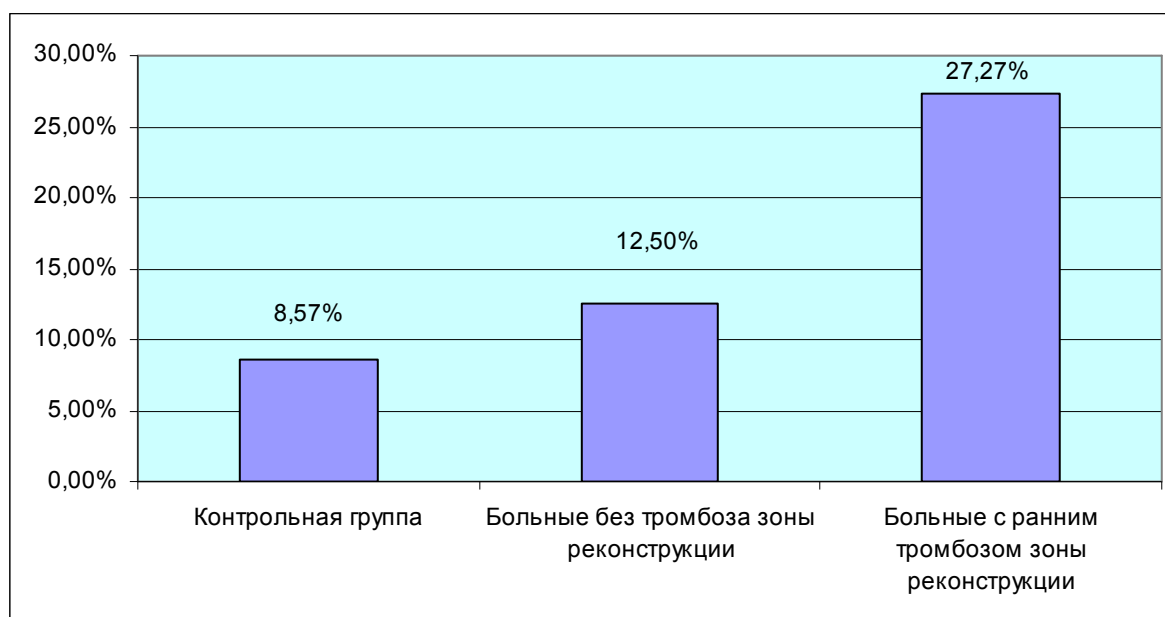


Рис. 18. Частота сочетания генетических вариант 677 Т МТНFR и 455 А FGB среди исследуемых групп.

Таким образом, резюмируя полученные в данном разделе работы результаты, выявлены статистически значимые комбинации полиморфных вариантов наследственных тромбофилий (677 С/Т МТНFR, 455 G/A FGB) в формировании ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции при операциях на брюшной аорте и артериях нижних конечностей. Сочетание генетических вариантов 677 Т МТНFR, 455 А FGB значительно повышает (OR=4,0) риск развития ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции при операциях на брюшной аорте и артериях нижних конечностей.

3.4 Анализ ассоциаций генетических полиморфизмов с лабораторными показателями

При анализе ассоциаций генетических полиморфизмов 1691G/A FV, 20210G/A FII, 677 С/Т МТНFR, 455 G/A FGB с лабораторными показателями в исследуемой выборке индивидов (n=119) выявлены значимые связи генетических вариантов наследственных тромбофилий с показателями коагулограммы (ТВ, Д-димер), уровнем гомоцистеина, показателями липидного профиля (ЛПВП, ЛПОНП, триглицериды).

Установлена ассоциация молекулярно-генетического маркера 20210 G/A FII с уровнем гомоцистеина: у пациентов с генотипом 20210 GA FII ($M_e=18,7$

мкмоль/л; Q25=17,5 мкмоль/л; Q75=19,9 мкмоль/л) наблюдается статистически достоверный более высокий уровень гомоцистеина в крови по сравнению с пациентами с генотипом 20210 GG FII ($M_e=12,1$ мкмоль/л; Q25=10,4 мкмоль/л; Q75=15,4 мкмоль/л, $p=0,05$) (рис. 19).

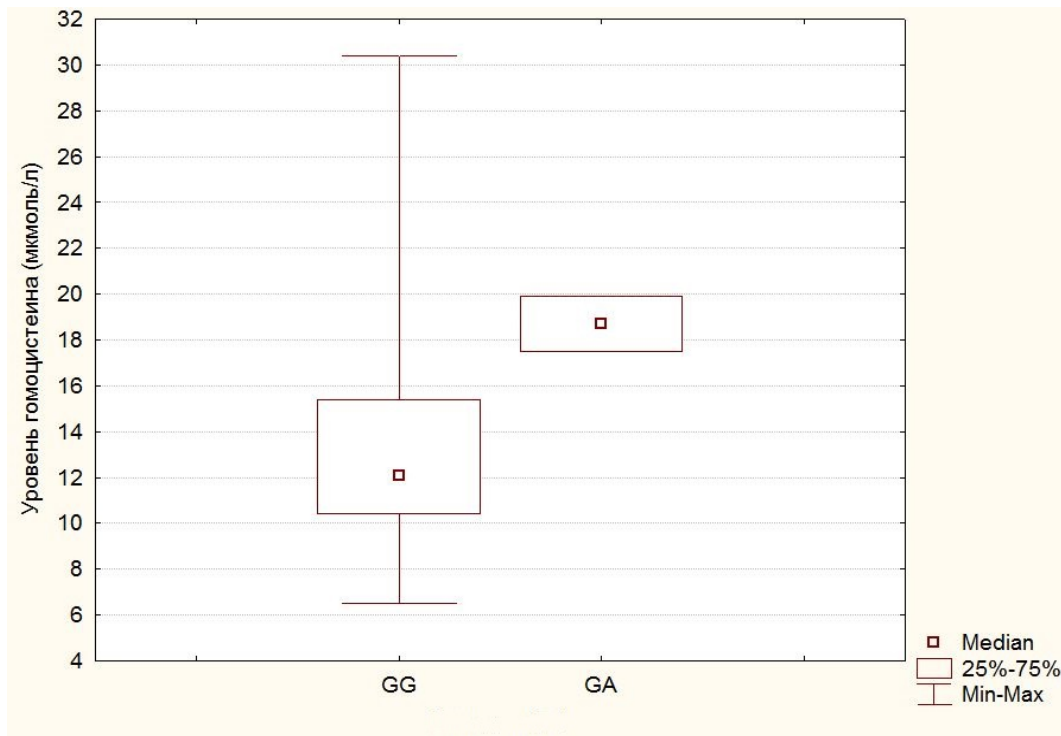


Рис. 19. Ассоциации генотипов локуса 20210 G/A FII с уровнем гомоцистеина в крови

Выявлено, что пациенты с генотипом 20210 GA FII имеют более высокий показатель Д-димера в венозной крови ($M_e=3,04$ мкг/мл; Q25=2,21 мкг/мл; Q75=3,86 мкг/мл) по сравнению с пациентами, имеющими генотип 20210 GG FII ($M_e=1,05$ мкг/мл; Q25=0,39 мкг/мл; Q-75 – 3,01 мкг/мл, $p=0,05$) (рис.20).

Также выявлена связь генетического полиморфизма 455 G/A FGB с уровнем Д-димера в венозной крови. Так у пациентов с генотипами 455 GA FGB и 455 AA FGB уровень Д-димера ($M_e=1,17$ мкг/мл; Q25=0,44 мкг/мл; Q75=2,21 мкг/мл) более высокий по сравнению с пациентами, имеющими генотип 455 GG FGB ($M_e=0,98$ мкг/мл; Q25=0,35 мкг/мл; Q75=2,04 мкг/мл, $p=0,03$) (рис.21).

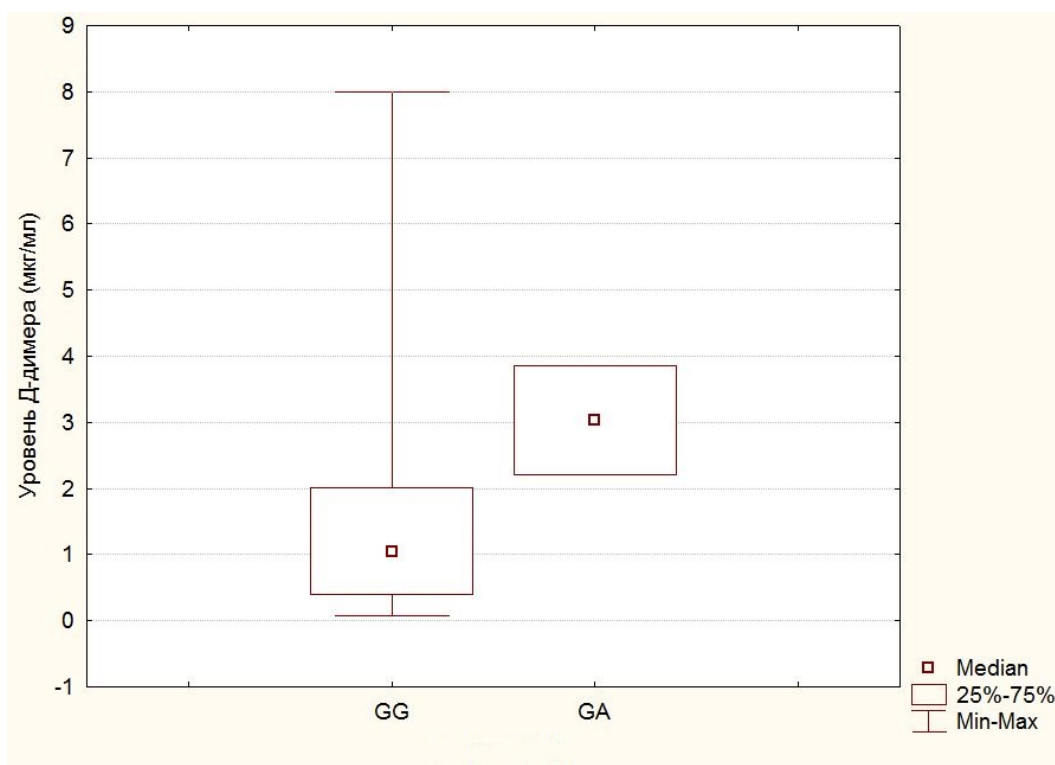


Рис. 20. Уровень Д-димера в крови в зависимости от генетических вариантов локуса 20210 G/A FII.

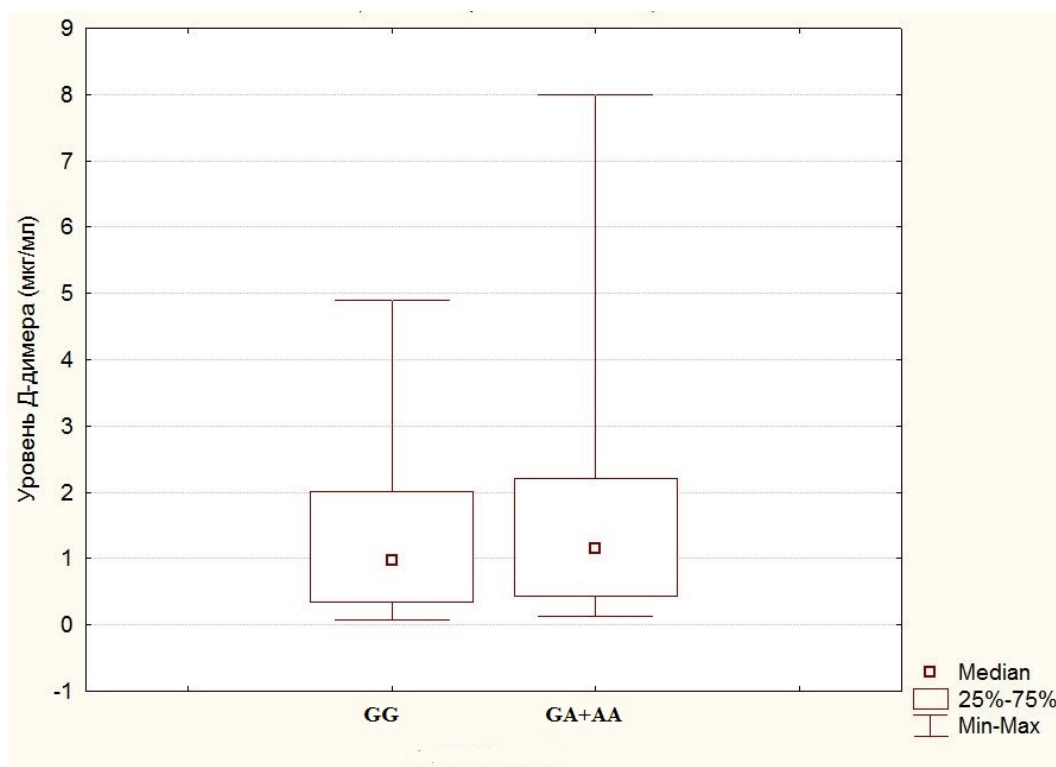


Рис. 21. Ассоциации генотипов 455 G/A FGB с уровнем Д-димера в крови.

При исследовании пациентов с генотипами 677 TT MTHFR и 677 CT MTHFR выявлен более высокий интерквартильный размах в уровне

триглицеридов крови ($M_e=1,45$ ммоль/л; $Q_{25}=1,21$ ммоль/л; $Q_{75}=2,01$ ммоль/л), по сравнению с пациентами с генотипом 677 СС МТНFR ($M_e=1,5$ ммоль/л; $Q_{25}=1,20$ ммоль/л; $Q_{75}=1,90$ ммоль/л, $p=0,03$) (рис. 22).

