

На правах рукописи

ЗОЛотоВА
Екатерина Алексеевна

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ПОСТТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКОГО
СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ С ПЕРЕНЕСЕННОЙ ТРОМБОЭМБОЛИЕЙ
ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ
Вавилова Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты:

Вереина Наталья Константиновна – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра факультетской терапии, профессор;

Силина Наталья Николаевна – кандидат медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», научно-исследовательский отдел патологии гемостаза, руководитель.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита состоится «10» июня 2025 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 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: 197345, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) регистрируется с частотой 35—40 на 100000 человек [Бокерия Л.А., 2015]. Хотя в большинстве случаев ТЭЛА разрешается без последствий, у небольшой когорты пациентов наблюдается формирование посттромбоэмболического синдрома, основные клинические проявления которого связаны с постоянными симптомами боли в груди, одышкой, усталостью, головокружениями, со снижением толерантности к нагрузке [Aggarwal V., 2023; Pugliese S.C., 2019]. Посттромбоэмболический синдром характеризуется сохранением тромботического поражения легочной артерии несмотря на проводимую антикоагулянтную терапию (стандартный курс 3 мес.) [Teerapunchaoen K., 2022], что подтверждается по результатам визуализирующих методов [Sharma M., 2021]. У 25% пациентов выявляется дилатация и/или дисфункция правого желудочка [Lachant D., 2020].

Посттромбоэмболический синдром включает две группы пациентов: с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией (ХТЭЛГ) - и с хронической тромбоэмболической болезнью (ХТЭБ) [Pugliese S.C., 2019]. Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ) является более тяжелым вариантом течения посттромбоэмболического синдрома и относится к группе орфанных заболеваний [Авдеев С.Н., 2021]. ХТЭЛГ характеризуется формированием прекапиллярной легочной гипертензии в сочетании с клиникой правожелудочковой сердечной недостаточности вследствие организации тромбов и формирования васкулопатии малого круга кровообращения [Simonneau G., 2022]. Частота формирования ХТЭЛГ после симптомной острой ТЭЛА по данным различных регистров колеблется от 0,4% до 9,1%, что в среднем составляет 3,4% (95% доверительный интервал (ДИ) 2,1-4,4%) [Pang W., 2023; Simonneau G., 2017]. Важно отметить, что по данным Европейского регистра ХТЭЛГ только 74,8% пациентов имеют в анамнезе подтвержденный эпизод ТЭЛА, что затрудняет диагностику [Wilkins H., 2018]. ХТЭЛГ является потенциально обратимым состоянием: возможны варианты хирургического вмешательства (тромбэндартерэктомия и баллонная ангиопластика ветвей легочной артерии), а при наличии противопоказаний проводится медикаментозная ЛАГ-специфическая терапия [Gerges M., 2020; Siennicka A., 2019; Yang J., 2023], поэтому ранняя диагностика заболевания является ключевым фактором успеха терапии и улучшения качества жизни пациентов.

У пациентов с ХТЭБ так же наблюдается персистирующее тромботическое поражение ЛА по результатам визуализирующих методов исследования, однако гемодинамические показатели в состоянии покоя не соответствуют критериям ЛГ, у них не развивается правожелудочковая сердечная недостаточность, что характеризуется сохранностью способности к физической нагрузке. Катетеризация правых камер сердца (КПКС) выявляет либо нормальную гемодинамику покоя, либо пограничную ЛГ (срДЛА 20–24 мм рт. ст. при легочном сосудистом сопротивлении 2–3 единиц Вуда). Распространенность данного заболевания неизвестна [Konstantinides S.V., 2020; Ramírez P., 2020].

Механизм формирования легочной гипертензии после ТЭЛА остается

неясным: происходит ли формирование ХТЭЛГ через стадию ХТЭБ с последующей трансформацией в более тяжелый вариант посттромбоэмболического синдрома, или следует выделять ХТЭБ в отдельную нозологию. В патогенезе ХТЭЛГ принято выделять два основных компонента - персистирующая обструкция ветвей легочной артерии неразрешенными тромботическими массами и формирование васкулопатии из-за асептического воспаления [Валиева З.С., 2022]. Установлено, что для пациентов с ХТЭЛГ характерно увеличение концентрации отдельных факторов свертывания крови (фактора VIII и антигена фактора Виллебранда), нарушения в фибринолитической системе [Otani N., 2023].

Вопрос патогенетических механизмов развития хронической тромбоэмболической легочной гипертензии и ее лабораторной диагностики окончательно не решен, не определены причины индивидуальной реакции пациентов на перенесенную ТЭЛА и условия формирования ЛГ. В существующих клинических рекомендациях по диагностике легочной гипертензии «Легочная гипертензия, в том числе хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия» от 2020 года отсутствуют обоснованные программы лабораторного обследования пациентов, а указанные тесты не отражают состояние системы гемостаза: рекомендовано определение уровня N-концевого фрагмента мозгового натрийуритического пропептида (NTproBNP), а также общелабораторное обследование, определение антинуклеарных антител, скрининг на антифосфолипидный синдром [Бокерия Л.А., 2015]. Однако данный алгоритм лабораторного обследования не является специфичным для ХТЭЛГ и не способен ответить на вопрос о возможных механизмах формирования патологии, найти предикторы ее развития, определить диагностические и прогностические биомаркеры для своевременного начала терапии и улучшения прогноза течения ХТЭЛГ.

Степень разработанности темы. Патогенез хронической тромбоэмболической легочной гипертензии (ХТЭЛГ) сложен и до конца не изучен. Особое внимание в генезе микрососудистого поражения при ХТЭЛГ уделяют асептическому воспалению, которое в свою очередь может быть опосредовано различными молекулярными механизмами. Учитывая противоречивые и неполные данные об изменении профиля факторов, контролирующих воспаление при ХТЭЛГ, исследования в этой области позволят определить новые терапевтические мишени для профилактики и лечения. Несмотря на достаточную изученность факторов риска развития ХТЭЛГ, остается спорным вклад в формирование патологии различных состояний. Так, до сих пор обсуждается роль тромбофилии, антифосфолипидного синдрома, ненулевой группы крови по системе АВ0. В работе Р. Prandoni было показано, что наличие любого вида тромбофилий увеличивает риск повторных тромбозов в 2,2 раза [Prandoni P., 2014]. В то же время J. Perke-Zaba доказали только значимую роль наследственной тромбофилии – носительство Лейденской мутации V фактора и мутации 20210 G/A в гене протромбина [Perke-Zaba J., 2011]. Однако рядом других авторов [Park S., 2016; Cheng Ch.-Y., 2019] корреляция с формированием ХТЭЛГ получена только для маркеров антифосфолипидного синдрома. Также в некоторых работах обсуждается отсутствие необходимости скрининга на протромботические состояния [Kyrle

Р.А., 2014]. Lang I.M. с коллегами показала, что развитие ХТЭЛГ может быть связано с «неклассической» тромбофилией, а классические факторы риска тромбоэмболии у пациентов не выше, чем в популяции [Lang I.M., 2016]. Более высокие уровни фактора VIII, антигена фактора Виллебранда и антифосфолипидные антитела были выявлены в большинстве исследований.

Также было показано, что воспаление способствует развитию ХТЭЛГ. У больных концентрация С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина 10 (ИЛ-10) и матриксной металлопротеиназы 9 (ММР-9) выше, чем у доноров, а при исследовании операционного материала, полученного при тромбэндартерэктомии, выявляется более высокий уровень нейтрофилов и макрофагов [Morris T.A, 2006; Sharma S., 2018; Simonneau G., 2018].

Разнородность полученных результатов обуславливает необходимость исследования лабораторных маркеров у пациентов с посттромбоэмболическим синдромом.

Цель исследования. Определить лабораторные маркеры, ассоциированные с разными вариантами течения посттромбоэмболического синдрома у больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать состояние плазменного гемостаза и воспалительной реакции у больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии, с разными вариантами течения посттромбоэмболического синдрома.
2. Изучить состояние системы фибринолиза (TAFI, t-PA, PAI-1) у больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии, с разными вариантами течения посттромбоэмболического синдрома.
3. Охарактеризовать популяцию внеклеточных везикул методом проточной цитометрии и в тесте генерации тромбина у больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии, с разными вариантами течения посттромбоэмболического синдрома.
4. Определить взаимосвязь наличия тромбофилии, антифосфолипидного синдрома и ненулевой группы крови с развитием посттромбоэмболического синдрома у больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии, с разными вариантами течения посттромбоэмболического синдрома.

Научная новизна исследования. Впервые дана комплексная лабораторная характеристика пациентов с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией и хронической тромбоэмболической болезнью, включающая исследование системы свертывания и фибринолиза, а также анализ маркеров воспаления. Проведена оценка гемостатического потенциала плазмы у больных с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией и хронической тромбоэмболической болезнью в тесте генерации тромбина с применением реагента с высоким содержанием тканевого фактора.

