

ИЗУЧЕНИЕ ТРОМБОГЕННОСТИ У БОЛЬНЫХ С ВРОЖДЕННЫМИ НАРУШЕНИЯМИ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ, ПЕРЕНЕСШИХ ОПЕРАТИВНЫЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Елыкомов В.А.^{1,2}, Копылов А.Н.^{1,2}, Летуева М.Н.¹

¹КГБУЗ Алтайская краевая клиническая больница (656024, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, 1), e-mail: hospital@hospital.e4u.ru;

²ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Барнаул, Россия (656038, Барнаул, пр. Ленина, 40), e-mail: rector@agmu.ru

В данной статье описано исследование, обнаружившее скрытую склонность к тромбообразованию у больных гемофилией. Учитывая значительно возросшее количество оперативных вмешательств у данной категории больных и описанные в литературе случаи тромбозов у больных гемофилией А и В, были рассмотрены факторы риска тромбозомболических осложнений у больных с врожденными нарушениями свертываемости крови. В ходе исследования было установлено, что у больных гемофилией, перенесших оперативное вмешательство, отмечаются высокий уровень тромбинемии, отражающий наличие процессов гиперкоагуляции, и несбалансированность антикоагулянтного звена по системе протеина С. Показано, что у больных гемофилией в Алтайском крае отмечается высокая частота встречаемости мутаций и полиморфизмов в генах системы гемостаза, которые свидетельствуют о предрасположенности к тромбофилическим состояниям. Совокупность полученных данных позволяет говорить о высоком тромбогенном потенциале системы крови в когорте обследованных больных.

Ключевые слова: тромбоз, гемофилия, система гемостаза, генетический полиморфизм, факторы риска.

THE RESEARCH OF TROMBOGENESIS IN PATIENTS WITH CONGENITAL BLEEDING DISORDERS AFTER SURGICAL INTERVENTIONS

Elykomov V.A.^{1,2}, Kopylov A.N.^{1,2}, Letueva M.N.¹

¹Altai Regional Clinical Hospital, Barnaul, Russia (656024, Barnaul, street Lyapidevskogo, 1), e-mail: hospital@hospital.e4u.ru;

²Altai State Medical University, Health Ministry of Russian Federation, Barnaul, Russia (656038, Barnaul, prospect Lenina, 40), e-mail: rector@agmu.ru

This article describes a study that found a hidden propensity for thrombogenesis in patients with hemophilia. Taking into account the significantly increased number of surgical interventions in this category of patients and described in literature cases of thrombosis in patients with hemophilia A and B, were considered risk factors for thromboembolic complications in patients with congenital bleeding disorders. During the research it was found that in patients with hemophilia who underwent surgery, there is a high level of thrombinemia representing the processes of hypercoagulation, and unbalanced anticoagulant part of system protein C. It is shown that in patients with hemophilia in the Altai region there is a high incidence of mutations and polymorphisms in the genes of the hemostatic system, which indicate predisposition to thrombophilic status. The obtained data allows to speak about high thrombogenic potential of blood system in the cohort of examined patients.

Keywords: thrombosis, hemophilia, hemostasis system, genetic polymorphism, risk factors.

Послеоперационные тромбозомболические осложнения являются наиболее опасными для жизни больного, поэтому проблема повышения эффективности их профилактики остается актуальной до настоящего времени [2]. Любое оперативное вмешательство усугубляет гиперкоагуляционную реакцию в системе гемостаза, в том числе и у больных с врожденными нарушениями свертываемости крови, таких как гемофилия и болезнь Виллебранда.

В настоящее время значительно увеличилось количество оперативных вмешательств у больных с врожденными нарушениями свертываемости крови. При наличии эффективных и

безопасных концентратов факторов свертывания крови операции эндопротезирования крупных суставов являются часто выполняемыми операциями у пациентов, страдающих гемофилией и хронической гемофилической артропатией [1,4].

Исследования крупных зарубежных медицинских центров показывают, что субклинический тромбоз глубоких вен встречается при гемофилии у пациентов, перенесших серьезные ортопедические операции. Так, в работах Pocoski J., Ma A., Kessler C. (США, Университет Нью-Джерси) показано 4.4 % случаев венозных тромбозов в популяции больных гемофилией в США [10]. Исследования в Бельгийском Университете Католика Лювьена под руководством д-ра С. Hermans выявили субклинический тромбоз глубоких вен у 10 % больных гемофилией, перенесших серьезные ортопедические операции [8]. В работах д-ра Girolami A. описаны свидетельства смертельных случаев больных гемофилией от тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) и острого инфаркта миокарда [7].