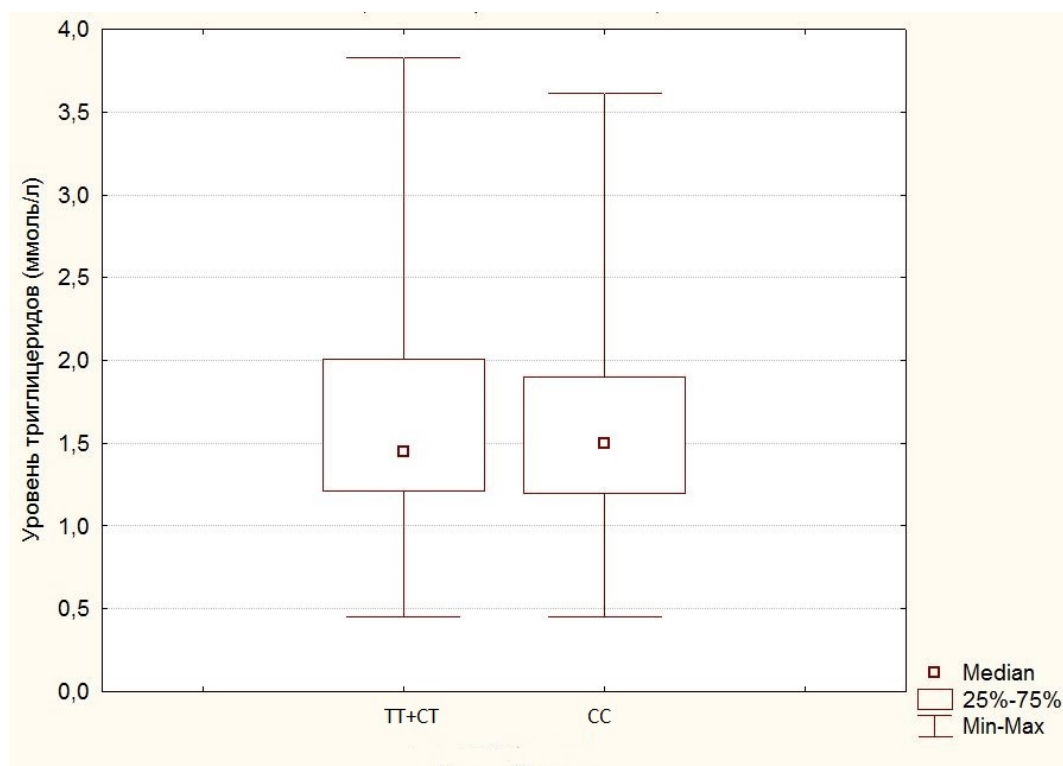


Рис. 22. Уровень триглицеридов в крови в зависимости от генетических вариантов локуса 677 С/Т МТНFR

Выявлена статистически значимая связь между генетическими вариантами локуса 677 С/Т МТНFR и уровнем ЛПВП в крови у индивидов исследуемой выборки. Так у пациентов с генотипом 677 ТТ МТНFR уровень ЛПВП крови статистически достоверно ниже ($M_e=0,89$ ммоль/л; $Q_{25}=0,71$ ммоль/л; $Q_{75}=1,08$ ммоль/л), чем у пациентов с генотипами 677 СС МТНFR и 677 СТ МТНFR ($M_e=1,10$ ммоль/л; $Q_{25}=0,92$ ммоль/л; $Q_{75}=1,28$ ммоль/л), $p = 0,05$) (рис.23).

Обнаружена ассоциация молекулярно-генетического маркера 677 С/Т МТНFR с показателем системы гемостаза – тромбиновым временем (ТВ). Выявлено статистически достоверное снижение ТВ у пациентов с генотипами 677 ТТ и СТ МТНFR ($M_e=15$ сек; $Q_{25}=15$ сек; $Q_{75}=16$ сек), по сравнению с

исследуемыми с генотипом 677 CC MTHFR ($M_e=16$ сек; $Q_{25}=15$ сек; $Q_{75}=15$ сек, $p=0,005$) (рис. 24).

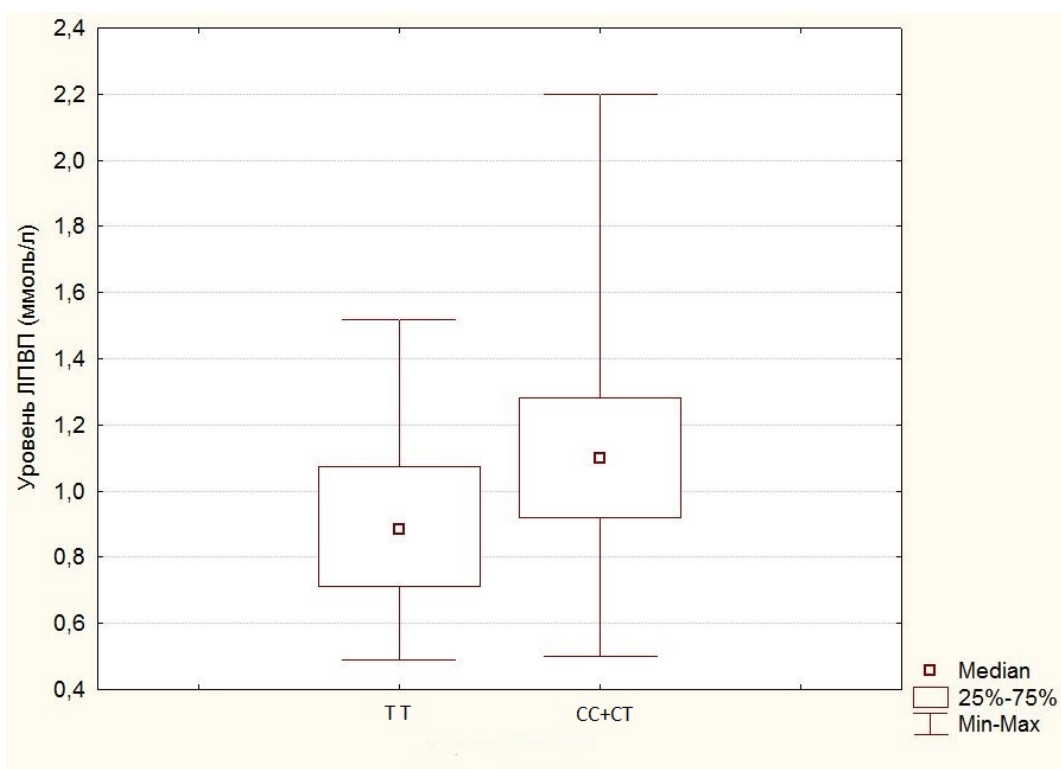


Рис. 23. Ассоциации генотипов 677 С/Т МТНFR с уровнем ЛПВП в крови.

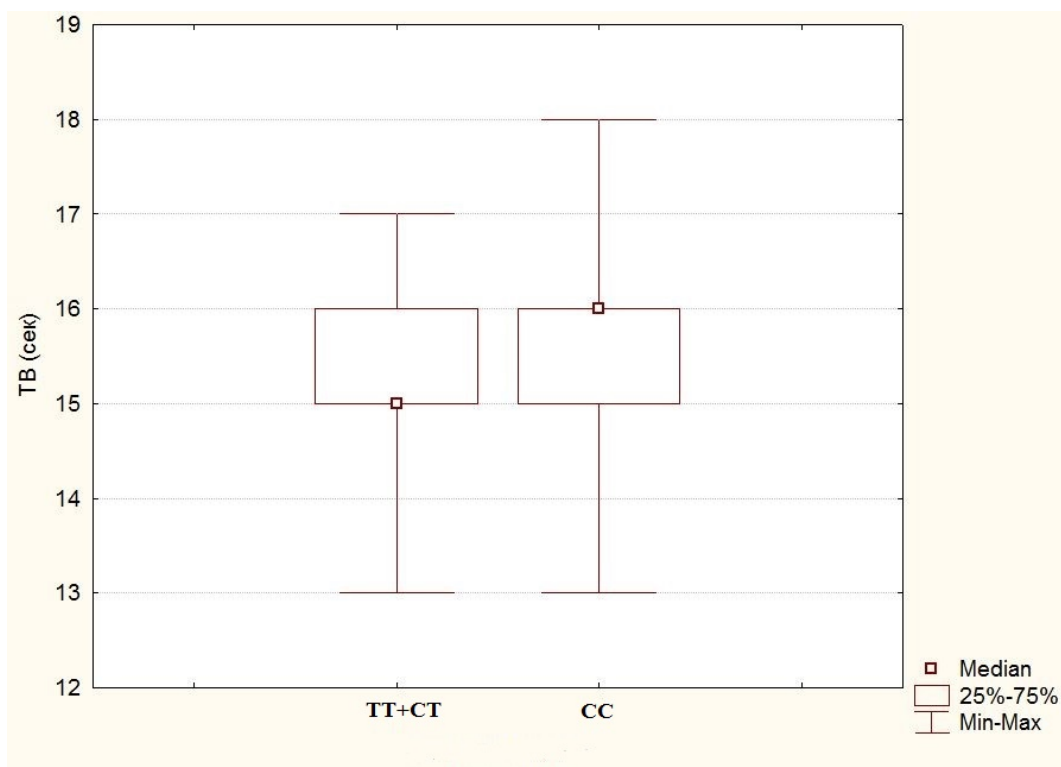


Рис. 24. Зависимость ТВ от генетических вариантов локуса 677 С/Т МТНFR.

Таким образом, резюмируя полученные результаты, следует отметить вовлеченность ряда изученных генетических полиморфизмов наследственных тромбофилий (20210G/A FII, 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB) в формирование лабораторных показателей в группах исследования. Выявлено, что генетический вариант 20210 GA FII ассоциирован с повышенным уровнем гомоцистеина и Д-димера в крови. Также с повышенным уровнем Д-димера в крови ассоциированы генетические варианты 455 GA FGB и 455 AA FGB. Генетические варианты 677 CT и 677 TT MTHFR связаны с повышенным уровнем триглицеридов в крови и укорочением тромбинового времени, а генотип 677 TT MTHFR ассоциирован со сниженным уровнем ЛПВП в крови.

3.5 Разработка модели прогнозирования развития раннего тромбоза зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей в зависимости от генетических вариантов наследственных тромбофилий и лабораторных показателей

Тромбоз зоны реконструкции после реваскуляризирующей операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей является особо значимой медико-социальной проблемой [4], поэтому актуальной задачей является разработка способов прогнозирования развития этого послеоперационного осложнения. В связи с этим на следующем этапе исследования нами разработана математическая модель прогнозирования риска развития ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции с использованием дискриминантного анализа.

Проведено изучение двух групп пациентов – больных I группы исследования с развитием ранней тромботической окклюзии после операций на брюшной аорте, артериях нижних конечностей и пациентов III группы исследования. Анализировались результаты лабораторных показателей, позволившие дискриминировать индивидов на две группы. Для этих двух групп пациентов получены две дискриминантные функции (таблица 12), которые включали следующие лабораторные показатели: уровень Д-димера в крови, уровень гомоцистеина в крови и количество тромбоцитов в крови. Эти показатели, согласно полученным ранее результатам, имели более высокий

уровень у пациентов I группы исследования в отличие от III группы исследования.

Выявленные нами показатели при дискриминантном анализе дали значение критерия Уилкса 0,29627, при $F(3,75) = 59,383$ и $p < 0,0000$. Эти данные позволили заключить, что две рассматриваемые группы пациентов по набору из трех изученных параметров демонстрировали неслучайную межгрупповую вариацию.

Таблица 12

Коэффициенты линейных дискриминантных функций для больных I и III групп исследования

Признаки	I группа исследования	III группа исследования
Уровень гомоцистеина в крови, мкмоль/л	1,6983	1,1212
Уровень Д-димера в крови, мкг/мл	2,9453	0,3940
Количество тромбоцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	0,1411	0,1115
Константа	-38,2884	-19,9638

Значения критериев Уилкса, F- критериев, вероятности P, а также показателей толерантности для каждого из выявленных в дискриминантном анализе показателей представлены в таблице 13. Анализ F-критериев и показателей вероятности статистической ошибки 1- го рода (p) по отдельным показателям свидетельствует о том, что по всем изученным параметрам $p < 0,05$ и это позволяет их использовать при дискриминантном анализе. Значения толерантности по рассматриваемым показателям ($T=0,971-0,979$) существенно выше критического уровня $T < 0,10$ [21], что исключает мультиколлениарность данных признаков т.е. отсутствуют высокие взаимные корреляции этих признаков, наличие которых снижает точность оценок. Точность распознавания

индивидов относящихся к I группе исследования (с ранним тромбозом зоны реконструкции) составила 88,64%, а в III группе исследования – 100%. В среднем процент правильных дискриминаций в I группу исследования и в III группу исследования на основе данных о лабораторных показателях (уровню Д-димера в крови, уровню гомоцистеина в крови, количеству тромбоцитов в крови) составил 93,67% (таблица 13).

Таблица 13

Значения критериев отбора для признаков, включённых в дискриминантный анализ

Признаки	Критерий Уилкса	F критерий	P	Толерантность (т)
Уровень гомоцистеина в крови, мкмоль/л	0,411	29,11	0,000001	0,971
Уровень Д-димера в крови, мкг/мл	0,451	39,17	0,000000	0,979
Количество тромбоцитов в крови, $\times 10^9$ /л	0,349	13,23	0,0005	0,977

С помощью полученных коэффициентов дискриминантных функций, на основе данных об уровне Д-димера, гомоцистеина и количестве тромбоцитов в крови можно определить принадлежность пациента либо к группе с высоким риском развития раннего тромбоза зоны реконструкции после реваскуляризирующей операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей, либо к группе пациентов низкого риска.

Уравнение линейной дискриминантной функции (ЛДФ) имеет следующий вид [69]:

$$y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \dots + a_nx_n + C,$$

где x_i - информативные признаки, a_i - коэффициенты для данных признаков, C - константа.

