

УДК 616.13-089-06-056.7

## ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ТРОМБОФИЛИЙ С КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ ПО ПОВОДУ ОБЛИТЕРИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ БРЮШНОЙ АОРТЫ И АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

© Лазаренко В.А.<sup>1</sup>, Парфёнов Е.И.<sup>1</sup>, Чурносоев М.И.<sup>2</sup>, Бобровская Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра хирургических болезней факультета последипломного образования Курского государственного медицинского университета, Курск; <sup>2</sup> кафедра медико-биологических дисциплин Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

E-mail: [dr.parfy@mail.ru](mailto:dr.parfy@mail.ru)

Исследовалась ассоциация генетических полиморфизмов генов наследственных тромбофилий 1691G/A *FV*, 20210G/A *FII*, 677 C/T *MTHFR*, 455 G/A *FGB* с клинико-лабораторными показателями липидного обмена и факторов гемостаза 119 больных (мужчин), перенесших реконструктивные оперативные вмешательства на брюшной аорте и артериях нижних конечностей, разделенных на три группы. В первую группу вошли больные с тромбозом зоны реконструкции в первые 6 месяцев после операции (n=44), вторую группу составили пациенты без тромбоза зоны реконструкции (n = 40), третья группа состояла из мужчин без признаков облитерирующих заболеваний аорты и артерий нижних конечностей (n = 35). В ходе сравнительного анализа достоверно выявлена ассоциация генетического варианта 20210 GA *FII* с повышенным уровнем гомоцистеина и D-димера в крови, генетических вариантов 455 GA *FGB* и 455 AA *FGB* с повышенным уровнем D-димера в крови. Генетические варианты 677 CT и 677 TT *MTHFR* связаны с повышением уровня триглицеридов в крови и укорочением тромбинового времени, а генотип 677 TT *MTHFR* ассоциирован со сниженным уровнем липопротеидов высокой плотности в крови.

**Ключевые слова:** гены, наследственные тромбофилии, лабораторные показатели, оперативное лечение, тромбоз.

## ASSOCIATION STUDY OF GENETIC POLYMORPHISMS OF INHERITED THROMBOPHILIA GENES WITH CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS IN PATIENTS AFTER RECONSTRUCTIVE SURGERY FOR OBLITERATING DISEASES OF ABDOMINAL AORTA AND LOWER LIMB ARTERIES

Lazarenko V.A.<sup>1</sup>, Parfenov E.I.<sup>1</sup>, Churnosov M.I.<sup>2</sup>, Bobrovskaya E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Surgery of FPE of Kursk State Medical University, Kursk;

<sup>2</sup> Department of Biomedical Sciences of Belgorod State National Research University, Belgorod

We investigated the association of genetic polymorphisms of hereditary thrombophilia 1691G / A *FV*, 20210G / A *FII*, 677 C / T *MTHFR*, 455 G / A *FGB* with clinical and laboratory parameters of lipid metabolism and hemostasis factors in 119 patients (men) who had undergone reconstructive surgery on abdominal aorta and arteries of lower extremities, divided into three groups. The first group included patients with thrombosis of the reconstruction zone within the first 6 months after surgery (n = 44), the second group included patients without thrombosis of the reconstruction zone (n = 40), the third group consisted of men without symptoms of obliterating diseases of aorta and lower limb arteries (n = 35). The comparative analysis revealed the reliable relations of genetic variants 20210 GA *FII* with elevated levels of homocysteine and D-dimer test, genetic variants of 455 GA *FGB* and 455 AA *FGB* with elevated levels of D-dimer test. Genetic variants of CT 677 and TT 677 *MTHFR* are associated with the increased levels of triglycerides in blood and shortening of thrombin time, and the TT genotype of *MTHFR* 677 is associated with the reduced level of high density lipoproteins in blood.

