



Тест генерации тромбина — уникальный метод интегральной оценки системы гемостаза

Тест генерации тромбина (ТГТ) представляет собой лабораторный метод определения динамики образования и инактивации *in vitro* ключевого фермента гемостаза — тромбина. Плазменная система (в которой функционирует тромбин), ответственная за образование и последующее угнетение тромбина в крови, вызовет тенденцию к тромбозу в случае избытка свободного тромбина (гиперкоагуляция) или приведет к кровоточивости при недостаточной активности тромбина (гипокоагуляция).

ТГТ относится к так называемым глобальным коагулологическим тестам, к которым также принадлежат такие методы, как тромбоэластография и тромбодинамика [7]. Результаты глобальных тестов позволяют оценить работу системы гемостаза в целом (рис. 1).

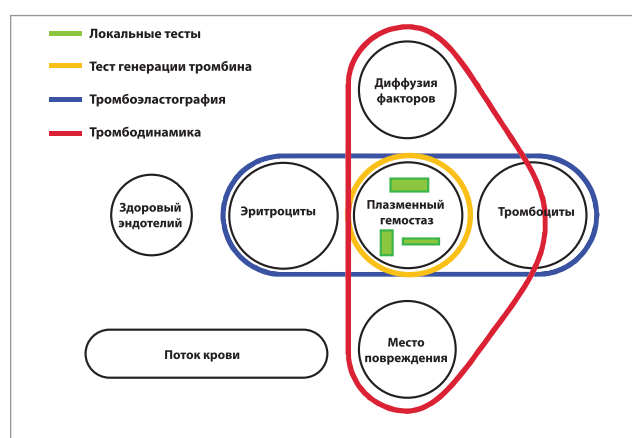


Рис. 1. Глобальные коагулологические тесты

Тромбин (фактор свертывания IIa) является важнейшим компонентом системы гемостаза и представляет собой витамин К-зависимый белок, который относится к ферментам класса гидролаз (сериновая протеаза), катализирующих гидролиз пептидных связей, образованных остатками аргинина и лизина (рис. 2).

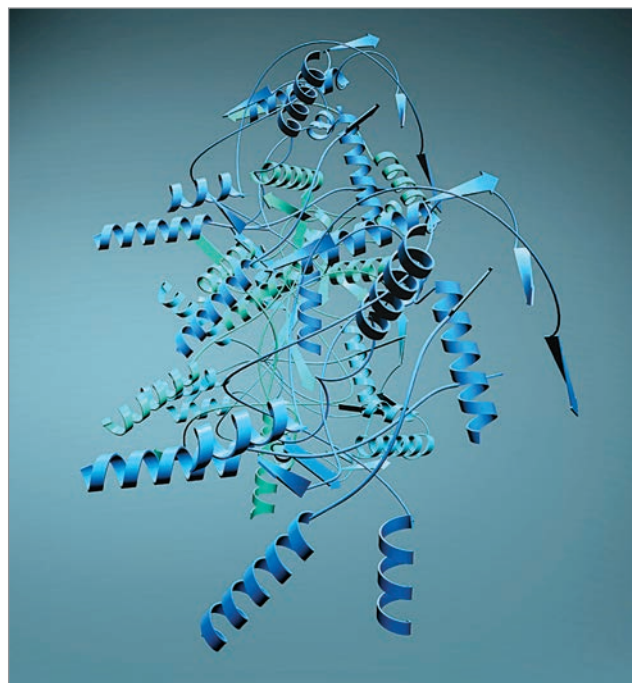


Рис. 2. Структура молекулы тромбина

Предшественником тромбина (фактор IIa) является протромбин (фактор II), синтез которого происходит в печени. В комплексе факторов Xa-Va-II на фосфолипидной поверхности происходит ограниченный протеолиз протромбина, в результате которого образуются несколько активных структур с различной молекулярной массой — мезотромбин, α -, β - и γ -тромбин. Наиболее значимым продуктом является сериновая протеаза — α -тромбин. На молекуле тромбина имеется 4 сайта связывания для субстратов, ингибиторов, кофакторов и ионов кальция [8]. Такая способность тромбина позволяет ему активно функционировать не только в твердой

фазе, но и в токе крови, выполняя при этом многочисленные функции (рис. 3).

