*На правах рукописи*

ЧЕТВЕРИКОВА Екатерина Николаевна

**ВОЗМОЖНОСТИ КОНСЕРВАТИВНОГО И ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЕГО РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ С УЧЕТОМ ГЕННОГО ПОЛИМОРФИЗМА ПАЦИЕНТОВ**

14.01.17 – хирургия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель –

доктор медицинских наук,

профессор В.В. Рыбачков

 Тверь– 2015

Работа выполнена в ГБОУ ВПО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре госпитальной хирургии

**Научный руководитель:**

**Рыбачков Владимир Викторович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии

**Официальные оппоненты:**

**Дуданов Иван Петрович**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», заведующий кафедрой общей и факультетской хирургии

**Плечев Владимир Вячеславович**, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий клиникой и кафедрой госпитальной хирургии

**Ведущая организация:**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2015 г. в\_\_\_\_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 208.099.01 в ГБОУ ВПО «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 170100, г. Тверь, ул. Советская, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тверского государственного медицинского университета на сайте www.tvergma.ru

Автореферат разослан «\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

кандидат медицинских наук,

доцент **В.В. Мурга**

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы исследования**

В течение последних 40-50 лет сердечно-сосудистые заболевания по-прежнему остаются основной причиной в структуре смертности большинства европейских популяций [Чепурина Н.А., 2008]. Этиологическим фактором сердечно-сосудистых заболеваний является атеросклероз – системное заболевание, которое поражает, как правило, несколько сосудистых бассейнов. По данным крупномасштабного исследования AGATHA, 35,7% больных имели проявления атеросклероза более чем в одном сосудистом бассейне [Комаров А.Л. и соавт., 2004; Оганов Р.Г., 2009].

Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей (ОААНК) является одним из частых проявлений генерализованного атеросклероза, встречается у 2-3% населения и составляет 20% от всех сердечно-сосудистых заболеваний [Затевахин И.И. и соавт., 2001; Бурлева Е.П., 2005; Плечев В.В. и соавт., 2005; Дибиров М.Б. и соавт., 2007; Покровский А.В. и соавт., 2007; Luther V. et. al., 1996; Klevsgard R. еt al., 2001; Barani J. еt. al., 2005]. Причем тяжесть сопутствующих поражений во многом определяет клиническое течение хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей [Гавриленко А.В. и соавт., 2005; Савельев В.С., Кошкин В.М., 2010; Fowkes F., 2012; Matzke S. et. al., 1999].

В течение первых 5 лет после постановки диагноза ОААНК 50% больных умирает от инфаркта и инсульта, то есть проявлений генерализованного атеросклероза [Дуданов И.П. и соавт., 2007; Chetter I., 2010; Rosen L., 2009]. Кроме того, снижение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) на каждые 0,1 увеличивает риск инфаркта миокарда на 10% [Kannel W. et al., 2011; Merlini M. et al., 2014].

Причины сложившейся ситуации связаны не только с ограничением эффективности лечебных мероприятий, но и с отсутствием объективных критериев, позволяющих прогнозировать течение данной патологии. Внедрение за последние годы новых оперативных пособий не снижает клинической значимости данной проблемы.

В настоящее время одним из прогностических критериев повышения эффективности лечения ОААНК могут стать генетические особенности пациента. Их реализация в клинической практике, безусловно, позволит индивидуализировать выбор медикаментозной терапии и оптимизировать объем оперативного вмешательства. Однако сведений о клинической значимости полиморфизма генов при данной патологии пока явно недостаточно [Сычев Д.А. и соавт., 2011]. Существующие данные или весьма неопределенны, или противоречивы. Согласно имеющимся сообщениям, частота полиморфизмов отдельных генов ассоциирована с течением заболевания [Катина М.Н., 2012]. Однако степень доказательности данной точки зрения в ряде случаев ставится под сомнение.

Все это свидетельствует о том, что исследования в этой области являются не только актуальными, но и перспективными. Прежде всего, это касается как лечебного, так и профилактического аспекта развития ОААНК. Изложенные моменты явились отправными для проведения настоящего исследования.

**Цель исследования:** улучшение результатов лечения больных с атеросклеротическими заболеваниями артерий нижних конечностей на основании оценки результатов консервативного и оперативного лечения с учетом генетического полиморфизма.

**Задачи исследования:**

1. Изучить частоту полиморфизма генов при атеросклеротических заболеваниях артерий нижних конечностей и ее влияние на клиническое течение заболевания.
2. Оценить степень эффективности консервативной терапии в зависимости от генетических ассоциаций.
3. Выявить неблагоприятные генетические критерии при хирургическом лечении данной патологии, сопровождающиеся ампутацией конечности.
4. Разработать алгоритм прогнозирования эффективности оперативных методов лечения с учетом генетических ассоциаций в каждом конкретном случае.

**Научная новизна исследования**

1. Определена клиническая значимость частоты встречаемости полиморфизма генов рецептора к ангиотензину II 2 типа (АGTR2:1675), эндотелиальной NO-синтазы (NOS3:894), цитохрома Р-450 CYP2D6 и CYP2C9, фактора Лейдена (F5), протромбина (F2), ингибитора активатора плазминогена (РAI– 1), тромбоцитарного рецептора к фибриногену (GPIIIA), фибриногена (FGB), их мутаций по гомозиготе и гетерозиготе при облитерирующем атеросклерозе артерий нижних конечностей.
2. Установлены генетические критерии неэффективности консервативного и хирургического лечения при данной патологии и степень их значимости в зависимости от уровня поражения сосудистого сегмента. Выявлено, что частота ампутаций сопряжена с полиморфизмом генов цитохрома Р-450 CYP2D6 и CYP2C9, F5, РAI-1, АGTR2:1675 и GPIIIA.
3. Определено значение методов многомерной статистики с использованием генетического тестирования в оценке эффективности хирургического лечения артерий нижних конечностей в зависимости от объема операции. Установлено, что ведущим является полиморфизм генов АGTR2:1675 и NOS3:894, в виде мутаций по гомозиготе и гетерозиготе.