**Keywords:** genes, hereditary thrombophilia, laboratory parameters, surgery, thrombosis.

Факторы риска тромбообразования и механизмы формирования тромбофилических состояний, создающие высокий риск развития тромбозов и тромбоэмболий, во многом определяют дальнейшее течение и последующий прогноз заболевания, как раннем послеоперационном периоде, так и в отдаленные сроки [5]. Современные диагностические лабораторные методы позволяют выявить нарушения гемостаза на дооперационном этапе и далее контролировать качество проводимой терапии в послеоперационном периоде [6]. Одним из основных и широко доступных методов исследования и контроля состояния системы

гемостаза является коагулограмма [1], а также некоторые отдельные исследования свертывающей системы крови, такие как антитромбин, D-димер и гомоцистеин [3], выделяемые из сыворотки крови больного. Гипергомоцистеинемия развивается вследствие повышения концентрации гомоцистеина к плазме крови и участвуя в формировании как венозных, так и артериальных тромбозов [9]. Способствуя развитию эндотелиальной дисфункции, активируя тромбоциты, гипергомоцистеинемия приводит к раннему развитию атеросклероза и тромбоза коронарных, церебральных и периферических артерий [7, 8], нарушению липидного обмена [2].

Антитромбин играет центральную роль в ингибировании коагуляции и воспалительных процессов сосудистого эндотелия, является основным ингибитором тромбина и других сериновых протеаз, в том числе факторов Ха и IXa [12]. Изменённые его уровни в плазме крови повышают риск тромбообразования в венозном и артериальном руслах [11, 14]. Роль нарушения обмена липидов в развитии атеросклероза на сегодняшний день не вызывает сомнений. В патогенезе атерогенной дислипидотеинемии ведущую роль играет нарушенный метаболизм липопротеидов, богатых триглицеридами [7]. Продукты такого нарушенного липидного обмена обладают выраженным тромбогенным влиянием на факторы физиологической системы гемостаза [13]. D-димер – это специфический продукт деградации фибрина, является диагностическим маркером активации системы гемостаза, который отражает процессы, как образования фибрина, так и его лизиса [10]. Повышение его концентрации выше 0,5 мкг/мл свидетельствует о высоком риске развития тромботических осложнений.

Коагулограмма в клинической практике наиболее доступный способ контроля за терапией непрямыми антикоагулянтами и определения расположенности к ряду гиперкоагуляционных состояний. Так, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) отражает активность всех факторов свёртывания, кроме фактора VII и используется для оценки состояния плазменного гемостаза при различных заболеваниях в предоперационном периоде и в контроле терапии нефракционированным гепарином [15]. Протромбиновое время – скрининговый тест для оценки внешнего каскада свертывания плазмы, в основном для определения активности фактора VII, контроля за лечением непрямыми антикоагулянтами, в исследовании системы гемостаза у больных при подготовке к оперативным вмешательствам.

Цель исследования – изучить взаимосвязь генетических полиморфизмов генов наследственных тромбофилий с клинико-лабораторными показателями в формировании риска развития раннего тромбоза зоны реконструкции у больных после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы образцы ДНК 119 больных (мужчин), перенесших реконструктивные оперативные вмешательства на брюшной аорте и артериях нижних конечностей, выделенные из