Несмотря на опасения, что фармакологическая тромбопрофилактика может усилить кровотечение, некоторые пациенты получали такую тромбопрофилактику в послеоперационном периоде (использовался препарат эноксапарин) [9].

В ряде источников отмечается, что мутации и полиморфизмы в системе гемостаза, ассоциирующиеся с повышенным риском возникновения тромбозов, встречаются у больных гемофилией с большей частотой по сравнению с общей популяцией [3].

Цель данного исследования – выявление склонности к тромбообразованию у больных гемофилией в Алтайском крае, изучение распространенности полиморфизмов системы гемостаза как фактора тромбогенного риска в данной группе больных.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 48 пациентов, из них больных гемофилией А 29 мужчин, 17 мужчин больных гемофилией В, 1 женщина больная гемофилией В, 1 женщина больная гемофилией С. Все больные состояли на диспансерном учете в поликлинике КГБУЗ «Алтайская краевая клиническая больница». Большинство больных страдали гемофилией тяжелой степени тяжести (73 %), также встречались больные с легкой (11 %) и средней (16 %) степенью тяжести. Средний возраст больных составил $34,7 \pm 6,7$ года. 14 больных гемофилий подверглись оперативному вмешательству в КГБУЗ «Алтайская краевая клиническая больница»: - в 8 случаях выполнялось эндопротезирование суставов, а также лапаротомия с резекцией жировых подвесков толстой кишки (1 случай), удаление липомы (1 случай), иссечение организовавшейся гематомы правой голени (1 случай), декомпрессивная трепанация черепа с удалением субдуральной гематомы (1 случай), коррекция эквинусной установки стопы (1 случай), протезирование митрального клапана (1 случай). Всем больным проведено развернутое исследование системы гемостаза на базе лаборатории гемостаза

КГБУЗ «Алтайская краевая клиническая больница», в том числе оценка уровня растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) в плазме – орто-фенантролиновым методом, определение уровней D-димеров, фибриногена, ф-ра Виллебранда, исследование ХШа зависимого фибринолиза, активности антитромбина III и протеина С, а также общесоагуляционные тесты. Исследования проводились на гематологическом анализаторе «МЕК 7222» (производитель Nihon Kohden, Япония), оптическом автоматическом коагулометре «СА-1500» (производитель «Sysmex Corporation», Япония), оптический агреометр «490-4D» (производитель «Chronolog Corporation», США).

Всем больным гемофилией было проведено молекулярно-генетическое тестирование на выявление мутаций в генах системы гемостаза и системы фолатного цикла, которое выполнялось методом ПЦР и включало исследование полиморфизмов генов: фактора V (мутация FVLeiden G1691A), протромбина – FII(G20210 /A), метилентетрагидрофолатредуктазы – MTHFR (C677/T; A1298/C), метионин-синтазы редуктазы MTRR (A66/G), ингибитора активатора плазминогена - PAI-I (4G/5G), ITGA 2-гликопротеин (807 C/T), ITGB 3 –гликопротеин (1565 T/C), фактора I FGB (455G/A), фактора свертывания VII (10976 G/A), гена F13 (Val34Leu). Исследование проводилось на базе лаборатории клинической иммунологии и ВИЧ КГБУЗ «Алтайская краевая клиническая больница». Выделение ДНК производилось с помощью «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА», для амплификации использовались наборы реагентов «КардиоГенетика Тромбофилия» и «Генетика Метаболизма Фолатов», (ООО «НПО ДНК- Технология», Россия). Исследования проводились на детектирующем амплификаторе «ДТ-96», (ООО «НПО ДНК- Технология», Россия), методом «кривых плавления».

Результаты и обсуждение

Исследование гемостаза у больных гемофилией, не подвергавшихся оперативному вмешательству, проводилось в рамках амбулаторного контроля или в ходе стационарного консервативного лечения. У больных гемофилией, подвергавшихся оперативному вмешательству, исследование гемостаза проводилось в послеоперационном периоде (на 1-й, 3-й и 6-й дни после операции). Полученные результаты приведены в сравнительной табл. 1.