В нашем случае мы имеем следующее уравнение ЛДФ: 1) для отнесения в группу больных с ранним тромбозом зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей:

$$y = -38,2884 + 1,6983x_1 + 2,9453x_2 + 0,1411x_3,$$

2) для отнесения в контрольную группу (пациенты без признаков облитерирующих заболеваний аорты и артерий нижних конечностей)

$$y = -19,9638 + 1,1212x_1 + 0,394x_2 + 0,1115x_3,$$

где x_1 – уровень гомоцистеина в крови (мкмоль/л), x_2 – уровень Д-димера в крови (мкг/мл), x_3 – количество тромбоцитов в крови ($\times 10^9$ /л).

После подставления значения соответствующих показателей конкретного пациента в вышеуказанные уравнения ЛДФ, рассчитываются новые признаки – y . Для какой группы (больные с ранним тромбозом зоны реконструкции или контрольная группа) новый признак y является максимальным, в ту группу следует отнести пациента [9].

Пример №1. У больного А. при лабораторном исследовании во время подготовки к реконструктивной операции на артериях нижних конечностей выявлены следующие показатели: уровень гомоцистеина в крови – 14,73 мкмоль/л; уровень Д-димера в крови – 0,38 мкг/мл; количество тромбоцитов в крови – 275×10^9 /л. Подставляем эти значения признаков в два вышеуказанных уравнения ЛДФ и находим в каждом уравнении новый признак y .

$$\begin{aligned} y \text{ (для пациентов I группы исследования)} &= \\ &= -38,2884 + 1,6983x_1 + 2,9453x_2 + 0,1411x_3 = -38,2884 + 1,6983 \times 14,73 + \\ &+ 2,9453 \times 0,38 + 0,1411 \times 275 = 26,65 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} y \text{ (для пациентов III группы исследования)} &= \\ &= -19,9638 + 1,1212x_1 + 0,394x_2 + 0,1115x_3 = -19,9638 + 1,1212 \times 14,73 + \\ &+ 0,394 \times 0,38 + 0,1115 \times 275 = 27,39 \end{aligned}$$

Полученные при расчётах в уравнении ЛДФ значения нового признака y для данного пациента выше для пациентов III группы исследования, что позволяет отнести этого пациента в группу с низким риском развития раннего тромбоза зоны реконструкции.

Пример №2. У больного К. во время подготовки к реконструктивной операции на брюшной аорте при лабораторном обследовании выявлены следующие показатели: уровень гомоцистеина в крови – 16,31 мкмоль/л; уровень Д-димера в крови – 1,95 мкг/мл; количество тромбоцитов в крови – 302×10^9 /л.

Подставляем эти значения признаков в два вышеуказанных уравнения ЛДФ и находим в каждом уравнении новый признак y .

$$y \text{ (для пациентов I группы исследования)} = \\ = -38,2884 + 1,6983x_1 + 2,9453x_2 + 0,1411x_3 = -38,2884 + 1,6983 \times 16,31 + \\ + 2,9453 \times 1,95 + 0,1411 \times 302 = 37,76$$

$$y \text{ (для пациентов III группы исследования)} = \\ = -19,9638 + 1,1212x_1 + 0,394x_2 + 0,1115x_3 = -19,9638 + 1,1212 \times 16,31 + \\ + 0,394 \times 1,95 + 0,1115 \times 302 = 32,77$$

Максимальное значение нового признака y для данного пациента, полученное при расчётах в уравнении ЛДФ, для I группы исследования, позволяет отнести этого пациента в группу с высоким риском раннего тромбоза в зоне реконструкции. Дальнейшее амбулаторное наблюдение за больным выявило развитие тромбоза бранши аорто-бедренного протеза через 4,5 месяца после операции.

Данная модель позволяет прогнозировать риск развития раннего тромбоза зоны реконструкции после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей, приведет к необходимости проведения более тщательной медикаментозной профилактики тромбоза в послеоперационном периоде и более пристальному наблюдению за больными группы риска развития тромбоза зоны реконструкции на амбулаторном этапе.

Для увеличения процента правильных дискриминаций в группу больных с ранним тромбозом зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей мы дополнительно использовали данные генетического тестирования этих пациентов по локусам 455 G/A FGB, 677 C/T MTHFR. Ранее нами было показано, что комбинация генетических вариантов 455 A FGB и 677 T MTHFR является фактором риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей (OR=4,0).

Для исследуемых групп пациентов получены две дискриминантные функции, которые включают следующие генетические и лабораторные показатели: генетические варианты по локусам 455 G/A FGB и 677 C/T MTHFR, уровень Д-димера, гомоцистеина, количество тромбоцитов в крови, уровень фибриногена, антитромбина III, ЛПНП и ЛПВП в крови (таблица 14).

Таблица 14

Коэффициенты линейных дискриминантных функций для больных I и III групп исследования

Признаки	I группа исследования	III группа исследования
Генетические варианты по локусам 455 G/A FGB, 677 C/T MTHFR (1- Комбинация аллелей 455 A FGB и 677 T MTHFR, 2- Другие комбинации генетических вариант по локусам 455 G/A FG и 677 C/T MTHFR)	8,549	6,1074
Уровень Д-димера в крови, мкг/мл	5,193	1,6767
Уровень гомоцистеина в крови, мкмоль/л	1,733	1,0168
Количество тромбоцитов в крови, $\times 10^9$ /л	0,154	0,1197
Уровень фибриногена в крови, г/л	3,796	2,8396
Уровень антитромбина III в крови, %	0,735	0,6612
Уровень ЛПНП в крови, ммоль/л	1,255	2,4880
Уровень ЛПВП в крови, ммоль/л	8,135	6,1074
Константа	-101,554	-71,4118

Выявленные нами показатели при дискриминантном анализе дали значение критерия Уилкса 0,21489, при $F(8,70) = 31,969$ и $p < 0,0000$. Эти данные позволили

заклучить, что две рассматриваемые группы пациентов (с развитием раннего тромбоза в зоне реконструкции и контрольная группа) по набору из восьми изученных параметров демонстрировали неслучайную межгрупповую вариацию. Значения критериев Уилкса, F- критериев, вероятности Р, а также показателей толерантности для каждого из выявленных в дискриминантном анализе показателей представлены в таблице 15. Анализ F-критериев и показателей вероятности статистической ошибки 1- го рода (р) по отдельным показателям свидетельствует о том, что по всем изученным параметрам $p < 0,05$ и это позволяет их использовать при дискриминантном анализе.

Таблица 15

Значения критериев отбора для признаков, включённых в дискриминантный анализ

Признаки	Критерий Уилкса	F критерий	Р	Толерантность (т)
Генетические варианты по локусам 455 G/A FGB, 677 C/T MTHFR (1- Комбинация аллелей 455 А FGB и 677 Т MTHFR, 2- Другие комбинации генетических вариант по локусам 455 G/A FG и 677 C/T MTHFR)	0,225	3,30	0,04	0,933
Уровень Д-димера в крови, мкг/мл	0,361	47,66	0,00000	0,839
Уровень гомоцистеина в крови, мкмоль/л	0,299	27,57	0,000002	0,880
Количество тромбоцитов в крови, $\times 10^9$ /л	0,246	10,19	0,002	0,868
Уровень фибриногена в крови, г/л	0,233	5,92	0,018	0,838
Уровень антитромбина III в крови, %	0,225	3,39	0,04	0,937
Уровень ЛПНП в крови, ммоль/л	0,233	5,87	0,018	0,860
Уровень ЛПВП в крови, ммоль/л	0,229	4,59	0,036	0,888

Значения толерантности по рассматриваемым показателям ($T=0,84-0,94$) существенно выше критического уровня $T<0,10$ [21], что исключает мультиколлениарность данных признаков т.е. отсутствуют высокие взаимные корреляции этих признаков, наличие которых снижает точность оценок (таблица 15). Точность распознавания индивидов, относящихся к I группе исследования, составляет 95,46% (в отличие от 88,64% в ЛДФ без учета генетических вариантов), а к III группе исследования – 100%.

В среднем процент правильных дискриминаций в I группу исследования и в III группу исследования на основе данных о генетических вариантах по локусам 455 G/A FGB, 677 C/T MTHFR и лабораторных показателях (уровень Д-димера, гомоцистеина, количество тромбоцитов, уровень фибриногена, антитромбина III, ЛПНП и ЛПВП в крови) составил 97,47% (по сравнению с 93,67% в ЛДФ без учета генетических вариантов).

В данном случае мы имеем следующие уравнения ЛДФ: 1) для отнесения в группу больных с ранним тромбозом зоны реконструкции после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей:

$$y = -101,554 + 8,549x_1 + 5,193x_2 + 1,733x_3 + 0,154x_4 + 3,796x_5 + 0,735x_6 + 1,255x_7 + 8,135x_8,$$

2) для отнесения в контрольную группу (индивиды без признаков облитерирующих заболеваний аорты и артерий нижних конечностей):

$$y = -71,4118 + 6,1074x_1 + 1,6767x_2 + 1,0168x_3 + 0,1197x_4 + 2,8396x_5 + 0,6612x_6 + 2,4880x_7 + 6,1074x_8,$$

где x_1 – генетический полиморфизм 455 G/A FGB, 677 C/T MTHFR (1- комбинация аллелей 455 A FGB и 677 T MTHFR, 2- другие комбинации генетических вариантов по локусам 455 G/A FG и 677 C/T MTHFR), x_2 - уровень Д-димера в крови (мкг/мл), x_3 – уровень гомоцистеина в крови (мкмоль/л), x_4 – количество тромбоцитов в крови ($\times 10^9$ /л), x_5 - уровень фибриногена в крови (г/л), x_6 - уровень антитромбина III в крови (%), x_7 - уровень ЛПНП в крови (ммоль/л), x_8 - уровень ЛПВП в крови (ммоль/л).

Подставляем значения соответствующих показателей конкретного пациента в вышеуказанные уравнения ЛДФ, рассчитываем значение y . Для какой группы (больные с ранним тромбозом зоны реконструкции или контрольная группа) значение y является максимальным, в ту группу следует отнести пациента [9].

Пример №3. У больного И. по данным молекулярно-генетического обследования выявлены генотипы 455GA FGB и 677 CT MTHFR (2), при лабораторном исследовании во время подготовки к реконструктивной операции на артериях нижних конечностей выявлены следующие показатели: уровень Д-димера в крови – 2,3 мкг/мл; уровень гомоцистеина в крови – 16,2 мкмоль/л; количество тромбоцитов в крови – 315×10^9 /л; уровень фибриногена в крови – 4,7 г/л; уровень антитромбина III в крови – 101,3%; уровень ЛПНП в крови – 2,9 ммоль/л; уровень ЛПВП в крови – 0,95 ммоль/л. Подставляем эти значения признаков в два вышеуказанных уравнения ЛДФ и находим в каждом уравнении новый признак y .

y для больных с ранним тромбозом зоны реконструкции после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей:

$$y = -101,554 + 8,549x_1 + 5,193x_2 + 1,733x_3 + 0,154x_4 + 3,796x_5 + 0,735x_6 + 1,255x_7 + 8,135x_8 = -101,554 + 8,549 \times 2,3 + 5,193 \times 16,2 + 1,733 \times 315 + 3,796 \times 4,7 + 0,735 \times 101,3 + 1,255 \times 2,9 + 8,135 \times 0,95 = 107,737$$

$$y \text{ для контрольной группы} = -71,4118 + 6,1074x_1 + 1,6767x_2 + 1,0168x_3 + 0,1197x_4 + 2,8396x_5 + 0,6612x_6 + 2,4880x_7 + 6,1074x_8 = -71,4118 + 6,1074 \times 2 + 1,6767 \times 2,3 + 1,0168 \times 16,2 + 0,1197 \times 315 + 2,8396 \times 4,7 + 0,6612 \times 101,3 + 2,4880 \times 2,9 + 6,1074 \times 0,95 = 92,18$$

Максимальное значение нового признака y для данного пациента, полученное при расчётах в уравнении ЛДФ для больных с ранним тромбозом зоны реконструкции, позволило отнести этого пациента в группу с высоким риском раннего тромбоза в зоне реконструкции. Дальнейшее амбулаторное наблюдение за больным выявило развитие тромбоза в зоне пластики бедренной артерии через 3 месяца после операции.

Пример №4. У больного Д. по данным молекулярно-генетического обследования выявлены генотипы 455GG FGB и 677 CC MTHFR (1), при лабораторном исследовании во время подготовки к реконструктивной операции на артериях нижних конечностей выявлены следующие показатели: уровень Д-димера в крови – 0,35 мкг/мл; уровень гомоцистеина в крови – 9,7 мкмоль/л; количество тромбоцитов в крови – 202×10^9 /л; уровень фибриногена в крови – 3,84 г/л; уровень антитромбина III в крови – 107%; уровень ЛПНП в крови – 2,27 ммоль/л; уровень ЛПВП в крови – 1,15 ммоль/л. Подставляем эти значения признаков в два вышеуказанных уравнения ЛДФ и находим в каждом уравнении новый признак у.

у для больных с ранним тромбозом зоны реконструкции после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей:

$$\begin{aligned} y = & -101,554 + 8,549x_1 + 5,193x_2 + 1,733x_3 + 0,154x_4 + 3,796x_5 + 0,735x_6 + 1,255x_7 + \\ & + 8,135x_8 \end{aligned} \quad \begin{aligned} = & -101,554 + 8,549 \times 0,35 + 1,733 \times 9,7 + 0,154 \times 202 + \\ & + 3,796 \times 3,84 + 0,735 \times 107 + 1,255 \times 2,27 + 8,135 \times 1,15 = 62,16 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} y \text{ для контрольной группы} = & -71,4118 + 6,1074x_1 + 1,6767x_2 + \\ & + 1,0168x_3 + 0,1197x_4 + 2,8396x_5 + 0,6612x_6 + 2,4880x_7 + 6,1074x_8 = \\ & -71,4118 + \\ & + 6,1074 \times 1 + 1,6767 \times 0,35 + 1,0168 \times 9,7 + 0,1197 \times 202 + 2,8396 \times 3,84 + 0,6612 \times 107 + \\ & + 2,4880 \times 2,27 + 6,1074 \times 1,15 = 63,65 \end{aligned}$$

Полученные при расчётах в уравнении ЛДФ значения нового признака у для данного пациента выше для индивидов контрольной группы, что позволило отнести этого пациента в группу с низким риском развития раннего тромбоза зоны реконструкции. Дальнейшее наблюдение за пациентом в течении 6 месяцев не выявило тромботической окклюзии бедренно-подколенного шунта.

