

На правах рукописи



Ступин Юрий Викторович

**РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ
СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ И
ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ В ПАТОГЕНЕЗЕ
УШИБА ГОЛОВНОГО МОЗГА**

3.3.3. Патологическая физиология
(медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Чита – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Мироманов Александр Михайлович**

Официальные оппоненты:

Шилов Сергей Николаевич - доктор медицинских наук, доцент.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии

Страмбовская Наталья Николаевна - доктор медицинских наук, доцент.

Государственное автономное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая больница имени Н.А. Семашко» Министерства здравоохранения Республики Бурятия, руководитель регионального сосудистого центра

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул

Защита диссертации состоится «19» февраля 2024 года в ___ на заседании диссертационного совета 21.2.077.01 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а, <http://chitgma.ru>)

Автореферат разослан « ___ » _____ 202_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.м.н., доцент



Наталья Анатольевна Мироманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Травматизм занимает 3-е место в структуре летальности населения [Крылов В.В., 2018; Гусева Е.И. и соавт., 2019]. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) относится к наиболее распространенному виду повреждений и составляет от 36 до 40% в структуре травм. Согласно данным ВОЗ, частота ЧМТ ежегодно увеличивается на 2%, при этом отмечается нарастание частоты тяжелых видов повреждений, что связано с развитием техники, прежде всего средств передвижения, увеличением количества автомашин, урбанизацией населения. В России частота ЧМТ составляет 4,5 на 1000 населения в год. При этом, в стационарном лечении ежегодно нуждаются более 80 тыс. пострадавших. ЧМТ наиболее часто подвержены люди трудоспособного возраста (от 20 до 50 лет) [Кириянова В.В. и соавт., 2018; Крылов В.В., 2018; Гусева Е.И. и соавт., 2021; Khellaf A. et al., 2019; Du H. et al., 2022; Jiang F. et al., 2022]. Это обосновывает необходимость и важность дальнейших научных исследований, направленных на углубленное изучение патогенетических особенностей ЧМТ с целью совершенствования диагностики, прогнозирования течения и исходов, оптимизации лечебных мероприятий [Щеголева Л.С. и соавт., 2019; Хамидова Л.Т. и соавт., 2020; Бояринцев В.В. и соавт., 2021].

В настоящее время общепризнана роль тромбофилий в возникновении осложнений и отягощении течения различных заболеваний [Страмбовская Н.Н. и соавт., 2019]. Установлено, что большая часть хирургической патологии протекает на фоне нарушений в системах гемостаза и иммунитета [Момот А.П. и соавт., 2021; Вдовин В.М. и соавт., 2023]. Состояние последних оказывает значительное влияние на течение заболеваний, эффективность лечения и исход [Савченко В.Г., 2018; Pellot J.E., Jesus O.D., 2021]. Течение ЧМТ у больных с тромбофилиями зачастую сопровождается возникновением таких осложнений как венозный тромбоз различных локализаций, ТЭЛА, ДВС-синдром, кровотечения. Тяжёлая ЧМТ является пусковым моментом для возникновения ферментного каскада системы гемостаза, и при этом у пациентов, страдающих тромбофилией, происходит срыв резервных возможностей организма, что неизбежно приводит к грубым патофизиологическим сдвигам, в частности, к выраженными сдвигам сосудисто-тромбоцитарного звена, свертывания крови и фибринолиза, которые во многих случаях приобретают признаки ДВС-синдрома [Момот А.П. и соавт., 2021; Вдовин В.М. и соавт., 2023; van Gent J.A.N. et al., 2020; Krishna G. et al., 2021; Pellot J.E., Jesus O.D., 2021].

Степень разработанности темы. Вопросами эпидемиологии, патогенеза, клинического течения, диагностики и лечения ушиба головного мозга (УГМ) занимались и продолжают заниматься многие отечественные и зарубежные авторы. В ходе изучения исследований, представленные научные труды не раскрывают генетических аспектов иммунитета и гемостаза в патогенезе течения и исходов УГМ. В настоящее время выявлено несколько генетических дефектов, имеющих прямое или опосредованное отношение к нарушениям иммунной системы и гемостаза, утяжеляющих течение основного заболевания. Так, установлено, что около 60-70% всех случаев неблагоприятного течения ЧМТ обусловлено генетическими факторами, на фоне которых приобретенные факторы играют провоцирующую роль [McFadyen C.A. et al., 2021; Zeiler F.A. et al., 2021]. В Забайкальском крае популяция людей в отношении ЧМТ является неизученной.

Предикторы исходов ЧМТ к настоящему моменту до конца не выяснены, и все больше исследователей осуществляют поиски механизмов прогрессирования очагов контузии и их влияния на исход. Прогнозирование летального и функционального исходов имеет важное значение для определения стратегии лечения и распределения ресурсов для пациентов при тяжелой ЧМТ [Nasi D. et al., 2019; Adatia K. et al., 2021].

Существующие многовариантные модели прогнозирования клинических исходов ЧМТ, такие как IMPACT (Международная миссия по прогнозированию и дизайну клинических испытаний в ЧМТ), объясняют примерно 35% варибельности исходов ЧМТ [Maas A.I.R. et al., 2017], тогда как около 65% исходов ЧМТ остается необъяснимой с помощью существующих крупных многофакторных моделей, которые включают в основном немодифицируемые характеристики травмы, выявленные в момент госпитализации. Из этого следует, что генетическая изменчивость все чаще признается важным фактором непостоянства посттравматического ответа хозяина [McFadyen C.A. et al., 2021; Zeiler F.A. et al., 2021].

Поиск новых генетических и иммунологических механизмов, влияющих на течение и исход УГМ, позволит стратифицировать группы риска и своевременно проводить персонализированные профилактические и лечебные мероприятия, направленные на предотвращение развития грозных осложнений и/или способствующие благоприятному течению травматической болезни головного мозга, что полностью соответствует приоритетному направлению стратегии развития науки и здравоохранения России до 2025 года, в частности – «развитие персонализированной медицины, основанной на современных научных достижениях», а также

«разработка и внедрение современных молекулярно-генетических методов прогнозирования, диагностики и мониторинга течения заболеваний» [Указ Президента РФ № 254 от 06.06.2019].