Таблица 1

Изменения гемостаза у больных гемофилией

<i>Изменение гемостаза</i>	<i>Среднее значение у не подвергавшихся операции больных</i>	<i>Среднее значение в послеоперационном периоде</i>	<i>p</i>
Уровень РФМК, мг/100мл	1,94±0,47	17,3±1,2	<0,001
Уровень D-димера,	106±11,7	873,8±111	<0,001

нг/мл			
Уровень фибриногена, г/л	2,8±0,8	4,9±0,23	<0,02
Уровень фактора Виллебранда, %	156,5±5,9	151,3±7,8	>0,05
XIIa зависимый фибринолиз, мин	14±1,6	29,5±5,2	<0,001
Активность антитромбина III, %	96,3±2,4	100,4±3,7	>0,05
Активность протеина С, %	91±3,7	74,6±1,9	<0,001

У всех больных гемофилией, подвергшихся оперативному вмешательству (10 больных), отмечается резко выраженная тромбинемия, проявляющаяся повышением уровней РФМК (в среднем до 17,3) и фибриногена (в среднем до 4,9), нарастанием концентрации D-димеров (в среднем до 873,8), отражающих в сумме высокую интенсивность процессов тромбообразования. Антикоагулянтное звено у больных после оперативного лечения оказалось нарушенным по системе протеина С ($p < 0,001$). Вместе с тем снижение активности антитромбина III было обнаружено нами у двоих больных (в целом по группе $p > 0,05$). Средние значения остальных показателей системы гемостаза остались в пределах нормы, хотя у части больных отмечалось повышение уровня фактора Виллебранда у 7 (50 %) больных.

Полученные данные у больных гемофилией, не подвергавшихся оперативному вмешательству, показывают угнетение XIIa зависимого фибринолиза (среднее значение 14 сек), активируемого контактными факторами свертывания внутреннего пути. Средние значения остальных показателей оказались в пределах нормы, хотя у части больных отмечались нарушения: повышение уровня факторов Виллебранда у 17 (48 %) больных, нарушения активности антитромбина III у 4 (12 %) и протеина С у 3 (8 %) больных.

Целью следующего этапа исследования являлось определение возможных факторов риска венозных тромбозов и ТЭЛА у больных с врожденными нарушениями свертываемости крови. Генетический полиморфизм в системе гемостаза не всегда имеет клинические проявления, в то же время продемонстрирована связь эпизодов венозного тромбоза с носительством врожденных факторов тромбогенного риска [6]. В настоящее время генная диагностика все шире и шире используется для обследования пациентов с целью выявления факторов риска развития заболеваний и выработки тактики их профилактики [5,6].

Данные о распространенности изучаемых генетических полиморфизмов в группе обследованных пациентов в сравнении с частотами их встречаемости в общей популяции больных в Алтайском крае [5] представлены в табл. 2.

Таблица 2

Полиморфизмы системы гемостаза у больных гемофилией в Алтайском крае

Тип полиморфизма системы гемостаза	Частота встречаемости полиморфизма у больных гемофилией			Частота встречаемости полиморфизма в общей популяции
	в гетерозиготном варианте	в гомозиготном варианте	Общая	
Мутация FII гена протромбина	0	0	0	2,68%
Мутация FV Leiden	3 (6,25%)	0	6,25%	3,22%
MTHFR (C677/T; A1298/C)	20 (41,7%)	11 (22,9%)	64,6%	49,34%
MTRR (A66/G)	15 (31,25%)	7 (14,6%)	45,75%	71,15%
PAI-I (4G/5G)	16 (33,3%)	18 (37,5%)	70,8%	79,40% (4G/4G – 33,31%)
ITGA 2-гликопротеин (807 C/T)	22 (45,8%)	8 (16,7%)	62,5%	20-40%
ITGB 3 –гликопротеин (1565 T/C)	9 (18,75%)	2(4,2%)	22,95%	20,48%
Ген фибриногена FGB (455G/A)	18 (37,5%)	0	37,5%	37,75%
фактора свертывания VII (10976 G/A)	6 (12,5%)	0	12,5%	17,77%
ген F13	16 (33,3%)	0	33,3%	40,66%

Мутация G1691A (Лейденская) в гене V фактора свертывания крови. Носители обладают повышенной склонностью к развитию сосудистых тромбозов. Гетерозиготными носителями Лейденской мутации являются 3,22% населения Алтайского края, причем риск тромбообразования увеличивается в 3–7 раз при гетерозиготном и в 80 раз при гомозиготном носительстве. В изучаемой группе гетерозиготное состояние гена F5 1691G/ A выявлено у 3 пациентов (6,25 %), гомозиготное носительство не обнаружено.