**Теоретическая и практическая значимость**

1. В результате проведенных исследований выявлены генетические критерии риска прогрессирования атеросклеротических заболеваний артерий нижних конечностей.
2. Определена степень эффективности проводимого лечения облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей на основе генетического полиморфизма.
3. Изучена клиническая значимость генов, ассоциированных с эффективностью консервативной терапии.
4. Установлена частота полиморфизма генов в зависимости от эффективности восстановления магистрального кровотока, объема операции и уровня поражения сосудистого русла.
5. Разработан алгоритм прогнозирования эффективности оперативных методов лечения облитерирующего атеросклероза на основе клинических данных и полиморфизма генов.

**Методология и методы исследования**

Исследования проведены на базе кафедры госпитальной хирургии Ярославского государственного медицинского университета.

Основу работы составили клинические наблюдения и специально проведенные исследования у 223 пациентов с атеросклеротическими заболеваниями артерий нижних конечностей. Возраст пациентов варьировал от 40 до 89 лет и в среднем составил 66,5 лет. Мужчин было – 156 (70%), женщин – 67 (30%). Соотношение женщины/мужчины 1:2,3. В 52% наблюдений длительность заболевания составила менее 5 лет.

По классификации Фонтейна-Покровского I степень хронической ишемии выявлена у 42 (19%), II А степень у 31 (14%) больного, II Б степень облитерирующего атеросклероза выявлена в 38% всех наблюдений (86 человек), III степень у 35 (16%) и IV степень у 29 (13%) пациентов.

По физикальным данным и результатам ультразвуковой допплерографии (УЗДГ) аорто-подвздошный уровень окклюзии артериального русла выявлен у 30 (13%) пациентов, бедренно-подколенный у 107 (48%) больных, подколенно-берцовый у 86 (39%).

У 60% пациентов с аорто-подвздошным уровнем окклюзионно-стенотического процесса наблюдалась II Б стадия хронической ишемии. При бедренно-подколенном типе также преобладали пациенты со IIБ стадией (45%). При подколенно-берцовом уровне поражения конечности в 48% наблюдений выявлена I стадия ишемии.

На тяжесть состояния больных накладывала отпечаток сопутствующая сердечно-сосудистая патология, которая была выявлена у 74,9% пациентов. Артериальная гипертензия (АГ) выявлена у 159 (71%) пациентов, острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) перенесли 18 (8%) больных. Среди различных вариантов ишемической болезни сердца (ИБС) наиболее часто встречалась стенокардия напряжения (35% всех наблюдений). Сочетание АГ и ИБС выявлено у 43% больных.

Среди обследованных только консервативная терапия проводилась у 184 (83%) больных, у 39 (17%) пациентов выполнялось хирургическое пособие. Консервативное лечение включало в себя внутривенное введение периферических вазодилятаторов (пентоксифиллин), антигипоксантов (актовегин), спазмолитиков и других препаратов, а также физиотерапию и гипербарическую оксигенацию (ГБО).

Варианты реконструктивных операций определялись стадией заболевания и уровнем поражения сосудистого русла. Аутовенозное шунтирование, так же как и аллопрофундопластика выполнено 1 пациенту (2,6%), эндартерэктомия, как и подвздошно-бедренное шунтирование (ПБШ) выполнено 3 больным (7,7%), тромбэктомия – 4 пациентам (10,3%), бедренно-подколенное шунтирование (БПШ) – 9 больным (23%), аортобифеморальное шунтирование (АБФШ) – 15 пациентам (38,4%), сочетание нескольких видов операций перенесли 3 пациента (7,7%).

Среди пациентов, получавших только консервативную терапию, I степень хронической ишемии определена в 23% наблюдений, II А – в 15%, IIБ – в 37%, III – в 11%, IV – в 14% случаев. У больных, подвергшихся оперативному лечению I степени ишемии выявлено не было. II А стадия наблюдалась в 10% наблюдений, II Б степень ишемии встречалась наиболее часто (46% случаев). У 36% больных выявлена III степень ишемии, у 8% пациентов IV стадия.

Методы исследования были направлены на оценку биохимического статуса и состояния артериального кровотока. Изучение генетического полиморфизма проводилось с помощью специальных методик генетического анализа. Биохимические методы включали в себя определение в периферической крови маркеров, выступающих в роли факторов риска развития атеросклероза: общего холестерина и липопротеидов, с определением коэффициента атерогенности. Анализ полученных данных показал наличие гиперхолестеринемии у 49% пациентов.

Состояние артериального кровотока и уровень поражения артерий нижних конечностей изучались при помощи ультразвуковой допплерографии. Оценивалась проходимость артерии, её диаметр, состояние сосудистой стенки по толщине комплекса интима-медиа (КИМ), а также проводился расчет лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ). Анализ полученных данных показал, что при прогрессировании степени ишемии имеет место увеличение КИМ до 0,15±0,02 и уменьшение ЛПИ до 0,36±0,015.