Цель исследования: выявить патогенетическую и прогностическую роль полиморфизма некоторых генов свертывающей системы крови (*F2-20210(G>A)*, *F5-1691(G>A)*, *F7-10976(G>A)*, *FGB-455(G>A)*, *MTHFR-677(C>T)*, *MTRR-66(A>G)*, *PAI-1-675(5G>4G)*) и иммунорегуляторных молекул (*TLR2-753(Arg>Gln)*, *TLR4-299(Asp>Gly)*) в неблагоприятном течении ушиба головного мозга.

Задачи исследования:

1. Определить содержание цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10), показатель лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА), уровни тканевого фактора (TF), D-димера, параметры коагулограммы (фибриноген, МНО, АЧТВ) в сыворотке крови, а также общий объем очага ушиба, объем его жидкой части и оценить их вклад в развитие неблагоприятного течения ушиба головного мозга.
2. Установить значение носительства полиморфизма генов *F2-20210(G>A)*, *F5-1691(G>A)*, *F7-10976(G>A)*, *FGB-455(G>A)*, *MTHFR-677(C>T)*, *MTRR-66(A>G)*, *PAI-1-675(5G>4G)*, *TLR2-753(Arg>Gln)*, *TLR4-299(Asp>Gly)* и их комбинаций при неблагоприятном течении ушиба головного мозга.
3. Выявить влияние носительства полиморфизма генов (*F2-20210(G>A)*, *F5-1691(G>A)*, *F7-10976(G>A)*, *FGB-455(G>A)*, *MTHFR-677(C>T)*, *MTRR-66(A>G)*, *PAI-1-675(5G>4G)*) на показатели фибриногена, МНО, АЧТВ, TF, D-димера и полиморфизма генов *TLR2-753(Arg>Gln)*, *TLR4-299(Asp>Gly)* на содержание цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10), показатель ЛТА в сыворотке крови при ушибе головного мозга.
4. Установить взаимосвязи между изучаемыми параметрами и выявить их прогностическую роль в неблагоприятном течении ушиба головного мозга.

Научная новизна

Показано, что неблагоприятное течение ушиба головного мозга сопровождается значительным повышением в сыворотке крови на третьи сутки после травмы уровней про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10), фибриногена, тканевого фактора, D-димера и снижением показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, МНО, АЧТВ по сравнению с пациентами при благоприятном исходе ЧМТ.

Впервые установлено, что при неблагоприятном течении

травматической болезни головного мозга выявлена более высокая частота носительства генотипа -20210A/A гена *F2-20210(G>A)*, генотипа -10976A/A гена *F7-10976(G>A)*, генотипа -455A/A гена *FGB-455(G>A)*, генотипа -66G/G гена *MTRR-66(A/G)*, генотипа -675 4G/4G гена *PAI-1-675(5G>4G)*, генотипа -753Gln/Gln гена *TLR2-753(Arg>Gln)*, и генотипа -299AspAsp гена *TLR4-299(Asp>Gly)*. Показано, что распределение частот аллелей и генотипов гена *F5-1691(G>A)* и гена *MTHFR-677(C>T)* у пациентов при ушибе головного мозга не отличается от практически здоровых резидентов.

Доказано, что увеличение содержания фибриногена, тканевого фактора и D-димера в сыворотке крови зависит от генотипа *MTRR66G/G* и *PAI-1675-4G/4G*; увеличение уровня тканевого фактора – от генотипа *FGB455A/A*, а повышение концентрации цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10) и снижение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии – от носительства генотипа *TLR2753Gln/Gln* и *TLR4299Asp/Asp*.

Впервые выявлена высокая сила взаимосвязей между полиморфизмами генов (*F7(G10976A)*, *FGB(G455A)*, *MTRR(A66G)*, *PAI-1(5G6754G)*, *TLR2(Arg753Gln)*, *TLR4(Asp299Gly)*), прогрессированием общего объема очага ушиба, объема его жидкой части и неблагоприятным течением ушиба головного мозга.

Впервые отмечено, что комбинация полиморфизма генов - *F7-10976(G>A) x FGB-455(G>A) x TLR2-753(Arg>Gln)*, *PAI-1-675(5G>4G) x MTRR-66(A>G) x FGB-455G>A* и *FII-20210(G>A) x MTRR-66(A>G) x PAI-1(5G>4G) x TLR4-299(Asp>Gly)* позволяет предвидеть неблагоприятное течение ушиба головного мозга.

Теоретическая и практическая значимость работы

Ценность работы заключается в расширении знаний о генетических факторах патогенеза ушиба головного мозга. Носительство генотипа -10976A/A гена *F7-10976(G>A)*, генотипа -455A/A гена *FGB-455(G>A)*, генотипа -66G/G гена *MTRR-66(A/G)*, генотипа -675 4G/4G гена *PAI-1-675(5G>4G)*, генотипа -753Gln/Gln гена *TLR2-753(Arg>Gln)*, генотипа -299AspAsp гена *TLR4-299(Asp>Gly)* и генотипа -20210A/A гена *F2-20210(G>A)* у резидентов является фактором риска неблагоприятного течения ушиба головного мозга.

Выявление генетических маркеров ушиба головного мозга позволит проводить профилактические и лечебные мероприятия, направленные на предупреждение развития осложнений, и будет способствовать благоприятному течению травматической болезни головного мозга.

Методология и методы исследования

В исследование включено 96 неродственных пациентов с УГМ II-III стадии, русской национальности, проживающих на территории Забайкальского края. Контрольную группу составили 100 практически здоровых лиц аналогичного возраста, национальности и ареала проживания. В работе применялись: клинический метод исследования; лабораторные (ИФА, ПЦР, гемостазиологические); инструментальный (КТ головы) и статистические методы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наличие генотипа -20210A/A гена *F2*, генотипа -10976A/A гена *F7*, генотипа -455A/A гена *FGB*, генотипа -66G/G гена *MTRR*, генотипа -675 4G/4G гена *PAI-1*, генотипа -753Gln/Gln гена *TLR2* и генотипа -299AspAsp гена *TLR4* ассоциировано с прогрессированием объема очага ушиба головного мозга (УГМ), объема его жидкой части и неблагоприятным течением патологического процесса.
2. У пациентов при УГМ носительство генотипа *MTRR66G/G*, *PAI-1675-4G/4G* сопровождается высоким содержанием фибриногена (FGB), тканевого фактора (TF) и D-димера, генотип *FGB455A/A* – высокой концентрацией тканевого фактора, а генотип *TLR2753Gln/Gln*, *TLR4299Asp/Asp* – высоким содержанием цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10) и низким показателем лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии.
3. Прогностическими факторами неблагоприятного течения УГМ является носительство комбинации генотипа -10976A/A гена *F7*, генотипа -455A/A гена *FGB*, генотипа -753 Gln/Gln гена *TLR2*, генотипа -675 4G/4G гена *PAI-1* и генотипа -66G/G гена *MTRR*, а также носительство комбинации генотипа -20210A/A гена *F2*, генотипа -66G/G гена *MTRR*, генотипа -675 4G/4G гена *PAI-1* и генотипа -299Asp/Asp гена *TLR4*.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация выполнена в рамках комплексной научной работы – РК 025(11) № 01201251787. Этапы научного исследования выполнены при непосредственном участии соискателя. Автором поставлены цели и задачи исследования, произведена выборка больных, собраны и проанализированы клинические, лабораторные и инструментальные данные. Разработаны персонализированные патогенетические механизмы прогрессирования УГМ и сформированы подходы к его прогнозированию.

Материалы исследований доложены на заседании РОО «Научно-практическое общество травматологов-ортопедов Забайкалья» (Чита, 2020 – 2022); VII Пироговском форуме травматологов-ортопедов (Салта –

Махачкала, 2022); Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Полиатравма. Острые вопросы лечения поврежденных опорно-двигательного аппарата: вчера, сегодня и завтра» (Благовещенск, 2022); Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Чита, 2022); XII Всероссийском съезде травматологов-ортопедов «Достижения Российской травматологии и ортопедии» (Москва, 2022).

Полученные результаты внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии, травматологии и ортопедии, неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 3 статьи в ведущих рецензируемых журналах, определенных ВАК Минобрнауки России, 2 свидетельства регистрации программ для ЭВМ.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит 147 страниц машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, перспективы дальнейшей разработки темы исследования, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 51 отечественный и 173 зарубежных источника. Работа иллюстрирована 44 таблицами и 6 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

При использовании методов исследований соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2013 – поправки) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

В исследование включено 96 неродственных пациентов в возрасте от 18 до 44 лет (молодой возраст по ВОЗ) с УГМ. Пациенты разделены на следующие группы: 1-я группа – 50 пациентов с УГМ 2 степени в возрасте 29,5 [24; 33] лет; 2-я группа (n=46) – пациенты с УГМ 3 степени (32,5 [28,5; 35] лет). Во 2-й группе у 10 пациентов зафиксировано неблагоприятное течение травматической болезни головного мозга, вследствие чего нами произведено разделение пациентов в зависимости от исхода: с благоприятным исходом (выздоровление), n=86 и с летальным исходом (n=10). Контрольную группу составили 100 практически здоровых лиц аналогичного пола и возраста.

Критерии исключения – пациенты с острыми и/или хроническими сопутствующими заболеваниями, другими патологическими состояниями/травмами, хроническим алкоголизмом, а также лица женского пола. Пациенты с другими клиническими формами, тяжестью ЧМТ и данными КТ не попадающие под критерии включения. Кроме того, из исследования исключались лица, получающие дезагрегационную и антикоагуляционную терапию (рис. 1).

Схема дизайна исследования представлена на рисунке 1.

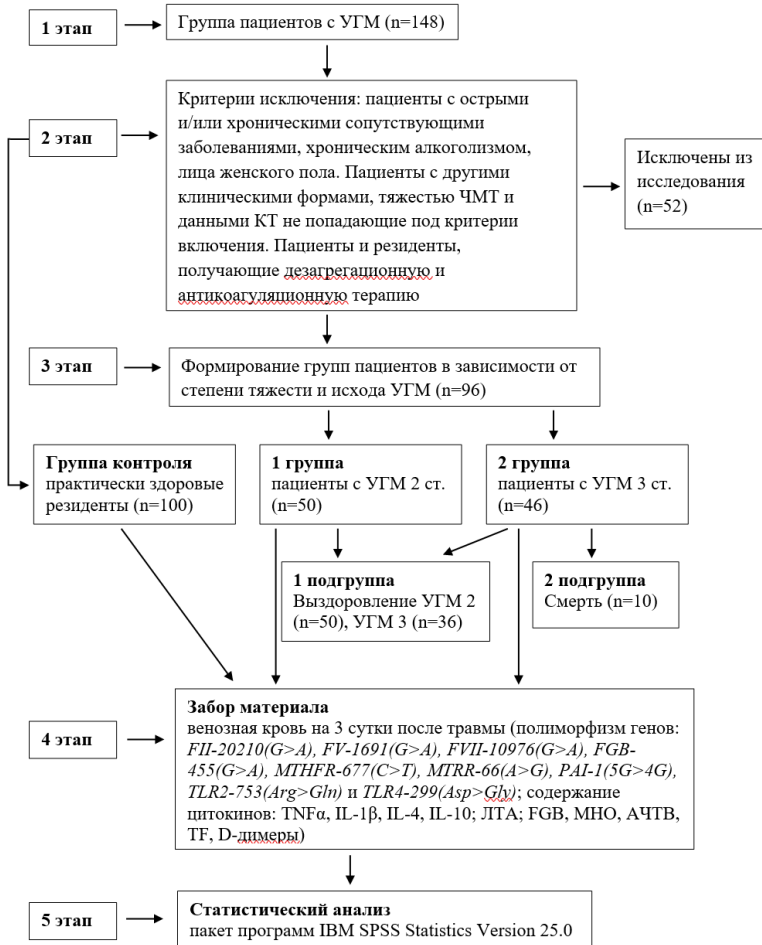


Рисунок 1. Дизайн исследования

Клинические методы исследования. В обследовании больных с УГМ использовались стандартные методы, используемые в клинических рекомендациях и национальных руководствах по неврологии и нейрохирургии РФ. Сроки наблюдения за пациентами – 1, 3, 10 сутки после ЧМТ и в дальнейшем – при выписке из клиники.

Лабораторные методы исследования. Для исследования лабораторных показателей использовалась периферическая кровь из локтевой вены.

- 1. Иммунологические исследования.** Уровень цитокинов в сыворотке крови (TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10) определяли с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) методом ИФА. Определение ЛТА проводили по стандартному методу.
- 2. Генетические исследования.** Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови. Для исследования выбирали точковую мутацию FII в позиции 20210(G>A), FV в позиции 1691(G>A), FVII в позиции 10976(G>A), FGB в позиции 455(G>A), MTHFR в позиции 677(C>T), MTRR в позиции 66(A>G), PAI-1 в позиции (5G>4G), TLR2 в позиции 753(Arg>Gln) и TLR4 в позиции 299(Asp>Gly). Амплификацию фрагмента исследуемых генов проводили в термоцикле (модель Ре «Бис» - M111 (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе использовали стандартные наборы праймеров фирмы «Литех»-«SNP» (Москва).
- 3. Гемостазиологические исследования.** Определение коагуляционного гемостаза (FGB, МНО, АЧТВ) проводили стандартным способом. Для выявления TF использовали набор реагентов системы «Cloud-Clone Corp.», методом ИФА. Определение D-димера выполняли по стандартной методике с помощью набора реагентов «D-dimer Test» фирмы Diagnostica Stado [Иванов А.М., 2022].

Инструментальные методы исследования. КТ головы производилась всем пациентам при поступлении в стационар, далее на третьи, седьмые сутки и при выписке. По данным КТ определяли вид и объем очага повреждения мозга, величину дислокации. Вычисляли объем всего очага ушиба (включая зону перифокального отека) и объем жидкой части очага ушиба в см³ по специальной программе, прилагаемой к томографу.

Статистические методы исследования. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (США). Оценку нормальности распределения признаков проводили с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. Интервальные данные представлены в виде медианы, первого и третьего

квартилей (Me [Q1; Q3]). Статистическая значимость различий показателей между группами оценивалась путем определения U-критерия Манна–Уитни и уровня значимости p . Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым. Зависимость относительных показателей оценивалась путем сравнения полученного значения критерия χ^2 с критическим. Учитывая наличие результативных и факторных признаков, проспективный характер исследования, оценка значимости различий показателей исследования проводилась за счет определения относительного риска (ОР). Статистическая значимость ОР оценивалась, исходя из значений 95% доверительного интервала (95% ДИ). Для измерения силы и направления связи между изучаемыми явлениями использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Диагностическая ценность прогностической модели определена путем построения ROC-кривой с последующим определением площади под ней.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Содержание некоторых показателей системы иммунитета, гемостаза и изменение инструментальных параметров у пациентов с УГМ

В ходе проведенных исследований выявлено, что у пациентов с УГМ на 3-и сутки после травмы содержание IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10, FGB, МНО и TF значимо превышало контрольные значения в 1,3, 1,3, 1,2, 1,1, 1,3, 1,01 и 2,6 раза, соответственно. Напротив, показатель ЛТА, АЧТВ снижался относительно аналогичного параметра группы контроля в 1,3 и 1,1 раза, тогда как уровень D-димера не различался. Сходные изменения выявлены и при распределении пациентов в зависимости от тяжести течения и исхода УГМ. Рассматривая динамику (на 3 и 7 сутки после ЧМТ), общего объема очага ушиба и объема его жидкой части в зависимости от тяжести течения зафиксирована тенденция к регрессу как общего патологического очага в обеих группах исследования в 2,4, 1,7 раза, так и его жидкой части – в 8 и 6,2 раза, соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Некоторые инструментальные параметры у пациентов с УГМ в зависимости от тяжести и исхода, Me [P25-P75]

Исследуемые группы		Параметр	
		Общий объем очага ушиба (см ³)	Объем жидкой части очага ушиба (см ³)
В зависимости от тяжести			
УГМ 2 ст. (n=50)	3 сутки	29 [25; 30]	8 [6; 11]
	7 сутки	12 [8; 16]*	0 [0; 1,0]*

УГМ 3 ст.	3 сутки	32 [31; 36]**	13 [8; 19]**
(n=46)	7 сутки	19 [14; 49]*/**	2,1 [1,0; 22]*/**
В зависимости от исхода			
		Общий объем очага ушиба (см ³)	Объем жидкой части очага ушиба (см ³)
УГМ (n=86) (выздоровление)	3 сутки	30,0 [25; 36]	9,5 [6,0; 14,0]
	7 сутки	14,0 [8,0; 22,0]*	0,5 [0,0; 2,9]*
УГМ (n=10) (летальный)	3 сутки	32,0 [31,0; 34,0]**	18,0 [17,0; 19,0]**
	7 сутки	48,5 [47,0; 49,0]*/**	18,5 [18,0; 22,0]*/**

Примечание: * – статистическая значимость различий с 3 сутками при $p \leq 0,05$; ** – статистическая значимость различий с группой сравнения при $p \leq 0,05$

Исследуемые показатели объективно отображают как течение тяжести, так и исход при УГМ, что подтверждает существенную роль иммунной системы и системы гемостаза в патогенезе ЧМТ [Ступин Ю.В., 2022]. Кроме того, в нашей работе показано влияние объема жидкой части очага ушиба на его прогрессирование и неблагоприятный исход ЧМТ.

Определение частоты встречаемости аллелей и генотипов исследуемых SNP генов у пациентов с УГМ в Забайкальском крае

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов у пациентов с УГМ рассмотрено в зависимости от степени тяжести и исхода. У пациентов с УГМ распределение частот аллелей и генотипов генов *F2-20210(G>A)*, *F5-1691(G>A)*, *MTHFR-677(C>T)* не отличалось как от группы контроля, так и в зависимости от степени тяжести и исхода, за исключением генотипа -20210A/A при носительстве которого отмечено значимое влияние на неблагоприятный исход ($p=0,004$); тогда как частота аллели -10976A- гена *F7*, аллели -455A- гена *FGB*, аллели -66G- гена *MTRR*, аллели -675/4G- гена *PAI-1*, аллели -753Gln- гена *TLR2* и аллели -299Asp- гена *TLR4* превышала контрольные значения, одновременно с этим регистрировалось более высокое носительство генотипа -10976A/A гена *F7*, генотипа -455A/A гена *FGB*, генотипа -66G/G гена *MTRR*, генотипа -675/4G/4G гена *PAI-1*, генотипа -753Arg/Gln гена *TLR2* и генотипа -299AspAsp гена *TLR4*, что позволяет судить о положительной ассоциации (высоком риске) носительства рассматриваемых SNP в неблагоприятном течении УГМ [Мироманов А.М. и соавт., 2022-2023; Ступин Ю.В., 2022].

Влияние генотипов SNP на уровень изучаемых показателей

Установлено отсутствие влияния полиморфизма генов *F2-20210(G>A)*, *F5-1691(G>A)*, *F7-10976(G>A)*, *MTHFR-677(C>T)* при УГМ на уровень рассматриваемых показателей гемостаза. Наличие генотипа -66G/G гена *MTRR*, генотипа -675/4G/4G гена *PAI-1* опосредованно способствует более высокому содержанию FGB, TF и D-димера, тогда как при генотипе -455A/A гена *FGB* регистрируется только повышение уровня TF. Наличие мутантного генотипа -753Gln/Gln полиморфизма гена *TLR2* и нормального генотипа -299Asp/Asp полиморфизма гена *TLR4* у пациентов с УГМ опосредованно способствует более высокому содержанию в сыворотке крови цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10 и низкому уровню показателя ЛТА (табл. 2, 3).

Таблица 2

Содержание IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 и ЛТА в сыворотке крови в зависимости от генотипа полиморфизма гена *TLR2-753(Arg>Gln)*, Me [P25-P75]

	IL-1 β (пг/мл)	TNF- α (пг/мл)	IL-4 (пг/мл)	IL-10 (пг/мл)	ЛТА (%)
Контроль (n=100)					
Arg/Arg (n=65)	15,4 [3,9; 26,6]	15,2 [3,27; 22,28]	24,9 [18,5; 31,7]	36,9 [20,0; 47,7]	11 [9,0; 16]
Arg/Gln (n=35)	46,2 [42,6; 47,0] ²	43,8 [28,11; 48,23] ²	43,5 [34,1; 45,1] ²	51,5 [49,2; 58,2] ²	20 [17,5; 21,0] ²
Gln/Gln (n=0)	0	0	0	0	0
УГМ (выздоровление), n=86					
Arg/Arg (n=50)	29 [26,4; 31,4] ¹	26,6 [24,7; 29,3] ¹	34,5 [31,6; 36,39] ¹	44,9 [41,9; 46,2] ¹	13 [10,3; 15]
Arg/Gln (n=36)	34,5 [32,3; 37,2] ^{1,2}	32,7 [30,1; 34,7] ^{1,2}	39,5 [36,1; 42,4] ²	50 [47,5; 53,0] ²	10 [9,0; 11,0] ^{1,2}
Gln/Gln (n=0)	0	0	0	0	0
УГМ (летальный исход), n=10					
Arg/Arg (n=0)	0	0	0	0	0
Arg/Gln (n=0)	0	0	0	0	0
Gln/Gln (n=10)	62 [60,0; 67,0]	59,5 [57,2; 64,3]	57,7 [56,0; 60,7]	60,9 [58,3; 63,7]	5,5 [5,0; 6,8]

Примечание: u^1 – статистическая значимость различий с контролем при $p \leq 0,05$; u^2 – статистическая значимость различий с генотипом Arg/Arg при $p \leq 0,05$; u^3 – статистическая значимость различий с генотипом Arg/Gln при $p \leq 0,05$.

Таблица 3

Содержание ИЛ-1 β , TNF- α , ИЛ-4, ИЛ-10 и ЛТА в сыворотке крови в зависимости от генотипа полиморфизма гена TLR4-299Asp>Gly, Me [P25-P75], (пг/мл)

	ИЛ-1 β (пг/мл)	TNF- α (пг/мл)	ИЛ-4 (пг/мл)	ИЛ-10 (пг/мл)	ЛТА (%)
Контроль (n=100)					
Asp/Asp (n=45)	43,6 [41,4; 47,0]	43,8 [29,1; 48,3]	43,1 [38,7; 45,3]	52,7 [49,2; 58,3]	20 [17,0; 21,0]
Asp/Gly (n=45)	15,4 [3,9; 22,1] ²	15,2 [12,3; 19,8] ²	24,9 [23,2; 28,9] ²	36,9 [34,1; 43,3] ²	11 [10,0; 14,0] ²
Gly/Gly (n=10)	2 [1,3; 4,9] ^{2,3}	2,5 [1,8; 6,6] ^{2,3}	16 [15,0; 17,9] ^{2,3}	9,4 [8,0; 15,0] ^{2,3}	6 [5,0; 9,8] ^{2,3}
УГМ (выздоровление), n=86					
Asp/Asp (n=36)	34,5 [32,3; 37,2] ¹	32,7 [30,1; 34,7] ¹	39,5 [36,1; 42,4]	50 [47,5; 53,0]	10 [9,0; 11,0] ¹
Asp/Gly (n=42)	29,8 [27,9; 32,4] ^{1,2}	27,1 [26,0; 29,8] ^{1,2}	34,6 [32,7; 37,0] ^{1,2}	45,2 [42,6; 46,7] ^{1,2}	13,5 [11,0; 15,8] ^{1,2}
Gly/Gly (n=8)	23,1 [21,3; 24,1] ^{1,2,3}	21,1 [19,7; 23,0] ^{1,2,3}	28,4 [26,8; 29,2] ^{1,2,3}	38 [37,1; 39,4] ^{1,2,3}	11 [8,8; 12,8] ¹
УГМ (летальный исход), n=10					
Asp/Asp (n=10)	62 [60,0; 67,0] ¹	59,5 [57,2; 64,3] ¹	57,7 [56,0; 60,7] ¹	60,9 [58,3; 63,7] ¹	5,5 [5,0; 6,8] ¹
Asp/Gly (n=0)	0	0	0	0	0
Gly/Gly (n=0)	0	0	0	0	0

Примечание: u^1 – статистическая значимость различий с контролем при $p \leq 0,05$; u^2 – статистическая значимость различий с генотипом Asp/Asp при $p \leq 0,05$; u^3 – статистическая значимость различий с генотипом Asp/Gly при $p \leq 0,05$.

Корреляционные взаимосвязи SNP и изучаемых показателей у пациентов с УГМ

Взаимосвязи между изучаемыми полиморфизмами генов и их влиянием на течение и исход УГМ отражены в таблицах 4–5.

Таблица 4

Сила взаимосвязи исследуемых SNP генов в зависимости от исхода УГМ

Показатели	V-Крамера	p	Сила взаимосвязи
<i>F2-20210(G>A)</i>	0,27	0,08	средняя
<i>F5-1691(G>A)</i>	0,06	0,84	несуществующая
<i>F7-10976(G>A)</i>	0,87	0,001	очень сильная
<i>FGB-455(G>A)</i>	0,88	0,001	очень сильная
<i>MTHFR-677(C>T)</i>	0,14	0,37	слабая
<i>MTRR-66(A>G)</i>	0,47	0,001	относительно сильная
<i>PAI-1-675(5G>4G)</i>	0,45	0,001	относительно сильная
<i>TLR2-753(Arg>Gln)</i>	0,89	0,001	очень сильная
<i>TLR4-299(Asp>Gly)</i>	0,36	0,02	средняя

Примечание: интерпретация значений V-Крамера (сила взаимосвязи): - менее 0,1 – несуществующая; - 0,1-0,2 – слабая; - 0,2-0,4 – средняя; - 0,4-0,6 – относительно сильная; - 0,6-0,8 – сильная; - 0,8-1,0 – очень сильная.

Таблица 5

Сила взаимосвязи исследуемых SNP генов в зависимости от течения УГМ

Показатели	V-Крамера	p	Сила взаимосвязи
<i>F2-20210(G>A)</i>	0,11	0,27	несуществующая
<i>F5-1691(G>A)</i>	0,17	0,23	несуществующая
<i>F7-10976(G>A)</i>	0,42	0,001	относительно сильная
<i>FGB-455(G>A)</i>	0,74	0,001	сильная
<i>MTHFR-677(C>T)</i>	0,27	0,03	средняя
<i>MTRR-66(A>G)</i>	0,81	0,001	очень сильная
<i>PAI-1-675(5G>4G)</i>	0,83	0,001	очень сильная
<i>TLR2-753(Arg>Gln)</i>	0,87	0,001	очень сильная
<i>TLR4-299(Asp>Gly)</i>	0,81	0,001	очень сильная

Примечание: интерпретация значений V-Крамера (сила взаимосвязи): - менее 0,1 – несуществующая; - 0,1-0,2 – слабая; - 0,2-0,4 – средняя; - 0,4-0,6 – относительно сильная; - 0,6-0,8 – сильная; - 0,8-1,0 – очень сильная.

Следующим этапом нами определены взаимосвязи между комбинациями выявляемых полиморфизмов генов (K-REGR) и изучаемыми показателями иммунитета (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10, ЛТА), гемостаза (FGB, МНО, АЧТВ, ТФ, D-димер) и некоторых инструментальных параметров (общий объем очага ушиба, объем его жидкой части). Учитывая, что полиморфизм гена *F7-10976(G>A)*, *FGB-455(G>A)* и *TLR2-753(Arg>Gln)* показали очень сильную связь (V-Крамера > 0,8) в течении и исходе УГМ, то нами предпринята попытка изучения вклада комбинации других полиморфизмов. В частности, учитывая силы взаимосвязи, составлена комбинация из полиморфизма *F2-20210(G>A)*, *MTRR-66(A>G)*, *PAI-1-675(5G>4G)* и *TLR4-299(Asp>Gly)* и представлена в виде коэффициента (K-REGR). V-Крамера данного K-REGR составил – 0,52 (p<0,001); чувствительность – 1,0; специфичность – 0,78; точность – 80,2, что свидетельствует о высокой прогностической значимости данного коэффициента. При проведении корреляционного анализа отмечена высокая и заметная связь между K-REGR, общим объемом очага ушиба, объемом жидкой части, цитокинами и ЛТА. Кроме того, зарегистрирована значимая связь различного характера между объемом жидкой части очага ушиба и всеми изучаемыми показателями, что может свидетельствовать о его важном значении в течении и исходе травматической болезни головного мозга.

Математическая модель прогноза неблагоприятного исхода УГМ

На основании бинарной логистической регрессии, в уравнение были включены наиболее информативные показатели (полиморфизм гена *FII-20210(G>A)*, гена *MTRR-66(A>G)*, гена *PAI-1(5G>4G)* и гена *TLR4-299(Asp>Gly)*) и определена их значимость в структуре модели. Уравнение логистической регрессии имеет следующий вид:

$$K = \frac{1}{1 + e^{117,6 - 1,5 \times FII - 17,75 \times MTRR - 17,66 \times PAI - 9,05 \times TLR4}},$$

где K – вероятность летального исхода у пациентов с УГМ; 117,6 – константа (регрессионный коэффициент b₀); 1,5, 17,75, 17,66 и 9,05 – нестандартизованные коэффициенты b; FII – полиморфизм гена *FII-20210(G>A)*, MTRR – полиморфизм гена *MTRR-66(A>G)*, PAI-1 –

полиморфизм гена *PAI-1(5G>4G)* и TLR4 - полиморфизм гена *TLR4-299(Asp>Gly)* принимающие значение «0» при наличии нормальной гомозиготы, «1» – при наличии гетерозиготы и значение «2» – при наличии мутантной гомозиготы; e – основание натурального логарифма ($e \sim 2,72$). При значении $K > 0,15$ имеется высокая вероятность летального исхода. Чувствительность разработанной прогностической модели составляет метилентетрогидрофолатредуктаза 1,0, специфичность – 0,78, точность – 0,8; площадь под ROC-кривой составляет 0,91 (95% ДИ = 0,84–0,97); $p < 0,001$ (рис. 2).

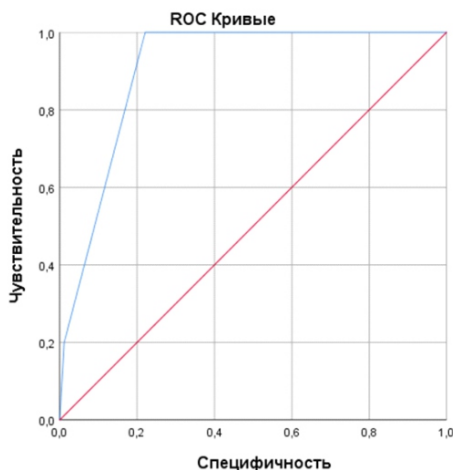


Рисунок 2. ROC-анализ вероятности летального исхода при УГМ по значению разработанного коэффициента К

Учитывая данные математических моделей, нами проведен анализ влияния комбинации прогностически значимых моделей в неблагоприятном течении УГМ, а именно: - *F7-10976(G>A) x FGB-455(G>A) x TLR2-753(Arg>Gln)*; *PAI-1-675(5G>4G) x MTRR-66(A>G) x FGB-455G>A* и *FII-20210(G>A) x MTRR-66(A>G) x PAI-1(5G>4G) x TLR4-299(Asp>Gly)*. Данные комбинации способствуют значимому повышению уровня IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10, FGB, TF, D-димера и снижению показателя ЛТА, МНО и АЧТВ. Одновременно регистрируется прогрессирование общего объема очага ушиба и объем его жидкой части на 7 сутки после травмы в 1,5 и 1,0 раза, соответственно.

