

Тромбофилические состояния в патогенезе поздних тромботических реокклюзий у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей

А.А.ПОЛЯНЦЕВ, П.В.МОЗГОВОЙ, Д.В.ФРОЛОВ, В.В.НАУМОВ, И.А.ПОЛИКАРПОВ

Thrombophilic states in pathogenesis of late thrombotic reocclusions in patients with atherosclerosis obliterans of arteries of lower extremities

A.A.POLYANCEV, P.V.MOZGOVOY, D.V.FROLOV, V.V.NAUMOV, I.A.POLIKARPOV

Волгоградский государственный медицинский университет

Анализируются результаты исследований 93 пациентов, оперированных на аорто-подвздошном и бедренно-подколенном артериальных сегментах. В исследование включены пациенты с поздними тромботическими реокклюзиями зон реконструкций. Поздние тромботические реокклюзии наблюдались в период от 6 мес. до 5 лет. Как показали результаты проведенных исследований, пациенты с тромбофилическими состояниями имеют большую вероятность поздних тромботических реокклюзий зон реконструкций, чем без указанных состояний. В случае же сочетания тромбофилий друг с другом вероятность данного осложнения еще выше. Пациенты, оперированные по поводу атеросклеротических окклюзий артерий, нуждаются в исследовании крови на скрытые тромбофилии и превентивной фармакологической коррекции выявленной патологии.

Ключевые слова: атеросклероз артерий нижних конечностей, тромбофилические состояния, отдаленные результаты

The results of studies of 93 patients operated on the aorto-iliac and femoropopliteal arterial segments were analyzed. The study included patients with late thrombotic reocclusion of redevelopment areas. Late thrombotic reocclusions observed in the period from 6 months to 5 years. Patients with thrombophilic states have a greater chance of later thrombotic reocclusions of redevelopment areas, than without these states. In the case of a combination of thrombophilia with each other the probability of this complication is even higher. Patients operated on for atherosclerotic occlusions of the arteries, are in need of blood analysis for latent thrombophilia and preventive pharmacological correction of the pathology.

Key words: atherosclerosis of arteries of lower extremities, thrombophilic states, long-term results

Основной причиной ишемии нижних конечностей является атеросклероз, распространенность которого в старших возрастных группах колеблется от 0,4% до 14,4% [2]. Неблагоприятное течение атеросклероза обуславливает необходимость поиска эффективных средств, способных предотвратить прогрессирование или вызвать обратное развитие хронической ишемии нижних конечностей. В начальных стадиях используются медикаментозные средства, физические упражнения, эфферентные методы, однако в более поздних стадиях достоверно улучшить качество жизни способны только хирургические методы лечения [1, 3, 4]. Однако, несмотря на широкое распространение реконструктивных операций, сохраняется большая частота тромботических реокклюзий в зоне реконструкции и в других бассейнах, поражённых облитерирующим процессом [2]. Причинами неудачных исходов артериальных реконструкций служат технические погрешности, возникновение рестенозов или прогрессирование атеросклероза. Частота проявления поздних тромботических реокклюзий в течение двух лет после бедренно-подколенных реконструкций составляет 37% при использовании аутоветны, 51% при применении синтетических протезов и до 50% после чрезпросветной ангиопластики артерий конечностей

[7, 8]. В ходе изучения свойств крови, выявлено, что у данной категории больных определяется высокая распространенность различных тромбофилических состояний [4-6], однако влияние данных изменений на результаты реконструктивных операций изучено недостаточно.