венозной крови, взятой из кубитальной вены в объёме 5 мл с последующей обработкой методом фенол-хлороформной экстракции. Исследование полиморфизма проводили с помощью методов полимеразной цепной реакции с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров с последующим анализом полиморфизма генов Лейденской мутации 1691G/A *FV*, протромбина 20210G/A *FII*, метилентетрагидрофолатредуктазы 677 C/T *MTHFR*, фибриногена 455 G/A *FGB* методом TaqMan зондов с помощью real-time ПЦР. Проводился забор венозной крови для клинического обследования: общий анализ крови, биохимический анализ крови, включая показатели липидного профиля (липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), триглицериды, холестерин). Коагулограмма: протромбиновый индекс (ПТИ), тромбиновое время (ТВ), АЧТВ, фибриноген, уровень гомоцистеина, антитромбина, D-димера. Количественное определение D-димера проводилось иммунотурбидиметрическим методом в плазме человека на анализаторе OLYMPUS (Япония) [5]. Определение антитромбина проводилось кинетическим колориметрическим тестом на аппарате COBAS INTEGRA 800 (Германия-Швейцария) [4, 5].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 7 и программы Statistica 6,0. Сравнительный анализ в группах проводили с расчётом критериев Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка ( $p < 0,05$ ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемая когорта ( $n = 119$ ) разделена на три группы. Первую группу составили больные после реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей, у которых развилась тромботическая окклюзия зоны реконструкции в течение первых 6 месяцев ( $n = 44$ ). Во вторую группу вошли больные, перенесшие аналогичные операции, не имеющие признаков тромбоза в зоне реконструкции по истечении 6 месяцев ( $n = 40$ ), в контрольную группу – мужчины без признаков хронических облитерирующих заболеваний аорты и артерий нижних конечностей ( $n = 35$ ). При анализе ассоциаций генетических полиморфизмов 1691G/A *FV*, 20210G/A *FII*, 677 C/T *MTHFR*, 455 G/A *FGB* с клинико-лабораторными показателями в исследуемой выборке индивидов,

выявлены значимые связи генетических вариантов наследственных тромбофилий с некоторыми показателями коагулограммы (ТВ, D-димер), уровнем гомоцистеина, показателями липидного профиля (ЛПВП, ЛПОНП, триглицериды).

Распределение всех исследуемых клинико-лабораторных показателей отличается 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).

Установлена ассоциация молекулярно-генетического маркера 20210 G/A *FII* с уровнем гомоцистеина: у индивидов 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

обследуемыми 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. 1).

Выявлено, что пациенты с генотипом 20210 GA *FII* имеют более высокий показатель D-димера в венозной крови ( $M_e = 3,04$  мкг/мл; Q25 = 2,21 мкг/мл; Q75 = 3,86 мкг/мл) по сравнению с индивидами, 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. 2).

Также установлена связь генетического полиморфизма 455 G/A *FGB* с уровнем D-димера в венозной крови. У индивидов с генотипами 455 GA *FGB* и 455 AA *FGB* уровень D-димера ( $M_e = 1,17$  мкг/мл; Q25=0,44 мкг/мл; Q75 = 2,21 мкг/мл) более высокий по сравнению с индивидами, 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. 3).

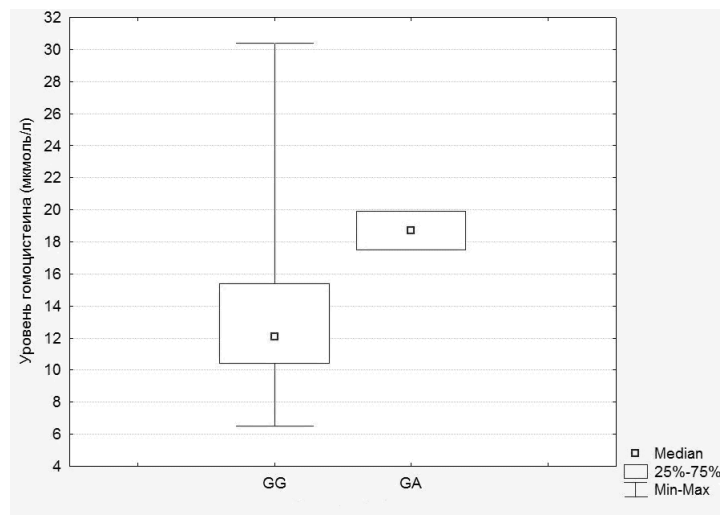


Рис. 1. Ассоциации генотипов локуса 20210 G/A *FII* с уровнем гомоцистеина в крови.

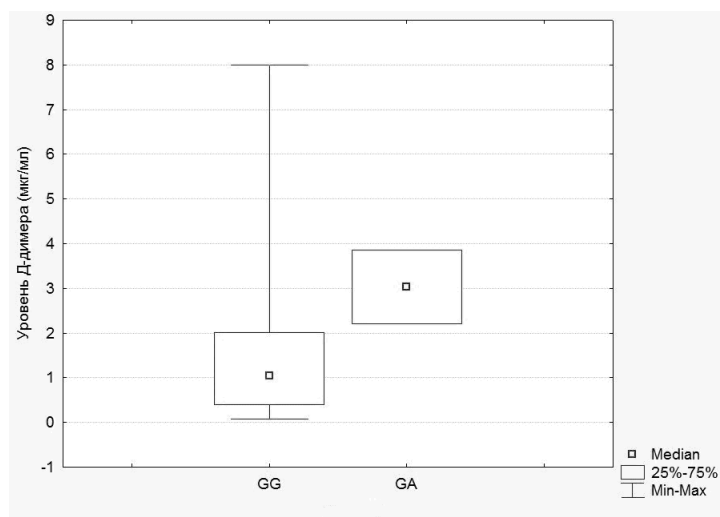


Рис. 2. Уровень D-димера в крови в зависимости от генетических вариантов локуса 20210 G/A *FII*.

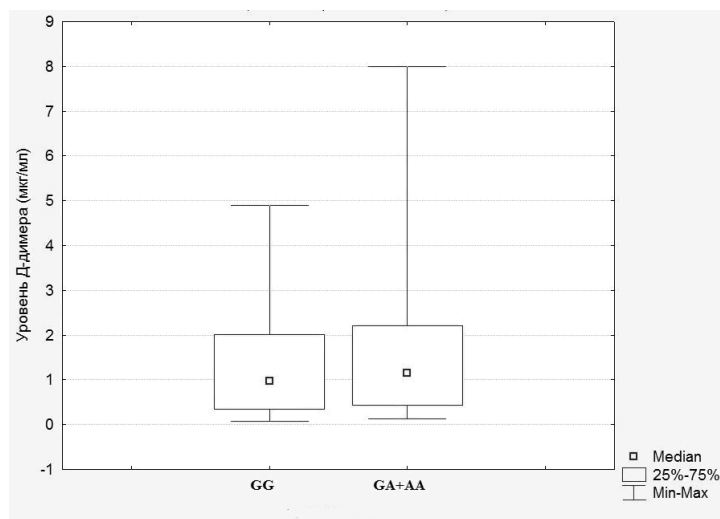


Рис. 3. Ассоциации генотипов 455 G/A *FGB* с уровнем D-димера в крови.

