

МЕЛЬНИЧНИКОВА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**ТЕСТ ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА В ОЦЕНКЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА
У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ И ЕГО ОСЛОЖНЕНИЯМИ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Эмануэль Владимир Леонидович – доктор медицинских наук профессор

Официальные оппоненты:

Гайковая Лариса Борисовна – доктор медицинских наук, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой биологической и общей химии

Обрезан Андрей Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет" Правительства Российской Федерации, заведующий кафедрой госпитальной терапии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита состоится “_____” _____ 2017 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.4/2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: Санкт-Петербург, ул. Оптиков д. 54 и на сайте www.arcerm.ru.

Автореферат разослан “_____” _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Атеросклероз, по определению экспертов Всемирной организации здравоохранения, это «вариабельная комбинация изменений интимы артерий, включающая накопление липидов, липопротеинов, сложных углеводов, фиброзной ткани, компонентов крови, кальцификацию и сопутствующие изменения средней оболочки (медии) сосудистой стенки» [Карпов Р.С., 1998].

Клиническая картина атеросклероза зависит от локализации и характера поражения артерий [Гуревич В.С., 2006]. Клинико-морфологически выделяют следующие формы атеросклероза: атеросклероз аорты, коронарных и мозговых сосудов, атеросклероз периферических артерий. Коронарный атеросклероз и ассоциированный с ним атеротромбоз, являются ведущими причинами стенокардии, инфаркта миокарда (ИМ) и внезапной сердечной смерти. В РФ число лиц, страдающих ишемической болезнью сердца, ежегодно увеличивается: стенокардией – на 4,4%, ИМ – на 2,5%. Атеросклероз и тромбоз церебральных артерий приводит к транзиторным ишемическим атакам и инсульту. Ежегодно в РФ регистрируют в среднем около 400–450 тыс. инсультов (из них 80-85% ишемических), из которых до 200 тыс. заканчиваются летально, а из выживших пациентов не менее 80% остаются инвалидами [Пряникова Н.А., 2006]. Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей (ОАНК) является причиной перемежающейся хромоты и гангрены ног. Было показано что, в зависимости от возраста распространённость этой патологии варьирует от 0,9 до 7,0% [Бокерия Л.А., 2013]. Доказано, что развитие стеноза в одном сосуде в дальнейшем повышает риск сужения просвета других артерий в результате атеросклеротических изменений. У пациентов с ОАНК увеличивается риск развития ИМ в 4 раза, инсульта в 2–3 раза по сравнению с пациентами без ОАНК [Faxon D.P., 2004]. Таким образом, атеросклероз является прогрессирующим заболеванием сосудов.

Генерализованный или мультифокальный атеросклероз представляет собой особую категорию гемодинамически значимых атеросклеротических поражений нескольких сосудистых бассейнов, обуславливающих тяжесть заболевания и затрудняющих выбор оптимальной тактики лечения, ставящих под сомнение благоприятный прогноз [Барбараш О.Л., 2011].

Ведущую роль в атерогенезе играет накопление липидов и липопротеинов в сосудистой стенке, обусловленное нарушением целостности эндотелия. В физиологических условиях эндотелий обладает антитромботическими свойствами, которые нарушаются при атеросклеротическом поражении: происходит активация сосудисто-тромбоцитарного и плазменного звена гемостаза, что приводит к состоянию гиперкоагуляции и атеротромбозу [Carcaillon L., 2011]. Так, ключевой фермент системы гемостаза – тромбин, помимо основных функций участвует в регуляции тонуса сосудов, пролиферации и миграции моноцитов в очаг атеросклеротического повреждения, адгезии лейкоцитов, продукции провоспалительных цитокинов, что опосредует развитие и прогрессирование атерогенеза [Borissoff J.I., 2009; Borissoff J.I., 2011]. В физиологических условиях влияние тромбина на свертывание крови уравнивается за счёт активации антикоагулянтной системы протеина С, который обладает ещё антиапоптотическими и противовоспалительными свойствами [Esmon C.T., 2005]. Было обнаружено, что при атеросклеротическом поражении сосудистой стенки происходит снижение экспрессии тромбомодулина (ТМ) и эндотелиального рецептора протеина С (EPCR – endothelial protein C receptor, англ.), что ведет к состоянию гиперкоагуляции [Laszik Z.G., 2001].

Лабораторная диагностика протромботического состояния представляет собой сложную задачу, поскольку скрининговые коагулологические тесты лишь косвенно отражают тромбинемии, в связи, с чем продолжают поиски технологий выявления

данного состояния. Одним из таких глобальных методов оценки динамического образования тромбина *in vitro* является тест генерации тромбина (ТГТ) [Nemker H.C., 2002; Nemker H.C., 2003]. Этот метод позволяет комплексно оценить действие как прокоагулянтных, так и антикоагулянтных факторов на процессы свертывания крови. Модификация ТГТ с добавлением в реагентную смесь ТМ дает возможность проследить антикоагулянтный ответ системы протеина С на внешний стимул.

Степень разработанности темы

Диагностическая значимость ТГТ широко изучалась в оценке риска венозных тромбозов [Tripodi A., 2012; Besser M., 2008; Tripodi A., 2008; Eichinger S., 2008]. Кроме того, имеются данные, подтверждающие связь повышения активности тромбинообразования, диагностируемой с помощью ТГТ, и риска артериальных тромбозов, обуславливающих развитие таких событий, как инфаркт миокарда и инсульт [Dieri R.A., 2012; Chan M.Y., 2008; Carcaillon L., 2011]. Также было показано, что повышение плотности бляшки по данным ультразвуковой доплерографии (УЗДГ) сопровождается увеличением генерации тромбина [With Noto A.T., 2008]. В недавнем исследовании ТГТ у пациентов с тромбозом стента, возникшим после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ), было обнаружено, что уровень эндогенного тромбинового потенциала (ETP – endogenous thrombin potential, англ.) у таких больных выше по сравнению с группой пациентов без осложнений [Loeffen R., 2015]. С другой стороны, проспективное когортное исследование ТГТ у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца (СИБС), перенёсших реваскуляризацию миокарда, проведённое в 2014 г., показало, что повышенная активность тромбинообразования ассоциирована с уменьшением риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [Schneider J.G., 2014]. Таким образом, имеющиеся в литературе сведения о диагностической значимости ТГТ у больных с атеросклеротическим поражением сосудистого русла противоречивы. Остается неясной роль ТГТ в оценке распространённости атеросклеротического поражения сосудистого русла и прогноза повторного стеноза коронарных артерий.

Цель исследования – определить клинко-диагностическую значимость теста генерации тромбина для оценки системы гемостаза у больных с атеросклерозом и его осложнениями.

Задачи исследования

1. Определить взаимосвязь показателей теста генерации тромбина с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и параметрами, отражающими основные патогенетические звенья атеросклеротического процесса: дисфункцией эндотелия (фибринектин, аннексин V, фактор Виллебранда), воспалением (С-реактивный белок, фибриноген) и дислипидемией.
2. Оценить активность тромбинообразования с помощью теста генерации тромбина у пациентов с различными клинко-морфологическими формами атеросклероза.
3. Сравнить показатели теста генерации тромбина у пациентов с различной степенью атеросклеротического поражения сосудистого русла, подтвержденной данными инструментальных исследований (ангиография, ультразвуковая доплерография).
4. Оценить антикоагулянтную активность системы протеина С с помощью теста генерации тромбина у пациентов с различной степенью поражения сосудистого русла и различными клинческими проявлениями атеросклероза.
5. С помощью теста генерации тромбина оценить риск рецидива стеноза коронарных артерий у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца, перенёсших чрескожное коронарное вмешательство.

Научная новизна работы

Впервые выявлена связь повышения активности тромбинообразования с характерными для атеросклероза изменениями в липидограмме, с возрастанием концентрации фибриногена, количества тромбоцитов, концентрации

высокочувствительного С-реактивного белка, с увеличением продукции фибронектина. Показана ассоциация повышения уровня эндогенного тромбинового потенциала и нарастания индекса массы тела у пациентов с атеросклерозом.