Материалы и методы

Анализируются результаты лечения 93 пациентов, оперированных на аорто-подвздошном и бедренно-подколенном артериальных сегментах в отделении сосудистой хирургии клиники общей хирургии им. А.А.Полянцева Волгоградского государственного медицинского университета в период с 1998 по 2005 годы. В исследование включены пациенты с поздними тромботическими реокклюзиями зон реконструкций

Период наблюдения за пациентами после операции составил 5 лет. Средний возраст больных: 58,8±5,9 лет. Все пациенты мужского пола. Изолированный облитерирующий процесс наблюдался у 90 пациентов (96,8%), сочетание облитерирующего процесса с аневризматическим – у 3 (3,2%). Стадия заболевания по Фонтейну-Покровскому IБ – у 30 (32,3%), II – у 56 (60,2%), IV – у 7 (7,5%) больных. Операции, выполненные пациентам, представлены в таблице 1. С момента

операции все пациенты постоянно принимали препараты аспирина в дозировке 75–125 мг/сут. Поздние тромботические реоклюзии наблюдались в период от 6 мес. до 5 лет, в среднем они возникали через $3,16 \pm 1,60$ года, что потребовало выполнить ампутацию конечности на уровне верхней трети бедра у 9 больных (9,7%), у 28 (30,1%) – повторную реконструкцию.

Исследовали венозную кровь на антифосфолипидный синдром (АФС): определяли волчаночный антикоагулянт, антифосфолипидные иммуноглобулины G (АФС IgG) и M (АФС IgM); уровень гомоцистеина в крови и наличие полиморфизма Ala222Val в гене метилентетрагидро-фолатредуктазы (МТФР); осуществляли поиск полиморфизма Arg506Gln (мутация Лейдена) в гене V фактора свертывания, G20210A в гене протромбина, G10976A в гене VII фактора свертывания; L33P в гене тромбоцитарного рецептора фибриногена. Анализ проводился не позднее 3 часов с момента забора материала.

Характеристика идентификации изученных ДНК-полиморфизмов – врожденный полиморфизм в гене протромбина (G20210A), генах VII (G10976A) и V (Arg506Gln – мутация Лейдена) факторов свертывания, гене тромбоцитарного рецептора фибриногена (L33P), гене метилентетрагидрофолатредуктазы (Ala222Val). Амплификацию участков геномной ДНК, содержащих указанные полиморфизмы, осуществляли на основе технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для инсерционно-делеционных (I/D) полиморфизмов в генах TPA и ACE после проведения 35 циклов ПЦР в соответствующих режимах аликвоту образовавшегося продукта (10–12 мкл) анализировали путем электрофореза в 2% агарозном геле. Идентификацию аллельных вариантов, обусловленных точечными нуклеотидными заменами, осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов ПЦР-продукта (метод ПЦР-ПДРФ). После проведения 35 циклов ПЦР, образовавшийся амплификат инкубировали с 10 ед. специфической эндонуклеазы рестрикции в условиях, рекомендуемых поставщиком (ООО “Сибэнзим”, Россия, или МБИ “Fermentas”, Литва). Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 6% (для полиморфизма в гене

АpoE – в 10%) полиакриламидном геле. Фрагменты ДНК визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете после окрашивания геля бромистым этидием в концентрации 1 мкг/мл.

Диагностика волчаночного антикоагулянта: в нашем исследовании были применены коагулологические методы, утвержденные Стандартами предприятия ГНЦ РАМН и панель реагентов (производство НПО РЕНАМ). Для определения волчаночного антикоагулянта использовали тесты АЧТВ, ПВ (протромбиновое время с разбавленным тромбопластином), время разбавленного яда гадюки Рассела (dRVVT или ВА). Методы подразделялись на скрининговые (с использованием реагентов с низким содержанием фосфолипидов: АЧТВс, ВAc и ПВс) и подтверждающие (с использованием реагентов с высоким содержанием фосфолипидов: АЧТВп, ВАп и ПВп). Для проведения тестов со смешением плазм использовали скрининговые реагенты. Для контроля качества проведения анализов использовали нормальную плазму и контрольные плазмы с различным уровнем ВА, производства НПО РЕНАМ и Dade Behring (Германия). Нормальные значения ($M \pm 2 SD$) составляли для АЧТВс – 30–40 сек., АЧТВп – 25–35 сек., ПВс – 45–60 сек., ПВп – 14–18 сек., ВAc – 22–29 сек., ВАп – 20–26 сек.