Разработанная нами модель прогнозирования риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции с учетом влияния генетических вариантов показало более высокий процент точности прогноза по сравнению с моделью, рассматривавшую только лабораторные показатели (патент № 2617418 от 25.04.17). Это дает возможность более точного выявления больных с

повышенным риском развития раннего тромбоза зоны реконструкции с целью подбора максимально эффективных способов медикаментозной профилактики тромбозов и активного динамического наблюдения за этой группой больных в послеоперационном периоде.

Глава 4. Оценка эффективности использования модели прогнозирования риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей в зависимости от генетических вариантов наследственных тромбофилий и лабораторных показателей

В настоящее время для прогнозирования риска реокклюзии зоны реконструкции в послеоперационном периоде наибольшей популярностью пользуются модели, основанные на оценке воспринимающего русла и степени ишемии конечности [72]. В нашей работе в изучаемых группах значимых различий по этим показателям не было получено, что потребовало введения дополнительных значимых параметров в модель прогнозирования развития тромбоза зоны реконструкции.

С учетом полученных нами данных изучения полиморфизмов генов наследственных тромбофилий 1691G/A FV, 20210G/A FII, 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB и их ассоциаций с лабораторными показателями была разработана математическая модель прогнозирования риска развития ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции с использованием дискриминантного анализа на дооперационном этапе.

Разработанная модель прогнозирования риска тромботической окклюзии зоны реконструкции была применена в IV группе оценки эффективности разработанной модели прогнозирования (56 пациентов) в предоперационном периоде для оценки эффективности полученных нами формул дискриминантного анализа: с учетом и без влияния генетических вариантов генов наследственных тромбофилий. Данная группа больных полностью соответствовала критериям включения и исключения основной выборки. В последующем всем пациентам были проведены реконструктивные операции, согласно национальным рекомендациям по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей [71].

Результаты проведенного на дооперационном периоде математического прогнозирования риска тромбоза зоны реконструкции, для отнесения пациента в подгруппу высокого (IV А) или низкого (IV Б) риска по изучаемому осложнению, а также информация о реальном наступлении изучаемого события (тромбоза зоны реконструкции) в течении первых 6 месяцев послеоперационного периода представлены в таблице 16.

Таблица 16.

Распределение результатов прогнозирования риска развития тромбоза зоны реконструкции без учета и с учетом влияния генетических вариантов генов наследственных тромбофилий и наступление реального события

	Группа высокого риска тромбоза зоны реконструкции (IV А)	Группа низкого риска тромбоза зоны реконструкции (IV Б)
Количество ожидаемых случаев (без учета влияния генетических вариантов генов наследственных тромбофилий / с учетом влияния генетических вариантов генов наследственных тромбофилий)	11/8	45/48
Количество произошедших случаев тромбоза зоны реконструкции	6	3

Всего в IV группе оценки эффективности разработанной модели прогнозирования зафиксировано 9 случаев тромбоза зоны реконструкции в течении 6 месяцев после оперативного вмешательства на аорте и артериях нижних конечностей. Из них у 1 больного после АББШ (1,8%), у 2 больных после АББШ+БПШ (3,6%) и 6 больных после аутовенозного БПШ выше щели коленного сустава (10,7%).

Для оценки модели прогнозирования, когда каждый расчет прогноза события дает положительный или отрицательный результат (то есть высокий или низкий риск развития исследуемого осложнения), по итогам анализа IV группы

оценки эффективности разработанной модели прогнозирования нужно составить определенную таблицу [69] (таблица 17).

Таблица 17

Методика расчета операционных характеристик диагностического теста

Оцениваемый метод	Положительный/ отрицательный результат	Истинный результат	
		Тромбоз зоны реконструкции	Нет тромбоза зоны реконструкции
Модель прогнозирования риска тромбоза зоны реконструкции	Высокий риск тромбоза (положительный результат)	Совпадение прогноза (истинно положительный результат) a	Гипердиагностика (ложноположительны й результат, ошибка первого рода) b
	Низкий риск тромбоза (отрицательный результат)	Гиподиагностика (ложноотрицатель ный результат, ошибка второго рода) c	Совпадение результатов (истинно отрицательный результат) d

Поскольку в исследовании такого типа анализу подвергались два признака, каждый из которых имел два возможных значения, такая задача является частным случаем задачи об ассоциации качественных признаков. Каждое из наблюдений может быть отнесено в одну из клеток этой таблицы. Следовательно, каждая клетка будет содержать число наблюдений, в нее попавших – a, b, c, d. На основании этих чисел рассчитывались операционные характеристики диагностического теста: диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), диагностическая эффективность (ДЭ), прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР), прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР) [69].

ДЧ (%) = $a/(a+c)$ – доля лиц с положительным результатом прогнозирования среди лиц с изучаемым осложнением.

ДС (%) = $d/(d+b)$ - доля лиц с отрицательным результатом прогнозирования среди лиц с изучаемым осложнением.

ДЭ = $(ДЧ+ДС)/2$ – среднее между ДЧ и ДС.

Значения ПЦПР и ПЦОР (при одинаковых значениях ДЧ и ДС) зависят от распространенности осложнения в исследуемой группе (Р).

$P = (a+c)/(a+b+c+d)$.

ПЦПР = $(ДЧ \times P) / (ДЧ \times P + (1-ДС)(1-P))$

ПЦОР = $(ДС \times (1-P)) / ((1-ДЧ) \times P + ДС \times (1-P))$.

При таком расчете для анализа точности метода прогнозирования не требуется применение статистических методов [69].

Проведя необходимые расчеты, получили результаты для модели прогнозирования риска тромбоза зоны реконструкции без учета и с учетом генетических факторов врожденных тромбофилий (таблица 18).

Таблица 18

Результаты расчета операционных характеристик диагностического теста

Название операционной характеристики диагностического теста	Модель прогнозирования тромбоза без генетического анализа	Модель прогнозирования тромбоза с генетическим анализом
диагностическая чувствительность (ДЧ) %	67	67
диагностическая специфичность (ДС) %	89	96
диагностическая эффективность (ДЭ)	0,78	0,82
прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР)	0,54	0,76
прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР)	0,93	0,94

Модель математического прогнозирования риска тромбоза зоны реконструкции с учетом генетических факторов показала более высокие результаты в расчете ее диагностической ценности по сравнению с моделью без учета генетических факторов по следующим показателям: диагностическая специфичность (96% против 89%), диагностическая эффективность (82% против 78%), прогностическая ценность положительного результата (0,76 против 0,54) и сопоставимые результаты по диагностической чувствительности (в обоих случаях 67%) и прогностической ценностью отрицательного результата (0,94 против 0,93).

Таким образом, установлена эффективность модели прогнозирования риска тромботической окклюзии зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей в практической работе. Процент верного определения группы риска развития данного осложнения выше при использовании модели дискриминантного анализа с учетом влияния генетических вариантов генов наследственных тромбофилий и лабораторных показателей, чем без учета генетических факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на достижения современной фармакотерапии в мире остается большое количество людей, страдающих облитерирующими заболеваниями аорты и артерий нижних конечностей. Атеросклеротическое поражение аорты и артерий нижних конечностей составляет около 20% от всех сердечно-сосудистых заболеваний и по данным литературы поражает около 2-3% населения в целом [4]. Консервативная терапия в изолированном виде эффективна не более чем у 15-20% пациентов, для остальных единственным эффективным способом лечения остается реконструктивное оперативное вмешательство [26]. Наблюдается тенденция к ежегодному увеличению количества реконструктивных оперативных вмешательств как в России, так и в мире. Параллельно с этим ежегодно увеличивается количество повторных реконструктивных операций [43, 113], которые относятся к числу наиболее технически сложных вмешательств, ведут к дополнительным материальным затратам, сопровождаются высокой летальностью и инвалидизацией пациентов [148]. Одной из частых причин повторного реконструктивного оперативного вмешательства является тромботическая окклюзия зоны реконструкции [81]. Среди причин тромбоза зоны реконструкции большинство авторов выделяют хирургические погрешности, несоответствие состояния притока и оттока крови выше и ниже зоны реконструкции, различные гиперкоагуляционные процессы, в том числе генетические факторы гиперкоагуляции [4, 63, 137, 173, 181].

В исследование включены 175 пациентов мужского пола, разделенных на четыре группы: 3 группы исследования (119 человек) и четвертая группа оценки эффективности разработанной модели прогнозирования (56 человек). Первую (I) группу исследования составили 44 пациента, у которых выявлен тромбоз зоны реконструкции после реконструктивной операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей по поводу облитерирующего атеросклероза в первые 6 месяцев после оперативного вмешательства. Вторую (II) группу исследования составили 40 мужчин после аналогичных операций, не имеющих осложнений тромбоза зоны реконструкции. Третью (III) группу исследования (группу

контроля) составили 35 мужчин, которые не имели клинических и инструментальных признаков облитерирующего атеросклероза брюшной аорты и артерий нижних конечностей. Группу оценки эффективности математической модели прогнозирования риска развития тромбоза в зоне реконструкции (IV группа) составили 56 пациентов (не из числа групп исследования) после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей. В исследование включались мужчины русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющие родства между собой.

Больные I и II групп исследования достоверно не отличались друг от друга видами оперативных вмешательств, степенью ишемии нижних конечностей в дооперационном периоде, состоянием периферического русла по оценке R.Rutherford ($p > 0,05$). Следует отметить, что мы получили достоверные различия по локализации тромбоза в I группе исследования. Так частота ранних тромботических окклюзий у больных, перенесших реконструктивную операцию по поводу облитерирующего поражения аорто-подвздошного сегмента достоверно ниже (42,9%), чем у больных, перенесших реконструктивную операцию на бедренно-подколенном сегменте (60,5%) ($p < 0,05$), что согласуется с данными отечественных и зарубежных исследователей, согласно которым тромбоз зоны реконструкции ниже паховой складки встречается чаще, чем после оперативных вмешательств на аорто-подвздошном сегменте [71, 94].

Большинство современных моделей прогнозирования сроков «работоспособности» зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей основываются на таких показателях, как состояние русла «оттока» и технических аспектах оперативного пособия [11]. В нашей работе по этим показателям достоверных различий между группами получено не было, что привело к необходимости поиска дополнительных причин развития тромботических осложнений в зоне реконструкции, а именно изучение диагностической ценности факторов гиперкоагуляции, в том числе наследственных тромбофилий, в развитии данного осложнения.

Изучение роли наследственных генетических факторов в развитии соматических заболеваний продолжает оставаться перспективным направлением современной медицинской науки. Исследование генов наследственной предрасположенности к тромбофилии широко исследуется для различных патологий [129, 140, 146, 192], уровень значимости этих генов в патогенезе болезни до сих пор остается до конца не изученным [50, 186]. По данным литературы наибольшее значение в формировании тромботических состояний имеют такие генетические факторы как: 1691G/A фактора V, 20210G/A протромбина, -455 G/A фибриногена, 677C/T MTHFR и ряда других [2, 102, 119, 184]. В проведенном исследовании мы изучили ассоциацию полиморфизмов этих генов с развитием тромбоза в зоне реконструкции впервые 6 месяцев после оперативного вмешательства. Установлена связь генетических вариантов 677 T MTHFR и 455 A FGB с ранним тромбозом зоны реконструкции. Сочетание этих генотипов значительно чаще (27,27%) встречается среди больных I группы исследования, чем в III группе (8,57%) и является фактором риска развития ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей (OR=4,0), что согласуется с литературными данными [46, 107, 124, 133, 164]. Нами изучена связь молекулярно-генетических маркеров с различными лабораторными показателями: уровнем тромбоцитов, липидным профилем, АТ III, Д-димером, гомоцистеином.

Фибриноген составляет важный элемент в свертывающей системе крови, из него образуется основной компонент кровяного сгустка - фибрин [42]. Полиморфизм -455 G/A гена FGB связан с заменой нуклеотида гуанин на аденин в промоторном участке гена и сопровождается повышенной экспрессией гена, что приводит к увеличению содержания фибриногена в крови и значительно повышает вероятность тромботических событий [73, 182].

По данным литературы мутации -455 G/A гена FGB, сопряженные с полиморфизмом генов фактора V Leiden, еще более повышают риска артериальных или венозных тромбозов [102]. Гипергомоцистеинемия способствует повышению уровня фибриногена. В присутствии повышенной

концентрации гомоцистеина в крови происходит изменение в структуре полимеров фибрина, что в дальнейшем приводит к уменьшению их чувствительности в фибринолизе [42].

В исследовании выявлена ассоциация молекулярно-генетического маркера 20210 G/A FII у индивидов с генотипом 20210 GA FII с уровнем гомоцистеина и Д-димера по сравнению с генотипом 20210 GG FII (рис.25).

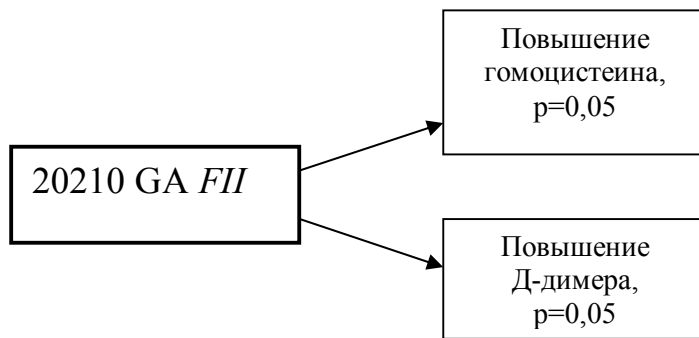


Рис. 25. Влияние генетического полиморфизма -20210 G/A FII на показатели крови.