Показано отсутствие ассоциации хронической тромбоэмболической болезни с указанными факторами с антифосфолипидным синдромом, наследственной тромбофилией и ненулевой группой крови..

Описан фенотип циркулирующих внеклеточных везикул у пациентов с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией и хронической тромбоэмболической болезнью и показана ассоциация с лабораторными и

клиническими параметрами. Проанализированы концентрация и размер внеклеточных везикул с помощью нанотрекингового анализа. Охарактеризована активность внеклеточных везикул в тесте генерации тромбина в модификации без добавления тканевого фактора в реагентную смесь.

Впервые определено значение cut-off концентрации тканевого активатора плазминогена для разграничения вариантов течения посттромбоэмболического синдрома.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Представлена лабораторная характеристика пациентов с разными вариантами течения посттромбоэмболического синдрома (хронической тромбоэмболической легочной гипертензией и хронической тромбоэмболической болезнью).

Установлено, что повышение уровня моноцитарного хемотаксатантного белка 1 у больных с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией и концентрации матриксной металлопротеиназы 9 у пациентов с хронической тромбоэмболической болезнью указывает на роль воспалительной реакции в формировании и прогрессировании посттромбоэмболического синдрома.

Установлено, что у пациентов с перенесенной тромбоэмболией легочной артерии наблюдается увеличение активности ф.VIII и концентрации антигена фактора Виллебранда, носящие вторичный характер за счет воспалительной реакции.

Увеличение концентрации тканевого активатора плазминогена, эндотелина-1, антигена фактора Виллебранда и содержания внеклеточных везикул эндотелиального происхождения указывают на повреждение эндотелия и представляют информацию для комплексной оценки выраженности эндотелиальной дисфункции у пациентов с разными вариантами течения посттромбоэмболического синдрома после перенесенной тромбоэмболии легочной артерии.

Показано, что для улучшения диагностики посттромбоэмболического синдрома у больных с перенесенной тромбоэмболией легочной артерии возможно использовать измерение уровня тканевого активатора плазминогена в рутинной лабораторной практике.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование выполнено как обсервационное наблюдение «случай-контроль». При проведении работы использовались современные методы лабораторной диагностики: исследование концентрации маркеров воспаления и системы фибринолиза проводилось методом иммуноферментного анализа, исследовалась активность ф.VIII и концентрация антигена фактора Виллебранда, измерение концентрации D-димера методом иммунотурбидиметрии с латексным усилением, измерение уровня С-реактивного белка иммунохемилюминисцентным, определение уровня N-концевого мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) проводили методом электрохемилюминесценции, выполнение клинического анализа крови проводилось на гематологическом анализаторе 5-Diff. Определение показателей кривой генерации тромбина проводилось методом калиброванной автоматизированной тромбограммы. Дополнительно проводилось исследование

профиля внеклеточных везикул плазмы методом высокочувствительной проточной цитометрии

Полученные результаты исследований анализировались в соответствии с имеющимися представлениями о механизмах формирования посттромбоэмболического синдрома, а также с учетом современных данных о физиологии системы гемостаза. Полученные данные обрабатывались с помощью статистических программ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии, имеет место повышение маркеров воспаления и повреждения эндотелия, более выраженное у пациентов со сформировавшейся хронической тромбоэмболической легочной гипертензией по сравнению с больными с хронической тромбоэмболической болезнью.

2. Состояние фибринолитической системы у больных с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией характеризуется дисбалансом с повышением уровня тканевого активатора плазминогена.

3. У пациентов с посттромбоэмболическим синдромом наблюдается увеличение содержания внеклеточных везикул тромбоцитарного и эндотелиального происхождения по сравнению со здоровыми донорами, которое не зависит от использования антикоагулянтной терапии.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается достаточным и репрезентативным объемом выборки пациентов, включенных в исследование, а также использованием современных методов лабораторной диагностики и статистических программ для обработки данных. Детальный анализ полученных данных лег в основу полученных результатов научной работы.

Материалы диссертационного исследования были представлены на XXXIV International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (4 – 7 мая 2021 г., е-постер), VII Российском конгрессе лабораторной медицины (19-21 ноября 2021 г., г. Москва), VI Всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (17-20 ноября 2021, г. Москва), 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (2–3 декабря 2021, г. Санкт-Петербург), на форуме антикоагулянтной терапии FACT-bridge 2022 (8-9 сентября 2022 г., г. Москва), XXVIII Всероссийской научно-практической конференции «Наукоемкие лабораторные технологии для клинической практики» (20-22 марта 2023 г., г. Москва), IX Российском конгрессе лабораторной медицины (4-6 октября 2023 г., г. Москва), XI Всероссийском конгрессе «Легочная гипертензия - 2023» (14-15 декабря 2023 г., г. Москва), XXIX Всероссийской научно-практической конференции «Интерпретация результатов лабораторных исследований» (1-3 апреля 2024 г., г. Москва).

Публикации результатов исследования. По результатам диссертационного исследования опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в Перечень Высшей аттестационной комиссии РФ по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки), и 1 статья, входящая в Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора. Диссертант лично участвовала в планировании и организации научной работы, разработке дизайна исследования, подготовке образцов биоматериала и проведении большей части лабораторных исследований. Автор самостоятельно выполнила исследование системы гемостаза в тесте генерации тромбина, маркеров воспаления и фибринолиза методом иммуноферментного анализа, провела оценку процессов микровезикуляции методом проточной цитометрии и в тесте генерации тромбина на микрочастицах.

Все материалы, представленные в диссертационном исследовании, получены, обобщены, статистически обработаны и проанализированы автором лично.

Внедрение результатов в практику. Теоретические и практические положения, изложенные в диссертации, используются в учебном процессе кафедры лабораторной медицины с клиникой лечебного факультета института медицинского образования «НМИЦ им. В.А. Алмазова» в виде семинара для студентов «Исследование системы гемостаза», лекций для ординаторов, программ постдипломного профессионального образования «Актуальные вопросы клинической лабораторной диагностики» и «Клинические и лабораторные проблемы патологии гемостаза», в учебном процессе кафедры клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В.В. Соколовского федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в виде семинара для студентов «Исследование системы гемостаза». Оценка системы гемостаза в тесте генерации тромбина внедрена в практику работы центральной клиничко-диагностической лаборатории «НМИЦ им. В.А. Алмазова».

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, иллюстрирована 13 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы (включает 10 отечественных и 166 зарубежных источников).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 123 пациента от 18 лет и старше, перенесшие ТЭЛА не менее 3 месяцев до включения в исследование. ТЭЛА подтверждалась по результатам мультисрезовой компьютерной ангиопульмонографии. Критерии не включения: наличие сопутствующей аутоиммунной патологии, гипо-/гипертиреоза, активное онкологическое заболевание, семейный анамнез тромбозов, беременность.

Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

В соответствии с вариантом течения посттромбоэмболического синдрома и на основании функциональных тестов и инструментального обследования пациенты были разделены на три группы:

1. Группа ХТЭЛГ (n=94, 48 женщин, 46 мужчин, медиана возраста 56,0 [43,5-67,0] лет) с верифицированной прекапиллярной легочной гипертензией, получающих антикоагулянтную терапию эноксапарином натрия в дозе 1 мг/кг два

раза в день (n=94). В процессе динамического наблюдения повторно была обследована группа из 33 пациентов (через 6 мес.) на фоне подобранной пероральной антикоагулянтной терапии (варфарин – 23 пациента, ривароксабан в дозе 20 мг 1 раз в день – 10 пациентов).

2. Группа ХТЭБ (n=19, 9 женщин, 10 мужчин, медиана возраста 44,0 [39,0-61,0] лет), имеющих резидуальный тромбоз, но без признаков легочной гипертензии в покое, получающих антикоагулянтную терапию варфарином (n=7) и ривароксабаном в дозе 20 мг (n=12).