Диагностику волчаночного антикоагулянта проводили по рекомендуемому Подкомитетом по Волчаночному Антикоагулянту алгоритму. Результаты скрининговых тестов (АЧТВс, ПВс, ВAc) выражали в виде скрининговых отношений $CO = T_o / T_n$, где T_o – время свертывания опытной плазмы, T_n – время свертывания нормальной плазмы (пулированная бес-тромбоцитарная донорская плазма или коммерческая нормальная донорская плазма). При $CO < 1,2$ ВА отсутствует, при $CO >$ или $= 1,2$ проводили тесты со смешением плазм. Рассчитывали CO смеси плазм (сп) в виде $CO_{сп} = T_{сп} / T_n$. Величина $CO_{сп} < 1,2$ свидетельствует об аномалиях факторов свертывания крови, а $CO > 1,2$ – о наличии в исследуемой плазме специфических ингибиторов факторов свертывания крови или неспецифических – ВА. Для решения вопроса о природе присутствующего в исследуемой плазме ингибитора, проводили подтверждающие тесты с добавлением к

Таблица 1

Вид выполненных операций

№ п/п	Вид операции	Абс.	%
1	Аорто-бедренное унилатеральное протезирование	6	6,5
2	Аорто-бифеморальное протезирование	19	20,4
3	Аорто-бифеморальное шунтирование	47	50,5
4	Подвздошно-бедренное протезирование	9	9,7
5	Реконструкция дистального анастомоза	3	3,2
6	Аутовенозное шунтирование	3	3,2
7	Бедренно-подколенное протезирование протезом ПТФЭ	6	6,5
	Всего	93	100

исследуемой плазме избытка компенсирующих фосфолипидов (АЧТВп, ПВп, ВАп). Результаты выражали в виде подтверждающего отношения $PO=To/Tn$. Решение о наличии ВА принимали после расчета нормализованного отношения $HO=CO/PO$ для каждого теста. При значении $HO>1,2$ даже в одном тесте исследуемый образец плазмы считали положительным по ВА.

Исследования антифосфолипидных антител проводили на полуавтоматическом микропланшетном анализаторе «Multiscan MS» фирмы «Labsystems» (Финляндия). Во всех примененных тест-системах в качестве антител использованы специфические антигены, сорбированные в лунках полистироловых стрипов планшетов. Соответствующие инструкции разведения исследуемых сывороток вносили в лунки и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. Находящиеся в сыворотках антитела за это время связывались с антигеном, сорбированным на стенах лунок. После отмывания в лунки вносили иммунопероксидазный конъюгат, представляющий собой антитела к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. После соответствующей отмывки лунок в них вносили хромоген (ТМБ-субстрат). Через 15-30 минут реакцию останавливали внесением стоп-реагента. Учет результатов проводили спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Каждое исследование сопровождалось положительным и отрицательным контролем. Затем по формуле или таблице рассчитывали значение оптической плотности и оценивали полученные результаты в соответствии с инструкцией по применению ИФА-тест-системы.

Для определения концентрации гомоцистеина использован набор компании «PLIVA-Lachema Diagnostika». Гепаринизированную кровь после забора помещали на лед и центрифугировали в течение 1 часа. Связанный или демиризованный ГЦ (окисленная форма) восстанавливается до свободного гомоцистеина. Свободный гомоцистеин реагирует с серином, с образованием L-цистатина. Реакция катализируется цистатион-b-синтетазой. L-цистатин, в свою очередь, расщепляется с формированием гомоцистеина, пирувата и аммиака. Реакция катализируется цистатион-b-лиазой. Пируват под воздействием лактатдегидрогеназы превращается в лактат, коферментом этой реакции является NADH. Отношение NADH к NAD⁺ прямо пропорционально концентрации гомоцистеина.