В результате полученных данных, нами предлагается схема некоторых патогенетических механизмов неблагоприятного течения УГМ (рис. 3).

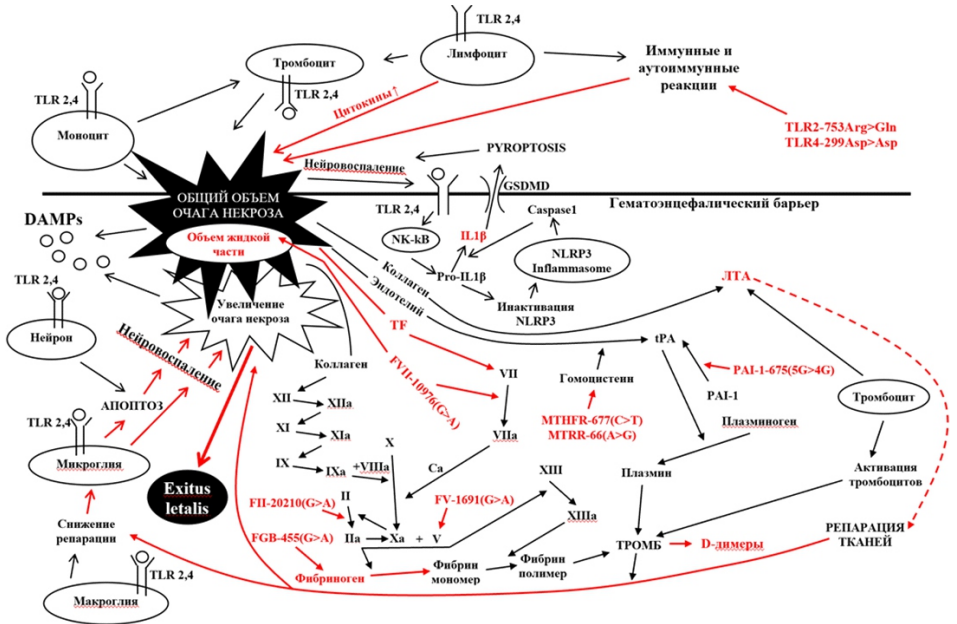


Рисунок 3. Модифицированная схема некоторых патогенетических механизмов ушиба головного мозга. Примечание: - красным цветом выделены исследуемые показатели; сплошная линия – инициация, пунктирная линия - ингибирование.

Таким образом, нами рекомендуется использование данных тестов в 1-е сутки после УГМ, особенно у молодых лиц для более быстрой и качественной диагностики, профилактики, прежде всего, среди пациентов высокого риска развития заболевания, а также в программах лечения при состоявшейся травме [Миронов А.М. и соавт., 2023].

ВЫВОДЫ

1. Неблагоприятное течение ушиба головного мозга на 3-и сутки травмы сопровождается повышением уровня цитокинов в сыворотке крови (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10) в 2; 2; 1,6 и 1,3 раза, соответственно; фибриногена в 1,3 раза; тканевого фактора в 1,8 раза; D-димера в 1,5 раза; снижением содержания показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в 2,2 раза; МНО в 1,2 раза; АЧТВ в 1,1 раза относительно благоприятного течения черепно-мозговой травмы, а также наличием объема жидкой части очага ушиба 18 и более см 3 .
2. При неблагоприятном течении ушиба головного мозга отмечается высокая частота носительства аллели -10976A- гена *F7*, аллели -455A-

гена *FGB*, аллели -66G- гена *MTRR*, аллели -675/4G- гена *PAI-1*, аллели -753Gln- гена *TLR2* и аллели -299Asp- гена *TLR4*; одновременно с этим регистрируется более высокое носительство генотипа -20210A/A гена *F2*; генотипа -10976A/A гена *F7*, генотипа -455A/A гена *FGB*, генотипа -66G/G гена *MTRR*, генотипа -675/4G/4G гена *PAI-1*, генотипа -753Arg/Gln гена *TLR2* и генотипа -299AspAsp гена *TLR4*.

3. Установлено отсутствие влияния полиморфизма генов *F2-20210(G>A)*, *F5-1691(G>A)*, *F7-10976(G>A)*, *MTHFR-677(C>T)* при ушибе головного мозга на показатели гемостаза. У носителей генотипа -66G/G гена *MTRR*, генотипа -675/4G/4G гена *PAI-1* наблюдается высокое содержание фибриногена, тканевого фактора и D-димера, а при носительстве генотипа -455A/A гена *FGB* регистрируется только повышение уровня тканевого фактора.
4. У носителей мутантного генотипа -753Gln/Gln полиморфизма гена *TLR2* и нормального генотипа -299Asp/Asp полиморфизма гена *TLR4* при ушибе головного мозга отмечается высокое содержание в сыворотке крови цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10 и низкий уровень показателя ЛТА.
5. Комбинация генотипов *F7-10976(G>A)* x *FGB-455(G>A)* x *TLR2-753(Arg>Gln)*, *PAI-1-675(5G>4G)* x *MTRR-66(A>G)* x *FGB-455G>A* и *FII-20210(G>A)* x *MTRR-66(A>G)* x *PAI-1(5G>4G)* x *TLR4-299(Asp>Gly)* характеризуется значимым повышением уровней цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10), фибриногена, тканевого фактора, D-димера, снижением показателей ЛТА, МНО и АЧТВ, обуславливая неблагоприятное течение ушиба головного мозга. Одновременно регистрируется нарастание общего объема очага ушиба и объема его жидкой части на 7-е сутки после травмы.
6. Предрасполагающими факторами неблагоприятного течения ушиба головного мозга являются носительство мутантных гомозигот генов - *FII-20210(G>A)*, *F7-10976(G>A)*, *FGB-455(G>A)*, *MTRR-66(A>G)*, *PAI-1(5G>4G)*, *TLR2-753(Arg>Gln)*, нормальной гомозиготы гена *TLR4-299(Asp>Gly)*, а также комбинации генов *FII-20210(G>A)* x *MTRR-66(A>G)* x *PAI-1(5G>4G)* x *TLR4-299(Asp>Gly)*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в ведущих научных рецензируемых журналах, определенных ВАК Минобрнауки России:

1. Полиморфизм гена FV (Leiden G1691A), гена F2 (G20210A) и гена MTHFR (C677T) у больных с черепно-мозговой травмой в Забайкальском крае / Ю.В. Ступин, В.В. Доржеев, А.М. Миromanов, Ю.А. Витковский // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - № 4. – URL: <http://www.science-education.ru/127-20830> (дата обращения: 27.09.2022).
2. Уровень IL-1 β , TNF- α , IL-4 и IL-10 у носителей SNP генов TLR2(ARG753GLN), TLR4(ASP299GLY) с ушибом головного мозга / А.М. Миromanов, Ю.В. Ступин, Н.А. Миromanова, Ю.А. Витковский. – DOI 10.52485/19986173_2022_4_60 // Забайкальский медицинский вестник. – 2022. – № 4. – С. 60-68. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2022-god-opublikovan-29-12-2022/uroven-il-1-tnf-il-4-i-il-10-u-nositelej-snp-genov-tlr2-arg753gln-tlr4-asp299gly-s-ushibom-golovnogo-mozga/1073/8.pdf> (дата обращения: 10.01.2023)
3. Возможности персонализированного прогноза летального исхода у пациентов с ушибом головного мозга / А.М. Миromanов, Ю.В. Ступин, О.Б. Миронова, Н.А. Миromanова, Ю.А. Витковский. – DOI 10.52485/19986173_2023_1_60 // Забайкальский медицинский вестник. – 2023. – № 1. – С. 60-68. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-1-za-2023-god-opublikovan-29-03-2023/vozmozhnosti-personalizirovannogo-prognoza-letal'nogo-iskhoda-u-pacientov-s-ushibom-golovnogo-mozga.pdf> (дата обращения: 30.03.2023).

Патенты на изобретения и полезные модели:

4. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022614300 Российская Федерация. Программа для оценки вероятности неблагоприятного течения ушиба головного мозга / Миromanов А.М., Ступин Ю.В., Миromanова Н.А., Мудров В.А.; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2022612357; дата поступления 21.02.2022 ; дата государственной регистрации в реестре программ для ЭВМ 18.03.2022. – 1 с.
5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022614736 Российская Федерация. Программа для определения риска смерти пациентов с ушибом головного мозга / Миromanов А.М., Ступин

Ю.В., Мироманова Н.А., Мудров В.А.; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2022613361; дата поступления 09.03.2022 ; дата государственной регистрации в реестре программ для ЭВМ 24.04.2022. – 1 с.

Публикации в прочих изданиях:

6. Доржеев В.В. Генетические аспекты прогнозирования тромбоэмболических осложнений у больных с политравмой / В.В. Доржеев, Ю.В. Ступин, А.М. Мироманов // Цивьяновские чтения : сборник материалов VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, г. Новосибирск, 26-28 ноября 2015 г. / под редакцией М.А. Садового, Е.В. Мамоновой. – Новосибирск : Сибпринт, 2015. – Т. 1. – С. 175-180. – ISBN 978-5-94301-603-5.
7. Ступин Ю.В. Патогенетические механизмы неблагоприятного течения ушиба головного мозга / Ю.В. Ступин // Актуальные проблемы патофизиологии : сборник статей международной научно-практической конференции, г. Чита, 11 ноября 2022 г. / под редакцией Н.В. Ларевой. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2022. – С. 144-148. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-49-1.
8. Ступин Ю.В. Персонализированные подходы к прогнозу летального исхода у пациентов с ушибом головного мозга / Ю.В. Ступин, А.М. Мироманов // Политравма. Острые вопросы лечения повреждений опорно-двигательного аппарата: вчера, сегодня, завтра : сборник материалов конференции, посвященной 70-летию Амурской государственной медицинской академии, г. Благовещенск, 18-19 октября 2022 г. / под редакцией И.В. Борозды. – Благовещенск : АГМА, 2022. – С. 78-80. – ISBN 978-5-6048633-2-9.
9. Ступин Ю.В. Персонализированный прогноз летального исхода у пациентов с ушибом головного мозга / Ю.В. Ступин, А.М. Мироманов, Ю.А. Витковский // XII Всероссийский съезд травматологов-ортопедов : сборник тезисов, г. Москва, 01-03 декабря, 2022. – Санкт-Петербург : Человек и его здоровье, 2022. – С. 876-877. – URL: <https://cdn.atorforum.ru/2/material.pdf> (дата обращения: 03.12.2022).
10. Ступин Ю.В. Современные подходы к диагностике летального исхода у пациентов с ушибом головного мозга / Ю.В. Ступин, А.М. Мироманов // VII Пироговский форум травматологов ортопедов: сборник материалов,

Республика Дагестан, с. Салта – г. Махачкала, 14-16 сентября 2022 г. –
Казань: Практика, 2022. – С. 182. – ISBN 978-5-907551-39-8.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЧТВ	- активированное частичное тромбопластиновое время
ИФА	- иммуноферментный анализ
КТ	- компьютерная томография
ЛТА	- лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия
МНО	- международное нормализованное отношение
ОР	- относительный риск
УГМ	- ушиб головного мозга
ЧМТ	- черепно-мозговая травма
IL	- интерлейкин
F2	- протромбин
F5	- фактор V
F7	- фактор VII (проконвертин)
FGB	- фибриноген
MTHFR	- метилентетрагидрофолатредуктаза
MTRR	- метионин-синтаза-редуктаза
SNP	- полиморфизм
TF	- тканевой фактор
TLR	- толл-подобный рецептор
TNF	- фактор некроза опухолей

Подписано в печать 27.11.2023. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman
Формат 60x84 1/16. Авт. л. 1,0 Тираж 100. Заказ № 110/2023.

Отпечатано в редакционно-издательском центре ЧГМА
672000, Чита, ул. Горького, 39а.