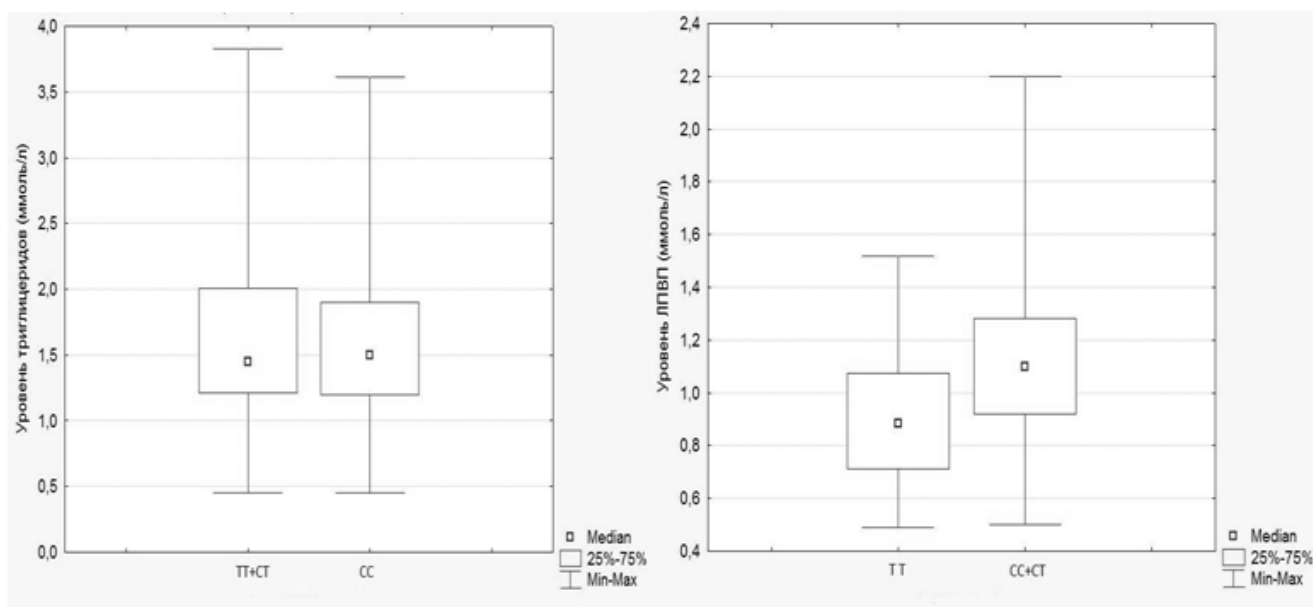


Рис. 4. Уровень триглицеридов и ЛПВП в крови в зависимости от генетических вариантов локуса 677 C/T *MTHFR*.

При исследовании индивидов с генотипами 677 TT *MTHFR* и 677 CT *MTHFR* выявлен более высокий интерквартильный размах уровня триглицеридов крови ( $M_e = 1,45$  ммоль/л;  $Q_{25} = 1,21$  ммоль/л;  $Q_{75} = 2,01$  ммоль/л), по сравнению с индивидами с генотипом 677 CC *MTHFR* ( $M_e = 1,5$  ммоль/л;  $Q_{25} = 1,20$  ммоль/л;  $Q_{75} = 1,90$  ммоль/л,  $p = 0,03$ ) (рис. 4).

Установлена статистически значимая связь между генетическими вариантами локуса 677 C/T *MTHFR* и уровнем липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) в крови у индивидов исследуемой выборки. У индивидов с генотипом 677 TT *MTHFR* 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 индивидов с генотипами 677 CC *MTHFR* и 677 CT *MTHFR* ( $M_e = 1,10$  ммоль/л;  $Q_{25} = 0,92$  ммоль/л;  $Q_{75} = 1,28$  ммоль/л),  $p = 0,05$ ) (рис. 4).

Обнаружена ассоциация молекулярно-генетического маркера 677 C/T *MTHFR* с показателем системы гемостаза – тромбиновым временем (ТВ). Выявлено статистически значимое снижение ТВ у индивидов с генотипами 677 TT и CT *MTHFR* ( $M_e = 15$  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. 5).

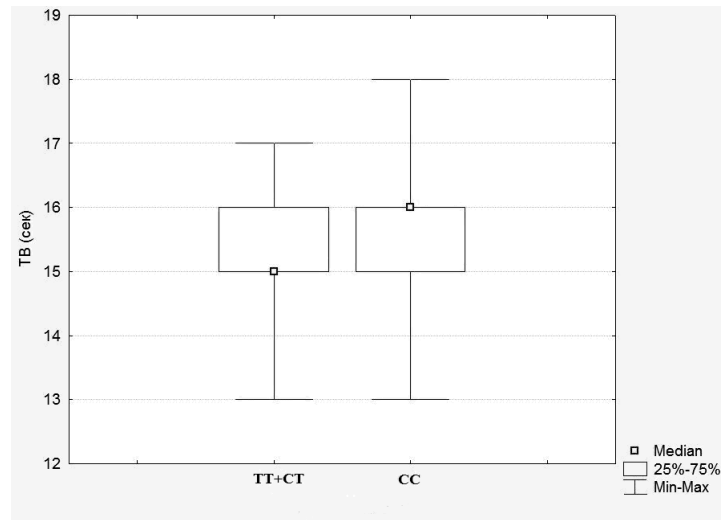


Рис. 5. Ассоциации генотипов 677 C/T MTHFR с показателями ТВ.