Для оценки генетических изменений методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в сыворотке крови были определены 17 генов. Гены, кодирующие элементы ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (гены ангиотензиногена AGT:704 и AGT:521, рецептора к ангиотензину II AGTR1:1166 и AGTR2:1675, альдостерон-синтетазы CYP11B2); гены, регулирующие внутриклеточный ионный гомеостаз (G протеин бета-3 субъединица GNB3, альфа-аддуктин ADD1: 1378); гены, определяющие структуру эндотелиальной NO-синтазы (NOS3:894 и NOS3:786); гены гемостаза (F5 фактора Лейдена, протромбина F2, ингибитора активатора плазминогена PAI-1, тромбоцитарного рецептора фибриногена GPIIIA, фибриногена FGB); гены цитохрома Р-450 CYP2D6 и CYP2C9; гены гликопротеина Р MDR1. В результате проведенного многомерного статистического анализа 8 генов были исключены, ввиду отсутствия их значимости в течении заболевания и эффективности оперативных методов лечения.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. При атеросклеротических заболеваниях артерий нижних конечностей доминируют полиморфизм генов игибитора активатора плазминогена PAI-1, фибриногена FGB, рецептора к ангиотензину II 2 типа AGTR2:1675, эндотелиальной NO-синтазы NOS3:894. Возраст и пол больных не оказывают существенного влияния на их трансформацию.
2. Частота ампутаций при консервативном лечении данной патологии ассоциируется с полиморфизмом генов цитохрома Р-450 CYP2D6 и CYP2C9, и генов гемостаза F5 и GPIIIA. При неэффективности реконструктивных операций преобладает полиморфизм генов F5, РAI-1 и АGTR2:1675. Повышение их частоты до 100% приводит к ампутации конечности.
3. На основании методов многомерной статистики установлено влияние клинических и генетических факторов на развитие и прогнозирование степени эффективности хирургических вмешательств при атеросклеротических поражениях артерий нижних конечностей. При этом ведущим является полиморфизм генов АGTR2:1675 и NOS3:894, в виде мутаций по гомозиготе и гетерозиготе.

**Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом фактического материала, применением адекватных методик сбора и обработки информации. Использованы современные методы статистического анализа. В работе использовано современное сертифицированное оборудование. Полученные данные документированы таблицами, графиками. На основании результатов исследования сформулированы выводы и практические рекомендации диссертации.

Основные положения диссертации нашли применение в практической деятельности ГАУЗ ЯО «Клиническая больница № 9» г.Ярославля.

Результаты исследования используются при проведении учебного процесса со студентами V и VI курсов лечебного факультета, интернами и клиническими ординаторами Ярославского государственного медицинского университета.

Основные положения диссертации доложены на XXVIII Международной конференции «Новые направления и отдаленные результаты открытых и эндоваскулярных вмешательств в лечении сосудистых больных» (г.Новосибирск, 2013), III Съезде хирургов Юга России (г.Астрахань, 2013), XXIX Международной конференции «Новые направления и отдаленные результаты открытых и эндоваскулярных вмешательств в лечении сосудистых больных» (г.Рязань, 2014), конференции У.М.Н.И.К (г.Ярославль, 2015), межкафедральной конференции ЯГМУ.

**Личный вклад автора**

Личный вклад автора состоит в непосредственном выполнении всех этапов работы, в самостоятельном сборе фактического материала, проведении клинических исследований, статистической обработке и анализе полученных данных, их систематизации и интерпретации, подготовке публикаций, докладов по материалам, полученным в процессе проведения исследования.

**Публикации**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 9 – в центральной печати, в том числе 3 в журналах, входящих в Перечень ВАК Минобрнауки РФ.

**Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 17 рисунков и 45 таблиц. Состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы исследования», Результаты собственных исследований», заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 247 источников, из них 181 на русском и 66 на иностранных языках.

Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ГБОУ ВПО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, № государственной регистрации.

**ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Результаты исследований и их обсуждение**

Анализ полученных данных показал, что у пациентов с ОААНК наиболее часто встречалась мутация гена PAI-1 (86%), преимущественно за счет гетерозиготы (79,2%). С частотой 80,7% определен полиморфизма гена FGB, исключительно в гетерозиготном варианте (100%). Мутация гена AGTR2:1675 выявлена в 72,6% наблюдений, удельный вес гетерозиготы составил 69,8%, а гомозиготы 30,2%. Полиморфизм гена NOS3:894 наблюдался в 58,3% случаев, также преимущественно за счет гетерозиготного варианта (83,1%). Мутации других исследуемых генов встречались реже. Генетический вариант гена цитохрома Р-450 CYP2C9 выявлен в 24,2% наблюдений, удельный вес гетерозиготы составил 74%, а гена CYP2D6 – в 26,9% случаев, исключительно в гетерозиготном варианте (100%). Только гетерозиготный полиморфизм генов гемостаза F5 и F2 определен у 17,5% и 13% пациентов соответственно, а гена GPIIIA у 30,5% больных.

В настоящее время стадия заболевания является одним из важных клинических критериев, определяющих тактику лечения, а также объем консервативной терапии и хирургической коррекции. Ввиду важности изложенных моментов, это побудило нас изучить частоту полиморфизма генов в зависимости от выраженности хронической ишемии нижних конечностей (табл.1).

