

А.А. Мельник, к.б.н.

Инновационный тест тромбодинамики — принципиально новый метод исследования системы гемостаза

Ктак называемым глобальным тестам исследования системы гемостаза относятся **Тромбоэластография, тест генерации тромбина и тест тромбодинамики. Тест тромбодинамики — это новый коагулологический тест, основанный на видеомикроскопии фибринового сгустка, растущего от имитированной поврежденной сосудистой стенки. Данная методика была разработана российскими учеными и представлена для исследования системы свертывания крови компанией «ГемаКор» в 2012 г.**

Система гемостаза является одной из жизненно важных физиологических систем организма человека, поэтому корректная диагностика нарушений свертывания крови имеет общемировое значение. Вопросы, касающиеся эффективного выявления и терапии нарушений системы свертывания крови, чрезвычайно актуальны, поскольку они служат прямой или косвенной причиной подавляющего большинства случаев смерти в мире. Процесс свертывания крови — это главное звено системы гемостаза, отвечающее за предотвращение кровопотери при нарушении целостности сосудистой системы и представляющее собой каскад, в который входит около 70 белков и приблизительно 300 реакций. К настоящему времени система свертывания крови достаточно изучена. За последние 15 лет в этой области не было обнаружено или открыто ни одного нового белка или реакции [3]. Тем не менее важнейшие клинические и патофизиологические аспекты функционирования системы свертывания крови в целом и роль отдельных реакций в ней до настоящего времени не установлены. Традиционные методы диагностики (определение активированного частичного тромбопластинового, протромбинового, тромбинового времени и др.) обладают низкой чувствительностью и специфичностью. Они не дают возможности выявить нарушение, а иногда демонстрируют ложноположительные результаты [4]. Во многих клинических ситуациях классические тесты не диагностируют реальное состояние системы свертывания крови. Например, при проведении антикоагулянтной терапии (АКТ) довольно часто результаты стандартных тестов соответствуют норме, однако у пациента развивается гиперкоагуляция. Кроме того, классические тесты обладают низкой чувствительностью к гиперкоагуляционным состояниям и низкой прогностической ценностью в отношении тромботических осложнений. Поэтому в последние годы во всем мире активно разрабатываются и внедряются новые методы диагностики. Главная цель этого поиска — стремление создать корректную экспериментальную модель гемостаза и тромбоза, приблизить свертывание *in vivo* к ситуации *in vitro* (в современной литературе это называют глобальными тестами гемостаза) [5]. Процесс свертывания в организме протекает неоднородно, т. е. формирование сгустка происходит не только во времени, но и в пространстве. Рост сгустка запускается сложным белковым комплексом (т. н. внешней теназой) на поврежденной сосудистой стенке, распространяется с участием фермента протромбиназы на активированных тромбоцитах в объеме плазмы и тормозится реакциями с участием тромбомодулина на здоровом эндотелии. Адекватное изучение этих процессов с помощью гомогенных методов невозможно. Исследования пространственной динамики свертывания крови привели к созданию нового метода, однако хорошо чувствительного как к гипо-, так и к гиперкоагуляционным состояниям. Он был предложен еще в 1994 г. группой исследователей под руководством профессора Ф. Атауллаханова [1, 2] и в настоящее время внедрен в клиническую практику под названием «тест тромбодинамики». Метод тромбодинамики основан на возможности пространственного разделения процесса активации свертывания и роста фибринового сгустка и позволяет оценивать как качество функционирования отдельных составляющих системы гемостаза, так и всей системы плазменного гемостаза в целом [9–13].

Основной принцип метода «Тромбодинамика» состоит в способности правильно ориентированного нанослоя с содержанием тканевого фактора (ТФ) запускать механизм свертывания крови *in vitro* в тест-системе. Вместе с искусственной фосфолипидной мембраной толщина покрытия в тест-системе составляет 30–50 нм, что идентично мембране клетки с ТФ. Таким образом, поверхность может запустить активацию свертывания,

идентичную той, которая развивается в организме в месте повреждения (рис. 1).