Мутация фактора II G20210A. Мутация связана с увеличением уровня протромбина в плазме, который может быть в 1,5–2,0 раза выше, чем в норме. Это приводит к пожизненному состоянию гиперкоагуляции, что связано примерно с 3–4-кратным увеличением риска развития венозного тромбоза. Мутация гена протромбина у больных гемофилией, проживающих в Алтайском крае, обнаружена не была, хотя ее общая встречаемость составляет 2,68 %.

Полиморфизм 5G(-675)4G в гене SERPINE1(PAI-1). Гомозиготная мутация 4G/4G полиморфизма – 675 4G/5G является фактором риска для развития тромбозов, инфаркта миокарда. Распространенность гомозиготной формы 4G/4G в Алтайском крае составляет

33,31 %. В данном исследовании дефект в гене PAI-1 выявлен у 34 больных (70,8 %), причем гомозиготный мутантный генотип 4G/4G, ассоциированный с наибольшим риском тромбообразования, встречался у 18 (37,5 %) больных.

Полиморфизм гена метилентетрагидрофолат редуктазы MTHFR (-677C>T, A1298C). Полиморфизм MTHFR широко распространен в общей популяции, гетерозиготными носителями, по некоторым данным являются до 40 % жителей Алтайского края, гомозиготными – 9–10 %. У лиц гомозиготных по мутации C677T (генотип T/T) отмечается термолабильность MTHFR и снижение активности фермента примерно до 35 % от среднего значения, что почти в 10 раз повышает риск развития гипергомоцистеинемии, что может привести к повышенному риску тромбообразования. В проведенном наблюдении данный полиморфизм встретился у 31 (64,6 %) больного, гомозиготный вариант в 11(22,9 %) случаях.

Полиморфизм гена метионин-синтазы редуктазы MTRR (A66G) изменяет биохимические свойства фермента метионин-синтазы редуктазы, в котором происходит замена аминокислоты изолейцин на метионин. В результате этой замены функциональная активность фермента снижается, что может привести к повышенному риску тромбообразования. У обследуемых больных гемофилией мутантный G аллель встретился в 45,8 % случаев.

Полиморфизм G10976A в гене VII фактора свертывания крови способствует снижению активности F7 и уменьшению тромбообразования. Генотип A/A является причиной снижения активности фермента F7 на 72 %, по сравнению с диким типом (генотип G/G). Гетерозиготное носительство данного дефекта выявлено 6 (12,5 %) больных гемофилией, что ниже распространенности в общей популяции (17,77 %). Гомозиготный мутантный генотип A/A, ассоциированный со снижением риска тромбообразования, не встречался в группе исследованных больных.

Полиморфизм G455A в гене фибриногена. Данный полиморфизм сопровождается повышенной экспрессией гена фибриногена, что приводит к увеличению содержания фибриногена в крови и повышает вероятность образования тромбов. При сопоставлении частот отдельных генотипов установлено, что частота встречаемости полиморфизма у больных гемофилией сопоставима с общей популяцией в Алтайском крае. При этом, гомозиготный мутантный аллель A/A ни у кого из обследованных больных гемофилией не выявлен.

Полиморфизм C807T в гене ITGA2. Наличие T-аллеля ассоциируется с увеличением скорости адгезии тромбоцитов, что может являться фактором риска тромбофилии. В связи с отсутствием в литературных источниках точной информации о распространенности

полиморфизма ITGA2 в Алтайском крае, приведены данные по европейской популяции, где данный аллель встречается в 20–40 % случаев, в то время как в группе исследуемых больных гемофилией Т-аллель встретился у 30 (62,5 %) больных, в т.ч. в гомозиготном варианте у 8 (16,7 %) больных, в гетерозиготном варианте у 22(45,8 %) больных.

Полиморфизм T1565C в гене ITGB3. Тромбоциты носителей С аллеля имеют повышенную склонность к агрегации, что может являться увеличением риска тромбообразования. При сопоставлении частот отдельных генотипов установлено, что гомозиготное носительство «мутантного» генотипа СС отмечается у 2(4,5 %) больных гемофилией, в то же время «мутантный» гетерозиготный аллель С/Т встречался у 9 (18,75 %) больных, тогда как в европейской популяции встречаемость аллеля С не превышает 20 %.