Таблица 1

Генетические варианты в зависимости от степени ишемии

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Гены | Стадии | Всего(n=223) |
| I (n=42) | II А (n=31) | II Б (n=86) | III (n=35) | IV (n=29) |
| АGTR2:1675 | всего | 23 (55%) | 26 (84%) | 66 (77%) | 25 (71%) | 22 (76%) | 162 (72,6%) |
| гомозигота | 12 (52%\*) | 2 (7,7%\*) | 5 (7,6%)\* | 12 (48%\*) | 18 (82%\*) | 49 (30,2%\*) |
| гетерозигота | 11 (48%\*) | 24 (92,3%\*) | 61 (92,4%\*) | 13 (52%\*) | 4 (18%\*) | 113 (69,8%\*) |
| NOS3:894 | всего | 18 (43%) | 25 (81%) | 68 (79%) | 15 (43%) | 4 (14%) | 130 (58,3%) |
| гомозигота | 4 (22%\*) | 4 (16%\*) | 10 (15%\*) | 3 (20%\*) | 1 (25%\*) | 22 (16,9%\*) |
| гетерозигота | 14 (78%\*) | 21 (84%\*) | 58 (85%\*) | 12 (80%\*) | 3 (75%\*) | 108 (83,1%\*) |
| CYP2C9 | всего | - | 5 (16%) | 16 (19%) | 15 (43%) | 18 (62%) | 54 (24,2%) |
| гомозигота | - | 2 (40%\*) | 9 (56%\*) | 3 (20%\*) | - | 14 (26%\*) |
| гетерозигота | - | 3 (60%\*) | 7 (44%\*) | 12 (80%\*) | 18 (100%\*) | 40 (74%\*) |
| CYP2D6 | всего | - | 6 (19%) | 17 (20%) | 16 (46%) | 21 (72%) | 60 (26,9%) |
| гомозигота | - | - | - | - | - | -\* |
| гетерозигота | - | 6 (100%\*) | 17 (100%\*) | 16 (100%\*) | 21 (100%\*) | 60 (100%\*) |
| F5 | всего | - | - | - | 11 (31%) | 28 (97%) | 39 (17,5%) |
| гомозигота | - | - | - | - | - | -\* |
| гетерозигота | - | - | - | 11 (100%\*) | 28 (100%\*) | 39(100%\*) |
| F2 | Всего | - | 4 (13%) | 15 (17%) | 10 (29%) | - | 29 (13%) |
| гомозигота | - | - | - | - | - | -\* |
| гетерозигота | - | 13 (100%\*) | 15 (100%\*) | 10 (100%\*) | - | 29 (100%\*) |
| РAI - 1 | всего | 42 (100%) | 27 (87%) | 70 (81%) | 25 (71%) | 28 (97%) | 192 (86%) |
| гомозигота | - | - | 1 (1,4%\*) | 11 (44%\*) | 28 (100%\*) | 40 (20,8%\*) |
| гетерозигота | 42 (100%\*) | 27 (100%\*) | 69 (98,6%\*) | 14 (56%\*) | - | 152 (79,2%\*) |
| GPIIIА | всего | - | 4 (13%) | 16 (19%) | 20 (57%) | 28 (97%) | 68 (30,5%) |
| гомозигота | - | - | - | - | - | -\* |
| гетерозигота | - | 4 (100%\*) | 16 (100%\*) | 20 (100%\*) | 28 (100%\*) | 68 (100%\*) |
| FGB | всего | 42 (100%) | 30 (97%) | 84 (98%) | 24 (69%) | - | 180 (80,7%) |
| гомозигота | - | - | - | - | - | -\* |
| гетерозигота | 42 (100%\*) | 30 (100%\*) | 84 (100%\*) | 24 (69%\*) | - | 180 (100%\*) |

Примечание: % – по отношению к числу пациентов в данной группе

%\* – удельный вес определяемой мутации

Представленные данные свидетельствуют, что при прогрессировании степени хронической ишемии имеет место увеличение частоты встречаемости полиморфизма генов цитохрома P-450 CYP2C9 и CYP2D6, генов гемостаза F5 и GPIIIA и уменьшение частоты мутации гена FGB. При всех стадиях заболевания имеет место высокая частота полиморфизма гена PAI-1. Закономерности по изменению частоты генетических вариантов AGTR2:1675 и NOS3:894 в зависимости от стадии выявлено не было.

Уровень окклюзионно-стенотического процесса, как правило, определяет выбор метода лечения. В этой связи нами изучены генетические варианты в зависимости от уровня окклюзии сосудистого сегмента (табл.2).

Таблица 2

Частота полиморфизма генов в зависимости от уровня поражения у пациентов с ОААНК

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Гены | Уровень поражения | Всего(n=223) |
| Аорто-подвздошный (n=30) | Бедренно-подколенный (n=107) | Подколенно-берцовый(n=86) |
| АGTR2:1675 | всего | 17 (57%) | 79 (74%) | 66 (77%) | 162 (72,6%) |
| гомозигота | 5 (29%\*) | 24 (30%\*) | 20 (30%\*) | 49 (30,2%\*) |
| гетерозигота | 12 (71%\*) | 55 (70%\*) | 46 (70%\*) | 113 (69,8%\*) |
| NOS3:894 | всего | 16 (53%) | 63 (59%) | 51 (59%) | 130 (58,3%) |
| гомозигота | 6 (38%\*) | 11 (17%\*) | 5 (9,8%\*) | 22 (16,9%\*) |
| гетерозигота | 10 (62%\*) | 52 (83%\*) | 46 (90,2%\*) | 108 (83,1%\*) |
| CYP2C9 | всего | 12 (40%) | 34 (32%) | 8 (9%) | 54 (24,2%) |
| гомозигота | 5 (42%\*) | 9 (26%\*) | -\* | 14 (26%\*) |
| гетерозигота | 7 (58%\*) | 25 (74%\*) | 8 (100%\*) | 40 (74%\*) |
| CYP2D6 | всего | 13 (43%) | 36 (34%) | 11 (13%) | 60 (26,9%) |
| гомозигота | -\* | -\* | -\* | -\* |
| гетерозигота | 13 (100%\*) | 36 (100%\*) | 11 (100%\*) | 60 (100%\*) |
| F5 | всего | 3 (10%) | 27 (25%) | 9 (10,5%) | 39 (17,5%\*) |
| гомозигота | -\* | -\* | -\* | - |
| гетерозигота | 3 (100%\*) | 27 (100%\*) | 9 (100%\*) | 39 (100%\*) |
| F2 | всего | 14 (47%) | 15 (14%) | - | 29 (13%) |
| гомозигота | -\* | -\* | - | -\* |
| гетерозигота | 14 (100%\*) | 15 (100%\*) | - | 29 (100%\*) |
| РAI-1 | всего | 15 (50%) | 91 (85%) | 86 (100%) | 192 (86%) |
| гомозигота | 4 (27%\*) | 27 (30%\*) | 9 (10,5%\*) | 40 (20,8%\*) |
| гетерозигота | 11 (73%\*) | 64 (70%\*) | 77 (89,5%\*) | 152 (79,2%\*) |
| GPIIIА | всего | 18 (60%) | 41 (38%) | 9 (10,5%) | 68 (30,5%) |
| гомозигота | -\* | -\* | -\* | -\* |
| гетерозигота | 18 (100%\*) | 41 (100%\*) | 9 (100%\*) | 68 (100%\*) |
| FGB | всего | 25 (83%) | 79 (74%) | 76 (88%) | 180 (80,7%) |
| гомозигота | -\* | -\* | -\* | - |
| гетерозигота | 25 (100%\*) | 79 (100%\*) | 76 (100%\*) | 180 (100%\*) |