3. Группа ТЭЛА в анамнезе без признаков резидуального тромбоза и ЛГ (n=10, 3 женщины, 7 мужчин, медиана возраста 57,0 [41,5-72,3] лет), получающих антикоагулянтную терапию ривароксабаном в дозе 20 мг.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов с посттромбоэмболическим синдромом,
Me [Q1-Q3]

Показатель	ХТЭЛГ (n=94)	ХТЭБ (n=19)
Возраст, годы	56,0 [43,5-67,0]	44,0 [39,0 - 61,0]
Жен/муж	48/46	9/10
0-II/III-IV ФК NYHA	26/68	19/0
дистанция в Т6МХ, м	320,0 [258,0 – 390,0]*	500,0 [438,5 - 507,5]
Ненулевая группа крови (AB0), %	83,3	80
Данные лабораторного обследования		
NT-proBNP, пг/мл	911,5 [172,0 – 2069,0]*	50,0 [24,8 - 79,5]
Наличие факторов риска тромбообразования		
АФС	n=7	n=1
Наследственная тромбофилия	7 - мутация FV Leiden (гетерозигота) 4 - мутация FII G20210A (гетерозигота)	-
Эхокардиографические данные		
Площадь ПП, см ²	26,0 [21,0 – 33,0]*	20,0 [16,5 – 22,0]
РСДЛА, мм. рт. ст	85,0 [67,0 – 97,0]*	30,5 [28,0 – 37,0]

Примечания: апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; * - $p < 0,017$ относительно группы ХТЭБ; ФК NYHA – функциональный класс (классификация выраженности хронической сердечной недостаточности Нью-Йоркской кардиологической ассоциации; Т6МХ – тест с шестиминутной ходьбой; NT-proBNP - N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида; АФС – антифосфолипидный синдром; ПП – правое предсердие; РСДЛА – расчетное систолическое давление в легочной артерии; ХТЭЛГ – хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия; ХТЭБ – хроническая тромбоэмболическая болезнь; ЛГ – легочная гипертензия.

В контрольную группу вошли здоровые доноры без сердечно-сосудистых, аутоиммунных, воспалительных заболеваний, эпизодов кровотечений и венозных

тромбоэмболических осложнений в анамнезе (n=40, 20 женщин, 20 мужчин, возраст 50,0 [44,0 – 58,0] лет).

Указание на ТЭЛА в анамнезе было отмечено у 77,5% с ХТЭЛГ, из них у 59,5% была «массивная ТЭЛА». У всех пациентов с ХТЭБ и ТЭЛА без ЛГ есть данные о ТЭЛА в анамнезе, «массивная ТЭЛА» была выявлена у 61,5% и 60% больных, соответственно.

1. Лабораторные методы.

Общеклиническое обследование: клинический анализ крови выполнялся на анализаторе 5-Diff+ (Sysmex XN, США); измерение уровня D-димера, уровня антигена фактора Виллебранда и активности фактора VIII проводилось на анализаторе STA-Compact Max (Diagnostica Stago S.A.S., Франция), концентрации NT-proBNP - на анализаторе Cobas (Cobas 2000, Roche Diagnostics) с помощью стандартного набора Elecsys (Roche Diagnostic GmbH, Германия), уровня СРБ – на анализаторе Architect (Abbott, США).

Тестирование на тромбофилию (мутация FV Leiden, мутация G20210A FII) проводилось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени набором «Кардиогенетика тромбофилия» (ДНК-технологии, Россия). Измерялся уровень антител к кардиолипину (IgM, IgG) и антител к b2-гликопротеину-I-типа (IgM, IgG) с интервалом 12 недель методом иммунохемилюминесцентного анализа. Исследование волчаночного антикоагулянта не проводилось из-за невозможности отмены антикоагулянтной терапии.

Кровь получали путем пункции кубитальной вены в вакуумные пробирки типа Granat Acti-fine с 3,2% цитрата натрия (для изучения системы гемостаза и системы фибринолиза), K₂ЭДТА (для иммуноферментного анализа и определения внеклеточных везикул). Для последующих исследований получали бестромбоцитарную плазму, аликвоты хранили при –80°C. Образцы плазмы размораживали при 37°C на водяной бане.

Определение основных параметров кривой генерации тромбина (ТГТ) осуществлялось в тесте генерации тромбина в двух вариантах:

1. на автоматическом коагулометре с оптическим модулем Ceveron Alpha TGA (Technoclone, Австрия) с использованием реагента RCHigh (с высоким содержанием тканевого фактора в реагентной смеси – для пациентов, получающих антикоагулянтную терапию) (Technoclone, Австрия),
2. по методу, описанному Hemker HC с соавторами [H.C. Hemker, 2002], в модификации Bidot L. и соавторов [Bidot L., 2008] (источником тканевого фактора являются внеклеточные везикулы исследуемой плазмы) на приборе Fluoroscanner Ascent (ThermoFisher SCIENTIFIC, Финляндия).

Определялись основные показатели ТГТ: максимальная концентрация тромбина в образце (Peak), нмоль/л; площадь под кривой — эндогенный тромбиновый потенциал (AUC), нмоль/л×мин; время инициации коагуляции (LagTime), мин; время достижения пика (ttPeak), мин. Скорость образования тромбина считалась по формуле: $VI = \text{Peak} / (\text{ttPeak} - \text{LagTime})$ нмоль/мин [Tripodi A., 2016].

Исследование маркеров воспаления, эндотелиальной дисфункции и системы фибринолиза проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА):

измерялся уровень интерлейкинов ИЛ-6 (Cloud-Clone Corp, Китай), ИЛ-8 (Cloud-Clone Corp, Китай), ИЛ-10 (Cloud-Clone Corp, Китай), ИЛ-18 (Abcam, США), моноцитарного хемотаксисного белка 1 (MCP-1) (Cloud-Clone Corp, Китай), матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) (Cloud-Clone Corp, Китай), эндотелина-1 (Abcam, США), активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (TAFI) (Imclone, Канада), тканевого активатора плазминогена (t-PA) (Technoclone, Австрия) и ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1) (Technoclone, Австрия) на микропланшетном фотометре MultiskanFC (ThermoFisher, США).

Выделение внеклеточных везикул (ВВ) осуществлялось набором Echo-FACS (HansaBioMed Life sciences Ltd, Эстония). Клеточную принадлежность ВВ анализировали методом проточной цитометрии (CytoFlex B4-R2-V2, Beckman Coulter, США) с использованием флуоресцентно меченных антител к клеточным маркерам (CD41-PE/Cy7, CD45-PC7, CD235a-PE и CD105-PE). Размеры, гомогенность и концентрация внеклеточных микровезикул оценивались с использованием NTA NanoSight LM10 (Malvern Instruments) анализатора. Были оценены следующие параметры: средний гидродинамический диаметр (нм) и концентрация частиц в суспензии (частиц/мл).

2. Статистические методы.

Полученные результаты анализировались в программах Statistica 12.0 (TIBCO Software Inc.) и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., США).

Нормальность распределения проверялась тестом Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q1-Q3]. При множественном сравнении использовался критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным попарным сравнением тестом Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состояние плазменного гемостаза и воспалительной реакции у пациентов после эпизода тромбоза легочной артерии, разрешившейся с формированием посттромботического синдрома

У больных с ХТЭЛГ наблюдается увеличение концентрации фибриногена и антигена фактора Виллебранда, активности фактора VIII, а у больных с ХТЭБ - изолированное повышение антигена vWF (рис. 1) по сравнению с донорами. У пациентов без ЛГ значимых различий выявлено не было. Не было показано статистически значимых различий при сравнении групп пациентов между собой. Так, уровень фибриногена достоверно повышен у пациентов с ХТЭЛГ (3,2 [2,9-3,6] г/л) относительно доноров (2,4 [2,2-2,6] г/л), $p=0,0018$. Также выявлено увеличение активности фактора VIII (165 [100-226] %) и антигена фактора Виллебранда (189 [133-248] %) по сравнению с контрольной группой (81 [73-99] %, $p<0,0001$ и 97 [72-115] %, $p<0,001$, соответственно). У больных с ХТЭБ также наблюдалось увеличение антигена фактора Виллебранда относительно здоровых обследуемых (165 [107-214] %, $p=0,002$).

Хотя в среднем активность антитромбина не отличалась в группах, у 9,5% пациентов отмечалось снижение активности антитромбина, и в целом результаты были на нижней границе референтного интервала (РИ) (РИ 83,00 – 128,00%).

По результатам корреляционного анализа было показано, что уровень

антитромбина коррелировал с некоторыми показателями инструментального исследования (ЭхоКГ и катетеризации правых камер сердца, КПКС): с индексом глобальной сократимости правого желудочка (RIMP) ($r=0,504$, $p=0,012$), уровнем насыщения крови кислородом ($SpaO_2$) ($r=0,504$, $p=0,017$). Значимая положительная корреляционная связь была получена для уровней факторов VIII и Виллебранда ($r=0,743$, $p=0,0001$).