Статистическую обработку проводили при использовании программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и их обсуждение

Полиморфизм G20210A в гене протромбина у данного контингента пациентов не выявлен. Волчаночный антикоагулянт обнаружен у трех пациентов (3,2%) и слабopоложительный ответ на поиск антикоагулянта у трех пациентов (3,2%) – всего 6 больных (6,4%). Из них, у троих (50%) отмечен высокий уровень антифосфолипидных антител и еще у троих (50%) –

гипергомоцистеинемия с полиморфизмом гена МТФР. Повышенный уровень АФС IgG (выше 10 Ед/мл), в среднем $37,56\pm 15,14$, выявлен у 15 пациентов (16,1%), из них у 6 (40%) повышение уровня АФС IgM, у 3 (20%) – гипергомоцистеинемия, у 6 (40%) – полиморфизм гена МТФР и у 3 (20%) – мутация Лейдена. Повышение уровня АФС IgM (выше 10 Ед/мл), в среднем $29,54\pm 15,92$, имело место у 9 пациентов (9,7%), из них, у троих (33,3%) – гипергомоцистеинемия и полиморфизм МТФР, еще у трех пациентов (33,3%) также выявлена мутация Лейдена.

Гипергомоцистеинемия (повышение уровня гомоцистеина выше 15 мкмоль/л), в среднем $19,99\pm 4,80$ мкмоль/л, выявлена у 33 больных (35,5%), из них трое (9,1%) – с повышенным уровнем АФС IgG и полиморфизмом МТФР и трое (9,1%) – с волчаночным антикоагулянтом; полиморфизм МТФР выявлен у 24 пациентов (72,7%), 6 (18,2%) – полиморфизм L33P в гене тромбоцитарного рецептора фибриногена; такое же количество пациентов имеют полиморфизм G10976A в гене VII фактора свертывания и мутацию Лейдена.

Полиморфизм гена МТФР выявлен у 54 пациентов (58,1%), из них у 6 (11,1%) отмечено повышение уровня АФС IgG, у 3 (5,6%) – обнаружен волчаночный антикоагулянт, у 24 (44,4%) – повышен уровень гомоцистеина крови, 9 (16,7%) имели полиморфизм L33P в гене тромбоцитарного рецептора фибриногена и 3 (5,6%) – полиморфизм G10976A в гене VII фактора свертывания.

Полиморфизм L33P в гене тромбоцитарного рецептора фибриногена обнаружен у 12 пациентов (12,9%), из них повышение уровня гомоцистеина крови имело место в 6 наблюдениях (50%); у 9 (75%) – полиморфизм гена МТФР, у 3 (25%) – мутация Лейдена.

Полиморфизм G10976A в гене VII фактора свертывания выявлен у 9 пациентов (12,9%), из них у 6 (66,7%) – гипергомоцистеинемия, трое (33,3%) имели полиморфизм гена МТФР и такое же количество больных было с мутацией Лейдена. Мутация Лейдена выявлена у 15 пациентов (16,1%), из них 3 (20%) – с повышенным уровнем АФС IgG и IgM, 6 (40%) – с гипергомоцистеинемией, 3 (20%) – с полиморфизмом

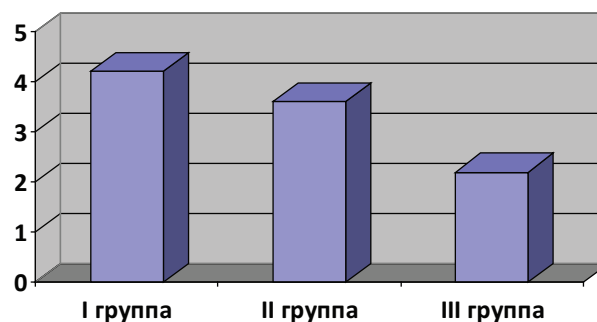


Рис. 1. Среднее время проходимости зон реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде у больных атеросклерозом артерий нижних конечностей, в зависимости от выраженности тромбофилических состояний.