Таким образом, вовлечённость исследуемых генетических полиморфизмов наследственных тромбофилий (20210G/A *FII*, 677 C/T *MTHFR*, 455 G/A *FGB*) связана с рядом клинико-лабораторных показателей и ассоциируется с развитием ранних тромботических осложнений в послеоперационном периоде в исследуемой группе. Выявлено, что генетический вариант 20210 GA *FII* коррелирует с повышенным уровнем гомоцистеина и D-димера в крови. Также с повышенным уровнем D-димера в крови ассоциированы генетические варианты 455 GA *FGB* и 455 AA *FGB*. Генетические варианты 677 CT и 677 TT *MTHFR* связаны с повышением уровня триглицеридов в крови и укорочением тромбинового времени, а генотип 677 TT *MTHFR* ассоциирован со сниженным уровнем липопротеидов высокой плотности в крови.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилова Т.В. Лабораторные исследования в мониторинге антитромботической терапии // Новости хирургии. – 2010. – Т. 18, № 3. – С. 150-161.
2. Казанцев А.В., Корымасов А.В. Исследование системы гемостаза и маркеров дисфункции эндотелия у больных с облитерирующим атеросклерозом бедренно-подколенной локализации // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2010. – Т. 12, № 22. – С. 80-85.
3. Лазаренко В.А., Бобровская Е.А., Сорокин А.В. Гипергомоцистеинемия: периферический атеросклероз и реконструктивная хирургия // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2014. – № 4. – С. 63-66.
4. Мамаев А.Н. Классификационные признаки коагулометров // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 10. – С. 32.
5. Момот А.П., Мамаев А.Н. Новый отечественный активатор протеина С и его применение для диагностики тромбофилий // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 9. – С. 25.
6. Момот А.П., Цыпкина Л.П., Тараненко И.А. Современные методы распознавания состояния тромботической готовности: монография / под ред. А.П. Момота. – Барнаул : Изд-во Алтайского государственного университета, 2011. – 138 с.
7. Солошенкова О.О., Чукаева И.И., Орлова Н.В. Дислипидемии в клинической практике. Часть 1. // Лечебное дело. – 2009. – № 3. – С. 12-17.
8. Федосеева А.А., Алейник Д.Я. Гомоцистеин сыворотки крови и некоторые показатели гемостаза при дегенеративно-дистрофических заболеваниях тазобедренного сустава // Медицинских альманах. – 2012. – № 1. – С. 149-152.
9. Шмелёва В.М., Рыбакова Л.И. Состояние окислительных и антиокислительных систем у больных с атеросклерозом при наличии и отсутствии гипергомоцистеинемии // Казанский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 281-285.
10. Adam S.S., Key N.S., Greenberg C.S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects // Blood. – 2009. – Vol. 113, N 13. – P. 2878-2887.
11. Di Minno M.N., Dentali F., Lupoli R., Ageno W. Mild antithrombin deficiency and risk of recurrent venous thromboembolism: a prospective cohort study // Circulation. – 2014. – Vol. 129, N 4. – P. 497-503.
12. Khor B., Van Cott E.M. Laboratory tests for antithrombin deficiency // Am. J. Hematol. – 2010. – Vol. 85. – P. 947.
13. Marcucci R., Liotta A.A., Cellai A.P., Rogolino A., Gori A.M., Giusti B., Poli D., Fedi S., Abbate R., Prisco D. Increased plasma levels of lipoprotein(a) and the risk of idiopathic and recurrent venous thromboembolism // Am. J. Med. – 2003. – Vol. 115. – P. 601-605.
14. Phillippe H.M., Hornsby L.B., Treadway S., Armstrong E.M., Bellone J.M. Inherited

- Thrombophilia // *J. Pharm. Pract.* – 2014. – Vol. 27, N 3. – P. 227-233.
15. *Vandiver J.W., Vondracek T.G.* Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for

monitoring unfractionated heparin // *Pharmacotherapy.* – 2012. – Vol. 32, N 6. – P. 546-558.