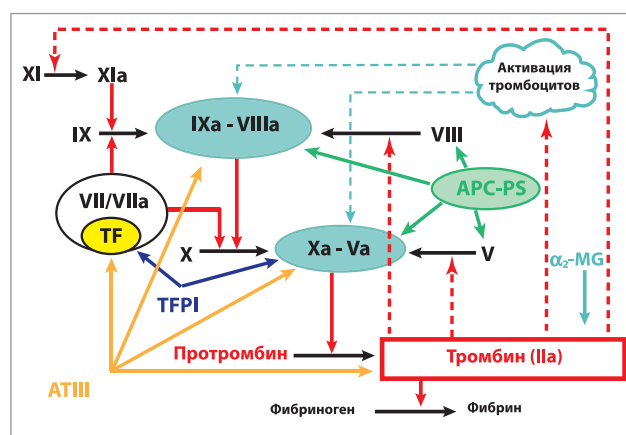


Рис. 3. Система регуляции тромбина в кровеносном русле

Условные обозначения: α_2 -MG — α_2 -макроглобулин; TF — тканевой фактор; APC — активированный протеин C; PS — протеин S; TFPI — ингибитор пути тканевого фактора; AT III — антитромбин III.

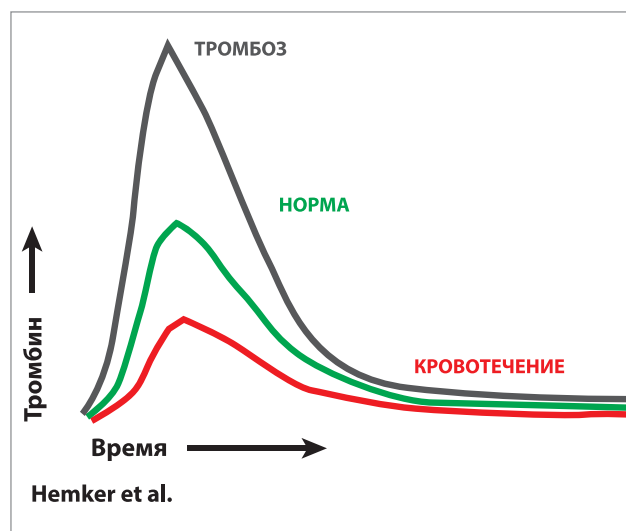
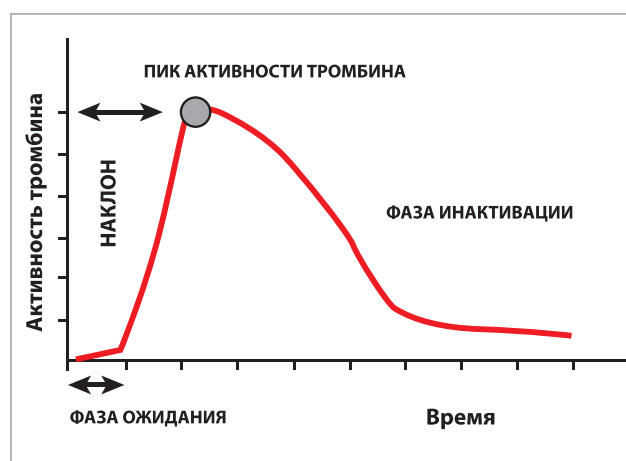


Рис. 4. Общая схема кинетики образования и инактивации эндогенного тромбина

Основные функции тромбина в системе гемостаза:

- образование фибрина из фибриногена (ограниченный протеолиз фибриногена до мономера фибрина);
- усиление активации системы гемостаза по принципу положительной обратной связи (активация факторов V, VII, VIII, XI);

- активация фактора XIII (участие в стабилизации сгустка);
- активация клеточного звена (агрегация тромбоцитов);
- в комплексе с тромбомодулином активация протеина C;
- ограниченный протеолиз плазматической карбоксипептидазы В до активной формы — активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (TAFI);
- стимуляция выброса из эндотелиоцитов тканевого активатора плазминогена.

Кроме вышеперечисленных функций, тромбин участвует также в активации сосудистого эндотелия, процессах репарации, ускорении ангиогенеза, миграции и роста клеток. Способность системы свертывания крови генерировать тромбин определяет коагуляционный потенциал крови. Главной причиной разработки ТГТ послужило то обстоятельство, что по выходу фибрина нельзя судить о повышенном тромбогенном потенциале системы свертывания, так как лишь часть тромбина идет на образование сгустка (все тесты, основанные на определении времени образования сгустка, регистрируют только начальную фазу образования тромбина, или около 5% от общего тромбина). Таким образом, необходимо было разработать такой тест, который бы позволил оценить динамику изменения концентрации тромбина в образце плазмы крови и количественно определить суммарный эффект от взаимодействия всех факторов системы свертывания, что может служить интегральным показателем состояния гемостаза [1].

Впервые такой тест под названием «тест генерации тромбина» для оценки состояния системы свертывания крови у больных, страдающих гемофилией, был предложен в 1953 г. R. Macfarlane и R. Biggs [2]. Однако он имел ряд существенных методических недостатков, в связи с чем группа исследователей под руководством Н. Hemker из Маастрихтского университета [3] видоизменила технологию выполнения данного теста и разработала автоматизированный метод детекции генерации тромбина. Первоначально Н. Hemker и S. Wielders [4] был предложен специфический для этого фермента хромогенный субстрат, который не обладал высокой степенью аффинности к тромбину. Более того, фотометрическое определение хромогена не позволяло использовать плазму, богатую тромбоцитами, которые существенно влияли на оптическую плотность. После анализа основных недостатков метода с применением хромогенного субстрата в 2003 г. Н. Hemker [5, 6] предложил использовать очень специфичный, медленно реагирующий флуорогенный субстрат — пептид, меченый 7-амино-4-метилкумарином (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) (рис. 4).

В настоящее время для проведения ТГТ используют такие планшетные флуориметры, как BioTek® FLx 800™ TC, BMG Labtech FLUOstar OPTIMA, Molecular Devices Gemini/SpectraMax®, Perkin Elmer® Victor Wallac, TECAN Genios™, Thermo Fluoroskan®, или автоматический анализатор Severon-alpha (включает флуоресцентный модуль) с использованием набора Technothrombin® TGA Kit.

Методика определения ТГТ с помощью флуориметра основана на том, что в лунках планшета инкубируется смесь образца исследуемой плазмы с активатором. В качестве активатора выступает рекомбинантный человеческий тканевой фактор и отрицательно заряженные фосфолипиды (фосфатидилсерин : фосфатидилэтаноламин : фосфатидилхолин — 20:20:60). После инкубации смеси при температуре 37° С для запуска свертывания в лунки флуориметра вносится буфер, содержащий ионизированный кальций и флуорогенный субстрат. Образующийся тромбин расщепляет субстрат, в результате чего высвобождается молекула флуорофора. Это излучение автоматически регистрируется флуориметром через равные промежутки времени. Интенсивность свечения пропорциональна скорости изменения флуоресценции в данный момент времени, а следовательно,

и концентрации образовавшегося тромбина. На основании измерений посредством специального программного обеспечения (программа Thrombinoscope) выстраивается кривая генерации тромбина (рис. 5).



Рис. 5. Кривая ТГТ, полученная с использованием флуориметра

В кривой ТГТ оценивают следующие показатели:

- время запаздывания (lag time, мин) — время от момента внесения смеси флуорогенного субстрата и ионизированного кальция в лунку с образцом и активатором до момента отклонения флуоресцентного сигнала от основной горизонтальной линии более чем на 2 стандартных отклонения;
- пиковая концентрация тромбина (peak thrombin, нмоль/л) — максимальная концентрация тромбина, достигаемая в процессе его генерации в образце;
- время достижения пика (time to peak, мин) — время, за которое в образце достигается максимальная концентрация тромбина;
- эндогенный тромбиновый потенциал (ETP, нмоль/мин) — площадь под кривой генерации тромбина (рис. 6).

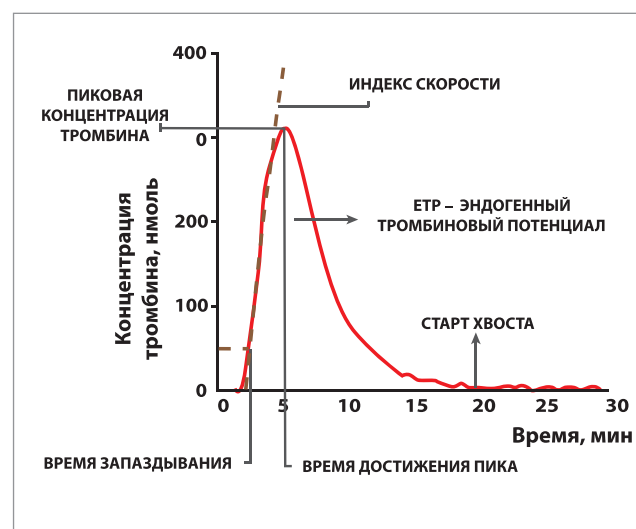


Рис. 6. Основные показатели ТГТ

Метод ТГТ нашел широкое практическое применение в диагностике тромбофилии (рис. 7) [13] и гемофилии (рис. 8).

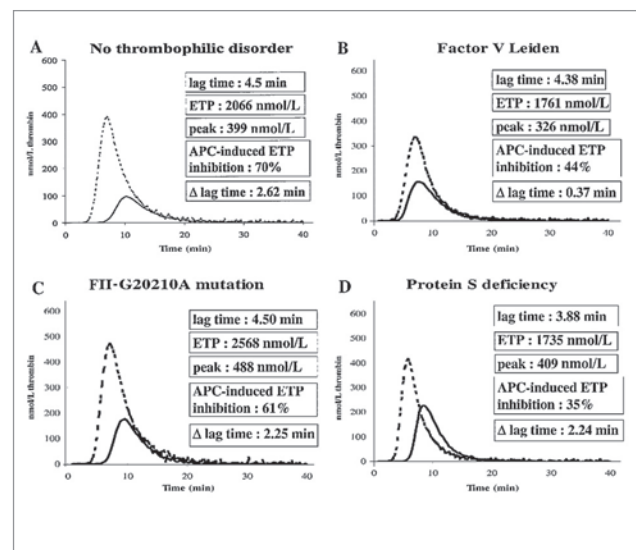


Рис. 7. ТГТ при мутации фактора V Лейден, фактора II протромбина G20210A и при дефиците протеина S

Результаты ТГТ у пациентов с волчаночным антикоагулянтом, мутацией фактора V Лейден и в ходе терапии непрямими антикоагулянтами представлены на рисунке 9.

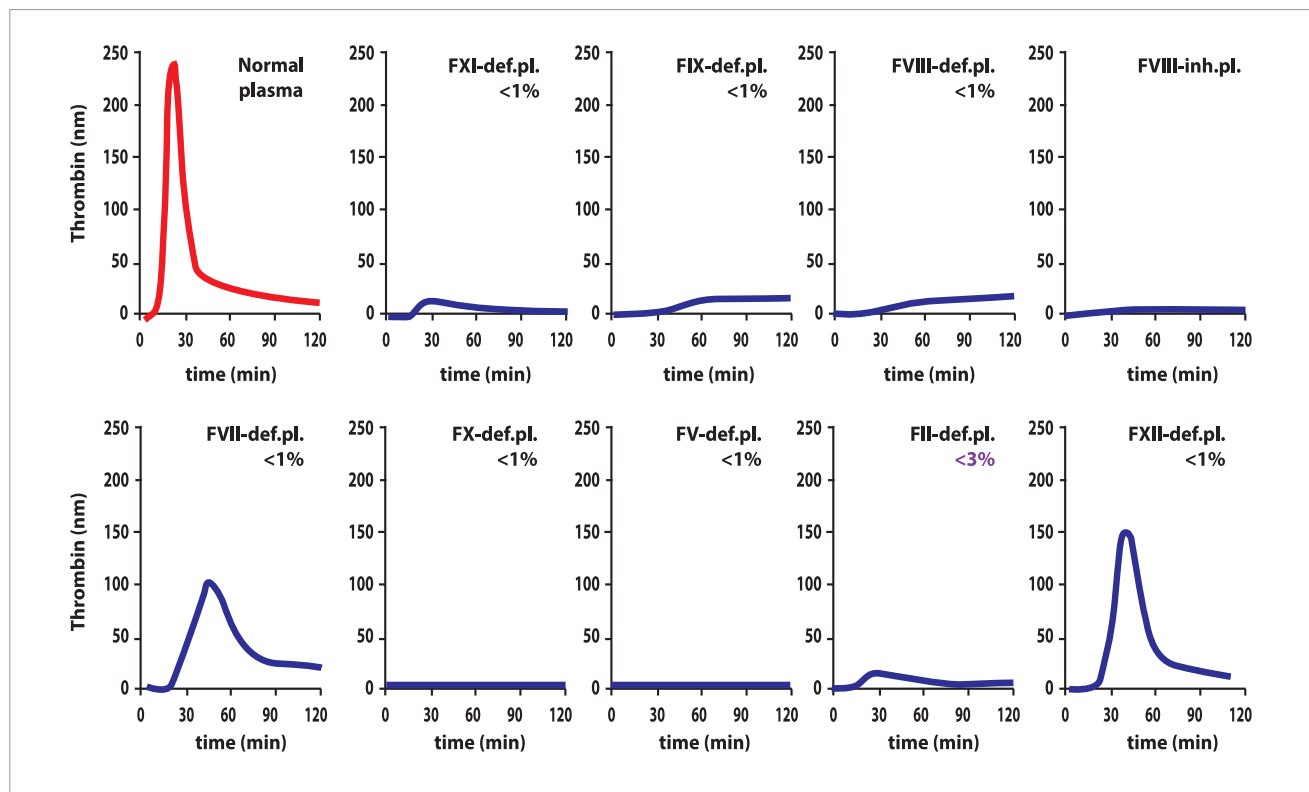


Рис. 8. ТГТ в различных образцах плазмы с дефицитом факторов свертывания

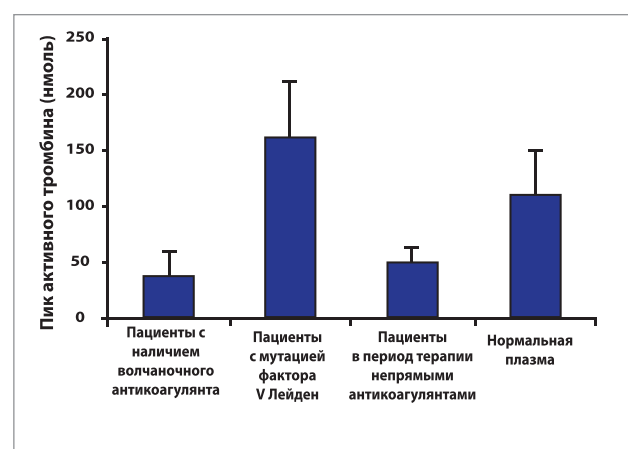


Рис. 9. ТГТ у пациентов с волчаночным антикоагулянтом, мутацией фактора V Лейден, в период терапии непрямими антикоагулянтами

Важность применения ТГТ состоит в том, что показатели рутинно используемых клоттинговых тестов (протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время) в клинико-диагностических лабораториях чаще всего остаются неизменными даже при возникновении тромбоза [9]. При определении уровня фибриногена, активности фактора свертывания VIII и фактора Виллебранда, а также антитромбина, протеинов С и S могут выявляться отклонения от референтного интервала, что не позволяет судить о наличии гиперкоагуляции в целом, так как изменения отдельных компонентов свертывающей системы могут быть нивелированы в организме включением компенсаторных механизмов [10].

Например, показатели коагулограммы могут находиться в пределах нормы, в то время как в функциональном ТГТ выявляется повышение параметров, что свидетельствует о наличии гиперкоагуляции. При этом если врач-клиницист будет руководствоваться только данными коагулограммы, то не будет назначена своевременная антикоагулянтная терапия. Обратная ситуация может наблюдаться в случае, когда изменение отдельных показателей коагулограммы не сопровождается изменением ТГТ. Так, у пациента могут быть повышены фактор VIII, фактор Виллебранда и D-димер, на основании чего врач-клиницист может предположить наличие гиперкоагуляции и назначить антикоагулянтную терапию для предотвращения тромбоза. Однако увеличение активности отдельных прокоагулянтных факторов может быть минимизировано повышением активности антикоагулянтных факторов, показатели ТГТ будут в таком случае в норме. Следовательно, учитывая только данные коагулограммы, можно получить ложноположительное представление о наличии у пациента гиперкоагуляции при ее реальном отсутствии.

При мониторинге антикоагулянтной терапии у больных, получающих варфарин, руководствуясь правилом достижения целевого значения МНО, при котором терапия считается адекватной у пациентов с одинаковыми значениями МНО, показатели ТГТ могут значительно отличаться.

Существует мнение, что мониторинг терапии низкомолекулярными гепаринами не обязателен по причине линейной зависимости их влияния на активный фактор X.

Мониторинг в случае необходимости проводится по исследованию динамики анти-Ха-активности. Об изменениях свойств системы гемостаза предлагается судить по изменению активности только одного фактора. Как показали последние исследования, при назначении одинаковых доз фраксипарина недостаточная доза наблюдалась в 13% случаях, передозировка — также в 13%. Эта работа демонстрирует необходимость лабораторного контроля эффекта введения низкомолекулярного гепарина с помощью глобальных тестов, а также неправомерность суждения о гемостазе в целом по изменению всего лишь одного показателя — анти-Ха-активности [12].

Как бы изменения не происходили на этапах межфакторных взаимодействий в процессе активации свертывания, они в конечном итоге окажут влияние на количество и скорость образования и инактивации тромбина. Динамическая оценка генерации тромбина с помощью ТГТ отражает состояние системы гемостаза в целом и может служить интегральным показателем баланса про- и антикоагулянтных механизмов [11].

Таким образом, ТГТ является универсальным методом оценки тромбогенного потенциала гемостаза и может быть использован в научных исследованиях и с целью:

- диагностики тромбофилии (врожденной и приобретенной), в т. ч. в педиатрии;
- выявления гемофилии;
- мониторинга терапии гемофилии при наличии ингибитора фактора VIII;
- мониторинга антикоагулянтной терапии, направленной на ингибирование тромбина и фактора Ха;
- контроля эффективности всех групп антикоагулянтов (в т. ч. новых);
- оценки активности гемостаза при беременности;
- контроля ДВС-синдрома.

Литература

- Hemker H.C., Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Throm. Haemost.* 1995; 74(5): 134-138.
- Macfarlane R.G., Biggs R. A thrombin generation test: the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J. Clin. Pathol.* 1953; 6: 3-8.
- Hemker H.C., Giesen P.L., Ramjee M. et al. The thromgram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb. Haemost.* 2000; 83 (4): 589-591.
- Hemker H.C., Weilders S., Kessels H. et al. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of thrombin potential. *Throm. Haemost.* 1993; 70 (4): 617-624.
- Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R. et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2003; 33: 4-15.
- De Smedt E., Al Dieri R., Spronk H.M. et al. The technique of measurement thrombin generation with fluoogenic substrates: 1. Necessity of adequate calibration. *Thromb. Haemost.* 2008; 100 (2): 343-349.
- Серебрянский И.И. «Глобальные» и «локальные» тесты системы гемостаза в диагностике гиперкоагуляционного синдрома. Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией. 2012; 12.
- Долгов В.В., Свириной П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. — М., 2005, С. 228.
- Hemker H.C., Al Dieri R., Beguin S. *Curr. Opin. Hematol.* 2004; 11: P. 170-175.
- Van Veen J.J., Gatt A., Makris M. // *Br. J. Haematol.* 2008. 142 (6): 889-903.
- Hemker H.C., Al Dieri R., De Smedt E. et al. // *Thromb. Haemost.* 2006; 96: 553-561.
- Наместников Ю.А., Головина О.Г., Папаян Л.П. Значение теста генерации тромбина в клинической практике. *Онкогематология.* 2011; № 2.
- Hezard N., Bouaziz-Borgi L. Utility of Thrombin-Generation Assay in the Screening of Factor V G1691A (Leiden) and Prothrombin G20210A Mutations and Protein S Deficiency. - *Clinical Chemistry* 2006; 52 (4): 665-670.