

На правах рукописи

ОХОТА СЕРГЕЙ ДЕНИСОВИЧ

**АДГЕЗИЯ ТРОМБОЦИТОВ, ОПОСРЕДОВАННАЯ ФАКТОРОМ ФОН
ВИЛЛЕБРАНДА, У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМ РАЗВИТИЕМ
ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА**

Кардиология – 3.1.20

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Козлов Сергей Геннадьевич

Официальные оппоненты:

Арабидзе Григорий Гурамович, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой терапии и подростковой медицины терапевтического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Орлова Яна Артуровна, доктор медицинских наук, заведующая отделом возраст-ассоциированных заболеваний обособленного подразделения Медицинский научно-образовательный центр ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.029.02 по присуждению ученой степени кандидата медицинских наук ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России по адресу: 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России и на сайте в сети Интернет: <https://cardioweb.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Ускач Татьяна Марковна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности.

Вероятность возникновения ишемической болезни сердца (ИБС) увеличивается с возрастом. Однако она может возникать у лиц молодого возраста, а ее первым проявлением часто является инфаркт миокарда (ИМ) [Gulati R. и др., 2020]. Существующие способы оценки риска возникновения ИБС преимущественно основаны на обнаружении и количественной оценке общепринятых факторов риска ИБС. По данным ряда исследований, у пациентов с ранним развитием ИБС ведущими факторами риска являются курение, повышенные значения общего холестерина (ОХС) и холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП), отягощенная наследственность в отношении ИБС, тогда как у пациентов старшего возраста чаще встречается артериальная гипертензия (АГ) и сахарный диабет (СД) [Qureshi W.T. и др., 2021]. Тем не менее, возникновение ИБС возможно в отсутствие традиционных факторов риска. С другой стороны, наличие даже нескольких факторов риска не всегда приводит к возникновению ИБС. В связи с этим актуальным является проведение исследований, направленных на поиск иных, чем традиционные факторы риска, факторов, наличие которых у пациента будет свидетельствовать о повышенном риске развития ИБС.

В патогенезе ИБС чрезвычайно важную роль играет система гемостаза, в том числе, возникновению ИБС и развитию ее осложнений способствует повышенная склонность к тромбообразованию. В этом процессе активное участие принимает фактор фон Виллебранда (ФВ). ФВ – белок плазмы, который является связующим звеном между тромбоцитами и субэндотелиальным коллагеном в местах повреждения эндотелия. В ряде крупных исследований была обнаружена прямая связь между уровнем ФВ и возникновением неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ИБС [Ray K.K. и др., 2005]. Ряд исследований не обнаружили связи между уровнем ФВ и ИБС у пациентов с ранним ее развитием [George R. и др., 2016]. В противоположность этому, опубликованы исследования, в которых уровень ФВ был выше у пациентов с ранним развитием ИБС, в сравнении с пациентами контрольной группы, и являлся дополнительным фактором риска развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [Алексеева И.В. и др., 2022].

В подавляющем большинстве исследований, в которых изучалась связь между ИБС и ФВ, проводилось измерение его уровня в плазме крови с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Тем не менее, подобный подход имеет выраженные ограничения. ФВ существует в кровотоке в одной из двух конформаций – глобулярной и развернутой. Конформация ФВ зависит от скорости сдвига в сосудах. При низких скоростях сдвига (например, в венах, где скорости сдвига равны $15-200 \text{ c}^{-1}$, или в крупных артериях, где скорости сдвига равны $300-800 \text{ c}^{-1}$), ФВ остается в глобулярной конформации, который скрывает свои домены для связывания с тромбоцитами. При высоких скоростях сдвига (например, в мелких артериях и артериолах, где скорости сдвига равны $450-1600 \text{ c}^{-1}$, или в артериях с выраженным стенозированием, где скорости сдвига могут достигать $\geq 11000 \text{ c}^{-1}$) ФВ разворачивается и открывает домены связывания, в частности, с рецептором гликопротеином Ib/IX/V (GPIb) тромбоцитов – единственным рецептором на неактивированных тромбоцитах, взаимодействующим с ФВ. ИФА показывает общее содержание в плазме крови всех мультимеров ФВ, от сверхбольших мультимеров до мультимеров, состоящих из нескольких димеров, но не дает представления о том, каково соотношение функционально активных и неактивных форм ФВ.

В последнее время использование микрофлюидных устройств для избирательной оценки различных этапов гемостаза в условиях, максимально приближенных к естественным, находит все большее распространение. Однако исследований по оценке адгезии тромбоцитов, опосредованной ФВ, у пациентов с ранним развитием ИБС до сих пор не проводилось.

С учетом участия ФВ в возникновении атеротромбоза, перспективным представляется разработка препаратов, блокирующих его взаимодействие с сосудистой стенкой и/или тромбоцитами, с последующим использованием этих препаратов в профилактике ИБС. Большинство препаратов, препятствующих возникновению атеротромбоза и используемых в первичной и вторичной профилактике ИБС, не влияют на ФВ.

Цель исследования: Изучение адгезии тромбоцитов, опосредованной фактором фон Виллебранда, у пациентов с ранним развитием ишемической болезни сердца.

Задачи исследования:

1. Сопоставить влияние блокирования взаимодействия рецепторов GPIIb с ФВ на адгезию тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС и у пациентов без ИБС.
2. Исследовать связь между уровнем ФВ в крови и адгезией тромбоцитов, опосредованной взаимодействием рецепторов GPIIb с ФВ.
3. Изучить влияние антиагрегантной терапии на адгезию тромбоцитов, опосредованную взаимодействием рецепторов GPIIb тромбоцитов с ФВ.
4. Провести сравнительный анализ факторов, связанных с ранним возникновением ИБС.

Научная новизна. Впервые изучено влияние блокирования рецепторов GPIIb при повышенной скорости сдвига на адгезию тромбоцитов к коллагену в условиях, приближенных к естественным, у пациентов с ранним развитием ИБС и у пациентов без ИБС. Полученные данные свидетельствуют о том, что у пациентов с ранним развитием ИБС выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ в 2,6 раза больше, чем у пациентов без ИБС. Впервые оценена связь между уровнем ФВ в крови и ФВ-опосредованной адгезией тромбоцитов к коллагену у пациентов с ранним развитием ИБС. Уровень ФВ в крови не влияет на адгезию тромбоцитов, опосредованную взаимодействием рецепторов GPIIb тромбоцитов с ФВ. Впервые изучена связь между приемом антиагрегантной терапии и уровнем ФВ у пациентов с ранним развитием ИБС и у пациентов без ИБС. Результаты исследования продемонстрировали, что уровень ФВ не влияет на адгезию тромбоцитов, опосредованную взаимодействием рецепторов GPIIb с ФВ. Впервые изучено влияние антиагрегантной терапии на адгезию тромбоцитов к коллагену в условиях, приближенных к естественным, у пациентов с ранним развитием ИБС и у пациентов без ИБС. Полученные данные свидетельствуют о том, что исходная адгезия тромбоцитов и адгезия тромбоцитов после блокирования GPIIb тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС, принимающих клопидогрел или комбинацию ацетилсалициловой кислоты (АСК) с ингибитором P2Y₁₂ (клопидогрел или тикагрелор) меньше, чем у пациентов с ранним развитием ИБС, принимающих АСК. Режим антиагрегантной терапии (АСК, клопидогрел или комбинация АСК с ингибитором P2Y₁₂ - клопидогрелом или тикагрелором) не влияет на опосредованную

GPIb адгезию тромбоцитов. Впервые проведен сравнительный анализ факторов, связанных с ранним возникновением ИБС. С поправкой на факторы риска, выраженность изменения адгезии тромбоцитов $\geq 45\%$ после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIb с ФВ увеличивает вероятность выявления ИБС у мужчин в возрасте до 55 лет и у женщин в возрасте до 65 лет. Из факторов риска независимо были связаны с повышенной вероятностью выявления ИБС злостное курение, мужской пол и возраст.

Практическая значимость. Продемонстрирована возможность использования оригинального микрофлюидного устройства для исследования адгезии тромбоцитов к коллагену, опосредованной взаимодействием рецепторов GPIb тромбоцитов с ФВ, у пациентов с ИБС с целью оценки начального этапа тромбообразования. Показана связь между рано развившейся ИБС и выраженностью взаимодействия ФВ с рецепторами GPIb тромбоцитов при умеренном повышении скорости сдвига. С учетом результатов настоящего исследования, перспективным представляется использование оригинального микрофлюидного устройства для изучения препаратов, блокирующих взаимодействие ФВ с сосудистой стенкой и/или тромбоцитами.

Методология и методы исследования. В исследование было включено 84 пациента со стабильной ИБС, у которых при коронароангиографии (КАГ) было выявлено поражение коронарных артерий, приводящее к уменьшению на 50% и больше диаметра просвета ствола левой коронарной артерии и/или магистральной коронарной артерии и/или ветви второго порядка диаметром более 2 мм. В контрольную группу вошли 64 пациента (26 мужчин в возрасте до 55 лет и 38 женщин в возрасте до 65 лет), не имеющих типичных клинических проявлений ИБС, у которых не было выявлено стенозирующего коронарного атеросклероза при КАГ и/или компьютерной томографической ангиографии (КТА) коронарных артерий. Проведено сравнение уровня ФВ в плазме крови в зависимости от факторов риска ИБС, группы крови и режима антиагрегантной терапии. С помощью оригинального микрофлюидного устройства проводилось измерение адгезии тромбоцитов к коллагену в реальном времени в условиях повышенной скорости сдвига. Блокирование рецепторов GPIb с помощью мАт позволяло оценить выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов

GPIb с ФВ. Результаты измерений сопоставляли у пациентов с ИБС и без этого заболевания. Определяли зависимость адгезии тромбоцитов от факторов риска ИБС, уровня ФВ и режима антиагрегантной терапии. С помощью ROC-анализа определялось отрезное значение выраженности изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIb с ФВ в прогнозировании наличия рано возникшей ИБС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Блокирование рецепторов GPIb тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС приводит в 2,6 раза большему, чем у пациентов без ИБС, снижению выраженности адгезии тромбоцитов к коллагену в условиях повышенной скорости сдвига.
2. Уровень ФВ не влияет на адгезию тромбоцитов, опосредованную взаимодействием рецепторов GPIb с ФВ.
3. Адгезия тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС, принимающих клопидогрел или комбинацию АСК с ингибитором P2Y₁₂ (клопидогрел или тикагрелор) меньше, чем у пациентов с ранним развитием ИБС, принимающих АСК. Режим антиагрегантной терапии (АСК, клопидогрел или комбинация АСК с ингибитором P2Y₁₂ - клопидогрелом или тикагрелором) не влияет на опосредованную GPIb адгезию тромбоцитов.
4. У мужчин в возрасте до 55 лет и у женщин в возрасте до 65 лет выраженность изменения адгезии тромбоцитов $\geq 45\%$ после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIb с ФВ вне зависимости от факторов риска связана с повышенной вероятностью выявления ИБС (ОШ 6,3; 95% ДИ 2,4-16,2; $p < 0,001$). Из основных факторов риска ИБС с повышенной вероятностью выявления ИБС у мужчин в возрасте до 55 лет и у женщин в возрасте до 65 лет независимо связаны: злостное курение (ОШ 6,1; 95% ДИ 1,7-25,4; $p = 0,01$), мужской пол (ОШ 3,4; 95% ДИ 1,2-10; $p = 0,02$) и возраст (ОШ 1,1; 95% ДИ 1-1,14; $p = 0,02$).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов определяется достаточным количеством исследуемого материала, проведением тщательного анализа и статистической обработки полученных данных. Сформулированные в диссертации выводы, положения и рекомендации

аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов выполненных исследований. Материалы диссертации были доложены на межотделенческой конференции по апробации кандидатских диссертаций института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова (ИКК им. А.Л. Мясникова) ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России 19 мая 2023 года, протокол №99.

Внедрение в практику. Результаты исследования внедрены в практику лаборатории клеточного гемостаза института экспериментальной кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова».

Личный вклад автора. Автор данного исследования осуществлял отбор пациентов в соответствии с заданными критериями включения и исключения, проводил опрос пациентов и анализировал медицинскую документацию, заполнял базу данных. Проводил эксперименты с цельной кровью по изучению адгезии тромбоцитов с помощью микрофлюидного устройства. Осуществлял статистическую обработку полученных данных, проводил анализ и оформление результатов в виде научных публикаций и докладов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных статей, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 5 в журналах, рецензируемых Scopus.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 140 страницах машинописного текста и состоят из введения, обзора литературы, клинической характеристики и методов исследования больных, результатов исследования и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включившего в себя 255 источника. Материалы иллюстрированы 7 таблицами и 21 рисунком.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В группу пациентов с ранним развитием ИБС было включено 84 пациента со стабильной ИБС (62 мужчины в возрасте до 55 лет с манифестацией ИБС до 50 лет, а также 22 женщины в возрасте до 65 лет с манифестацией ИБС до 60 лет), у которых при КАГ было выявлено поражение коронарных артерий, приводящее к уменьшению

на 50% и выше диаметра просвета ствола левой коронарной артерии и/или магистральной коронарной артерии и/или ветви второго порядка диаметром более 2 мм. В контрольную группу было включено 64 пациента (26 мужчин в возрасте до 55 лет и 38 женщин в возрасте до 65 лет), не имеющих типичных клинических проявлений ИБС, у которых не было выявлено стенозирующего коронарного атеросклероза при КАГ или КТА коронарных артерий. Решение о проведении КАГ и КТА коронарных артерий принималось лечащими врачами пациентов.

В исследование не включали пациентов с семейной ГХС; уровнем ХС ЛНП >4,9 ммоль/л; нестабильной стенокардией; в первые 2 месяца после перенесенного ИМ, шунтирования или ангиопластики коронарных артерий; с сердечной недостаточностью III-IV функционального класса по классификации выраженности хронической сердечной недостаточности Нью-Йоркской кардиологической ассоциации; фракцией выброса левого желудочка <40%; постоянной формой фибрилляции/трепетания предсердий; умеренным и тяжелым стенозом устья аорты или левого атриовентрикулярного отверстия; наследственными и приобретёнными коагулопатиями; злокачественными новообразованиями; клиническими и лабораторными признаками острого инфекционного заболевания в течение 2-х предшествующих месяцев.

У всех включенных в исследование пациентов оценивали наличие факторов риска ИБС. У пациентов с ранним возникновением ИБС оценивали распространенность факторов риска, первые проявления ИБС, результаты КАГ. У всех включенных в исследование пациентов был измерен уровень ФВ в плазме крови. Оценена связь между уровнем ФВ и наличием ИБС, факторами риска ИБС, группой крови пациентов и режимом антиагрегантной терапией.

Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России (протокол №262 от 30 ноября 2020 г.).

Методика определения биохимических показателей. Забор венозной крови проводился из локтевой вены в утренние часы натощак. Содержание ОХС, триглицериды и ХС ЛВП определяли ферментативным способом на биохимических анализаторах Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Швейцария) и Architect C-8000 (Abbott, США). Уровень ХС ЛНП рассчитывали по формуле Фридвальда: $\text{ХС ЛНП} = \text{ОХС} -$

ХС ЛВП - триглицериды/2,2, ммоль/л). Определение уровня ФВ в крови выполняли в лаборатории клеточной адгезии ИЭК им. ак. В.Н. Смирнова ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России. Для определения уровня ФВ использовались пробирки, содержащие 0.106 моль/л цитрата натрия. Кровь в пробирках с цитратом натрия центрифугировалась до получения бедной тромбоцитами плазмы на протяжении 15 мин при скорости 6000 оборотов в минуту (ускорение – 2000 g). Измерение количества антигена ФВ в образцах плазмы проводилось методом ИФА. Единицы измерения концентрации ФВ в плазме – % от нормального содержания (50-200%) [Власик Т.Н. и др., 2006]. Все эксперименты с измерением адгезии тромбоцитов проводились в течение 2-х часов после забора крови. Для измерения адгезии тромбоцитов цельная кровь из пробирки, содержащая 100 мкмоль/л D-фенилаланил-L-пролил-L-аргинин хлорметилкетона в объеме 580 мкл помещалась в микропробирку объемом 1,5 мл.

Измерение адгезии тромбоцитов с помощью микрофлюидного устройства.

Микрофлюидное устройство, используемое в исследовании, состоит из проточной камеры с оптической подложкой с коллагеновым покрытием, системы обеспечивающую движение крови через проточную камеру, источника лазерного излучения, стеклянной оптической призмы, фотодетектора и аналогово-цифрового преобразователя, подключенного к компьютеру. В качестве оптической подложки с коллагеновым покрытием использовались предметные стекла с адгезивным покрытием силан (Citoglas, Китай). Предметные стекла инкубировали с раствором коллагена крысы типа I в концентрации 0,1 мг/мл (Sigma, США) в течение 2-х часов при комнатной температуре. По завершении 2-х часов одна сторона предметного стекла очищалась от раствора коллагена с помощью дистиллированной воды. Оптическая подложка с коллагеновым покрытием помещалась на стеклянную оптическую призму микрофлюидного устройства, на которое предварительно наносилось 1-2 капли силиконового масла ПМС-5 (Rexant, РФ). С помощью прижимного механизма микрофлюидного устройства оптическая подложка с коллагеновым покрытием фиксировалась к стеклянной оптической призме образуя герметичный канал (проточная камера).

Исследование состояло из 2-х последовательных опытов.

Опыт 1. Микропробирка с цельной кровью подсоединялась к трубке, соединённой с перистальтическим насосом и проточной камерой микрофлюидного устройства. Трубка, выходящая из проточной камеры, подсоединялась обратно к микропробирке с кровью, образуя замкнутое пространство. Лазерное излучение направлялось на оптическую подложку с коллагеновым покрытием проточной камеры. При включении перистальтического насоса цельная кровь с заданной скоростью двигаясь по трубкам, проходила через проточную камеру, вновь попадая в микропробирку. Скорость сдвига при этом составляла $\approx 1300 \text{ с}^{-1}$. Лазерное излучение проникало в цельную кровь на глубину 400-600 нм, тем самым, взаимодействуя с форменными элементами крови. Это взаимодействие приводило к изменениям в интенсивности рассеянного излучения, что регистрировалось фотодетектором. Учитывая неглубокое проникновение лазерного излучения (400-600 нм), изменение интенсивности рассеянного излучения определялось, как взаимодействие (адгезия) форменных элементов крови с коллагеновым покрытием оптической подложки. Рассеивание лазерного излучения нарастало по мере увеличения количества адгезированных клеток на поверхности оптической подложки с коллагеновым покрытием. На изменение интенсивности рассеянного излучения не влияли форменные элементы крови, находящиеся в потоке. Регистрируемое фотодетектором рассеянное лазерное излучение преобразовывалось в электрическое напряжение и измерялось в милливольтках (мВ). Таким образом, нарастание электрического напряжения на выходе фотодетектора отражало увеличение степени адгезии клеток к оптической подложке с коллагеновым покрытием. Циркуляция крови в системе и регистрация сигнала фотодетектора осуществлялась в течение 16 мин. Степень адгезии тромбоцитов определяли по 15-минутному значению сигнала фотодетектора по окончании циркуляции. Запись и обработка регистрируемого фотодетектором изменения интенсивности рассеянного света производились с помощью программного обеспечения L-Graph2 версия 2.35.16 (L-CARD, РФ), которое позволяло представить эти изменения в виде графика.

Опыт 2. В новую микропробирку с цельной кровью добавляли 10 мкг/мл мАт кролика к рецепторам GPIb тромбоцитов человека (ИМТЕК, РФ) и инкубировали на протяжении 15-ти мин. Повторяли действия, описанные в опыте 1.

У всех включенных в исследование пациентов проведена оценка адгезии тромбоцитов к покрытой коллагеном оптической подложке с помощью микрофлюидного устройства. У пациентов обеих групп проведено сопоставление выраженности изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ. Оценена связь между выраженностью изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ с факторами риска, антиагрегантной терапией и уровнем ФВ в плазме крови.

Протокол проведения компьютерной томографической ангиографии коронарных артерий. Показания к проведению КТА коронарных артерий определялись лечащими врачами исследуемых пациентов. Протокол проведения КТА коронарных артерий включал в себя следующие этапы: создание топограммы, нативную и артериальную фазы исследования. Нативная фаза проводилась до введения контрастного вещества, в то время как артериальная фаза осуществлялась с применением спирального режима томографии, что позволяло получить 64 среза с толщиной 0,5 мм за 400 мс при непрерывном движении стола с пациентом. Уровень тока и напряжения на рентгеновской трубке составляли соответственно 400 мА и 120 кВ. Контрастное вещество в дозе 1,5 мл на кг веса вводилось внутривенно автоматическим шприцем со скоростью 5 мл/с. Пройодимость коронарных артерий оценивалась путем анализа изображений сердца на поперечных томографических срезах и при использовании многоплоскостных и трехмерных реконструкций изображений с расчетом степени стеноза с применением полуавтоматических методов. Оценку коронарных артерий производили сотрудники отдела томографии ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России.

Протокол проведения коронароангиографии. Показания к проведению КАГ определялись лечащими врачами исследуемых пациентов. Для выполнения КАГ использовались рентгенангиографические устройства компаний Siemens (Германия) и Philips (Нидерланды). Сотрудники отдела рентгенэндоваскулярных методов диагностики и лечения ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России проводили количественную оценку поражения коронарных артерий визуально, а также с помощью программного обеспечения Xcelera (Philips, Нидерланды). Поражение коронарных артерий, приводящее к уменьшению диаметра просвета

ствола левой коронарной артерии и/или магистральной коронарной артерии (передней нисходящей, огибающей, правой) и/или ветви второго порядка диаметром более 2 мм на 50% и выше, считалось гемодинамически значимым поражением.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения STATISTICA v.7.0 (StatSoft Inc., США) и SPSS Statistics v.17.0 (SPSS Inc., США). Применялись стандартные методы аналитической статистики: критерий Шапиро-Уилка W, точный критерий Фишера, критерий χ^2 с поправкой Йетса, U-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса, критерий Вилкоксона, ROC-анализ, логистический регрессионный анализ. Величину уровня значимости p принимали равной 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние блокирования рецепторов GPIb тромбоцитов на их адгезию к коллагену при повышенной скорости сдвига. Характеристика пациентов, вошедших в исследование, представлена в таблице 1. На момент включения в исследование 47 (56%) пациентов с ранним развитием ИБС перенесли ИМ, 67 (79,7%) больных – стентирование коронарных артерий, 8 (9,5%) пациентов – шунтирование коронарных артерий. У мужчин и женщин одинаково часто в анамнезе встречался ИМ – в 59,7% и 54,5% случаев, соответственно, а также стентирование коронарных артерий, соответственно, в 80,6% и 77,2% случаев, и шунтирование коронарных артерий, соответственно, в 11,3% и 9% случаев. Среди пациентов с ранним развитием ИБС медиана возраста, когда возникли ее первые клинические проявления, равнялась 49 [43; 50] годам. У мужчин медиана возраста возникновения первых клинических проявлений была меньше, чем у женщин и равнялась 47 и 55,5 годам, соответственно (p <0,001). В 57,2% случаев первым проявлением ИБС был ИМ. Частота возникновения ИМ, как первого проявления ИБС, не отличалась у мужчин и у женщин. Гемодинамически значимое поражение передней нисходящей артерии было выявлено у 85%, огибающей артерии – у 56,5%, правой коронарной артерии – у 73,7%, основного ствола левой коронарной артерии – у 11,2% пациентов.

Таблица 1. Характеристика пациентов

	С ранним развитием ИБС (n = 84)	Контрольная группа (n = 64)	p
Возраст, лет	54 [49; 55]	50,5 [44,5; 58]	0,1
Мужчины/женщины	62 (73,8%)/ 22 (26,2%)	26 (40,6%)/ 38 (59,4%)	<0,001
Неблагоприятная наследственность в отношении ИБС	23 (27,4%)	10 (15,6%)	0,1
ХС ЛНП >3 ммоль/л	62 (73,8%)	39 (60,9%)	0,1
ХС ЛВП <1 ммоль/л у мужчин и <1,2 ммоль/л у женщин	43 (51,2%)	15 (23,4%)	0,001
Курение	53 (63,1%)	24 (37,5%)	0,002
<i>Активный курильщик</i>	33 (62,2%)	14 (58,3%)	0,8
<i>Бывший курильщик</i>	20 (37,8%)	10 (41,7%)	0,8
Индекс курильщика, пачка/лет	33 [25; 44]	17 [8; 22]	<0,001
Злостный курильщик	38 (71,7%)	5 (20,8%)	<0,001
Ожирение	44 (52,4%)	26 (40,6%)	0,1
<i>ИМТ, кг/м²</i>	30 [26,5; 33]	29 [25,5; 32]	0,3
Сахарный диабет	18 (21,4%)	5 (7,8%)	0,03
Артериальная гипертензия	75 (89,3%)	52 (81,2%)	0,2
<i>1 степень</i>	2 (2,7%)	9 (17,3%)	0,007
<i>2 степень</i>	19 (25,3%)	18 (34,6%)	0,3
<i>3 степень</i>	54 (72%)	25 (48,1%)	0,009

Примечание. ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИМТ – индекс массы тела; ХС ЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности; ХС ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности. Индекс курильщика – среднее количество выкуриваемых сигарет в день, умноженное на количество лет курения и деленное на 20. Злостный курильщик – индекс курильщика ≥ 25 пачек/лет.

Атеросклеротическое поражение коронарных артерий, стенозирующее их просвет >50%, чаще встречалось в передней нисходящей артерии, чем в огибающей и правой коронарной артерии (p <0,05). Поражение огибающей артерии чаще встречалось у мужчин, чем у женщин (p = 0,02). Поражение одной магистральной коронарной артерии (МКА) имели 27,4% пациентов, двух МКА – 37,5% пациентов, трех МКА – 38,7% пациентов (p = NS). Поражение одной и более МКА с вовлечением основного ствола левой коронарной артерии имели 11,2% пациентов. Поражение одной МКА чаще встречалось у женщин (p = 0,01), а поражение трех МКА - у мужчин (p = 0,009).

У пациентов с ранним развитием ИБС медиана 15-минутного значения исходной адгезии составляла 8,3 [5,2; 13,4] мВ, после блокирования GPIIb – 1,7 [1,3; 3,2] мВ, что было на 77% [57,2; 84,6] меньше, чем в первом случае (рис. 1а). У пациентов контрольной группы медиана 15-минутного значения исходной адгезии после циркуляции цельной крови без добавления в нее мАт к GPIIb тромбоцитов составляла 12,6 [9,3; 16,7] мВ, после блокирования GPIIb – 10,3 [4,3; 14,8] мВ, что было на 29,5% [-6,9; 59,3] меньше, чем в первом случае (рис. 1б). Выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов с ранним развитием ИБС была больше, в сравнении с пациентами контрольной группы ($p < 0,001$).

Согласно результатам ROC-анализа, при отрезном значении уменьшения адгезии после блокирования GPIIb тромбоцитов равному 45% достигается оптимальное сочетание чувствительности и специфичности – 86% и 67%, соответственно. Площадь под кривой $0,81 \pm 0,03$ (95% ДИ 0,74-0,87; $p < 0,001$), что позволяет оценить прогностическую силу модели, как очень хорошую.

Среди пациентов с ранним развитием ИБС у 14% пациентов выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ была $< 45\%$, у 86% пациентов – $\geq 45\%$. В то время как, среди пациентов контрольной группы у 66% участников исследования выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ была $< 45\%$, у 34% пациентов – $\geq 45\%$.

Исходная адгезия тромбоцитов, адгезия тромбоцитов после блокирования GPIIb, а также выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ не зависели у пациентов двух исследуемых групп от возраста, неблагоприятной наследственности в отношении ИБС, курения, СД, АГ. Выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ была выше у мужчин с ранним развитием ИБС в сравнении с женщинами и равнялась 78 [64,2; 84,7] % и 63 [32; 79,2] %, соответственно ($p = 0,02$). Выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов контрольной группы не отличалась у мужчин и у женщин.

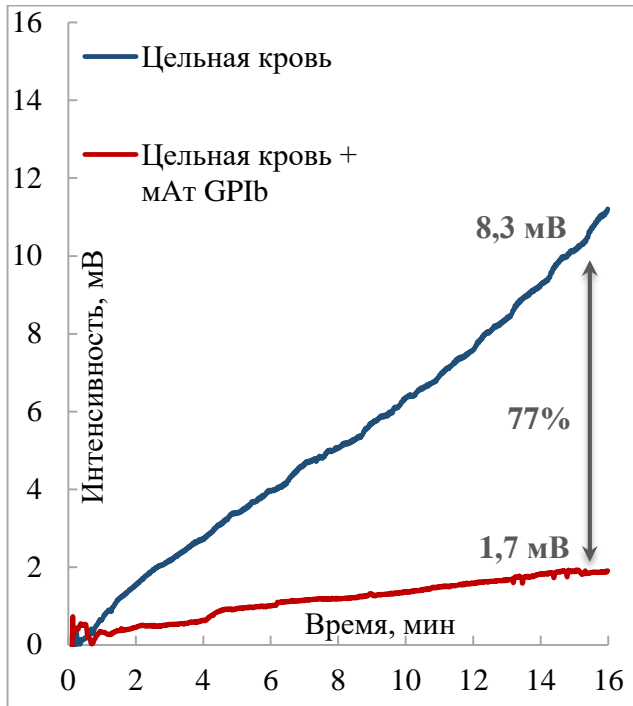


Рис. 1а. Характерные кривые изменения интенсивности рассеянного лазерного излучения у пациентов с ранним развитием ИБС до и после блокирования GPIIb тромбоцитов

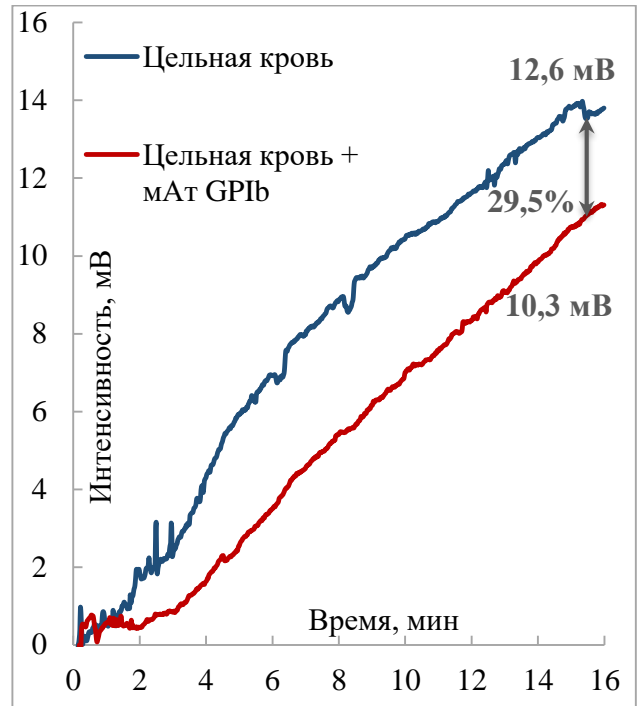


Рис. 1б. Характерные кривые изменения интенсивности рассеянного лазерного излучения у пациентов контрольной группы до и после блокирования GPIIb тромбоцитов

Зависимости между уровнем ХС ЛНП и ХС ЛВП со значениями исходной адгезии тромбоцитов и значениями адгезии тромбоцитов после блокирования GPIIb у пациентов с ранним развитием ИБС не было выявлено. Корреляционный анализ продемонстрировал слабую отрицательную зависимость между выраженностью изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ и уровнем ХС ЛВП у пациентов с ранним развитием ИБС ($r = -0,3$, $p = 0,01$). Зависимости между уровнем ХС ЛНП и ХС ЛВП со значениями исходной адгезии тромбоцитов, значениями адгезии тромбоцитов после блокирования GPIIb и выраженностью изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов контрольной группы не было выявлено.

Плазменный уровень ФВ. У пациентов с ранним развитием ИБС медиана уровня ФВ в плазме крови равнялась 111 [43; 354] %, у пациентов контрольной группы – 145 [33; 273] %, что было больше ($p = 0,03$), чем у пациентов с ранним развитием ИБС. При анализе связи между уровнем ФВ и группой крови всех включенных в исследование пациентов было выявлено, что у пациентов с группой крови I (0) уровень ФВ был меньше, чем у пациентов с группами крови II (A), III (B) и IV (AB) ($p < 0,001$). Не было выявлено связи между уровнем ФВ и такими факторами риска ИБС, как мужской пол, возраст, неблагоприятная наследственность в отношении ИБС, курение, СД, низкий уровень ХС ЛВП и повышенный уровень ХС ЛНП. Уровень ФВ был выше ($p = 0,04$) у пациентов с артериальной гипертензией, в сравнении с пациентами без нее, и равнялся, соответственно, 129 [98; 183] % и 110 [75; 132] %.

В группе пациентов с ранним развитием ИБС антиагрегантную терапию принимали 84 пациента. 22 пациента получали АСК, 10 пациентов – блокатор P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов клопидогрел, 41 пациент – клопидогрел в сочетании с АСК, 11 пациентов – блокатор P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов тикагрелор в сочетании с АСК. В контрольной группе антиагрегантную терапию принимали 11 пациентов. Все они получали АСК. Остальные 53 пациента не получали антиагрегантной терапии. Как у пациентов с ранним развитием ИБС, так и у пациентов контрольной группы уровень ФВ не зависел от режима антиагрегантной терапии (рис. 2а и 2б). Корреляционный анализ не продемонстрировал связи между уровнем ФВ и значениями исходной адгезии тромбоцитов, между уровнем ФВ и значениями адгезии тромбоцитов после блокирования GPIIb, а также между уровнем ФВ и выраженностью изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ, как у пациентов с ранним развитием ИБС, так и у пациентов контрольной группы.

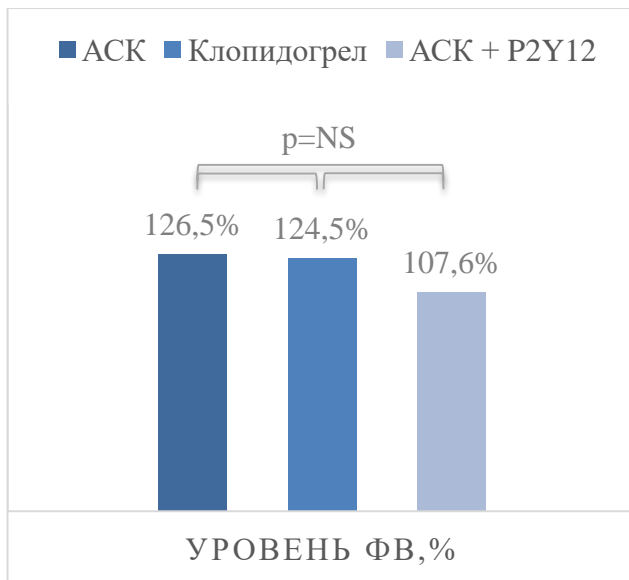


Рис. 2а. Уровень ФВ в зависимости от принимаемой антиагрегантной терапии у пациентов с ранним развитием ИБС

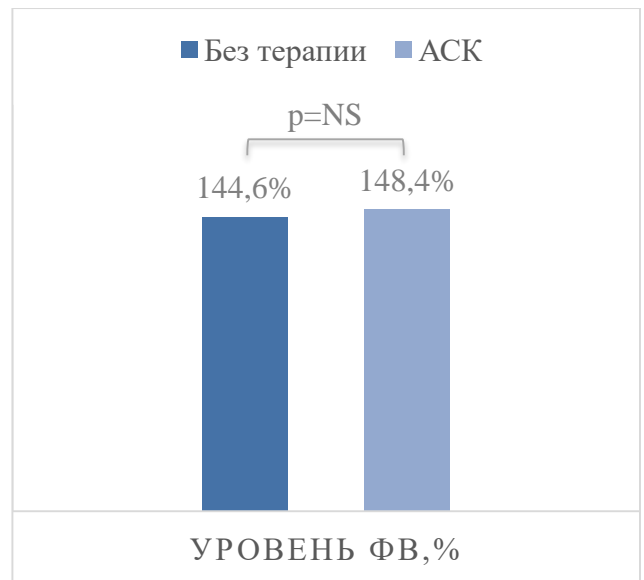


Рис. 2б. Уровень ФВ в зависимости от принимаемой антиагрегантной терапии у пациентов контрольной группы

Влияние антиагрегантной терапии на ФВ-опосредованную адгезию тромбоцитов при повышенной скорости сдвига. У пациентов с ранним развитием ИБС, которые принимали монотерапию АСК медиана исходной адгезии тромбоцитов была равна 12 [9,9; 14,8] мВ, что было выше, чем у пациентов, принимавших клопидогрел, у которых медиана исходной адгезии тромбоцитов была равна 6,2 [4,5; 7,5] мВ ($p = 0,004$), или у пациентов, принимавших двойную антиагрегантную терапию (АСК + ингибитор P2Y₁₂), у которых медиана исходной адгезии тромбоцитов была равна 7,7 [5; 13,6] мВ ($p = 0,02$) (рис. 3). У пациентов с ранним развитием ИБС, которые принимали монотерапию АСК, медиана адгезии тромбоцитов после блокирования GPIIb рецепторов была равна 3,2 [1,5; 7,4] мВ, что было выше, чем у пациентов принимавших клопидогрел, у которых медиана адгезии тромбоцитов после блокирования GPIIb рецепторов была равна 1,8 [0,7; 2,9] мВ ($p = 0,04$), или у пациентов принимавших двойную антиагрегантную терапию, у которых медиана адгезии тромбоцитов после блокирования GPIIb рецепторов была равна 1,6 [1,2; 2,2] мВ ($p = 0,006$) (рис. 3).

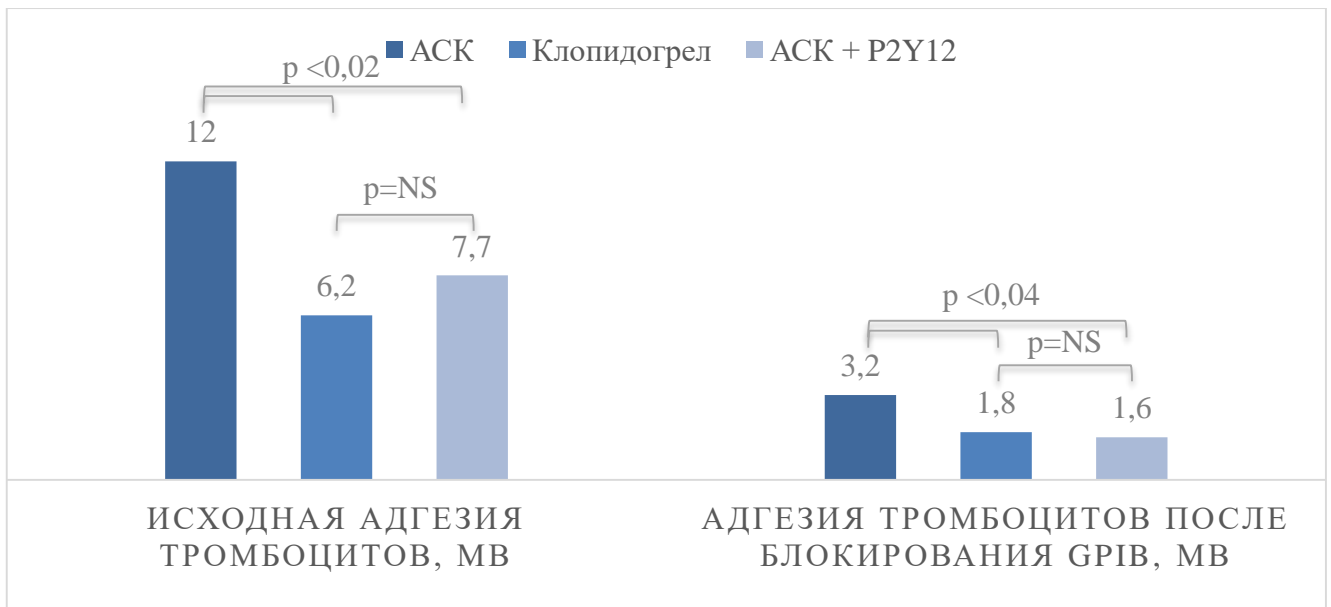


Рис. 3. Адгезия тромбоцитов до и после блокирования GPIIb рецепторов у пациентов с ранним развитием ИБС в зависимости от режима антиагрегантной терапии

У пациентов контрольной группы, принимавших АСК, исходная адгезия тромбоцитов не отличалась от таковых пациентов без антиагрегантной терапии и равнялась, соответственно, 12,6 [9,9; 15,5] мВ и 13,3 [9,5; 17,3] мВ ($p = 0,6$) (рис. 4). У пациентов контрольной группы, которые принимали АСК, адгезия тромбоцитов после блокирования GPIIb не отличалась от адгезии тромбоцитов после блокирования GPIIb у пациентов без антиагрегантной терапии и равнялась, соответственно, 10,6 [3,5; 14,9] мВ и 9,6 [4,3; 14,5] мВ ($p = 0,9$) (рис 4). Выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов с ранним развитием ИБС не зависела от режима антиагрегантной терапии и составила 67,7 [47,9; 83,3] % у пациентов, принимавших АСК, 69,5 [60,7; 79,2] % у пациентов, принимавших клопидогрел и 77,9 [63,5; 85,2] % у пациентов, принимавших двойную антиагрегантную терапию (рис 5а). Выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов контрольной группы, которые принимали монотерапию АСК, не отличалась от выраженности изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов, не принимавших антиагрегантной терапии и равнялась, соответственно, 22,2 [-34,3; 39,4] % и 37,1 [-1,4; 59,1] % (рис 5б).

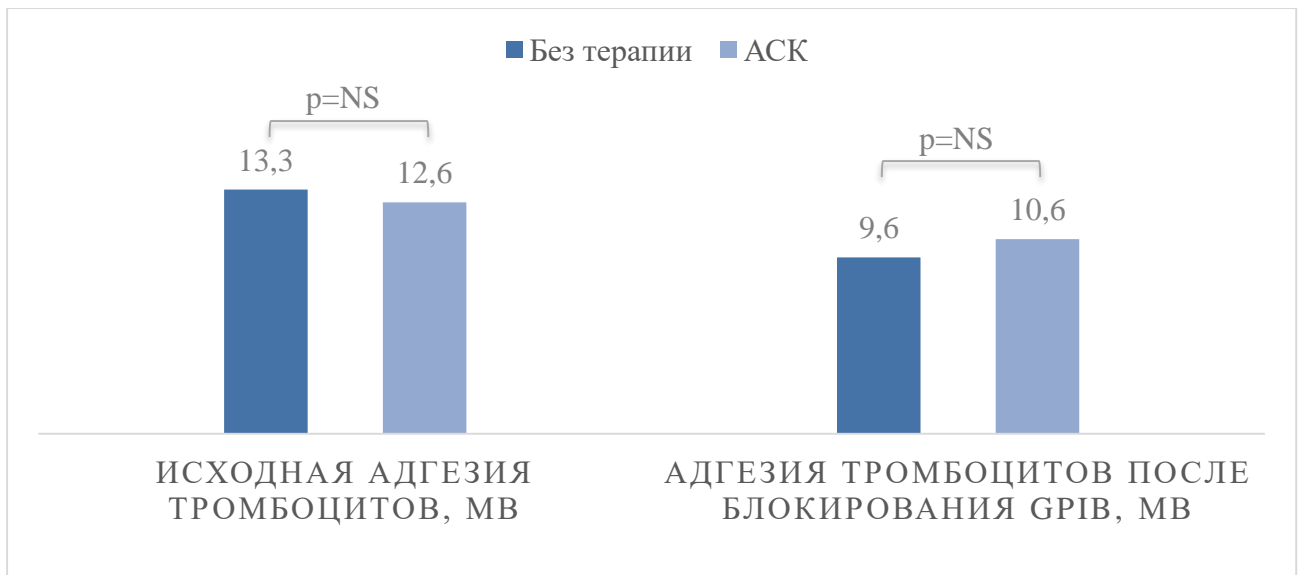


Рис. 4. Адгезия тромбоцитов до и после блокирования GPIIb у пациентов контрольной группы в зависимости от приема ацетилсалициловой кислоты

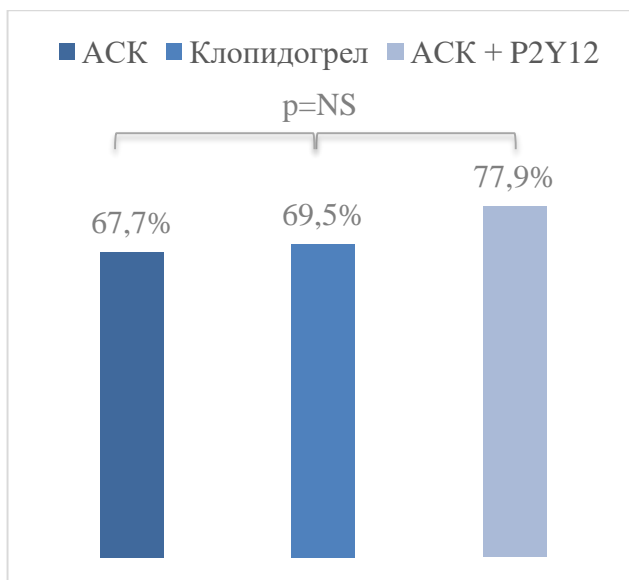


Рис. 5а. Выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов с ранним развитием ИБС в зависимости от режима антиагрегантной терапии

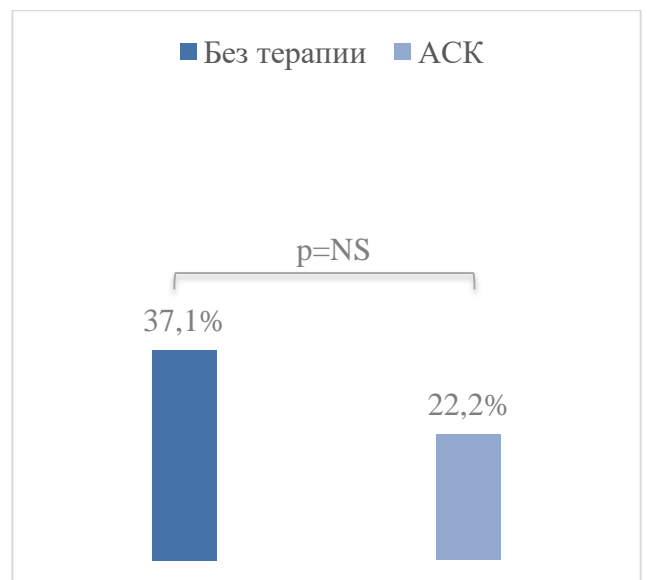


Рис. 5б. Выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов контрольной группы в зависимости от приема ацетилсалициловой кислоты

Сравнительный анализ факторов, связанных с рано возникшей ИБС.

Согласно однофакторному логистическому регрессионному анализу, злостное курение, выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ $\geq 45\%$, мужской пол, СД, уровень ХС ЛВП < 1 ммоль/л у мужчин и $< 1,2$ ммоль/л у женщин, курение, а также возраст являлись факторами, связанными с повышенной вероятностью выявления ИБС у мужчин в возрасте до 55 лет и у женщин в возрасте до 65 лет. Многофакторный логистический регрессионный анализ показал, что злостное курение, выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ $\geq 45\%$, мужской пол и возраст являются независимыми факторами, связанными с повышенной вероятностью выявления ИБС у мужчин в возрасте до 55 лет и у женщин в возрасте до 65 лет (таблица 2).

Таблица 2. Многофакторный логистический регрессионный анализ для оценки связи факторов с вероятностью выявления ИБС у мужчин в возрасте до 55 лет и у женщин в возрасте до 65 лет

Переменная	Отношение шансов	95% доверительный интервал	p
Выраженность изменения адгезии тромбоцитов после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ $\geq 45\%$	6,3	2,4 - 16,2	<0,001
Злостное курение	6,1	1,4 - 25,4	0,01
Мужской пол	3,4	1,2 - 10	0,02
Возраст	1,1	1 - 1,14	0,02
Сахарный диабет	2,2	0,9 - 5,8	0,09
ХС ЛВП < 1 ммоль/л у мужчин и $< 1,2$ ммоль/л у женщин	2,1	0,5 - 8,9	0,3
Курение	0,7	0,2 - 2,4	0,6

Примечание. ИБС – ишемическая болезнь сердца; злостное курение – индекс курильщика ≥ 25 пачка/лет; GPIIb – гликопротеин IIb; ХС ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности.

ВЫВОДЫ

1. Блокирование рецепторов GPIIb тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС приводит в 2,6 раза большему, чем у пациентов без ИБС, снижению выраженности адгезии тромбоцитов к коллагену в условиях повышенной скорости сдвига.
2. Уровень ФВ не влияет на адгезию тромбоцитов, опосредованную взаимодействием рецепторов GPIIb с ФВ.
3. Адгезия тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС, принимающих клопидогрел или комбинацию АСК с ингибитором P2Y₁₂ (клопидогрел или тикагрелор) меньше, чем у пациентов, принимающих АСК. Режим антиагрегантной терапии (АСК, клопидогрел или комбинация АСК с ингибитором P2Y₁₂ - клопидогрелом или тикагрелором) не влияет на опосредованную GPIIb адгезию тромбоцитов.
4. У мужчин в возрасте до 55 лет и у женщин в возрасте до 65 лет выраженность изменения адгезии тромбоцитов $\geq 45\%$ после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ вне зависимости от факторов риска связана с повышенной вероятностью выявления ИБС (ОШ 6,3; 95% ДИ 2,4-16,2; $p < 0,001$). С повышенной вероятностью выявления ИБС независимо связаны злостное курение (ОШ 6,1; 95% ДИ 1,7-25,4; $p = 0,01$), мужской пол (ОШ 3,4; 95% ДИ 1,2-10; $p = 0,02$) и возраст (ОШ 1,1; 95% ДИ 1-1,14; $p = 0,02$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Способ измерения адгезии тромбоцитов к коллагену, опосредованной взаимодействием рецепторов GPIIb тромбоцитов с ФВ, с помощью оригинального микрофлюидного устройства может найти применение в исследованиях механизмов начального этапа тромбообразования у пациентов с ранним развитием ИБС и для изучения препаратов, блокирующих взаимодействие ФВ с сосудистой стенкой и/или тромбоцитами.
2. Пациенты со значениями выраженности изменения адгезии тромбоцитов $\geq 45\%$ после блокирования взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ должны рассматриваться, как пациенты с повышенной вероятностью тромботических осложнений.

**СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Охота С.Д.**, Козлов С.Г., Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Гурия К.Г., Габбасов З.А. Адгезия тромбоцитов, опосредованная фактором фон Виллебранда, у пациентов с ранним развитием ишемической болезни сердца //Атеросклероз и Дислипидемии. – 2023. – №. 2 (51). – С. 54-64.
2. **Охота С.Д.**, Козлов С.Г., Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Гурия К.Г., Shang-Rong Ji, Wu Yi, Габбасов З.А. Опосредованная фактором фон Виллебранда адгезия тромбоцитов у пациентов с преждевременной ишемической болезнью сердца //Кардиология. – 2023. – Т. 63. – №. 3. – С. 55-60.
3. Avtaeva Y.N., Melnikov I.S., **Okhota S.D.**, Zozulya N.I., Gabbasov Z.A. Kinetics of platelet adhesion to protein-coated surface in whole blood samples at high flow rates //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Т. 169. – P. 229-232.
4. Gabbasov Z.A., Avtaeva Y.N., Melnikov I.S., **Okhota S.D.**, Caprnda M., Mozos I., Prosecky R., Rodrigo L., Kruzliak P., Zozulya N.I. Kinetics of platelet adhesion to a fibrinogen-coated surface in whole blood under flow conditions //Journal of clinical laboratory analysis. – 2021. – Т. 35. – №. 9. – P. e23939.
5. Автаева Ю.Н., Мельников И.С., **Охота С.Д.**, Зозуля Н.И., Габбасов З.А. Кинетика адгезии тромбоцитов к покрытой белком поверхности в образцах цельной крови в условиях высоких скоростей потока //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – №. 2. – С. 188-192.
6. **Охота С.Д.**, Козлов С.Г., Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Габбасов З.А. Фактор фон Виллебранда и сердечно-сосудистая патология //Атеросклероз и дислипидемии. – 2022. – №. 4. – С. 10-24.
7. **Okhota S.D.**, Melnikov I.S., Avtaeva Y.N., Kozlov S.G., Gabbasov Z.A. Shear stress-induced activation of von Willebrand factor and cardiovascular pathology //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 20. – P. 7804.
8. Kozlov, S.G., **Okhota, S.D.**, Avtaeva, Y.N., Melnikov, I.S., Matroze, E.G., Gabbasov, Z.A. Von Willebrand factor in diagnostics and treatment of cardiovascular disease: Recent advances and prospects //Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2022. – Т. 9. – P. 1038030.

9. Avtaeva Y.N., Melnikov I.S., **Okhota S.D.**, Kozlov S.G., Gabbasov Z.A. Von Willebrand Factor in Thrombo-inflammation and Cardiovascular Pathology //Recent Research Advances in Biology Vol. 9. – 2021. – P. 25-47.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСК - ацетилсалициловая кислота

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМ - инфаркт миокарда

ИФА - иммуноферментный анализ

КАГ - коронароангиография

КТА - компьютерная томографическая ангиография

МАТ - моноклональное антитело

ОХС - общий холестерин

СД - сахарный диабет

ФВ - фактор фон Виллебранда

ХС ЛВП - холестерин липопротеидов высокой плотности

ХС ЛНП - холестерин липопротеидов низкой плотности

GP^{IIb} - гликопротеиновый комплекс

Ib/IX/V тромбоцитов