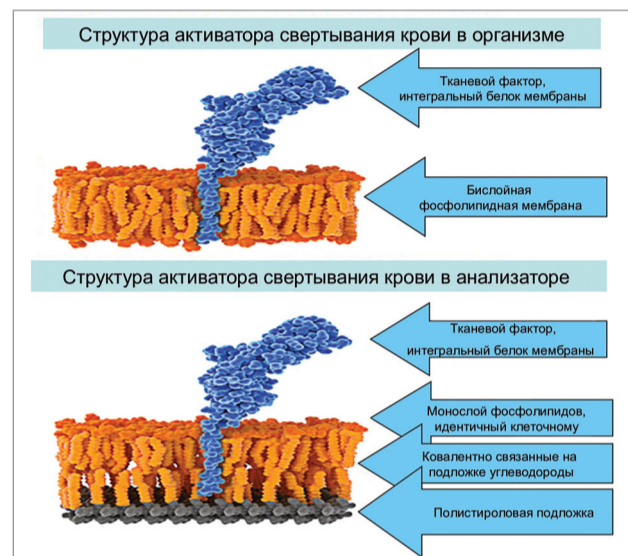


Рис. 1. Искусственная фосфолипидная мембрана с нанесенным ТФ

В основе теста «Тромбодинамика» лежит новый принцип регистрации нарушений системы свертывания крови. В отличие от обычных тестов, которые проводятся в полностью гомогенных системах, данный метод предполагает создание условий для роста фибринового сгустка, максимально приближенных к ситуации *in vivo*, т. е. тест позволяет воссоздать пространственный процесс образования сгустка от стенки сосуда вглубь плазмы. Одним из преимуществ теста «Тромбодинамика» является отсутствие перемешиваний образца плазмы, характерных для рутинных коагулологических методов. При этом воссоздаются оба процесса, происходящих в организме, — активация свертывающей системы в месте повреждения эндотелия и дальнейшее распространение процесса свертывания в пространстве.

Цифровая камера прибора следит за формированием фибринового сгустка в кювете, где происходит имитация повреждения стенки сосуда. На базе данного метода разработаны диагностический прибор и аналитическая методика.

Наблюдение за ростом фибринового сгустка и последующая математическая обработка дают точную информацию о состоянии системы свертывания крови пациента.

Помимо визуального контроля роста сгустка на экране компьютера, прибором производится математическая обработка и получение количественных параметров роста сгустка (табл.).

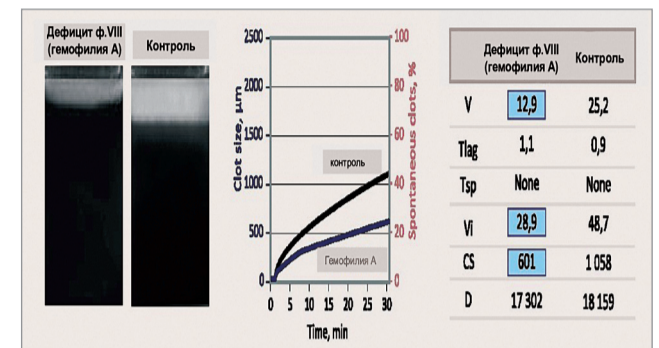
Наряду с количественными параметрами в отчете об исследовании выдается последовательность снимков растущего фибринового сгустка, которые наглядно характеризуют состояние гемостаза пациента (рис. 2).

Снимки получены с помощью системы лабораторной диагностики «Регистратор Тромбодинамики Т-2»	Норма	Гипокоагуляция	Гиперкоагуляция	Гиперкоагуляция Спонтанные сгустки	Гиперкоагуляция Спонтанные сгустки Фибринолиз
скорость роста, V, [мм/мин]	(20 - 29)	15	40	35	возможен качественный анализ
размер сгустка, S, [мм]	(800 - 1200)	400	2000	1600	возможен качественный анализ
время появления спонтанных сгустков, Tsp, [мин]	> 30	-	-	15	возможен качественный анализ

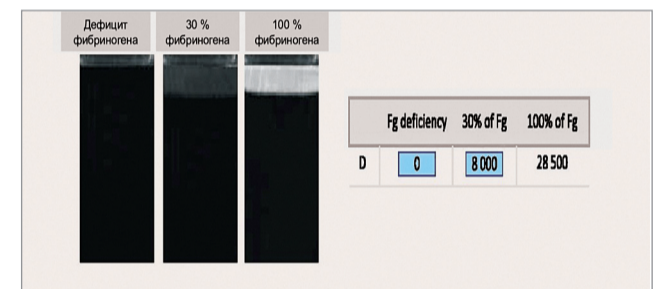
Рис. 2. Характер роста фибринового сгустка при различных состояниях гемостаза: норма, гипокоагуляция, гиперкоагуляция, гиперкоагуляция со спонтанными сгустками, гиперкоагуляция со спонтанными сгустками и фибринолизом

Некоторые примеры использования теста «Тромбодинамика» в клинической практике:

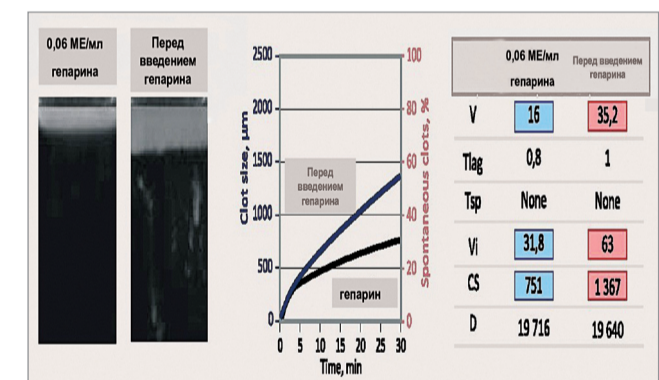
1. В работах N. Dashkevich и соавт. [6], А.А. Бутылина и соавт. [8] показаны результаты теста «Тромбодинамика» при дефиците фактора VIII, фибриногена, а также при действии гепарина и варфарина (рис. 3).



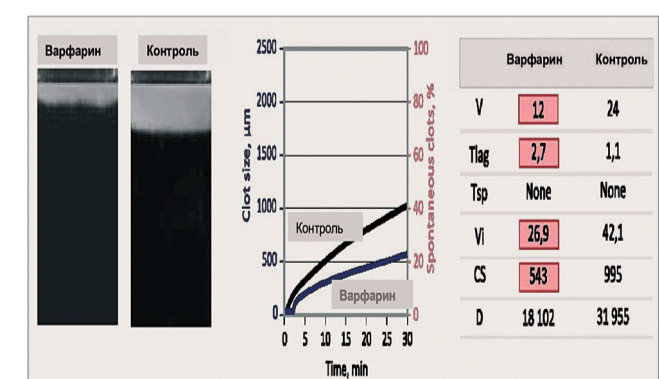
Дефицит фактора VIII. В случае дефицита фактора VIII (гемофилия А) активность теназы изменена, что приводит к уменьшению распространения сгустка.



Дефицит фибриногена. При нарушении синтеза фибриногена или процесса его полимеризации происходит изменение плотности сгустка (D).



Действие гепарина. Гепарин в комплексе с антитромбином III ингибирует активность факторов II и X. При этом гепарин не влияет на Lag Time, но уменьшает показатели Vi и Vst.



Действие варфарина. Варфарин является антагонистом витамина К, который ингибирует активность факторов II, VII, IX и X. В образцах плазмы пациентов, принимавших варфарин, наблюдается увеличение Tlag и уменьшение Vi, Vst и CS.

Рис. 3. Результаты теста «Тромбодинамика» при дефиците фактора VIII, фибриногена, а также при действии гепарина и варфарина

Продолжение на стр. 4.

Інноваційний тест тромбодинамики — принципово новий метод дослідження системи гемостаза

Продолжение. Начало на стр. 3.

2. Механизм действия антикоагулянтных препаратов на рост сгустка в пространстве анализировал Т.А. Вуймо [7]. Из полученных экспериментальных данных автор сделал следующие выводы:

- гепарины не влияют на стадию инициации свертывания, однако воздействуют на стадию пространственного роста сгустка. В отличие от них прямые ингибиторы тромбина (дабигатран) и фактора Ха (ривароксабан) влияют на фазу инициации роста сгустка, но достаточно слабо воздействуют на скорость его пространственного роста;
- тест тромбодинамики чувствителен к изменениям коагуляционного статуса при наличии НФГ и НМГ и применим для мониторинга активности этих гепаринов в терапевтической области концентраций. Он позволяет также корректировать дозу НМГ для получения терапевтического эффекта;
- наиболее чувствительный среди всех тестов по отношению к активности гепаринов в плазме является стационарная скорость роста сгустка в тесте «Тромбодинамика» — Vst (рис. 4).

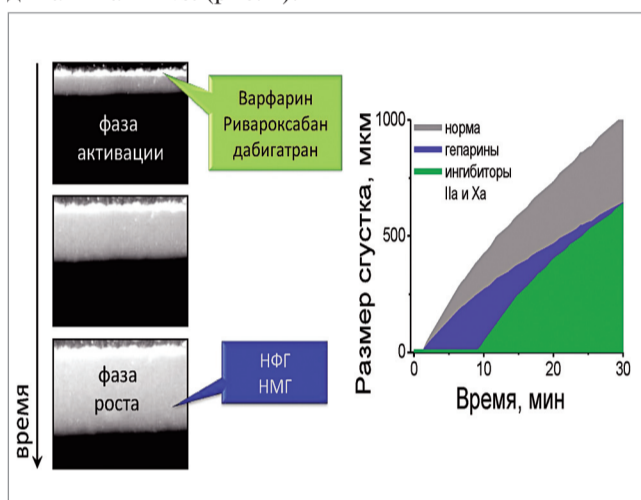


Рис. 4. Механизм действия различных антикоагулянтных препаратов на рост сгустка в пространстве

Таким образом, тест «Тромбодинамика» регистрирует итоговый эффект всех типов антикоагулянтов (НФГ, НМГ, ривароксабана, дабигатрана) и оценивает результативность дозировки препарата для конкретного пациента.

3. Риск тромботических осложнений и эффективность АКТ при тромбозе глубоких вен

При тромбозе глубоких вен (ТГВ) всем пациентам назначается АКТ по стандартной схеме с НФГ и варфарином. НФГ и варфарин эффективно воздействуют на показатель стационарной скорости роста сгустка (Vst) в тесте «Тромбодинамика» и уменьшают его (процесс гипокоагуляции) [14-16]. На фоне АКТ НФГ этот метод регистрирует гипокоагуляцию раньше, чем тест на определение активированного частичного тромбопластинового времени.

На фоне АКТ варфарином у пациентов со спонтанным ТГВ (по данным теста «Тромбодинамика») сохраняется умеренная гипокоагуляция, однако у некоторых больных показатель Vst возвращается к нормальным значениям. Важным в данном исследовании является тот факт, что у многих пациентов, у которых Vst вернулась в диапазон нормальных значений, выявлено резкое повышение уровня D-димера. Динамика этих параметров позволяет предполагать развитие состояния гиперкоагуляции и повышение риска рецидива тромбоза. С помощью теста «Тромбодинамика» на основании показателя скорости роста сгустка выделяют группу риска повторного тромбоза с чувствительностью на уровне 86%, в то время как при использовании международного нормализованного отношения (МНО) она составляет лишь 40%.

На рисунке 5 представлена группа пациентов с ТГВ, которым осуществляется АКТ по стандартной схеме.

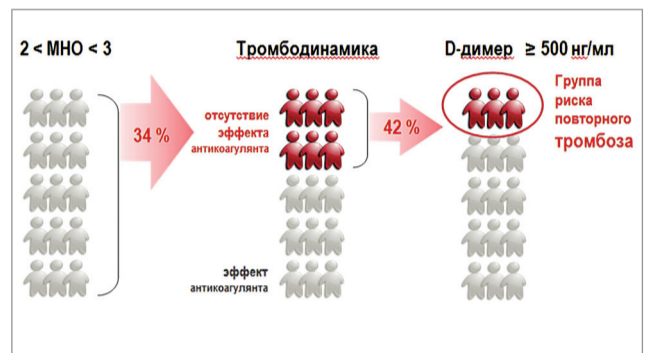


Рис. 5. У всех пациентов МНО находится в целевом диапазоне (А); 34% пациентов этой группы (по данным теста «Тромбодинамика») находятся в нормокоагуляции (отсутствие эффекта АКТ) (Б); 42% пациентов из тех, у которых выявили отсутствие эффекта АКТ, демонстрируют резкий рост значений D-димера и составляют группу риска повторного тромбоза (В)

Данные теста «Тромбодинамика» в сочетании со стандартными лабораторными методами контроля плазменного гемостаза позволяют выявлять больных, которым необходима индивидуальная коррекция АКТ.

4. Риск тромботических осложнений и эффективность АКТ после крупных операций

Одним из наиболее опасных в отношении тромбообразования в послеоперационном периоде является тотальное эндопротезирование тазобедренного или коленного сустава (артропластика). В генезе венозных тромбозов играют роль как само хирургическое вмешательство и последующая иммобилизация, так и целый спектр других факторов тромбогенного риска. При этом вероятность возникновения венозного тромбоза после протезирования тазобедренного сустава, если не проводится АКТ, превышает 60%. Терапия антикоагулянтными препаратами

даже в профилактических дозах (не приводящих к выраженной гипокоагуляции) существенно снижает риск тромбозов после операции. Тест «Тромбодинамика» демонстрирует хорошую чувствительность к состоянию гиперкоагуляции, возникающему во время тотального протезирования тазобедренного сустава. И.А. Тараненко и соавт. [17] показали, что скорость роста сгустка непосредственно после операции у большинства пациентов достоверно повышается. Затем она достоверно снижается на фоне профилактики ТГВ и тромбоэмболии легочной артерии эноксапарином, что подтверждает чувствительность метода к действию этого антикоагулянта. Стационарная скорость роста сгустка также отражает резкое увеличение тромбогенного потенциала спустя 3 мес после операции. Это может стать информативным критерием оценки эффективности и необходимой длительности антикоагулянтной профилактики и АКТ. Более того, проведение теста «Тромбодинамика» до операции позволяет заранее выявить группу больных с высоким риском неэффективности стандартных доз эноксапарина в послеоперационном периоде. Тест тромбодинамики также позволяет по увеличенной скорости роста сгустка (Vst > 30 мкм/мин) выделить группу пациентов с повышенным риском тромбоза после прекращения АКТ в отсроченном послеоперационном периоде.

Области практического использования теста «Тромбодинамика»:

- мониторинг АКТ;
- мониторинг заместительной терапии;
- диагностика дефицита факторов свертывания (массивная кровопотеря, гемофилии А и В, передозировка антикоагулянтов);
- хирургия (пред- и послеоперационный периоды);
- акушерство (ведение беременности);
- гинекология (контроль показателей системы свертывания крови на фоне применения оральных контрацептивов и заместительной гормональной терапии);
- травматология (при обширных травмах, ожоговой болезни);
- онкология (при хирургическом и/или химиотерапевтическом лечении);
- наличие инородной поверхности внутри сосудистого русла (искусственные клапаны сердца, кардиостимуляторы и центральные венозные катетеры);
- скрининг здорового населения для выявления склонности к тромбозам.

В 2016 г. планируется выпуск второго поколения регистратора тромбодинамики под названием «Тромбодинамика-4D». С помощью теста «Тромбодинамика-4D» можно будет контролировать терапию антикоагулянтами любого типа (в т. ч. новыми оральными формами), лечение антитромбоцитарными препаратами и заместительную терапию факторами свертывания. Анализатор «Тромбодинамика-4D» сократит время проведения теста и даст возможность определить полную картину состояния гемостаза пациента.

Список литературы находится в редакции.

Таблица. Основные параметры теста «Тромбодинамика»

Название параметра	Характеристика	Референсные значения параметров теста «Тромбодинамика»	Возможные причины, приводящие к отклонению от нормальных значений
Лag (Lag Time), мин	Время задержки роста сгустка (характеризует начальную фазу формирования сгустка). Параметр чувствителен к состоянию факторов внешнего пути свертывания	0,8-1,5	Удлинение. Гипокоагуляционные состояния различной природы. Дефицит факторов VII и X. Терапия антикоагулянтами – ингибиторами фактора Ха, тромбина, антагонистами витамина К Укорочение. Гиперкоагуляционные состояния различной природы
V _i , мкм/мин	Начальная скорость роста сгустка (характеризует фазу инициации свертывания). Параметр чувствителен к состоянию внешнего и внутреннего пути свертывания	36-56	Увеличение. Гиперкоагуляционные состояния различной природы Уменьшение. Гипокоагуляционные состояния различной природы. Дефицит факторов VII и X. Терапия антикоагулянтами – ингибиторами фактора Ха, тромбина, антагонистами витамина К, НФГ и НМГ
V _{st} , мкм/мин	Стационарная скорость роста сгустка (характеризует пространственную фазу формирования сгустка и распространения свертывания). Чувствителен к состоянию внутреннего пути свертывания, к концентрации факторов VIII, IX, XI, V, X, тромбина	20-29	Увеличение. Гиперкоагуляционные состояния различной природы Уменьшение. Гипокоагуляционные состояния различной природы, в т. ч. гемофилии А, В и С, дефицит факторов V, X, тромбина. Терапия антикоагулянтами: НФГ и НМГ, антагонистами витамина К
CS, мкм	Размеры сгустка (характеризуют структуру фибринового сгустка, концентрацию фибриногена в плазме крови и процесс роста сгустка в целом). Интегральная характеристика работы плазменного звена гемостаза	800-1200	Увеличение. Гиперкоагуляционные состояния различной природы Уменьшение. Гипокоагуляционные состояния различной природы, в т. ч. гемофилии А, В и С, дефицит факторов V, X, тромбина. Терапия антикоагулянтами: НФГ и НМГ, антагонисты витамина К
D, усл. ед.	Характеризует плотность образовавшегося фибринового сгустка и его структуру. Зависит от концентрации фибриногена	15 000-32 000	Увеличение. Повышенная концентрация фибриногена Уменьшение. Сниженная концентрация фибриногена. Гипокоагуляционные состояния различной природы
T _{sp}	Время образования спонтанных сгустков (характеризует собственный прокоагуляционный потенциал плазмы). Образование сгустков вдали от активатора характеризуется как состояние гиперкоагуляции	>30 мин (отсутствуют)	Удлинение. Нет Укорочение. Гиперкоагуляционные состояния различной природы: наличие в крови активированных факторов свертывания, в т. ч. ТФ, повышенная концентрация микровезикул и т. д.

Примечание: НФГ – нефракционированный гепарин; НМГ – низкомолекулярный гепарин.