

# Тест генерации тромбина в диагностике гиперкоагуляции у пациентов с атеросклерозом

**О. С. Мельничникова**, врач КЛД клинико-диагностической лаборатории научно-методического центра по молекулярной медицине<sup>1</sup>, м.н.с. научно-исследовательской лаборатории кардиоангиологии<sup>2</sup>

**В. М. Лапина**, к.м.н., вед. научный сотрудник отдела сердечно-сосудистой хирургии<sup>1</sup>

**С. В. Лапин**, к.м.н., зав. лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний<sup>1</sup>

**А. В. Тишков**, к.ф.-м.н., доцент, зав. кафедрой физики, математики и информатики<sup>1</sup>

**В. Л. Эмануэль**, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины<sup>1</sup>

**Т. В. Вавилова**, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики и генетики<sup>2</sup>

**М. А. Карпенко**, д.м.н., проф., зам. директора по научно-лечебной работе<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

## **Thrombin generation test in diagnosis of hypercoagulability in patients with atherosclerosis**

O.S. Napalkova, V.M. Lapina, T.V. Vavilova, M.A. Karpenko, S.V. Lapin, A.V. Tishkov, V.L. Emanuel  
The First Saint Petersburg State Medical University n.a. I.P. Pavlov, the North-West Federal Medical Research Centre n.a. V.A. Almazov; Saint Petersburg, Russia

### Резюме

В результате многостадийного процесса активации прокоагулянтных и антикоагулянтных факторов происходит генерация и регуляция работы ключевого фермента гемостаза тромбина. Поэтому измерение динамики образования тромбина с помощью теста генерации тромбина (ТГТ) является интегральным методом оценки системы свертывания. В ходе работы были обследованы 102 пациента с различными клинико-морфологическими формами атеросклероза. В результате исследования ТГТ было обнаружено значимое повышение уровня эндогенного тромбинового потенциала (ETP — endogenous thrombin potential, англ.) у пациентов с атеросклеротическим поражением коронарных и брахиоцефальных артерий и артерий нижних конечностей по сравнению с пациентами, имеющих поражение только коронарных артерий ( $2104,1 \pm 441,2$  против  $1717,2 \pm 352,5$  нМоль/мин,  $p < 0,05$ ) нМоль/мин., и группой сравнения ( $2104,1 \pm 441,2$  против  $1637,0 \pm 180,2$  нМоль/мин,  $p < 0,01$ ). Также мы наблюдали у пациентов с генерализованным атеросклерозом достоверное увеличение времени инициации свертывания (LT — Lag time, англ.) ( $3,5 [3,0-3,9]$  против  $2,7 [2,4-3,0]$  мин,  $p < 0,01$ ). Таким образом, уровень ETP возрастает с увеличением тяжести атеросклеротического повреждения и вовлечением в процесс нескольких сосудистых бассейнов и может быть использован в качестве дополнительного и не инвазивного метода диагностики распространенности атеросклеротического поражения сосудистого русла.

Ключевые слова: тромбин, атеросклероз, воспаление, гиперкоагуляция.

### Summary

Generation of thrombin is the result of procoagulant and anticoagulant factors is the generation and regulation of a key enzyme of hemostasis thrombin. Therefore, measuring the formation of thrombin with thrombin generation test (TGT) is assumed an integral method of assessment of the coagulation system. We examined 102 patients with various clinical-morphological forms of atherosclerosis. It was found significant increase in endogenous thrombin potential (ETP) of thrombin in patients with coronary and brachiocephalic arteries and arteries of lower limb compared to patients suffering only coronary artery diseases ( $2104.1 \pm 441.2$  vs  $1717.2 \pm 352.5$  nmol/min,  $p < 0.05$ ). Endogenous thrombin potential (ETP) in individuals of control group was  $1637.0 \pm 180.2$  nmol/min. We have also observed increase in time of initiation of clotting (LT) in patients with generalized atherosclerosis that was  $3.5 [3.0-3.9]$  minutes vs.  $2.7 [2.4-3.0]$  minutes in the control group ( $p < 0.01$ ). Thus, thrombin potential of plasma is closely associated with the severity and extent of atherosclerotic lesions of the vascular bed and can be used as an additional diagnostic tool and non-invasive method to diagnose the severity of the damage of the vascular bed.

Key words: thrombin, atherosclerosis, inflammation, hypercoagulation.



О. С. Мельничникова



В. М. Лапина



С. В. Лапин



В. Л. Эмануэль



Т. В. Вавилова

## Введение

Атеросклероз характеризуется эндотелиальной дисфункцией, локальным воспалением сосудистой стенки и сопровождается отложением холестерина и некоторых фракций липопротеинов в интиме сосудов [15]. Атеросклероз является системным заболеванием, поскольку у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (ОАНК) повышается риск инфаркта миокарда в 4 раза, развитие инсульта в 2–3 раза по сравнению с пациентами без ОАНК [11]. Хотя развитие гиполипидемической, антитромботической, тромболитической терапии и усовершенствование оперативного эндоваскулярного вмешательства значительно повлияли на снижение смертности и инвалидности от атеросклероза, такое осложнение, как атеротромбоз, остается ведущей причиной смертности в развитых странах.

При мультифокальном атеросклерозе требуется комплексная диагностика, направленная на предотвращение прогрессирования и возникновения атеротромбоза.

Патогенез атеросклероза тесно связан с активацией системы гемостаза и формированием гиперкоагу-

ляционного состояния плазмы крови. Возникновение состояния гиперкоагуляции плазмы при атеросклерозе опосредуется дисфункцией эндотелия и активацией провоспалительных цитокинов. На сегодняшний день в клинической лабораторной практике не существует лабораторного метода для диагностики состояния гиперкоагуляции. Комплексный подход оценки генерации тромбина с помощью теста генерации тромбина (ТГТ) является одним из методов, позволяющих решить эту задачу.

Диагностическая значимость ТГТ хорошо изучена в оценке риска венозных тромбозов [5, 9, 19]. Сочетание повышенного уровня D-димера и уровня тромбинового потенциала плазмы, измеренного с помощью ТГТ, позволяет повысить оценку риска тромбоэмболических осложнений [9]. Кроме того, изучена связь повышения показателей ТГТ и возникновения риска артериальных тромбозов, обуславливающих развитие таких событий, как ИМ и инсульт [10, 7, 3, 6]. В исследовании R. Loeffen et al. обнаружили, что у пациентов с тромбозом стента после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ), показатели ТГТ были выше по сравнению с группой

пациентов без осложнений [14]. Нами также было показано, что у пациентов с повторным сердечно-сосудистым событием, в результате которого им потребовалась повторная реваскуляризация миокарда, исходно отмечался более высокий уровень эндогенного тромбинового потенциала по сравнению с пациентами, у которых первое эндоваскулярное вмешательство прошло без осложнений [2]. Также увеличение генерации тромбина наблюдается и при других заболеваниях и патологических состояниях, таких как хронические заболевания легких [21], ожирение и сахарный диабет (СД) [4, 12, 18], ревматоидный артрит [20], курение, артериальная гипертензия [16]. Таким образом, исследование ТГТ является перспективным лабораторным методом диагностики протромботических изменений системы гемостаза. Однако остается неясным, какова роль тромбинового потенциала плазмы крови в оценке тяжести течения и распространенности атеросклеротического поражения сосудов и ассоциированного с ним атеротромбоза.

**Цель нашего исследования** состояла в определении клинического значения теста генерации тромбина для диагностики гиперкоагуляции у пациентов с атеросклерозом.

## Материалы и методы

Всего были обследованы 102 пациента с атеросклерозом (74 мужчины, 28 женщин), средний возраст которых составил  $59,5 \pm 8,4$  года. Пациенты находились на обследовании и лечении в Северо-Западном федеральном медицинском исследовательском центре имени В. А. Алмазова и Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете имени академика И. П. Павлова. В зависимости от клинко-морфологической формы атеросклероза они были разделены на три группы. В I группу вошли 58 пациентов (13 женщин и 45 мужчин) средний возраст которых был  $58,0 \pm 7,2$  года, имеющие поражение только коронарных артерий и клинические проявления стабильной ишемической болезни сердца (СИБС). Во II группе были 32 пациента (12 женщин и 20

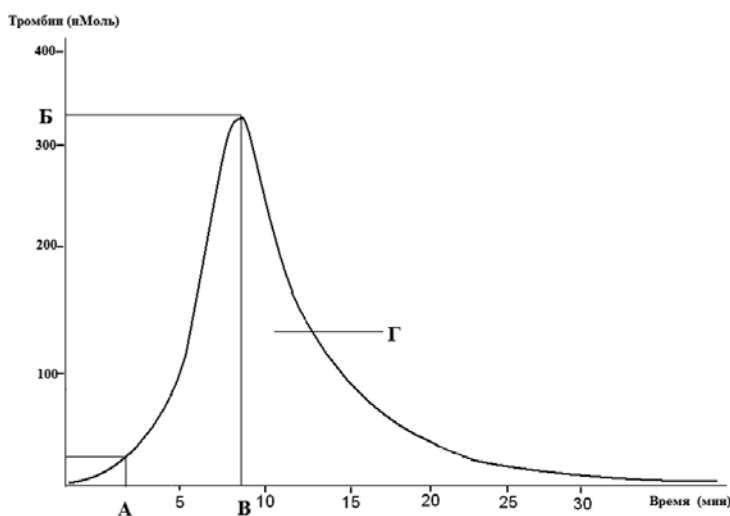


Рисунок 1. Кривая генерации тромбина и измеряемые параметры.

Примечание: А — время инициации свертывания, мин. (Lag time, LT); Б — пиковая концентрация тромбина, нМоль/л (Peak thrombin, Peakthr.); В — время достижения пиковой концентрации тромбина, мин. (Time to peak, ttPeak); Г — эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль/мин. (ETP).

Результаты исследований обрабатывали с использованием программы SPSS Statistics 17.0. Для описания количественных признаков использовались стандартные показатели описательной статистики (среднее арифметическое значение, стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ), или медиана, 25 и 75 перцентиль  $Me [Q_1-Q_3]$ ). При сравнении двух и более независимых групп, распределенных по нормальному закону, использовали дисперсионный анализ. Для сравнения переменных, не относящихся нормальному закону распределения, был использован критерий Краскела-Уолиса. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

мужчин), средний возраст которых был  $62,0 \pm 5,1$  года, с поражением коронарных и мозговых артерий и клиническими проявлениями СИБС и цереброваскулярных заболеваний (ЦВЗ). В III группу были отобраны 12 пациентов (3 женщины и 9 мужчин) среднего возраста  $62,2 \pm 7,2$  года, которые, помимо атеросклеротического поражения коронарных и брахиоцефальных артерий, имели также ОАНК.

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

Для визуализации атеросклеротических стено-окклюзирующих поражений коронарных, мозговых артерий, аорты и артерий нижних конечностей пациентам выполняли рентгеноконтрастную ангиографию и ультразвуковую доплерографию. С помощью этих исследований выявляли гемодинамически значимые стенозы, под которыми понимали сужения просвета сосуда, составляющие 75% и более, и окклюзии артерий.

Тест генерации тромбина производился амидолитическим методом на флюорогенном субстрате с использованием наборов реагентов фирмы Thrombinoscope BV (Нидерланды) на приборе Fluoroskan Ascent® производства Thermo Fisher Scientific (Финляндия). На кривой генерации тромбин рассчитывались показатели, представленные на рис. 1.

### Результаты

В результате оценки основных факторов ССЗ было обнаружено, что пациенты с атеросклерозом вне зависимости от клинической формы достоверно чаще страдают от СД, АГ, и среди них повышена встречаемость курящих по сравнению с группой без атеросклероза ( $p < 0,0001$ ). Во второй и третьей подгруппах пациентов с мультифокальным атеросклерозом наблюдается увеличение частоты больных с артериальной гипертензией на 28% по сравнению с пациентами, имеющими поражение только коронарных артерий ( $p < 0,05$ ). Также пациенты этих подгрупп достоверно старше группы лиц без атеросклероза ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

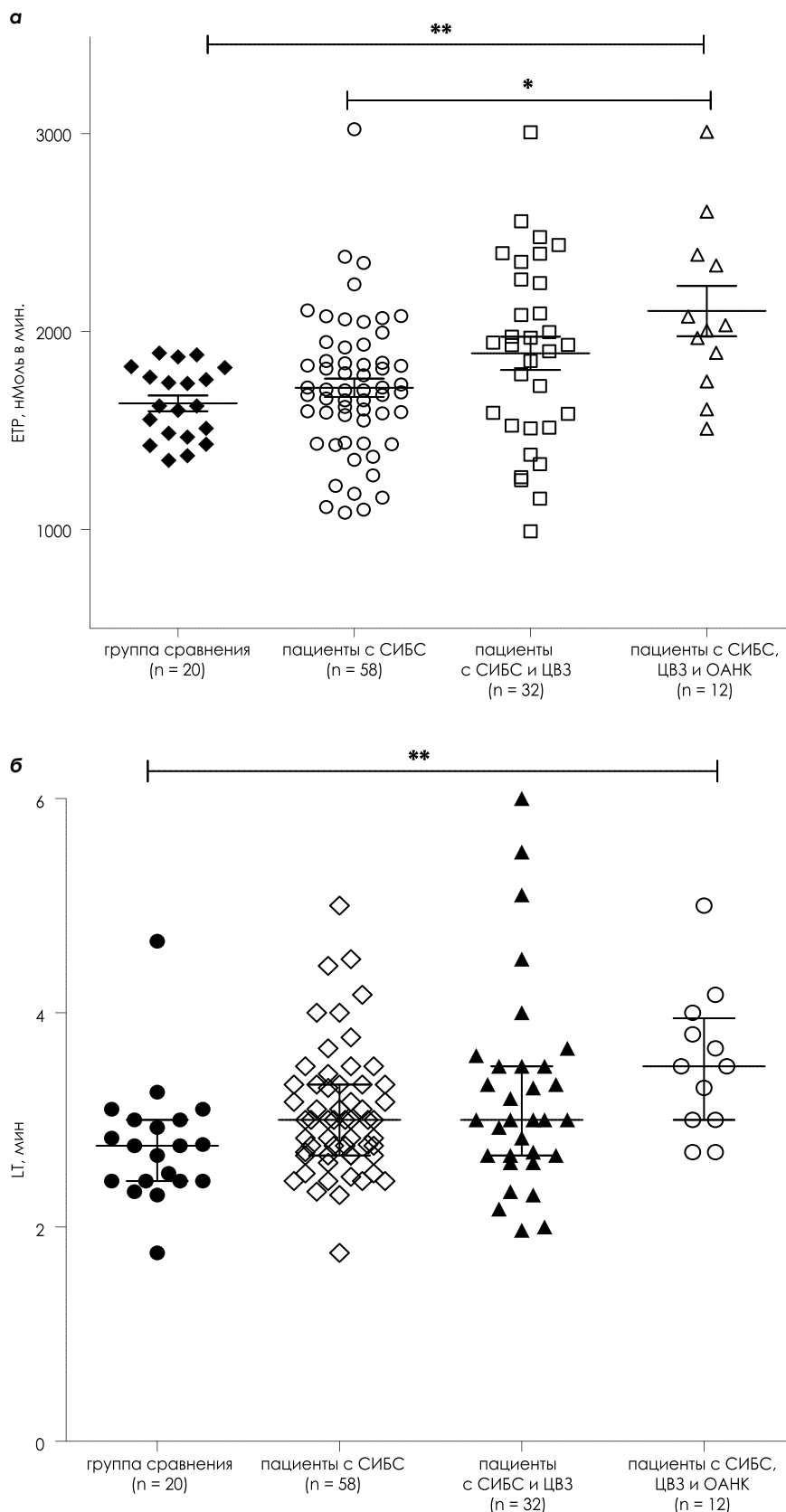


Рисунок 2. Эндогенный тромбиновый потенциал (а) и время инициации свертывания (б) у пациентов с различными клиническими формами атеросклероза и в группе сравнения. Примечание: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  по сравнению с аналогичным показателем в подгруппе пациентов с СИБС, ЦВЗ и ОАНК.

Таблица 1  
Факторы сердечно-сосудистого риска у больных с различными клиничко-морфологическими формами атеросклероза и в группе сравнения,  $M \pm SD$

Факторы риска	Группа сравнения (n = 20)	Подгруппа с СИБС (n = 58)	Подгруппа с СИБС и ЦВЗ (n = 32)	Подгруппа с СИБС, ЦВЗ и ОАНК (n = 12)
Возраст, лет	53,6 ± 6,0	58,0 ± 7,2	62,0 ± 5,1**	62,2 ± 7,2**
Общий холестерин, ммоль/л	4,3 ± 0,9	5,0 ± 0,7	4,8 ± 0,7	4,6 ± 0,7
Сахарный диабет, % (n)	0,0 (0)	25,8 (15)***	25,0 (8)***	33,3 (4)***
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	Нет данных	29,7 ± 3,5	29,3 ± 3,8	27,9 ± 4,8
Соот. по полу Ж/М, n	10/10	13/45	12/20	3/9
Артериальная гипертензия, % (n)	0,5 (1)	72,4 (42)***	100 (32)***,x	100 (12)***,x
Курение, % (n)	1,0 (2)	65,5 (38)***	68,7 (22)***	58,3 (7)***

Примечания: \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,0001$  по сравнению с аналогичным показателем в группе лиц без атеросклероза; x — по сравнению с аналогичным показателем в подгруппе пациентов с СИБС  $p < 0,05$ .

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.,  $p < 0,01$ ) (рис. 2 а). В подгруппе пациентов

с СИБС, ЦВЗ и ОАНК, по сравнению с группой лиц без атеросклероза, выявлено достоверное увеличение времени инициации свертывания ( $3,5 [3,0-3,9]$  против  $2,7 [2,4-3,0]$  мин.,  $p < 0,01$ ) (рис. 2 б).

В результате сравнения показателей коагулограммы в подгруппах обследованных пациентов было обнаружено, что АЧТВ достоверно снижено в подгруппе пациентов с СИБС

и ЦВЗ по сравнению с пациентами, имеющими только СИБС ( $p < 0,01$ ). В то же время в подгруппе пациентов с СИБС было зарегистрировано достоверное понижение процента протромбина по Квику по сравнению с группой без атеросклероза ( $p < 0,05$ ). Однако значения АЧТВ и протромбина по Квику оставались в пределах нормы во всех исследуемых подгруппах. Также 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 (рис. 3). Мы не обнаружили достоверных различий по таким показателям, как D-димер и антитромбин III.

Таким образом, пациенты с мультифокальным атеросклерозом наряду с такими факторами риска, как возраст, артериальная гипертензия и высокие значения фибриногена плазмы крови имеют повышенный уровень ЕТР и увеличение времени ЛТ.

### Обсуждение

Атеросклеротическое поражение сосудистой стенки обусловлено воспалением и дисфункцией эндотелия и приводит к формированию состояния гиперкоагуляции плазмы крови. Протромботическое состояние плазмы крови, в свою очередь, опосредует возникновение атеротромбоза, который является самой частой причиной внезапной смерти больного с атеросклерозом.

На сегодняшний день диагностика состояния гиперкоагуляции с помощью стандартных параметров

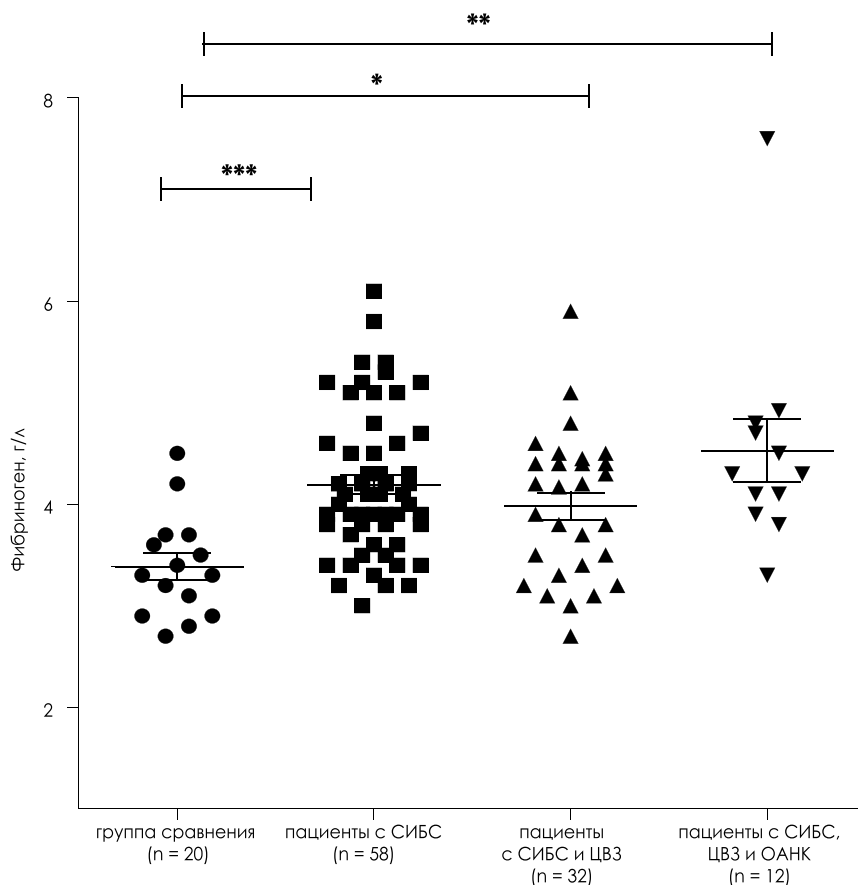


Рисунок 3. Концентрация фибриногена плазмы крови у пациентов с различными клиническими формами атеросклероза и в группе сравнения.

Примечание: \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$  по сравнению с аналогичным показателем в подгруппе лиц без атеросклероза.

коагулограммы представляется сложной задачей, так, как они косвенно оценивают тромбинемию и чаще всего остаются неизменными даже при наступлении тромбоза [13]. А такие маркеры активации тромбина, как комплекс тромбин-антитромбиновый комплекс, фрагменты протромбина, фибрин-мономер и D-димер, используются в основном для исключения диссеминированного внутрисосудистого синдрома, тромбоза глубоких вен, тромбоза эмболии легочной артерии. Однако эффективность этих показателей в определении риска атеротромбоза не доказана. Поэтому исследование генерации тромбина с помощью ТГТ для диагностики состояния гиперкоагуляции плазмы крови представляет практический интерес.

В настоящем исследовании были обследованы 102 пациента с атеросклерозом (74 мужчины, 28 женщин), средний возраст которых составил  $59,5 \pm 8,4$  года. В результате анализа ТГТ в группах пациентов с генерализованным атеросклерозом было обнаружено значимое повышение уровня ЕТР по сравнению с группой сравнения и группой больных, имеющих только СИБС.

Мы также наблюдали достоверное увеличение времени инициации свертывания (LT) у пациентов в этой группе больных. Повышение временного показателя LT мы связываем с компенсаторной активацией ингибитора пути тканевого фактора (TFPI — tissue factor pathway inhibitor, англ.). Это предположение согласуется с результатами других исследователей, которые показали, что у пациентов с нестабильным атеросклерозом на фоне дисфункции эндотелия происходит повышенная активация TFPI, в результате которой удлиняется LT [17].

В настоящем исследовании мы также отмечаем повышенный уровень фибриногена у пациентов с мультифокальным атеросклерозом. Согласно ряду крупных исследований повышенный уровень плазменного фибриногена приравнен к таким сердечно-сосудистым факторам риска, как гипертония, СД и курение [8]. В недавнем исследовании установлено, что у пациентов с СД и муль-

тифокальным атеросклерозом отмечается значимое повышение уровня С-реактивного белка, фибриногена, фактора Виллебранда и ряда других показателей по сравнению с таковыми у лиц с поражением одного сосудистого бассейна. А такие факторы, как СД, снижение функции почек, инфаркт миокард в анамнезе, курение, повышение уровня фибриногена, ассоциированы с развитием мультифокального атеросклероза в группах обследуемых лиц [1]. Вероятно, использование теста генерации тромбина в комплексе с определением уровня фибриногена повысит диагностическую значимость в оценке распространенности сочетанного атеросклеротического поражения нескольких сосудистых бассейнов.

Таким образом, пациенты с мультифокальным атеросклерозом наряду с такими факторами риска, как возраст, артериальная гипертензия и высокие значения фибриногена плазмы крови, имеют повышенный ЕТР и увеличение временного показателя ТГТ- LT. Это наблюдение свидетельствует о взаимосвязи состояния гиперкоагуляции, диагностируемой с помощью ТГТ, и распространенности атеросклеротического поражения сосудистого русла. Однако необходимы дальнейшие стандартизация данного метода и изучение его диагностической значимости для внедрения ТГТ в широкую клиническую практику.

#### Список литературы

1. Грачева С. А., Глазунова А. М., Клефторова И. И., Мелкозеров К. В. (2014). «Распространенность и факторы риска атеросклеротического поражения экстракоронарных артерий у больных сахарным диабетом с подтвержденным коронароангиосклерозом». Кардиология 2. 2014.
2. Напалкова О. С., Эмануэль В. Л., Карпенко М. А., Вавилова Т. В., Березовская Г. А., Яковлев А. Н., Юдина В. А., Васильева Е. Ю., Лапин С. В. (2016). «Оценка риска повторной операции реваскуляризации миокарда с помощью теста генерации тромбина». Тромбоз, гемостаз и реология 1: 65–71.
3. Al Dieri, R., B. de Laat, et al. (2012). Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev.* 26 (5): 197–203.
4. Beijers, H.J., I. Ferreira, et al. (2010). Body composition as determinant of thrombin generation in plasma: the Hoorn study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (12): 2639–2647.
5. Besser, M., C. Baglin, et al. (2008). High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis

is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J. Thromb. Haemost.* 6 (10): 1720–1725.

6. Campo, G., R. Pavasini, et al. (2012). Thrombin generation assay: a new tool to predict and optimize clinical outcome in cardiovascular patients? *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 23 (8): 680–687.
7. Carcaillon, L., M. Alhenc-Gelas, et al. (2011). Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (6): 1445–1451.
8. Dotevall, A., S. Johansson, et al. (1994). Association between fibrinogen and other risk factors for cardiovascular disease in men and women. Results from the Goteborg MONICA survey 1985. *Ann. Epidemiol.* 4 (5): 369–374.
9. Eichinger, S., G. Hron, et al. (2008). Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. *Clin. Chem.* 54 (12): 2042–2048.
10. Faber, C. G., J. Lodder, et al. (2003). Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33 (1): 52–58.
11. Faxon, D.P., M. A. Creager, et al. (2004). Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Executive summary: Atherosclerotic Vascular Disease Conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. *Circulation* 109 (21): 2595–2604.
12. Fritsch, P., M. Kleber, et al. (2010). Haemostatic alterations in overweight children: associations between metabolic syndrome, thrombin generation, and fibrinogen levels. *Atherosclerosis* 212 (2): 650–655.
13. Hemker, H.C., R. Al Dieri, et al. (2004). Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr. Opin. Hematol.* 11 (3): 170–175.
14. Loeffen, R., T. C. Godschalk, et al. (2015). The hypercoagulable profile of patients with stent thrombosis. *Heart* 101 (14): 1126–1132.
15. Loeffen, R., H. M. Spronk, et al. (2012). The impact of blood coagulability on atherosclerosis and cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost.* 10 (7): 1207–1216.
16. Rudez, G., N. A. Janssen, et al. (2009). Effects of ambient air pollution on hemostasis and inflammation. *Environ. Health Perspect.* 117 (6): 995–1001.
17. Smid, M., A. W. Dielis, et al. (2011). Thrombin generation in patients with a first acute myocardial infarction. *J. Thromb. Haemost.* 9 (3): 450–456.
18. Tripodi, A., A. Branchi, et al. (2011). Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *J. Thromb. Thrombolysis.* 31 (2): 165–172.
19. Tripodi, A., C. Legnani, et al. (2008). High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* 6 (8): 1327–1333.
20. Undas, A., M. Gissel, et al. (2010). Thrombin generation in rheumatoid arthritis: dependence on plasma factor composition. *Thromb. Haemost.* 104 (2): 224–230.
21. Undas, A., M. Jankowski, et al. (2011). Thrombin generation in chronic obstructive pulmonary disease: dependence on plasma factor composition. *Thromb. Res.* 128 (4): e24–28.