L33P в гене тромбоцитарного рецептора фибриногена и такое же количество больных – с полиморфизм G10976A в гене VII фактора свертывания. Все пациенты условно были разделены на три группы, в зависимости от выраженности тромбофилических состояний. I группа – 12 больных (12,9%), тромбофилические состояния у которых выявлены не были. Среднее время поздних тромботических реокклюзий у пациентов данной группы – $4,2 \pm 0,9$ года. II группа – 48 (51,6%) пациентов, у которых выявлено одно из тромбофилических состояний; тромбоз зоны реконструкции в отдаленном периоде выявлен в среднем через $3,6 \pm 1,2$ лет. III группа – 33 (35,5%) пациентов, у которых выявлено два тромбофилических состояния; поздние реокклюзии у них зарегистрированы в среднем через $2,2 \pm 1,2$

года. При сравнении групп выявлено, что они достоверно ($p < 0,05$) отличаются друг от друга (рис. 1).

Выводы

1. Пациенты с тромбофилическими состояниями имеют большую вероятность поздних тромботических реокклюзий зон реконструкций, чем без указанных состояний. В случае же сочетания тромбофилий друг с другом вероятность данного осложнения еще выше.

2. Пациенты, оперированные по поводу атеросклеротических окклюзий артерий, нуждаются в исследовании крови на скрытые тромбофилии и превентивной фармакологической коррекции выявленной патологии.

Список литературы

1. Абалмасов К.Г., Бузиаивили Ю.И., Папоян С.А., Морозов К.Н. Отдаленные результаты хирургического лечения и качество жизни больных после инфраингвинальных реконструкций. Грудная и сердечно-сосудистая хирургия 2004; 6: 52-57.
2. Белов Ю.В., Степаненко А.Б., Генс А.П., Халилов И.Г. Хирургическое лечение больных с множественным поражением артерий нижних конечностей. Ангиология и сосудистая хирургия 2002; 8: 1: 72-82.
3. Казанцев А.В., Корымасов Е.А. Прогнозирование течения и хирургическая тактика при облитерирующем атеросклерозе артерий нижних конечностей. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2011; IV: 1: 71-78.
4. Капустин С.И., Блинов М.Н., Папаян Л.П., Селиванов Е.А. Наследственная тромбофилия – актуальная проблема современной медицины. Медицинский академический журнал 2006; 6: 1: 183-191.
5. Мухомедова Т.В., Жидкова О.В., Князькова Л.Г., Мозутова Т.А. Латентный антифосфолипидный синдром у кардиохирургических больных. Патология кровообращения и кардиохирургия 2009; 4: 38-40.
6. Суханов С.Г., Таубер О.Н. Гипергомоцистеинемия и коронарный атеросклероз. Вестник СамГУ – Естественная серия 2007; 2(52): 285-293.
7. Myers S.I., Myers D.J., Ahmend A., Ramakrishnan V. Preliminary results of subintimal angioplasty for limb salvage in lower extremities with severe chronic ischemia and limb-threatening ischemia. J. Vasc. Surg. 2006; 44(6): 1239-1246.
8. Nguyen L.L., Moneta G.L., Conte M.S., Bandyk D.F., Clowes A.W., Seely B.L. Prospective multicenter study of quality of life before and after lower extremity vein bypass in 1404 patients with critical limb ischemia. J. Vasc. Surg. 2006; 44(5): 977-983.

Поступила: 04.08.2010 г.

Информация об авторах

1. Полянцев Александр Александрович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии с урологией Волгоградского государственного медицинского университета; e-mail: polikarpof@rambler.ru
2. Мозговой Павел Вячеславович – д.м.н., профессор кафедры факультетской хирургии Волгоградского государственного медицинского университета; e-mail: polikarpof@rambler.ru
3. Фролов Денис Владимирович – к.м.н., доцент кафедры общей хирургии с урологией Волгоградского государственного медицинского университета; e-mail: frolden@aport.ru
4. Наумов Вадим Валерьевич – аспирант кафедры общей хирургии с урологией Волгоградского государственного медицинского университета; e-mail: polikarpof@rambler.ru
5. Поликарпов Игорь Александрович – ассистент кафедры общей хирургии с урологией Волгоградского государственного медицинского университета; e-mail: polikarpof@rambler.ru