У пациентов с генотипами 455 GA FGB и 455 AA FGB выявлено повышение уровня Д-димера по сравнению с пациентами, имеющими генотип 455 GG FGB ($p=0,03$).

MTHFR регулирует метаболизм фолатов, необходимых для синтеза метионина из гомоцистеина [16]. Полиморфизм 677Т гена MTHFR является наиболее значимым и связан с сердечно-сосудистыми болезнями [165]. В результате замены цитозин на тимин в 677-м положении синтезируется фермент, приводящий к развитию гипергомоцистеинемии [46, 124]. Гипергомоцистеинемия, развивающаяся в следствии мутации MTHFR, приводит к тромбофилическим состояниям за счет прямого токсического действия на эндотелий и косвенного - за счет активации тромбоцитов и нарушения процесса фибринолиза [91].

Проведенное исследование выявило ассоциацию генетического полиморфизма 677 С/Т MTHFR с лабораторными показателями. У пациентов с генотипом 677 ТТ MTHFR уровень ЛПВП (наиболее протективных по развитию атеросклероза) крови статистически значимо ниже, чем у пациентов с генотипами 677 СС MTHFR и 677 СТ MTHFR ($p = 0,05$), а пациенты с генотипами 677 ТТ и

СТ МТНFR имели статистически значимое снижение ТВ по сравнению с исследуемыми пациентами с генотипом 677 СС МТНFR ($p=0,005$) (рис. 26). Значимость гомозиготного генотипа 677 ТТ МТНFR в развитии тромботических осложнений подтверждается литературными данными [2, 51].

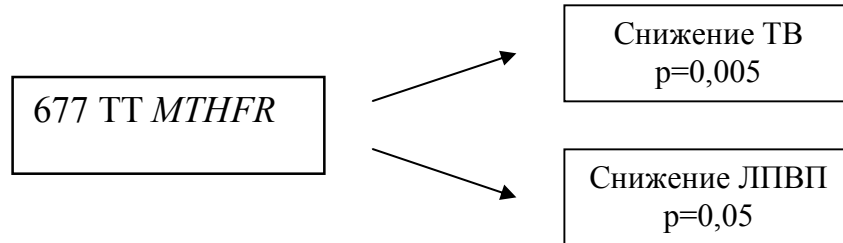


Рис. 26. Связь генотипа 677 ТТ МТНFR в показателями ТВ и ЛПВП.

Таким образом, установлена вовлеченность изученных генетических полиморфизмов наследственных тромбофилий (20210G/A FII, 677 С/Т МТНFR, 455 G/A FGB) в изменение лабораторных показателей в исследуемых группах.

Проведена оценка лабораторных показателей у больных, имеющих тромботические осложнения в зоне реконструкции, по сравнению с пациентами других групп. Выявлено достоверное повышение таких показателей как гомоцистеин, Д-димер, количество тромбоцитов и фибриногена у больных I группы исследования в сравнении с II группой исследования и III группой контроля ($p<0,05$). У больных II группы выявлено статистически подтвержденное удлинение интервала АЧТВ по сравнению с III группой исследования (на 1 сек) ($p=0,02$). Установлено, что уровень антитромбина III в крови пациентов I и II групп исследования достоверно выше, чем в III контрольной группе (Ме 120,5%; Ме 111% и Ме 91,2% соответственно), $p=0,003$. Идентичная зависимость выявлена при изучении уровня гомоцистеина крови. Так среди пациентов I группы исследования (с ранним тромбозом зоны реконструкции) и II группы исследования (без тромбоза в зоне реконструкции) уровень гомоцистеина в крови был выше, чем в III контрольной группе (Ме 15,9 мкмоль/л; Ме 12,3 мкмоль/л и

Me 10,3 мкмоль/л соответственно), $p < 0,002$. При этом, в I группе уровень гомоцистеина в крови достоверно выше, чем во II группе ($p = 0,001$) (рис. 27).

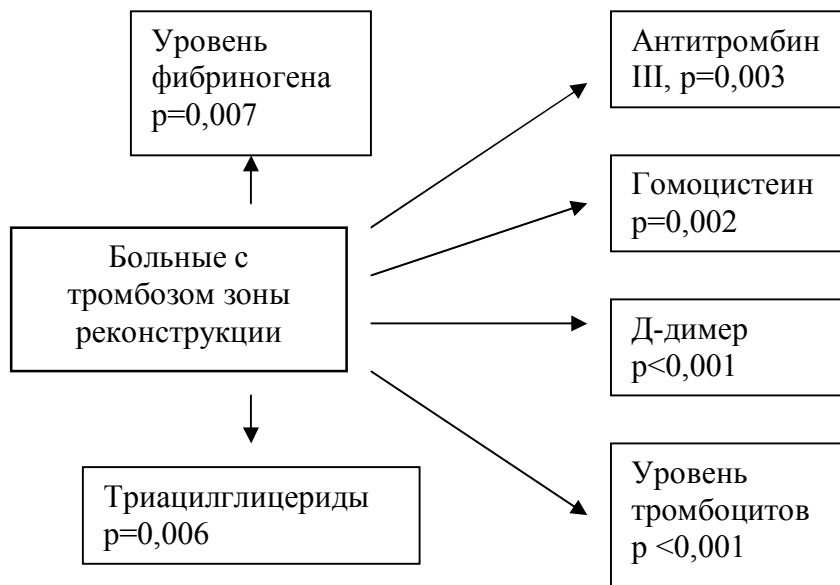


Рис. 27. Взаимосвязь лабораторных показателей крови с наличием тромбоза у больных I группы исследования.

Таким образом, I группа исследования (с тромбозом зоны реконструкции) значительно отличалась от II группы исследования (без тромбоза) увеличенным уровнем гомоцистеина, фибриногена, триглицеридов в крови и замедлением тромбинового времени. Во II группе исследования определялись значимые отличия от III контрольной группы исследования, характеризующиеся увеличенным уровнем антитромбина III, гомоцистеина, Д-димера, тромбоцитов в крови и удлинением АЧТВ. Сочетание генетических вариантов 677 T MTHFR, 455 A FGB значительно повышает ($OR = 4,0$) риск развития ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции при операциях на брюшной аорте и артериях нижних конечностей.

Тромботическая окклюзия зоны анастомоза является тяжелым осложнением реконструктивных операций на артериальном русле. Устранение последствий тромбоза – трудная задача, требующая сложных действий по ее устранению и имеющая тяжелые последствия для здоровья пациентов. Разработка способов предупреждения данного осложнения является перспективной и важной задачей

современной науки. В настоящее время активно разрабатываются математические модели прогнозирования риска развития тромбоза зоны реконструкции с использованием различных диагностических критериев [11].

В проведенном исследовании мы разработали математическую модель прогнозирования риска развития ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции с использованием дискриминантного анализа (патент №2617418 от 25.04.17). Для решения этой задачи проведено разделение больных на две группы: пациенты с развитием ранней тромботической окклюзии после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей и пациентов контрольной группы. Анализировались результаты лабораторных показателей, позволяющие дискриминировать индивидов на две группы, для которых были получены две дискриминантные функции, включающие следующие показатели: уровень Д-димера, уровень гомоцистеина и количество тромбоцитов в крови т.к именно они, согласно полученным результатам, ассоциировались с высоким риском развития тромбоза. Эти данные позволили заключить, что две рассматриваемые группы индивидов (с развитием раннего тромбоза в зоне реконструкции и контрольная группа) по набору из трех изученных параметров демонстрируют неслучайную межгрупповую вариацию.

Составлено уравнение линейной дискриминантной функции ЛДФ: 1) для отнесения в группу больных с ранним тромбозом зоны реконструкции после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей:

$$y = -38,2884 + 1,6983x_1 + 2,9453x_2 + 0,1411x_3,$$

2) для отнесения в контрольную группу (индивиды без признаков облитерирующих заболеваний аорты и артерий нижних конечностей):

$$y = -19,9638 + 1,1212x_1 + 0,394x_2 + 0,1115x_3,$$

где x_1 – уровень гомоцистеина в крови (мкмоль/л), x_2 – уровень Д-димера в крови (мкг/мл), x_3 – количество тромбоцитов в крови ($\times 10^9$ /л).

Данная модель позволяет прогнозировать риск развития раннего тромбоза зоны реконструкции после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей.

Для увеличения процента правильных дискриминаций в группу больных с ранним тромбозом зоны реконструкции после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей мы дополнительно использовали данные генетического тестирования этих индивидов по локусам 455 G/A FGB, 677 C/T MTHFR. Было установлено, что комбинация генетических вариантов 455 A FGB и 677 T MTHFR является фактором риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции после операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей. Для исследуемых групп пациентов получены две дискриминантные функции, включающие следующие генетические и лабораторные показатели: генетические варианты по локусам 455 G/A FGB и 677 C/T MTHFR, уровень Д-димера, гомоцистеина, количество тромбоцитов, уровень фибриногена, антитромбина III, ЛПНП и ЛПВП в крови. Выявленные нами показатели при дискриминантном анализе дали значение критерия Уилкса 0,21489, при $F(8,70) = 31,969$ и $p < 0,0000$. Эти данные позволили заключить, что две рассматриваемые группы индивидов (с развитием раннего тромбоза в зоне реконструкции и контрольная группа) по набору из восьми изученных параметров демонстрируют неслучайную межгрупповую вариацию. Точность распознавания пациентов, относящихся к I группе исследования с ранним тромбозом зоны реконструкции, составляет 95,46% (в отличие от 88,64% в ЛДФ без учета генетических вариантов), а к контрольной группе – 100%. В среднем процент правильных дискриминаций в I группу исследования и в III контрольную группу на основе данных о генетических вариантах по локусам 455 G/A FGB, 677 C/T MTHFR и лабораторных показателях (уровней Д-димера, гомоцистеина, уровень фибриногена, антитромбина III, ЛПНП и ЛПВП и количество тромбоцитов в крови) составляет 97,47% по сравнению с 93,67% в ЛДФ без учета генетических вариантов.

В данном случае мы имеем следующие уравнения ЛДФ: 1) для отнесения в группу больных с ранним тромбозом зоны реконструкции после операции на брюшной аорте и артериях нижних конечностей:

$$y = -101,554 + 8,549x_1 + 5,193x_2 + 1,733x_3 + 0,154x_4 + 3,796x_5 + 0,735x_6 + 1,255x_7 + 8,135x_8,$$

2) для отнесения в контрольную группу (индивиды без признаков облитерирующих заболеваний аорты и артерий нижних конечностей):

$$y = -71,4118 + 6,1074x_1 + 1,6767x_2 + 1,0168x_3 + 0,1197x_4 + 2,8396x_5 + 0,6612x_6 + 2,4880x_7 + 6,1074x_8,$$

где x_1 – генетический полиморфизм 455 G/A FGB, 677 C/T MTHFR (1- комбинация аллелей 455 A FGB и 677 T MTHFR, 2- другие комбинации генетических вариантов по локусам 455 G/A FG и 677 C/T MTHFR). Подставляя значения соответствующих показателей конкретного пациента в вышеуказанные уравнения ЛДФ, рассчитываем значение y . Для какой группы (больные с ранним тромбозом зоны реконструкции или контрольной группы) значение y является максимальным, в ту группу следует отнести пациента.

Разработанная нами модель прогнозирования риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции (патент №2617418 от 25.04.17) с учетом влияния генетических вариантов показывает более высокий процент точности прогноза по сравнению с моделью, рассматривавшую только лабораторные показатели. Диагностическая специфичность на 7% выше (96% против 89%), что близко к математически рассчитанным процентам правильных дискриминаций в группах (97,47% и 93,67% соответственно). Диагностическая эффективность выше на 5% (82% против 78%), прогностическая ценность положительного результата выше на 0,22 (0,76 против 0,54). Сопоставимые результаты по диагностической чувствительности (67%) и прогностической ценностью отрицательного результата (0,94 и 0,93 соответственно), что дает возможность более точного выявления больных с повышенным риском развития раннего тромбоза зоны реконструкции с целью проведения максимально персонализированных способов медикаментозной профилактики тромбозов и активного динамического наблюдения за этой группой больных в послеоперационном периоде.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с тромбозом зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте, артериях нижних конечностей выявлено статистически значимое повышение уровней антитромбина III, гомоцистеина, Д-димера, количества тромбоцитов, фибриногена, триглицеридов, ЛПОНП и снижение уровня ЛПВП в крови у пациентов с тромбозом зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте, артериях нижних конечностей по сравнению с группой контроля и увеличение уровней гомоцистеина, фибриногена, триглицеридов в крови и замедление тромбинового времени в группе больных без тромбоза зоны реконструкции ($p < 0,05$).
2. Генетический вариант 20210 GA FII ассоциирован с повышенным уровнем гомоцистеина и Д-димера в крови. Генотипы 455 GA FGB и 455 AA FGB маркируют повышенный уровень Д-димера в крови. Генетические варианты 677 CT и 677 TT MTHFR связаны с повышенным уровнем триглицеридов в крови и укорочением тромбинового времени, а генотип 677 TT MTHFR ассоциирован со сниженным уровнем липопротеидов высокой плотности в крови.
3. Сочетание генетических вариантов 677 T MTHFR и 455 A FGB встречается среди больных с тромбозом зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операций на брюшной аорте, артериях нижних конечностей чаще (27,27%), чем в контрольной группе (8,57%) и является фактором риска развития ранней тромботической окклюзии зоны реконструкции при операциях на брюшной аорте и артериях нижних конечностей ($OR=4,0$).
4. Разработана модель прогнозирования риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции, включающая генетические варианты по локусам 455 G/A FGB и 677 C/T MTHFR, количество тромбоцитов в крови, уровень Д-димера, гомоцистеина, фибриногена, антитромбина III, ЛПНП и ЛПВП в крови.

5. Математическая модель прогнозирования риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции с учетом влияния генетических вариантов показывает более высокий процент точных прогнозов развития тромботических осложнений по сравнению с моделью, в основе которой используются только клинико-лабораторные показатели - диагностическая специфичность (96% против 89%) и диагностическая эффективность (82% против 78%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для определения возможного развития тромботической окклюзии зоны реконструкции у больных, перенесших оперативные вмешательства на брюшной аорте и артериях нижних конечностей, рекомендовано проводить молекулярно-генетическое тестирование факторов коагуляции 20210G/A FII, 677 C/T MTHFR, 455 G/A FGB в дооперационном периоде.

2. В группе пациентов с высоким риском развития тромботической окклюзии зоны реконструкции после оперативных вмешательств на брюшной аорте и артериях нижних конечностей рекомендуем использовать уравнения линейных дискриминантных функции, включающие в себя следующие предикторы развития тромбоза: генетические варианты по локусам 455 G/A FGB и 677 C/T MTHFR, количество тромбоцитов в крови, уровень Д-димера, гомоцистеина, фибриногена, антитромбина III, ЛПНП и ЛПВП в крови.

3. У больных перед реконструктивной операцией на брюшной аорте и артериях нижних конечностей в качестве маркеров повышенного риска развития тромбоза зоны реконструкции рекомендуем использовать сочетание генетических вариантов 677 T MTHFR и 455 A FGB.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алборов, Р. Г. Постоянное внутрисосудистое свёртывание крови при изменении интенсивности липопероксидации / Р. Г. Алборов // Успехи соврем. естествознания. – 2003. – № 6. – С. 37–42.
2. Антифосфолипидные антитела и гипергомоцистеинемия как факторы риска тромботических осложнений после операции на аорте и магистральных артериях у пациентов молодого возраста / И. А. Кустов [и др.] // Бюл. НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. – 2006. – Т. 7, № 1. – С. 46–53.
3. Баркаган, З. С. Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных / З. С. Баркаган, Г. И. Костюченко // Бюл. Сиб. отд-ния Рос. акад. мед. наук. – 2006. – Т. 26, № 2. – С. 132–138.
4. Белов, Ю. В. Повторные реконструктивные операции на аорте и магистральных артериях / Ю. В. Белов, А. Б. Степаненко. – Москва : Мед. информ. агентство, 2009. – 176 с.
5. Биохимия : учеб. для студентов мед. вузов / под ред. Е. С. Северина. – Москва : ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 779 с.
6. Бокарев, И. Н. Тромбофилии, венозные тромбозы и их лечение / И. Н. Бокарев, М. И. Бокарев // Клин. медицина. – 2002. – № 5. – С. 4–8.
7. Бокарев, И. Н. Венозный тромбоэмболизм и тромбоэмболия легочной артерии / И. Н. Бокарев, Л. В. Попова. – Москва : Мед. информ. агентство, 2005. – 208 с.
8. Бокерия Л. А. Здоровье населения Российской Федерации и хирургическое лечение болезней сердца и сосудов в 2012 г. / Л. А. Бокерия, Р. Г. Гудкова. – М. : Изд-во НЦССХ им А.Н. Бакулева, 2013. – С. 3–13.
9. Боровиков, В. П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере : для профессионалов / В. П. Боровиков. – Санкт-Петербург : Питер, 2001. – 650 с.
10. Боровиков, В. П. Программа STATISTICA для студентов и инженеров / В. П. Боровиков. – 2-е изд. – Москва : КомпьютерПресс, 2001. – 301 с.

11. Бурков, Н. Н. Прогнозирование риска развития тромбозов и стенозов биопротезов «кемангиопротез» путем построения математической модели / Н. Н. Бурков, И. Ю. Журавлева, Л. С. Барбараш // Комплекс. проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2013. – № 4. – С. 5–11.

12. Вавилова, Т. В. Лабораторные исследования в мониторинге антитромботической терапии / Т. В. Вавилова // Новости хирургии. – 2010. – Т. 18, № 3. – С. 150–161.

13. Вейр, Б. Анализ генетических данных : дискретные генетические признаки / Б. Вейр ; пер. с англ. Д. В. Зайкина [и др.] ; под ред. Л. А. Животовского, А. И. Пудовкина. – Москва : Мир, 1995. – 400 с.

14. Влияние генетических факторов, ассоциированных с тромбозами, на долгосрочный прогноз больных с хронической ишемической болезнью сердца / А. Л. Комаров [и др.] // Рацион. фармакотерапия в кардиологии. – 2011. – Т. 7, № 4. – С. 409–425.

15. Гемореологические параметры у больных артериальной гипертонией с нарушениями липидного обмена / Е. Д. Абрашкина [и др.] // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 15–19.

16. Генетическая паспортизация населения – новая технология профилактики и реабилитации в медицине / В. Третьяков [и др.] // Эстет. медицина. – 2008. – Т. VII, № 2. – С. 165–180.

17. Генетическая предрасположенность к венозному тромбозу : роль полиморфизмов компонентов плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза / С. И. Капустин [и др.] // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. – 2004. – Т. 11, № 3. – С. 10–15.

18. Генетически обусловленные тромбофилические состояния как фактор риска ишемических нарушений мозгового кровообращения у пациентов молодого возраста / И. В. Зорилова [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии. Прил. Инсульт. – 2006. – № 18. – С. 17–25.

19. Генотипирование по генам GРIПA и протромбина пациентов с дислипидемиями, страдающих ишемической болезнью сердца / Т. Ю. Зотова [и др.] // Вестн. новых мед. технологий. – 2007. – Т. XIV, № 2. – С. 43–45.

20. Д-димер, фибриноген и уровень артериального давления. Анализ популяции взрослого населения Томска: исследование ЭССЕ-РФ / А. Б. Добровольский [и др.] // Атеротромбоз. – 2014. – № 2. – С. 19–24.

21. Дерябин, В. Е. Многомерные биометрические методы для антропологов / В. Е. Дерябин. – Москва, 2001. – 243 с.

22. Добровольский, А. Б. Образование тромбина и его функции в системе гемостаза / А. Б. Добровольский, Е. В. Титаева // Атеротромбоз. – 2013. – № 1. – С. 66–72.

23. Долгов, В. В. Турбидиметрия в лабораторной практике : [метод. руководство] / В. В. Долгов, О. П. Шевченко, А. А. Шарышев. – Москва : Реафарм, 2007. – 175 с.

24. Драпкина, О. М. Атерогенная дислипидемия и печень / О. М. Драпкина, Е. Л. Буеверова, В. Т. Ивашкин // Мед. алфавит. – 2012. – Т. 4, № 24. – С. 30–35.

25. Животовский, Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях / Л. А. Животовский // Теоретическая популяционная генетика : [сб. ст.] / науч. ред. Ю. М. Свирежев. – Москва, 1983. – С. 76–104. – (Итоги науки и техники / ВИНТИ. Сер. Общая генетика ; т. 8).

26. Интраоперационное применение низкомолекулярных гепаринов при реконструктивных сосудистых операциях / А. В. Покровский [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 14, № 3. – С. 11–17.

27. Казанцев, А. В. Исследование системы гемостаза и маркеров дисфункции эндотелия у больных с облитерирующим атеросклерозом бедренно-подколенной локализации / А. В. Казанцев, Е. А. Корымасов // Науч. вед. Белгород. гос. ун-та. Сер. Медицина. Фармация. – 2010. – Т. 12, № 22. – С. 80–85.

28. Калинин, Р. Е. Прогностическое определение полиморфизма некоторых генов с целью улучшения результатов хирургического лечения атеросклероза артерий нижних конечностей / Р. Е. Калинин, П. Г. Швальб, А. А. Никифоров //

Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 15, № 2. – С. 363–365. – (Материалы 19-й (XXIII) Междунар. конф. Рос. о-ва ангиологов и сосудистых хирургов (Краснодар, 16–18 июня 2008 г.)).

29. Капустин, С. И. Генетические детерминанты наследственной тромбофилии в патогенезе венозного тромбоза / С. И. Капустин, М. Н. Блинов, Л. П. Папаян // Терапевт. арх. – 2003. – № 10. – С. 78–80.

30. Кирющенко, П. А. Физиология системы гемостаза и ее особенности при неосложненной беременности / П. А. Кирющенко // Эффектив. фармакотерапия. – 2010. – № 4. – С. 18–22.

31. Клиническая ангиология : руководство / под ред. А. В. Покровского. – Москва : Медицина, 2004. – Т. 1. – 808 с.

32. Коагулопатия и повторные ишемические нарушения мозгового кровообращения / М. А. Домашенко [и др.] // Атмосфера. Нервные болезни. – 2005. – № 3. – С. 36–40.

33. Козлова, Т. В. Гипергомоцистеинемия как клиническое проявление риска тромбозов / Т. В. Козлова // Клин. медицина. – 2005. – № 2. – С. 9–12.

34. Костюченко, Г. И. Гипергомоцистеинемия: клиническое значение, возрастные особенности, диагностика и коррекция / Г. И. Костюченко // Клин. геронтология. – 2007. – № 4. – С. 32–40.

35. Кузнецов, М. Р. Современное состояние проблемы реокклюзий после реконструктивных вмешательств на артериях таза и нижних конечностей у больных облитерирующим атеросклерозом / М. Р. Кузнецов, К. В. Комов, С. А. Тепляков // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2009. – Т. 15, № 4. – С. 145–151.

36. Курьянов, П. С. Гиперплазия интимы в зоне сосудистого анастомоза / П. С. Курьянов, А. С. Разуваев, В. Н. Вавилов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – № 14. – С. 146–151.

37. Лабораторные методы исследования системы гемостаза и диагностика нарушений системы гемокоагуляции / Ю. В. Первушин [и др.]. – Ставрополь ; Москва : Москва, 2009. – 61 с.

38. Лазаренко, В. А. Гипергомоцистеинемия: периферический атеросклероз и реконструктивная хирургия / В. А. Лазаренко, Е. А. Бобровская, А. В. Сорокин // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2014. – № 4. – С. 63–66.

39. Ли, Ч. Ч. Введение в популяционную генетику / Ч. Ч. Ли ; пер. с англ. Е. А. Салменковой, Е. Я. Тетушкина ; под ред. Ю. П. Алтухова, Л. А. Животовского. – Москва : Мир, 1995. – 555 с.

40. Липовецкий, Б. М. Поражения аорты и ее брахиоцефальных ветвей при дислипидемических состояниях / Б. М. Липовецкий // Рос. кардиол. журн. – 2005. – № 3. – С. 38–40.

41. Лифанов, А. Д. Ассоциация полиморфизмов генов MTHFR, MTR и MTRR с развитием гипергомоцистеинемии у спортсменов / А. Д. Лифанов // Ученые зап. ун-та им. П. Ф. Лесгафта. – 2013. – № 8. – С. 98–101.

42. Макацария, А. Д. Тромбозы и эмболии в акушерско-гинекологической клинике : молекулярно-генетические механизмы и стратегия профилактики тромбоэмболических осложнений : руководство для врачей / А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе, С. В. Акиньшина. – Москва : Мед. информ. агентство, 2007. – 1064 с.

43. Максимов, В. А. ПТФЭ-протезы в реконструктивной хирургии бедренно-подколенного сегмента при критической ишемии конечности / В. А. Максимов, С. М. Хизриев // Стратегия применения и результаты. – 2015. – Т. 1, № 4. – С. 101–104.

44. Метаболические и генетические предикторы рестеноза и тромбоза артериальных биопротезов в бедренно-подколенной позиции / Н. Н. Бурков [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013. – № 3. – С.131–136.

45. Метаболические предикторы рестеноза и тромбоза артериальных биопротезов в бедренно-подколенной позиции / Л. С. Барбараш [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – № 1. – С. 29–34.

46. Метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) при различных типах ремоделирования сердца / А. Э. Пушкарева [и др.] // Мед. вестн. Башкортостана. – 2012. – Т. 7, № 4. – С. 40–44.

47. Моисеев, И. С. Диагностическое значение исследования антитромбина III при веноокклюзионной болезни печени после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / И. С. Моисеев, Б. В. Афанасьев // Ученые зап. СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. – 2012. – Т. XIX, № 4. – С. 46–50.

48. Молекулярные основы предрасположенности к венозному тромбозу : роль «ген-генных» взаимодействий / М. Н. Блинов [и др.] // Тромбоз гемостаз и реология. – 2008. – № 3. – С. 24–31.

49. Морфологические изменения в артериальной стенке при рестенозе после реконструктивно-восстановительных и эндоваскулярных вмешательств / П. Г. Швальб [и др.] // Арх. патофизиологии. – 2008. – № 1. – С. 42–44.

50. Наследственные формы тромбофилии у больных с венозным тромбозом / Е. В. Мясенко [и др.] // Регионар. кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 21–25.

51. Наумов, А. В. Гомоцистеин в патогенезе микроциркуляторных и тромботических осложнений / А. В. Наумов, Т. Н. Гриневич, В. М. Найдина // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2012. – № 1. – С. 9–19.

52. Наумов, А. В. Роль нарушений процессов метилирования и обмена метионина в патогенезе заболеваний человека / А. В. Наумов // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2007. – № 1. – С. 4–7.

53. Основные тенденции распределения протромботических полиморфизмов генов у пациентов с флеботромбозами г. Новосибирска / А. И. Шевела [и др.] // Экология человека. – 2010. – № 7. – С. 36–41.

54. Отдаленные результаты применения биопротезов с различной антитромботической модификацией в инфраингвинальной позиции / Л. С. Барбараш [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – № 2. – С. 21–25.

55. Пантелеев, М. А. Свертывание крови: биохимические основы / М. А. Пантелеев, Ф. И. Атауллаханов // Клин. онкогематология. – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 50–62.

56. Папаян, Л. П. Современное представление о механизме регуляции свертывания крови / Л. П. Папаян // Тромбоз, гемостаз и реология. –2004. – № 2. – С. 7–11.

57. Патогенетическое и клиническое обоснование комплексной профилактики гипергомоцистеинемии / М. Ю. Андрианова [и др.] // Арх. внутр. медицины. – 2014. – № 4. – С. 32–38.

58. Пизова Н. В. Тромбофилии: генетические полиморфизмы и сосудистые катастрофы / Н. В. Пизова. – Москва : ИМА-ПРЕСС, 2013. – 248 с.

59. Показания и противопоказания // Баллонная ангиопластика при ишемии нижних конечностей / И. И. Затевахин, В. Н. Шиповский, В. Н. Золкин. – М. : Медицина, 2004. – Гл. 6. – С. 115–126.

60. Показатели системы гемостаза, липидного обмена и продукты липопероксидации у больных ишемической болезнью сердца / Э. Н. Коробейникова [и др.] // Клин. и эксперим. исслед. – 2014. – № 3. – С. 91–95.

61. Покровский, А. В. Состояние сосудистой хирургии в России в 2014 году / А. В. Покровский, В. Н. Гонтаренко ; Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов. – Москва, 2015. – 99 с.

62. Покровский, А. В. Что могут сегодня сосудистые хирурги / А. В. Покровский // 50 лекций по хирургии / под ред. В. С. Савельева. – Москва, 2003. – С. 39–48.

63. Покровский, А. В. Результаты использования комбинированных шунтов с дистальным анастомозом ниже щели коленного сустава / А. В. Покровский, Д. И. Яхонтов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 20, № 2. – С. 140–147.

64. Покровский, А. В. Состояние сосудистой хирургии в России в 2016 году / А. В. Покровский, А. С. Ивандаев ; Рос. о-во ангиологов и сосудистых хирургов. – Москва, 2017. – 76 с.

65. Полиморфизм генов 5,10- метилентетрагидрофолатредуктазы, протромбина и V фактора свертывания крови у молодых больных с ишемическим

инсультом / Л. А. Добрынина [и др.] // Клиническая медицина. – 2012. – Т. 90, № 3. – С. 37–40.

66. Прогнозирование ранних тромбогеморрагических осложнений после реконструктивных операций на магистральных артериях нижних конечностей / А. А. Полянец [и др.] // Вестн. Волгогр. гос. мед. ун-та. – 2004. – № 11. – С. 68–72.

67. Профилактика стеноза сосудистых анастомозов при хирургическом лечении хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / М. Р. Кузнецов [и др.] // Хирургия. Журн. им. Н.И. Пирогова. – 2010. – № 11. – С. 56–61.

68. Работа на автоматических коагулометрах Sysmex серии CA-1500 с использованием реагентов торговой марки «Ренам»: методическое руководство / А. А. Козлов [и др.]. – Москва: Принт, 2013. – 54 с.

69. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных: применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – Москва: Медиа Сфера, 2006. – 305 с.

70. Роль генетических полиморфизмов в возникновении венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений [Электронный ресурс] / А. С. Петриков [и др.] // Медицина и образование в Сибири. – 2012. – № 4. – С. [1–9]. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=781

71. Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия (прил.). – 2013. – Т. 19, № 2. – С.1–75.

72. Сажинов, А. П. Пути улучшения проходимости бедренно-подколенно-берцовых шунтов / А. П. Сажинов, А. В. Лукинский, А. В. Чупин // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 20, № 1. – С. 141–145.

73. Сердечная, Е. В. Генетические полиморфизмы в риске артериальных тромбозов у больных с фибрилляцией предсердий / Е.В. Сердечная, Б.А. Татарский, Е.В. Казакевич // Клиническая медицина. – 2008. – № 12. – С. 30–33.

74. Система гомеостаза у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС с дисциркуляторной энцефалопатией / Л. А. Авдушкина [и др.] // Медико-биол. и социально-психол. проблемы безопасности в чрезвычайн. ситуациях. – 2011. – № 2. – С. 73–78.

75. Современное состояние проблемы реокклюзии после реконструктивных вмешательств на артериях таза и нижних конечностей у больных облитерирующим атеросклерозом / М. Р. Кузнецов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2009. – Т. 15, № 4. – С. 145–151.

76. Современные методологические аспекты лабораторной диагностики системы протеина С и значение ее исследования для хирургии / В. В. Егорова [и др.] // Мед. алфавит. – 2013. – Т. 3, № 16. – С. 12–17.

77. Современные методы распознавания состояния тромботической готовности : монография / А. П. Момот [и др.] ; под ред. А. П. Момота. – Барнаул : Изд-во Алтайского гос. ун-та, 2011. – 138 с.

78. Солошенкова, О. О. Дислипидемии в клинической практике. Ч. 1 / О. О. Солошенкова, И. И. Чукаева, Н. В. Орлова // Лечеб. дело. – 2009. – № 3. – С. 12–17.

79. Староверов, И. Н. Особенности морфологических изменений сосудистой стенки при рестенозе / И. Н. Староверов, А. В. Кораблев, О. М. Лончакова // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова. – 2014. – № 1. – С. 26–31.

80. Страмбовская, Н. Н. Мутация FV (Лейден), аномалия в гене протромбина (G20210A), мутация в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР C677T) как факторы риска развития ишемического инсульта / Н. Н. Страмбовская, Ю. А. Витковский // Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН. – 2008. – № 3. – С. 139–140.

81. Султаниян, Т. Л. Осложнения после реконструктивных операций на магистральных артериях нижних конечностей и методы их коррекции / Т. Л. Султаниян, А. С. Саркисян, А. М. Хачатрян // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013. – Т. 19, № 1. – С. 124–128.

82. Суслина, З. А. Антитромботическая терапия ишемических нарушений мозгового кровообращения с позиций доказательной медицины / З. А. Суслина, М. М. Танамян, М. А. Домашенко. – Москва : Мед. информ. агентство, 2009. – 224 с.

83. Сушкевич, Г. Н. Патогенез и лабораторная диагностика гемостатических нарушений при тромбофилиях различного генеза / Г. Н. Сушкевич // Лаборатор. диагностика. – 2009. – № 10. – С. 11–22.

84. Тарханова, И. Ю. Влияние гомоцистеина на гемостаз у больных артериальной гипертензией / И. Ю. Тарханова, М. М. Фазлыев, Г. Х. Мирсаева // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии : материалы 4-й Всерос. науч. конф. – Москва, 2009. – С. 511–511.

85. Тромбофилические состояния обусловленные мутацией генов (PAI-1, MTHFR) / А. С. Толеуова [и др.] // Успехи соврем. естествознания. – 2013. – № 7. – С. 23–26.

86. Тромбоэмболия легочной артерии и тромбофилии: оптимизация диагностики и лечения / А. В. Никитин [и др.] // Клин. медицина. – 2006. – № 6. – С. 21–24.

87. Фатеева, В. В. Патогенез эндотелиальной дисфункции при церебральном атеросклерозе и способы ее коррекции / В. В. Фатеева // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2017. – Т. 117, № 12. – С. 67–70.

88. Федосеева, А. А. Гомоцистеин сыворотки крови и некоторые показатели гемостаза при дегенеративно-дистрофических заболеваниях тазобедренного сустава / А. А. Федосеев, Д. Я. Алейник // Мед. альм. – 2012. – № 1. – С. 149–152.

89. Ханин, М. А. Физиологические механизмы свертывания крови / М. А. Ханин, К. В. Тюрин // Онкогематология. – 2007. – № 3. – С. 70–76.

90. Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей – диагностика и тактика лечения / В. Н. Оболенский [и др.] // Рус. мед. журн. – 2010. – № 17. – С. 1049–1054.

91. Шилова, А. Н. Тромбоэмболия легочных артерий на фоне гипергомоцистеинемии / А. Н. Шилова, А. А. Карпенко, Ю. Е. Клеванец // *Ангиология и сосудистая хирургия.* – 2015. – Т. 21, № 1. – С. 25–27.

92. Шмелева, В. М. Состояние окислительных и антиокислительных систем у больных с атеросклерозом при наличии и отсутствии гипергомоцистеинемии / В. М. Шмелева, Л. И. Рыбакова // *Казан. мед. журн.* – 2008. – № 3. – С. 281–285.

93. Яковлев, В. Б. Тромбоэмболия легочной артерии: патофизиология, диагностика, лечебная тактика / В. Б. Яковлев, М. В. Яковлева // *Флебология.* – 2005. – Т. 7, № 6. – С. 493–499.

94. 2011 ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases / C. Brognaux [et al.] // *Rev. Med. Liege.* – 2012. – Vol. 67, Iss. 11. – P. 560–565.

95. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS) / V. Aboyans [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2018. – Vol. 39, Iss. 9. – P. 763–816.

96. A Genome Search for Genetic Determinants That Influence Plasma Fibrinogen Levels / J. M. Soria [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 1288–1292.

97. A Gibbs sampler for identification of symmetrically structured, spaced DNA motifs with improved estimation of the signal length / A. V. Favorov [et al.] // *Bioinformatics.* – 2005. – Vol. 21, Iss. 10. – P. 2240–2245.

98. A model for the harmonisation of test results of different quantitative D-dimer methods / P. Meijer [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 95, Iss. 3. – P. 567–572.

99. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors / A. R. Folsom [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 99, Iss. 8. – P. 2720–2725.
100. Adam, S. S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects / S. S. Adam, N. S. Key, C. S. Greenberg // *Blood*. – 2009. – Vol. 113, № 13. – P. 2878–2887.
101. Ali, N. High prevalence of protein C, protein S, antithrombin deficiency, and Factor V Leiden mutation as a cause of hereditary thrombophilia in patients of venous thromboembolism and cerebrovascular accident / N. Ali, M. Ayyub, S. A. Khan // *Pak. J. Med. Sci.* – 2014. – Vol. 30, Iss. 6. – P. 1323–1326.
102. Analysis of prothrombotic mutations and polymorphisms in children who developed thrombosis in the perioperative period of congenital cardiac surgery / N. Ozbek [et al.] // *Cardiol. Young.* – 2005. – Vol. 15, Iss. 1. – P. 19–25.
103. Analytical performances of the D-dimer assay for the Immulite 2000 automated immunoassay analyzer / G. Lippi [et al.] // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2007. – Vol. 29. – P. 415–420.
104. Anderson, F. Risk factors for venous thromboembolism / F. Anderson, F. Spencer // *Circulation*. – 2003. – Vol. 107, Iss. 23, Suppl. I. – P. 9–16.
105. Arterial reoperation of the aorto-femoral segment / T. Zakhariyev [et al.] // *Khirurgiia (Sofia)*. – 2000. – Vol. 56, Iss. 2. – P. 10–13.
106. Ashjazadeh, N. Evaluation of Homocysteine Level as a Risk Factor among Patients with Ischemic Stroke and Its Subtypes / N. Ashjazadeh, M. Fathi, A. H. Shariat // *Iran. J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 38, № 3. – P. 233–239.
107. Association of the C677T methylentetrahydrofolate reductase mutation with congenital heart diseases / C-N. Lee [et al.] // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2005. – Vol. 84, Iss. 12. – P. 1134–1140.
108. Atorvastatin and quinapril inhibit blood coagulation in patients with coronary artery disease following 28 days of therapy / A. Undas [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – №4. – P. 2397–2404.

109. Autoantibodies against endothelial protein C receptor and the risk of a first deep vein thrombosis / A. Van Hylckama Vlieg [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2007. – Vol. 5, Iss. 7. – P. 1449–1454.
110. Barre, D. E. The molecular nature and consequences of lipoprotein(a)'s association with platelets / D. E. Barre // *Protein Pept. Lett.* – 2007. – Vol. 14, Iss. 9. – P. 839–842.
111. Bilateral renal artery thrombosis in inherited thrombophilia: a rare cause of acute kidney injury / K. S. Wiles [et al.] // *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* – 2014. – Vol. 7. – P. 35–38.
112. Bouwens, E. A. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway / E. A. Bouwens, F. Stavenuiter, L. O. Mosnier // *J. Thromb. Haemost.* – 2013. – Vol. 11, Suppl. 1. – P. 242–253.
113. Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg (BASIL) trial: Analysis of amputation free and overall survival by treatment received / A. W. Bradbury [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2010. – Vol. 51, 5 Suppl. – P. 18–31.
114. Cavusoglu, E. Editorial comment: plasma homocysteine, coronary risk factors and serum nitrite in coronary artery disease and vascular syndrome X / E. Cavusoglu // *Anadolu Kardiyol. Derg.* – 2003. – Vol. 3, Iss. 1. – P. 35–37.
115. Chapin, J. C. Fibrinolysis and the control of blood coagulation / J. C. Chapin, K. A. Hajjar // *Blood Reviews.* – 2015. – Vol. 29, Iss. 1. – P. 17–24.
116. Choi, S. H. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin / S. H. Choi, S. A. Smith, J. H. Morissey // *Blood.* – 2011. – Vol. 118, Iss. 26. – P. 6963–6970.
117. Circulating markers of endothelial dysfunction and platelet activation in patients with severe symptomatic cerebral small vessel disease / P. C. Lavallée [et al.] // *Cerebrovasc. Dis.* – 2013. – Vol. 36, Iss. 2. – P. 131–138.
118. Clinical syndromes associated with acquired antithrombin deficiency via microvascular leakage and the related risk of thrombosis / S. Ornaghi [et al.] // *Thromb. Res.* – 2014. – Vol. 133, Iss. 6. – P. 972–984.

119. Combinations of 4 mutations (FV R506, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210 G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family / E. Castoldi [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 96, Iss. 4. – P. 1443–1448.

120. Combined carrier status of prothrombin 20210A and factor XIII-A Leu34 alleles as a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction / C. Butt [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 102, Iss. 4. – P. 1558–1559.

121. Comments on the ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. A report of the Task Force of the Clinical Practice Guidelines Committee of the Spanish Society of Cardiology / Grupo de Trabajo de SEC para Guía ESC de enfermedad arterial periférica ; A. Cequier [et al.] // *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed)*. – 2012. – Vol. 65, Iss. 2. – P. 119–124.

122. C-reactive protein promotes monocyteplatelet aggregation: an additional link to the inflammatory thrombotic intricacy / H. D. Danenberg [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2007. – Vol. 78, Iss. 3. – P. 246–252.

123. Crowther, M. Pathogenesis of atherosclerosis / M. Crowther // *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*. – 2005. – Vol. 2005, No. 1. – P. 436–441.

124. Davis, C. D. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions / C. D. Davis, E. O. Uthus // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 229, Iss. 10. – P. 988–995.

125. Decrease of carotid intimamedia thickness in patients at risk to cerebral ischemia after supplementation with folic acid, vitamins B6 and B12 / U. Till [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2005. – Vol. 181, Iss. 1. – P. 131–135.

126. Degen, S. J. F. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin / S. J. F. Degen, E. W. Davie // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26, Iss. 19. – P. 6165–6177.

127. Dempfle, C. E. Validation, calibration, and specificity of quantitative D-dimer assays / C. E. Dempfle // *Semin. Vasc. Med.* – 2005. – Vol. 5, Iss. 4. – P. 315–320.

128. Den Heijer, M. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies / M. Den Heijer, S. Lewington, R. Clarke // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 3, Iss. 2. – P. 292–299.

129. Facco, F. Genetic thrombophilias and intrauterine growth restriction: a meta-analysis / F. Facco, W. You, W. Grobman // *Obstet. Gynaecol.* – 2009. – Vol. 113, Iss. 6. – P. 1206–1216.

130. Factor V Leiden and myocardial infarction: a case, review of the literature with a meta-analysis / S. Doix [et al.] // *Ann. Cardiol. Angeiol (Paris).* – 2003. – Vol. 52, Iss. 3. – P. 143–149.

131. Factor V Leiden: The Copenhagen City Heart. Study and 2 metaanalyses / K. Juul [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 100, Iss. 1. – P. 3–10.

132. Fava, C. Atherosclerosis Is an Inflammatory Disease which Lacks a Common Anti-inflammatory Therapy: How Human Genetics Can Help to This Issue. A Narrative Review / C. Fava, M. Montagnana // *Front. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 9. – Article 55. – doi: 10.3389/fphar.2018.00055.

133. Fibrinogen, factor VII and PAI-1 genotypes and the risk of coronary and peripheral atherosclerosis: Edinburgh Artery Study / A. J. Lee [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 1999. – Vol. 81, Iss 4. – P. 553–560.

134. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods / E. J. Konings [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – Vol. 73, Iss. 4. – P. 765–776.

135. Franchini, M. Inherited thrombophilia: an update / M. Franchini, D. Veneri // *Clin. Lab.* – 2005. – Vol. 51, Iss. 7–8. – P. 357–365.

136. Gaffney, P. J. Fibrin degradation products. A review of structures found in vitro and in vivo / P. J. Gaffney // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 936, Iss. 1. – P. 594–610.

137. Gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population / B. Hoppe [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 96, Iss. 4. – P. 465–470.

138. Gene variants associated with deep vein thrombosis / I. D. Bezemer [et al.] // *JAMA.* – 2008. – Vol. 299, Iss. 11. – P. 1306–1314.

139. Generation and role angiotatin in human platelets / P. Jurasz [et al.] // *Blood.* – 2003. – Vol. 102, Iss. 9. – P. 3217–3223.

140. Genotype-phenotype relationship of F7 R353Q polymorphism and plasma factor VII coagulant activity in Asian Indian families predisposed to coronary artery disease / J. Shanker [et al.] // *J. Genet.* – 2009. – Vol. 88, Iss. 3. – P. 291–297.
141. Hauk, L. ACCF/AHA update peripheral artery disease management guideline / L. Hauk // *Am. Fam. Physician.* – 2012. – Vol. 85, Iss. 10. – P. 1000–1001.
142. Heemskerk, J. W. Platelet-based coagulation: different populations, different functions / J. W. Heemskerk, N. J. Mattheij, J. M. Cosemans // *J. Thromb. Haemost.* – 2013. – Vol. 11, Iss. 1. – P. 2–16.
143. High affinity binding of β 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II / K. Ma [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, Iss. 20. – P. 15541–15548.
144. Hoffman, M. A cell-based model of hemostasis / M. Hoffman, D. M. Monroe 3rd. // *Thromb. Haemost.* – 2001. – Vol. 85, Iss. 6. – P. 958–965.
145. Homocysteine and C-reactive protein associated with progression and prognosis of intracranial branch atheromatous disease / X. Men [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, Iss. 9. – e73030.
146. Howley, H. E. A systematic review of the association between factor V Leiden or prothrombin gene variant and intrauterine growth restriction / H. E. Howley, M. Walker, M. A. Rodger // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 192, Iss. 3. – P. 694–708.
147. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively / N. J. Royle [et al.] // *Somat. Cell Mol. Genet.* – 1987. – Vol. 13, Iss. 3. – P. 285–292.
148. Hybrid-Based External Iliac Endarterectomy With Stenting Provides Superior Primary Patency Compared With External Iliac Artery Stenting Alone / C. M. Kavanagh [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2015. – Vol. 62, No 3. – P. 827–828.
149. Increased plasma levels of lipoprotein(a) and the risk of idiopathic and recurrent venous thromboembolism / R. Marcucci [et al.] // *Am. J. Med.* – 2003. – Vol. 115, Iss. 8. – P. 601–605.

150. Influence of the β -fibrinogen-455G/A polymorphism on development of ischemic stroke and coronary heart disease / L. Gu [et al.] // *Thromb. Res.* – 2014. – Vol. 133, Iss. 6. – P. 993–1005.
151. Inherited Thrombophilia / H. M. Phillippe [et al.] // *J. Pharm. Pract.* – 2014. – Vol. 27, Iss. 3. – P. 227–233.
152. Inherited Thrombophilic Risk Factors and Venous Thromboembolism. Distinct Role in Peripheral Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism / M. Margaglione [et al.] // *Chest.* – 2000. – Vol. 118, Iss. 5. – P. 1405–1411.
153. Khor, B. Laboratory tests for antithrombin deficiency / B. Khor, E. M. Van Cott // *Am. J. Hematol.* – 2010. – Vol. 85, Iss. 12. – P. 947–950.
154. Kim, R. J. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies / R. J. Kim, R. C. Becker // *Am. Heart J.* – 2003. – Vol. 146, Iss. 6. – P. 948–957.
155. Lane, D. A. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease / D. A. Lane, P. J. Grant // *Blood.* – 2000. – Vol. 95, Iss. 5. – P. 1517–1532.
156. Left main coronary artery thrombus resulting from combined protein C and S deficiency / M. R. Sayin [et al.] // *Intern. Med.* – 2012. – Vol. 51, Iss. 21. – P. 3041–3044.
157. Level of fibrinogen and risk of fatal and non-fatal stroke. EUROSTROKE: a collaborative study among research centres in Europe / M. L. Bots [et al.] // *J. Epidemiol. Community Health.* – 2002. – Vol. 56, Suppl. 1. – P. i14–i18.
158. Manucci, P. M. The molecular basis of inherited thrombophilia / P. M. Manucci // *Vox Sang.* – 2000. – Vol. 78, Suppl 2. – P. 39–45.
159. Martinelli, I. Inherited risk factors for venous thromboembolism / I. Martinelli, V. De Stefano, M. Mannucci // *Nat. Rev. Cardiol.* – 2014. – Vol. 11, Iss. 3. – P. 140–156.
160. Mathew, C. C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA / C. C. Mathew // *Methods Mol. Biol.* – 1985. – No 2. – P. 31–34.

161. Methylenetetrahydrofolate reductase, alcohol dehydrogenase, diet, and risk of colorectal adenomas / E. Giovannucci [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2003. – Vol. 12, Iss 10. – P. 970–979.

162. Mild antithrombin deficiency and risk of recurrent venous thromboembolism: a prospective cohort study / M. N. Di Minno [et al.] // *Circulation.* – 2014. – Vol. 129, Iss. 4. – P. 497–503.

163. Mountain, D. The VIDAS D-dimer test for venous thromboembolism: a prospective surveillance study shows maintenance of sensitivity and specificity when used in normal clinical practice / D. Mountain, I. Jacobs, A. Haig // *Am. J. Emerg. Med.* – 2007. – Vol. 25, Iss. 4. – P. 464–471.

164. MTHFR 677C → T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis / M. Klerk [et al.] // *JAMA.* – 2002. – Vol. 288, Iss. 16. – P. 2023–2031.

165. Multiple gene polymorphisms predisposing to the prothrombotic state in an adolescent with acute myocardial infarction / A. Doğan [et al.] // *Cardiovasc. J. Afr.* – 2012. – Vol. 23, Iss. 3. – P. 6–8.

166. Percutaneous transluminal angioplasty for treatment of "below-the-knee" critical limb ischemia: early 159 outcomes following the use of sirolimus-eluting stents / M. Bosiers [et al.] // *J Cardiovasc. Surg. (Torino).* – 2006. – Vol. 47, No 2. – P. 171–176.

167. Plasma fibrin clot properties in arterial hypertension and their modification by antihypertensive medication / M. Rajzer [et al.] // *Thromb. Res.* – 2012. – Vol. 130, Iss. 1. – P.99–103.

168. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype / E. A. Podrez [et al.] // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13, Iss. 9. – P.1086–1095.

169. Polymorphisms in the protein C gene as risk factor for venous thrombosis / E. R. Pomp [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 101, Iss. 1. – P. 62–67.

170. Potential vascular mechanisms of ramipril induced increases in walking ability in patients with intermittent claudication / A. A. Ahimastos [et al.] // *Circ. Res.* – 2014. – Vol. 114, Iss. 7. – P. 1144–1155.

171. Prothrombotic markers in familial combined hyperlipidemia: evidence of endothelial cell activation and relation to metabolic syndrome / A. M. Georgieva [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2004. – Vol. 175, Iss. 2. – P. 345–351.

172. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version / R. B. Rutherford [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 1997. – Vol. 26, Iss. 3. – P. 517–538.

173. Risk Stratification for the Development of Respiratory Adverse Events Following Vascular Surgery / E. A. Genovese [et al.] // *J. Vasc. Surgery*. – 2015. – Vol. 62, Iss. 3. – P. 793–794.

174. Risk-factor profile in severe, generalized, obliterating vascular disease / J. Finsterer [et al.] // *South. Med. J.* – 2004. – Vol. 97, Iss 1. – P. 87–92.

175. Role of thrombophilia factors in acute systemic-pulmonary shunt obstruction / Y. Ergul [et al.] // *Pediatr. Int.* – 2015. – Vol. 57, Iss. 6. – P. 1072–1077.

176. Rosendaal, F. R. Genetics of venous thrombosis / F. R. Rosendaal, P. H. Reitsma // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 7, Suppl. 1. – P. 301–304.

177. Rutherford, R. B. Vascular surgery / R. B. Rutherford. – 6th ed. – Denver, 2005. – P. 193–380.

178. Schlesselman, J. J. Case-control studies: design, conduct, analysis / J. J. Schlesselman; with contributions by P. D. Stolley. – New York : Oxford University Press, 1982. – 354 p. : ill.

179. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66.155 cases and 91.307 controls / Z. Ye [et al.] // *Lancet*. – 2006. – Vol. 367, N 9511. – P. 651–658.

180. Sharp, L. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review / L. Sharp, J. Little // *Am. J. Epidemiol.* – 2004. – Vol. 159, Iss. 5. – P. 423–443.

181. Sheweita, S. A. Role of genetic changes in the progression of cardiovascular diseases / S. A. Sheweita, H. Baghdadi, A. R. Allam // *Int. J. Biomed. Sci.* – 2011. – Vol. 7, Iss. 4. – P. 238–248.

182. Siegerink, B. Genetic variation in fibrinogen; its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke / B. Siegerink, F. R. Rosendaal, A. Algra // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 7, Iss. 3. – P. 385–390.

183. The FibrinAssay Comparison Trial (FACT): evaluation of quantitative D-dimer assays as basis for the development of D-dimer calibrators. FACT study group / C. E. Dempfle, [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2001. – Vol. 85, Iss. 4. – P. 671–678.

184. The G20210A prothrombin polymorphism is not associated with increased thromboembolic risk in a large protein C deficient kindred / E. G. Bovill [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2000. – Vol. 83, Iss. 3. – P. 366–370.

185. The β -fibrinogen-455G/A gene polymorphism and the risk of ischaemic stroke in a Polish population / A. Golenia [et al.] // *Neurol. Neurochir. Polska.* – 2013. – Vol. 47, Iss. 2. – P. 152–156.

186. Thrombophilia and venous thromboembolism. International consensus statement. Guidelines according to scientific evidence / A. N. Nicolaides [et al.] // *International Angiology.* – 2005. – Vol. 24, Iss. 1. – P. 1–26.

187. Thrombosis of the aorta abdominalis in infants--diagnosis and thrombolytic therapy / U. Krause [et al.] // *Klin. Padiatr.* – 2012. – Vol. 224, Iss. 3. – P. 179–182.

188. Treatment of adverse perinatal outcome in inherited thrombophilias: a clinical study / A. Kosar [et al.] // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* – 2011. – Vol. 22, Iss. 1. – P. 14–18.

189. Vandiver, J. W. Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for monitoring unfractionated heparin / J. W. Vandiver, T. G. Vondracek // *Pharmacotherapy.* – 2012. – Vol. 32, Iss. 6. – P. 546–558.

190. Vossen, C. Y. The protective effect of the factor XIII Val34Leu mutation on the risk of deep venous thrombosis is dependent on the fibrinogen level / C. Y. Vossen, F. R. Rosendaal // *Thrombosis and Haemostasis.* – 2005. – Vol. 3, Iss. 5. – P. 1102–1103.

191. Yilmaz, S. Inherited risk factors in low-risk venous thromboembolism in patients under 45 years / S. Yilmaz, S. Gunaydin // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2015. – Vol. 20, Iss. 1. – P. 21–23.

192. Zotz, R. B. Thrombophilia in pregnancy: venous thromboembolism, fetal loss, preeclampsia, intrauterine growth restriction / R. B. Zotz, C. Sucker, A. Gerhardt // Hamostaseologie. – 2008. – Vol. 28, Iss. 5. – P. 455–464.