Впервые показана взаимосвязь повышения уровня эндогенного тромбинового потенциала и распространённости атеросклеротического поражения сосудов у пациентов с различными клинико–морфологическими формами атеросклероза.

Впервые установлена роль уровня эндогенного тромбинового потенциала плазмы крови в оценке риска многососудистого поражения у пациентов с атеросклерозом.

Выявлено снижение антикоагулянтной активности системы протеина С, измеренной с помощью модифицированного теста генерации тромбина с добавлением тромбомодулина, у пациентов с атеросклерозом.

Впервые показана роль теста генерации тромбина для оценки риска повторной операции реваскуляризации миокарда у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца, перенёвших чрескожное коронарное вмешательство.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе нашей работы получены данные о взаимосвязи состояния гиперкоагуляции и ряда аспектов патогенеза атеросклероза. Показано, что тест генерации тромбина, как интегральный метод оценки системы гемостаза, позволяет выявлять протромботическое состояние у пациентов с атеросклерозом. Выявлена ассоциация повышения активации тромбообразования и увеличения концентрации белков острой фазы воспаления, коэффициента атерогенности и дисфункцией эндотелия. Установлено, что повышение генерации тромбина ассоциировано с распространённостью атеросклеротического поражения сосудов. Обнаружено, что модификация теста генерации тромбина с добавлением в реакционную смесь тромбомодулина позволяет выявлять снижение антикоагулянтной активности протеина С у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий.

Показано, что тест генерации тромбина может быть использован в оценке риска рецидива стеноза коронарных артерий у пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство, и риска развития многососудистого поражения. Сформулированы практические рекомендации с целью оптимизации диагностического подхода оценки состояния гиперкоагуляции у больных с атеросклерозом. Результаты исследования могут быть использованы в практической деятельности врачей клинической лабораторной диагностики, кардиохирургов, кардиологов, неврологов, ангиохирургов и, следовательно, в системе непрерывного медицинского образования в качестве междисциплинарного модуля.

Положения, выносимые на защиту

1. Повышение активности тромбообразования, выявляемое тестом генерации тромбина, ассоциировано с возрастанием распространённости поражения нескольких сосудистых бассейнов и характерными для атеросклероза изменениями в липидном спектре, увеличением продукции белков острой фазы и дисфункцией эндотелия.

2. Модифицированный тест генерации тромбина с добавлением в реакционную смесь тромбомодулина позволяет выявить снижение антикоагулянтной активности системы протеина С у пациентов с атеросклерозом.

3. Повышенный уровень эндогенного тромбинового потенциала плазмы крови у больных со стабильной ишемической болезнью сердца увеличивает риск рецидива стеноза коронарных артерий после чрескожного коронарного вмешательства.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа основана на обследовании 133 человек. Из них 96 пациентов были со стабильной ишемической болезнью сердца, 17 больных с генерализованным атеросклерозом и 20 человек без клинических проявлений атеросклеротического поражения сосудистого русла. Для достижения поставленной в научной работе цели был проведён анализ литературы, использованы современные

методы статистической обработки полученных данных. Лабораторные исследования были выполнены на высокотехнологичном оборудовании.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов научной работы обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объёмом выборок обследованных пациентов, достаточным количеством проведённых лабораторных исследований системы гемостаза и статистическим анализом полученных данных. Сформированные и обследованные группы больных были сопоставимы по полу, возрасту и характеру сопутствующих заболеваний, а также репрезентативны по количеству и могли использоваться для решения поставленных задач.

Результаты работы были представлены на Российском национальном конгрессе кардиологов (Москва, 2013); на XXIII Национальном конгрессе Итальянского общества по изучению гемостаза и тромбозу (SISET XXIII NATIONAL CONGRESS) (Милан, 2014); 2-ом Международном образовательном форуме «Российские Дни Сердца» (Санкт-Петербург, 2014); XIX Форуме «Национальные дни лабораторной медицины России – 2015» (Москва, 2015); XXI Всероссийской научно-практической конференции «Качество лабораторных исследований – условие безопасности пациентов» (Москва, 2016); XXIX Международном симпозиуме по техническим инновациям в лабораторной гематологии (ISLH 2016) (Милан, 2016).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе при подготовке клинических ординаторов и интернов, а также слушателей дополнительного профессионального образования по теме «Клинические и лабораторные проблемы патологии гемостаза» кафедры клинической лабораторной диагностики и генетики Института медицинского образования ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, в модуле по клинической гемостазиологии на циклах тематического усовершенствования по смежным дисциплинам в системе непрерывного медицинского образования для врачей клинической лабораторной диагностики, а также врачей клинических специальностей на кафедре клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава России.

Личный вклад автора

Диссертант лично участвовал в планировании и организации научной работы, разработал проект исследования. Автор лично выполнил исследования теста генерации тромбина, биохимический анализ крови и коагулологические исследования, в том числе индуцированную агрегацию тромбоцитов в образцах крови всех обследованных лиц. Все материалы, представленные в диссертационном исследовании, получены, обобщены, статистически обработаны и проанализированы автором лично.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 22 таблицы, иллюстрирована 16 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы (включает 28 отечественных и 132 зарубежных источника).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Всего было обследовано 113 пациентов с атеросклерозом (80 мужчин, 33 женщины) в возрасте от 40 до 78 лет, госпитализированных в ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» и ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России.

На базе ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» были обследованы пациенты с диагнозом СИБС, стабильная стенокардия ФК (II-III). Из них 64 пациента (49 мужчин, 15 женщин) в возрасте от 44 до 73 лет перенесли стентирование коронарных артерий, 21 пациенту (15 мужчин, 6 женщин) в возрасте от 40 до 76 лет было выполнено аорто–коронарное шунтирование (АКШ). В исследование были включены 11 пациентов (6 мужчин, 5 женщины) в возрасте от 51 до 67 лет с СИБС без показаний к хирургическому вмешательству по данным коронарографии и/или стресс-эхокардиографии (стресс-ЭХО).

На базе нейрохирургического отделения ПСПбГМУ им. И.П. Павлова были обследованы 17 больных с диагнозом СИБС, генерализованный атеросклероз (ГА), цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ), облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей (ОАНК) (10 мужчин, 7 женщин) в возрасте от 55 до 78 лет. Из них 4 пациента страдали ОАНК и перенесли реконструктивную операцию на артериях нижних конечностей. Остальным пациентам (n=13) было выполнено стентирование брахиоцефальных артерий.

В группу сравнения вошли 20 практически здоровых лиц без клинических проявлений атеросклероза сосудов (10 мужчин, 10 женщин) в возрасте от 46 до 62 лет.

Факторы сердечно-сосудистого риска у пациентов с СИБС, перенесших реваскуляризацию миокарда, а также в группе без оперативного вмешательства и у лиц без атеросклероза приведены в таблице 1.

Таблица 1
Факторы сердечно–сосудистого риска у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца, перенесших чрескожное коронарное вмешательство или аорто–коронарное шунтирование, в группе без оперативного вмешательства, в группе сравнения

Факторы риска	Группа сравнения (n=20)	Пациенты СИБС, перенесшие ЧКВ (n=64)	Пациенты СИБС, перенесшие АКШ (n=21)	Пациенты с СИБС без операции (n=11)	Пациенты с ГА (n=17)
Возраст, лет (M±SD)	53,6±6,0	58,3±7,4	58,5±9,8	60,7±4,7	65,6±7,1**
Общий холестерин, ммоль/л (M±SD)	4,3±0,9	5,0±0,7	4,8±0,7	4,8 ±1,1	4,8±0,7
Сахарный диабет, % (n)	0,0 (0)	25,0 (16)***	23,8 (5)***	27,2 (3)***	29,4 (5)***
Индекс массы тела, кг/м ² (M±SD)	Нет данных	28,7±3,5	27,3±3,8	29,9±4,8	30,1±3,8
Соотношение по полу Ж/М, n	10/10	15/49	6/15	5/6	7/10
Артериальная гипертензия, % (n)	0,5 (1)	76,5 (49)***	100,0 (21)***	81,8 (9)***	100,0 (17)***
Курение, % (n)	1,0 (2)	68,7 (44)***	62,1 (13)***	72,7 (8)***	58,2 (10)***

Примечание: **– p<0,01, ***– p<0,0001 по сравнению с аналогичным показателем в группе лиц без атеросклероза

Критерии включения в исследование: атеросклеротическое поражение коронарных, церебральных артерий и артерий нижних конечностей, подтвержденное функциональными и визуализирующими методами исследования вне острого сосудистого события; возраст старше 18 лет; подписанное информированное согласие на использование результатов обследования и лечения в научной работе.