Примечание: % – по отношению к числу пациентов в данной группе

%\* – удельный вес определяемой мутации

Анализ полученных данных показал, что при аорто-подвздошном и бедренно-подколенном уровне окклюзионно-стенотического процесса достоверно чаще встречался полиморфизм генов цитохрома Р-450 CYP2C9 и CYP2D6, и GPIIIА, чем при подколенно-берцовом (р<0,05). Выявлены значимые различия по частоте мутации гена F2 при поражении аорто-подвздошного сегмента, в отличие от бедренно-подколенного и подколенно-берцового сегмента. Напротив, частота мутации гена РAI -1 чаще встречалась при поражении бедренно-подколенного и подколенно-берцового уровня артериального русла (р<0,05). При сравнении частоты генетических вариантов генов АGTR2:1675, NOS3:894, F5 и FGB (р>0,05) в зависимости от уровня поражения конечности достоверных различий не выявлено (р>0,05).

Определенную клиническую значимость представляют изменения генетических ассоциаций в зависимости от выбранного метода лечения данного контингента больных.

Анализ полученных данных показал наличие статистически значимых различий по частоте определяемых генов. Полиморфизм генов AGTR2:1675 (80%) , NOS:894 (61%) и PAI-1 (99,5%) достоверно чаще встречались у пациентов, получавших консервативную терапию, чем у больных, перенесших реконструктивную операцию (p<0,05). Однако удельный вес гомозиготного варианта указанных генов достоверно чаще выявлен у пациентов с восстановленным магистральным кровотоком. Частота полиморфизма генов CYP2C9 (64%), CYP2D6 (67%), GPIIIА (92%) и F2 (74%) достоверно выше у пациентов, перенесших реваскуляризирующую операцию (p<0,05). В обеих группах пациентов преобладал удельный вес гетерозиготного варианта. По частоте мутаций генов F5 и FGB статистически значимых отличий не выявлено.

Полученные данные, по-видимому, являются отражением степени исходной ишемии и в определенной степени могут выступать отправными критериями для оценки эффективности лечебных мероприятий с позиций генетического тестирования. В этой связи дальнейшие исследования были направлены на выявление частоты полиморфизма генов в зависимости от степени эффективности консервативной терапии и выполненных оперативных вмешательств. Клиническую эффективность определяли по частоте выполненных ампутаций. При консервативной терапии частота ампутаций составила 18% (33 человека). С учетом изложенного в каждой группе проведена оценка генетического полиморфизма в зависимости от степени эффективности проводимого лечения (табл. 3). Как показали исследования, статистически значимых различий по частоте встречаемости генов AGTR2:1675 и PAI-1 между группами пациентов выявлено не было (р>0,05), однако следует отметить, что при неэффективной консервативной терапии преимущественно определен гомозиготный полиморфизм указанных генов (88,5% и 100% соответственно). У пациентов, перенесших ампутацию, ввиду неэффективности консервативной терапии достоверно чаще встречался полиморфизм генов цитохрома Р-450 CYP2D6 (78,8%) и CYP2C9 (72,7%), F5 (97%) и тромбоцитарного рецептора фибриногена GPIIIA (97%) (р<0,0001). Однако, высокая частота мутаций по гетерозиготе генов NOS3:894 (72,8%) и FGB (99,3%) выявлена у пациентов, не подвергавшихся оперативному лечению (р<0,0001). Можно предположить, что при выявлении генетических предпосылок для ампутации конечности одним из методов пролонгирования эффективности фармакотерапии является назначение генных препаратов.