Полиморфизм Val34Leu А-субъединицы фактора XIII. С помощью электронной микроскопии было показано, что для варианта фактора XIII, содержащего 34Leu, характерно образование более тонких фибриновых волокон и менее пористая структура сгустка, чем в случае «нормального» варианта Val/Val, что может привести к гипокоагуляции. Частота встречаемости мутантного аллеля в общей популяции составляет 40,66 %, в то время как у исследуемых больных гемофилией данный аллель встретился у 16 (33,3 %) больных.

Важным результатом является выявление большого числа сочетанных форм полиморфизмов исследуемых генов (см. табл. 3).

Таблица 3

Сочетания полиморфизмов системы гемостаза у больных гемофилией

Количество полиморфизмов	Количество больных
1	2 (4 %)
2	4 (8 %)
3	7 (14,3 %)
4	9 (18,4 %)
5 и более	26 (53,1 %)

Во всех случаях отмечается сочетание не менее 3-х полиморфизмов у каждого больного. У 12 больных сочетаются 5 и более полиморфизмов. Ни у одного из пациентов не выявлено изолированного дефекта исследуемых генов.

На наш взгляд, обнаруженные у исследуемых больных сочетания тромбогенных полиморфизмов значительно увеличивают предрасположенность к тромботическим состояниям.

Выводы

1. У больных гемофилией до оперативного лечения обнаружено снижение ХШа зависимого фибринолиза, активируемого контактными факторами свертывания внутреннего пути.

2. У больных гемофилией, перенесших оперативное вмешательство, появляется склонность к тромбообразованию за счет повышения уровня фибриногена, растворимых фибрин-мономерных комплексов, D-димера и снижения активности протеина С.

3. У больных гемофилией, несмотря на гипокоагуляцию по активированному парциальному тромбопластиновому времени, обнаружена высокая частота сочетанных форм мутаций и полиморфизмов в генах системы гемостаза, что повышает тромбогенный потенциал системы крови.

Список литературы

1. Андреев Ю.Н. Многоликая гемофилия. – М.: Ньюдиамед, 2006. – 215с.
2. Балуда В. П., Дуянов И. И., Балуда М. В. и др. Профилактика тромбозов. – Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 1992. – С. 75-78.
3. Бувечич Е.И., Котовщикова Е.Ф., Богданова И.В. Особенности сосудисто-тромбоцитарных нарушений и генетический полиморфизм системы гемостаза у больных гемофилией с мезенхимальной дисплазией // Вестник Алтайской науки. – 2009. – № 1(4). – С. 7-15.
4. Зоренко В.Ю. Реконструктивно-восстановительное лечение больных гемофилией: дис... д-ра мед. наук. – Барнаул, 2007. – С. 188-197.
5. Момот А.П., Строзенко Л.А., Цывкина Л.П. и др. Первичная тромбопрофилактика у детей Алтайского края на основе выявления и модификации постоянных и временных факторов тромбогенного риска. – Барнаул: Изд-во АГМУ, 2013. – 83 с.
6. Шевела А. И., Егоров К. С., Севастьянова К. С., Новикова Я. В. Флеботромбоз и врожденная тромбофилия //Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – № 5. – С.95-99.
7. Girolami A., Ruzzon E., Fabris F et al. Myocardial infarction and other arterial occlusions in hemophilia A patients // Acta Haematol. – 2006. – Vol. 116, № 2. – pp. 120–125.
8. Hermans C, Hammer F, Lobet S. Subclinical deep venous thrombosis observed in 10% of hemophilic patients undergoing major orthopedic surgery// J Thromb Haemost. – 2010. – Vol.8. – pp. 1138–40.
9. Ozelo M.C. Surgery in patients with hemophilia: is thromboprophylaxis mandatory? // Thromb Res. – 2012. – Vol.130. – Supp.1. – pp.23-6.

10. Pocoski J., Ma A., Kessler C.M., Boklage S., Humphries T.J. Cardiovascular comorbidities are increased in U.S. patients with haemophilia A in a retrospective database analysis // Haemophilia. – 2014. – Vol. 20(4). – pp. 472-78.

Рецензенты:

Мамаев А. Н., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией гемостаза КГБУЗ «Алтайская краевая клиническая больница», г. Барнаул;

Момот А.П., д.м.н., профессор, директор Алтайского филиала ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул.