

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ, СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ, СОФИЯ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ
И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ**

Д-Р АНТОАНЕТА ИВАНОВА МЛАДЕНОВА

**ХЕМОСТАЗНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ КАРЦИНОМ
НА ПРОСТАТАТА И ОЦЕНКА НА РИСКА ОТ
ТРОМБОТИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ СЛЕД РАДИКАЛНА
ПРОСТАТЕКТОМИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР”**

Научна специалност: Клинична лаборатория

Научно жури

Проф. д-р К. Цачев, дмн
Проф. д-р Д. Свиначов, дмн
Проф. д-р М. Пенев, дмн
Проф. д-р И. Паскалева, дмн
Проф. д-р Т. Цветкова, дмн

**София
2015**

Дисертационния труд е представен на 116 страници, съдържа 16 таблици и 17 фигури. Библиографската справка включва 369 заглавия, от които 22 на кирилица и 347 на латиница.

Дисертационния труд е обсъден, одобрен и насочен за официална защита от Катедрения съвет на Катедрата по клинична лаборатория и клинична имунология при Медицински университет, София, състоял се на 19.11.2014 г.

Дисертантът работи като гл. асистент към Катедрата по клинична лаборатория и клинична имунология.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 05.03.2015 г. от 14.00 ч. в Аудиторията на Клиника по неврология, УМБАЛ „Александровска”, София.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	7
IV. РЕЗУЛТАТИ	24
V. ОБСЪЖДАНЕ	35
VI. ИЗВОДИ	43
VII. ПРИНОСИ	45
VIII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	46

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

АТ III – антитромбин III

ВТЕ – венозен тромбемболизъм

БТЕ – белодробен тромбемболизъм

ДВТ – дълбока венозна тромбоза

ДИК – дисеминирана интравазална коагулопатия

ДПХ – доброкачествена простатна хиперплазия

ПИН – простатна интраепителиална неоплазия

ПСА – простатен специфичен антиген

ФДП (XLF) – фибрин деградационни продукти

АРТТ – активирано парциално тромбoplastиново време

ВМІ – индекс за телесна маса

LMWH – ниско молекулярен нефракциониран хепарин

РТ – протромбиново време

TF – тъканен фактор

VEGF – съдово ендотелен растежен фактор

VWF – Фон Вилебранд фактор

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременните познания за естественото биологично развитие на карцинома на простатата показват, че той е уникален и неподражаем по своето протичане. При мъжете над 50 години той прогресира бързо, протича скрито, характеризира се с висока смъртност и непредсказуема еволюция. В този смисъл той не може да бъде сравнен с който и да било друг вид неоплазма.

Карциномът на простатната жлеза е на четвърто място по честота сред неопластичните заболявания при мъжете в България. Според Националния онкологичен регистър през последните десетилетия се установява увеличаване на заболеваемостта, с известно снижаване на възрастовата граница, като преобладават новорегистрираните случаи в осмото десетилетие на живота.

През последните години прави впечатление, че честотата на простатния карцином нараства бързо. Това най-вероятно се дължи на няколко причини като удължена средна продължителност на живота, по-добрите диагностични възможности и зачестяване на заболяването поради различни фактори. Ето защо в днешно време той е най-често диагностицирания малигнен тумор при мъжа в много страни и е на второ място след тумора на белия дроб като заболяване, което води до летален изход.

Ето защо проблемът за ранната диагностика и своевременно лечение на простатния карцином продължава да вълнува медицинската ни общност. Търсенето и въвеждането на нови диагностични методи потвърждава значимостта на заболяването и неговия здравен и социален ефект. Днес основните усилията на учените и клиницистите са насочени към ранната му диагностика и адекватно лечение с оглед неговата радикалност и запазване качеството на живот на пациентите. Усилията в тази посока през последните 20 години ни въодушевяват, но твърде често и обезверяват. Днес всички постижения в диагностиката и лечението на прос-

татния карцином задължително се потвърждават чрез клиничния опит. Карциномът на простатната жлеза е исторически свързан с аномалии в хемостазата при човека. Редица автори считат, че кръвосъсирващите фактори като Д- димер, антиромбин III и фибриноген са в тясна връзка с туморната ангиогенеза, съдовата плътност на тумора, възможните усложнения след проведеното оперативно лечение и прогнозата за пациента в следоперативния период.

Настоящата дисертация е съвременен и актуален опит на автора да даде своя принос в тази насока, да се опишат и проследят промените в хемостазните показатели преди и след радикална простатектомия, да се избере и препоръча качествен и съвременен подход за активно и динамично следоперативно проследяване и антиромботична профилактика с оглед повишаване качеството на живот на пациентите.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Да се проучи предоперативното и прогностично значение на хемостазните показатели при локализиран карцином на простатата за тежестта на заболяването. Да се разработи алгоритъм за оценка на следоперативния риск за развитие на венозен тромбемболизъм.

ЗАДАЧИ

За постигане на поставената цел беше необходимо да се изпълнят следните задачи:

1. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичния амидолитичен метод за определяне на АТIII.
2. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичния имунотурбидиметричен метод за определяне на Д-димер.
3. Да се извърши сравнително проучване на плазмените нива на хемо-

стазните показатели при пациенти с локализиран карцином на простатата преди и след радикална простатектомия и контролна група пациенти с ДПХ.

4. Да се проучи корелационната зависимост между стадия на диференциацията на карцинома и хемостазните показатели.

5. Да определим най-добрите предиктори и техните стойности за настъпване на тромботични усложнения и дефиниране профила на рисковите пациенти.

6. Да установим най-вероятния следоперативен период, в който биха настъпили тромботични усложнения при пациенти, дефинирани като високо, средно и ниско рискови.

7. Да съпоставим стойностите на ПСА и хемостазните показатели и установим доколко съществува положителна корелация между тях.

8. Да проучим възможностите на Д-Димер, АТ III и фибриноген, техните прагове на чувствителност и специфичност, достоверност и надеждност пред- и следоперативно при карцином на простатата с оглед тежестта на заболяването и риска от усложнения.

9. Да създадем и предложим алгоритъм от различни хемостазни показатели за оптимално поведение и прогнозиране с висока степен на достоверност на усложненията след проведеното оперативно лечение на простатния карцином.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОД

1. Собствен клиничен материал

Нашето проспективно проучване обхваща 246 пациенти с карцином на простатата, оперирани в Клиниката по урология и изследвани в Катедрата по клинична лаборатория и клинична имунология на Медицински университет, София – УМБАЛ „Александровска” за периода от 2008 – 2013 година. Те бяха на възраст от 51 до 79 години (средно 65

години). Те бяха показани за радикална простатовезикулектомия, която беше извършена чрез отворен достъп.

2. Включващи критерии и протокол

При пациентите бяха изследвани рутинните хемостазни показатели (ПТ, АПТТ, фибриноген) и Д-Димер, АТ III, предоперативно и на 1-ви, 3-ти, 5-ти и 30-ти ден след операцията с автоматичен коагуломер STA Compact.

Чрез морфологично изследване на отстранената простатата се определиха стадия и степента на диференциация на карцинома. Обема на оперативната интервенция зависеше от наличието на метастази в регионалните лимфни възли. Ние отчитаме и продължителността на оперативната интервенция в минути.

За същия период от време ние проследихме като контролна група 80 пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ) на възраст между 52 и 76 години. Те бяха показани за отворено оперативно лечение (трансвезикална простатектомия). При всички тях бяха изследвани предоперативно и на 1-ви, 3-ти, 5-ти и 30 следоперативен ден същите рутинни хемостазни показатели (ПТ, АПТТ, фибриноген) и Д-димер, АТ III. При тези пациенти беше изключен предоперативно простатен карцином чрез изследване на ПСА и ректално туширане. Като критерии беше прието ПСА $\leq 3,0$ ng/ml и негативно ректално туширане (ДРТ) или ПСА $> 3,0$ ng/ml и съмнително за карцином ректално туширане. При втората група пациенти задължително се извършваше пункционна биопсия под трансректален ултразвуков контрол.

Предоперативно при всички пациенти беше изследван ПСА, регистрирана възрастта и определени обема на простатната жлеза и степента на затлъстяване (BMI).

Пациентите бяха проследявани до 30 дни след извършването на опера-

цията за настъпване на тромботични усложнения. За профилактика на възможна венозната тромбоза или емболия те получаваха нискомолекулярен хепарин (Zibor 2500 IU/ден) за 5 седмици съгласно протокола на Клиниката по урология, УМБАЛ „Александровска“, София. При всички пациенти се прилагаха ластични бинтове на долните крайници (еластокомпресия) по време на операцията и през първите следоперативни дни. Пациентите се раздвижваха активно на 2-3-ти следоперативен ден (табл. 1).

Диагноза	Брой	Изследвани показатели	Изследване
Карцином на простатата	246	ПВ, аПТТ, фибриноген Д-димер, АТ III, ПСА, индекс на телесна маса	Предоперативно и на 1-ви, 3-ти, 5-ти и 30-ти ден след операцията Предоперативно
ДПХ	80	ПВ, аПТТ, фибриноген, Д-димер, АТ III, ПСА, индекс на телесна маса	Предоперативно и на 1-ви, 3-ти, 5-ти и 30-ти ден след операцията Предоперативно

Таблица 1. Изследвани пациенти 2008 – 2013 г.

При пациентите с клинични данни за дълбока венозна тромбоза (ДВТ) или БТЕ диагнозата се потвърждаваше и чрез компютърна аксиална томография (КАТ) на белия дроб и ултразвуково изследване на долните крайници.

1. Изисквания към пробата за изследване

Като биологичен материал се използва венозно взета кръв чрез хемостазен вакутейнер.

2. Начин на вземане

- минимално травмиране на вената, за да се избегне замърсяване на пробата с тъканна течност. Първият вакутейнер след венепункцията не трябва да се използва за коагулационни тестове.

- недопускане на венозна стаза, тъй като тя води до активиране на кръвосъсирването (за предпочитане е венепункцията да се направи без турникет). Използване на широки игли, за да не се разрушават тромбоцити и еритроцити.

- спазване на точно съотношение кръв / антикоагулант 9:1. Като антикоагулант се използва 3,8% тринатриев цитрат с 5,5 молекули кристализационна вода с крайна концентрация 105 mmol/l или 3,2% тринатриев цитрат с крайна концентрация 109 mmol/l.

- след вземане на необходимото количество кръв тя внимателно се разклаща с цел размесване на кръвта с антикоагуланта

3. Транспорт и съхранение

- донасянето на цитратната кръв в лабораторията трябва да стане незабавно, най-късно до 1 час след вземането ѝ, за да се центрофугира и отдели плазмата. Идеалния срок за извършване на анализа е до 2 часа след центрофугирането и отделянето на плазмата.

- използва се бедна на тромбоцити плазма, която се получава при центрофугиране на кръвта при 3000 – 3500 U/min /2000 x g/ в продължение на 10 -15 мин.

- условията (-20°C или -70°C) при необходимост от по-дълготрайно съхранение на плазмата до извършване на анализа се уточняват със специалист от клиничната лаборатория

4. Д - Димер – метод на изследване

Принцип на метода

STA -Liatest анализ на Д-димер е нов количествен и автоматизиран

имуноанализ, използващ имунотурбидиметрична технология - отчита се промяната в абсорбцията, измерена на 540 Nm и автоматично се записва за 140 сек. Този тест за изследване на Д-димер може да подпомогне диагнозата на дълбоката венозна тромбоза и белодробната емболия. В САЩ този метод се препоръчван като умерено технологична комплексна категория от CLIA 1988 – CDC аналитичен код 1320 и CDC система тестови кодове 04767, 04768 и 04876.

STA – Compact е коагулометър с имунологичен канал за отчитане на Д-димер.

Описанието на аналитичния ход на пробата в съкратен вид е следното :
Поставяме вакутейнерите в работните гнезда с бар код.

Реактивите и контролните материали са заредени в съответното отделение за реактиви.

Избираме от дисплея на компютъра пробата за Д-димер и стартираме програмата.

Необходимото количество за един анализ е 50 микролитра плазма.

Реактиви

1-ви реактив – (Реакционен буфер – TRIS с приблизително рН 7,5, 6x5 мл.) TRIS buffer, approx. pH 7,5, 6x5 ml

2-ри реактив – (кравешка албумин стебилизирана суспензия от латексови частици, обвити с Д-димер специфични миши моноклонални антитела 6x6 мл.).

Начин на приготвяне на реактивите

Реактивите са готови за употреба.

Съхранение и стабилност

Неразтворените реактиви са годни до посочения на опаковката срок на годност при температура 2-8° С. След разтварянето годността на реак-

тивите е 5 дни престой в оригиналните шишета при 2-8° С.

Калибрация

Калибрационната крива се изготвя автоматично с познати концентрации като се използва STA Уникалибратор с лот № 109363. Той съдържа лиофилизирана човешка нормална плазма, представляваща пул от цитратна плазма от здрави донори. Една опаковка калибратор съдържа 6 шишенца. Те се разтварят с по 1 мл. дестилирана вода и след престой от 30 мин. на стайна температура може да се пристъпи към работа. Разтвореният калибратор е стабилен 4 часа при 15-20° С или 24 часа при замразяване. Неразтворените калибратори се съхраняват при 2-8° С и са годни до посочената на опаковката дата.

Внимание – съществува възможност от инфекциозен риск !!!

Този продукт съдържа човешки материал, който е тестван и показва негативни резултати за HTLV-III/HIV антитела и за хепатит В. Въпреки това се препоръчват безопасни процедури за минимален риск от пренасяне на инфекциозни болести.

Контролни плазми

Използват се контролни плазми в нормална и патологична област – STA LIATEST Control N + Control P с лот № 110269. Опаковката съдържа 12x1мл. шишенца нормална контролна плазма и 12x1мл. шишенца патологична контролна плазма. Те представляват лиофилизирана човешка плазма, разтваряща се с 1 мл. дестилирана вода. След внимателно размесване и престой на стайна температура от 30 минути могат да се използват за работа. Неразтворените плазми са годни до посочения на опаковката срок, а разтворени са стабилни 4 часа при 15-25° С или 24 часа при замразяване. Контролните плазми също крият възможност за възникване на инфекциозен риск.

Ежедневно се използват контролни плазми в двете нива.

Резултати

Областта на измерване (линейността) при Д-димер е от 0,22 – 4,0 mikrog/ml.

При приложено разреждане на плазмата е от 0,22 – 20,0 mikrog/ml.

Интерференции

- липемия
- хемолизирани проби не бива да се тестват
- няма интерференция, ако интерфериращите вещества са в определени количества – нефракциониран хепарин до 2,0 IU/ml, ниско молекулярен хепарин до 2 анти-Ха IU/ml, хемоглобин до 2 g/l, конюгиран билирубин до 290mg/l, неконюгиран билирубин до 200mg/l

Референтни граници

Нормалните стойности на Д-димер при възрастни обикновено са под 0,50 µg/ml FEU (121). Те се повишават по време на бременността (117) и с напредване на възрастта (121, 195).

5. АТIII – метод на изследване

Количествената оценка на активността на АТ III в плазмата се извършва чрез хромогенен субстратен метод. В САЩ този метод се препоръчан като високо технологична комплексна категория от CLIA 1988 – CDC аналитичен код 0456 и CDC система тестови кодове 4677 и 4875.

Принцип на метода

Това е хромогенен метод, базиран на автоматично измерване в двустъпален тест:

АТ III + Хепарин → АТ III Хепарин

АТ III Хепарин + Тромбин → АТ III Хепарин Тромбин + остатъчен тромбин

MeOC-Gly-Pro-Arg-pNa + HOH + остатъчен тромбин → MeOC-Gly-Pro-Arg-pNa-OH + p-Nitroanilin

1. Инкубиране на плазмата с тромбин реагента в присъствие на хепарин за 60 сек.
2. Определяне на остатъчната активност на тромбина при взаимодействието му с хромогенен субстрат на 405 nm, която е обратно пропорционална на активността на АТ III в пробата на пациента.

STA – Compact е коагулометър с електромеханично отчитане, хромогенен и имунологичен канал.

Описанието на аналитичния ход на пробата в съкратен вид е следното:

1. Поставяме вакутейнерите в работните гнезда с бар код.
2. Реактивите и контролните материали са заредени в съответното отделение за реактиви.
3. Избираме от дисплея на компютъра пробата АТ III и стартираме програмата.

Реактиви

1. Лиофилизиран тромбин с произход от крава над 10 nkat/mL ,
4 x 6 mL
- 1а. Трис буфер – 50 mmol/L , хепарин – 2 U/mL , реагентът е готов за употреба - 4 x 6 mL.
2. Лиофилизиран хромогенен субстрат : Ethyl-malonyl-S-Pro-Arg-pNA. AcOH(CBS 61.50), приблизително 1.4 $\mu\text{mol/mL}$, 4 x 6 mL

Начин на приготвяне на реактивите

Едно шише лиофилизиран тромбин се разтваря с едно шише буфер. Размесват се внимателно. Така приготвения реактив се оставя на стайна температура – 18 - 25°C за 60 мин., след което отново се размесва преди употреба.

Съхранение и стабилност

Неразтворените реактиви са годни до посочения на опаковката срок при

температура 2-8° С. След разтварянето им годността на реактивите е 7 дни в оригиналните шишета при 15-20° С.

Калибрация

Калибрационната крива се изготвя автоматично с познати концентрации -115%, 77%, 38%, 10%. Използва STA Уникалибратор с лот № 109363, съдържащ лиофилизирана човешка нормална плазма. Тя представлява пул от цитратна плазма от здрави донори. Една опаковка калибратор съдържа 6 шишенца, разтварящи се с по 1 мл. дестилирана вода. След престой от 30 мин. на стайна температура може да се пристъпи към работа. Разтвореният калибратор е стабилен 4 часа при 15-20° С или 24 часа при замразяване. Неразтворените калибратори се съхраняват при 2-8° С и са годни до посочената на опаковката дата.

Внимание – съществува възможност от инфекциозен риск !!!

Този продукт съдържа човешки материал, който е тестван и показва негативни резултати за НТЛV-III/HIV антитела и за хепатит В. Въпреки това се препоръчват безопасни процедури за минимален риск от пренасяне на инфекциозни болести.

Контролни плазми

Използват се контролни плазми в нормална и патологична област – STA SYSTEM Control N с каталожен № 111101, STA SYSTEM Control P с каталожен № 111101. Опаковката съдържа 12x1мл. шишенца нормална контролна плазма и 12x1мл. шишенца патологична контролна плазма (лиофилизирана човешка плазма). Те се разтварят с 1 мл. дестилирана вода и след внимателно размесване и престой на стайна температура от 30 мин. могат да се използват за работа. Неразтворени те са годни до посочения на опаковката срок, а разтворени са стабилни 4 часа при 15-25° С или 24 часа при замразяване. Контролните плазми също крият възможност за възникване на инфекциозен риск.

Ежедневно се използват контролните плазми в двете нива.

Резултати

Областта на измерване при АТ III е от 0% - 140%.

Линейността на измерване е до 140% , а долната граница на откриваемост е (the low detection limit is) 9%.

Интерференции

- при лечение с тромбинови инхибитори (хирудин, аргатробан и др.) нивото на АТIII може да се повиши с около 10%μ
- няма интерференция при определени количества на интерфериращите вещества: хепарин до 1,0 IU/ml, хемоглобин до 7 g/l, билирубин до 200 mg/l, триглицериди до 7,6 g/l.

Референтните граници на АТ III при възрастни хора обикновено са 80-120 %.

Нивото на АТ III при жени в менопауза е по-ниско отколкото при мъже. Намалването на неговото ниво се установява и по време на бременността.

Нивото на АТ III при мъже намалява с напредване на възрастта. При деца нивото на АТ III е нормално по-ниско до 6-ия месец, след което достига нивото при възрастни.

Останалите рутинни хемостазни показатели за РТ и аРТТ са изследвани, но не са обработени статистически и не са предмет на проучване в настоящия дисертационен труд.

6. Верифициране на основните аналитични характеристики на използваните методи за количествено определяне на Д - димер и АТ III

Съгласно препоръките на CLSI (Института на клинични и лабораторни стандарти на САЩ) аналитичните характеристики на всички методи, преди клиничното им приложение, следва да бъдат експериментално

потвърдени чрез изследване и предоставяне на обективни доказателства. Тези изисквания са посочени в два документа – EP 05-A2 и EP15 A2. CLSI EP 15 A2 (2005) е програма, предназначена за верифициране на методи, при които се използва аналитична платформа и реактиви на производителя. Според документа минималните изисквания за верификация включват експериментално потвърждаване на следните ключови аналитични характеристики: аналитичен обхват (линейност) вкл. процедура с автоматично разреждане, възпроизводимост, достоверност и референтни интервали.

6.1. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичен имунотурбидиметричен метод за определяне на Д – димер

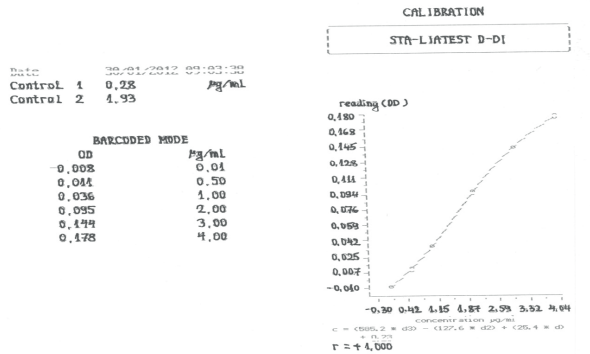
6.1.1. Аналитична измервана област (линеен обхват)

Преди да се започне процедурата по верификация е необходимо да се извърши верификация на калибрацията на аналитичната система. За целта използвахме STA Unicalibrator (лот №110665) - стабилизирана, лиофилизирана цитратна човешка плазма, прицелната стойност на която е определена чрез използване на вторичен стандарт, проследим до международен стандарт от по-висок метрологичен клас – International standard N 02/150;2003. Следва да отбележим, че до момента няма създаден референтен метод, първичен стандарт или универсален калибратор за анализа на Д - димер. Калибрационните стойности са лот-специфични и са включени в бар-кода на калибратора. Получават се автоматично чрез разреждане с дестилирана вода на основния калибратор. Калибрационната графика се построява автоматично и се визуализира графично.

При смяна на лот № на реактивите, калибрационната крива се верифицира отново със STA Unicalibrator.

Потвърди се обявения от производителя линеен обхват – 0.27 до 4,00

µg/ml, изразен във фибриноген-еквивалентни единици (FEU) (фиг. 1)



Фигура 1. Калибрационна графика от определяне на Д - димер с автоматичен турбидиметричен метод на коагулометър STA Compact

Клинично-измерваната област (чрез процедура с разреждане на плазмата с буфер Owren Kolleg при високи стойности) е до 20,0 µg/ml, изразен във фибриноген-аквивалентни единици (FEU).

6.1.2. Невъзпроизводимост на резултатите

За оценка на невъзпроизводимостта бяха използвани лиофилизирани контролни плазми от човешки произход в две концентрационни нива: STA Liatest Control N + P (лот № 110269).

6.1.2.1. Повторяемост на резултатите (невъзпроизводимост в серия).

Повторяемостта беше определена в две концентрационни нива (n=10). Резултатите представяме на табл. 2.

D- Dimer µg/ml FEU	Liatest Control N	Liatest Control P
\bar{x}	0.28	2.38
SD	0.018	0.065
CV	6.4	2.7
CV на производителя	6.3	2.3

Таблица 2. Повторяемост (repeatability) на резултатите от определяне на Д - димер с автоматичен имунотурбидиметричен метод

6.1.2.2. Невъзпроизводимост във време (n=20)

Невъзпроизводимостта във време на резултатите беше оценена с помощта на посочените контролни плазми в две концентрационни нива. Резултатите представяме на табл. 3.

D - Dimer µg/ml FEU	Liatest Control N	Liatest Control P
\bar{x}	0,305	2,45
SD	0,0226	0,099
CV%	7.41	4.04
CV на производителя	7.3	3.9

Таблица 3. Невъзпроизводимост на резултатите от определяне на Д-димер с автоматичен имунотурбидиметричен метод

Получените от нас стойности на случайната вариация потвърждават посочените от производителя и за двете концентрационни нива.

6.1.3. Недостоверност

За оценка на недостоверността се прилагат следните подходи:

- корелационен и регресионен анализ на пациентски проби с референтен метод и с лабораторния метод

- прицелна стойност на референтен материал

За целта ние използвахме контролни плазми с прицелни стойности и допустими интервали, като определихме отклонението на средната аритметична стойност, получена в лабораторията, от обявената стойност на производителя като мярка за недостоверността. За целта бяха изследвани петкратно две контролни плазми.

STA Liatest Control N (лот № 110269) с доверителен интервал 0.10-0.50 µg/ml и STA Liatest Control P (лот № 110269) с доверителен интервал: 1.75 – 2.65 µg/ml. Резултатите представяме на табл. 4.

Контролен материал	Доверител интервал	\bar{x}	Bias %
LiatestControl I µg/ml FEU	0,30 0.10 – 0.50	0.31	3.3
LiatestControl II µg/ml FEU	2.30 1.75- 2.65	2.40	4.3

Таблица 4. Недостоверност на резултатите от определяне на Д - димер с автоматичен имунотурбидиметричен метод

Получените от нас средни аритметични стойности попадат в доверителните интервали на производителя и се отклоняват в допустими граници.

6.1.4. Референтни интервали

Съгласно препоръките на CLSI референтните интервали на производителите също подлежат на верификация. За целта се извършва следното проучване:

Подбират се 20 лица с верифицирано състояние на здраве от изследвания контингент на лабораторията, на които се изследва D dimer. Ако <2 резултата са извън референтните интервали на производителя, се приема, че те са верифицирани и могат да се прилагат от лабораторията за клинични цели. Ако > 3 резултата са извън референтните интервали, се препоръчва лабораторията да изработи собствени референтни интервали.

6.2. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичен амидолитичен метод STA® –Stachrom® АТIII

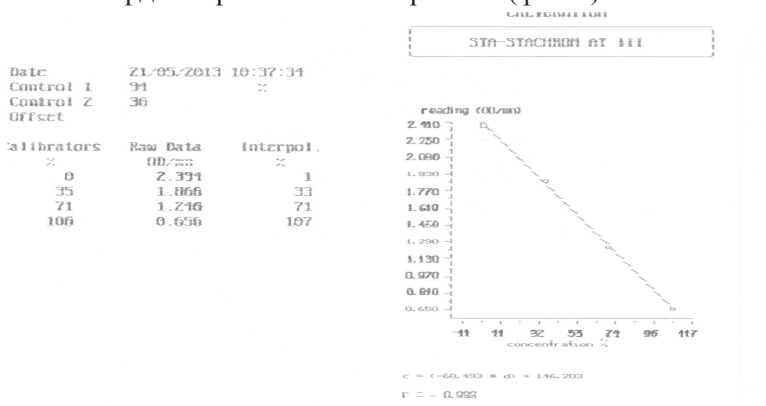
Верификацията на калибрацията е извършена със STA Unicalibrator – (лот №110665) - стабилизирани, лиофилизирани на базата на нормална цитратна човешка плазма. Прицелната стойност за АТ III е определена чрез използване на вторичен стандарт, който е проследим до международен стандарт от по-висок метрологичен клас –IN 93/768;1994

Калибрационните стойности са лот-специфични и са включени в

бар-кода на калибратора. Получават се автоматично чрез четирикратно разреждане с дестилирана вода на основния калибратор – 10%, 38%, 77%, 115%. Калибрационната графика се построява автоматично и се визуализира графично.

При смяна на лот № на реактивите, калибрационната крива се верифицира отново със STA Unicibrator.

Обявеният от производителя линеен обхват на метода е от 9 до 140 %, което се потвърди и при нашия експеримент (фиг. 2)



Фигура 2. Калибрационна графика от определяне на АТШ с диагностичен тест STA® – Stachrom® АТШ

6.2.1. Невъзпроизводимост на резултатите

За оценка на невъзпроизводимостта бяха използвани лиофилизирани контролни плазми от човешки произход в две концентрационни нива:

STA SYSTEM CONTROL N с прицелна стойност 107%, допустим интервал: (91% - 123%) и STA SYSTEM CONTROL P с прицелна стойност 39%, допустим интервал: (31% - 47%).

6.2.1.1. Повторяемост на резултатите (невъзпроизводимост в серия)

Повторяемостта беше определена в две концентрационни нива при (n=10). Резултатите представяме на табл. 5.

АТШ %	STA SYSTEM CONTROL N	STA SYSTEM CONTROL P
\bar{x}	103	43.5
SD	2.95	1.98
CV	2.86	4.55
CV на производителя	2.6	5.0

Таблица 5. Повторяемост (repeatability) на резултатите от определяне на АТШ STA® –Stachrom® АТШ

6.2.1.2. Невъзпроизводимост във време (n=20)

Невъзпроизводимостта във време на резултатите беше оценена с помощта на посочените контролни плазми в две концентрационни нива.

Резултатите представяме на табл. 6.

АТШ %	STA SYSTEM CONTROL N	STA SYSTEM CONTROL P
\bar{x}	94,4	43.3
SD	4,5	2.49
CV%	4,8	5.8
CV на производителя	4.8	6.7

Таблица 6. Невъзпроизводимост на резултатите от определяне на АТШ STA® –Stachrom® АТШ във време

Получените от нас стойности на случайната вариация потвърждават посочените от производителя и за двете концентрационни нива.

6.2.2. Недостоверност

За оценка на недостоверността се прилагат следните подходи:

- корелационен и регресионен анализ на пациентски проби с референтен метод и с лабораторния метод

- прицелна стойност на референтен материал

За целта ние използвахме контролни плазми с прицелни стойности и допустими интервали, като определихме отклонението на средната

аритметична стойност, получена в лабораторията, от обявената стойност на производителя като мярка за недоверността. За целта бяха изследвани петкратно две контролни плазми STA SYSTEM CONTROL N с прицелна стойност 107%, допустим интервал: (91% - 123%). STA SYSTEM CONTROL P с прицелна стойност 39%, допустим интервал: (31% - 47%).

Резултатите представяме на табл. 7.

Контролен материал	Доверител интервал	\bar{x}	Bias %
STA PreciClot Plus I	107 (91 – 123)	103	- 3.7
STA PreciClot Plus II	39 (31 – 37)	43.5	11.5

Таблица 7. Недоверност на резултатите от определяне на АТIII с автоматичен амидолитичен метод STA® –Stachrom® АТIII

Получените от нас средни аритметични стойности попадат в доверителните интервали на производителя и се отклоняват в допустими граници.

6.2.3. Референтни интервали

Съгласно препоръките на CLSI референтните интервали на производителите също подлежат на верификация. За целта се извършва следното проучване:

Подбират се 20 лица с верифицирано състояние на здраве от изследвания контингент на лабораторията, на които се изследва АТIII. Ако <2 резултата са извън референтните интервали на производителя, се приема, че те са верифицирани и могат да се прилагат от лабораторията за клинични цели. Ако > 3 резултата са извън референтните интервали, се препоръчва лабораторията да изработи собствени референтни интервали.

7. Статистически методи и анализи

За статистическия анализ пациентите се разделят на субгрупи според:

1. Стадия на тумора - pT2, pT3.

2. Диференцираността на тумора.
3. Извършването или не на тазова лимфаденектомия.
4. Продължителност на операцията $< 180 \text{ min}$ и $\geq 180 \text{ min}$.
5. Body mass index < 25 и ≥ 25 .
6. Възраст ≤ 65 и > 65 години.

Данните са анализирани чрез статистическия пакет SPSS 19.0. Използвани са:

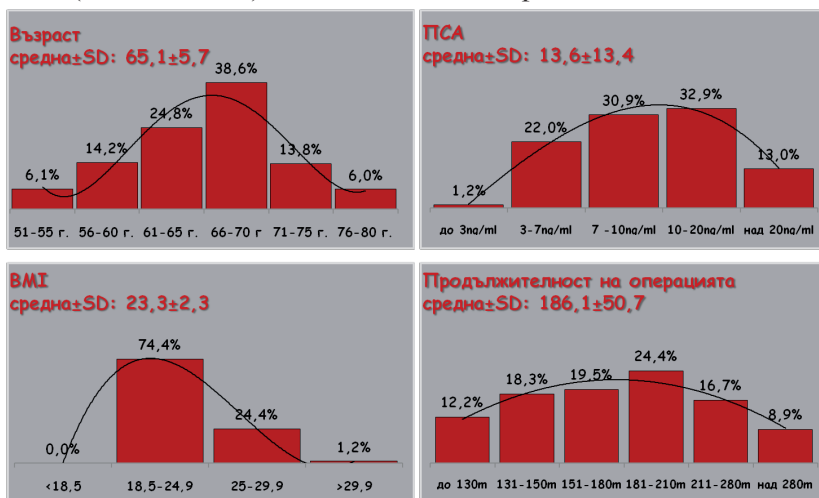
- За установяване наличието на статистически значими разлики t-test на Стюдент-Фишер и Пиърсън Chi-Квадрат тест при прието ниво на значимост от 95%;
- За измерване на зависимости между коагулационния профил и T-стадия и Gleason Score на карцинома: коефициент за корелация на Пиърсън;
- За анализиране на чувствителността и специфичността и оценка на различните прагове на лабораторните тестове: Receiver-Operating Characteristic (ROC) графики;
- За определяне на предикативната стойност на различни лабораторни тестове и други клинични параметри: създаден е множествен регресионен модел;
- За установяване на следоперативния период с най-висок риск за настъпване на тромботични усложнения: криви на Kaplan-Meier.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Радикална простатектомия – стадий, диференциация, обем и продължителност на операцията, кръвозагуба

Разпределението на пациентите по възраст е много близко при тези с карцином и ДПХ. Преобладаващият брой пациенти с карцином на

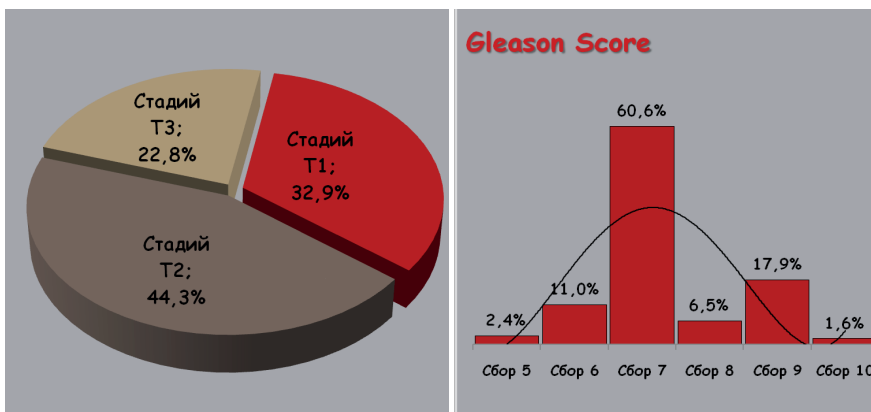
простатата са на възраст между 61-70 г. и с ПСА 7-20 ng/ml. Над 25% от пациентите са с наднормено тегло. Средното оперативно време беше 186 min (144 – 255 min). Това е показано на фиг. 3.



Фигура 3. Разпределение на пациентите с карцином на простатата по възраст, ПСА, ВМІ и продължителност на операцията

Тазова лимфна дисекция при радикалната простатектомия е извършена при 62 пациенти в зависимост от предоперативната стойност на ПСА и хистологичния резултат от биопсията. При 5 пациенти бяха установени метастази в тазовите лимфни възли.

При всички пациенти хистологичното изследване установява карцином в стадий между pT1 и pT3b. Стадирането на процеса показва Gleason Score между 5 и 10. Около 60,6% от пациентите са с Gleason Score 7, като 67% от пациентите са с Gleason Score 7 и 8, а 17,9% от тях са с Gleason Score 9. В стадий T1 са 32,9%, в стадий T2 са 44,3% и в стадий T3 са 22,8% от пациентите с карцином на простатата. Това е показано на фиг. 4



Фигура 4. Разпределение на пациентите с карцином по стадий и Gleason score

Предоперативните стойности на ПСА са между 1,99 - 69,03 ng/ml, средно $13,6 \pm 13,4$. Стойността на ПСА един месец след операцията намалява и спада до степен на лабораторна детекция. Последваща лъчетерапия и / или хормонална терапия е проведена при 11 пациенти, поради наличие на биохимичен рецидив. През първите 12 месеца след операцията не беше установен рецидив на карцинома на простатата. До шест месеца след операцията 86% от пациентите не се оплакват от незадържане на урината и са континентни. За същия срок от време при 43% от пациентите с интактен съдовонервен сноп едностранно или двустранно еректилната способност е запазена с или без използването на медикаменти.

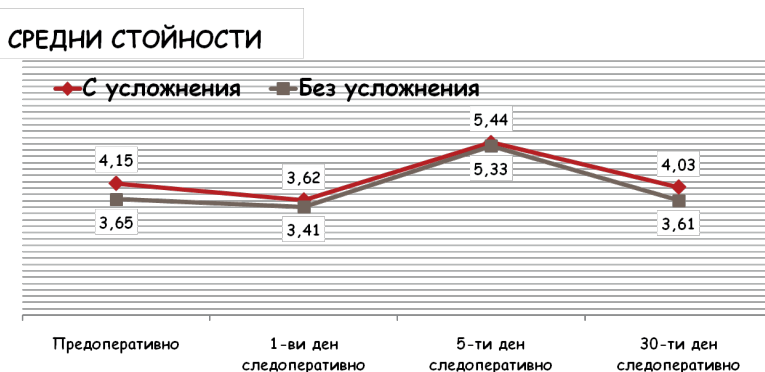
2. Промени в лабораторните показатели

Предоперативните стойности на Д - димер, АТ III и фибриноген са статистически значимо различни при групата пациенти с простатен карцином спрямо тези с ДПХ. Това е показано на табл. 8.

		CaP		ДПХ	
Брой пациенти		246		80	
Средни стойности	Д-Димер	0,80	↑	0,28	p=0,000
	АТ Ш	71,22	↓	101,09	p=0,000
	Фибриноген	3,71	↑	2,80	p=0,000

Таблица 8. Предоперативни нива на Д-Димер, АТ Ш, фибриноген при пациенти с карцином на простатата и ДПХ

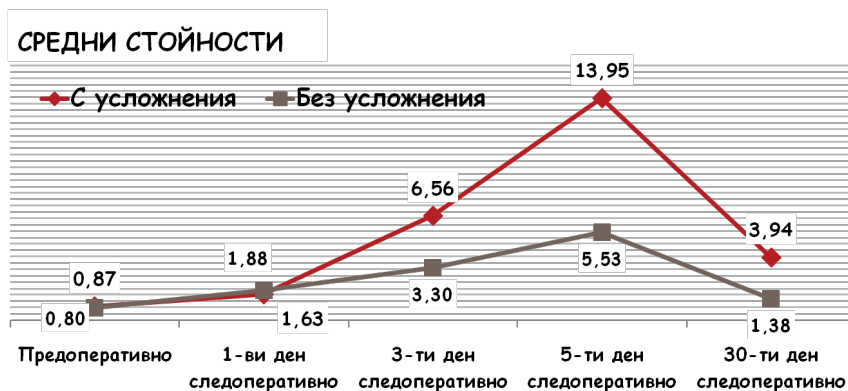
Нивата на фибриногена първоначално намаляват, след което почти се удвояват и отново намаляват до предоперативните си стойности до 1-ия месец след операцията. Фибриногенът не показва ясно отличима закономерност по отношение на завишения риск от тромботични усложнения. При пациентите в двете подгрупи с и без тромботични усложнения има значима разлика в предоперативните нива, както и в нивата след 30-ия следоперативен ден. Такава разлика не съществува в нивата на междинните контроли. Това е показано на фиг. 5.



Фигура 5. Нива на фибриноген при пациентите с карцином – със и без тромботични усложнения

Д - димер е повишен на 1-ия час след операцията. Стойността му продължава да се увеличава с пик на 5-ия следоперативен ден, след което се връща до стойностите си преди операцията

При пациенти с тромботични усложнения Д - димер се повишава в много по-голяма степен, въпреки, че предоперативно няма значима разлика между двете подгрупи. Това е показано на фиг. 6

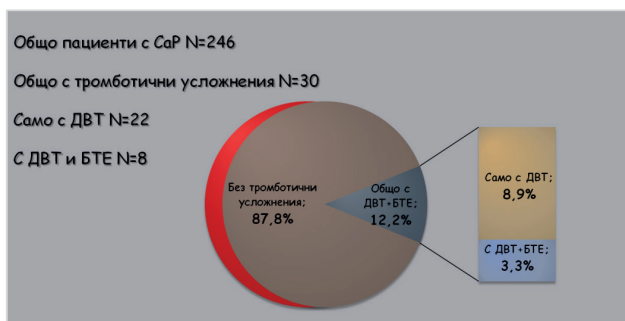


Фигура 6. Нива на Д-димер при пациентите с карцином на простатата – със и без тромботични усложнения

Стойностите на Д - димер преди и след операцията се различават значително при двете групи пациенти. Това е най – изразено на 5-ия и 30-ия ден.

3. Тромботични усложнения

Дълбока венозна тромбоза и/или белодробна тромбемболия се установи при 30 пациенти (12,2%) от всички 246 пациенти. При 8 (3,3%) от пациентите с усложнения се установи едновременно ДВТ или белодробен тромбемболизъм, а при 22 (8,9%) – само ДВТ. Това е показано на фиг. 7.



Фигура 7. Дял на тромботичните усложнения при пациентите с карцином на простатата

Процентът на тромботичните усложнения е по-висок при пациенти на възраст над 65 г, при недиференциран карцином и напреднал стадий, както и при пациенти с наднормено тегло. Процентът на пациентите с тромботични усложнения също е значимо по-висок след продължителна оперативна интервенция. Това е показано на табл. 9

Стадий	% Тромб. усл.
T1-2 (N=190)	2,1%
T3 (N=56)	46,4% p=0,000

Gleason score	% Тромб. усл.
≤ 7 (N=182)	6%
> 7 (N=64)	29,7% p=0,000

ВМІ	% Тромб. усл.
25 (N=183)	8,2%
≥ 25 (N=63)	23,8% p=0,001

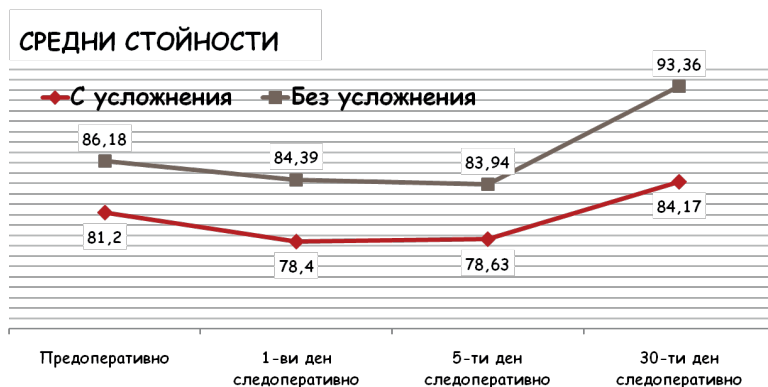
Продължителност на операцията	% Тромб. усл.
< 180 м (N=201)	4,5%
≥ м (N=45)	46,7% p=0,000

Възраст	% Тромб. усл.
≤ 65 (N=111)	5,4%
> 65 (N=135)	17,8% p=0,003

Таблица 9. Дял на тромботичните усложнения при пациентите с карцином в основни под-групи

В нашето проучване нивото на АТ III е статистически значимо по-ниско при пациентите, които са получили тромботични усложнения в сравнение с тези, които не са. Стойностите му започват да се покачват и при двете подгрупи на 5-ия ден след операцията. Темпото на повишаване е много по-бавно при пациентите, получили тромботични усложнения.

Това е показано на фиг. 8.



Фигура 8. Нива на АТ III при пациентите с карцином – със и без тромботични усложнения

В сравнение с нивата на АТ III преди операцията те намаляват на 1-ия час следоперативно в сравнение с контролната група пациенти с ДПХ. Това намаление обаче не е сигнификантно.

4. Анализ на пациентите по групи

Ние извършихме ретроспективен анализ на данните и корелацията в промените на Д-димер, фибриноген, АТ III, възрастта и ВМІ. Резултатите показват, че няма значителна разлика между контролната група и пациентите с карцином по отношение на възрастта, ВМІ и обема на простатата, измерен чрез трансректално ултразвуково изследване (ТРУС). Средните стойности на серумния ПСА в контролната група и пациентите с карцином е съответно $5,8 \pm 2,6$ и $13,6 \pm 13,4$ ng/ml. Нашите резултати показват, че предоперативните плазмени нива на Д-димер са значително по-високи, активността на АТ III е значително по-ниска и фибриногена е значително по-висок при пациентите с карцином на простатата в сравнение с тези с ДПХ.

Пациентите с карцином на простатата и Gleason Score над 7 показват по-ниска предоперативна активност на АТ III в сравнение с останалите

пациенти. От друга страна тази разлика само достига до статистическата значимост. По отношение на останалите коагулационни параметри между пациентите с карцином на простатата и Gleason Score под 6 и тези с Gleason Score над ≥ 7 не се установява статистическа значимост в предоперативните нива на фибриноген и Д-димер. При използване на същия анализ и праг на Gleason Score от 8 се установява значима разлика с по-високи нива на Д-димер и достига статистическа значимост при фибриноген. Същата е зависимостта и при пациентите със следоперативно установена екстракапсулна инвазия на тумора ($\geq T3$) или с близки и далечни метастази. Стадирането по Gleason Score и Т-стадият на простатния карцином корелират в голяма степен с нивото на Д-димера, измерено на 3-ия и 5-ия следоперативен ден. Установява се също умерена корелация между Gleason Score и нивото на Д-димера на 1-ия и 30-ия следоперативен ден. Това е показано на табл. 10

		ДД предоперативно	ДД 1ви ден	ДД 3ти ден	ДД 5ти ден	ДД 30ти ден
Т-стадий	Pearson Correlation	,083	,039	,462**	,518**	,397**
	Sig. (2-tailed)	,196	,542	,000	,000	,000
	N	246	246	246	246	246
Gleason Score	Pearson Correlation	,058	,245**	,405**	,414**	,301**
	Sig. (2-tailed)	,366	,000	,000	,000	,000
	N	246	246	246	246	246

Таблица 10. Корелация между Gleason Score, Т-стадий и Д-димер при пациентите с карцином на простатата

От друга страна резултатите показват, че Gleason Score не корелира с предоперативните стойности на Д-димер. Установява се обаче, че нивата на Д-димер са по-високи при пациентите с ПСА над 10 ng/ml. Това е показано на табл. 11.

		Д-Димер предоперативно
PSA	Pearson Correlation	,026
	Sig. (2-tailed)	,687
	N	246

	Брой пациенти	PSA		Д-Димер предоперативно	
		Средна	SD	Средна	SD
PSA до 10ng/ml	133	6,83	1,56	0,74	0,51
PSA ≥ 10ng/ml	113	21,57	16,40	0,86	0,63

Таблица 11. Корелация между ПСА и Д-димер при пациентите с карцином

Ние установихме ниска степен на зависимост между Gleason Score и нивото на фибриноген. Налице е обаче умерена корелация между Т-стадия на простатния карцином и предоперативния фибриноген, както и тези измерени на 5-ия и 30-ия следоперативен ден. Това е показано на табл. 12.

		Фибр. Предопер.	Фибр. 1ви ден	Фибр. 5ти ден	Фибр. 30ти ден
Т-стадий	Pearson Correlation	,207**	,180**	,210**	,200**
	Sig. (2-tailed)	,001	,005	,001	,002
	N	246	246	246	246
Сбор по Gleason	Pearson Correlation	,185**	,133*	,102	,177**
	Sig. (2-tailed)	,004	,037	,109	,005
	N	246	246	246	246

Таблица 12. Корелация между Gleason Score, Т-стадий и фибриноген при пациентите с карцином

Т-стадия на простатния карцином корелира значително както с предоперативните, така и със следоперативните нива на АТ III, измерени на 1-ия и 5-ия ден. От друга страна Gleason Score корелира умерено с АТ III, измерен на 1-ия следоперативен ден. Това е показано на табл. 13.

		AT III предопер.	AT III 1ви ден	AT III 3ти ден	AT III 30ти ден
Т- стадий	Pearson Correlation	-,564**	-,591**	-,492**	-,279**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000
	N	246	246	246	246
Сбор по Gleason	Pearson Correlation	-,164*	-,275**	-,188**	-,084
	Sig. (2-tailed)	,010	,000	,003	,190
	N	246	246	246	246

Таблица 13. Корелация между Gleason Score, Т-стадий и AT III при пациентите с карцином

Извършването на тазовата лимфна дисекция при пациентите с простатен карцином не корелира със стойностите на Д-димера за разлика от продължителността на самата операция. Стойността на Д-димер корелира с BMI над 25.

Концентрацията на фибриноген преди операцията при пациентите с карцином на простатата са със статистически значими разлики в сравнение с тези при ДПХ. Тя обаче не показва статистически значима разлика при сравняване на пациентите с карцином и развили венозна тромбоза с тези без венозна тромбоза. Не се установява статистически значима разлика в нивото на фибриноген и между пациенти с венозна тромбоза и такива с белодробен тромбоемболизъм. Ето защо можем да кажем, че фибриногеновата концентрация не се свързва с повишен риск от развитие на венозна тромбоза.

5. Мултивариационен регресионен модел на предикторите на тромботични усложнения при карцином на простатата

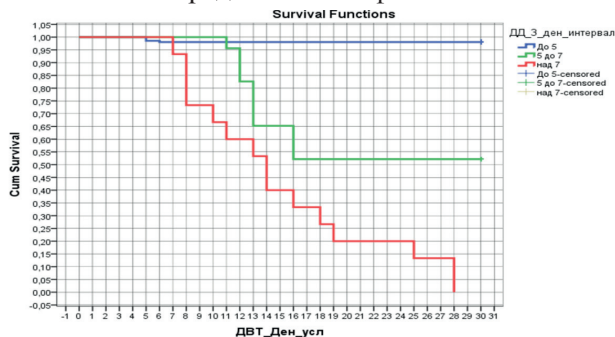
Мултивариационният регресионен модел на предикторите на тромботични усложнения при пациентите след радикална простатектомия по повод на карцином на простатата обяснява 76,3% от вариацията. Невключените променливи не допринасят значимо поради ниската си предикативна

стойност и моделът ги „изхвърля“. С най-голяма предикативна сила са ниво на Д-димер на 5-ия ден, както и АТ III на 1-ия ден след операцията. Това е показано на табл. 14.

Независими променливи в модела: - Възраст - BMI - Продължителност на операцията - Gleason Score - T-Стадий - ДД 3ти ден - ДД 5ти ден - АТ III 1ви ден - Фибриноген 1ви ден Зависима променлива: Наличие на тромботични усложнения през периода на проследяване	Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
	(Constant)	,401	,426		,941	,348
	ДД 5ти ден	,026	,008	,325	3,264	,001
	АТIII 1ви ден	-,018	,004	-,210	-4,419	,000
	BMI	,026	,006	,181	4,138	,000
	Продължит. опер.	,001	,000	,191	3,817	,000
	ДД 3ти ден	,037	,018	,195	2,047	,042

Таблица 14. Мултивариационен регресионен модел на предикторите на тромботични усложнения при карцином

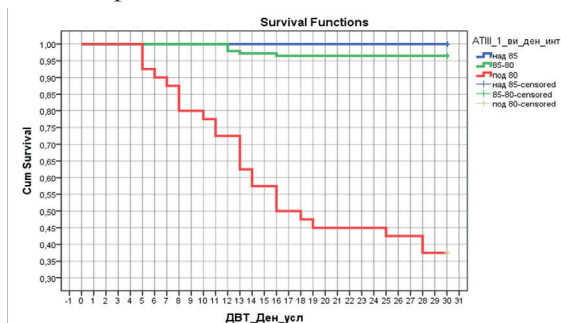
При пациентите с Д-димер до 5 $\mu\text{g/ml}$ на 3-ия ден операцията е налице минимален риск да се развият усложнения в 30 дневен период (до 3%). При другите пациенти с нива на Д-димер от 5 $\mu\text{g/ml}$ до 7 $\mu\text{g/ml}$ рискът значително се увеличава. Тази тенденция с времето продължава като между 11-ия и 16-ия ден той нараства прогресивно от 5% до 50%. При нива над 7 $\mu\text{g/ml}$ периодът от 8-ия до 19-ия ден е най-рисков и нараства от 25% до 80%. Това е представено на фиг. 9.



Фигура 9. Криви на Каплан-Майер: Д - димер на 3-ти следоперативен ден: оценка на риска

При пациентите с АТ III над 80 на 1-ия ден след операцията е налице 5% риск да се развият усложнения в 30 дневен период. От друга страна резултатите показват, че практически след 15-ия ден той не нараства. При пациенти с нива на АТ III под 80 периодът между 6-ия и 19-ия ден е най-рисков. В този интервал от време той варира от 10% до 55%.

Това е показано на фиг. 10.



Фигура 10. Криви на Каплан-Майер: АТ III на 1-ви следоперативен ден: оценка на риска

Първичното следоперативно скриниране за ранна диагностика на венозна тромбоза или белодробен тромбоемболизъм се извършва чрез внимателно проследяване на клиничните данни и плазмените нива на Д-димер и АТ III.

V. ОБСЪЖДАНЕ

1. Д-димер

Повишението на Д-димер е индикатор за образуване и натрупване на фибрин, което го прави рисков показател за тромбоза (тромбофлебити, белодробна тромбоемболия). При злокачествени тумори туморната тъкан е покрита с фибринова мрежа, която е източник на ФДП, в частност на Д-димер. Увеличението на първоначални нива на Д-димер съвпада с публикуваните резултати в други проучвания.

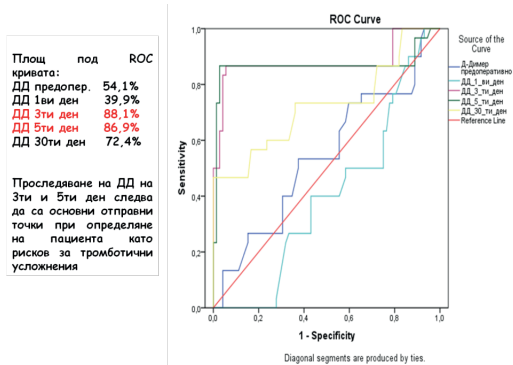
Плазменото ниво на Д-димер са значително по-високи при пациенти

с карцином на простатата в сравнение с контролната група. Това може да се свърже с повишената коагулационна активност при карцинома, особено когато той е в по-напреднал стадий и / или по-недиференциран вариант. Ние предполагаме обаче, че Д-димер не е достатъчно специфичен, за да установи разлики в нивото на хиперкоагулация при пациентите с Gleason Score под 6 и над 7. От друга страна Д-димер показва по-високи нива при по-висок праг на недиференцираност на тумора (Gleason Score над 8). Такава взаимовръзка установихме и при пациентите с екстракапсулна инвазия (стадий на тумора над Т3) и близки и далечни метастази. Тези резултати предполагат възможност за прецизиране поведението на клинициста по отношение дозировката на хепариновата профилактика и следоперативното проследяване на възможното развитие на венозна тромбоза. Факторите, повлияващи тромботичния риск все още не са точно определени.

Д-димер се повишава на 1-ия час след операцията, след това стойността му продължава да се увеличава и достига своя пик на 5-6-ти следоперативен ден. Накрая се връща до предоперативните си стойности.

Стойностите на Д-димер се различават значително между развилите венозна тромбоза и останалите пациенти преди и след операцията. Тези разлики остават постоянни в първите 30 дни след операцията. Това показва, че най-висок риск от венозна тромбоза се наблюдава между 6-ия и 20-ия следоперативен ден.

Ние считаме, че проследяването на Д-димер на 3-ия и 5-ия ден след операцията трябва да са основни отправни точки при определяне на риска от тромботични усложнения при тези пациенти. Това е показано на фиг. 11.



Фигура 11. Чувствителност и специфичност на Д-димер при пациентите с карцином

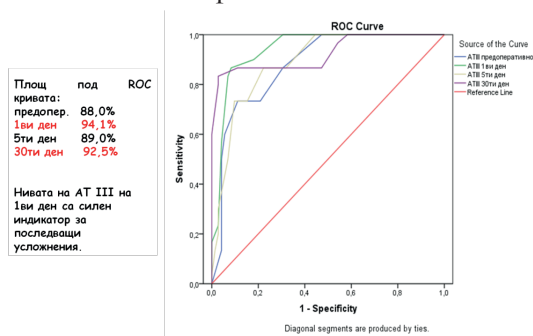
Предоперативните стойности на Д-димер, увеличението му на 3-ия следоперативен ден, продължителността на операцията, разширената тазова лимфна дисекция, възрастта са важни прогностични рискови фактори за венозна тромбоза и белодробен тромбоемболизъм (119, 274). Логистичният регресионен мултивариационен анализ установява, че стойността на Д-димер на 3-ия следоперативен ден и напредналата възраст са независими рискови фактори за предсказване развитието на следоперативна венозна тромбоза.

2. АТ III

При злокачествени заболявания може да се намали продукцията на инхибитори на коагулацията и да се ускори тяхната прокоагулационна активност. АТ III регулира повишената прокоагулационна активност и е важен естествен тромбинов инхибитор. Той дезактивира тромбина чрез необратима реакция, което води до образуването на тромбин-антитромбинови комплекси. Нашите проучвания показват, че нивата на АТ III са ниски при пациенти със злокачествени заболявания.

ROC кривата показва чувствителността и специфичността на АТ III при

пациенти с карцином на простатата. Спорде нас нивата му на 1-ия следоперативен ден са силен индикатор за последващи тромботични усложнения. Това е показано на фиг. 12.



Фигура 12. Чувствителност и специфичност на АТ III при пациентите с карцином

Регресионният мултивариационен анализ установява, че ниските стойности на АТ III на 1-ия следоперативен ден са независим фактор и с най-голяма предиктивна сила за следоперативни тромботични усложнения при карцином на простатата.

3. Фибриноген

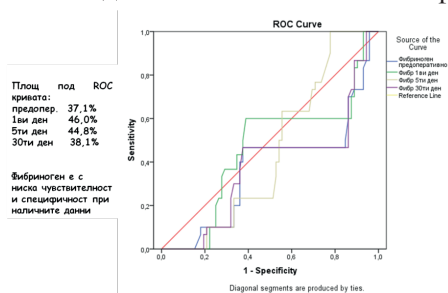
Нивата на фибриногена първоначално намаляват, след това почти се удвояват и накрая намаляват до предоперативните си стойности на 1-ия месец след операцията. Фибриногените нива показват по-слаб отговор на тъканната травма, отколкото Д-димер.

Серумните нива на фибриногена се различават слабо както преди, така и след операцията и между проучваните групи пациенти. Ние не установихме връзка между тях и риск от венозна тромбоза.

Стойностите на фибриногена показват слаба статистическа значимост при сравняване на пациентите с карцином и тези от контролната група. Ние не установихме статистически значима разлика при сравняване на пациенти с карцином на простатата и развили венозна тромбоза и без

венозна тромбоза. Такава не беше установена и между пациентите с венозна тромбоза и белодробен тромбемболизъм. Според нас нивата на фибриноген не могат да се свързват с повишен риск от развитие на венозна тромбоза.

Ние установихме, че фибриногенът е с ниска чувствителност и специфичност при наличните данни. Това е показано на фиг. 13.



Фигура 13. Чувствителност и специфичност на фибриноген при пациентите с карцином

Ние установихме липса на разлика между контролната група пациенти и тези с карцином на простатата по отношение на възрастта, BMI и обема на жлезата, измерен чрез трансректално ултразвуково изследване. Нашите данни съвпадат с тези на други автори. Това се дължи на факта, че пациентите с диагностициран и лекуван карцином на простатата и тези от контролната група са най-често на възраст между 60 и 70 години.

Средните стойности на серумния ПСА при пациентите с карцином на простатата е разбираемо по-висок. Те обаче силно се припокриват при пациентите с ДПХ в диапазона между 4-10 ng/ml.

Продължителността на операцията, интраоперативната кръвозатуба и следоперативните усложнения са подобни на описаните от други автори. Окончателно определеният патологичен стадий на заболяването е предимно T1 – T2. Стадий T3 е изключение предвид подборът на пациентите с показания за радикално оперативно лечение. При пациенти с доказана екстракапсулна инвазия и / или установени близки и далечни

метастази е извършена лъчетерапия или пълна андрогенна блокада (медикаментозна и естетична пулпектомия). Те бяха изключени от по-нататъшно проследяване.

Продължителността на операцията и агресивната тазова лимфна дисекция при тазови тумори е добре известен рисков фактор за развитие на дълбока венозна тромбоза. В нашето проучване продължителността на операцията и обема на лимфната дисекция не повлияха коагулационните фактори в следоперативния период. Те обаче остават рисков фактор за развитие на тромботични усложнения в първите 4 седмици след операцията. От друга страна повишеният риск от развитие на тромбоза може да се свърже с интраоперативната травма и застоя в дълбоката венозна система по време на оперативната интервенция.

Нашите резултати предполагат, че продължителната анестезия и високата ВМІ може да допринасят за коагулационната активност в следоперативния период.

Преценката на индивидуалния тромботичен риск преди извършването на радикална простатектомия по повод на простатен карцином е важна съставна част от диагностично-лечебния процес на пациентите. Понякога тя играе решаваща роля особено при установяване на високо рискови пациенти и необходимост от модифициране на антикоагулационната терапия. За съжаление конвенционалните хемостазни изследвания нямат необходимата специфичност и чувствителност за определянето на тази група пациенти. Ето защо ние препоръчваме изследването на специализирани хемостазни показатели като Д-димер и АТ III, за да се определи риска от следоперативни тромботични усложнения и индивидуализира антикоагулантната терапия.

Основните препоръки за антитромботична профилактика при високо рисковите пациенти включват приложението на нискомолекулярен хепарин - еднократно дневно, а при силно кървене - следоперативна ела-

стокомпресия на долните крайници. При пациенти с изключително висок риск се препоръчва комбинация от еднократно дневно прилагане на нискомолекулярен хепарин и еластокомпресия на долните крайници. Той е неинвазивен и евтин метод за профилактика. В случаите на повишен риск от кръвене механичната профилактика трябва да се предпочита пред фармакологичната.

Според редица проучвания рискът от следоперативни тромботични усложнения продължава да е значим в рамките на 1-ия месец след оперативната интервенция. По клинични данни той обаче е значим до 6-та седмица след операцията, а нисък риск съществува до 12-та седмица след операцията.

Различните форми на антикоагулантна профилактика и терапия на тромботичните усложнения преди операцията трябва да се заменят с нискомолекулярен хепарин. Ацетилсалициловата киселина трябва да се спре 8 – 10 дни предоперативно.

Нашето проучване доказва необходимостта от индивидуален подход и определяне на риска от тромботични усложнения в следоперативния период при пациентите след радикална простатектомия. От своя страна това изисква и индивидуален план за антикоагулантна терапия с оглед профилактика и намаляване честотата на тромбозата и лечение на свързани с нея белодробен тромбемболизъм. Изследването на хемостазните показатели на пациентите в следоперативния период след радикална простатектомия може да промени международния консенсус за продължителността и дозировката на антикоагулантната профилактика.

4. Ограничения на нашето проучване

1. Това са предварителни резултати. Няма категорично заключение за статистическа значимост по отношение стойностите на фибриногена, тазовата лимфна дисекция и възрастта.

2. Относително малък брой пациенти и като следствие на това вероятността да се установят случаи на венозни тромбоемболични усложнения е ограничена.
3. Не са включени пациенти с извършена лъче- и хормонална терапия 6 седмици следоперативно и затова те отпадат от проследяването.
4. Налице са и други лабораторни тестове, чрез които се определя коагулационната активност. Те не са изследвани в нашето проучване и не е търсена специфичната им свързаност с карцинома на простатата след радикална простатектомия.

VI. ИЗВОДИ

1. Преди операцията пациентите с карцином на простатата имат статистически значимо по-високи плазмени нива на Д-димер и фибриноген спрямо контролната група от пациенти с ДПХ, а нивата на АТ III са значимо по-ниски.
2. Д-димер и АТIII са с най-висока самостоятелна диагностична стойност от трите проследени хемостазни показатели при прогнозирането на тромботични усложнения при пациентите с карцином на простатата.
3. При пациентите с усложнения Д-димер нараства ускорено между 3-ти и 5-ти следоперативен ден. През този период той корелира значително с туморния стадий и Gleason Score. Между 3-ти и 5-ти следоперативен ден Д-димер достига висока чувствителност и специфичност (88 % и 87 % съответно), като оптималните диагностични прагове са между 3 - 5 $\mu\text{g/ml}$.
4. АТIII е със статистически значимо по-ниски нива при пациентите с настъпили тромботични усложнения, както предоперативно, така и на 1-ви, 5-ти и 30-ти следоперативен ден. Предоперативната и следоперативна корелация на 1-ви и 5-ти ден между АТ III и туморния стадий е висока. На 1-ия следоперативен ден АТ III демонстрира много висока чувствителност и специфичност като оптималните прагове са 84 % до 82 %.
5. Плазмените нива на фибриноген не са достатъчно добър самостоятелен предиктор за прогнозиране на тромботични усложнения при пациенти с простатен карцином. Той не корелира със стадия и диференциацията на карцинома на простатата.
6. Направеният съвкупен регресионен мултивариационен модел отличава **4 САМОСТОЯТЕЛНИ** предиктора с ключово значение и най-висока прогностична стойност, чиято неблагоприятна комбинация профилира пациентите като високо рискови:

- пациенти с повишен индекс на телесна маса (ВМІ)
- пациенти с удължено времетраене на оперативната интервенция
- АТ III със занижени нива под 85 % на 1-ия следоперативен ден
- Д - димер със завишени нива на 3-ти следоперативен ден над 5 $\mu\text{g/ml}$. и на 5-ти следоперативен ден над 7 $\mu\text{g/ml}$.

7. Анализите чрез кривите на преживяемост на Каплан-Майер установиха:

- при пациенти с АТIII под 80 % на 1-ия следоперативен ден най-рискът е периодът между 6-ти и 19-ти следоперативен ден и нараства от 10% до 55%
- при пациенти с Д - димер над 7 $\mu\text{g/ml}$. на 3-ти следоперативен ден най-рискът е периодът между 8-ми и 19-ти следоперативен ден и нараства от 25% до 80%

8. Делът на пациентите с тромботични усложнения нараства значимо в специфични подгрупи, които трябва да бъдат профилактирани с повишено внимание:

- при оперативни интервенции с продължителност над 240 минути – с 46,7 %
- при туморен стадий Т3-4 - 46,4 %
- при Gleason Score над 7 - 29,7 %
- при индекс на телесна маса (ВМІ) над 25 % - 23,8 %
- при възраст на пациента над 65 години - 17,8 %

9. При пациентите след радикална простатектомия са необходими индивидуален подход и индивидуално определяне на риска от венозни тромбоемболични усложнения в следоперативния период в зависимост от изследваните хемостазни маркери.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Изследват се стойностите на Д - димер, АТ III и фибриноген пред- и следоперативно с оглед определяне на специфично свързаната с карцинома на простатата хиперкоагулация и риска от развитието на следоперативен венозен тромбемболизъм (ВТЕ).
2. Потърсена е възможността за корелация между Д - димер, АТ III и фибриноген със стадия и агресивността на простатния карцином.
3. Установено е, че стойността на Д - димер над 5 $\mu\text{g/ml}$ на 3-ия следоперативен ден и напредналата възраст са независими рискови фактори за предсказване развитието на следоперативна венозна тромбоза.
4. Установено е, че праг на Д - димер над 7 $\mu\text{g/ml}$ на 5-ия следоперативен ден е съмнителен за венозна тромбоза и налага допълнителни диагностични изследвания.
5. Препоръчва се използването на Д - димер за дългосрочно проследяване на високорисковите пациенти с оглед развитие на ВТЕ.
6. За първи път в България се изследват хемостазни показатели като прогностични и рискови маркери при пациенти с карцином на простатата.

VIII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в списания

1. Бояновски, Б., М. Русева, **А. Младенова** и др. – Антифосфолипиден синдром и резистентност към активиран протеин С при пациенти със системен лупус еритематодес – Ревматология, 2000, 4, 8-11.
2. Boyanovski, B., M. Russeva, **A. Mladenova** et al. - Protein C activity in patients with antiphospholipid syndrome – Journal of Clinical Rheumatology, 2000, 6, 5, 1-5.
3. **Младенова, А.** – Хемостазни показатели при локализиран карцином на простатната жлеза – Урология и ендоурология, 2013, 19, 2, 37-45.
4. **Младенова, А.** – Хемостазни показатели при локализиран карцином на простатната жлеза – Урология и ендоурология, 2013, 19, 3, 73-79.

Участия в научни прояви

1. **Младенова, А.**, А. Нашков,, М. Палавеева и др. – Автоматичен метод за определяне на антитромбин III активността преди , по време и след терапия с хепарин - Втори Балкански конгрес по клинична лаборатория, Истанбул, Турция, 21-24.09. 1994, 68-72.
2. Донкова, О., **А.Младенова**, М. Пенев и др. – Аналитична надеждност и референтни граници на някои коагулационни параметри - Четвърти Балкански конгрес по клинична лаборатория, Будва, Черна гора, 09-13.10.1996, 23-25.
3. Пенев, М., Д.Османлиев, **А.Младенова** и др. – Антитромбин III, протеин С и фактор V – Лайден при белодробен тромбоемболизъм – Шести Национален конгрес по клинична лаборатория, София, България, 19-20.09.1998, 38-41.

4. Цачев К., Л. Ламбрева, **А. Младенова**, М. Пенев, Д. Дескова – Коагулационна програма на българския външен качествен контрол. Седми Балкански конгрес по клинична лаборатория, Янина, Гърция, 09-12.10.2001,
5. **Младенова, А.**, Йотовски, В. – Хемостазни показатели като прогностични критерии при карцином на простатата – IX Национален конгрес по клинична лаборатория, Резюмета, Боровец, 27-29.09.2012, 56-57.
6. Йотовски, В., **А. Младенова**, Г. Деримачковски, Д. Младенов – Наличие на лимфни метастази в зависимост от клиничния стадий, ПСА и Gleason Score - 17-ти Национален симпозиум по урология, Резюмета, Сандански, 05-07.06.2014.