Таблица 3

Влияние частоты генетического полиморфизма на эффективность консервативного лечения пациентов с ОААНК

|  |  |
| --- | --- |
| Гены | Степень эффективности консервативного лечения |
| Эффективно (n=151) | Неэффективно (n=33) |
| Абс. | % | Абс. | % |
| АGTR2:1675 | всего | 121  | 80,1% | 26 | 78,8% |
| гомозигота | 16  | 13,2%\* | 23 | 88,5%\* |
| гетерозигота | 105 | 86,8%\* | 3 | 11,5%\* |
| NOS3:894 | всего | 110 | 72,8% | 3 | 9,1% |
| гомозигота | 7 | 6,4%\* | 1 | 33,3%\* |
| гетерозигота | 103 | 93,6%\* | 2 | 66,7%\* |
| CYP2C9 | всего | 5 | 3,3% | 24 | 72,7% |
| гомозигота | 1 | 20%\* | - | - |
| гетерозигота | 4 | 80%\* | 24 | 100%\* |
| CYP2D6 | всего | 8 | 5,3% | 26 | 78,8% |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | 8 | 100%\* | 26 | 100%\* |
| F5 | всего | - | - | 32 | 97% |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | - | - | 32 | 100%\* |
| F2 | всего | - | - | - | - |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | - | - | - | - |
| РAI-1 | всего | 151 | 100% | 32 | 97% |
| гомозигота | - | - | 32 | 100%\* |
| гетерозигота | 151 | 100%\* | - |  |
| GPIIIА | всего | - | - | 32 | 97% |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | - | - | 32 | 100%\* |
| FGB | всего | 150 | 99,3% | - | - |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | 150 | 100%\* | - | - |

Примечание: % – по отношению к числу пациентов в данной группе

%\* – удельный вес мутации

В группе пациентов, перенесших реваскуляризирующую операцию, частота ампутаций также составила 18% (7 человек). В связи с этим у всех больных был изучен полиморфизм генов (табл. 4).

Таблица 4

Влияние частоты генетического полиморфизма на эффективность хирургического лечения ОААНК.

|  |  |
| --- | --- |
| Гены | Степень эффективности реконструктивных операций |
| Эффективны (n=32) | Неэффективны (n=7) |
| АGTR2:1675 | всего | 8 | 25% | 7 | 100% |
| гомозигота | 4 | 50%\* | 6 | 85,7%\* |
| гетерозигота | 4 | 50%\* | 1 | 14,3%\* |
| NOS3:894 | всего | 16 | 50% | 1 | 14,3% |
| гомозигота | 14 | 87,5%\* | - | - |
| гетерозигота | 2 | 12,5%\* | 1 | 100%\* |
| CYP2C9 | всего | 20 | 62,5% | 5 | 71,4% |
| гомозигота | 13 | 65%\* | - | - |
| гетерозигота | 7 | 35%\* | 5 | 100%\* |
| CYP2D6 | всего | 21 | 65,6% | 5 | 71,4% |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | 21 | 100%\* | 5 | 100%\* |
| F5 | всего | - | - | 7 | 100% |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | - | - | 7 | 100%\* |
| F2 | всего | 29 | 90,6% | - | - |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | 29 | 100%\* | - | - |
| РAI-1 | всего | 2 | 6,3% | 7 | 100% |
| гомозигота | 1 | 50%\* | - | - |
| гетерозигота | 1 | 50%\* | 7 | 100%\* |
| GPIIIА | всего | 29 | 90,6% | 7 | 100% |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | 29 | 100%\* | 7 | 100%\* |
| FGB | всего | 30 | 93,8% | - | - |
| гомозигота | - | - | - | - |
| гетерозигота | 30 | 100%\* | - | - |

Примечание: % – по отношению к числу пациентов в данной группе

%\* – удельный вес определяемой мутации

Установлено, что статистически значимых отличий по частоте встречаемости генов NOS3:894, CYP2C9, CYP2D6 , GPIIIА между группами выявлено не было (р>0,05). Среди генов, которые ассоциированы с неэффективностью реконструктивных операций наибольшую клиническую значимость имеют: гетерозиготный вариант F5 , РAI-1 (р<0,001) и АGTR2:1675 (р<0,05).

В зависимости от метода хирургической коррекции магистрального кровотока ампутации конечности были выполнены в 50% наблюдений после тромбэктомии и в 67% случаев после эндартерэктомии, БПШ и ПБШ. Причинами ампутаций после реваскуляризирующих операций был тромбоз шунта при шунтировании артерии и при выполнении дезоблитерирующих операций.

По-видимому, при наличии высокой частоты полиморфизма генов, ассоциированных с выполнением ампутации выполнение данных оперативных вмешательств в конкретной клинической ситуации должно быть минимизировано.

Частота полиморфизма определяемых генов при эффективном консервативном лечении и реконструктивных операциях была неодинаковой.

У больных при эффективной консервативной терапии достоверно чаще определен полиморфизм генов АGTR2:1675 и РAI-1, а при эффективном восстановлении магистрального артериального кровотока достоверно чаще встречались генетические варианты цитохрома P-450 CYP2C9 и CYP2D6, генов гемостаза F2 и GPIIIА (р<0,0001). Различий по частоте мутаций генов FGB и NOS3:894 между группами не выявлено

Согласно существующим представлениям степень доказательности полученных данных значимо возрастает при использовании методов многомерной статистики. В связи с этим изучены возможности прогнозирования эффективности оперативных методов лечения хронической ишемии нижних конечностей с учетом генетического полиморфизма. Первая группа включала пациентов, перенесших ампутацию конечности (40 человек – 55,6%). Пациентам второй группы была выполнена реконструктивная операция на сосудах нижней конечности (32 пациента – 44,4%). Пациенты, которые получали консервативную сосудистую терапию в исследование включены не были, так как для данной группы больных в национальных рекомендациях по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей подробно описана тактика ведения данного контингента больных и в объективизации подхода к прогнозированию течения заболевания на основе генетического полиморфизма, с нашей точки зрения, необходимости нет. Поэтому нами была предпринята попытка прогнозирования эффективности оперативных методов лечения хронической ишемии нижних конечностей с учетом генетической составляющей.

Последовательно методом редукции множества признаков в программе «MedCalc» v. 12.7.0.0 были выделены комбинации наиболее значимых показателей, отличающие группы друг от друга. Для построения прогностической модели в отношении эффективности оперативных методов лечения хронических облитерирующих заболеваний были использованы ROC-анализ и построение логистической регрессии. В эту модель оказались включенными следующие переменные: полиморфизм гена эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3:894) и гена рецептора ангиотензина II второго типа (AGTR2:1675); возраст пациентов; уровень окклюзионно-стенотического поражения; показатели липидограммы: липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и уровень триглицеридов (ТГ). Прогностическая мощность составила 90,28%.(рис.1)



Рис. 1. ROC-кривые независимых переменных

Площадь под кривой (AUC) указывает на уровень прогностической значимости. Наименьшая точность переменной выявлена для прогноза в отношении уровня ТГ в крови (AUC=0,0663 (0,538-0,767)). Самое высокое значение площади под кривой (AUC=0,892 (0,719-0,906)) выявлено для переменной полиморфизм гена AGTR2:1675. Однако и это значение было недостаточно высоким.

В дальнейшем с целью выявления возможной комбинации выделенных переменных построено регрессионное уравнение, с включением всех значимых переменных, в результате оно имело вид:

**LOG=СУММ(313,6572;1,67772\*AGTR2:1675;-3,16337\*УР;1,67003\*ТГ;**

**-0,057423\*ВЗР;-1,59131\*** **NOS3:894;0,27886\*ЛПНП).**

После его решения выверена одиночная аналитическая шкала прогностических значений с оптимальной комбинацией между чувствительностью и специфичностью, определенных по последующей процедуре ROC-анализа (рис.2).



Рис.2. ROC-кривая конечной прогностической модели

Уровень значения данной модели статистически значимый (р<0,0001). Площадь под кривой (AUC) составляла 0,959. Точка отсечения при данной модели находилась на уровне -0,4511, где чувствительность составила 93,75%, c 95% доверительным интервалом от 79 до 99, а специфичность - 92,5%, с 95% доверительным интервалом 79 до 98, с положительным 12,5 и отрицательным 0,068 отношением правдоподобия. При сравнении полученных данных значение площади под кривой самого значимого прогностического показателя AGTR2:1675 оказалась ниже совокупного оценочного значения «LOG» (AUC 0,892<0,959), поэтому конечная модель «LOG» имеет наибольшую прогностическую способность в отношении оценки эффективности оперативного лечения облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей. Прогностическая мощность составляет 90,28%, чувствительность -93,75%, специфичность – 92,5%.

При решении уравнения регрессии для каждого конкретного пациента получены оценочные значения, которые при сопоставлении с аналитической шкалой позволяют прогнозировать эффективность реконструктивных операций, направленных на восстановление магистрального кровотока. Если оценочное значение ниже точки отсечения, то возрастает риск неэффективности реконструктивной операции. Напротив, если полученное значение выше указанной точки отсечения, то вероятность эффективности операции, направленной на восстановление магистрального кровотока повышается (рис.3)

Рис.3. Оценочная шкала прогностических значений

Таким образом, применение методов многомерной статистики позволяет с позиции доказательной медицины прогнозировать эффективность реконструктивных операций, с учетом не только клинических и лабораторных данных, но и на основании изменения полиморфизма генов.

**ВЫВОДЫ**

1. Полиморфизм генов: PAI -1 (86%), FGB (80,7%), AGTR2:1675 (72,6%), NOS3:894 (58,3%) предопределяет прогрессирование облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. В зависимости от возраста и пола частота полиморфизма генов несущественна.

2. Ухудшение течения заболевания при окклюзии аорто-подвздошного сегмента ассоциируется с полиморфизмом генов FGB (83%), GPIIIА (60%), AGTR2:1675 (56,7%), NOS3:894 (53%) и PAI-1 (50%); бедренно-подколенного сегмента с мутацией генов PAI-1 (85%), FGB (74%), AGTR2:1675 (74%); NOS3:894 (59%); подколенно-берцового сегмента с полиморфизмом генов PAI-1 (100%), FGB (88%), AGTR2:1675 (77%); NOS3:894 (59%). Удельный вес гомозиготного полиморфизма варьирует от 9,8 до 37,5% , гетерозиготного от 62,5 до 100%.

3. При консервативной терапии окклюзионных заболеваний артерий нижних конечностей степень её неэффективности ассоциируется с гетерозиготным полиморфизмом генов цитохрома Р-450 CYP2D6 (78,8%) и CYP2C9 (72,7%), F5 (97%) и тромбоцитарного рецептора фибриногена GPIIIA (97%). Частота мутации указанных генов выше 72,5% является фактором риска возможной ампутации конечности.

4. При выполнении реконструктивных операций на артериях нижних конечностей после тромбэктомии и эндартерэктомии при поражении бедренно-подколенного и подколенно-берцового сегментов, частота ампутаций ассоциирована с гетерозиготным полиморфизмом генов F5 (100%) и РAI-1 (100%), и мутацией гена АGTR2:1675 (100%), по гомозиготе (85,7%) и гетерозиготе (14,3%). Гендерные различия и возраст больных существенного влияния не оказывают.

5. Использование прогнозирования эффективности оперативных методов лечения при облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей методами многомерной статистики с учетом генетического тестирования ассоциируется с полиморфизмом генов AGTR2:1675 и NOS3:894. Прогностическая мощность составляет 90,28%, чувствительность – 93,75%, специфичность – 92,5%.

**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для прогнозирования течения атеросклеротических заболеваний артерий нижних конечностей целесообразно использовать мониторинг генетического тестирования с оценкой частоты полиморфизма генов.
2. При неэффективной консервативной терапии облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей с позиций изменений частоты полиморфизма генов необходима интенсификация фармакотерапии, направленная на улучшение функционального состояния коллатерального кровообращения с включением в комплекс лечебных мероприятий генных препаратов.

3. С учетом генетического тестирования степень эффективности реконструктивных операций повышается при их выполнении на бедренно-подколенном и аорто-подвздошном сегменте. В этих случаях частота ампутаций в ближайшем и отдаленном периоде уменьшается.

4. Степень доказательности эффективности оперативных методов, направленных на улучшение магистрального кровотока возрастает при использовании методов многомерной статистики.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Рыбачков, В.В. Возможности генетического прогнозирования осложнений окклюзионных заболеваний артерий нижних конечностей / В.В. Рыбачков, Е.Н. Кабанов, ***Е.Н. Четверикова*** // Материалы III съезда хирургов России с международным участием. – Астрахань, 2013. – С. 12.
2. ***Четверикова, Е.Н.*** Оценка риска тромботических осложнений у пациентов с окклюзионными заболеваниями артерий нижних конечностей / Е.Н. Четверикова, В.В. Рыбачков // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки»: сборник научных работ студентов и молодых ученых. – Ярославль, 2013. – С. 181
3. Рыбачков, В.В. Оценка генетических маркеров при окклюзионных заболеваниях артерий нижних конечностей / В.В. Рыбачков, Е.Н. Кабанов, ***Е.Н. Четверикова*** // Материалы XXVIII международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. – Новосибирск, 2013. – С. 338-339.
4. Рыбачков, В.В. Возможность генетического прогнозирования эффективности лечения облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / В.В. Рыбачков, ***Е.Н. Четверикова,*** Е.Н. Кабанов // Материалы ХХVII конференции хирургов Республики Карелия. – Петрозаводск, 2014. – С. 135-136.
5. Рыбачков, В.В. Возможность генетического тестирования при окклюзионных заболеваниях артерий нижних конечностей / В.В. Рыбачков, Е.Н. Кабанов, ***Е.Н. Четверикова*** // Материалы ХХ1Х международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. – 2014. – Т.20, №2 (приложение). – С. 293-294.
6. Рыбачков, В.В. Оценка частоты генетического полиморфизма при облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей / В.В. Рыбачков, ***Е.Н Четверикова*** // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания»: сборник статей. – Москва, 2014. – С. 262.
7. Рыбачков, В.В. Роль генетического полиморфизма в развитии облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / В.В. Рыбачков, Е.Н. Кабанов, ***Е.Н. Четверикова*** // VIII Всероссийская конференции общих хирургов с международным участием, посвященной 95-летию СамГМУ: сборник тезисов. – Самара, 2014. – С. 454-455.
8. Рыбачков, В.В. Частота полиморфизма генов у пациентов с атеросклеротической гангреной нижних конечностей / В.В. Рыбачков, Е.Н. Кабанов, ***Е.Н. Четверикова*** // Международная научно-практическая конференция «Хирургическая обработка ран и гнойно-некротических очагов у детей и взрослых»: сборник тезисов – Москва, 2014. – С. 203-204.
9. Седелкин, А.Е. Генетические аспекты облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / А.Е. Седелкин, ***Е.Н. Четверикова*** // Всероссийская научно-практической конференция с международным участием, посвященная памяти академика М.И.Перельмана «Актуальные вопросы медицинской науки»: сборник научных работ студентов и молодых ученых. – Ярославль, 2014. – С. 185.
10. **Рыбачков, В.В. Полиморфизм генов, ассоциированных с риском развития артериальной гипертензии и наследственных тромбофилий, у больных с хроническими окклюзионными заболеваниями нижних конечностей / В.В. Рыбачков, *Е.Н. Четверикова* // Вестник Ивановской медицинской академии. -2014. – Т.19, №4. – С. 27-30.**
11. **Рыбачков, В.В. Оценка эффективности лечения облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей на основе генетического полиморфизма / В.В. Рыбачков, *Е.Н. Четверикова* // Современные проблемы науки и образования. [Электронный ресурс] – 2015. – № 2; URL:**[**http://www.science-education.ru/122-17144**](http://www.science-education.ru/122-17144)**, 112 Кб**
12. **Рыбачков, В.В. Прогнозирование эффективности оперативных методов лечения облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей / В.В. Рыбачков, *Е.Н. Четверикова,* Л.Б. Шубин, Е.Н. Кабанов // Современные проблемы науки и образования. [Электронный ресурс] – 2015. – № 2; URL:**[**http://www.science-education.ru/122-18135**](http://www.science-education.ru/122-18135)**, 135 Кб**

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АБФШ – аортобифеморальное шунтирование

АГ – артериальная гипертензия

БПШ – бедренно-подколенное шунтирование

ГБО – гипербарическая оксигенация

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КИМ – комплекс интима-медиа

ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ОААНК – облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

ОХ – общий холестерин

ПБШ – подвздошно-бедренное шунтирование

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТГ – триглицериды

УЗДГ – ультразвуковая допплерография

АGTR2: 1675 – ген рецептора к ангиотензину II 2 типа

AUC – площадь под кривой

CYP2C9 – ген цитохрома Р-450

CYP2D6 – ген цитохрома Р-450

F5 – ген фактора Лейдена

F2 – ген протормбина

FGB – ген фибриногена

GPIIIA – ген тромбоцитарного рецептора фибриногена

NOS3:894 – ген, синтазы окиси азота

PAI-1 – ген ингибитора активатора плазминогена