Критериями исключения из группы были отказ от участия в исследовании, острое нарушение мозгового кровообращения, тромбоэмболия легочной артерии в предшествующие 6 месяцев, хроническая сердечная недостаточность 3 или 4 стадии (классификация Стражеско–Василенко), пороки сердца, постоянная форма фибрилляции предсердий, фракция выброса левого желудочка <35%, онкологические заболевания, туберкулез, хронический воспалительный процесс в стадии обострения, заболевания системы крови, наличие острого тромботического эпизода, перенесенного менее 3 месяцев назад, наличие искусственного клапана сердца, беременность.

Обследование лиц без клинических проявлений атеросклероза включало определение протромбина по Квику, активированного частичного тромбопластинового времени, тромбинового времени и концентрации фибриногена. Лабораторное обследование пациентов с СИБС дополнительно включало определение активности антитромбина III, уровня D-димера, фактора Виллебранда, а также измерение индуцированной агрегации тромбоцитов.

Коагуляционные тесты проводились с использованием наборов реагентов фирмы Stago (Франция) на анализаторе STA-Compact (Roche Diagnostica, Швейцария). Уровень D-димера определялся количественно в плазме методом иммунотурбидиметрии с латексным усилением с использованием набора STA®-Liatest® D-Di; антиген фактора Виллебранда – иммунотурбидиметрическим методом с использованием наборов STA®-Liatest® VWF:Ag; концентрация фибриногена – количественно по А. Clauss. Для оценки полученных результатов использовались референтные интервалы, разработанные фирмой производителем. Для исследования показателей системы гемостаза венозную кровь забирали в вакуумные пробирки, содержащие 3,8% цитрата натрия. Во всех случаях антикоагулянт в пробирках был комнатной температуры, соотношение крови и антикоагулянта составляло 9:1.

Для оценки маркеров, отражающих основные патогенетические звенья атеросклероза, были выполнены следующие тесты: общий холестерин (ОХС), ХС–ЛПВП, ХС–ЛПНП, ХС–ЛПНОН, триглицериды. Для оценки отношения количества холестерина, входящего в липопротеины высокой плотности, к общему холестерину крови вычисляли коэффициент атерогенности, который позволяет оценить риск развития атеросклероза. Формула (1) для расчета представлена ниже.

$$\text{Коэффициент атерогенности} = \frac{(\text{ОХС}-\text{ХС}-\text{ЛПВП})}{\text{ХС}-\text{ЛПВП}} \quad (1)$$

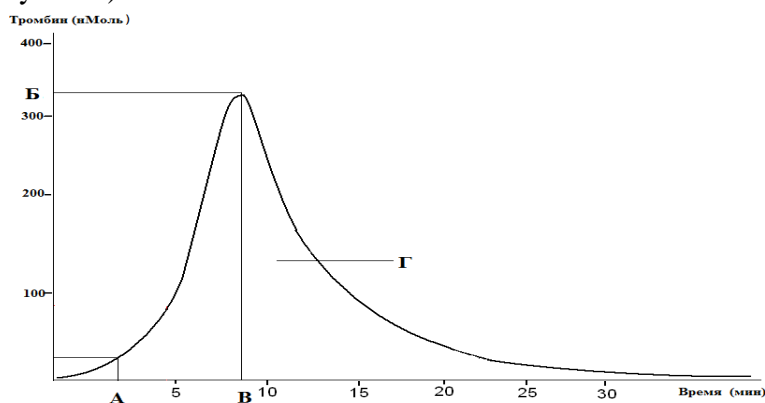
Также измеряли концентрацию показателей воспаления (высокочувствительный С-реактивный белок, фибриноген), маркеров повреждения миокарда (тропонин I, КФК-МВ) и дисфункции эндотелия (фибронектин, аннексин V).

Основные биохимические показатели определяли на автоматическом анализаторе Architect 8000 (Abbot, США). Материалом для исследования являлась сыворотка крови. Тропонин I и КФК–МВ измеряли методом хемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах на автоматическом анализаторе Architect i2000SR (Abbot, США). Концентрацию фибронектина количественно определяли в плазме крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Thechnoclon, Австрия). Концентрацию аннексина V измеряли в сыворотке крови методом ИФА (Biocscience, США). Также пациентам с атеросклерозом выполнялся клинический анализ крови на гематологическом анализаторе Coulter® LH 500 (Beckman Coulter, США).

Тест генерации тромбина и анализ результатов данного исследования выполняли по методике, предложенной Н. Hemker в 2003 г. [Hemker Н.С., 2003]. Для ТГТ венозную кровь забирали в вакуумные пробирки, содержащие 3,2% цитрата натрия основного в молярной концентрации 0,109 М. Исследование проводили в бедной тромбоцитами плазме, которую получали центрифугированием 10 минут при 130 g, а затем повторно центрифугировали супернатант 30 мин при 2500 g. В пробу плазмы крови добавляли пусковой реагент, который представлял собой смесь рекомбинантного человеческого тканевого фактора в конечной концентрации 5 пмоль и отрицательно заряженных прокагулянтных фосфолипидов. Молярное соотношение фосфолипидов было следующее: 20% фосфатидилсерина, 20% фосфатидилэтаноламина и 60% фосфатидилхолина. Свежую смесь специфичного для тромбина субстрата, меченного флуорогенным аминотетракарбом (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), и CaCl_2 подготавливали перед каждой постановкой теста. Автоматическая калибровка результатов проводилась относительно измеренной в аналогичных условиях активности тромбинового калибратора (Thrombinoscope BV, Нидерланды). Калибратор представлял собой синтетический аналог тромбина с заведомо известной активностью, высокоспецифичный к добавляемому в реакцию смеси субстрату [Наместников Ю.А., 2011].

Результаты ТГТ анализировали в дублях на планшетном флуориметре, оборудованном диспенсером, производства ThermoFisher SCIENTIFIC (Финляндия). Длина волны абсорбции составляла 390 нм, эмиссии – 460 нм. За одну постановку в 96-луночном планшете исследовалось 16 образцов плазмы.

Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Thrombinoscope® версия 3.0.0.26, позволяющего производить построение и расчет показателей кривых генерации тромбина. Рассчитывались следующие показатели: Lag time (время инициации свертывания, мин) – время, измеренное от момента внесения смеси флуорогенного субстрата и ионизированного кальция в лунку с образцом и пусковым реагентом, до момента отклонения флуоресцентного сигнала от основной горизонтальной линии более чем на 2 стандартных отклонения; Peak thrombin (пиковое количество тромбина в образце, нМоль) – максимальное количество тромбина, образующееся в процессе его генерации; ttPeak (время достижения пика, мин) – время, за которое в образце генерируется максимальное количество тромбина и ЕТР (эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль/мин) – измеренный как площадь под кривой генерации тромбина (рисунок 1).



A – время инициации свертывания, мин (Lag time/LT); B – пиковая концентрация тромбина, нМоль (Peak thrombin/Peak thr.); B – время достижения пиковой концентрации тромбина, мин (Time to peak/ttPeak); Г – эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль/мин (ETP)

Рисунок 1 – Кривая генерации тромбина и измеряемые параметры

Для оценки активности системы протеина С в реакцию смесь добавляли тромбомодулин (ТМ). Для определения степени чувствительности к ТМ рассчитывали

процент снижения ЕТР (%ЕТР), отражающий разницу значений ЕТР до и после добавления в тест ТМ. Формула (2) для расчета представлена ниже [Наместников Ю.А., 2011].

$$\% \text{ ЕТР} = \frac{(\text{ЕТР}-\text{ЕТР}/\text{ТМ})}{\text{ЕТР}} * 100\% \quad (2)$$

Основным критерием в отборе больных для хирургического лечения помимо клинической картины являлись результаты рентгенконтрастной ангиографии, направленной на выявление атеросклеротических стено-окклюзирующих поражений коронарных, мозговых артерий, аорты и артерий нижних конечностей. Гемодинамически значимым стенозом считали сужение просвета артерии на 75% и более. У пациентов с генерализованным атеросклеротическим поражением коронарных, мозговых и артерий нижних конечностей проводилось ангиографическое исследование одновременно всех 3-х сосудистых бассейнов. Для оценки поражений мозговых сосудов учитывались результаты УЗДГ брахиоцефальных артерий и/или транскраниальной доплерографии с функциональными пробами.

По результатам ангиографии коронарных артерий пациентам с СИБС была выполнена операция реваскуляризации миокарда с помощью стентирования коронарных артерий, либо АКШ. В нейрохирургическом отделении ПСПбГМУ им. И.П. Павлова пациенты с ГА перенесли хирургическое вмешательство в виде стентирования брахиоцефальных артерий (n=13) или реконструкции артерий нижних конечностей (n=4). Согласно клиническим рекомендациям Европейского общества кардиологов (ESC) и национальным рекомендациям, все пациенты с СИБС принимали бета-блокаторы и/или антагонисты кальциевых каналов, антиагрегантную терапию (аспирин и/или клопидогрел), гиполипидемические средства (статины) [Montalescot G., 2014; Акчурин Р.С., 2008; Карпов, Ю.А., 2014]. Пациентам с заболеванием периферических артерий, перенесенным ИМ, инсультом, после ЧКВ дополнительно назначался антагонист рецепторов P2Y12 тромбоцитов – клопидогрел в дозировке 75 мг/сут. У пациентов, принимавших антиагреганты, была исследована агрегация тромбоцитов из цельной крови методом импедансной агрегатометрии на анализаторе Chrono-log 700 (Chrono-log Corporation, США) с активаторами АДФ (5 мкмоль/л и 10 мкмоль/л), коллаген (2 мкг/мл), арахидоновая кислота (0,5 мкмоль/л).

Полученные данные обрабатывали с использованием статистической программы SPSS Statistics (версия 17.0). Для описания количественных признаков использовались стандартные показатели описательной статистики (среднее арифметическое значение, стандартное отклонение (M±SD), или медиана, 25 и 75 перцентиль Me [Q1-Q3]). Для описания качественных данных использовался частотный анализ, сравнение двух независимых групп проводили с помощью критерия X2 Пирсона. Сравнение двух независимых переменных, распределенных по нормальному закону, проводилось с помощью параметрического T-теста Стьюдента. При сравнении больше двух групп использовали дисперсионный анализ. Для сравнения переменных, не относящихся к нормальному закону распределения, использовали тест Манна-Уитни. При количестве независимых сравнимых групп больше двух применялся критерий Краскела-Уолиса. Для изучения связи между количественными переменными пользовались методом корреляционного анализа. Определение диагностической и прогностической значимости для значения ЕТР, а также оценку уровня пороговых значений этого параметра осуществляли с помощью ROC-анализа. На основании этого анализа по специфичности и чувствительности теста была определена площадь под кривой (ППК) и отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом [ДИ] с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism 5.0. Уровень значимости всех статистических тестов принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимосвязь показателей теста генерации тромбина с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и лабораторными параметрами, отражающими основные патогенетические звенья атеросклеротического процесса

В результате исследования генерации тромбина с помощью ТГТ обнаружены достоверные различия в общей группе пациентов с атеросклерозом (n=113) по сравнению с группой контроля (n=20). Мы наблюдали повышение временного показателя ТГТ – LT у пациентов с атеросклерозом ($3,2 \pm 0,6$ против $2,7 \pm 0,6$ мин, $p < 0,01$). Также была выявлена тенденция повышения уровня ЕТР у пациентов с атеросклерозом на уровне значимости $p = 0,05$ (таблица 2).

Таблица 2

Значения показателей теста генерации тромбина у больных с атеросклерозом по сравнению с группой без него, $M \pm SD$

Показатели	Группа сравнения (n=20)	Пациенты с атеросклерозом (n=113)
LT, мин	$2,7 \pm 0,6$	$3,2 \pm 0,6^{**}$
ЕТР, нМоль/мин	$1680,5 \pm 421,9$	$1818,2 \pm 238,5$
Peak thr., нМоль	$242,4 \pm 77,1$	$255,5 \pm 70,8$
ttPeak, мин	$6,9 \pm 1,9$	$7,1 \pm 1,4$

** – $p < 0,01$ достоверность различия между подгруппами

В результате анализа взаимосвязи основных факторов ССЗ с показателями ТГТ были получены достоверные различия по уровню ЕТР. Было обнаружено, что у пациентов (n=10), перенесших инсульт более чем 3 месяца назад, значение ЕТР достоверно выше по сравнению с пациентами (n=103), не имевших острое нарушение мозгового кровообращения в анамнезе ($2147,9 \pm 446,7$ против $1791,1 \pm 399,1$ нМоль/мин, $p < 0,01$). Также было отмечено, что у пациентов с индексом массы тела (ИМТ) более 30 кг/м^2 (n=33) был достоверно более высокий уровень ЕТР по сравнению с пациентами с ИМТ до 30 кг/м^2 (n=80) ($1954,6 \pm 476,4$ против $1722,2 \pm 271,6$ нМоль/мин, $p < 0,01$). Мы наблюдали тенденцию повышения уровня ЕТР в группе пациентов с артериальной гипертензией на уровне значимости $p = 0,05$.

При сравнении показателей ТГТ в подгруппе пациентов с нормальным значением коэффициента атерогенности и пациентов с повышенным значением этого показателя было обнаружено, что подгруппа с дислипидемией имела достоверное увеличение временных параметров теста – LT и ttPeak ($p < 0,05$) (таблица 3).

Таблица 3

Показатели теста генерации тромбина у пациентов с атеросклерозом в зависимости от значения коэффициента атерогенности, $M \pm SD$

Показатели ТГТ	Коэффициент атерогенности $< 3,5$ усл. ед. (n=57)	Коэффициент атерогенности $> 3,5$ усл. ед. (n=36)
LT, мин	$2,9 \pm 0,6$	$3,2 \pm 0,7^*$
ЕТР, нМоль/мин	$1719,5 \pm 381,3$	$1793,8 \pm 398,5$
Peak thr., нМоль	$252,1 \pm 104,4$	$235,1 \pm 67,3$
ttPeak, мин	$6,8 \pm 1,6$	$7,6 \pm 1,7^*$

* - $p < 0,05$ достоверность различия между подгруппами

Также было проведено сравнение подгрупп пациентов с атеросклерозом и нормальным уровнем фибриногена и пациентов с концентрацией фибриногена более 4,0 г/л в плазме крови. В результате было обнаружено, что пациенты с фибриногемией имеют значимое повышение уровня ЕТР и времени LT ($p < 0,01$) (таблица 4).

Таблица 4

Показатели теста генерации тромбина у пациентов с атеросклерозом в зависимости от концентрации фибриногена, $M \pm SD$

Показатели ТГТ	Концентрация фибриногена < 4,0 г/л, (n=63)	Концентрация фибриногена > 4,0 г/л, (n=50)
LT, мин	2,9±0,5	3,3±0,8**
ЕТР, нМоль/мин	1688,1±300,4	1884,2±473,6**
Peak thr., нМоль	249,6±103,7	252,2±76,6
ttPeak, мин	6,8±1,4	7,4±1,8

** - $p < 0,01$ достоверность различия между подгруппами

В результате сравнения показателей ТГТ между подгруппой пациентов с концентрацией высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ) в пределах нормы и подгруппой лиц с повышенным значением этого протеина в сыворотке крови было обнаружено, что пациенты со значением СРБ более 5,0 мг/л имеют значимое увеличение времени LT ($p < 0,05$) (таблица 5).

Таблица 5

Показатели теста генерации тромбина у пациентов с атеросклерозом в зависимости от концентрации высокочувствительного С-реактивного белка, $M \pm SD$

Показатели ТГТ	Концентрация СРБ < 5,0 мг/л (n=78)	Концентрация СРБ > 5,0 мг/л (n=27)
LT, мин	3,1±0,7	3,4±0,8*
ЕТР, нМоль/мин	1780,9±420,6	1795,5±357,1
Peak thr., нМоль	255,6±96,1	252,2±66,7
ttPeak, мин	6,9±1,6	7,7±1,8

* - $p < 0,05$ достоверность различия между подгруппами

По данным корреляционного анализа была обнаружена связь лабораторных показателей, отражающих основные патогенетические звенья атеросклероза, и параметров ТГТ. В результате исследования обнаружена прямая корреляция увеличения времени инициации свертывания (LT) с повышением коэффициента атерогенности ($r=0,26$; $p=0,01$), а также с возрастанием концентрации триглицеридов и ХС–ЛПОНП в сыворотке крови ($r=0,22$; $p=0,03$ и $r=0,23$; $p=0,02$, соответственно). Повышение этого показателя напрямую связано с увеличением концентрации таких параметров воспаления, как: фибриноген ($r=0,31$; $p=0,008$) и высокочувствительный СРБ ($r=0,30$; $p=0,002$). В тоже время, удлинение времени LT ассоциировано с возрастанием количества тромбоцитов в цельной крови ($r=0,32$; $p=0,01$).

Обнаружена прямая корреляционная связь между повышением времени достижения пиковой концентрации тромбина (ttPeak) и характерными изменениями в липидном спектре такими, как: увеличение коэффициента атерогенности ($r=0,42$; $p=0,0001$), уровня ОХС ($r=0,29$; $p=0,006$), концентрации ХС–ЛПНП ($r=0,24$; $p=0,03$), ХС–ЛПОНП ($r=0,32$; $p=0,003$) и триглицеридов сыворотки крови ($r=0,32$; $p=0,002$). Увеличение этого временного показателя ТГТ ассоциировано с повышением количества тромбоцитов в

цельной крови ($r=0,33$; $p=0,01$). Повышение значения $ttPeak$ связано с возрастанием концентрации показателей воспаления, в том числе: фибриногена ($r=0,20$; $p=0,03$) и высокочувствительного СРБ в сыворотке крови ($r=0,24$; $p=0,01$).

Также в ходе корреляционного анализа была обнаружена связь увеличения пиковой концентрации тромбина ($Peak\ thr.$) с повышением концентрации плазменного фибронектина, который является маркером дисфункции эндотелия ($r=0,36$; $p=0,02$). Повышение уровня ЕТР достоверно коррелирует с возрастанием концентрации фибриногена ($r=0,36$; $p<0,01$).

Таким образом, показатели ТГТ положительно коррелируют с лабораторными маркерами, отражающими основные звенья атеросклероза, что свидетельствует о непосредственной роли активации тромбинообразования в развитии атеросклероза.

Роль теста генерации тромбина для оценки активности тромбинообразования у пациентов с различными клинико-морфологическими формами атеросклероза

Группа больных с атеросклерозом ($n=102$), в зависимости от его клинико-морфологической формы, была разделена на три подгруппы. В первую подгруппу вошли 58 пациентов, имевших поражение только коронарных артерий, с клиническими проявлениями СИБС, во второй подгруппе было 32 пациента с поражением коронарных и мозговых артерий и клиническими проявлениями СИБС и ЦВЗ. В третью подгруппу были отобраны 12 пациентов, у которых помимо атеросклеротического поражения коронарных и брахиоцефальных артерий выявлен стеноз артерий нижних конечностей.

В результате исследования ТГТ было обнаружено значимое повышение уровня ЕТР у пациентов третьей подгруппы с СИБС, ЦВЗ и ОАНК по сравнению с пациентами первой подгруппы с СИБС ($2104,1\pm 441,2$ против $1717,2\pm 352,5$ нМоль/мин, $p<0,05$) и группой лиц без атеросклероза ($2104,1\pm 441,2$ против $1637,0\pm 180,2$ нМоль/мин, $p<0,01$) (рисунок 2 А). В подгруппе пациентов с СИБС, ЦВЗ и ОАНК, по сравнению с группой лиц без атеросклероза, выявлено достоверное увеличение времени инициации свертывания (LT) ($3,5$ [$3,0-3,9$] против $2,7$ [$2,4-3,0$] мин, $p<0,01$) (рисунок 2 Б).

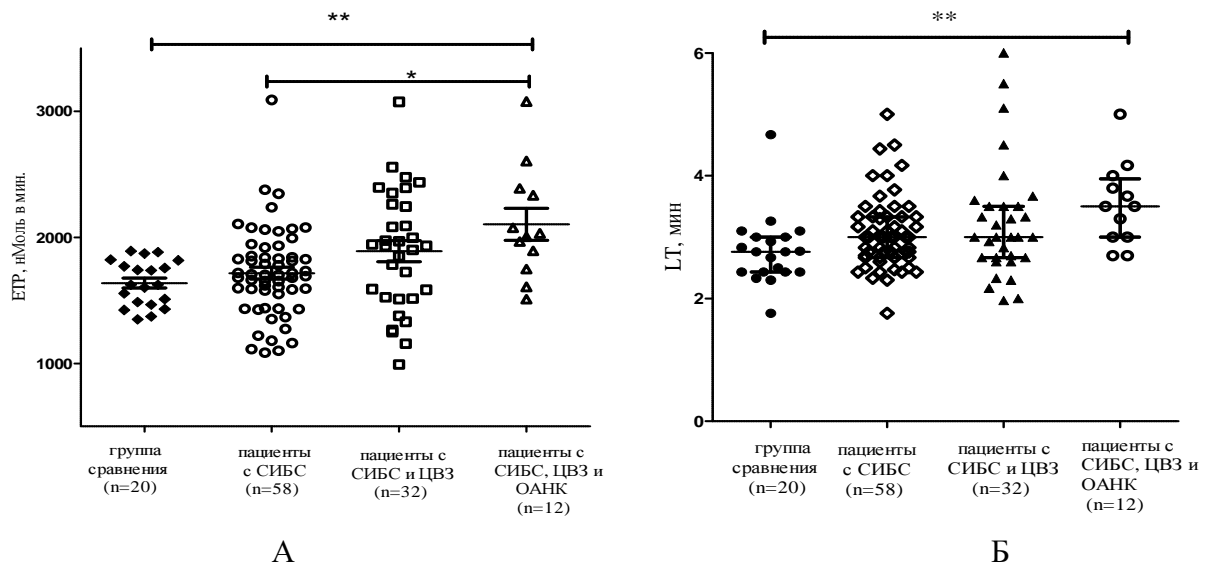


Рисунок 2– Сравнение уровня эндогенного тромбинового потенциала (ЕТР) и времени инициации свертывания (LT) у пациентов с различными клиническими формами атеросклероза и без него

*– $p<0,05$, **– $p<0,01$ по сравнению с аналогичным показателем в подгруппе пациентов с СИБС, ЦВЗ и ОАНК

В результате сравнения показателей коагулограммы в подгруппах обследованных пациентов было обнаружено, что пациенты с атеросклерозом вне зависимости от клинической формы атеросклероза имеют достоверно более высокую концентрацию фибриногена плазмы крови по сравнению с группой лиц без атеросклероза ($p < 0,01$) (рисунок 3).

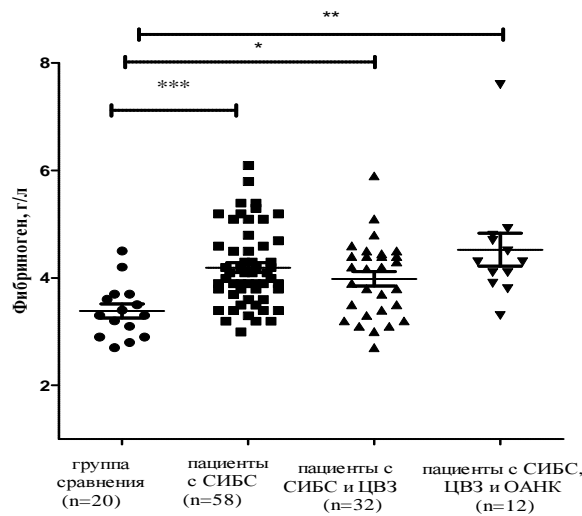


Рисунок 3 – Сравнение концентрации фибриногена в подгруппах пациентов с различными клиническими формами атеросклероза и без него

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в подгруппе лиц без атеросклероза

Таким образом, мы наблюдаем увеличение генерации тромбина у пациентов с сочетанным атеросклеротическим поражением нескольких сосудистых бассейнов, что свидетельствует о взаимосвязи активации тромбинообразования и распространенности атеросклеротического поражения сосудистого русла.

Взаимосвязь уровня эндогенного тромбинового потенциала и объема атеросклеротического поражения сосудистого русла по данным инструментального обследования пациентов с атеросклерозом

В результате проведенных инструментальных исследований, а именно ангиографии и УЗДГ, у больных с атеросклерозом сосудов был определен процент стеноза пораженных артерий. Группа пациентов с атеросклерозом ($n=98$), независимо от количества гемодинамически значимых стенозов (75% и более) была разделена на три подгруппы. В первую подгруппу вошли пациенты с поражением одного сосуда ($n=43$), во второй подгруппе больные имели поражение двух сосудов ($n=35$), и в третью подгруппу вошли пациенты, имеющие гемодинамически значимый стеноз трех- и более артерий ($n=20$).

В результате межгруппового сравнения показателей ТГТ мы наблюдали достоверное повышение уровня ЕТР у больных с многососудистым стенозом артерий по сравнению с пациентами с одно-сосудистым поражением ($2216,2 \pm 394,8$ против $1798,4 \pm 397,4$ нМоль/мин, $p < 0,05$), а также с двух-сосудистым поражением магистральных артерий ($2216,2 \pm 394,8$ против $1708,3 \pm 333,1$ нМоль/мин, $p < 0,001$) (рисунок 4).

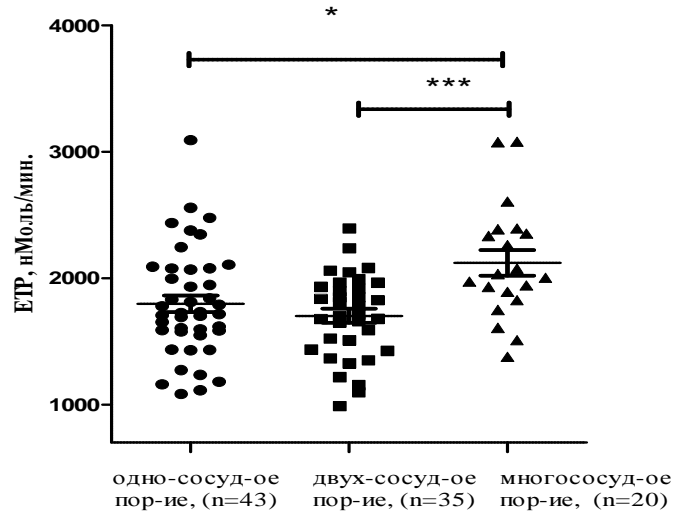


Рисунок 4 – Сравнение эндогенного тромбинового потенциала у пациентов с атеросклерозом в зависимости от количества гемодинамически значимых стенозов артерий

*– $p < 0,05$, ***– $p < 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в подгруппе пациентов с многососудистым стенозом артерий

Для проверки диагностической значимости определения уровня ETP в оценке риска развития многососудистого атеросклеротического поражения был проведен ROC-анализ. В результате выбранное пороговое значение ETP составило 1968,0 нМоль/мин с диагностической чувствительностью 63% и специфичностью 75% ($p < 0,01$). Площадь под ROC-кривой (ППК) и отношения шансов равнялись 0,76 [95% ДИ: 0,6–0,8] и 5,2 [95% ДИ: 1,8–15,4], соответственно при $p < 0,01$ (рисунок 5).

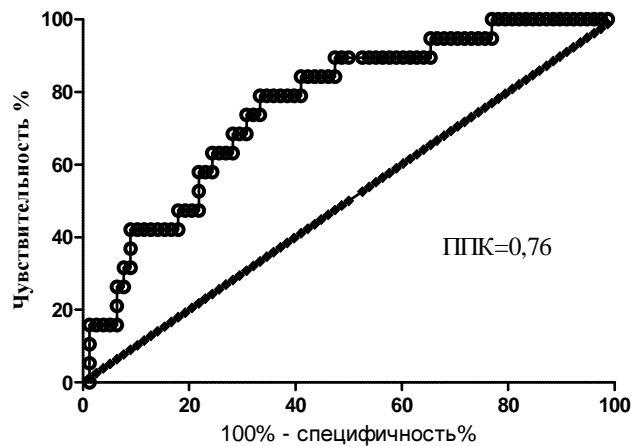


Рисунок 5 – ROC-кривая оценки уровня эндогенного тромбинового потенциала для определения риска развития многососудистого атеросклеротического поражения артерий у пациентов с атеросклерозом

Таким образом, повышение уровня ETP более 1968,0 нМоль/мин у пациентов с атеросклерозом увеличивает риск развития многососудистого атеросклеротического поражения в 5,2 раз [95% ДИ: 1,8–15,4]. Тест генерации тромбина может являться дополнительным методом оценки распространённости атеросклеротического поражения сосудистого русла с вовлечением нескольких артерий в гемодинамически значимый процесс.

Модифицированный тест генерации тромбина в оценке антикоагулянтной активности системы протеина С у пациентов с различными клиническими проявлениями атеросклероза и различным объемом поражения сосудистого русла

В настоящем исследовании была проведена качественная оценка работы антикоагулянтной системы протеина С с помощью модифицированного ТГТ с добавлением в реагентную смесь тромбомодулина (ТМ). Комплекс тромбин–тромбомодулин тысячекратно ускоряет активацию протеина С. Поэтому при измерении ТГТ с ТМ в норме происходит снижение показателей теста, а процентное соотношение ЕТР до и после добавления ТМ (%ЕТР) считается маркером чувствительности системы протеина С к ТМ.

При сравнении показателей ТГТ с ТМ в общей группе пациентов с атеросклерозом (n=113) и в группе контроля (n=20) были выявлены значимые различия. Обнаружено достоверное повышение уровня ЕТР/ТМ, увеличение времени ttPeak/ТМ (p<0,05 и p<0,01, соответственно). Мы наблюдали достоверное снижение чувствительности системы протеина С к ТМ (%ЕТР) у пациентов с атеросклерозом по сравнению с группой лиц без него (43,3±18,3 против 53,4±18,4%, p<0,05).

В результате межгруппового сравнения показателей теста у пациентов с различными клиническими формами атеросклероза были обнаружены значимые изменения показателей ТГТ с ТМ. Было выявлено, что у пациентов с СИБС и ЦВЗ, а также в группе пациентов с СИБС, ЦВЗ и ОАНК, значимо увеличивалось время достижения пиковой концентрации тромбина в серии постановок с ТМ (ttPeak/ТМ) по сравнению с группой лиц без атеросклеротического поражения сосудистого русла и подгруппой с СИБС. В этих же подгруппах пациентов достоверно повышен показатель ЕТР/ТМ по сравнению с группой контроля. Также в подгруппе пациентов с СИБС, ЦВЗ и ОАНК мы наблюдали увеличение времени инициации свёртывания в серии постановок с ТМ (LT/ТМ) по сравнению с группой лиц без атеросклеротического поражения сосудистого русла и подгруппой с СИБС (p<0,001) (таблица 6).

Таблица 6

Показатели модифицированного теста генерации тромбина у больных с различными клиничко-морфологическими формами атеросклероза и в группе сравнения, М±SD

Показатели ТГТ с ТМ	Группа сравнения (n=20)	Группа пациентов с атеросклерозом (n=102)		
		Подгруппа с СИБС (n=58)	Подгруппа с СИБС и ЦВЗ (n=32)	Подгруппа с СИБС, ЦВЗ и ОАНК (n=12)
LT/ТМ, мин	2,6±0,5^{££}	2,7±0,5[×]	3,1±0,6	3,3±0,7
ЕТР /ТМ, нМоль/мин	801,0±232,2[£]	986,3±374,4[°]	1080,3±371,9	1246,3±480,9
Peak thr. /ТМ, нМоль	152,5±52,3	176,4±72,1	214,48±57,1	176,9±52,3
ttPeak/ТМ, мин	5,2±0,7^{£££, °}	5,5±0,8^β	6,2±0,6	6,6±0,7
% ЕТР	53,4±18,4	42,3±19,9	42,4±19,3	40,5±18,4

Примечание: £ – p<0,01, ££ – p<0,001, £££ – p<0,0001 группа сравнения против подгруппы пациентов с СИБС, ЦВЗ и ОАНК; ×– p<0,001 подгруппа с СИБС против подгруппы пациентов с СИБС, ЦВЗ и ОАНК; ° – p<0,01 группа сравнения против подгруппы пациентов с СИБС и ЦВЗ; β- p<0,05 подгруппа с СИБС против подгруппы пациентов с СИБС и ЦВЗ

В результате исследования результатов модифицированного ТГТ с ТМ у пациентов с различным количеством пораженных артерий были также выявлены достоверные изменения показателей теста. У больных с многососудистым поражением артерий по сравнению с пациентами с двух–сосудистым поражением повышались временные показатели – LT/ТМ и ttPeak/ТМ, увеличивался уровень ЕТР/ТМ (таблица 7).

Таблица 7

Показатели модифицированного теста генерации тромбина у пациентов с различным количеством гемодинамически значимых стенозов артерий и в группе сравнения, М±SD

Показатели ТГТ/ТМ	Количество пораженных сосудов		
	Один (n=43)	Два (n=35)	Три и более (n=20)
LT/ТМ, мин	2,7±0,5	2,7±0,4	3,3±0,7*
ЕТР/ТМ, нМоль/мин	1034,4±404,7	988,5±350,0	1258,0±428,4*
Peak thr./ТМ, нМоль	174,5±70,7	186,4±71,4	204,9±46,9
ttPeak/ТМ, мин	5,7±0,8	5,4±0,7	6,4±0,7**
% ЕТР	41,3±19,7	41,7±17,5	39,7±20,7

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с аналогичным показателем в группе лиц с двух-сосудистым поражением

Таким образом, у пациентов с атеросклеротическим повреждением артерий наблюдается снижение антикоагулянтной активности системы протеина С, выявляемое с помощью ТГТ с добавлением в реакционную смесь ТМ.

Роль теста генерации тромбина в оценке риска повторной операции реваскуляризации миокарда у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца, перенёвших чрескожное коронарное вмешательство

Мы наблюдали пациентов с СИБС, перенесших ЧКВ, в течение двух лет после оперативного вмешательства. В результате мониторинга из 64 пациентов с СИБС, перенесших ЧКВ, 13 пациентов были повторно госпитализированы для реваскуляризации миокарда. Из них у 6 пациентов произошел рецидив стеноза коронарных артерий в зоне локализации стента, а у 7 пациентов произошел стеноз в другой части коронарного русла. У пациентов с повторной операцией реваскуляризации миокарда мы обнаружили достоверно более высокий уровень ЕТР, по сравнению с пациентами, у которых ЧКВ прошло клинически успешно (1967,2 [1880,3–2085,7] против 1703,2 [1433,2–1845,8] нМоль/мин, $p < 0,05$) (рисунок 6).

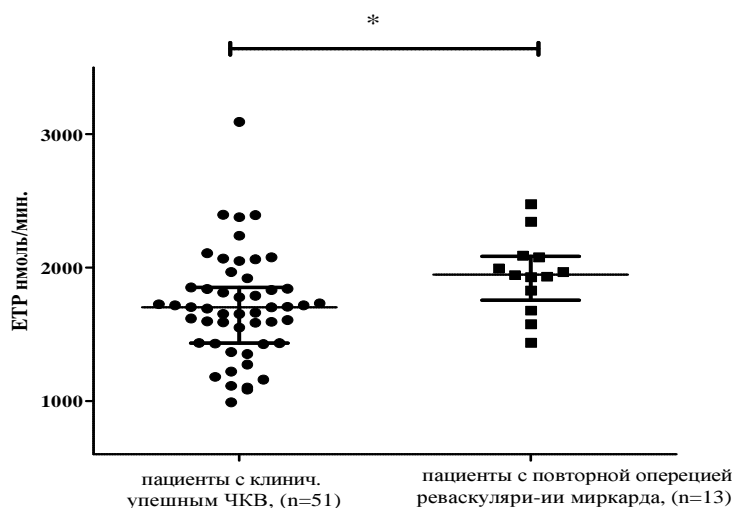


Рисунок 6 – Эндогенный тромбиновый потенциал, измеренный до вмешательства, у пациентов с ишемической болезнью сердца, перенесших чрескожное коронарное вмешательство

*– достоверные различия при $p < 0,05$

Для оценки диагностической информативности показателя ЕТР в оценке риска стеноза коронарных артерий после ЧКВ был использован ROC – анализ. Пороговое значение ЕТР составило 1926,0 нМоль/мин с чувствительностью 70% и высокой специфичностью 80% ($p < 0,01$). Площадь под ROC–кривой (ППК) и отношение шансов (ОШ) равнялись 0,72 [95% ДИ: 0,6-0,8] и 13,3 [95% ДИ: 3,1-57,6], соответственно при $p < 0,01$, (рисунок 7).

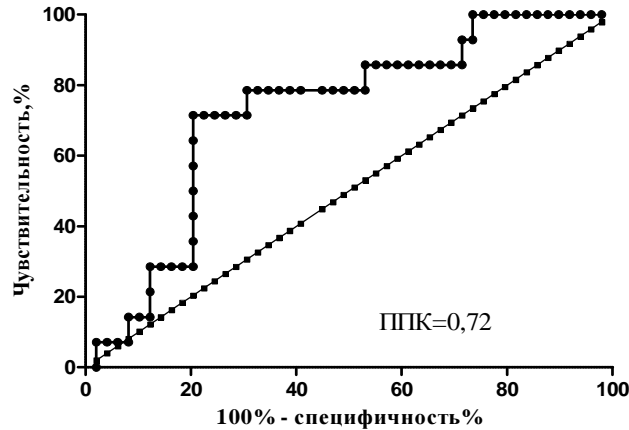


Рисунок 7 – ROC-кривая оценки уровня эндогенного тромбинового потенциала для определения риска повторного кардиохирургического вмешательства у пациентов, перенесших ЧКВ

Также мы провели оценку сердечно–сосудистого риска в исследуемых группах пациентов. В результате анализа было выявлено, что встречаемость пациентов с атеросклерозом церебральных сосудов по данным УЗДГ и с ИМ в анамнезе достоверно выше в группе пациентов, перенесших повторную операцию реваскуляризации миокарда ($p < 0,05$).

Таким образом, у пациентов с повторным кардиохирургическим вмешательством, с ИМ в анамнезе и атеросклерозом церебральных артерий по данным инструментального обследования, наблюдается повышение уровня ЕТР. При возрастании этого показателя более 1926,0 нМоль/мин увеличивается риск повторной операции реваскуляризации миокарда в 13,3 раз [95% ДИ: 3,1-57,6] в течение последующих двух лет, что отражает прогностическое значение ТГТ в оценке рецидива стеноза коронарных артерий у пациентов, перенесших кардиохирургическое вмешательство.

ВЫВОДЫ

1. Уровень эндогенного тромбинового потенциала ассоциирован с такими факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний как, индекс массы тела, наличие инсульта в анамнезе. У пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, значение эндогенного тромбинового потенциала плазмы крови достоверно повышается на 17% по сравнению с пациентами без инсульта в анамнезе ($p < 0,01$). Пациенты с ожирением имеют достоверно более высокий уровень эндогенного тромбинового потенциала по сравнению с пациентами с нормальной или избыточной массой тела ($p < 0,01$).

2. Показатели теста генерации тромбина коррелируют с лабораторными маркерами, отражающими основные патогенетические звенья атерогенеза. Увеличение времени инициации свёртывания и времени достижения пиковой концентрации тромбина достоверно связано с повышением коэффициента атерогенности ($r = 0,26$; $p = 0,01$ и $r = 0,42$; $p = 0,0001$, соответственно), а увеличение уровня эндогенного тромбинового потенциала – с возрастанием концентрации фибриногена ($r = 0,36$; $p < 0,01$).

3. Уровень эндогенного тромбинового потенциала возрастает с увеличением распространённости атеросклеротического поражения и вовлечением в процесс нескольких сосудистых бассейнов. У пациентов с поражением коронарных, брахиоцефальных артерий и артерий нижних конечностей уровень эндогенного тромбинового потенциала плазмы крови достоверно увеличен по сравнению с группой лиц без клинических проявлений атеросклероза ($p < 0,01$).

4. У пациентов с атеросклерозом увеличение количества гемодинамически значимых стенозов сосудов, подтвержденных данными инструментального обследования, приводит к росту уровня эндогенного тромбинового потенциала. Превышение уровня эндогенного тромбинового потенциала более 1968,0 нМоль/мин увеличивает риск развития многососудистого поражения в 5,2 раза.

5. С помощью модифицированного теста генерации тромбина с добавлением в реагентную смесь тромбомодулина определяется угнетение антикоагулянтной активности системы протеина С у пациентов с атеросклеротическим поражением сосудистого русла. У таких пациентов чувствительность к тромбомодулину *in vitro* снижена на 19% по сравнению с группой лиц без атеросклероза.

6. Повышение эндогенного тромбинового потенциала, измеренного с помощью теста генерации тромбина у больных со стабильной ишемической болезнью сердца до чрескожного коронарного вмешательства, увеличивает риск повторной операции реваскуляризации миокарда в 13,3 раз в течение последующих двух лет.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, кардиохирургов, кардиологов, неврологов, ангиохирургов.

1. Тест генерации тромбина может быть использован в качестве дополнительного неинвазивного метода оценки тяжести и распространённости атеросклеротического поражения сосудистого русла. Повышение уровня эндогенного тромбинового потенциала $\geq 1968,0$ нмоль/мин у пациентов с атеросклерозом является фактором риска развития многососудистого поражения.

2. У больных с атеросклерозом тест генерации тромбина и его модификация с добавлением тромбомодулина в реагентную смесь является одним из методов оценки функциональной активности антикоагулянтной системы протеина С и тромбинообразования.

3. Увеличение уровня эндогенного тромбинового потенциала $\geq 1926,0$ нмоль/мин у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца, перенесших чрескожное коронарное вмешательство, является прогностически неблагоприятным фактором риска повторной операции реваскуляризации миокарда в течение последующих двух лет и может быть основанием для индивидуализации тактики ведения таких больных.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективой дальнейшего изучения темы является проведение проспективного исследования теста генерации тромбина у пациентов с различными клиническими формами атеросклероза, увеличение групп обследованных лиц, включение в исследование пациентов с инсультом и инфарктом миокарда с целью оценки риска повторных сердечно-сосудистых событий. Кроме того, рекомендуется выполнение теста генерации тромбина в богатой тромбоцитами плазме для изучения как коагуляционного, так и тромбоцитарного звена гемостаза при атеросклеротическом поражении сосудистой стенки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований

1. Напалкова О.С. (Мельничникова О.С.) Тест генерации тромбина в динамике у пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство/ О.С. Напалкова, В.Л. Эмануэль, М. А. Карпенко, Г.А. Березовская, А.Н. Яковлев, В.А. Юдина, Е.Ю. Васильева, С.В. Лапин, А.В. Тишков, Н.А. Хышова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. - № 4 - С.40-42.
2. Напалкова О.С. (Мельничникова О.С.) Тромбин как ключевой фермент гемостаза и его роль в атеросклерозе и воспалении / О.С. Напалкова В.Л. Эмануэль, М. А. Карпенко, Т.В. Вавилова, Г.А. Березовская, А.Н. Яковлев, В.А. Юдина, Е.Ю. Васильева, С.В. Лапин // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. – 2015. – №11. - С.46-51.
3. Березовская Г.А. Интенсивность образования тромбина у больных ишемической болезнью сердца после коронарного стентирования / Г.А. Березовская, Н.Н. Петрищев, Л.П. Папаян, М.А. Карпенко, О.А. Смирнова, Т.В. Лазовская, О.С. Напалкова (О.С. Мельничникова) // Атеротромбоз. – 2015. -№ 2. - С.19-27.
4. Напалкова О.С. (Мельничникова О.С.) Оценка риска повторной операции реваскуляризации миокарда с помощью теста генерации тромбина / О.С. Напалкова, В.Л. Эмануэль, М.А. Карпенко, Т.В. Вавилова, Г.А. Березовская, А.Н. Яковлев, В.А. Юдина, Е.Ю. Васильева, С. В. Лапин, А.В. Тишков //Тромбоз, гемостаз и реология. – 2016. - № 1 - С.65-71.
5. Мельничникова О. С. Тест генерации тромбина в диагностике гиперкоагуляции у пациентов с атеросклерозом / О. С. Мельничникова, В. М. Лапина, С. В. Лапин, А.В. Тишков, В.Л. Эмануэль, Т.В. Вавилова, М.А. Карпенко // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. – 2016 – Т.4. – № 23. – С.29-33.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций

6. Napalkova O.S. (Melnichnikova O.S.) The thrombin generation test in the diagnosis of hypercoagulability in patients with atherosclerosis / O.S. Napalkova, T.V. Vavilova, V.L. Emanuel, V.M. Lapina, M.A. Karpenko, S.V. Lapin, A.V. Tishkov // International Journal of Laboratory Hematology. – 2016. – Vol.38. – p.79
7. Напалкова О.С. (Мельничникова О.С.) Тест генерации тромбина в диагностике состояния гиперкоагуляции у пациентов с атеросклерозом /О.С. Напалкова, В.Л. Эмануэль, Т.В. Вавилова, М.А. Карпенко, С.В. Лапин, В.А. Юдина // Журнал для врачей. Лаборатория. – 2016. - №1. - С.37.
8. Напалкова О.С. (Мельничникова О.С.) Эндогенный тромбиновый потенциал после чрескожных коронарных вмешательств/ В.А. Юдина, О.С. Напалкова, М. А. Карпенко, Е.Ю. Васильева, Г.А. Березовская, А.Н. Яковлев, Т.В. Вавилова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. - № 9. -С.45-46.
9. Napalkova O.S. (Melnichnikova O.S.) Hypercoagulable state associated with percutaneous coronary intervention - thrombin generation testing results/ O.S. Napalkova, V.L. Emanuel, M.A. Karpenko, G.A. Berezovskaya, A.N. Yakovlev, V.A. Yudina, E.U. Vasileva, S.V. Lapin, T.V. Vavilova //Thrombosis research. 134S2 - (2014). - S1-S103.
10. Напалкова О.С. (Мельничникова О.С.) Исследования генерации тромбина в клинической практике/ Напалкова О. С., Эмануэль В. Л., Карпенко М. А., Березовская Г. А., Яковлев А. Н., Юдина В. А., Васильева Е. Ю., Лапин С. В., Хышова Н. А.// Российский кардиологический журнал. – 2014. - № 5 (109). – приложение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБ – атеросклеротическая бляшка
АДФ – аденозиндифосфат
АКШ – аорто-коронарное шунтирование
ГА – генерализованный атеросклероз
ИМ – инфаркт миокарда
ИМТ – индекс массы тела
ИФА – иммуно-ферментный анализ
ОАНК – облитерирующий атеросклероз нижних конечностей
ОХС – общий холестерин
ОШ – отношения шансов
ППК – площадь под ROC – кривой
СД – сахарный диабет
СИБС – стабильная ишемическая болезнь сердца
СРБ – С-реактивный белок
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ТГТ – тест генерации тромбина
ТМ – тромбомодулин
ЦВЗ – цереброваскулярные заболевания
УЗДГ – ультразвуковая доплерография
ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство
ЕРСР – эндотелиальный рецептор протеина С
ЕТР – эндогенный тромбиновый потенциал
LT – время инициации свертывания
Peak thr. – пиковая концентрация тромбина
ttPeak – время достижения пиковой концентрации тромбина