

Karina Dubovska

ORCID 0000-0002-1091-276

Iegūto koagulācijas izmaiņu un
ģenētisko polimorfismu saistība
ar mikrovaskulārā brīvā lēvera
trombozi rekonstruktīvajā ķirurģijā

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – anestezioloģija un reanimatoloģija

Rīga, 2026

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātē, Latvijā

Promocijas darba vadītājas:

Emeritētā profesore **Biruta Mamaja**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija
Dr. med. Liene Nikitina-Zaķe,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Zinātniskā konsultante:

Dr. med. asociētā profesore Agnese Ozoliņa,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. asociētais profesors Oļegs Sabeļņikovs,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija
Dr. med. asociētā profesore Iveta Golubovska,
Latvijas Universitāte
Dr. med. asociētā profesore Emilia Guasch,
Lapasas Universitātes slimnīca, Spānija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Rīgas Stradiņa universitātes Klīniskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē 2026. gada 16. jūnijā plkst. 13.00 Hipokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16, Rīgas Stradiņa universitātē

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. asociētais profesors Dzintars Ozols

Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi	4
Ievads	5
Promocijas darba mērķis	6
Promocijas darba uzdevumi	6
Promocijas darba hipotēze	6
Promocijas darba novitāte	6
1. Materiāls un metodes	7
1.1. Pētījuma dizains un pacientu iesaiste	7
1.2. Genotipēšana	7
1.3. Klīniski laboratorā izmeklēšana	8
1.4. Anestēzija un intraoperatīva pacienta uzraudzība	9
1.5. Statistiskā analīze	10
2. Rezultāti	12
2.1. Pētījuma populācijas raksturojums	12
2.2. Ģenētisko variantu sastopamība	12
2.3. Ģenētisko variantu un koagulācijas parametru sakarības	14
2.4. Kombinēto riska faktoru analīze	16
2.5. Lēvera trombozes attīstības laiks un riska faktori	18
3. Diskusija	20
3.1. Būtiskākie rezultāti un to klīniskā nozīme	20
3.2. Ģenētiskie varianti	20
3.2.1. rs6025 FV gēnā	21
3.2.2. rs1799963 variants protrombīna gēnā	22
3.2.3. rs2066865 fibrinogēna gamma ķēdes gēnā	22
3.2.4. rs2227589 SERPINC1 gēnā	23
3.2.5. rs1801133 MTHFR gēnā	24
3.3. Koagulācijas parametri	24
3.4. Prognozējošais modelis un klīniskā lietderība	26
3.5. Pētījuma ierobežojumi un metodoloģiskie apsvērumi	26
3.6. Turpmākie pētījumi	27
3.7. Pētījuma stiprās puses un ierobežojumi	28
Secinājumi	30
Priekšlikumi	31
Publikāciju, ziņojumu saraksts par promocijas darba tēmu	32
Literatūras un avotu saraksts	33
Pateicības	40
Pielikumi	41
1. pielikums	42

Darbā izmantotie saīsinājumi

APC	aktīvetais C proteīns
APCR	aktīveta C proteīna rezistence
AT	antitrombīns
AUC	laukums zem līknes
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
FGG	fibrinogēna gamma ķēdes gēnā
FII	koagulācijas faktors II, protrombīns
FV	koagulācijas faktors V
FV Leiden	koagulācijas faktors V Leidena
MTHFR	metilentetrahidrofolāta reduktāze
ns	nenozīmīgs
PCR	polimerāzes ķēdes reakcija
PT	protrombīns
ROC	uztvērēja darbības raksturlīkne
RTE	tromboelastometrija
SERPINC1	serīna proteāzes inhibitora 1 gēns
TFPI	audu faktora ceļa inhibitors
t-PA	audu tipa plazminogēna aktivators
u-PA	urokināzes tipa plazminogēna aktivators
VNV	viena nukleotīda varianti
Δt	temperatūras starpība

Ievads

Mikrovaskulārā brīvā lēvera ķirurģija ir metode rekonstruktīvajā ķirurģijā, kur transplantētā lēvera audu dzīvotspēja ir kritiski atkarīga no adekvātas perfūzijas un trombotiskie sarežģījumi joprojām ir galvenais lēvera neveiksmes cēlonis ar sastopamību 2–9 % gadījumu (Bowman, 2011; Friedman, 2010).

Lai gan tehniskie un fizioloģiskie aspekti ir plaši pētīti, ģenētisko faktoru loma trombotiskajos sarežģījumos mikrovaskulārajā ķirurģijā ir saņēmusi salīdzinoši mazāk uzmanības (Khansa, 2011). Jaunākie sasniegumi molekulārajā ģenētikā ir jautājumā par iedzimtu faktoru potenciālo ietekmi uz trombotiskiem notikumiem. Viena nukleotīda varianti (VNV) gēnos, kas regulē koagulācijas ceļus, var būtiski ietekmēt individuālās trombotiskā riska variācijas (Friedman, 2010).

Pieci ģenētiskie varianti, kas saistīti ar trombotiskiem traucējumiem: koagulācijas faktora V Leidena (FV Leiden) (rs6025), visizplatītākā iedzimtā trombofilija eiropiešu izcelsmes populācijā (2–15 % biežums), kas rada 3–8 reizes palielinātu venozo trombozes risku caur rezistenci pret aktivēto C proteīnu (APC) (Rees, 1995; Rosendaal, 1995; Segers, 2007); protrombīna G20210A (rs1799963), kas sastopams 1–3 % eiropiešu izcelsmes populācijā ar 2–3 reizes palielinātu risku paaugstināta plazmas protrombīna līmeņa dēļ (Poort, 1996; Simone, 2013); fibrinogēna gammas gēna (rs2066865), kas ietekmē asins recekļa struktūru un stabilitāti (de Willige, 2005; Grünbacher, 2007; van Hylckama Vlieg, 2003); serīna proteāzes inhibitora 1 gēna (SERPINC1) (rs2227589), kas ietekmē antitrombīnu (AT), kurš asociējas ar 10–20 reizes palielinātu trombozes risku deficīta gadījumā (Zöller, 1999) un metilentetrahidrofolāta reduktāzes (MTHFR) C677T (rs1801133), kas ietekmē homocisteīna metabolismu ar saistītiem trombotiskiem notikumiem (Goyette, 1998; Liew, 2015).

Lai gan plašie epidemioloģiskie dati atbalsta saistību starp šiem variantiem un trombotisko risku vispārējās populācijās, to specifiskā nozīme mikrovaskulārās ķirurģijas rezultātiem joprojām ir nepietiekami aprakstīta. Unikālā mikrovaskulārās anastomozes hemodinamiskā vide apvienojumā ar ķirurģiskas traumas izraisītiem protrombotiskiem stāvokļiem var pastiprināt ģenētisko trombofilisko variantu klīnisko nozīmīgumu. Ģenētisko marķieru identifikācija, kas saistīta ar palielinātu trombotisku risku, varētu mainīt pirmsoperācijas riska novērtēšanu un vadīt personalizētas antikoagulācijas stratēģijas, potenciāli uzlabojot ķirurģiskos rezultātus.

Promocijas darba mērķis

Promocijas darba mērķis bija noteikt, vai specifiskie viena nukleotīda varianti ir saistīti ar palielinātiem trombotiskiem sarežģījumiem mikrovaskulārā brīvā lēvera ķirurģijā ar mērķi izstrādāt ģenētiskās riska stratifikācijas parametrus individualizētai perioperatīvai aprūpei.

Promocijas darba uzdevumi

1. Identificēt pacientus ar viena nukleotīda variantiem: rs6025 koagulācijas faktora V (FV) gēnā; rs1799963 protrombīna gēnā; rs2066865 fibrinogēna gamma ķēdes gēnā (FGG); rs2227589 SERPINC1 un rs1801133 MTHFR.
2. Izpētīt un novērtēt saistību starp noteiktajiem viena nukleotīda variantiem un mikrovaskulārā brīvā lēvera trombozes biežumu.
3. Novērtēt iegūto trombofilijas faktoru ietekmi uz mikrovaskulārā brīvā lēvera trombozes biežumu.
4. Novērtēt trombozes risku pacientiem ar kombinētiem faktoriem (t. i., viena nukleotīda varianti un iegūti trombofilijas faktori).

Promocijas darba hipotēze

Pacienti, kas ir variantu nesēji gēnos, kuri ietekmē hemostatisko funkciju (rs6025 FV Leiden; protrombīna gēnā rs1799963; rs2066865 FGG; rs2227589 SERPINC1 un/vai rs1801133 MTHFR), uzrādīs palielinātu lēvera trombozes biežumu.

Promocijas darba novitāte

Pētījums raisa jaunu pieeju trombotisko sarežģījumu izpratnei mikrovaskulārā brīvā lēvera ķirurģijā ar mēģinājumu veidot novērtēšanas modeli, kas apvieno ģenētisko polimorfismu analīzi ar standartizētiem perioperatīviem protokoliem. Galvenais aspekts ir sistemātiskā gan iedzimtu trombofilisko pazīmju, gan iegūto koagulācijas izmaiņu novērtēšana, nodrošinot pamatu personalizētai riska novērtēšanai un mērķtiecīgām profilaktiskām stratēģijām rekonstruktīvajā mikroķirurģijā. Šī pieeja piedāvā ieskatu lēvera trombozes daudzfaktoriālajā raksturā un iezīmē potenciālus ceļus ķirurģisko rezultātu uzlabošanai, izmantojot ģenētiski pamatotu klīnisko lēmumu pieņemšanu.

1. Materiāls un metodes

1.1. Pētījuma dizains un pacientu iesaiste

Novērojuma prospektīvs gadījumu sērijas pētījums tika veikts no 2016. gada decembra līdz 2019. gada jūlijam Latvijas Plastiskās un rekonstruktīvās mikroķirurģijas centrā. Pēc iekļaušanas un izslēgšanas kritēriju piemērošanas tika iesaistīti 155 pieaugušie pacienti, kuriem tika veikta mikrovaskulārā brīvā lēvera ķirurģija. Pētījuma protokols un informētās piekrišanas forma saņēma Latvijas Centrālās ētikas komitejas apstiprinājumu (Nr. 1/28-11-16), nodrošinot starptautisko ētikas vadlīniju un pacientu tiesību aizsardzības ievērošanu.

Iekļaušanas kritēriji ietvēra visus pieaugušos pacientus, kuriem tika veikta mikrovaskulārā brīvā lēvera ķirurģija ar parakstītu informēto piekrišanu.

Izslēgšanas kritēriji tika noteikti:

- Grūtniecība un pēcdzemdību periods.
- Nesenās transfūzijas. Pacienti, kas saņēma alogēnus asins komponentus un/vai koagulācijas faktorus 72 stundu laikā pirms operācijas, tika izslēgti, lai novērstu jaucējmainīgus, kas ietekmē rezultātus.
- Sirds slimības. Individīdi ar pierādītu kreisā kambara mazspēju.
- Kaulu smadzeņu un aknu transplantācijas. Pacienti ar alogēnu kaulu smadzeņu vai aknu transplantāciju.
- Nieru slimība beigu stadijā.
- Nesena koagulāciju ietekmējoša medikamentu lietošana. Tiešie orālie antikoagulanti tika pārtraukti 72 stundas pirms paraugu ņemšanas. K vitamīna antagonisti tika pārtraukti 4–5 dienas pirms operācijas, pamatojoties uz starptautiski normalizētā protrombīna laika rādītājiem. Pacientiem ar augstu trombozes risku tika ordinēti zemmolekulārie heparīni, kas tika pārtraukti 12 stundas pirms operācijas.

Standartizētas intervijas veica viens klīnicists, tika ievākta: pacienta anamnēze, ieskaitot iepriekšējus trombotiskus notikumus, antitrombotisko medikamentu lietošana, regulāro medikamentu lietošana (ieskaitot orālos kontraceptīvus), trombozes ģimenes anamnēze un iepriekš diagnosticētas iedzimtas trombofilijas. Tika reģistrēti audu bojājuma faktori, ar nesenu traumu, ko definēja kā notikušu 30 dienu laikā traumas vai politraumas etioloģijas gadījumā. Pozitīva trombozes anamnēze ietvēra jebkuru arteriālu vai venozu trombotisku notikumu.

1.2. Genotipēšana

Asins paraugi tika ņemti pirmsoperācijas periodā pirms anestēzijas indukcijas un kristaloīdu ievadīšanas, pēc kā transportēti uz Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru un SIA “NMS Laboratorija” analīzei.

DNS ekstrakcija un kvalitātes novērtēšana

Genomiskā dezoksiribonukleīnskābe (DNS) tika ekstrahēta no perifēro asiņu leikocītiem, izmantojot standartizētu fenola-hloroforma ekstrakcijas protokolu. Ekstrahētā DNS tika pakļauta spektrofotometriskai kvalitātes novērtēšanai (260/280 attiecība) un koncentrācijas noteikšanai. DNS integritāte tika pārbaudīta ar gela elektroforēzes palīdzību.

Viena nukleotīda varianta genotipēšana

Viena nukleotīda variantu genotipēšanā tika izmantotas *TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ASV*) ar *ViiA 7 Real-Time* polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) sistēmu (*Applied Biosystems*). Specifiskie testi ietvēra C_11975250_10 V faktora Leiden (rs6025), C_1799963_10 protrombīna gēnam (rs1799963), C_11503414_10 fibrinogēna gamma (rs2066865), C_16180170_10 SERPINC1 (rs2227589) un C_1202883_20 MTHFR (rs1801133).

PCR protokols

Reakcijas maisījums sastāda 12,5 µL *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 0,625 µL *SNP Genotyping Assay* (40×), 2 µL DNS matricas (10 ng/µL) un 9,875 µL nukleāžu brīva ūdens (kopējais tilpums 25 µL). Termiskās ciklēšanas apstākļi ietvēra sākotnējo *AmpErase UNG* aktivāciju (50 °C, 2 minūtes), polimerāzes aktivāciju (95 °C, 10 minūtes), 40 denaturācijas ciklus (95 °C, 15 sekundes) un hibridizāciju/pagarināšanu (60 °C, 1 minūte), noslēdzoties ar galīgo pagarināšanu (72 °C, 1 minūte).

Kvalitātes kontrole

Vienlaicīga zināmu homozigotu savvaļas (*wild type*) tipa, heterozigotu un homozigotu variantu kontrolanalīze kopā ar bezmatricas kontrolēm. Genotipa noteikšana, izmantojot alēļu diskriminācijas grafikus un klasteru analīzi. Validācijas kritēriji: minimālā 95 % izsaukšanas likme, Hārdija-Veinberga līdzsvara novērtējums un kontroles paraugu atbilstības pārbaude. Iekšējā kvalitātes nodrošināšana tika uzturēta, izmantojot 10 % paraugu dublikātu testēšanu un starpplatformu pārbaudi, ja piemērojams. Visas procedūras tika veiktas, sekojot ražotāja ieteikumiem ar visaptverošu reakcijas apstākļu, reaģentu partijas numuru un aprīkojuma kalibrācijas stāvokļa dokumentāciju. Datu analīze izmantoja ražotāja programmatūru (*Applied Biosystems*) ar standartizētiem analītiskajiem parametriem.

1.3. Klīniski laboratorā izmeklēšana

Asins paraugi tika ņemti operācijas dienā pirms anestēzijas indukcijas un kristaloīdu infūzijas, visus testus apstrādājot vienas dienas laikā SIA “NMS Laboratorija”.

Kopējā plazmas fibrinogēna koncentrācija tika mērīta ar *Clauss* metodi (Mackie, 2003) citrāta plazmā, izmantojot *STA-R COMPACT* (*Diagnostika Stago, Asnières-sur-Seine, Francija*). References diapazons: 2–4 g/L. Modificēts APC-R tests ar pacienta plazmu, kas atšķaidīta 1:4 ar FV-deficītu plazmu. Paralela testēšana ar/bez APC, izmantojot aktivētājā parciālajā tromboplastīna laikā balstītu mērījumu. Atsauces diapazoni: normāls > 2,1, robežvērtība 1,8–2,1, abnormāls < 1,8, heterozigots FVL tipiskais 1,5–1,8, homozigots FVL tipiskais < 1,5. Protrombīna laiks: reaģents, kas satur tromboplastīnu un kalcija hlorīdu, sajaukts ar pacienta plazmu; laiks līdz recekļa veidošanās tiek mērīts fotometriski. References intervāls: 70–130 %. Homocisteīna koncentrācija tika analizēta ar ķīmiluminescences imunoanalīzēm. References intervāls: 5–12 μmol/L. Antitrombīns tika noteikts ar hromogēno analīzi. References intervāls: 75–125 %.

1.4. Anestēzija un intraoperatīva pacienta uzraudzība

Tika lietoti trīs anestēzijas veidi, pamatojoties uz pacienta vajadzībām: standartizēta vispārējā anestēzija, reģionālā anestēzija vai reģionālās un vispārējās anestēzijas kombinācija.

Standartizēts vispārējās anestēzijas protokols

Pirmsoperācijas fāze: premedikācija ar midazolāmu 0,02–0,04 mg/kg IV (max 2 mg). Profilaktiskie antibiotiķi saskaņā ar vadlīnijām. Pretvemšanas profilakse: deksametazons 8 mg IV + ondansetrons 4 mg IV.

Indukcijas fāze: preoksigenācija ar 100 % O₂ 3 minūtes caur sejas masku. Indukcijas medikamenti: fentanils 1–2 mcg/kg IV, propofols 1,5–2,5 mg/kg IV, cisatrakurijs 0,15–0,2 mg/kg IV.

Uzturēšanas fāze: inhalācijas anestētiķis sevoflurāns MAC (minimālā alveolārā koncentrācija) 0,8–1,2 O₂/gaisa maisījumā (FiO₂ 0,4–0,5). Analģēzija: fentanila 0,5–1 mcg/kg/h nepārtraukta infūzija vai remifentanila 0,05–0,2 mcg/kg/min. nepārtraukta infūzija. Muskuļu relaksācija: cisatrakurijs 0,1–0,2 mg/kg/h, uzturot muskuļu relaksācijas pakāpi TOF (*train of four* jeb četru secīgu impulsu nervu stimulācijas tests) 1–2 saraušanos.

Standartizēts reģionālās anestēzijas protokols

Augšējām un apakšējām ekstremitātēm: ropivakains 0,2–0,5 % vai bupivakains 0,25–0,5 %, tilpums 20–30 ml ar maksimālās devas aprēķinu. Adjuvanti: deksametazons 4–8 mg. Neirāla blokāde, ko veica, izmantojot duālu vadību: reāllaika ultraskaņas vizualizāciju un perifēro nervu stimulāciju (*Stimuplex, B. Braun, Melsungen, Vācija*), nodrošinot precīzu anatomisko lokalizāciju.

Tilpuma uzturēšana un monitorings

Uzturēšana ar kristaloīdu šķīdumu 4–6 mL/kg/h un papildu bolusiem, pamatojoties uz klīnisko novērtējumu. Centrālā katetra un pastāvīgā urīna katetra ievietošana operācijām, kas pārsniedz 2 stundas.

Mērķa parametri:

- Hemodinamikas mērķi: vidējais arteriālais spiediens 70–80 mmHg, sirdsdarbības frekvence 60–80 reizes/minūtē.
- Centrālais venozais spiediens: optimālais diapazons 4–6 mmHg (nepārsniedzot 10 mmHg).
- Urīna izvade: 0,5–1,0 mL/kg/h.
- Hematokrīts: 30–35 %.
- Pamattemperatūra (nazofaringeālā) 36,0–37,0 °C, $\Delta t \leq 1$ °C, izmantojot šķidruma sildītāju un piespiedu gaisa sildīšanas ierīci.

Pēcoperācijas multimodāla analgēzija ietvēra paracetamolu 1 g IV vai metamizolu 1 g IV un deksketoprofenu 50 mg IV (ja nav kontraindikāciju). Pēcoperācijas uzraudzība: standarta Amerikas Anesteziologu asociācijas uzraudzība, lēvera perfūzijas novērtējums, temperatūras uzraudzība, sāpju vadība.

1.5. Statistiskā analīze

Statistiskā analīze tika veikta, izmantojot *Statistical Package for Social Science (SPSS) V.23 (IBM Korea, Seula, Koreja)*. Ar Kolmogorova-Smirnova testu novērtēja normālo sadalījumu. Normāli sadalīti nepārtrauktie mainīgie tika prezentēti kā vidējie \pm standartnovirze ($M \pm SD$) un kategoriskie mainīgie kā procenti (%). Asimetriski sadalītās vērtības tika prezentētas kā mediānas un starpkvartiļu diapazoni (IQR). Izredžu attiecības un 95 % ticamības intervāli novērtēja faktoru ietekmi starp grupām. Salīdzinājumiem starp genotipa grupām tika izmantoti Kruskala-Volisa H testi neparametriskajiem mainīgajiem un ANOVA parametriskajiem mainīgajiem. Tika aprēķināti Pīrsona χ^2 korelācijas koeficienti un p vērtības, izmantojot Spīrmena rangu korelācijas koeficientu, ja piemērojams. Statistiskā nozīmīguma pieņēmums bija divpusējs, $p < 0,05$.

Trombozes riska novērtējums: primārā analīzē izmantoja loģistiskās regresijas modeļus katram VNV ar sekojošu izredžu attiecību (OR), 95 % ticamības intervālu un koriģētu p vērtību aprēķinu. Alēļu sadalījuma analīzē izmantoja hī kvadrāta testu genotipa frekvencēm, Fišera testu (kad $n < 5$) un izredžu attiecības alēļu frekvencēm. Kombinētā ģenētiskā riska analīzē izmantoja vairāku mainīgo loģistisko regresiju un ģenētiskā riska punktu aprēķinu ar uztvērēja darbības raksturlīknes (ROC) laukumu zem līknes (AUC).

Riska prognozēšanas modeļi: vairāku mainīgo loģistiskā regresijā izmantoja trīs kategorijas:

- ģenētiskie varianti: FV rs6025, protrombīna gēnā rs1799963, FGG rs2066865, SERPINC1 rs2227589, MTHFR rs1801133;
- iegūtās koagulācijas izmaiņas: fibrinogēns, homocisteīns, aktivētā C proteīna rezistence (APCR), protrombīns, antitrombīns;
- jaucējfaktori: vecums, dzimums, smēķēšana.

Statistikās jaudas un izlases lieluma aprēķini ģenētiskajai asociācijai: $\alpha = 0,05$ un $\beta = 0,20$.

2. Rezultāti

2.1. Pētījuma populācijas raksturojums

Pēc iekļaušanas un izslēgšanas kritēriju piemērošanas sākotnēji tika iesaistīti 162 pacienti, no kuriem septiņi tika izslēgti nepilnīgu datu dēļ, rezultātā iegūstot galīgo pētījuma populāciju ar 155 pacientiem. Kohortu veidoja 118 vīrieši (76,1 %) un 37 sievietes (23,9 %), vidējais vecums $45,07 \pm 14,94$ gadi. Defekta etioloģija ietvēra traumu (44,5 %), hronisku iekaisumu (20 %), ļaundabīgus audzējus (18 %) un politraumu (7,7 %). Defektu lokalizācija galvenokārt skāra apakšējās ekstremitātes (54,8 %), kam sekoja augšējās ekstremitātes (23,2 %) un galvas/orofaciālās zonas (18,7 %). Būtiski pacientu raksturojoši faktori bija smēķēšana (41,3 %), nesenā trauma < 30 dienas (32,9 %), ģimenes anamnēzē tromboze (13,5 %), alkohola lietošana (11,6 %), metaboliski traucējumi (9,7 %) un personīgā anamnēzē tromboze (6,5 %).

Lēvera tromboze attīstījās 14 pacientiem (9 %), ar pilnīgu lēvera zudumu 8 gadījumos (5,16 %), neskatoties uz glābšanas mēģinājumiem, un daļēju lēvera zudumu 5 gadījumos (3,22 %), sasniedzot kopējo mikrovaskulārā lēvera izdzīvošanas līmeni 94,84 %. Venozā tromboze bija biežāka nekā arteriālā tromboze (71,4 % gadījumu vai nu izolēti, vai kombinācijā ar arteriālām komplikācijām). Neskatoties uz ķirurģisku iejaukšanos, daļēja vai pilnīga lēvera nekroze attīstījās 64,3 % pacientu ($n = 9$), padarot nepieciešamas alternatīvas rekonstruktīvas stratēģijas, ieskaitot lokālos lēverus, šķeltus ādas transplantātus un negatīvā spiediena brūču terapiju. Gadījumos, kad bija gan arteriāla, gan venoza tromboze, konstatēja augstākus lēvera nekrozes rādītājus, uzsverot duālās asinsrites nozīmību rezultātu noteikšanā.

Trombotisko komplikāciju gadījumu ($n = 14$) individuāla raksturojuma analīze atklāja, ka visiem pacientiem bija identificējams vismaz viens ģenētiskais variants. Pēc sastopamības biežuma pirmajā vietā bija MTHFR rs1801133 variants (10 pacienti, 71,4 %), tam sekoja FGG rs2066865 (7 pacienti, 50 %) un SERPINC1 rs2227589 (5 pacienti, 35,7 %).

Tikai vienā trombotisku komplikāciju gadījumā tika konstatēta V faktora Leidena mutācija, turklāt šis pacients bija arī FGG varianta nesējs ar atbilstošu fenotipisko izpausmi – paaugstinātu fibrinogēna līmeni un zemiem APCR parametriem.

2.2. Ģenētisko variantu sastopamība

MTHFR rs1801133 bija visbiežāk identificētais ģenētiskais variants (26,5 %), turpretī protrombīna G20210A (rs1799963) uzrādīja viszemāko sastopamību (1,3 %), atbilstoši populācijas pētījumu datiem (2.1. tabula).

Ģenētisko variantu sastopamības salīdzinājums starp pētījuma grupu un references populāciju

Gēns, variants (vēsturiskais nosaukums)	Varianta alēles frekvence lielajā kohortā* (n = 605)	Varianta alēles frekvence pētījuma grupā, % (n = 155)	Frekvences maiņas koeficients
V faktors, rs6025 (V faktora Leidens)	18/1210, 1,5 %	7/310, 2,1 %	1,33
II faktors, rs1799963 (protrombīna G20210A)	15/1210, 1,2 %	4/310, 1,3 %	1,01
FGG, rs2066865	301/1210, 24,9 %	68/310, 22 %	0,93
SERPINC1, rs2227589	118/1210, 9,8 %	30/310, 9,7 %	1,01
MTHFR, rs1801133	356/1210, 29,4 %	82/310, 26,5 %	0,91

* Lielā kohorta – Latvijas populācijas genoma references izveide. Projekts finansēts no Eiropas Atveseļošanas fonda, projekta Nr. 4.1.1.r.0/3/22/I/VM/001.

Salīdzinājums ar lielo Latvijas populācijas references kohortu (n = 605) uzrādīja ļoti līdzīgas alēļu frekvences bez statistiski nozīmīgām atšķirībām, apstiprinot ģenētisko salīdzināmību un atbalstot pētījuma reprezentativitāti un validitāti. Frekvenču maiņas koeficienti svārstījās no 0,91 (MTHFR) līdz 1,33 (V faktora Leidens). Retiem variantiem, piemēram, V faktora Leidens un G20210A, bija zemas frekvences, kas ierobežoja statistisko jaudu reto variantu analīzē. Kopumā ģenētiskā konsekvence validē atklājumu plašāku piemērojamību.

Piecu ar trombofiliju saistīto ģenētisko variantu frekvenču sadalījums, analizēts atkarībā no trombozes statusa (2.2. tabula), neuzrādīja statistiski nozīmīgas asociācijas.

Ģenētisko variantu alēļu salīdzinājums atkarībā no trombozes statusa

Gēns, variants (iepriekšējais nosaukums)	Varianta alēles frekvence trombotiskajā grupā, alēles/% (n = 14)	Varianta alēles frekvence grupā bez trombozes, alēles/% (n = 141)	Izredžu attiecība (ticamības intervāls, 95 %)	p vērtība
V faktors, rs6025 (V faktora Leidens)	1/28, 3,6 %	6/282, 2,1 %	0,84 (0,05–15,60)	1
II faktors, rs1799963 (protrombīna G20210A)	1/28, 3,6 %	3/282, 1,1 %	2,88 (0,26–32,30)	0,245
FGG, rs2066865	8/28, 28,6 %	60/282, 21,3 %	1,36 (0,67–2,76)	0,375
SERPINC1, rs2227589	5/28, 17,9 %	25/282, 8,9 %	1,46 (0,59–3,62)	0,448
MTHFR, rs1801133	11/28, 39,3 %	71/282, 25,2 %	1,28 (0,67–2,45)	0,5

FVL – V faktora Leidens; FII – protrombīna gēns; FGG – fibrinogēna gammas ķēdes gēns; MTHFR – metilentetrahidrofolāta reduktāze. Piecu ģenētisko variantu izredžu attiecības (OR) ar 95 % ticamības intervāliem (TI). Statistiskā analīze tika veikta, lietojot Fišera eksakto testu ar nozīmīguma līmeni $\alpha = 0,05$ (divpusējs tests).

Spēcīgākā asociācija tika novērota protrombīna G20210A (OR = 2,88, 95 % TI: 0,26–32,30, p = 0,245), kam sekoja SERPINC1 rs2227589 (OR = 1,46, p = 0,448), FGG rs2066865 (OR = 1,36, p = 0,375), MTHFR rs1801133 (OR = 1,28, p = 0,500) un V faktora Leidens (OR = 0,84, p = 1,000). P vērtības 0,245–1,000 diapazonā liecina par nepietiekamu statistisko jaudu trombozes asociāciju noteikšanai. Plašie ticamības intervāli atspoguļo efekta novērtējumu ierobežoto precizitāti mazā izlases apjoma dēļ, īpaši retiem variantiem.

Visu variantu genotipu frekvences atbilda Hārdija-Veinberga līdzsvaram, apstiprinot, ka alēļu un genotipu frekvences pētītajā populācijā ir stabilas, un validējot ģenētiskās analīzes kvalitāti.

2.3. Ģenētisko variantu un koagulācijas parametru sakarības

Genotipa-fenotipa asociāciju analīze (2.3. tabula) ietver visus piecus analizētos variantus un ar tiem saistītos proteīnus.

V faktora Leidena varianta nesēji (C/T genotips) demonstrēja statistiski nozīmīgi samazinātas APCR vērtības ($1,19 \pm 0,17$) salīdzinājumā ar normālo genotipu ($2,02 \pm 0,32$, p = 0,006), apstiprinot šī varianta funkcionālo ietekmi uz C proteīna rezistenci. FGG rs2066865 variantam tika konstatēts skaidrs devas-efekta raksturs, ar fibrinogēna līmeni G/G genotipa nesējiem ($4,08 \pm 1,32$ g/L), G/A nesējiem ($4,64 \pm 1,74$ g/L, p = 0,04) un A/A nesējiem ($5,57 \pm 1,81$ g/L, p = 0,004 pret G/G).

2.3. tabula

Analizētie viena nukleotīda varianti un to atbilstošie proteīni pētījuma grupā (n = 155)

Variants un genotips	Noteiktais proteīns (min; -max) M (\pm SD)	p
rs6025 <i>FV</i> (C>T) C/C (n = 148) C/T (n = 7) T/T (n = 0)	APCR (< 1,8) 2,02 (0,32) 1,19 (0,17) –	0,006
rs1799963 <i>F2</i> (G>A) G/G (n = 152) G/A (n = 2) A/A (n = 1)	PT (70–130 %) 94,38 (20,34) 95,50 (20,51) 106,00	ns
rs2066865 <i>FGG</i> (G>A) G/G (n = 92) G/A (n = 54) A/A (n = 9)	Fibrinogēns (2–4 g/L) 4,08 (1,32) [#] 4,64 (1,74) [*] 5,57 (1,81) ^{*#}	0,04 [*] 0,004 [#]
rs2227589 <i>SERPINC1</i> (C>T) C/C (n = 126) C/T (n = 28) T/T (n = 1)	AT (75–125 %) 89,57 (14,14) 97,89 (14,52) 92,10	ns

Variants un genotips	Noteiktais proteīns (min; -max) M (\pm SD)	p
rs1801133 <i>MTHFR</i> (G>A)	Homocisteīns (5–12 mkmol/L)	Ns
G/G (n = 83)	10,71 (4,17)	
G/A (n = 62)	13,61 (5,44)	
A/A (n = 10)	13,50 (5,8)	

Salīdzinājums ar G/G genotipu; #Salīdzinājums starp A/A un G/G genotipiem. Statistiskā analīze veikta, izmantojot atbilstošus parametriskos vai neparametriskos testus. SNV – viena nukleotīda variants; M – vidējais rādītājs; SD – standartnovirze; APCR – aktivētā C proteīna rezistence; PT – protrombīna laiks; AT – antitrombīns; ns – nav statistiski nozīmīgs.

Protrombīna G20210A, SERPINC1 un *MTHFR* polimorfismi neuzrādīja statistiski nozīmīgas asociācijas ar atbilstošajiem proteīniem, kas, iespējams, izskaidrojams ar nelielu variantu nesēju skaitu. *MTHFR* rs1801133 neuzrādīja būtisku saistību ar plazmas homocisteīna līmeni, un SERPINC1 rs2227589 nesējiem netika konstatētas nozīmīgas antitrombīna aktivitātes atšķirības.

Sākotnējo koagulācijas rādītāju analīze pēc trombozes klātbūtnes (2.4. tabula) atklāja tikai divas statistiski būtiskas atšķirības. APCR vērtības bija ievērojami zemākas pacientiem, kuriem attīstījās tromboze (1,83 pret 2,01, $p = 0,043$). Pretēji gaidītajam homocisteīna koncentrācija trombozes pacientu grupā bija zemāka (7,9 pret 11,1 $\mu\text{mol/L}$, $p = 0,029$), kas ir pretrunā ar zināmajām hiperhomocistinēmijas un trombotiskā riska asociācijām, tādēļ šis rezultāts prasa piesardzīgu interpretāciju, ņemot vērā nelielo trombozes grupas izlasi. Protrombīna laika, fibrinogēna koncentrācijas vai antitrombīna aktivitātes rādītājos netika novērotas nozīmīgas atšķirības.

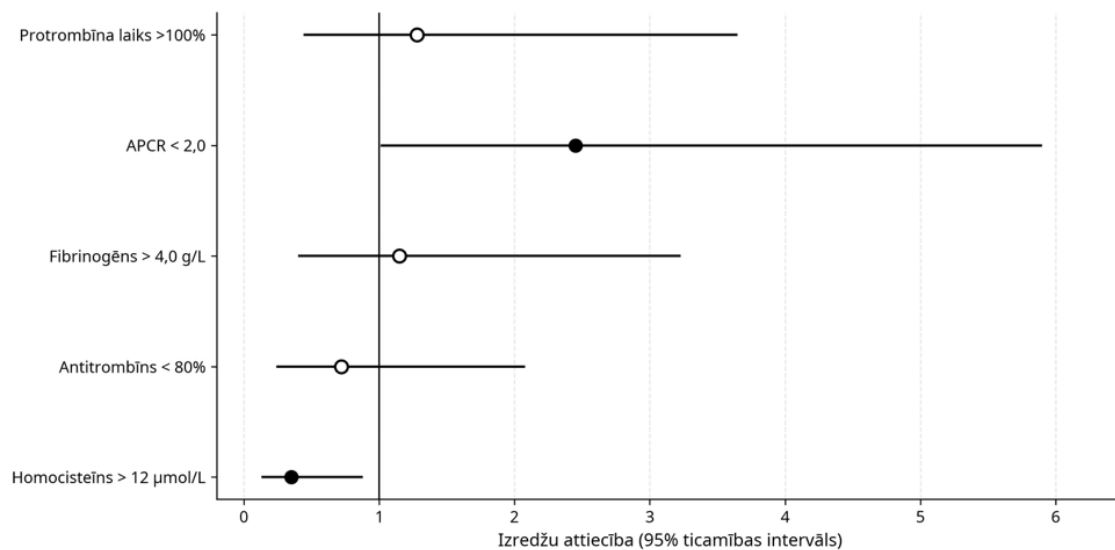
2.4. tabula

Koagulācijas parametri saskaņā ar trombozes statusu

Rādītājs	Grupa bez trombozes, n = 141	Trombozes grupa, n = 14	p
PT %	97,0 (85,0–109,0)	102,5 (89,3–116,8)	0,26
APCR	2,01 (1,75–2,22)	1,83 (1,69–1,9)	0,043
Fibrinogen, g/L	4,08 (3,18–5,32)	4,28 (3,78–4,78)	0,60
AT	89,1 (79,9–97,4)	96,2 (85,4–111,8)	0,231
Hmc, mkmol/L	11,1 (8,4–14,6)	7,9 (7,1–8,4)	0,0029

PT – protrombīna laiks; APCR – aktivētā C proteīna rezistence; AT – antitrombīns; Hmc – homocisteīns. Dati attēloti kā mediāna (starpkvartīļu diapazons). Statistiskā analīze veikta, izmantojot Manna-Vitnija U testu.

Forest plot analīze (2.1. attēls) pieciem koagulācijas parametriem ar klīniski būtiskām robežvērtībām atklāja atšķirīgus pamatmodeļus. APCR < 2,0 bija visnozīmīgākais biomarkieris (OR = 2,45, 95 % TI: 1,02–5,89, $p = 0,043$). Homocisteīns > 12 $\mu\text{mol/L}$ uzrādīja negaidītu aizsargājošu efektu (OR = 0,35, 95 % TI: 0,14–0,87, $p = 0,029$).



Parametrs	IzA (95% TI)	P-vērtība	Noz.
Protrombīna laiks>100%	1,28 (0,45-3,64)	0,260	nn
APCR<2,0	2,45 (1,02-5,89)	0,043	*
Fibrinogēns>4,0 g/L	1,15 (0,41-3,22)	0,600	nn
Antitrombīns<80%	0,72 (0,25-2,07)	0,231	nn
Homocisteīns>12 μmol/L	0,35 (0,14-0,87)	0,029	*

2.1. attēls. Koagulācijas parametru saistība ar brīvā lēvera trombozi

Datu punkti atspoguļo izredžu attiecību ar 95 % ticamības intervālu koagulācijas parametriem. Aizpildītie apli apzīmē statistiski būtiskas saistības ($p < 0,05$), kamēr kontūrapļi reprezentē statistiski nenozīmīgus rezultātus ($p \geq 0,05$). Vertikālā līnija $OR = 1,0$ pozīcijā norāda uz efekta neesamību. $APCR < 2,0$ bija būtiski asociēts ar paaugstinātu trombozes risku ($OR = 2,45$, 95 % TI: 1,02–5,89, $p = 0,043$). Homocisteīna līmenis $> 12 \mu\text{mol/L}$ demonstrēja neparedzētu saistību ($OR = 0,35$, 95 % TI: 0,14–0,87, $p = 0,029$). Izlases apjoms: $n = 155$ pacienti ar 14 trombotiskām komplikācijām.

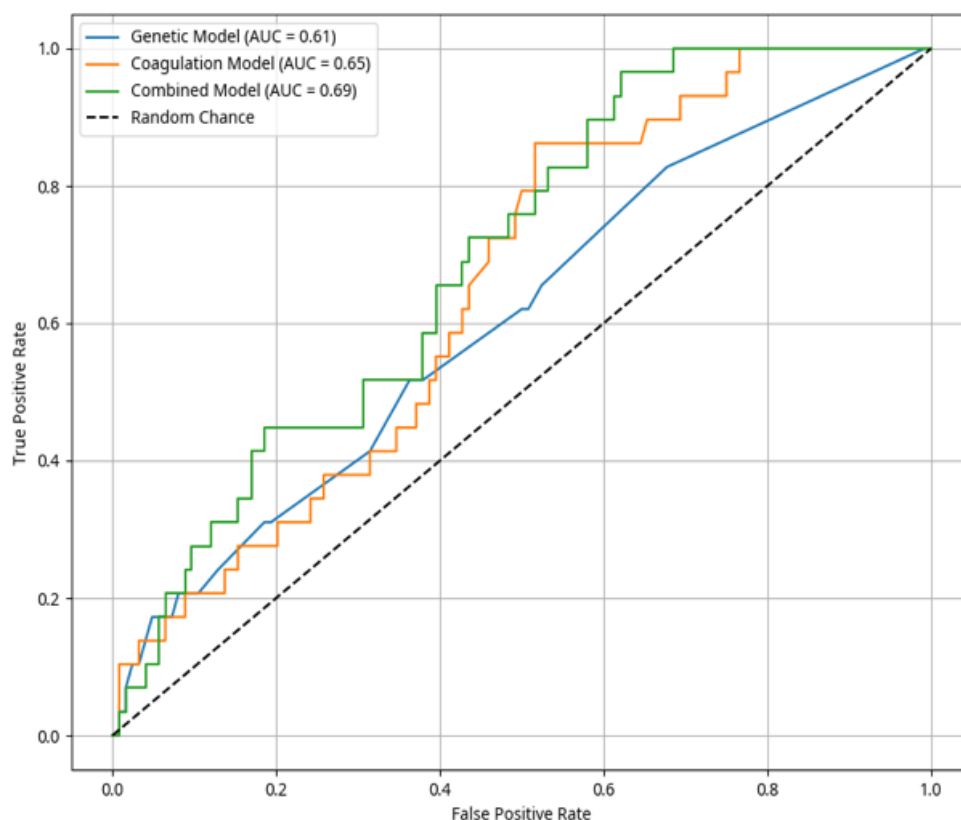
Standarta koagulācijas parametri, ieskaitot protrombīna laiku $> 100 \%$ ($OR = 1,28$, $p = 0,260$), fibrinogēnu $> 4,0 \text{ g/L}$ ($OR = 1,15$, $p = 0,600$) un antitrombīnu $< 90 \%$ ($OR = 0,72$, $p = 0,231$), neuzrādīja statistiski nozīmīgas sakarības, kas liecina, ka rutīnas koagulācijas testēšanai varētu būt ierobežota klīniskā prognozējošā vērtība.

2.4. Kombinēto riska faktoru analīze

Trīs loģistiskās regresijas modeļi tika izmantoti, lai novērtētu dažādu faktoru kopu prognostisko spēju (2.2. attēls). Modelis, kas ietvēra tikai ģenētiskos polimorfismus FV rs6025, FII rs1799963, FGG rs2066865, SERPINC1 rs2227589, MTHFR rs1801133, uzrādīja pseidokoeficientu $R^2 = 0,02327$, kas liecina, ka ģenētiskie varianti atsevišķi izskaidro ļoti mazu daļu no lēvera trombozes variācijas. Neviens no individuālajiem ģenētiskajiem variantiem nedemonstrēja statistiski būtisku saistību (visi $p > 0,05$), kas norāda, ka šie faktori nav efektīvi lēvera trombozes prognozētāji pētījuma kohortā.

Tikai koagulācijas modelis uzrādīja $R^2 = 0,05983$, kas ir nedaudz augstāks kā ģenētiskajam modelim, liecinot, ka koagulācijas faktori izskaidro nedaudz lielāku variācijas proporciju. APCR uzrādīja statistiski nozīmīgu negatīvu asociāciju ar lēvera trombozi ($p = 0,035$), kas ir saskaņā ar iepriekšējiem rezultātiem, apstiprinot V faktora Leidena funkcionālo ietekmi uz APCR.

Kombinētais modelis demonstrēja augstāko pseido R^2 (0,08160), norādot, ka visu ģenētisko, koagulācijas un jaucējfaktoru integrēšana skaidro nedaudz lielāku, taču joprojām limitētu variācijas proporciju. Kombinētajā modelī neviens no ģenētiskajiem variantiem, koagulācijas parametriem vai jaucējfaktoriem neuzrādīja statistiski būtisku saistību (visi $p > 0,05$). Iepriekš gandrīz nozīmīgais homocisteīns ($p = 0,075$) un APCR ($p = 0,071$) vairs nerasniedza nozīmīguma līmeni $p < 0,05$, kas liecina, ka, kontrolējot citus faktorus, individuālā prognozējošā spēja mazinās.

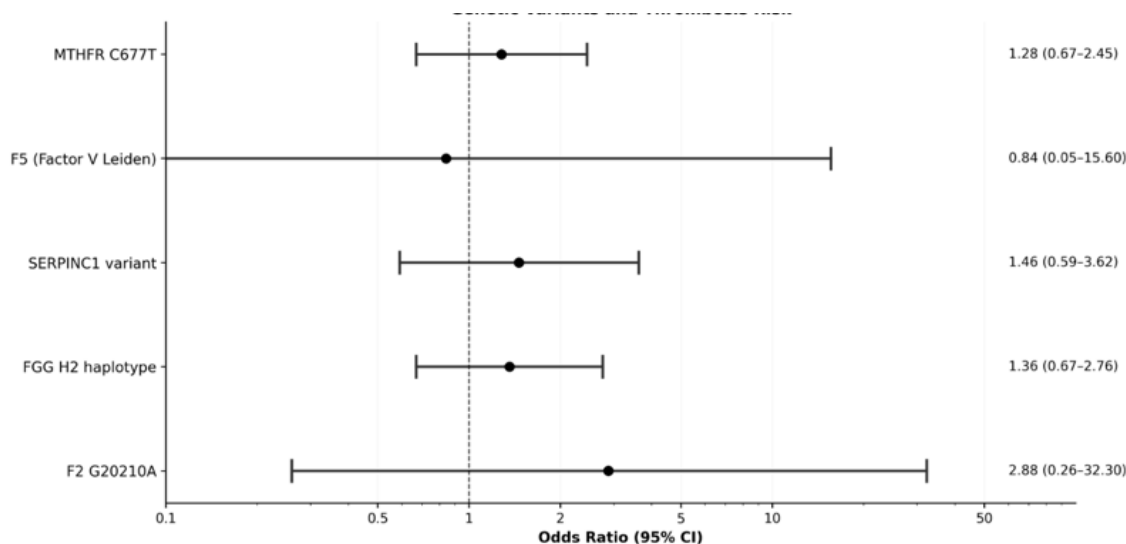


2.2. attēls. Loģistiskās regresijas modeļu ROC līkne trim riska faktoru grupām

Ģenētiskā modeļa AUC = 0,61 (ļoti vāja diskriminācijas jauda, tikai nedaudz labāka par nejaušību AUC = 0,50); koagulācijas modeļa AUC = 0,65 (nedaudz labāka diskriminācijas jauda, pieticīga spēja atšķirt pacientus ar/bez lēvera trombozes); kombinētā modeļa AUC = 0,69 (augstākā no trim, bet joprojām vāja līdz vidēja diskriminācijas jauda, norādot uz ierobežotu kopējo lēvera trombozes prognozēšanas spēju, neskatoties uz plašākas informācijas iekļaušanu).

Forest plot analīze (2.3. attēls) ģenētisko polimorfismu saistībai ar trombotiskām komplikācijām uzrādīja: V faktora Leidens OR = 0,84 (95 % TI: 0,05–15,60, $p = 0,762$), 1 trombotisks gadījums no 7 nesējiem; protrombīna G20210A OR = 2,88 (95 % TI: 0,26–32,30,

$p = 0,245$), spēcīgākā asociācija; FGG rs2066865 OR = 1,36 (95 % TI: 0,67–2,76, $p = 0,375$), viegls ģenētisks riska indikators ar šaurāku ticamības intervālu, kas liecina par iespējamu klīnisko nozīmi; SERPINC1 rs2227589 OR = 1,46 (95 % TI: 0,59–3,62, $p = 0,449$); MTHFR rs1801133 OR = 1,28 (95 % TI: 0,67–2,45, $p = 0,500$). Plašie ticamības intervāli atspoguļo mazu izlasi un nepietiekamu statistisko jaudu.



2.3. attēls. Ar trombozes risku saistītie ģenētiskie varianti

Izredžu attiecības (OR) ar 95 % ticamības intervāliem (TI) pieciem ģenētiskajiem variantiem. Attēloti punktu novērtējumi (kvadrāti) un ticamības intervāli (horizontālās līnijas). Vertikālā pārtrauktā līnija norāda OR = 1,0. Neviena asociācija nesasniedza statistisko nozīmību (visi $p > 0,05$). Statistiskā analīze veikta, izmantojot Fišera eksakto testu kategoriskajiem mainīgajiem. Izredžu attiecības un 95 % ticamības intervāli aprēķināti, izmantojot loģistisko regresiju. F2 – protrombīna gēns; FGG – fibrinogēna gammas ķēdes gēns; MTHFR – metilēntetrahidrofolāta reduktāzes gēns; SERPINC1 – serīnproteāzes inhibitora 1 (antitrombīna) gēns.

Proporcionālo risku regresijas analīzes neuzrādīja statistiski nozīmīgus mainīgos $\alpha = 0,05$ līmenī ne vienfaktora, ne daudzfaktoru modeļos. Vecums > 50 gadu parādīja paaugstinātu trombozes risku (HR = 1,58, 95 % TI: 0,56–4,45, $p = 0,386$). Aktīvā smēķēšana uzrādīja nelielu pieaugumu (HR = 1,24, 95 % TI: 0,45–3,42, $p = 0,675$), ar 3 gadījumiem starp 29 smēķētājiem (10,3 % notikumu īpatsvars). FGG variants un kumulatīvā ģenētiskā slodze (≥ 2 varianti) demonstrēja vispastāvīgākās sakarības visos analīzes veidos, ar riska attiecību tuvu 2,0 un p vērtībām tuvu statistiskajai nozīmībai, kas liecina par iespējamu klīnisko nozīmi, kura var atklāties ar lielāku izlašu vai augstāka riska pacientu populācijām.

2.5. Lēvera trombozes attīstības laiks un riska faktori

Analīze par izdzīvotību bez trombozes atklāja raksturīgu divfāžu ainu ar atšķirīgām agrīnām un vēlīnām fāzēm. Izdzīvotības līkne parādīja asu kritumu pirmajās trijās pēcoperācijas dienās – bez trombozes laiks samazinājās no 100 % uz aptuveni 97 % pirmajā dienā, 94 % otrajā dienā un nostabilizējās 91 % līmenī trešajā dienā. Pēc šī kritiskā sākuma perioda līkne izlīdzinājās bez jauniem trombozes gadījumiem līdz 10. novērošanas dienai. Šis modelis

liecina, ka lielākā daļa trombotisku sarežģījumu notika tieši pēcoperācijas sākumā, bet pacienti bez komplikācijām saglabāja stabili stāvokli. Galīgā 91 % izdzīvotība bez trombozes atspoguļo pacientu daļu, kas izvairījās no trombozes visā 10 dienu novērošanas laikā, ar 14 trombozes gadījumiem (9,0 %), kas galvenokārt notika pirmajās 72 stundās pēc operācijas.

Kaplana-Meijera analīze, vērtējot kumulatīvo ģenētisko variantu ietekmi, atklāja pakāpenisku izdzīvotības varbūtības samazināšanos, pieaugot trombofilisko ģenētisko variantu skaitam. Nulles variantu grupa saglabāja augstāko beztrombotiskās izdzīvotības līmeni, stabilizējoties aptuveni 87 % pēc 3. dienas. Viena varianta grupa uzrādīja zemāku izdzīvotības varbūtību, sasniedzot plato ap 82 %. Divu variantu un ≥ 3 variantu grupas demonstrēja progresīvi zemākus izdzīvotības rādītājus. Lai gan skaidra tendence liecināja, ka lielāka ģenētiskā slodze saistīta ar zemāku beztrombotiskās izdzīvotības iespējamību, *log-rank* tests tendencei nerasniedza statistisko nozīmību ($\chi^2 = 2,95$, $p = 0,086$).

Šis gandrīz nozīmīgais rezultāts ir ievēribas cienīgs, ņemot vērā izlases apjoma ierobežojumus, norādot uz bioloģisko efektu, kas varētu sasniegt statistisko nozīmību ar lielākām kohortām. Līdzība starp divu variantu un ≥ 3 variantu grupām liecina, ka ģenētiskā riska saistība var nebūt stingri lineāra, potenciāli norādot uz griestiem efektu, kur papildu varianti virs diviem nodrošina samazinātu papildu risku, statistiskās jaudas ierobežojumus, kas neļauj noteikt turpmākas atšķirības, vai bioloģiskās mijiedarbības efektus, kas modificē vienkāršos aditīvos ģenētiskos modeļus. Kaplana-Meijera līknes pēc dzimuma uzrādīja nelielu beztrombotiskās izdzīvotības varbūtību, bet *log-rank* tests ($p = 0,1685$) norādīja uz statistiski nenozīmīgu atšķirību, liecinot, ka dzimums vien var nebūt spēcīgs lēvera trombozes laika prognozētājs.

Pacienti ar trombozes anamnēzi uzrādīja tendenci uz zemāku beztrombotisko izdzīvotību salīdzinājumā ar pacientiem bez anamnēzes. *Log-rank* tests ($p = 0,2151$) nerasniedza statistisko nozīmību, tomēr vizuālā tendence liecina, ka trombozes anamnēze varētu būt svarīgs faktors, kas ietekmē turpmāko trombotisko notikumu laiku.

Līknes pacientiem, kuri saņēma tromboprolaksi, salīdzinājumā ar tiem, kuri nesaņēma, uzrādīja zināmas vizuālas atšķirības, bet *log-rank* tests nenorādīja statistiski nozīmīgu izdzīvotības laika atšķirību.

3. Diskusija

Mikrovaskulārajā ķirurģijā transplantētā lēvera audu dzīvotspēja ir būtiski atkarīga no adekvātas perfūzijas un trombotiskās komplikācijas joprojām ir nozīmīga problēma. Šī pētījuma mērķis ir rast sakarību starp ģenētiskajiem polimorfismu variantiem, kas ietekmē hemostatisko funkciju, un trombotiskajām komplikācijām mikrovaskulārajā brīvo lēveru ķirurģijā.

Trombotisko notikumu etioloģija mikrovaskulārajā ķirurģijā ir multifaktoriāla, un ģenētiskā ietekme, domājams, rada nosacījumus palielinātas trombotiskās aktivitātes veidošanai. Dažādu gēnu varianti, kas iesaistīti hemostāzes regulācijā, ieskaitot koagulāciju, trombocītu funkciju un fibrinolīzi, var padarīt noteiktus indivīdus uzņēmīgākus pret trombotiskām komplikācijām. Šādu ģenētisko ietekmes ceļu izpratne varētu optimizēt perioperatīvo riska novērtējumu un veidot pamatu individualizētas terapeitiskās pieejas veidošanai.

3.1. Būtiskākie rezultāti un to klīniskā nozīme

Novērotais 9 % lēvera trombozes līmenis atbilst iepriekš publicētajai literatūrai, kurā ziņots par lēvera komplikācijām 2–9 % robežās (Bowman, 2011; Friedman, 2010). Kopējais 94,84 % lēvera izdzīvošanas rādītājs atklāj klīniskiem rezultātiem, kas atbilst mūsdienu mikroķirurģijas prakses standartiem. Šis veiksmīgi transplantēto lēveru izdzīvošanas rādītājs uzsver turpmāko trombotisko komplikāciju klīnisko nozīmīgumu, jo pat nelieli neveiksmes gadījumi var izraisīt postošas funkcionālas un estētiskas sekas atsevišķiem indivīdiem.

Pretēji sākotnējai hipotēzei individuālie ģenētiskie polimorfismi neuzrādīja statistiski nozīmīgu saistību ar lēvera trombozes risku. Tādējādi mūsu rezultāti apstrīd tiešu ģenētiskās trombofilijas pētījumu ekstrapolāciju no vispārējām populācijām uz specifisku mikrovaskulārās ķirurģijas kontekstu. Nozīmīgu asociāciju neesamība starp V faktora Leidenu (rs6025), protrombīna G20210A (rs1799963) un citiem pētījumā analizētajiem ģenētiskajiem variantiem liecina, ka patofizioloģiskie mehānismi, kas ir spontānas venozās trombembolijas pamatā, var, iespējams, būtiski atšķirties no tiem, kas regulē mikrovaskulārās anastomotiskās trombozes attīstību.

3.2. Ģenētiskie varianti

Ģenētisko variantu prevalence mūsu pētījuma populācijā atbilda noteiktajām populācijas frekvencēm, turklāt MTHFR rs1801133 uzrādīja augstāko biežumu (26,5 %), bet protrombīna G20210A zemāko (1,3 %). Šie sadalījumi ir saskaņā ar Eiropas populācijas pētījumiem (Rosendaal, 1995; Kujovich, 2011), apstiprinot atbilstošu populācijas izlasi un validējot mūsu kohortu kā plašākas ķirurģiskās populācijas reprezentatīvu. Varianto alēļu

frekvences uzrādīja atbilstību salīdzinājumā ar lielu Latvijas populācijas references kohortu ($n = 605$), ar izmaiņu koeficientiem no 0,91 līdz 1,33 visos pārbaudītajos lokusos, apstiprinot būtiskas objektivitātes klātesamību pacientu atlasē.

3.2.1. rs6025 FV gēnā

V faktora Leidena joprojām ir visizplatītākā starp iedzimtās trombofilijas noteiktiem faktoriem Eiropas populācijās, ar heterozigotu sastopamību 3–7 % Ziemeļeiropas populācijās un gandrīz pilnīgu neesamību Āfrikas un Āzijas populācijās (Rees, 1995; Ridker, 1997). Literatūras dati liecina, ka šis variants radās no vienas dibinātāja mutācijas aptuveni pirms 21 000–24 000 gadu, turklāt tā saglabāšanās liecina par varbūtējām evolūcijas priekšrocībām, iespējams, saistītām ar uzlabotu hemostāzi dzemdību vai traumas laikā (Lindqvist, 2001; Zivelin, 2006). Arg506Gln substitūcija eliminē vienu no trim aktivētā C proteīna šķelšanas vietām Va faktorā, rezultātā radot aptuveni 10 reižu pagarinātu kofaktora aktivitāti un pastāvīgu trombīna ģenerāciju (Segers, 2007; Castoldi, 2010).

Neskatoties uz plašo literatūru, kurā norādīts uz 3–7 reižu palielinātu trombotisku risku nesējiem (Kujovich, 2011), mūsu rezultāti neatklāja nozīmīgu asociāciju ar lēvera trombozi ($OR = 0,84$, $p = 0,762$). Salīdzinoši nelielais nesēju skaits ($n = 7$, 2,1 %) ierobežoja spēju noteikt efektus, jo īpaši, ņemot vērā nelielo sākotnējo trombozes līmeni (9 %). *Post-hoc* jaudas aprēķini norāda, ka 3 reizes palielināta riska noteikšanai ar 7 nesējiem un 9 % sākotnējo trombozes līmeni būtu nepieciešami izlases lielumi, kas pārsniedz 800 pacientus. Otrkārt, mikrovaskulārās anastomozes hemodinamiskā vide, ko raksturo zemas plūsmas vide, mazs asinsvadu diametrs (1–3 mm) un būtiska ķirurģiskā trauma, var radīt trombotiskos apstākļus, kas būtiski atšķiras no spontānās venozās trombozes (Khouri, 1998).

Aptuveni 5 % APCR gadījumu veidojas alternatīvu mehānismu ceļā, kas nav saistīti ar V faktora Leidenu (Segers, 2007), to skaitā paaugstināts VIII faktora līmenis, *lupus* antikoagulants, grūtniecība un kombinēto orālo kontracepcijas līdzekļu lietošana (Castoldi, 2010). Mūsu kohortā viens patients, kurš demonstrēja APCR (koeficients 1,21) kopā ar V faktora Leidena heterozigotitāti, divu gadu periodā tika pakļauts divām mikrovaskulārā brīvā lēvera operācijām, abas gadījumos attīstoties lēvera trombozei. Šis klīniskais novērojums uzsver funkcionālās APCR analīzes klīnisko vērtību, kas pārsniedz izolētu ģenētisko testēšanu, jo fenotipiskā rezistences izpausme, ko modulē gan iedzimti, gan iegūti faktori, var būt precīzāks trombotiskā riska prediktors nekā tikai genotipiskā informācija (Vos, 2006). V faktora Leidena statistiski nozīmīgas saistības neesamība ar mikroķirurģisko trombozi mūsu pētījumā sakrīt ar līdzīgiem secinājumiem ierobežotajā pieejamā literatūrā par rekonstruktīvo ķirurģiju (Khansa, 2011; Biban, 2019).

3.2.2. rs1799963 variants protrombīna gēnā

Protrombīna G20210A varianta mutācija ir otrā visbiežāk sastopamā iedzimtā trombofilija Eiropas populācijās, kas sastopama 1–3 % un rada aptuveni 2–3 reizes palielinātu venozās trombozes risku (Simone, 2013; Bertina, 1998). Atšķirībā no V faktora Leidena, kas ietekmē proteīna funkciju, G20210A variants atrodas 3' netranslētajā reģionā, rezultātā radot paaugstinātu mRNS stabilitāti un palielinātu proteīna sintēzi, neietekmējot protrombīna enzimatiskās īpašības (Poort, 1996; Jadaon, 2011). Heterozigotie nesēji parasti uzrāda paaugstinātu protrombīna līmeni, 30 % virs populācijas vidējiem rādītājiem, lai gan ievērojama pārklāšanās ar normāliem references rādītājiem sarežģī fenotipisko identifikāciju (Poort, 1996).

Mūsu kohortā tikai viens pacients, kam tika identificēts protrombīna gēna variants, bija ar brīvā lēvera trombozi, rezultātā uzrādot nenozīmīgu izredžu attiecību 2,88 (95 % TI: 0,26–32,30, $p = 0,245$). Lai arī tas saskan ar datiem, kas apstiprina, ka pacientiem, kuri ir protrombīna gēna varianta nesēji, populācijas pētījumos ir 2–3 reizes palielināts trombozes risks (Simone, 2013), ārkārtīgi plašais ticamības intervāls atspoguļo dziļu statistisko nenoteiktību, kas izriet no varianta retuma. 1,3 % varianta izplatība sakrīt ar publicēto līdz šim (1–3 %), apstiprinot atbilstošu populācijas izlasi bez atlasas neobjektivitātes. Protrombīna G20210A klīniskais nozīmīgums mikroķirurģiskajās populācijās joprojām ir pretrunīgs. Varianta retums kopā ar pieticīgiem efekta lielumiem padara adekvāti jaudīgus klīniskos pētījumus par šo specifisko jautājumu nepraktiskus.

3.2.3. rs2066865 fibrinogēna gamma ķēdes gēnā

Pētījuma rezultātā tika novērota asociācija starp FGG rs2066865 un paaugstinātu plazmas fibrinogēna koncentrāciju. A/A genotipa nesēji demonstrēja ievērojami paaugstinātu fibrinogēna līmeni ($5,57 \pm 1,81$ g/L) salīdzinājumā ar G/G nesējiem ($4,08 \pm 1,32$ g/L), ar statistiski nozīmīgiem gēna-devas efektiem ($p = 0,001$ A/A pret G/G; $p = 0,04$ G/A pret G/G). Šī genotipa-fenotipa korelācija apstiprina rs2066865 funkcionālo nozīmīgumu kā kvantitatīvo īpašību lokusu, kurš modulē fibrinogēna ekspresiju, kas ir saskaņā ar iepriekšējiem ziņojumiem no Leidenas trombofilijas pētījuma un citām publikācijām (de Willige, 2005; Grünbacher, 2007; El-Galaly, 2013). Tiek atzīmētas arī korelācijas starp vecumu, paaugstinātu fibrinogēna līmeni un palielinātiem trombotiskiem notikumiem, jo īpaši venozajā sistēmā (Rosendaal, 2009). Predispozīcija paaugstinātam fibrinogēna līmenim, kas tiek noteikta ar gēna varianta klātbūtni, var tikt pastiprināta iekaisuma stāvokļu, traumas un ļaundabīgo audzēju laikā, radot protrombotisku vidi, kas palielina ķirurģisko risku (van Hylekama Vlieg, 2003; Schlimp, 2016). Fibrinogēns arī veicina asins viskozitāti un ir īpaši nozīmīgs zemas plūsmas mikrovaskulārajās sistēmās, kur paaugstināta viskozitāte var traucēt perfūziju (Eber, 1993). Kaut arī FGG rs2066865 A/A genotipa nesēji uzrādīja gan augstāku vidējo vecumu, gan paaugstinātu plazmas

fibrinogēna koncentrāciju, tas neizraisīja statistiski nozīmīgu lēvera trombozes incidences pieaugumu (OR = 1,36, p = 0,375). Ģenētisko variantu un to fenotipiskās izpausmes savstarpējā saistība liecina, ka FGG rs2066865 variants darbojas kā fibrinogēna koncentrācijas modulējošs faktors, nevis kā tiešs trombotiskā riska noteicošais faktors.

Tiešās sakarības neesamība starp palielinātu fibrinogēna koncentrāciju un lēvera trombozi regresijas analīzēs norāda, ka ģenētiski nosacītie fibrinogēna līmeņi nav pietiekami trombotisko notikumu paredzēšanai. Iespējams, ka citi aspekti – tehniski, mehāniski vai pacienta specifiskās pazīmes – ir būtiskāki lēvera panākumu noteikšanā (Khoury, 1998; Pattani, 2010).

3.2.4. rs2227589 SERPINC1 gēnā

Antitrombīna deficīts, ko pirmo reizi aprakstīja Egebergs 1965. gadā, ir viens no agrāk atklātajiem iedzimtās trombofilijas veidiem un viens no retākajiem riska faktoriem ar ievērojami augstāku, 10–20 reižu paaugstinātu, trombozes risku salīdzinājumā ar V faktora Leidenā vai protrombīna G20210A variantiem (Zöller, 1999; Patnaik, 2008). Šis serpīna superģimenes loceklis darbojas kā galvenais fizioloģiskais koagulācijas procesu inhibitors, turklāt aktivētā formā tas ir viens no spēcīgākajiem antikoagulācijas aģentiem, tā aktivitāte tiek pastiprināta (līdz 1000 reižu), saistoties ar heparīnu un endogēno heparāna sulfātu (Pike, 2005). Antitrombīna nozīmīgums tiek uzsvērts ar embrionālo letalitāti homozigotiem nesējiem deficīta gadījumos (Zöller, 1999).

Iedzimts antitrombīna deficīts ir autosomāli dominants ar mainīgu penetranci, tiek klasificēts I tipā (kvantitatīvs deficīts 10–15 % gadījumu) un II tipā (kvalitatīvi defekti) (Kumar, 2015; Perry, 1996). Rs2227589 variants SERPINC1 (c.41+141G>A) ir bieži sastopams variants, kura funkcionālais nozīmīgums un trombotiskā riska asociācija joprojām nav pilnīgi skaidrota, ar pretrunīgiem pierādījumiem no populācijas pētījumiem (Jiang, 2017). Atsevišķi dati liecina, ka samazinātas antitrombīna koncentrācijas ne vienmēr izraisa trombotiskus notikumus (van der Meer, 1973). Mūsu pētītajā populācijā netika novērotas nozīmīgas atšķirības plazmas antitrombīna aktivitātē starp rs2227589 varianta nēsātājiem neatkarīgi no brīvā lēvera trombozes stāvokļa. Visi noteiktie antitrombīna rādītāji atradās normālās references robežās (75–125 %), neuzrādot fenotipiskās izmaiņas, kas saistītos ar rs2227589 genotipiskajām atšķirībām.

Būtiski atzīmēt, ka divi no pieciem pacientiem ar heterozigotu genotipu, kuriem novēroja brīvo lēveru trombozi, bija vecumā līdz 50 gadiem, atbilstoši literatūras norādēm par sākotnējo trombotisko manifestāciju līdz 30 gadu vecumam (Patnaik, 2008; Hart, 2022).

3.2.5. rs1801133 MTHFR gēnā

MTHFR C677T variants uzrādīja augstu izplatību mūsu kohortā (26,5 %), kas atbilst Eiropas populāciju datiem ar homozigotiskās formas sastopamību 10–14 % robežās (Wilcken, 1996; Botto, 2000). Šis variants izraisa alanīna-valīna substitūciju 677. pozīcijā metilentetrahidrofolāta reduktāzē, kas katalizē 5,10-metilentetrahidrofolāta pārvēršanu 5-metilentetrahidrofolātā – metildonorā homocisteīna remetilācijai uz metionīnu (Goyette, 1998). Homozigotie varianta nesēji uzrāda aptuveni 70 % samazinātu enzīma aktivitāti (Rozen, 1997).

Primārā bioķīmiskā C677T homozigotitātes sekas ir viegla līdz vidēja hiperhomocisteinēmija, jo īpaši indivīdiem ar samazinātu folātu daudzumu (Klerk, 2002). Homocisteīns ir iesaistīts gan arteriālo, gan venozo trombožu etiopatogēnēzē ar vairākiem patogēnētiskiem ceļiem, ieskaitot endotēlija disfunkciju, oksidatīvo stresu, skābekļa oksidāzes homologu traucējumus un paaugstinātu trombocītu aktivitāti (Welsch, 1997; Liew, 2015). Tomēr cēloņsakarība starp hiperhomocisteinēmiju un trombozi joprojām ir pretrunīga (Ray, 2002; Clarke, 2012).

Starp visiem pacientiem ar brīvā lēvera trombozi desmit pacienti tika identificēti kā MTHFR gēna rs1801133 G/A genotipa nesēji, vairāk nekā pusei (n = 8) uzrādot paaugstinātu seruma homocisteīna līmeni (> 12 μmol/L). Trīs pacienti uzrādīja izolētus MTHFR gēna variantus, turklāt viens pacients piedzīvoja arteriālu brīvā lēvera trombozi un diviem attīstījās tromboze venozajā gultnē. Šis sadalījums, kas ietver gan arteriālo, gan venozos asinsrites, saskan ar literatūru, kas liecina, ka hiperhomocisteinēmija atšķirībā no klasiskajām venozajām trombofilijām var predisponēt trombozi abās asinsvadu gultnēs (Falcon, 1994; Pathare, 2004).

MTHFR C677T klīniskās sekas mikroķirurģiskajā praksē joprojām ir nenoteiktas. Ņemot vērā varianta augsto populācijas prevalenci (aptuveni ceturtdaļa eiropiešu nēsā vismaz vienu varianta alēli), spēcīgu trombotisko asociāciju neesamību mūsu pētījumā un konfliktējošus pierādījumus no plašākas literatūras, rutīnas MTHFR genotipēšanu pašlaik nevar ieteikt preoperatīvai riska novērtēšanai. Turpmākajiem pētījumiem nepieciešams koncentrēties uz to, vai homocisteīnu pazeminošas intervences uzlabo mikroķirurģiskus rezultātus ģenētiski vai bioķīmiski augsta riska pacientiem, lai arī kardiovaskulāro pētījumu negatīvie rezultāti liecina par ierobežotu potenciālu ieguvumu (Bona, 2006).

3.3. Koagulācijas parametri

Klīniski vērtīgākais konstatējums ir sakarība starp samazinātu APCR un palielinātu trombozes varbūtību (izredžu attiecība 2,45, p = 0,043). Pacientiem ar trombozi APCR mediāna bija 1,83, bet pacientiem bez komplikācijām 2,01 (abos gadījumos zem kritiskās 2,0 robežas), pirmsoperācijas APCR skrīnings varētu būt lietderīgs instruments augsta riska indivīdu atpazīšanai, kam nepieciešama mērķtiecīgāka tromboprolifakse vai mērķēta pēcoperācijas

uzraudzība (Dahlbäck, 1993; Castoldi, 2010). APCR samazinājuma korelācija ar lēvera trombozes risku, kas ir neatkarīga no V faktora Leidena ģenētiskā profila, demonstrē, ka APCR mērījums ir jutīgāks rādītājs nekā genotipēšana vien. Būtiski, ka APCR vērtību var modificēt arī daudzi iegūti faktori – gan grūtniecība, gan orālā kontracepcija, gan sistēmisks iekaisums, gan VIII faktora līmeņa paaugstināšanās (Castoldi, 2010).

Rutīnas APCR skrīninga klīniskā lietderība mikroķirurģiskajiem pacientiem prasa rūpīgu izvērtējumu. Lai arī 2,45 reizes palielinātais trombozes risks, kas saistīts ar APCR < 2,0, šķiet būtisks, absolūtais riska pieaugums ir jāievieto vispārējā 9 % trombozes līmenī, kas novērots šajā kohortā. Pašreizējās vienprātības neesamība par tromboprolifakses protokoliem mikroķirurģijā (Khansa, 2013; Pan, 2014) vēl vairāk sarežģī APCR atklājumu pārvēršanu klīniskajā praksē, jo optimālas vadības stratēģijas identificētiem augsta riska pacientiem joprojām nav stingri definētas.

Nozīmīgu asociāciju neesamība starp trombozes risku un citiem koagulācijas parametriem, ieskaitot protrombīna laiku, fibrinogēna koncentrāciju un antitrombīna aktivitāti, izceļ sarežģīto un multifaktoriālo mikroķirurģiskās trombozes dabu. Šis atklājums kontrastē ar labi noteiktām asociācijām starp šiem parametriem un sistēmisku venozo trombemboliju, kur paaugstināts fibrinogēna līmenis (Rosendaal, 2009), samazināta antitrombīna aktivitāte (Patnaik, 2008) un protrombīna paaugstināšanās (Poort, 1996) ir atzīti riska faktori.

Atšķirībā no spontānas venozās trombembolijas, kur sistēmiska hiperkoagulabilitāte ieņem centrālo lomu kā klasiskā Virhova triāde – hiperkoagulabilitāte, endotēlija trauma un stāze (Kumar, 2010) –, mikroķirurģiska tromboze var būt vairāk atkarīga no lokāliem faktoriem anastomozes vietā. Tie ietver tehnisko asinsvada aproksimācijas precizitāti, anastomotisko spriegumu, asinsvada sienas traumu, kalibra neatbilstību starp donora un recipienta asinsvadiem un unikālo hemodinamisko vidi, ko rada ķirurģiskā rekonstrukcija (Khouri, 1998; Pattani, 2010). Mazs asinsvada kalibrs, kas ir tipiski mikroķirurģiskajām anastomozēm (1–3 mm), rada plūsmas apstākļus, kas atšķiras no lielākām venozām sistēmām, potenciāli mazinot sistēmisku koagulācijas izmaiņu ietekmi, vienlaikus pastiprinot lokālu mehānisku un hemodinamisku faktoru nozīmi.

Attiecībā uz fibrinogēna izmaiņām mūsu pētījumā vērojama izteikta asociācija starp FG rs2066865 un plazmas fibrinogēna līmeņiem. Lai gan A/A genotipa nesēji uzrādīja būtiski paaugstinātas fibrinogēna koncentrācijas ($5,57 \pm 1,81$ g/L pret $4,08 \pm 1,32$ g/L G/G nesējiem, $p = 0,004$), šī ģenētiskā predispozīcija hiperfibrinogēmijai neizraisīja statistiski nozīmīgus klīniskās trombozes riska pieaugumus. Fibrinogēns eksistē gan kā substrāts trombīnam (ģenerējot fibrīnu), gan kā akūtās fāzes reaktants, kas reaģē uz ķirurģisko stresu (van Hyleckama Vlieg, 2003). Visi pacienti tika pakļauti ķirurģijai ar saistītām iekaisuma reakcijām, potenciāli

ar iespējamu paaugstinātu fibrinogēna līmeni un aizēnojot sākotnējās ģenētiskās atšķirības. Mērījumu laiks (preoperatīvi) var neuztvert maksimālo fibrinogēna paaugstināšanos, kas notiek kritiskajā postoperatīvajā periodā, kad attīstās vairums trombožu (Schlimp, 2016; Tang, 2010).

Asociācija starp homocisteīna paaugstināšanos ($> 12 \mu\text{mol/L}$) un trombozes risku ($\text{OR} = 0,35, p = 0,029$) ir atrade, kas prasa rūpīgu interpretāciju un validāciju. Šis novērojums pretējs noteiktajai literatūrai, kas saista hiperhomocisteinēmiju gan ar arteriāliem, gan venoziem trombotiskiem notikumiem (Falcon, 1994; Pathare, 2004; Liew, 2015), lai arī metaanalīzēs ir konstatēti konfliktējoši secinājumi par šīs attiecības stiprumu un cēloņsakarību (Ray, 2002; Clarke, 2012). Nelielais izlases lielums homocisteīna mērījumiem trombozes pacientiem ($n = 14$) rada būtisku potenciālu nejaušiem atklājumiem un I tipa kļūdai. MTHFR C677T polimorfisms, lai arī asociēts ar paaugstinātu homocisteīnu dažās populācijās, demonstrē mainīgu penetranci, kas ir atkarīga no folātu stāvokļa (Klerk, 2002; Rozen, 1997).

Rezultāti uzrāda, ka visaptverošs trombofilijas skrīnings ārpus APCR mērījuma var sniegt ierobežotu klīnisku vērtību mikroķirurģisku trombotisku komplikāciju paredzēšanai kopējā pacientu populācijā. Tas apstrīd intuitīvo plašas preoperatīvas koagulācijas testēšanas pieeju, ko aizstāv daži autori (Biban, 2019; Pannucci, 2015), un atbalsta selektīvākas, mērķētākas skrīninga stratēģijas. Mūsu kombinētā koagulācijā balstītā prognozējošā modeļa vājā diskriminācijas jauda ($\text{AUC} = 0,65$) pastiprina šo secinājumu, norādot, ka laboratorijas parametri vieni paši nav adekvāti lēvera panākuma noteicēji.

3.4. Prognozējošais modelis un klīniskā lietderība

Visu trīs prognozējošo modeļu ($\text{AUC}: 0,61\text{--}0,69$) salīdzinoši vājā diskriminācijas jauda izceļ lēvera trombozes multifaktoriālo raksturu. Tikai ģenētiskais modelis darbojās nedaudz labāk nekā nejaušība ($\text{AUC} = 0,61$), kamēr tikai koagulācijas modelis uzrādīja pieticīgu uzlabojumu ($\text{AUC} = 0,65$). Kombinētais modelis, kas iekļauj ģenētiskos, koagulācijas un jaucošus faktorus, sasniedza augstāko, bet joprojām ierobežotu diskriminācijas jaudu ($\text{AUC} = 0,69$). Šie atklājumi liecina, ka trombotiskās komplikācijas mikrovaskulārajā ķirurģijā izriet no sarežģītām mijiedarbībām starp vairākiem faktoriem, kas pārsniedz ģenētisko predispozīciju un laboratorijas parametrus. Tehniskie faktori, ķirurģiskā pieredze, izveidotās anastomozes un asinsvada kvalitāte, un postoperatīvā vadība, visticamāk, nosaka rezultātu.

3.5. Pētījuma ierobežojumi un metodoloģiskie apsvērumi

Pētījuma rezultātu interpretācijā nepieciešams atzīmēt vairākus būtiskus metodiskus ierobežojumus. Pirmkārt, salīdzinoši mazais pētījuma dalībnieku skaits ($n = 155$) ierobežo statistisko spēju atklāt pieticīgus ģenētiskos efektus, jo īpaši attiecībā uz retiemi variantiem. Tikai 14 trombotisko komplikāciju gadījumi nozīmē, ka pētījumam trūkst adekvātas jaudas

noteikt pat mērenu ģenētisko ietekmi, kas sevišķi attiecas uz reti sastopamiem variantiem, tādiem kā V faktora Leidens ($n = 7$ nesēji) (Rosendaal, 1995; Kujovich, 2011) un protrombīna G20210A ($n = 3$ nesēji). Otrkārt, koagulācijas parametru mērījumu laiks attiecībā pret ķirurģisko iejaukšanos varēja būt ietekmējošs faktors. Posttraumatiskā akūtās fāzes reakcija var ievērojami izmainīt koagulācijas sistēmas rādītājus, tādējādi potenciāli aizklājot primāros ģenētiskos efektus (van Hylckama Vlieg, 2003; Schlimp, 2016). Trešais aspekts saistīts ar to, ka 40 % lēveru veiksmīgas glābšanas procedūru pēc aizkavētas komplikāciju atklāšanas norāda uz unificētu uzraudzības protokolu būtisku nepieciešamību. Lai gan visas procedūras tika realizētas saskaņā ar standartizētiem protokoliem un tās veica pieredzējuši mikroķirurgi, tehniskie ķirurģiskie mainīgie lielumi turpina būt nozīmīgs limitējošs faktors (Vanags, 2020). Būtiski atzīmēt, ka mūsu pētījuma kohorta ($n = 155$, pacienti no 2016. līdz 2019. gadam) laika un vietas ziņā (Latvijas Mikroķirurģijas centrs) pārklājas ar J. Stepanova (2025) promocijas darbā analizēto kohortu ($n = 103$, traumu pacienti no 2016. līdz 2019. gadam). Lai gan mūsu pētījums bija fokusēts uz plašāku etioloģiju (onkoloģija, osteomielīts, traumas) un ģenētiskiem faktoriem, Stepanova darbā uzmanība koncentrēta uz traumatoloģiskiem pacientiem un ķirurģisko faktoru, kā arī tromboelastometrijas (RTE) nozīmi. Viņa pētījums pārliecinoši parādīja, ka operācijas ilgums (> 240 min.) bija galvenais trombozes riska faktors pacientiem, kuriem operācija veikta drīz pēc traumas, savukārt vēlīnās rekonstrukcijās nozīmīgākas bija pacienta blakusslimības un RTE noteikta hiperkoagulācija (Stepanovs, 2025). Šis konteksts ir kritiski svarīgs mūsu rezultātu interpretācijai. Nākotnes pētījumos būtu nepieciešama integrēta analīze, kas apvienotu gan ģenētiskos, gan detalizētus ķirurģiskos un RTE datus no vienas un tās pašas pacientu kohortas, lai izveidotu visaptverošu un klīniski lietojamu riska prognozēšanas modeli. Nobeigumā, ierobežojot pētījumu ar noteiktu ģenētisko polimorfismu kopumu, visticamāk, netika identificēti citi būtiski ģenētiskie varianti vai epigenētiskie faktori, kuri ietekmē trombotisko risku, kas apstiprina venozo tromboemboliju raksturu kā poliģenētisku un daudzfaktoriālu slimību (Dahlbäck, 2005).

3.6. Turpmākie pētījumi

Kaut arī pētījumā netika konstatētas izteiktas ģenētiskās asociācijas ar trombotisko risku mikrovaskulārajā ķirurģijā, iegūtie rezultāti sniedz nozīmīgu pamatu individualizētu stratēģiju attīstībai šajā jomā. Fibrinogēna ģenētiskā varianta loma plazmas fibrinogēna līmeņu regulācijā norāda uz potenciāliem terapeitiskiem mērķiem. Turpmākiem daudzcentru pētījumiem ar lielāku dalībnieku skaitu būtu jāvalidē šie atklājumi un jānodrošina pietiekama statistiskā jauda arī nelielu ģenētisko efektu identificēšanai. Genoma līmeņa asociācijas pētījumi spētu atklāt

jaunus ģenētiskos marķierus, kas ir saistīti ar trombotiskām komplikācijām mikrovaskulārajā ķirurģijā (de Haan, 2012).

3.7. Pētījuma stiprās puses un ierobežojumi

Pētījumu raksturo vairākas stiprās puses metodoloģijas izvēlē, kas paaugstina pētījuma secinājumu ticamību un nozīmību rekonstruktīvās mikroķirurģijas jomā.

Nozīmīgākā ir prospektīva šķērsriezuma pētījuma dizaina izvēle. Šāda pieeja nodrošina sistemātisku un vienlaicīgu datu vākšanu, tādējādi samazinot novirzi un datu nevienādīgumu, kas bieži negatīvi ietekmē retrospektīvu analīzi. Iekļaujot pacientus secīgi, kad tiek veikta ķirurģiska iejaukšanās, tika nodrošināta konsekventa pētījuma protokola piemērošana, kas uzlabo secinājumu iekšējo pamatotību.

Pētījuma ieguvums ir arī visaptveroša un standartizēta datu vākšanas stratēģija. Protokols integrēja daudzpusīgu pieeju, ieskaitot standartizētas pacientu intervijas, detalizētu genotipēšanu pieciem specifiskiem un klīniski nozīmīgiem VNV, kā arī pirmsoperācijas koagulācijas parametru paneļa novērtējumu.

Standartizētu klīnisko protokolu ieviešana anestēzijai, intraoperatīvai uzraudzībai un pēcoperācijas aprūpei ir vēl viena nozīmīga stiprā puse. Kontrolējot kritiskos perioperatīvos mainīgos, tika efektīvi samazināta potenciālo jaucējfaktoru ietekme.

Visbeidzot, pētījums sniedz klīniski nozīmīgu ieguldījumu ar saviem negatīvajiem atklājumiem. Secinājums, ka mērķa viena nukleotīda varianta un standarta koagulācijas parametri nav uzticami atsevišķi trombozes prognozētāji, pats par sevi ir vērtīgs zinātnisks rezultāts. Mūsu pētījums pārliecinoši argumentē par pētījumu fokusa maiņu no šaura marķieru klāsta uz sarežģītākiem daudzfaktoru vai poliģenētiskiem riska modeļiem.

Neskatoties uz stiprajām pusēm, tiek atzīti vairāki ierobežojumi, kas jāņem vērā, interpretējot rezultātus.

Nozīmīgākais ierobežojums ir salīdzinoši mazās izlases apjoms. Ar 155 pacientiem pētījumam nebija pietiekamas statistiskās jaudas, lai atklātu nelielas ģenētiskās ietekmes, īpaši reti variantiem, piemēram, V faktora Leidena mutācijai. Lielāka daudzcentru kohorta būtu nepieciešama, lai sasniegtu statistisko jaudu, kas vajadzīga, lai pārliecinoši izslēgtu retāko, bet potenciāli nozīmīgo polimorfismu ietekmi.

Turklāt pētījumu ierobežo potenciāli klīniskie mainīgie. Autore norāda, ka koagulācijas parametru analīzes laiks attiecībā pret ķirurģisko iejaukšanos ir kritisks; akūtās fāzes iekaisuma reakcija uz operāciju var būtiski mainīt koagulācijas marķierus, potenciāli maskējot ģenētiskās ietekmes sākotnējo līmeni. Turklāt analīzē netika iekļauti detalizēti perioperatīvie

antikoagulācijas protokoli, kas var atšķirties starp pacientiem un ir nozīmīgs neizmērīts jaucējfaktors.

Būtisks ierobežojums ir tehnisko faktoru nekvantatīvā uzskaitē. Autore norāda, ka tehniskie ķirurģiskie mainīgie ir nozīmīgs limitējošs faktors. Lai arī ķirurģiju veica pieredzējuši mikroķirurgi, variācijas operācijas tehnikā, asinsvadu kvalitātē un anastomotiskajā spriegumā ir kritiski panākumu faktori, kas netika objektīvi izmērīti. Šie faktori rada mainīgumu, ko nevar skaidrot tikai ar ģenētiskiem vai hematoloģiskiem datiem.

Pētījuma sašaurinātais ģenētiskais tvērumš (pieci polimorfismi) nozīmē, ka citi būtiski varianti, gēnu mijiedarbības vai epigenētiskie faktori varēja netikt identificēti. Tas pamato nepieciešamību turpmākos pētījumos izmantot plašākas genomiskās pieejas, piemēram, poliģenētiskos riska indeksus, lai iegūtu pilnīgāku riska novērtējumu.

Kā viena centra pētījumam Latvijā rezultātiem var būt ierobežota vispārināmība. Pacientu populācijas, klīniskie protokoli un vides faktori var atšķirties starp centriem un reģioniem, tāpēc atklājumi var nebūt tieši piemērojami citiem kontekstiem bez papildu validācijas.

Secinājumi

1. Tika identificēti pacienti ar definētajiem viena nukleotīda variantiem: rs6025 *FV* gēnā (2,1 %), rs1799963 *FII* gēnā (1,3 %), rs2066865 *FGG* gēnā (22 %), rs2227589 *SERPINC1* gēnā (9,7 %) un rs1801133 *MTHFR* gēnā (26,5 %). Variantu biežumi uzrādīja atbilstību Eiropas populācijas sadalījumiem (izmaiņu koeficients 0,91–1,33), apliecinot korektu populācijas izlasi bez atlasē novirzes.
2. Neviens individuāls ģenētiskais variants neuzrādīja statistiski nozīmīgu asociāciju ar mikrovaskulārā brīvā lēvera trombozes incidenci (visi $p > 0,05$). Šis negatīvais atradums ir zinātniski nozīmīgs secinājums, kas liecina, ka šo biežo polimorfismu radītais trombotiskais risks mikroķirurģijas kontekstā klīniski izpaužas ierobežotā mērā, jo dominējošā loma var piederēt lokāliem hemodinamiskajiem, tehniskajiem un iegūtajiem faktoriem.
3. No iegūtajiem koagulācijas parametriem vienīgi aktivētā C proteīna rezistence zem 2,0 demonstrēja statistiski nozīmīgu asociāciju ar trombozi (OR = 2,45, 95 % TI: 1,02–5,89, $p = 0,043$). Standarta koagulācijas parametri, tostarp protrombīna laiks, fibrinogēna koncentrācija un antitrombīna aktivitāte, neuzrādīja statistiski nozīmīgas asociācijas (visi $p > 0,05$).
4. Integrētie riska stratifikācijas modeļi, kas ietver ģenētiskos variantus, koagulācijas parametrus un jaucējfaktoros, demonstrēja nepietiekamu diskriminējošo spēju (AUC: 0,61–0,69), lai tos lietotu trombozes riska paredzēšanai.

Priekšlikumi

Šajā pētījumā identificētie ierobežojumi norāda uz vairākām būtiskām pētniecības prioritātēm:

1. Nepieciešamība pēc daudzcentru prospektīva pētījuma ar standartizētiem protokoliem, lai validētu atklājumus un nodrošinātu adekvātu statistisko jaudu mērenu ģenētisko efektu noteikšanai, īpaši retākiem ģenētiskajiem variantiem, piemēram, V faktora Leidena.
2. Lietderīgi apsvērt longitudinālu pētījumu nepieciešamību, lai izsekotu pacientus laika gaitā un novērtētu ģenētisko un iegūto faktoru ilgtermiņa ietekmi uz trombotiskajiem rezultātiem un kopējo lēvera panākumu rādītājiem.
3. Ģenētisko variantu, kas ietekmē antikoagulantu medikamentu metabolismu un efektivitāti, izpēte varētu vadīt personalizētas antikoagulācijas stratēģijas augsta riska pacientiem.
4. Izstrādātie prognozēšanas modeļi uzrādīja nepietiekamu diskriminācijas spēju (AUC 0,61–0,69), tādēļ mašīnmācīšanās pieeju izmantošana prognozēšanas modeļu izstrādē varētu precīzāk atspoguļot sarežģītās mijiedarbības starp ģenētiskajiem, klīniskajiem, tehniskajiem un laboratoriskajiem faktoriem nekā tradicionālās statistiskās metodes.
5. Turpmākajiem pētījumiem būtu jāapsver arī ģenētiskās testēšanas ētiskās sekas ķirurģiskā kontekstā, ieskaitot pacienta piekrišanu, ģenētisko diskrimināciju un ģenētiskā riska informācijas psiholoģisko ietekmi uz pacientiem un viņu ģimenēm.

Lai gan pētījums neuzrādīja spēcīgas ģenētiskās asociācijas ar trombotiskām komplikācijām, tas uzsver turpmāku pētījumu nozīmi faktoriem, kas nosaka mikrovaskulārās ķirurģijas rezultātus. Personalizētās medicīnas mērķa sasniegšana rekonstruktīvajā ķirurģijā joprojām ir nozīmīgs mērķis, lai arī tas prasa visaptverošāku pieeju, ne tikai izolētu ģenētisku testēšanu.

Publikāciju, ziņojumu saraksts par promocijas darba tēmu

Publikācijas:

1. Drizlionoka, K., Zariņš, J., Ozoliņa, A., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2019. Polymorphism rs2066865 in the Fibrinogen Gamma Chain (FGG) gene increases plasma fibrinogen concentration and is associated with an increased microvascular thrombosis rate. *Medicina*, 55, 563
2. Ozoliņa, A., Vanags, I., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2021. Inherited Thrombophilias in Thrombosis Advancement in Microvascular Flap Surgery. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. Vol. 75, No. 2 (731), 113–120–567.

Ziņojumi un tēzes:

1. Drizlionoka, K., Stepanovs, J., Ozoliņa, A., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2019. Markers for thrombosis prediction in free flap surgery. Euroanaesthesia, European Congress of European Society of Anaesthesiology, Vienna, Austria, 01.–03. June 2019.
2. Drizlionoka, K., Stepanovs, J., Ozoliņa, A., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2019. Assessment of rotational thromboelastometry and standard coagulation profile in predicting thrombosis in microvascular flap surgery. Rīga Stradiņš University international conference on medical and health care sciences. 04.–05. April 2019. Riga, Latvia. Abstract Book 2019, 433
3. Drizlionoka, K., Stepanovs, J., Krustiņš, L., Ozoliņa, A., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2018. The association of hereditary thrombophilia with clinically relevant hypercoagulation state and free flap thrombosis in microvascular surgery. Congress of International Society of Thrombosis and Haemostasis. ISTH SSC Dublin, Ireland, 17.–21. July 2018.
4. Drizlionoka, K., Ozoliņa, A., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2018. Plasma fibrinogens increase due to polymorphism rs2066865 in FGG gene as a risk factor for thrombosis in microvascular surgery. Euroanaesthesia, Congress of European Society of Anaesthesiology, Copenhagen, Denmark, 02.–04. June 2018.
5. Drizlionoka, K., Stepanovs, J., Ozoliņa, A., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2018. The association of increased plasma fibrinogen concentration due to polymorphism in FGG gene with free flap thrombosis in microvascular surgery. Rīga Stradiņš University Scientific Congress 16.–17. March 2018, Rīga, Latvia. [https://www.rsu.lv/sites/default/files/imce/Zinātnes %20departaments/2018/RSU_zinatnis](https://www.rsu.lv/sites/default/files/imce/Zinātnes%20departaments/2018/RSU_zinatnis)
6. Drizlionoka, K., Stepanovs, J., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2017. Does inherited thrombophilia contributes thrombosis in microvascular free flap surgery: a pilot study. Euroanaesthesia, Congress of European Society of Anaesthesiology. Geneva, Switzerland, 03.–05. June 2017.
7. Drizlionoka, K., Stepanovs, J., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2017. Genetic contribution towards thrombosis in free flap surgery: a pilot study. Rīga Stradiņš University Scientific Congress Rīga, Latvia, 5 April 2017, Abstracts, http://www.rsu.lv/images/stories/zk_2017/genetic_contribution_thrombosis_free_flap_surgery.pdf
8. Drizlionoka, K., Stepanovs, J., Ņikitina-Zaķe, L., Mamaja, B. 2016. The role of inherited thrombophilia in patients undergone free flap surgery: a systemic review of the literature. 8th International Baltic Congress of Anaesthesiology and Intensive Care. 1–3 December 2016. Tallinn, Estonia.

Literatūras un avotu saraksts

1. Adams, J., Charlton, P. (2003). Anaesthesia for microvascular free tissue transfer. *British Journal of Anaesthesia*, 3(2), 33–37.
2. Ahmad, S.S., London, F. S., Walsh, P.N. (2003). The assembly of the factor X-activating complex on activated human platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(1), 48–59.
3. Autin, L., Miteva, M. A., Lee, W. H., Mertens, K., Radtke, K. P., Villoutreix, B. O. (2005). Molecular models of the procoagulant factor VIIIa-factor IXa complex. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(9), 2044–2056.
4. Bertina, R. M. (1998). The prothrombin 20210 G to A variation and thrombosis. *Current Opinion in Hematology*, 5(5), 339–342.
5. Biban, J. A., Atmodiwirjo, P. (2019). Free flap thrombosis in patients with hypercoagulability: a systematic review. *Archives of Plastic Surgery*, 46(6), 572–579.
6. Bonaa, K., Njolstad, I., Ueland, P., Schirmer, H., Tverdal, A., Steigen, T. (2006). Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 354(15), 1578–1588.
7. Bonde, C., Khorasani, H., Hoejvig, J., Kehlet, H. (2017). Cyclooxygenase-2 inhibitors and free flap complications after autologous breast reconstruction: a retrospective cohort study. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 70(11), 1543–1546.
8. Botto, L., Yang, Q. (2000). 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review, *American Journal of Epidemiology*, 151(9), 862–877.
9. Bowman, K. G., Carty, M. J. (2011). Flap complications and thrombophilia: an evidence-based model and cost analysis for preoperative screening. *Open Access Journal of Plastic Surgery*, 11, 32–45.
10. Broze, G. J., Lange, G. W., Duffin, K. L., MacPhail, L. (1994). Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 5(4), 551–559.
11. Bruegger, D., Bauer, A., Finsterer, U., Bernasconi, P., Kreimeier, U., Christ, F. (2002). Microvascular changes during anaesthesia: sevoflurane compared with propofol. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 46(5), 481–487.
12. Brummel-Ziedins, K., Mann, K. G. (2013). Molecular basis of blood coagulation, in Hoffman, R. et al. (eds.) *Hematology: Basic Principles and Practice*. 6th edn. Philadelphia: Elsevier, ch. 128, 1821–1841.
13. Castoldi, E., Rosing, J. (2010). APC resistance: biological basis and acquired influences. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(3), 445–453.
14. Chalmers, A., Turner, M. W., Anand, R. (2012). Cardiac output monitoring to guide fluid replacement in head and neck microvascular free flap surgery – what is current practice in the UK? *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 50(6), 500–503.
15. Chen, C. M., Ashjian, P., Disa, J. J., Cordeiro, P. G., Pusic, A. L., Mehrara, B. J. (2008). Is the use of intraoperative heparin safe? *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121(3), 49e–53e.
16. Clarke, R., Bennett, D. A., Parish, S., Verhoef, P., Dötsch-Klerk, M., Lathrop, M. MTHFR Studies Collaborative Group. (2012). Homocysteine and coronary heart disease: meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. *PLoS Medicine*, 9(2), e1001177.
17. Collen, D., Lijnen, H. R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*, 78(12), 3114–3124.
18. Dahlbäck, B., Carlsson, M., Svensson, P. J. (1993). Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(3), 1004–1008.

19. Dahlbäck, B. (2005). Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine*, 257(3), 209–223.
20. Davie, E. W., Fujikawa, K., Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30(43), 10363–10370.
21. de Haan, H. G., Bezemer, I. D., Doggen, C. J., Reitsma, P. H., Rosendaal, F. R., le Cessie, S. (2012). Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood*, 120(3), 656–663.
22. de Willige, S. U., de Visser, M. C., Houwing-Duistermaat, J. J., Rosendaal, F. R., Vos, H.L., Bertina, R.M. (2005). Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen γ' levels. *Blood*, 106(13), 4176–4183.
23. Dizon-Towson, D., Nelson, L., Jang, H. (1997). The incidence of the factor V Leiden mutation in an obstetric population and its relationship to deep vein thrombosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 176(4), 883–886.
24. Doh, G. H., Kim, B., Lee, D. Y., Yoon, J. S., Lim, S. A., Han, Y. S., Eo, S. R. (2021). Hemodynamic principles in free tissue transfer: vascular changes at the anastomosis site. *Archives of Hand and Microsurgery*, 26(4), 285–292.
25. Dort, J. C., Farwell, D. G., Findlay, M., Huber, G. F., Kerr, P., Shea-Budgell, M. A., Simon, C., Uppington, J., Zygogianni, A., Andresen, E., Breckenridge, A. (2017). Optimal perioperative care in major head and neck cancer surgery with free flap reconstruction: a consensus review and recommendations from the enhanced recovery after surgery society. *JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery*, 143(3), 292–303.
26. Dunn, J. O. C., Mythen, M. G., Grocott, M. P. (2016). Physiology of oxygen transport. *BJA Education*, 16(10), 341–348.
27. Eber, B., Schumacher, M. (1993). Fibrinogen: its role in the haemostatic regulation of atherosclerosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 19(2), 104–107.
28. Edgington, T. S., Mackman, N., Brand, K., Ruf, W. (1991). The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thrombosis and Haemostasis*, 66(1), 67–79.
29. El-Galaly, T. C., Severinsen, M., Overvad, K., Steffensen, R., Vistisen, A. K., Tjønneland, A., Kristensen, S.R. (2013). Single nucleotide polymorphisms and the risk of venous thrombosis: results from a Danish case-cohort study. *British Journal of Haematology*, 160(6), 838–841.
30. Esmon, C. T. (2006). Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32(1), 49–60.
31. Falcon, C. R., Cattaneo, M., Panzeri, D., Martinelli, I., Mannucci, P. M. (1994). High prevalence of hyperhomocystinemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14(7), 1080–1083.
32. Farrell, D. H. (2012). γ' Fibrinogen as a novel marker of thrombotic disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 50(11), 1903–1909.
33. Friedman, T., Coon, D. B., Michaels, J. V., Bontempo, F., Young, V. L., Clavijo, J. A., Rubin, J. P. (2010). Hereditary coagulopathies: practical diagnosis and management for the plastic surgeon. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 125(5), 1544–1552.
34. Fu-Chan, W., Mardini, S. (2017). Classification of flaps, in *Flaps and Reconstructive Surgery*. 2nd edn. Philadelphia: Elsevier, ch. 2.
35. Furie, B., Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*, 359(9), 938–949.
36. Goyette, P., Pai, A., Milos, R., Frosst, P., Tran, P., Chen, Z., Chan, M., Rozen, R. (1998). Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, 9(8), 652–656.
37. Grünbacher, G., Weger, W., Marx-Neuhold, E., Pilger, E., Köppel, H., Wascher, T., März, W., Renner, W. (2007). The fibrinogen gamma (FGG) 10034C>T polymorphism is associated with venous thrombosis. *Thrombosis Research*, 121(1), 33–36.

38. Hagau, N., Longrois, D. (2008). Anaesthesia for free vascularized tissue transfer. *Microsurgery*, 28(3), 161–167.
39. Hart, C., Rott, H., Heimerl, S., Linnemann, B. (2022). Management of antithrombin deficiency in pregnancy. *Hamostaseologie*, 42(5), 320–329.
40. Hill, J. B., Patel, A., Del Corral, G. A. (2012). Preoperative anemia predicts thrombosis and free flap failure in microvascular reconstruction. *Annals of Plastic Surgery*, 69(4), 364–367.
41. Hosein, R. C., Cornejo, A., Wang, H. T. (2016). Postoperative monitoring of free flap reconstruction: a comparison of external Doppler ultrasonography and the implantable Doppler probe. *Plastic Surgery*, 24(1), 11–19.
42. Jadaon, M. M. (2011). Epidemiology of prothrombin G20210A mutation in the Mediterranean region. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 3(1), e2011037.
43. Jiang, J., Liu, K., Zou, J., Ma, H., Yang, H., Zhang, X., Jiao, Y. (2017). Associations between polymorphisms in coagulation-related genes and venous thromboembolism. *Medicine (Baltimore)*, 96(13), e6537.
44. Joshi, G. P., Kehlet, H., Lobo, D. N. (2025). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the perioperative period: current controversies and concerns. *British Journal of Anaesthesia*, 134(2), 294–296.
45. Kamikubo, Y., Mendolicchio, G. L., Zampolli, A., Marchese, P., Rothmeier, A. S., Orje, J. N., Gale, A. J., Krishnaswamy, S., Gruber, A., Østergaard, H., Petersen, L. C., Ruf, W., Ruggeri, Z. M. (2017). Selective factor VIII activation by the tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex. *Blood*, 130(14), 1661–1670.
46. Khansa, I., Colakoglu, S., Curtis, M. S. (2011). Postoperative monitoring and management of the reconstructive microsurgery patient. *Seminars in Plastic Surgery*, 27(1), 62–69.
47. Khansa, I., Colakoglu, S., Haider, S., Craft, R., Curtis, M. S. (2013). Evidence for pharmacologic thromboprophylaxis in microvascular breast reconstruction. *Microsurgery*, 33(5), 338–343.
48. Khouri, R. K., Cooley, B. C., Kunselman, A. R., Landis, R. J., Yeramian, P., Ingram, D., Natarajan, N., Benes, C. O., Wallemark, C. (1998). A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 102(3), 711–721.
49. Kim, M. J., Woo, K. J., Park, B. Y. (2018). Effects of transfusion on free flap survival: searching for an optimal hemoglobin threshold for transfusion. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 34(8), 610–615.
50. Kim, P. Y., Tieu, L. D., Stafford, A. R., Fredenburgh, J. C., Weitz, J. I. (2012). A high affinity interaction of plasminogen with fibrin is not essential for efficient activation by tissue-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4652–4661.
51. Klerk, M., Verhoef, P., Clarke, R., Blom, H. J., Kok, F. J., Schouten, E. G., MTHFR Studies Collaboration Group. (2002). MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*, 288(16), 2023–2031.
52. Koeppen, B. M., Stanton, B. A. (2017). *Berne & Levy Physiology*. 7th edn. Philadelphia: Elsevier, ch. 17, 386–410.
53. Kohlert, S., Quimby, A. E., Saman, M. (2019). Postoperative free-flap monitoring techniques. *Seminars in Plastic Surgery*, 33(1), 13–16.
54. Kujovich, J. L. (2011). Factor V Leiden thrombophilia. *Genetics in Medicine*, 13(1), 1–16.
55. Kumar, D. R., Hanlin, E., Glurich, I., Mazza, J. J., Yale, S. H. (2010). Virchow's contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology. *Clinical Medicine & Research*, 8(3–4), 168–172.
56. Kumar, R., Dawson, J. E., Chan, A. K., Forman-Kay, J. D., Kahr, W. H., Williams, S. (2015). c.1058C>T variant in the *SERPINC1* gene is pathogenic for antithrombin deficiency. *British Journal of Haematology*, 170(1), 123–125.

57. Kuri, M., Nakagawa, M., Tanaka, H., Hasuo, S., Kishi, Y. (2005). Determination of the duration of perioperative smoking cessation to improve wound healing after head and neck surgery. *Anesthesiology*, 102(5), 892–896.
58. Larsen, J. B. and Hvas, A. M. (2020). Fibrin clot formation and lysis in plasma. *Methods and Protocols*, 3(4), 67.
59. László, I., Janovszky, Á. and Lovas, A. (2019). Effects of goal-directed crystalloid vs. colloid fluid therapy on microcirculation during free flap surgery: a randomised clinical trial. *European Journal of Anaesthesiology*, 36(8), 592–604.
60. Lawson, J. H., Kalafatis, M., Stram, S. and Mann, K. G. (1994). A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *Journal of Biological Chemistry*, 269(37), 23357–23366.
61. Leung, J. S., Seto, A. and Li, G. K. (2017). Association between preoperative nutritional status and postoperative outcome in head and neck cancer patients. *Nutrition and Cancer*, 69(3), 464–469.
62. Leyte, A., Verbeet, M. P. and Brodniewicz-Proba, T. (1989). The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochemical Journal*, 257(3), 679–683.
63. Liew, S. C. and Gupta, E. D. (2015). Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European Journal of Medical Genetics*, 58(1), 1–10.
64. Lighthall, J. G., Cain, R. and Gidley, P. W. (2013). Increased hematocrit is not associated with decreased free flap failure. *Laryngoscope*, 123(12), 2963–2967.
65. Lindqvist, P. G., Zöller, B. and Dahlbäck, B. (2001). Improved hemoglobin status and reduced menstrual blood loss among female carriers of factor V Leiden – an evolutionary advantage? *Thrombosis and Haemostasis*, 86(4), 1122–1123.
66. Mackie, I. J., Kitchen, S., Machin, S. J., Lowe, G. D., Haemostasis, Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. (2003). Guidelines on fibrinogen assays. *British Journal of Haematology*, 121(3), 396–404.
67. Mak, Q. H., Chan, H. T., Irwin, M. G. (2020). Anaesthesia for plastic and reconstructive surgery. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 22(1), 64–69.
68. Menu, P., Bleeker, W., Longrois, D., Caron, A., Faivre-Fiorina, B., Muller, S., Labrude, P., Stoltz, J. F. (2000). In vivo effects of Hb solutions on blood viscosity and rheologic behavior of RBCs: comparison with clinically used volume expanders. *Transfusion*, 40(9), 1095–1103.
69. Moellhoff, N., Broer, P. N., Heidekrueger, P. I., Ninkovic, M., Ehrl, D. (2021). Impact of intraoperative hypothermia on microsurgical free flap reconstructions. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 37(2), 174–180.
70. Nelsestuen, G. L., Shah, A. M., Harvey, S. B. (2000). Vitamin K-dependent proteins. *Vitamins & Hormones*, 58, 355–389.
71. Neubauer, K., Zieger, B. (2022). Endothelial cells and coagulation. *Cell and Tissue Research*, 387(3), 391–398.
72. O'Reilly, M. S., Pirie-Shepherd, S., Lane, W. S., Folkman, J. (1999). Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*, 285(5435), 1926–1928.
73. Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C. (2008). The vitamin K cycle. *Vitamins & Hormones*, 78, 35–62.
74. Pan, X. L., Chen, G. X., Shao, H. W., Han, C. M., Zhang, L. P., Zhi, L. Z. (2014). Effect of heparin on prevention of flap loss in microsurgical free flap transfer: a meta-analysis. *PLoS One*, 9(4), e95111.
75. Pannucci, C. J., Kovach, S. J., Cuker, A. (2015). Microsurgery and hypercoagulable state: a hematologist perspective. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 135(4), 545–552.

76. Pathare, A., Alkindi, S., Albalushi, T., Bayoumi, R., Dennison, D., Muralitharan, S. (2004). Heterozygous methylene tetrahydrofolate reductase mutation with mild hyperhomocysteinemia associated with deep vein thrombosis. *Clinical and Laboratory Haematology*, 26(2), 143–146.
77. Patnaik, M. M., Moll, S. (2008). Inherited antithrombin deficiency: a review, *Haemophilia*. 14(6), 1229–1239.
78. Pattani, K. M., Byrne, P., Boahene, K. (2010). What makes a good flap go bad? A critical analysis of the literature of intraoperative factors related to free flap failure. *Laryngoscope*, 120(4), 717–723.
79. Pepe, G., Camacho, V. O., Giusti, B., Brunelli, T., Marcucci, R., Attanasio, M. (1998). Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *American Journal of Human Genetics*, 63(3), 917–920.
80. Perry, D. J., Carrell, R. W. (1996). Molecular genetics of human antithrombin deficiency, *Human Mutation*, 7(1), 7–22.
81. Piety, N. Z., Reinhart, W. H., Stutz, J., Shevkoplyas, S. S. (2017). Optimal hematocrit in an artificial microvascular network. *Transfusion*, 57(9), 2257–2266.
82. Pike, R. N., Buckle, A. M., le Bonniec, B. F., Church, F. C. (2005). Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS Journal*, 272(19), 4842–4851.
83. Poort, S. R., Rosendaal, F. R., Reitsma, P. H., Bertina, R. M. (1996). A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 88(10), 3698–3703.
84. Pottinger, B. E., Read, R. C., Paleolog, E. M., Higgins, P. G., Pearson, J. D. (1989). von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thrombosis Research*, 53(4), 387–394.
85. Rahemtullah, A., Van Cott, E. M. (2007). Hypercoagulation testing in ischemic stroke. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 131(6), 890–901.
86. Ray, J. G., Shmorgun, D., Chan, W. S. (2002). Common C677T polymorphism of the methylene tetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 32(2), 51–58.
87. Rees, D., Cox, M., Clegg, J. (1995). World distribution of factor V Leiden. *Lancet*, 346(8983), 1133–1134.
88. Ridker, P. M., Glynn, R., Miletich, J. (1997). Age-specific incidence rates of venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden mutation. *Annals of Internal Medicine*, 126(7), 528–531.
89. Rijken, D. C., Lijnen, H. R. (2009). New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), 4–13.
90. Risman, R. A., Kirby, N. C., Bannish, B. E., Hudson, N. E., Tutwiler, V. (2023). Fibrinolysis: an illustrated review. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 7(2), e100070.
91. Rosendaal, F. R., Koster, T., Vandenbroucke, J. P., Reitsma, P. H. (1995). High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood*, 85(6), 1504–1508.
92. Rosendaal, F. R., Reitsma, P. H. (2009). Genetics of venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(Suppl. 1), 301–304.
93. Roshanov, P. S., Rochweg, B., Patel, A., Salehian, O., Duceppe, E., Belley-Côté, E. P., Guyatt, G. H., Sessler, D. I., Le Manach, Y., Borges, F. K., Tandon, V., Worster, A., Thompson, A., Koshy, M., Devereaux, B., Spencer, F. A., Sanders, R. D., Sloan, E. N., Morley, E. E., Paul, J., Raymer, K. E., Punthakee, Z., Devereaux, P. J. (2017). Withholding versus continuing angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers before noncardiac surgery: an analysis of the vascular events in noncardiac surgery patients cohort evaluation prospective cohort. *Anesthesiology*, 126(1), 16–27.

94. Rozen, R. (1997). Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thrombosis and Haemostasis*, 78(1), 523–526.
95. Sakata, Y., Aoki, N. (1982). Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *Journal of Clinical Investigation*, 69(3), 536–542.
96. Schlimp, C. J., Ponschab, M., Voelckel, W., Treichl, B., Maegele, M., Schöch, H. (2016). Fibrinogen levels in trauma patients during the first seven days after fibrinogen concentrate therapy: a retrospective study. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 24(1), 29.
97. Schmaier, A. H. (2008). Assembly, activation, and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system. *International Immunopharmacology*, 8(2), 161–165.
98. Schmid, M., Giger, R., Nisa, L. (2022). Association of multiprofessional preoperative assessment and information for patients with head and neck cancer with postoperative outcomes. *JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery*, 148(3), 259–267.
99. Scridon, A. (2022). Platelets and their role in hemostasis and thrombosis – from physiology to pathophysiology and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12974.
100. Segers, K., Dahlbäck, B., Nicolaes, G. (2007). Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thrombosis and Haemostasis*, 98(3), 530–542.
101. Serletti, J. M., Higgins, J. P., Moran, S., Orlando, G. S. (2000). Factors affecting outcome in free-tissue transfer in the elderly. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 106(1), 66–70.
102. Simone, B., De Stefano, V., Leoncini, E., Zacho, J., Martinelli, I., Emmerich, J., Rossi, E., Folsom, A. R., Almawi, W. Y., Scarabin, P. Y., Doggen, C. J., Palareti, G., Tenedios, F., Psaty, B. M., Tang, W., Buil, A., Lathrop, M., Souto, J. C., Hingorani, A. D. (2013). Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. *European Journal of Epidemiology*, 28(8), 621–647
103. Slavik, L., Krcova, V., Hlusi, A., Prochazkova, J., Prochazka, M., Ulehlova, J., Indrak, K. (2009). Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics. *Biomedical Papers*, 153(1), 19–26.
104. Smith, S., Travers, R., Morrissey, J. (2015). How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 50(4), 326–336.
105. Sou, W. K., Perng, C. K., Ma, H., Shih, Y. C. (2022). Perioperative myocardial infarction in free flap for head and neck reconstruction. *Annals of Plastic Surgery*, 88(1 Suppl 1), S56–S61.
106. Stanger, O., Herrmann, W., Pietrzik, K., Fowler, B., Giesel, J., Dierkes, J. (2004). Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Zeitschrift für Kardiologie*, 93(6), 439–453.
107. Stepanovs, J. (2025). Thromboelastometry for Microvascular Flap Thrombosis Risk Assessment in Trauma Patients Undergoing Reconstructive Surgery [Doctoral Thesis, Rīga Stradiņš University]. Rīga Stradiņš University. <https://dspace.rsu.lv/jspui/handle/123456789/17143>.
108. Svensson, P., Dahlbäck, B. (1994). Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *New England Journal of Medicine*, 330(8), 517–522.
109. Tang, L., Liu, K., Wang, J., Wang, C., Zhao, P., Liu, J. (2010). High preoperative plasma fibrinogen levels are associated with distant metastasis and impacted prognosis after curative resection in patients with colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 102(4), 428–432
110. van Hylekama Vlieg, A., Rosendaal, F. R. (2003). High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(12), 2677–2678.

111. Vanags, I., Stepanovs, J., Ozolina, A., Mukans, M., Bjertnaes, L. J., Mamaja, B. (2020). Thromboelastometry for assessing risks of free flap thrombosis in patients undergoing microvascular surgery. *Frontiers in Medicine*, 7, 294.
112. Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M., Reitsma, P. H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*, 93(1), 327–358.
113. Vincent, A., Sawhney, R., Ducic, Y. (2019). Perioperative care of free flap patients. *Seminars in Plastic Surgery*, 33(1), 5–12.
114. Vos, H. L. (2006). Inherited defects of coagulation factor V: the thrombotic side. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(1), 35–40.
115. Wayne, A. S., Kevy, S. V., Nathan, D. G. (1993). Transfusion management of sickle cell disease. *Blood*, 81(5), 1109–1123.
116. Welsch, G., Upchurch, G., Loscalzo, J. (1997). Hyperhomocysteinemia and atherothrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 811(1), 48–58.
117. Westrick, R. J., Bodary, P. F., Xu, Z., Shen, Y. (2001). Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice. *Circulation*, 103(25), 3044–3046.
118. Wilcken, D., Wang, X., Sim, A., McCredie, R. (1996). Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 16(7), 878–882.
119. Wolberg, A. S., Campbell, R. A. (2008). Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfusion and Apheresis Science*, 38(1), 15–23.
120. Woodruff, R. S., Sullenger, B., Becker, R. C. (2011). The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 32(1), 9–20.
121. Zheng, H., Ma, H. P., Xu, W. F., Zhang, Y. Q., Wu, J. J., Wang, J. (2014). Identification of a new *SERPINC1* mutation in a Kazak family that alters the heparin binding capacity of antithrombin. *Thrombosis Research*, 134(6), 1344–1349.
122. Zivelin, A., Mor-Cohen, R., Kovalsky, V. (2006). Prothrombin 20210G>A is ancestral prothrombotic mutation that occurred in whites approximately 24,000 years ago. *Blood*, 107(12), 4666–4668.
123. Zöller, B., Dahlbäck, B. (1994). Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet*, 343(8912), 1536–1538.
124. Zöller, B., Garcia de Frutos, P., Hillarp, A., Dahlbäck, B. (1999). Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica*, 84(1), 59–70.

Pateicības

Esmu pateicīga savai zinātniskajai vadītājai profesorei Birutai Mamajai par viņas nelokāmo vadību, neatsveramajām zināšanām un pastāvīgo ticību manām spējām visā šī doktorantūras ceļa garumā. Viņas atbalsts, padoms un uzmuntrinājums ir bijis fundamentāls gan šī pētījuma veidošanā, gan manā attīstībā kā ārstei un pētniecei.

Izsaku sirsnīgu pateicību Lienei Ņikitinai-Zaķei par profesionālo sadarbību un atbalstu šī darba izstrādes laikā. Īpašu pateicību vēlos izteikt Lindai Gailītei par viņas izcilo ieguldījumu un palīdzību, kas izrādījās neatsverama šīs disertācijas pabeigšanai.

Esmu dziļi pateicīga savai mammai Lūcijai par viņas nebeidzamo iedrošinājumu un ticību man visos manos centienos.

Visbeidzot, mana dziļākā un vissirsnīgākā pateicība pieder manai ģimenei. Savam mīļotajam vīram Vjačeslavam esmu neizsakāmi pateicīga par viņa pacietību, sapratni un atbalstu cauri neskaitāmajām stundām, kas veltītas šim darbam. Saviem brīniskiģigajiem bērniem Sofijai, Georgam, Rafaelai un Mateušam – paldies par jūsu mīlestību, sapratni un par to, ka esat mana lielākā iedvesma. Šis sasniegums nebūtu bijis iespējams bez jūsu atbalsta un iedrošinājuma, ģimenes, kas stāvēja man līdzās cauri katram izaicinājumam un svinēja katru uzvaru kopā ar mani.

Pielikumi

Ētikas komitejas atļauja

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72. Rīga, LV-1011 • Tālr. 67876182 • Fakss 67876071 • E-pasts: vm@vm.gov.lv

Rīgā

28.11.2016. Nr.1/28-11-16

„Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” SIA

*Atzinums par pētījuma pieteikumu
„Iedzimto un iegūto trombofīliju nozīme
mikrovaskulārajā brīvo lēveru ķirurģijā”*

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2016.gada 8.septembrī ir izskatījusi „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” SIA iesniegto pētījuma pieteikumu „Iedzimto un iegūto trombofīliju nozīme mikrovaskulārajā brīvo lēveru ķirurģijā”.

Pamatojoties uz Centrālās medicīnas ētikas komitejas 2016.gada 8.septembra sēdes protokola Nr.2016-4 punktu Nr.5 un iesniegtajiem papildinājumiem, tiek izsniegts atzinums, ka „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” SIA iesniegtais pētījuma pieteikums „Iedzimto un iegūto trombofīliju nozīme mikrovaskulārajā brīvo lēveru ķirurģijā” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas
komitejas priekšsēdētāja



E.Pole