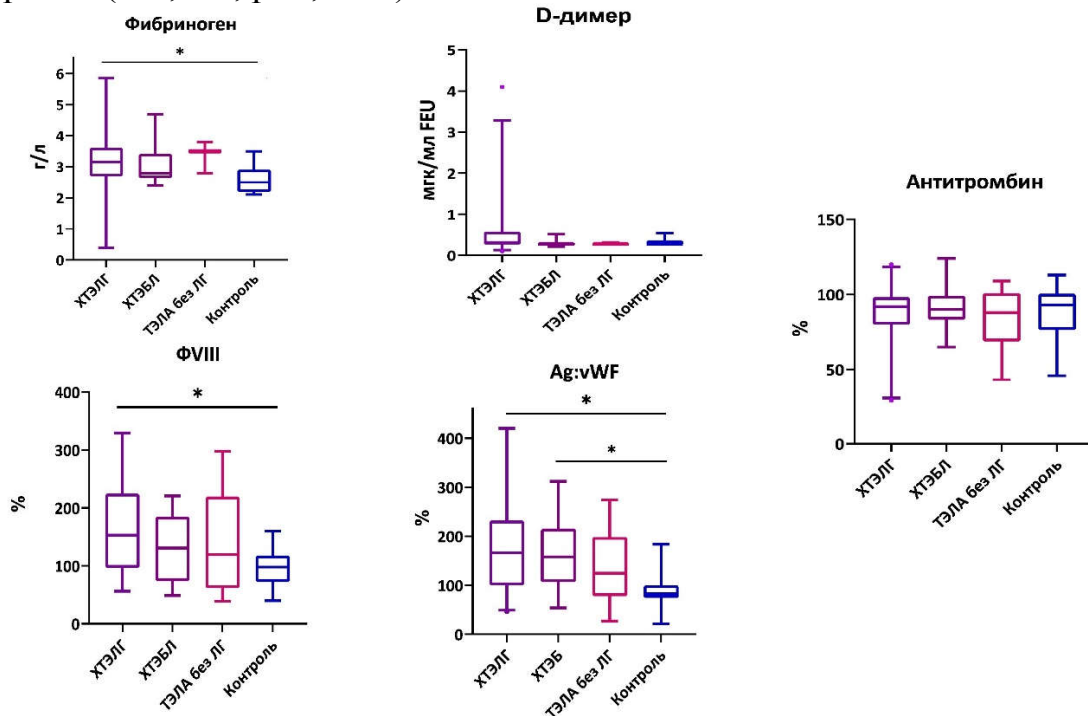


Рисунок 1. Результаты исследования маркеров системы гемостаза

Примечания: апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; * - $p < 0,0085$ по сравнению с группой доноров; FEU – фибриноген эквивалентные единицы.

По результатам исследования генерации тромбина различия в хронометрических показателях были получены только в группе ХТЭЛГ по сравнению с контролем (табл. 2). Так, времена инициации коагуляции группе ХТЭЛГ (205,00 [116,67-256,67] %) значимо увеличивалось относительно доноров (104,00 [96,00-108,00] %), $p=0,0002$.

Наблюдалось удлинение и времени достижения пиковой концентрации тромбина в тесте (135,19 [101,75-164,13] % относительно 100,0 [92,39-105,95] %, $p=0,0084$). При этом пиковая концентрация тромбина на фоне приема антикоагулянтной терапии снижалась как в группе ХТЭЛГ (47,35 [39,51-78,91] %, $p=0,0018$), так и в группе ХТЭБ (56,6 [44,5-75,6] %, $p=0,0008$) по сравнению со здоровыми донорами (107,15 [94,98-125,69]). Также было выявлено снижение обобщающего показателя – площади под кривой – в обеих группах пациентов. AUC у больных с легочной гипертензией составила 58,89 [35,44-96,20] %, $p < 0,0001$, а у пациентов с тромбоэмболической болезнью - 54,04 [29,65-79,04] %, $p=0,0006$ относительно контроля (110,26 [102,29-122,93] %). Скорость тромбообразования значимо снижалась в группах ХТЭЛГ (50,00 [21,89-109,45] %, $p=0,013$) и ХТЭБ (54,04 [29,65-79,04] %, $p=0,0049$) по сравнению с донорами (103,5 [85,4-142,4] %). Интересно, что различий между группами пациентов не

было выявлено.

Как в группе варфарина, так и в группе ривароксабана наблюдалось удлинение хронометрических показателей ГТ (табл. 3). Так, было выявлено удлинение времени инициации коагуляции в группе варфарина (265,0 [226,8-305,9] %, $p<0,0001$) и в группе ривароксабана (150,0 [129,4-245,0] %, $p<0,0001$) относительно LagTime доноров (104,0 [94,1 -111,8] %). Значимо удлинялось и время достижения пиковой концентрации тромбина в группе варфарина (200,0 [175,0 -220,5] %, $p<0,0001$) и в группе ПОАК (125,0 [158,0-209,1] %, $p<0,0001$) по сравнению с контролем (100,6 [95,2-110,7] %).

Таблица 2

Нормализованные показатели теста генерации тромбина в обследуемых группах, Ме [Q1-Q3]

Показатель	Посттромбоэмболический синдром		Контрольная группа (n=40)
	ХТЭЛГ (n=94)	ХТЭБ (n=19)	
LagTime, %	205,00 [116,67-256,67]*	124,00 [108,00-180,00]	104, 00 [96,00-108,00]
ttPeak, %	135,19 [101,75-164,13]*	122,81 [103,51-154,39]	100,00 [92,39-105,95]
Peak, %	52,66 [20,02-97,83]*	47,35 [39,51-78,91]*	107,15 [94,98-125,69]
AUC, %	58,89 [35,44-96,20]*	80,71 [52,03-91,58]*	110,26 [102,29-122,93]
VI, %	50,00 [21,89-109,45]*	54,04 [29,65-79,04]*	109,09 [86,78-142,15]

Примечания: апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; * - $p<0,017$ относительно группы контроля; LagTime - время от добавления реагента до образования стартового количества тромбина; ttPeak - время до образования максимальной концентрации тромбина; Peak - максимальное содержание тромбина в образце; AUC - площадь под кривой; VI – скорость образования тромбина.

Таблица 3

Нормализованные показатели теста генерации тромбина у пациентов ХТЭЛГ на фоне различной антикоагулянтной терапии, Ме [Q1-Q3]

Показатель	Группа варфарина (n=23)	Группа ривароксабана (n=10)	Контрольная группа (n=25)
LagTime, %	265,0 [226,8-305,9]*	150,0 [129,4-245,0]*	104,0 [94,1 -111,8]
ttPeak, %	200,0 [175,0 -220,5]*	125,0 [158,0-209,1]*	100,6 [95,2-110,7]
Peak, %	23,2 [13,3 -25,8]* [#]	45,7 [32,0-72,1]*	114,7 [99,6 -138,3]
AUC, %	34,6 [23,2-45,2]* [#]	70,7 [49,8-88,7]*	102,8 [94,6-112,8]
VI, %	16,4 [10,2-22,1]* [#]	33,7 [20,8-56,0]*	124,2 [97,4-163,2]

Примечания: апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; * - $p<0,017$ по сравнению с группой контроля; [#] - $p<0,017$ относительно группы ривариксабана; tLag – время инициации коагуляции; ttPeak – время достижения пиковой образования концентрации тромбина; Peak – пик тромбина; AUC – площадь под кривой; VI – скорость образования тромбина.

Параметр, отражающий концентрацию образовавшегося тромбина, также был статистически значимо снижен в обеих группах: 23,2 [13,3 -25,8] % в группе варфарина и 45,7 [32,0-72,1] % в группе ривароксабана, что значимо ниже, чем у доноров 114,7 [99,6-138,3] % ($p<0,0001$ и $p<0,0001$, соответственно).

Пиковая концентрация тромбина ($p=0,0007$) и скорость его образования ($p=0,0073$), а также площадь под кривой ($p=0,0003$) в группе пациентов, принимающих варфарин, были в два раза ниже, чем у больных, получающих терапию ривароксабаном, что свидетельствует о более глубоком угнетении процессов свертывания крови.

В зависимости от уровня МНО пациенты были разделены на две группы (табл. 4).

При делении на группы по уровню МНО было показано, что при достижении целевого показателя все параметры кривой генерации в 1,5-2 раза ниже. Обращает на себя внимание факт более глубокого угнетения коагуляционных свойств плазмы у пациентов даже при более низких значениях МНО, чем в группе ривароксабана. В результате корреляционного анализа получена сильная связь между параметрами ТГТ и значениями МНО. Так, при возрастании МНО наблюдается увеличение времени инициации генерации тромбина ($r=0,80$; $p<0,0001$) и снижения пиковой концентрации тромбина ($r=-0,80$; $p<0,0001$).

Таблица 4

Показатели теста генерации тромбина у пациентов с ХТЭЛГ, принимающих варфарин, в зависимости от достижения целевого МНО, Ме [Q1-Q3]

Показатель	Группа с достижением целевого МНО	Группа без достижения целевого МНО	p
LagTime, %	302,94 [270,00-328,75]	223,53 [188,24-241,18]	0,0018
ttPeak, %	210,22 [200,00-223,86]	170,45 [163,64-186,36]	0,0032
Peak, %	14,92 [11,31-24,02]	32,01 [23,25-41,68]	0,0034
AUC, %	23,99 [19,05-35,48]	47,00 [45,18-65,55]	0,0003
VI, %	11,12 [8,56-17,36]	22,37 [15,13-28,36]	0,0106

Примечания: Критерий Манна-Уитни; *iLag* – время инициации коагуляции; *ttPeak* – время достижения пиковой образования концентрации тромбина; *Peak* – пик тромбина; *AUC* – площадь под кривой; *VI* – скорость образования тромбина.

Кроме этого, получены достоверные отличия по всем показателям ТГТ при сравнении групп с достижением целевого МНО и без такового, что свидетельствует о том, что ТГТ аналогично показателю МНО может характеризовать антикоагулянтный эффект варфарина и потенциально может быть использован для оценки коагуляционного потенциала плазмы у пациентов, принимающих антикоагулянтную терапию.

У пациентов с ХТЭЛГ (2,05 [1,20-4,68] мг/л, $p=0,057$) и у пациентов с ХТЭБ (1,30 [0,91-2,20] мг/л, $p=0,784$) уровень СРБ не отличался от показателей контрольной группы (0,99 [0,43-3,00]) (рис. 2). В результате сравнения у больных с посттромбоэмболическим синдромом была выявлена тенденция к повышению уровня ИЛ-18 относительно контроля. Концентрация МСР-1 статистически

значимо увеличена только в группе ХТЭЛГ (60,19 [32,73-106,44] пг/мл) относительно контрольной группы (28,05 [23,37-34,39] пг/мл), $p=0,003$. А уровень ММР-9 повышен относительно контроля (10,24 [8,36-13,85] пг/мл) как у больных с ХТЭЛГ (14,33 [11,37-17,36] пг/мл, $p=0,022$), так и в группе ХТЭБ (16,06 [13,68-17,17] пг/мл, $p=0,015$). Различий в концентрациях циркулирующих маркеров воспаления между двумя группами пациентов выявлено не было.

У больных с ХТЭБ выявлено значимое увеличение уровня эндотелина-1 относительно контроля ($p=0,036$). В группе ХТЭЛГ также наблюдалось увеличение концентрации эндотелина-1, однако отличия не достигали статистической значимости.

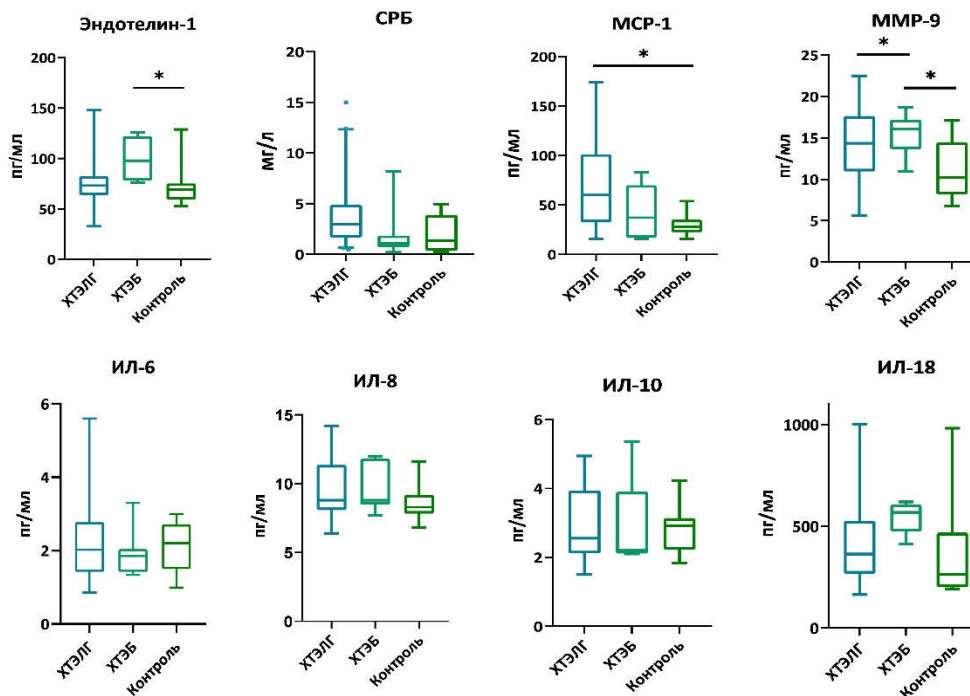


Рисунок 2. Уровни маркеров воспаления и эндотелиальной дисфункции

Примечания: апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; *- $p<0,017$ по сравнению с группой контроля СРБ – С-реактивный белок; ИЛ-6 – интерлейкин-6; ИЛ-8 – интерлейкин-8; ИЛ-18 – интерлейкин-18; МСР-1 - моноцитарный хемоаттрактантный белок-1, ММР-9 - матриксная металлопротеиназа 9.

При делении пациентов с ХТЭЛГ по степени тяжести на основании значений сердечного индекса было выявлено, что уровень МСР-1 значимо выше в группе пациентов с СИ < 2 л/мин*м² по сравнению с пациентами с СИ > 2 л/мин*м² (42,0 [35,2; 45,5] пг/мл и 30,9 [25,5; 34,9] пг/мл, $p=0,0007$, соответственно). Дополнительно о связи с тяжестью течения ХТЭЛГ свидетельствуют полученные ассоциации уровня МСР-1 и маркеров фибринолиза с показателями гемодинамики малого круга кровообращения и физической работоспособности, определяющими прогноз больного: МСР-1 и SvO₂ ($r=-0,574$, $p=0,002$), МСР-1 и СИ ($r=-0,614$, $p=0,001$). При делении пациентов по функциональному классу значимых различий не было выявлено.

По результатам гемограммы (табл. 5) у пациентов с ХТЭЛГ было выявлено

увеличение количества эритроцитов ($5,1 [4,8-5,5] \cdot 10^{12}/л$) и гемоглобина ($144,2 [128,8-157,5]$ г/л) относительно здоровых доноров ($4,6 [4,1-5,0] \cdot 10^{12}/л$ и $135,7 [124,0-145,1]$ г/л), $p=0,002$ и $p=0,064$, соответственно. Также достоверно увеличена ширина распределения эритроцитов по объему (RDW) в группе ХТЭЛГ ($13,7 [12,6-17,5]$ %) относительно группы доноров ($11,7 [11,1-12,6]$ %, $p=0,0002$).

Таблица 5

Показатели клинического анализа крови, Ме [Q1-Q3]

Показатель	Посттромбоэмболический синдром		ТЭЛА без ЛГ (n=10)	Контрольная группа (n=40)
	ХТЭЛГ (n=94)	ХТЭБ (n=19)		
HGB, г/л	144,2 [128,8-157,5]	138,9 [125,0-153,0]	134,6 [132,2-139,2]	135,7 [124,0-145,1]
RBC, $10^{12}/л$	5,1 [4,8-5,5]*	4,7 [4,4-5,0]	4,7 [4,6-4,9]	4,6 [4,1-5,0]
MCV, фл	88,1 [80,3-91,9]	87,4 [84,7-88,7]	87,4 [84,7-87,6]	88,3 [85,8-90,3]
MCH, пг	28,9 [25,4-30,5]	28,8 [28,0-29,3]	28,1 [28,0-29,0]	29,5 [28,3-30,7]
MCHC, г/л	330,0 [318,0-336,0]	328,0 [322,0-333,0]	322,0 [321,0-327,0]	331,0 [328,0-338,0]
HTC, %	43,9 [39,5-47,7]	40,8 [37,9-43,9]	41,1 [39,9-43,2]	42,4 [36,6-44,1]
RDW-CV, %	13,7 [12,6-17,5]*	11,9 [11,1-13,0]	11,3 [10,6-12,4]	11,7 [11,1-12,6]
PLT, $10^9/л$	233,5 [180,0-269,5]	248,0 [206,0-257,0]	249,0 [248,0-262,0]	214,5 [187,5-242,0]
WBC, $\times 10^9/л$	7,1 [5,8-8,7]	5,7 [4,8-6,3]	5,7 [5,1-5,8]	5,6 [5,0-6,8]
NEU, $\times 10^9/л$	3,97 [3,08-5,86]	2,79 [2,50-3,76]	3,43 [3,39-3,69]	3,00 [2,76-3,39]
LYM, $\times 10^9/л$	1,88 [1,38-2,48]	1,61 [1,20-1,90]	1,37 [1,26-1,85]	1,50 [1,25-1,98]
MON, $\times 10^9/л$	0,52 [0,40-0,67]	0,46 [0,38-0,55]	0,43 [0,39-0,43]	0,39 [0,32-0,44]
EOS, $\times 10^9/л$	0,09 [0,06-0,16]	0,09 [0,08-0,12]	0,07 [0,04-0,25]	0,14 [0,11-0,17]
BAS, $\times 10^9/л$	0,03 [0,01-0,08]	0,05 [0,04-0,09]	0,05 [0,04-0,06]	0,06 [0,05-0,08]

Примечания: апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; * - $p < 0,0085$ относительно группы контроля; HGB – уровень гемоглобина в образце; RBC – количество эритроцитов; MCV – средний объем эритроцита; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; HTC – гематокрит; RDW-CV – ширина распределения эритроцитов по объему; PLT – количество тромбоцитов; MPV – средний объем тромбоцита; PDW – ширина распределения тромбоцитов; WBC – количество лейкоцитов; NEU – относительное содержание нейтрофилов; LYM – относительное содержание лимфоцитов; MON – относительное содержание моноцитов; EOS – относительное содержание эозинофилов; BAS – относительное содержание базофилов.

Отмечается увеличение как общего количества лейкоцитов у пациентов с ХТЭЛГ (7,1 [5,8-8,7] $\cdot 10^9/\text{л}$) относительно доноров (5,6 [5,0-6,8] $\cdot 10^9/\text{л}$, $p=0,0018$), так и количества нейтрофилов у больных с ХТЭЛГ (4,6 [3,3-5,9] $\cdot 10^9/\text{л}$) по сравнению с группой контроля (3,0 [2,7-3,6] $\cdot 10^9/\text{л}$ и, $p=0,0006$). Данные изменения наблюдаются как в абсолютном, так и в процентном отношении.

Показатели гемограммы больных без легочной гипертензии не отличаются от параметров здоровых доноров.

Состояние системы фибринолиза у пациентов после эпизода тромбозмболии легочной артерии, разрешившейся с формированием посттромбозмблического синдрома

Учитывая референтный интервалы для тканевого активатора плазминогена (2-8 нг/мл), ингибитора активатора плазминогена 1 типа (17-43 нг/мл) представленный производителем, и полученные значения во всех группах, входящие в данный РИ, анализ данных производился путем сравнения результатов в различных группах. Для тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза представлен широкий РИ (40-250%), что обуславливает необходимость сравнения результатов пациентов с результатами доноров.

При исследовании маркеров фибринолиза (табл. 6) было обнаружено значимое увеличение тканевого активатора плазминогена (t-РА) в группе ХТЭЛГ: 6,1 [4,5-8,3] нг/мл в сравнении с 2,9 [2,7-3,7] нг/мл у доноров ($p=0,0001$), 3,3 [2,9-3,8] нг/мл у больных с ХТЭБ ($p=0,0002$) и 3,3 [2,9-3,4] нг/мл у пациентов без легочной гипертензии ($p=0,0008$). У пациентов была также выявлена некоторая тенденция к увеличению ингибитора активатора плазминогена 1 типа (РАI-1), но она была статистически незначимой. Различий в уровне тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза (ТАFI) в группах выявлено не было.

При этом отношение РАI-1 к t-РА хотя и снижалось у пациентов с ХТЭЛГ, различия не достигали уровня статистически значимых.

Таблица 6

Показатели системы фибринолиза, Ме [Q1-Q3]

Показатель	Посттромбозмблический синдром		ТЭЛА без ЛГ (n=10)	Контрольная группа (n=19)
	ХТЭЛГ (n=47)	ХТЭБ (n=19)		
РАI-1, нг/мл	34,4 [22,5-46,4]	31,6 [22,0-48,9]	35,9 [23,6-47,6]	24,9 [21,2-45,6]
t-РА, нг/мл	6,1 [4,5-8,3]* [#] %	3,3 [2,9-3,8]	3,3 [2,9-3,4]	2,9 [2,7-3,7]
ТАFI, %	94,7 [89,9-102,8]	98,1 [95,1-103,9]	98,5 [96,8-103,5]	92,7 [87,9-98,7]
РАI-1/t-РА	5,3 [3,3-8,7]	8,3 [6,6-13,7]	14,8 [6,7-15,3]	8,4 [6,2-13,4]

Примечания: апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; * - $p<0,0085$ по сравнению с группой доноров; # - $p<0,0085$ относительно группы ХТЭБ; % - $p<0,0085$ относительно группы ТЭЛА без ЛГ; ТАFI - активируемый тромбином ингибитор фибринолиза; t-РА - тканевой активатор плазминогена; РАI-1 - ингибитор активатора плазминогена – 1.

Отмечена слабая корреляция уровня t-PA с антигеном фактора Виллебранда ($r=0,340$, $p=0,012$) и с активностью фактора VIII ($r=0,465$, $p=0,0001$). На тяжесть течения заболевания указывает наличие корреляционных связей уровня тканевого активатора плазминогена с функциональным классом ($r=-0,512$, $p=0,00001$), дистанцией в тесте шестиминутной ходьбы ($r=-0,6974$, $p=0,006$), уровнем NT-proBNP ($r=0,554$, $p=0,0001$), данными ЭхоКГ: глобальной продольной деформацией правого желудочка (GLS RVaver) ($r=0,495$, $p=0,001$), площадью правого предсердия ($r=0,456$, $p=0,001$), данными КПКС - уровнем насыщения крови кислородом (SpaO2) ($r=-0,466$, $p=0,003$). Также были выявлены слабые корреляционные связи в уровне маркера системы фибринолиза t-PA и протромбином по Quick ($r=0,488$, $p=0,002$) и МНО ($r=-0,486$, $p=0,002$). Интересным является наличие корреляций уровня t-PA с показателями теста генерации тромбина на микрочастицах: VI ($r=-0,660$, $p=0,001$), Peak ($r=-0,592$, $p=0,002$), ETP ($r=-0,493$, $p=0,014$).

В ходе ROC-анализа было определено пороговое значение концентрации t-PA для выделения группы ХТЭЛГ, которое составило 4,7 нг/мл (AUC=0,901, 95% ДИ 0,795-0,963, $p<0,0001$, чувствительность=70,73%, специфичность=94,44 %, NPV=58,6, PPV=96,7%) (рис. 3).

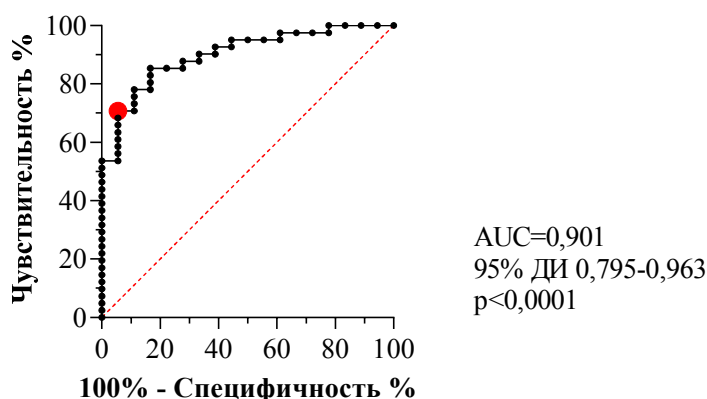


Рисунок 3. ROC-кривая и точка отсечения уровня тканевого активатора плазминогена.

Характеристика внеклеточных везикул у пациентов после эпизода тромбоэмболии легочной артерии, разрешившейся с формированием посттромбоэмболического синдрома

Фенотип циркулирующих внеклеточных везикул представлен на рисунке 4. Относительное количество внеклеточных везикул (ВВ) тромбоцитарного (CD9+CD41+) происхождения было приблизительно в 2 раза выше у пациентов с ХТЭЛГ (39,90 [27,65-52,65] %, $p=0,003$) и ХТЭБ (49,10 [28,90-64,10] %, $p=0,009$) по сравнению с донорами (27,20 [22,55-31,00] %). В то же время, количество внеклеточных везикул лейкоцитарного (CD9+CD45+) и эритроцитарного (CD9+CD235a+) происхождения у больных было ниже, чем в контрольной группе (6,15 [5,28-6,88] %). Так, уровень эритроцитарных везикул у пациентов с ХТЭЛГ составил 6,10 [4,68-7,10] %, $p=0,0006$, а у больных с ХТЭБ - 4,70 [3,90-5,20] %, $p=0,009$. Уровень внеклеточных везикул лейкоцитарного происхождения в группе ХТЭБ составил 4,80 [2,90-9,00] %, что значительно ниже уровня CD45+ВВ у доноров

(8,80 [7,48-10,88] %, $p=0,009$). Уровень эндотелиальных внеклеточных везикул (CD9+CD105+) достоверно повышался в группах ХТЭЛГ (4,75 [2,23-7,03]%, $p=0,007$) и ХТЭБ (4,40 [9,65-11,23]%, $p=0,004$) относительно контроля (1,90 [1,43-2,80]%).

Не наблюдалось достоверных различий в профиле экспрессии везикул при сравнении больных с посттромбоэмболическим синдромом между собой.

Уровень внеклеточных везикул тромбоцитарного происхождения (CD41+) коррелировал с индексом глобальной сократимости правого желудочка (RIMP) ($r=0,585$, $p=0,028$), с временем инициации коагуляции в ТГТ на частицах LagTime ($r=0,414$, $p=0,05$) и уровнем фактора VIII ($r=0,505$, $p=0,006$). Также были выявлены взаимосвязи с маркерами воспаления - уровня лейкоцитов ($r=0,516$, $p=0,005$) и MCP-1 ($r=-0,661$, $p=0,038$) и CD41+-BB, а уровень лейкоцитов ($r=0,410$, $p=0,03$) и фибриногена ($r=-0,418$, $p=0,024$) коррелировал с CD45+-BB.

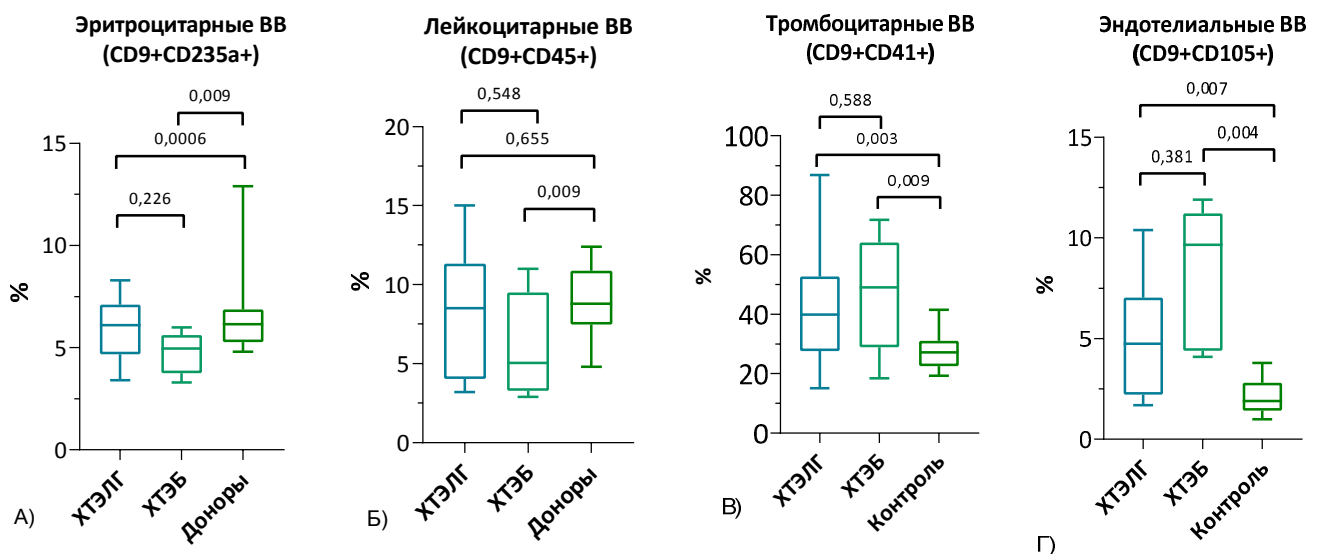


Рисунок 4. Фенотип циркулирующих внеклеточных везикул

А) Внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения; Б) Внеклеточные везикулы лейкоцитарного происхождения; В) Внеклеточные везикулы тромбоцитарного происхождения; Г) Внеклеточные везикулы эндотелиального происхождения
апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони

Интересной является ассоциация циркулирующих внеклеточных везикул с показателями теста генерации тромбина в различных модификациях. Так, были выявлены положительные корреляционные связи временных показателей ТГТ с высоким содержанием тканевого фактора в реакционной смеси: CD41+-BB и LagTime ($r=0,414$, $p=0,05$) и CD45+-BB и ttPeak ($r=0,465$, $p=0,026$). В то же время, для пиковой концентрации тромбина и для обобщающего показателя – площади под кривой генерации получены отрицательные связи с содержанием внеклеточных везикул различного клеточного происхождения: CD105+ и Peak ($r=-0,445$, $p=0,033$), CD45+ и AUC ($r=-0,519$, $p=0,011$), CD105+ и AUC ($r=-0,427$, $p=0,042$). Данный феномен может быть связан с приемом антикоагулянтной терапии и конкурентным действием избыточного количества тканевого фактора реагентной смеси. Однако при проведении ТГТ на микрочастицах получены обратные результаты – выявлены отрицательные корреляции LagTime и

эритроцитарных (CD235a+) ($r=-0,390$, $p=0,04$), лейкоцитарных (CD45+) ($r=-0,446$, $p=0,017$) и эндотелиальных (CD105+) ($r=-0,412$, $p=0,029$) везикул.

Отмечены корреляции уровня фактора VIII и тромбоцитарных везикул ($r=0,505$, $p=0,006$), фактора Виллебранда и везикул эритроцитарного происхождения ($r=-0,448$, $p=0,017$).

По результатам теста генерации тромбина (ТГТ) на микрочастицах было выявлено статистически значимое снижение пиковой концентрации тромбина (Peak) в группе ХТЭЛГ (113,1 [94,2-173,0] нмоль/л) относительно доноров (210,7 [160,8-256,9] нмоль/л), $p=0,0009$ (табл. 7). Также у пациентов с ХТЭЛГ наблюдалось снижение эндогенного тромбинового потенциала (ЕТР) (1197,5 [1058,0-1433,0] нмоль/л*мин) в сравнении с донорами (1567,8 [1491,3-1666,8] нмоль/л*мин), $p=0,0004$. Наблюдалось значимое удлинение времени инициации коагуляции (LagTime) и времени достижения пиковой концентрации тромбина (ttPeak). Так, в контрольной группе LagTime составил 10,7 [9,5-12,1] мин, а у пациентов 12,2 [11,5-15,7] мин, $p=0,013$, а ttPeak в группе ХТЭЛГ 17,2 [16,2-19,3] мин в сравнении 15,6 [13,3-17,0] мин у доноров ($p=0,016$). Также у пациентов с легочной гипертензией скорость тромбообразования была ниже, чем в контрольной группе: 31,2 [17,7-38,2] нмоль/л/мин в сравнении с (58,3 [35,9-67,7] нмоль/л/мин, $p=0,0028$).

Значимых различий в группе ХТЭБ относительно контроля и между двумя группами больных получено не было.

Удлинение временных показателей у пациентов может быть связано с приемом антикоагулянтной терапии, однако у больных не происходит полного подавления активности микрочастиц, что доказывается наличием кривой генерации.

Таблица 7

Показатели теста генерации тромбина, реагент без тканевого фактора, Ме [Q1-Q3]

Показатель	Посттромбоэмболический синдром		Контрольная группа (n=19)
	ХТЭЛГ (n=47)	ХТЭБ (n=19)	
LagTime, мин	12,2 [11,5-15,7]*	9,8 [8,8-15,0]	10,7 [9,5-12,1]
ttPeak, мин	17,2 [16,2-19,3]*	14,1 [12,7-19,8]	15,6 [13,3-17,0]
Peak, нмоль/л	113,1 [94,2-173,0]*	188,0 [155,4-228,3]	210,7 [160,8-256,9]
ЕТР, нмоль/л*мин	1197,5 [1058,0-1433,0]*	1362,5 [1192,5-1694,0]	1567,8 [1491,3-1666,8]
VI, нмоль/л/мин	31,2 [17,7-38,2]*	48,3 [27,9-68,8]	58,3 [35,9-67,7]

Примечания: апостериорный тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони; *- $p<0,017$; LagTime - время от добавления реагента до образования стартового количества тромбина; ttPeak - время до образования максимальной концентрации тромбина; Peak - максимальное содержание тромбина в образце; ЕТР - площадь под кривой (эндогенный тромбиновый потенциал; VI – скорость образования тромбина).

Взаимосвязь наличия тромбофилии, антифосфолипидного синдрома и ненулевой группы крови с развитием посттромбоэмболического синдрома у больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии

У 7 пациентов с ХТЭЛГ и 1 больного с ХТЭБ был подтвержден антифосфолипидный синдром. Из 84 обследованных с ХТЭЛГ, наследственная тромбофилия выявлена у 13% пациентов (гетерозиготное носительство мутации FV Leiden - 7 пациентов, гетерозиготное носительство мутации FII G20210A - 4 пациента) и у 1 больного с ТЭЛА без ЛГ (гетерозиготное носительство мутации FV Leiden), что выше, чем в европейской популяции (2-7%) [Сироткина О.В., 2010]. Ни у одного пациента с ХТЭБ не было обнаружено мутаций. У 4,1% пациентов ХТЭЛГ отмечалось снижение активности антитромбина.

У 83,3% обследуемых с ХТЭЛГ и у 80% больных с ХТЭБ была определена нулевая группа крови по системе АВ0. Группа крови была определена у 6 пациентов с ТЭЛА без ЛГ (у всех ненулевая группа крови). Не было выявлено статистически значимой разницы в указанных факторах в обследуемых группах.

ВЫВОДЫ

1. Состояние плазменного гемостаза у пациентов со сформировавшейся хронической тромбоэмболической легочной гипертензией характеризуется повышением активности фактора VIII, антигена фактора Виллебранда и концентрации фибриногена, а у больных с хронической тромбоэмболической болезнью – только повышением антигена фактора Виллебранда.

2. Воспалительная реакция у больных с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией проявляется увеличением концентрации моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 и матриксной металлопротеиназы 9, в то время как у пациентов с хронической тромбоэмболической болезнью имеет место повышение уровня только матриксной металлопротеиназы 9, что может рассматриваться в качестве защитной реакции для предупреждения развития легочной гипертензии.

3. Фибринолитическая система пациентов с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией характеризуется повышением уровня тканевого активатора плазминогена, коррелирующим с тяжестью течения хронической тромбоэмболической легочной гипертензии. Точкой отсечения формирования легочной гипертензии у больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии, является концентрация тканевого активатора плазминогена 4,7 нг/мл (PPV=96,7%).

4. Соотношение внеклеточных везикул у больных, перенесших тромбоэмболию легочной артерии, характеризуется повышением доли тромбоцитарных везикул в 1,4 раза и 1,8 раз, эндотелиальных внеклеточных везикул в 2,5 раза и 5 раз у больных с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией и хронической тромбоэмболической болезнью, соответственно. Антикоагулянтная терапия не уменьшает процесс микровезикуляции тромбоцитов и клеток эндотелия, независимо от варианта течения посттромбоэмболического синдрома.

5. Формирование посттромбоэмболического синдрома или разрешение

тромбоэмболии легочной артерии без последствий не связано с наличием тромбофилии, антифосфолипидного синдрома и ненулевой группой крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики и врачей-кардиологов.

1. Рекомендовано использование теста генерации тромбина с использованием реагента с высоким содержанием тканевого фактора в реагентной смеси для комплексной оценки эффективности антикоагулянтной терапии прямыми оральными антикоагулянтами у больных с хронической тромбоэмболической болезнью и хронической тромбоэмболической легочной гипертензией в случае клинической необходимости.

2. У больных с перенесенной тромбоэмболией легочной артерии рекомендовано определение уровня тканевого активатора плазминогена (t-PA) в качестве маркера для разграничения вариантов посттромбоэмболического синдрома. Выявление уровня t-PA более 4,7 нг/мл позволяет заподозрить хроническую тромбоэмболическую легочную гипертензию.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представленная научно-исследовательская работа затронула важные вопросы изучения лабораторных маркеров, ассоциированных с разными вариантами посттромбоэмболического синдрома у больных с перенесенной тромбоэмболией легочной артерии.

Дальнейшее изучение лабораторных маркеров может быть связано с определением динамики и вектора изменений концентраций моноцитарного хемоаттрактантного белка 1, антигена фактора Виллебранда и тканевого активатора плазминогена после проведения хирургического лечения.

Необходимо проведение изучения концентрации указанных маркеров у пациентов с перенесенной тромбоэмболией легочной артерии после курса антикоагулянтной терапии в расширенной группе. Увеличение обследуемой когорты пациентов позволит определить клиническую информативность маркеров и определить пороговые значения для раннего выявления патологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, для опубликования основных научных результатов диссертации по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

1. Золотова, Е. А. Исследование циркулирующих внеклеточных везикул различного клеточного происхождения и их активности у пациентов с посттромбоэмболическим синдромом / Золотова Е.А., Симакова М.А., Мельничникова О.С., Сироткина О.В., Жиленкова Ю.И., Моисеева О.М., Вавилова Т.В. // Трансляционная медицина. - 2022. - Т. 9, № 3. - С. 59-69.
2. Золотова, Е. А. Анализ межиндивидуальной вариации и референтные интервалы показателей теста генерации тромбина при использовании различных

технологий /Золотова Е.А., Мельничникова О.С., Симакова М.А., Жиленкова Ю.И., Сироткина О.В. Вавилова Т.В. // Трансляционная медицина. - 2022. - Т.9, № 5. - С. 78-86.

3. Симакова, М. А. Оценка взаимосвязи активации коагулофибринолитической системы и асептического воспаления у пациентов с длительно существующей хронической тромбоэмболической легочной гипертензией / Симакова М.А., Золотова Е.А., Жиленкова Ю.И., Мельничникова О.С., Карпов А.А., Вавилова Т.В., Моисеева О.М. // Артериальная гипертензия. - 2023. - Т. 29, № 5. С. 493–504.

Статьи в международных базах данных

4. Melnichnikova O. Reference intervals and biological variation in parameters of the thrombin generation test in healthy individuals / Melnichnikova O., Zhilenkova Yu., Lukinov V., Zolotova E., Pishchulov K., Evgina S., Simakova M., Vavilova T. // Int J Lab Hematol. - 2024. - Vol. 46, Issue 2. - pp. 336 - 344.

Авторские свидетельства, патенты

5. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023623785 Российская Федерация. Регистр пациентов с различными вариантами посттромбоэмболического синдрома № 2023623625 : заявл. 01.11.2023 : опубл. 07.11.2023 Бюл. № 11 / Е.А. Золотова, М.А. Симакова, Ю.И. Жиленкова, О.С. Мельничникова, О.В. Сироткина, Т.В. Вавилова, О.М. Моисеева; заявитель федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций

6. Золотова, Е.А. Повышение уровня внеклеточных везикул тромбоцитарного и эндотелиального происхождения у пациентов с перенесенной тромбоэмболией легочной артерии / Золотова Е.А., Жиленкова Ю.И., Сироткина О.В., Симакова М.А., Моисеева О.М., Вавилова Т.В. // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - 2021. – С. 243-246

7. Жиленкова, Ю.И. Микровезикулы клеток крови у больных с тромбоэмболическими осложнениями / Жиленкова Ю.И., Симакова М.А., Золотова Е.А., Моисеева О.М., Улитина А.С., Сироткина О.В., Вавилова Т.В. // Российский кардиологический журнал. – 2021. – Т. 26, S8. – С. 6-7.

8. Золотова, Е. А. Уровень гемоглобина как дополнительный критерий тяжести хронической тромбоэмболической легочной гипертензии / Золотова Е.А., Жиленкова Ю.И., Симакова М.А., Моисеева О.М., Вавилова Т.В. // Материалы научно-практических конференций в рамках VII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2021): сборник тезисов.-М.:Издательство «У Никитских ворот», 2021. – С. 74

9. Y. Zhilenkova, E. Zolotova, M. Simakova, O. Melnichnikova, O. Sirotkina, O. Moiseeva, T. Vavilova. Extracellular vesicles in chronic thromboembolic pulmonary hypertension/Clin Chem Lab Med 2021; 59, Special Suppl, pp S25

10. Золотова, Е.А. Роль микро-РНК в патогенезе венозных тромбоэмболических осложнений / Золотова Е.А., Симакова М.А., Жиленкова Ю.И. [и др.] // Российский журнал персонализированной медицины. – 2022 – Т. 1,

№2. – С. 43-50.

11. Мельничникова, О.С. Тест генерации тромбина как интегральный анализ системы гемостаза: технические возможности и применение в клинико-лабораторной практике / Мельничникова О.С., Жиленкова Ю.И., Золотова Е.А., Пищулов К.А., Сироткина О.В., Симакова М.А., Вавилова Т.В. // Российский журнал персонализированной медицины. – 2022. – Т. 2, № 3. – С. 119-128.

12. Карпов, А.А. Повышение уровня провоспалительных цитокинов в плазме крови у пациентов с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией / Карпов А.А., Симакова М.А., Докшин П.М., Жиленкова Ю.И., Шиленко Л.А., Золотова Е.А., Зелинская И.А., Ионова Ж.И., Галагудза М.М., Моисеева О.М. // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2023. – Т. 12, № 4. – С. 29-42.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AUC – площадь под кривой

ETP – эндогенный тромбиновый потенциал

LagTime - время инициации коагуляции

MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1

MMP-9 – матриксная металлопротеиназа-9

NT-proBNP – N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида

PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1

Peak – максимальная концентрация тромбина в образце

t-PA – тканевой активатор плазминогена

ttPeak – время достижения пиковой концентрации тромбина

vWF – антиген фактора Виллебранда

VI – скорость образования тромбина

АКТ – антикоагулянтная терапия

АФС – антифосфолипидный синдром

ВВ – внеклеточные везикулы

ГТ – генерация тромбина

ИЛ – интерлейкин

ЛАГ – легочная артериальная гипертензия

МНО – международное нормализованное отношение

МСКТ - мультисрезовая компьютерная томография легких

СИ – сердечный индекс

СРБ – С-реактивный белок

ТГТ – тест генерации тромбина

ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии

ХТЭБ – хроническая тромбоэмболическая болезнь

ХТЭЛГ – хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия