

Интегральные лабораторные тесты гемостаза в диагностике гиперкоагуляции и оценке риска тромбоза

Е.Н. Липец^{1,2}, Ф.И. Атауллаханов¹⁻⁴, М.А. Пантелеев¹⁻⁴

¹ ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

² Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН; Россия, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4;

³ ООО «Гемакор»; Россия, 125319, Москва, 4-я ул. 8 Марта, 3;

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1

Контакты: Михаил Александрович Пантелеев mapanteleev@yandex.ru

Часть I. Патопфизиология гиперкоагуляции и тромбоза

Тромбоз является смертельно опасным нарушением системы гемостаза, возникающим при различных патологиях и состояниях, начиная от беременности и состояния после операции до онкологии, сепсиса и инфаркта. Несмотря на доступность разнообразных антикоагулянтов и большой накопленный клинический опыт, подтверждающий их эффективность, тромбоз остается одной из главных причин смертности и заболеваемости в современном мире. Во многом это объясняется тем, что традиционные лабораторные тесты свертывания крови недостаточно чувствительны к гиперкоагуляции и их сложно использовать для оценки риска тромбоза. Специфические молекулярные маркеры, определяющие процесс свертывания (D-димеры, фибриноген, тромбин-анти тромбин комплекс), более эффективны, однако также обладают большим количеством недостатков. Возможным решением является использование интегральных тестов, которые *in vitro* имитируют большинство физиологических процессов, протекающих в организме в процессе остановки кровотечения. В I части данной работы обсуждаются биохимические процессы, вызывающие риск тромбоза.

Ключевые слова: интегральные тесты гемостаза, гиперкоагуляция, тромбоз, D-димеры, фибриноген, анти тромбин комплекс

DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-3-73-91

Integrated laboratory coagulation tests in hypercoagulation diagnosis and thrombosis risk assessment

E.N. Lipets^{1,2}, F.I. Ataullakhanov¹⁻⁴, M.A. Panteleev¹⁻⁴

¹ Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117997, Russia;

² Theoretical Problems Center of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences; 4 Kosygina St., Moscow, 119991, Russia;

³ HemaCore Company; 3, 4th 8 Marta St., Moscow, 125319, Russia;

⁴ M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory St., Moscow, 119991, Russia

Part I. The pathophysiology of thrombosis and hypercoagulation

Thrombosis is a fatal hemostatic disorders occurring in various conditions ranging from pregnancy and surgery to cancer, sepsis and heart attack. Despite the availability of different anticoagulants and accumulated clinical experience, proving their effectiveness, thrombosis remains a major cause of morbidity and mortality. This is largely due to the fact that conventional laboratory coagulation tests are not sufficiently sensitive to the hypercoagulable state, and they are difficult to use for assessing the risk of thrombosis. Specific molecular markers (D-dimers, fibrinogen, thrombin-antithrombin complex) are more effective, but also have a large number of disadvantages. A possible solution is the use of integrated test, which simulate *in vitro* the majority of the physiological coagulation processes. In the first part of this paper the biochemical processes that cause the risk of thrombosis were discussed.

Key words: integral coagulation tests, hypercoagulation, thrombosis, D-dimers, fibrinogen, antithrombin complex

Введение

Тромботические осложнения сопровождают или являются причиной широкого круга патологических и физиологических состояний: атеросклероз, инфаркт, инсульт, беременность, сепсис, состояние после травмы, хирургической операции и т.д. В настоящее время

для их лечения и профилактики разработали множество разнообразных анти тромботических препаратов [1], среди которых есть прямые и непрямые ингибиторы факторов свертывания, антагонисты активации тромбоцитов, рецепторов адгезии, сигнальных молекул тромбоцитов.

Однако остаются нерешенными вопросы лабораторной идентификации пациентов с риском тромбоза и проблемы индивидуального подбора и коррекции доз антитромботических препаратов у конкретного пациента. Всегда существует риск развития кровотечений (1–3 % при применении антитромботических препаратов в рекомендуемых дозах), а мозговые кровоизлияния могут привести к не менее фатальным последствиям, чем тромбоз. Традиционные коагуляционные тесты нечувствительны и неприменимы для оценки риска тромбоза. Возможным решением является использование интегральных тестов [2–4], которые *in vitro* имитируют большинство физиологических процессов остановки кровотечения.

Чтобы лучше понять проблему оценки риска тромбоза и прогнозирования его развития с использованием диагностических тестов *in vitro*, необходимо обсудить биохимические процессы, лежащие в основе формирования тромба.

Венозный тромбоз

Подробный разбор современных представлений о патогенезе венозных тромбозов можно найти в основополагающих работах последних лет [5, 6]. Однако основные его принципы были сформулированы еще Р. Вирховым в 1859 г., описавшим природу тромбоза в знаменитой триаде — теории возникновения тромбофлебита: травма внутренней стенки вен; снижение скорости тока венозной крови; повышение свертываемости крови [7]. Хорошо известно, что венозные тромбы образуются в основном за счет полимеризации фибрина (так называемые красные тромбы, богатые фибрином, в котором застревают эритроциты), а адгезия тромбоцитов играет незначительную роль или вообще не имеет значения. Прикрепление венозного тромба к стенке сосуда также происходит за счет фибрина [8], при этом в большинстве случаев стенка сосуда остается неповрежденной [9]. Наиболее вероятный механизм, запускающий тромбоз, — активация клеток сосудистого эндотелия. При застое кровотока, воспалении и/или гипоксии эндотелиальные клетки секретируют тельца Вайбеля—Палладе, в которых содержится фактор Виллебранда (VWF) и Р-селектин. К ним могут прикрепляться тромбоциты, моноциты, нейтрофилы [10], а также микроvesикулы (MB), образованные перечисленными клетками. Под действием гипоксии, цитокинов и липополисахаридов моноциты экспрессируют тканевой фактор (TF) [11], непосредственно активирующий свертывание. Дополнительным источником TF могут быть MB, образованные моноцитами, раковыми клетками [12] и, возможно, нейтрофилами [10]. Существенную роль может играть контактная активация нейтрофильными внеклеточными ловушками (neutrophil extracellular traps, NETs) внеклеточного хроматина на гистонах [10]; возможно, определенный вклад вносят тромбоцитарные и эндотелиальные MB [13]. В за-

висимости от баланса между прокоагулянтными факторами, их ингибиторами и системой фибринолиза активация эндотелия может приводить к формированию тромба.

Артериальный тромбоз

Артериальные тромбозы возникают в основном при разрушении атеросклеротической бляшки. При этом на поверхность выходят коллаген, VWF и TF. Из-за высокой скорости кровотока в артериях основной механизм артериального тромбоза — агрегация тромбоцитов (поток крови размывает факторы свертывания, но зато ускоряет доставку тромбоцитов к месту повреждения), а образование фибрина — вторичный фактор, стабилизирующий тромб [14, 15]. Это подтверждается преобладанием тромбоцитов в таком тромбе (так называемом белом тромбе) и эффективностью препаратов, угнетающих адгезию тромбоцитов [16]. Риск артериального тромбоза повышен при нарушении адгезии и агрегации тромбоцитов вследствие повышения концентрации VWF, снижения металлопротеиназы, которая расщепляет VWF на мелкие, менее прокоагулянтные фрагменты (фермент ADAMTS13) [17], а также при усиленной агрегации тромбоцитов *in vitro* в ответ на активацию низкими концентрациями аденозиндифосфата и/или адреналина (синдром липких тромбоцитов) [18].

Однако даже в плазме пациентов, страдающих артериальным тромбозом, есть индикаторы гиперактивности плазменного свертывания: циркулирующие фактор XIa и TF выявляются у пациентов после ишемических цереброваскулярных событий [19], а также у больных со стабильной стенокардией [20], систолической дисфункцией на фоне ишемической кардиомиопатии [21]. В некоторых экспериментальных моделях артериального тромбоза у животных в тромбах были обнаружены моноцитарные и эндотелиальные MB [12]. Даже терапия 2 препаратами, угнетающими агрегацию тромбоцитов при остром коронарном синдроме, не способна предотвратить 10 % риска рецидива в течение следующего года, тогда как добавление ривароксабана достоверно снижает этот риск [22]. Эти данные свидетельствуют о том, что в формировании артериального тромбоза нельзя не учитывать значения свертывания крови.

Микрососудистый тромбоз

Первоначально патогенез тромбоза в основном изучали на крупных сосудах. Однако в последнее время больше внимания стало уделяться окклюзии микроциркуляторного русла [23]. Вероятно, в значительной степени это произошло благодаря развитию видеомикроскопических экспериментальных моделей тромбоза на этом уровне [24]. Развитие микротромбоза, как правило, связано с высвобождением TF различными клетками, разрушением ингибитора пути TF (TFPI) эластазой нейтрофилов и активацией фактора

Причины гиперкоагуляции при различных состояниях

Заболевание или состояние	Активирующий материал	Повышенный уровень прокоагулянтных факторов свертывания	Сниженный уровень ингибиторов свертывания	Нарушения фибринолиза	Другие гемостатические нарушения	Тип тромбоза
Рак	TF, NETs, MB	—	—	—	Раковый прокоагулянт, адгезионные молекулы	Венозная тромбоэмболия
Беременность	TF, MB	Fg, VII, VIII, X	Свободный PS	PAI-1, PAI-2	Тромбоцитопения, активация тромбоцитов, VWF	Венозная тромбоэмболия, артериальный тромбоз
Прием оральных контрацептивов	—	Fg, II, VII, VIII, X	AT-III, PS, TFPI	tPA, PAI-1	—	Венозный тромбоз
Диабет	TF, тромбоцитарные, моноцитарные, эндотелиальные MB	Fg, II, V, VII, VIII, X	AT-III, PC, эндотелиальный TM	PAI-1, tPA	Увеличена адгезия, агрегация тромбоцитов, активация лейкоцитов, VWF↑	Артериальный тромбоз, венозная тромбоэмболия
ДВС	TF, MB	—	AT-III, PC, PS, TFPI	PAI-1	Активация тромбоцитов и лейкоцитов эндотоксинами	Микрососудистый тромбоз

XII NETs [25]. Микрососудистый тромбоз наблюдается при многих заболеваниях (сепсис [26], онкологические заболевания [27], инфаркт [28], тромбоцитопеническая пурпура [29]) и является основным механизмом развития диссеминированного внутрисосудистого свертывания и полиорганной недостаточности [30]. Среди всех типов тромбозов тромбоз микроциркуляторного русла больше всего сопряжен с общим повышением коагуляционного потенциала плазмы, гиперкоагуляцией [31].

Гиперкоагуляционное состояние при конкретных патологиях

Как правило, под термином «гиперкоагуляция» понимают повышенную склонность крови к свертыванию, возникающую под действием различных молекулярных механизмов, перечисленных ниже. Этот термин является наиболее общим и нейтральным. В российской медицинской литературе есть клиническое понятие гиперкоагуляционного синдрома: по определению академика А.И. Воробьева, это «состояние организма, характеризующееся повышенной готовностью крови к свертыванию, но до появления тромбозов не имеющее характерной клинической картины». В международной печати употребляется близкое понятие неявного диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), или скрытого ДВС (non-overt DIC): состояние напряженного гемостаза, до поры компенсируемого антисвертывающими процессами и не проявляющегося клинически.

Гиперкоагуляция при онкологических заболеваниях, как правило, ассоциируется с экспрессией TF, ра-

кового прокоагулянта и адгезионных молекул. В случае колоректального рака повышение экспрессии TF вызывается K-RAS-онкогеном и инактивацией гена супрессии опухоли *p53* [32]. Часть циркулирующего TF находится на MB [33, 34], которые также ускоряют свертывание за счет содержащегося на их поверхности фосфатидилсерина. Раковый прокоагулянт представляет собой цистеиновую протеазу, активирующую фактор X [35]. Однако не показано, что его наличие создает риск возникновения тромбоза. В модели на мышах M. Demers и D. Wagner показали, что NETs вносят существенный вклад в гиперкоагуляцию при онкологии [36]. Адгезионные молекулы, осуществляющие прямое взаимодействие опухолевых клеток с эндотелием, тромбоцитами и лейкоцитами, могут вызвать формирование тромбоцитарных микро-тромбов [37].

При нормальной беременности повышается уровень фибриногена (Fg), факторов VII, VIII, X и VWF. Вследствие повышения уровня связывающего протеин S компонента комплемента C4b снижается уровень свободного протеина S. Уровень ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1) увеличивается в 5 раз [38]. В течение III триместра в плаценте активно синтезируется PAI-2 и его концентрация резко увеличивается [39]. Для некоторых осложнений беременности были зафиксированы повышенные концентрации эндотелиальных MB и MB, несущих TF [40, 41].

Гормональные контрацептивы вызывают увеличение концентрации фибриногена, протромбина (фактора II), факторов VII, VIII, X и уменьшение ингибиторов свертывания, таких как антитромбин (AT-III),

протеин S, TFPI. Стимулируется также фибринолиз: активность тканевого активатора плазминогена (tPA) увеличена, а PAI-1 — уменьшена [42].

Диабет ведет к увеличению адгезии и агрегации тромбоцитов, а также к зависящей от тромбоцитов продукции тромбина. Изменения в активационном потенциале тромбоцитов происходят на стадии мегакариоцитов. Лейкоциты также активированы и экспонируют аминокислоты и TF, экспрессируют адгезионные молекулы, ведущие к образованию тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов и взаимодействию лейкоцитов с эндотелием. Наблюдается дисфункция эндотелия. Концентрации VWF, фактора VII и Fg повышены, AT-III, протеина C (PC), эндотелиального тромбомодулина (TM) понижены. Тромбоциты, моноциты, эндотелий образуют МВ. Уровень PAI-1 и tPA снижен [43].

Заключение

Таким образом, существует несколько непосредственных причин высокого риска системного тромбоза. Во-первых, в крови могут присутствовать непо-

средственные активаторы свертывания — МВ, активирующие свертывание по контактному пути [44], TF, циркулирующий на клетках или МВ (при раке или диабете), фактор XIa (ишемические цереброваскулярные события, стабильная стенокардия), раковый прокоагулянт, бактерии. Другая категория включает механизмы, не активирующие свертывание сами, но ускоряющие рост сгустка, сдвигая баланс свертывания: увеличение концентрации, активности или времени жизни прокоагулянтных факторов (врожденные нарушения, беременность, оральные контрацептивы, такие мутации, как протромбин G20210A [45], фактор V Лейдена [46, 47], уменьшенная концентрация или активность противосвертывающих молекул (наследственный или приобретенный дефицит AT-III, PS, PC [48, 49]), сниженный фибринолиз, ADAMTS13, повышение VWF [17]. Данные для нескольких протромботических состояний представлены в таблице, в которой сделана попытка соотнести механизмы прокоагулянтных изменений, патологии, вызывающие их, и тип вызываемого ими тромбоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sinauridze E.I., Pantelev M.A., Ataulakhanov F.I. Anticoagulant therapy: basic principles, classic approaches and recent developments. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23:482–93.
2. Brummel-Ziedins K.E., Wolberg A.S. Global assays of hemostasis. *Curr Opin Hematol* 2014;21:395–403.
3. Dargaud Y., Sorensen B., Shima M. et al. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia* 2012;18(4):81–8.
4. van Geffen M., van Heerde W.L. Global haemostasis assays, from bench to bedside. *Thromb Res* 2012;129:681–7.
5. Lopez J.A., Chen J. Pathophysiology of venous thrombosis. *Thromb Res* 2009;123(4):30–4.
6. Lopez J.A., Kearon C., Lee A.Y. Deep venous thrombosis. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2004;2004:439–56.
7. Virchow R.L.K. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt am Main, 1856.
8. Friedman M.H., Brinkman A.M., Qin J.J., Seed W.A. Relation between coronary artery geometry and the distribution of early sudanophilic lesions. *Atherosclerosis* 1993;98:193–9.
9. Sevitt S. The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *J Clin Pathol* 1974;27:517–28.
10. von Bruhl M.L., Stark K., Steinhart A. et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo*. *J Exp Med* 2012;209:819–35.
11. Lawson C.A., Yan S.D., Yan S.F. et al. Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest* 1997;99:1729–38.
12. Lacroix R., Dubois C., Leroyer A.S. et al. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013;11(1):24–35.
13. Van Der Meijden P.E., Van Schilfgaarde M., Van Oerle R. et al. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* 2012;10:1355–62.
14. Shibeko A.M., Lobanova E.S., Pantelev M.A., Ataulakhanov F.I. Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa. *BMC Syst Biol* 2010;4:5.
15. Tokarev A.A., Butylin A.A., Ataulakhanov F.I. Platelet adhesion from shear blood flow is controlled by near-wall rebounding collisions with erythrocytes. *Biophys J* 2011;100:799–808.
16. Davi G., Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007;357:2482–94.
17. Sonneveld M.A., de Maat M.P., Leebeek F.W. Von Willebrand factor and ADAMTS13 in arterial thrombosis: a systematic review and meta-analysis. *Blood Rev* 2014;28:167–78.
18. Kubisz P., Ruiz-Arguelles G.J., Skasko J. et al. Sticky platelet syndrome: history and future perspectives. *Semin Thromb Hemost* 2014;40:526–34.
19. Undas A., Slowik A., Gissel M. et al. Circulating activated factor XI and active tissue factor as predictors of worse prognosis in patients following ischemic cerebrovascular events. *Thromb Res* 2011;128:62–6.
20. Zabczyk M., Butenas S., Plicner D. et al. Factors associated with the presence of circulating active tissue factor and activated factor XI in stable angina patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23:189–94.
21. Zabczyk M., Butenas S., Palka I. et al. Active tissue factor and activated factor XI in circulating blood of patients with systolic heart failure due to ischemic cardiomyopathy. *Pol Arch Med Wewn* 2010;120:334–40.
22. Weitz J.I. Insights into the role of thrombin in the pathogenesis of recurrent ischemia after acute coronary syndrome. *Thromb Haemost* 2014;112:924–31.
23. Kwaan H.C. Microvascular thrombosis: a serious and deadly pathologic process in multiple diseases. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:961–78.
24. Bellido-Martin L., Chen V., Jasuja R. et al. Imaging fibrin formation and platelet and endothelial cell activation *in vivo*. *Thromb Haemost* 2011;105:776–82.
25. Pfeiler S., Massberg S., Engelmann B. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb Res* 2014;133(1):35–7.
26. Levi M., Schultz M., van der Poll T. Sepsis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:559–66.

27. Langer F., Bokemeyer C. Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. *Hamostaseologie* 2012;32:95–104.
28. Barrabes J.A., Insite J., Agullo L. et al. Microvascular thrombosis: an exciting but elusive therapeutic target in reperfused acute myocardial infarction. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2010;10:273–83.
29. Blake-Haskins J.A., Lechleider R.J., Kreitman R.J. Thrombotic microangiopathy with targeted cancer agents. *Clin Cancer Res* 2011;17:5858–66.
30. Gando S. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 2010;38:35–42.
31. Semeraro N., Ammollo C.T., Semeraro F., Colucci M. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res* 2012;129:290–5.
32. Yu J.L., May L., Lhotak V. et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005;105:1734–41.
33. Geddings J.E., Mackman N. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood* 2013;122:1873–80.
34. Tesselaar M.E., Romijn F.P., Van Der Linden I.K. et al. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007;5:520–7.
35. Levi M. Cancer and thrombosis. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003;1:668–71.
36. Demers M., Wagner D.D. Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. *Oncoimmunology* 2013;2:22946.
37. Wahrenbrock M., Borsig L., Le D. et al. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest* 2003;112:853–62.
38. Bremme K.A. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:153–68.
39. Medcalf R.L., Stasinopoulos S.J. The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *FEBS J* 2005;272:4858–67.
40. Alijotas-Reig J., Palacio-Garcia C., Llurba E., Vilardell-Tarres M. Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. *Fertil Steril* 2013;99:441–9.
41. Patil R., Ghosh K., Satoskar P., Shetty S. Elevated procoagulant endothelial and tissue factor expressing microparticles in women with recurrent pregnancy loss. *PLoS One* 2013;8:81407.
42. Sandset P.M. Mechanisms of hormonal therapy related thrombosis. *Thromb Res* 2013;131(1):4–7.
43. Morel O., Jesel L., Abbas M., Morel N. Prothrombotic changes in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:477–88.
44. Lipets E., Vlasova O., Urnova E. et al. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and XIa induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients. *PLoS One* 2014;9:87692.
45. Poort S.R., Rosendaal F.R., Reitsma P.H., Bertina R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698–703.
46. Lindahl T.L., Lundahl T.H., Nilsson L., Andersson C.A. APC-resistance is a risk factor for postoperative thromboembolism in elective replacement of the hip or knee – a prospective study. *Thromb Haemost* 1999;81:18–21.
47. Rosendaal F.R., Koster T., Vandenbroucke J.P., Reitsma P.H. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995;85:1504–8.
48. Koster T., Rosendaal F.R., Briet E. et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995;85:2756–61.
49. Lijfering W.M., Brouwer J.L., Veeger N.J. et al. Selective testing for thrombophilia in patients with first venous thrombosis: results from a retrospective family cohort study on absolute thrombotic risk for currently known thrombophilic defects in 2479 relatives. *Blood* 2009;113:5314–22.

Часть II. Чувствительность интегральных тестов к гиперкоагуляционным состояниям

В данной работе представлен обзор существующих данных относительно способности интегральных тестов, как уже введенных в клиническую практику, так и новых (тест генерации тромбина, тромбоэластография, тромбодинамика, перфузионные камеры), оценивать риск тромбоза при различных патологиях. Мы пришли к выводу, что существующие интегральные тесты могут стать важным инструментом в диагностике гиперкоагуляции. Однако имеющийся в настоящее время недостаток стандартизации препятствует их применению: различные тесты и любые их модификации различаются по чувствительности и специфичности для каждого патологического состояния. Кроме того, даже в тех ситуациях, когда тесты могут достоверно выявлять группы пациентов с различной степенью риска тромбоза, их применение в клинической практике для принятия решений часто затруднительно, так как различия между такими группами статистически достоверны, однако диапазоны норм и пациентов значительно перекрываются.

Ключевые слова: интегральные тесты гемостаза, гиперкоагуляция, тромбоз, активированное частичное тромбопластиновое время, тест генерации тромбина, тромбоэластография, тромбодинамика, онкологические заболевания, беременность, сахарный диабет

Part II. The sensitivity of integral tests to hypercoagulable states

In the second part we present a review of the existing data about ability of integrated tests, as already introduced in clinical practice, and the new (test of thrombin generation, thromboelastography, thrombodynamics, perfusion chamber) to assess the risk of thrombosis in different pathologies. We can conclude that the existing integrated tests can be an important tool in the diagnosis of hypercoagulation. However, lack of standardization prevents their use: various tests and modifications of each test are different in sensitivity and specificity for each pathological condition. Furthermore, even in situations where the tests can reliably identify a group of patients with different degrees of thrombosis risk, their use in clinical practice is often difficult, since the differences between these groups were statistically significant, but the normal range and patients significantly overlap.

Key words: global assays of hemostasis, hypercoagulation, thrombosis, activated partial thromboplastin time, thrombin generation, thromboelastography, thrombodynamics, cancer, pregnancy, diabetes mellitus

Введение

Природа предрасположенности индивидуума к тромбозу может быть локальной или глобальной. Локальные факторы, такие как повреждение стенки сосуда, формирование атеросклеротической бляшки или замедление тока крови, естественно, остаются за пределами возможностей функциональных лабораторных тестов на свертывание (хотя нельзя исключать возможность косвенно измерить в крови некоторые маркеры воспаления и повреждения сосудов). Другие тромботические события могут быть напрямую связаны с глобальными изменениями в составе крови. Эти систематические прокоагулянтные изменения называют гиперкоагуляцией. Когда тромбоз напрямую связан с гиперкоагуляцией, существует несколько способов ее выявить.

Один способ — определение конкретной причины гиперкоагуляции: изменение концентраций прокоагулянтных факторов и ингибиторов, факторов фибринолиза, фактора Виллебранда, наличие циркулирующих активных факторов, микровезикул (МВ). Такие исследования, без сомнения, важны, но количество возможных причин очень велико, и некоторые из них (например, пикомолярные концентрации циркулирующих факторов: XIa и тканевой фактор — TF) крайне сложны для измерений. Кроме того, отдельная информация о специфических причинах не дает представления о способности крови к свертыванию в целом, а значимость изменений отдель-

ных компонентов для полной системы может быть не очевидной, особенно когда есть несколько изменений, отклоняющих баланс системы свертывания в разные стороны.

Другой подход — использование молекулярных маркеров процесса тромбообразования: D-димеры, фибриноген, растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), тромбин-антитромбиновые комплексы (ТАТ), фрагменты активации протромбина F1 + 2. Эта стратегия широко используется и имеет огромную клиническую значимость, но ее главный недостаток в том, что перечисленные маркеры показывают следы уже произошедшего или идущего в настоящий момент свертывания, но не потенциал системы свертывания в ответ на активацию. В случае диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) может быть очень высокий уровень D-димеров одновременно с отсутствием способности крови свернуться в результате истощения предшественников прокоагулянтных факторов.

Возможным решением являются интегральные или глобальные тесты гемостаза [1–3], которые имитируют патофизиологические процессы с большей точностью, позволяя оценить потенциал системы гемостаза в целом. В этих тестах обычно используются низкие концентрации активаторов (тест генерации тромбина, тромбоэластография) или активаторы, локализованные на поверхности (тромбодинамика, проточные камеры). Это может делать тесты особенно

Таблица 1. Чувствительность отношения АЧТВ к различным гиперкоагуляционным состояниям

Причина гиперкоагуляции	Число пациентов	Диапазон значений		Достоверность	Предсказательная сила	Ссылка	Комментарии
		Контрольная группа, среднее \pm СО, если не подписано иначе	Группа с гиперкоагуляцией, среднее \pm СО, если не подписано иначе				
ВТЭ	605; 1290 — контрольная группа	Медиана (диапазон) 1,00 (0,72—1,33)	Медиана (диапазон) 0,97 (0,75—1,41)	< 0,001	Отношение АЧТВ < 0,87 ОШ 2,4	[9]	Ретроспективное исследование
Рецидив после спонтанного ВТЭ	918 с ВТЭ; 101 — с рецидивом	0,97 \pm 0,09	0,93 \pm 0,09	0,001	Отношение АЧТВ < 0,95 ОР 1,79	[10]	Проспективное исследование. Тест проводился через 3 нед после прекращения антикоагулянтной терапии
Рецидив после спонтанного ВТЭ	628 с ВТЭ; 71 — с рецидивом	—	—	—	Отношение АЧТВ < 0,90 ОР 2,38 относительно отношения АЧТВ > 1,05	[11]	Проспективное исследование. Тест проводился через 3—4 нед после прекращения антикоагулянтной терапии
Сахарный диабет 2-го типа	60; 57 — контрольная группа	Медиана (диапазон) 0,93 (0,71—1,34)	Медиана (диапазон) 1,03 (0,79—1,27)	0,43	—	[19]	—

чувствительными к низким концентрациям патологических активаторов свертывания в кровотоке.

Цель настоящего обзора — систематизация существующих данных о способности интегральных тестов детектировать гиперкоагуляцию и выявлять риск тромбоза.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и международное нормализованное отношение (МНО): можно ли их отнести к интегральным тестам?

В настоящее время первичную оценку системы гемостаза проводят по тестам: АЧТВ и протромбиновое время (ПВ). В первую очередь, они чувствительны к дефицитам факторов свертывания, что обычно приводит к их удлинению. Укорочение времени свертывания наблюдается редко и часто объясняется ошибками на преаналитическом этапе (который в целом имеет большое значение в диагностике гиперкоагуляции, так как очень легко вызвать гиперкоагуляцию недостаточно аккуратным обращением с цельной кровью). Хотя в единичных работах 1970—90-х годов встречается упоминание об укорочении ПВ в состояниях с повышенным риском тромбоза [4, 5], в настоящее время применение ПВ (в стандартизованном варианте — МНО) в отношении к тромбозу обычно

ограничивается оценкой эффективности дозы антагонистов витамина К [6].

Некоторые протромботические факторы риска могут быть обнаружены по изменению АЧТВ. А. Mina и соавт. показали, что сокращение АЧТВ достоверно отражает отклонения в концентрации факторов V, VIII, XI, XII, концентрации антигена и коллагенсвязывающей активности фактора Виллебранда, содержание прокоагулянтных фосфолипидов, измеренное методом ХАСТ (Ха clotting time) [7]. Сокращение АЧТВ также коррелирует с высоким уровнем маркеров генерации тромбина и образования фибрина: фрагментами протромбина F1 + 2, ТАТ (см. выше) и D-димерами [8]. Сокращение АЧТВ является фактором риска тромбоза глубоких вен. В группе пациентов, имеющих отношение АЧТВ (отношение времени свертывания в исследуемом образце ко времени свертывания в контрольной плазме) меньше 5 процентов от распределения нормальных доноров, отношение шансов (ОШ) для тромбоза глубоких вен было 2,4 и не зависело от наследственных тромбофилий. Медиана отношения АЧТВ для группы пациентов была 0,97 (диапазон 0,75—1,41), для контрольной группы — 1,00 (диапазон: 0,72—1,33) ($p < 0,001$) [9]. Проспективное исследование группы из 918 пациентов со спон-

таным венозным тромбозом показало, что отношение АЧТВ было достоверно больше у пациентов без рецидива тромбоза ($0,97 \pm 0,09$ против $0,93 \pm 0,09$; $p < 0,001$). Относительный риск (ОР) рецидива у пациентов с отношением АЧТВ $< 0,95$ был 1,7 [10]. С. Legnani и соавт. обнаружили, что риск рецидива венозного тромбоза после отмены антикоагулянтов у пациентов с отношением АЧТВ $\leq 0,9$ более чем в 2 раза выше относительно контрольной группы (ОР 2,38) [11]. Данные о предсказательной силе АЧТВ представлены в табл. 1.

Важной модификацией метода АЧТВ является так называемый анализ формы сигнала сгустка (clot waveform analysis), в котором анализируется вся кривая изменения оптической плотности, а не только время свертывания. Такую модификацию, в отличие от обычного теста АЧТВ, однозначно относят к глобальным тестам [1–3]. В частности, появление двухфазной кривой в этом методе оказалось чувствительным и специфичным ранним признаком развития ДВС (85 % и 92 % соответственно) [12]. Двухфазная форма объясняется преципитацией С-реактивного белка (СРБ) с липопротеинами очень низкой плотности (ЛПНП) при добавлении Са [13].

Таким образом, сокращение АЧТВ отражает некоторые прокоагулянтные сдвиги в плазме, в первую очередь увеличение концентраций или активности предшественников факторов свертывания. Например, в работе С. Legnani и соавт. повышенный риск рецидива венозного тромбоза исчез после корректировки ОР на концентрации факторов VIII, IX и XI, и сами концентрации факторов обладали большей предсказательной силой риска рецидива (ОР 2,38 для отношения АЧТВ $< 0,9$; ОР 3,01; 3,06; 2,14 для повышенных концентраций факторов VIII, IX и XI соответственно) [11]. В то же время тромбофилические факторы риска G1691A — фактор V и G20210A — фактор II достоверно не отличались в группах с нормальным и укороченным АЧТВ [8]. На появление в крови активирующих частиц или факторов АЧТВ, по-видимому, не реагирует. Вероятно, сильная внешняя активация в АЧТВ (и еще более сильная в МНО) не позволяет увидеть более слабую активацию от исходно присутствующих в плазме тканевого фактора (ТФ), фактора XIa или MB. Путь протеина С (РС) не работает в АЧТВ, если не добавлен активированный протеин С (aPC), но даже тогда тест генерации тромбина, использующий тот же подход, оказывается более чувствительным к нарушениям в пути РС [14]. АЧТВ совсем не учитывает фибринолиз. Вероятно, по перечисленным причинам АЧТВ не имеет предсказательной силы тромботических осложнений у пациентов после операций [15, 16], травм [17], с диабетом [18, 19] и онкологическим заболеванием [20]. Данные в отношении беременности противоречивы [21, 22].

Гиперкоагуляция и тест генерации тромбина (ТГТ)

ТГТ — один из 2 наиболее разработанных и изученных интегральных тестов гемостаза. В данном методе по скорости расщепления субстрата к тромбину рассчитывается зависимость концентрации тромбина от времени, имеющая, как правило, характерную колоколообразную форму [23]. Наиболее широко используются такие параметры кривой генерации тромбина, как эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП, площадь под кривой генерации тромбина) и пик концентрации тромбина ($\Pi a \max$), их корреляция с клинической картиной показана в ряде работ. Интересно, что большая часть кривой генерации тромбина регистрируется после образования сгустка. Значение этого факта все еще является предметом обсуждения [24].

В настоящее время существует множество модификаций ТГТ, включая несколько коммерчески доступных и даже встроенных в стандартные многофункциональные коагулометры. Чаще всего для теста выбирают свободную от тромбоцитов плазму с добавлением искусственных фосфолипидов, можно также использовать богатую тромбоцитами плазму. Активируют пикомолярными концентрациями ТФ, хотя могут применяться и другие активаторы. Тест может проводиться с добавлением тромбомодулина (ТМ), активаторов РС или самого aPC для выяснения работы пути РС.

А. Tripodi и соавт. обнаружили, что пациенты с повышенной генерацией тромбина в присутствии ТМ имеют более высокий риск повторной венозной тромбоземболии (ВТЭ). ОР рецидива венозного тромбоза у пациентов с ЭТП > 960 нМ·мин или $\Pi a \max > 193$ нМ был 3,41 или 4,57 соответственно по сравнению с теми, у которых ЭТП < 563 нМ·мин или $\Pi a \max < 115$ нМ. ОР у пациентов с временем задержки свертывания (лаг-таймом) $< 14,5$ мин был 3,19 по отношению к пациентам с лаг-таймом $> 20,8$ мин [25]. Тот же результат был получен М. Besser и соавт.: после корректировки ОР на D-димер, тромбофилии, пол и получения ответа на вопрос — был ли первый тромбоз спровоцирован или нет, высокий ЭТП достоверно предсказывал рецидив с ОР 2,6 [26]. В подобном исследовании G. Hron и соавт. у пациентов без повторного ВТЭ пик генерации тромбина был ниже, чем у пациентов с рецидивом (среднее \pm стандартная ошибка, 350 ± 110 против 420 ± 110 соответственно; $p < 0,001$) [27]. В то же время А. van Hylckama Vlieg и соавт. не обнаружили предсказательной силы риска тромбоза у ТГТ, но, возможно, это связано с использованием другой модификации ТГТ [28]. В работе R. Chaireti и соавт. ЭТП в плазме пациентов сразу после тромбоза было даже несколько ниже в группе, где тромбоз потом повторился. Если же брать кровь через 1–2 мес после отмены антикоагулянтов, ЭТП в этой группе был незначительно повышен [29].

В ряде работ показано повышенное значение ЭТП у пациентов после ишемического инсульта [30]. Повышенный пик значения богатой тромбоцитами плаз-

мы предсказывал появление ишемического инсульта у женщин и не коррелировал с ишемической болезнью сердца (ИБС) (ОР 1,04 для мужчин, 1,7 — для женщин, среднее по группам с инсультом и без не различалось) [31]. ЭТП повышен практически при любых видах тромбофилии, включая полиморфизм G20210A [32], дефицит антитромбина [33], V Leiden [34] (с добавлением аРС), дефицит протеина S [35] (с добавлением аРС), а также при приеме оральных контрацептивов (с добавлением аРС) [36] и онкологических заболеваниях [37]. В работах [38, 39] ЭТП был повышен при беременности, но в [40] ЭТП возрастал в I триместре относительно нормы и далее держался постоянным в течение всего срока беременности, в то время как маркеры активации свертывания D-димеры, F1 + 2 и ТАТ возрастали. Корреляция между параметрами ЭТП и D-димерами, F1 + 2, ТАТ, РФМК отсутствовала. Отсутствие корреляции параметров ТГТ с D-димерами, F1 + 2 наблюдали также С. Ау и соавт. [37]. У пациентов, страдающих диабетом, наблюдали достоверно повышенный пик тромбина [18, 19], вероятно, в связи с повышенным уровнем факторов II, V, VII, VIII и X и сниженным уровнем РС [18].

Показано, что есть корреляция пика ТГТ и количества МВ, особенно в постановке без добавления внешних ТФ и фосфолипидов (ФЛ) [19]. А. Ollivier и соавт. выявили, что лаг-тайм ТГТ в рекальцифицированной плазме является чувствительным параметром для внешнего ТФ, в то время как пик ТГТ сильно зависит от концентрации ФЛ и слабо — от концентрации ТФ. Аналогичный результат в плазме больных раком был получен в работе F. Debaugnies и соавт. [41]. Лаг-тайм ТГТ в рекальцифицированной плазме достоверно сокращался при стимуляции крови липополисахаридами [42].

Таким образом, в зависимости от постановки ТГТ оказывается чувствительным к разным факторам гиперкоагуляции: к уровню факторов II, V, Fg, АТ-III при высокой концентрации ТФ (13,6 pM); к факторам XII, Fg, АТ-III, свободному TFPI [43], а также факторам VIII и IX [44] при низкой (1 pM); при добавлении ТМ или активатора РС — к нарушениям в пути РС [45]; при добавлении только ФЛ — к циркулирующему ТФ и другим активным факторам; при активации только ТФ — к липидам, присутствующим в плазме. Снижение концентрации активатора увеличивает чувствительность теста, но увеличивает и разбросы между донорами. Разница между группами с повышенным риском тромбоза и без в большинстве рассмотренных работ достоверна (табл. 2), но стандартные ошибки в подавляющем большинстве случаев пересекаются, что затрудняет перенос таких результатов в клинические рекомендации. Недостаток стандартизации также ограничивает применение теста, хотя в этом направлении достигнуты существенные успехи [1].

За пределами данного метода остается оценка функции фибринолиза и вклада клеток крови. Хотя

появилась работа по генерации тромбина в цельной крови, данные о ее применимости для клинических исследований пока отсутствуют [46]; также есть попытки одновременно наблюдать за динамикой тромбина и плазмينا.

Оценка риска тромбоза с помощью тромбозластографии (ТЭГ)

Наиболее прямой способ характеризовать образование сгустка — по реометрии, имеющей дополнительные преимущества независимости от оптических характеристик и легкости применения к цельной крови. Существует ряд реологических подходов, из них наиболее изученный — ТЭГ. Это самый ранний тест гемостаза, в котором оценивают формирование сгустка в цельной крови, используя вынужденную колебательную реометрию.

ТЭГ нашла широкое применение в оценке состояния свертывания у пациентов, подвергшихся операции, как альтернатива АЧТВ и МНО, не чувствительным к гиперкоагуляции в послеоперационный период [15, 47]. Доскональное исследование работ с 1980 по 2008 г. о возможности ТЭГ предсказывать тромботические осложнения после операций было проведено Y. Dai и соавт. [48]. В большинстве проанализированных исследований делали заключение об эффективности ТЭГ. Однако чувствительность и специфичность в разных исследованиях варьировали от 0 до 100 % и от 62 до 92 % соответственно. ОШ варьировало от 1,5 до 27,7 [48]. Разнородность данных не позволила провести метаанализ. Несколько более поздних работ подтверждают предсказательную силу параметра максимальной амплитуды (МА): МА либо G (жесткость сгустка = 5,000 МА/100 — МА) у пациентов после операций является независимым фактором риска повторного ишемического инсульта (ОШ 1,192; $p = 0,022$) [49], а также других тромботических осложнений, в том числе инфаркта миокарда [50, 51]. Подобные данные имеются для аналога ТЭГ — ROTEM [47]. Параметр МА в основном определяется функцией тромбоцитов и концентрацией фибриногена [52], что объясняет отсутствие корреляции МА с АЧТВ и МНО [49].

ТЭГ показывала гиперкоагуляцию у пациентов с раком предстательной железы, наиболее сильную в группе на стадии рака с метастазами. В этой группе также наблюдали повышенное количество ТФ, содержащих МВ. У 7 из 22 пациентов с гиперкоагуляционной ТЭГ возникли тромботические осложнения, в то время как АЧТВ и МНО показывали норму [20]. ТЭГ также обнаруживала гиперкоагуляционное состояние у пациентов с раком молочной железы и колоректальным раком [53], опухолями желудочно-кишечного тракта, органов дыхания и другими опухолями [54], у пациентов после тромбоза глубоких вен (ТГВ) [55], но только не после церебрального венозного тромбоза [56]. ТЭГ была повышена только у 57 % пациентов

Таблица 2. Чувствительность ТГТ к различным гиперкоагуляционным состояниям

Причина гиперкоагуляции	Число пациентов	Активатор генерации тромбина и дозировки относительно базовой постановки	Диапазон значений		Достоверность	Предсказательная сила	Ссылка	Комментарии
			Контрольная группа, среднее ± СО, если не подписано иначе	Группа с гиперкоагуляцией, среднее ± СО, если не подписано иначе				
Рецидив после спонтанного ВТЭ	254 с ВТЭ; 34 — с рецидивом	1 пМ ТФ; 1 мкМ ФЛ	ЭТП, нМ·мин 1502 ± 446	ЭТП, нМ·мин 1361 ± 499	0,122	1 тертиль по сравнению с 3 ОР 2,54	[25]	Проспективное исследование. Тест проводился через 1 мес после прекращения антикоагулянтной терапии
			Па max, нМ 232 ± 82	Па max, нМ 187 ± 89	0,005	ОР 3,09		
			Плаг, мин 12 ± 6	Плаг, мин 13 ± 5	0,319	ОР 2,29		
	—	1 пМ ТФ; 1 мкМ ФЛ, 4 нМ ТМ	ЭТП, нМ·мин 986 ± 422	ЭТП, нМ·мин 763 ± 468	0,009	ОР 3,35	[25]	—
			Па max, нМ 201 ± 75	Па max, нМ 148 ± 88	< 0,001	ОР 4,49		
			Плаг, мин 17 ± 7	Плаг, мин 19 ± 10	0,174	ОР 2,39		
Рецидив спонтанного ВТЭ	188 с ВТЭ; 29 — с рецидивом	5 пМ ТФ; 4 мкМ ФЛ	—	—	—	ЭТП > 50 процентилей ОР 2,9	[26]	Проспективное исследование. Тест проводился через 2–3 мес после прекращения антикоагулянтной терапии
			—	—	—	Недостоверная разница рисков		
Рецидив после спонтанного ВТЭ	914 с ВТЭ; 100 — с рецидивом	72 пМ ТФ; 3,2 мкМ ФЛ	Па max, нМ 349 ± 108	Па max, нМ 419 ± 110	< 0,001	Па max > 400 нМ ОР = 2,5	[27]	Проспективное исследование. Тест проводился после прекращения антикоагулянтной терапии

Продолжение табл. 2

Причина гиперкоагуляции	Число пациентов	Активатор генерации тромбина и дозирования относительно базовой постановки	Диапазон значений		Достоверность	Предказательная сила	Ссылка	Комментарии
			Контрольная группа, если среднее \pm СО, если не подписано иначе	Группа с гиперкоагуляцией, если среднее \pm СО, если не подписано иначе				
Первый и вторичный ВТЭ	187 со спонтанным ВТЭ; 404 — контрольная группа	1/6 разведенная плазма 2,5 пМ ТФ; 4 мкМ ФЛ; 1,2 нМ ТМ	Средний ЭТП (95 % ДИ), нМ·мин 1641 (1607–1676)	Средний ЭТП (95 % ДИ), нМ·мин 1695 (1639–1750)	—	ЭТП > 90-го перцентиля распределения контрольной группы ОР ВТЭ 1,7	[27]	Тест проводился через 3 мес после прекращения антикоагулянтной терапии
	173 с первым спровоцированным ВТЭ; 404 — контрольная группа	—	Средний ЭТП (95 % ДИ), нМ·мин 1641 (1607–1676)	Средний ЭТП (95 % ДИ), нМ·мин 1649 (1595–1703)	—	—	[28]	—
	59 с рецидивом ВТЭ	—	—	—	—	ОР рецидива 1,1	[28]	—
Рецидив после спонтанного ВТЭ	105 с первым ВТЭ; 40 — с рецидивом	5 пМ ТФ; 4 мкМ ФЛ	ЭТП, нМ·мин 1671 \pm 514 Па max, нМ 302 \pm 91 Паг, мин 7,2 \pm 2,2	ЭТП, нМ·мин 1491 \pm 536 Па max, нМ 261 \pm 125 Паг, мин 8,7 \pm 5	0,111 0,058 < 0,001	—	[29]	Проспективное исследование. Анализ проводился после первого тромбоза
	42; 408 — контрольная группа	5 пМ ТФ; 4 мкМ ФЛ	Среднее геометрическое ЭТП (диапазон квартиля), нМ·мин 1755 (1620–1940) Па max, нМ 327,0 (304,9–357,8)	Среднее геометрическое ЭТП (диапазон квартиля), нМ·мин 1720 (1572–1978) Па max, нМ 330,2 (301,8–361,4)	—	ОР = 0,88/СО ОР = 1,04/СО	[31]	Проспективное исследование
	45; 666 — контрольная группа	5 пМ ТФ; 4 мкМ ФЛ	ЭТП, нМ·мин 1755 (1604–1940) Па max, нМ 333,6 (311,0–372,4)	ЭТП, нМ·мин 1863 (1636–1998) Па max, нМ 357,8 (320,5–391,5)	—	ОР = 1,55/СО ОР = 1,71/СО	[31]	Проспективное исследование
Острый коронарный синдром	186; 1000 — контрольная группа	5 пМ ТФ; 4 мкМ ФЛ	ЭТП, нМ·мин 1765 (1620–1940) Па max, нМ 333,0 (308,0–365,0)	ЭТП, нМ·мин 1772 (1604–1939) Па max, нМ 330,3 (301,9–357,8)	—	ОР = 1,09/СО ОР = 1,02/СО Па max	[31]	Проспективное исследование

Продолжение табл. 2

Причина гиперкоагуляции	Число пациентов	Активатор генерации тромбина и добавки относительно базовой постановки	Диапазон значений		Достоверность	Предсказательная сила	Ссылка	Комментарии
			Контрольная группа, среднее ± СО, если не подписано иначе	Группа с гиперкоагуляцией, среднее ± СО, если не подписано иначе				
Мутация протромбина G20210A	148 гетерозиготы; 111 — контрольная группа	6,8 пМ ТГ, 30 мкМ ФЛ	Медиана ЭТП (диапазон квартиля), нМ·мин 1053 (946—1171)	Медиана ЭТП (диапазон квартиля), нМ·мин 1358 (1190—1492)	Носители по отношению к контрольной группе < 0,001	—	[32]	—
			Па max, нМ 292 (267—330)	Па max, нМ 349 (307—385)	< 0,001			
	Плаг, мин 2,54 (2,46—2,84)		Плаг, мин 2,74 (2,46—3,04)	0,268				
	3 гомозиготы		—	ЭТП, нМ·мин 1661 (1451—1976)	—	—	[32]	—
			Па max, нМ 466 (446—470)					
			Плаг, мин 3,06 (2,14—5,08)					
Наследственный дефицит АТ-III	18 Type I—IIRS/PE; 9 — контрольная группа	5 пМ ТГ, 4 мкМ ФЛ	ЭТП, нМ·мин 2200 ± 320	ЭТП, нМ·мин 3366 ± 668	Достоверно отличались только ЭТП пациентов с Type I—IIRS/PE и контрольной группы	—	[33]	—
	Па max, нМ 377,3 ± 49,1		Па max, нМ 493,4 ± 75,0					
	—		ЭТП, нМ·мин 2142 ± 464					
	Па max, нМ 427,2 ± 98,3							
	8 — Cambridge II гетерозиготы		—	ЭТП, нМ·мин 2211 ± 268				
	Па max, нМ 391,4 ± 46,8							
ВТЭ у пациентов с онкологическими заболеваниями	1033 с онкологическими заболеваниями; 77 случаев ВТЭ	71,6 пМ ТГ, 3,2 мкМ ФЛ	Медиана (25—75 процентилей) ЭТП, нМ·мин 4386 (3804—4890)	Медиана (25—75 процентилей) ЭТП, нМ·мин 4475 (4087—4915)	0,197	Па max > 611 нМ (75 процентилей) OR = 2,1	[37]	Проспективное исследование.
	Па max, нМ 499 (360—603)	Па max, нМ 556 (432—677)	0,014					

Продолжение табл. 2

Причина гиперкоагуляции	Число пациентов	Активатор генерации тромбина и дозировки относительно базовой постановки	Диапазон значений		Достоверность	Предсказательная сила	Ссылка	Комментарии
			Контрольная группа, если среднее \pm СО, если не подписано иначе	Группа с гиперкоагуляцией, если среднее \pm СО, если не подписано иначе				
Сахарный диабет 2-го типа	52; 60 — контрольная группа	1 пМ ТГ; 1 мкМ ФЛ	Медиана (диапазон) ЭТП, нМ·мин 1844 (1317–2592)	Медиана (диапазон) ЭТП, нМ·мин 1835 (1213–2656)	0,96	—	[19]	—
			Па max, нМ 264 (97–432)	Па max, нМ 303 (207–434)	< 0,001			
			Плаг. мин 7,8 (4,7–18,4)	Плаг. мин 5,9 (4,5–11,5)	< 0,001			
		1 пМ ТГ; 1 мкМ ФЛ, 4 нМ ТМ	ЭТП, нМ·мин 1301 (535–2381)	ЭТП, нМ·мин 1497 (1061–2418)	0,003	—	[19]	—
			Па max, нМ 256 (79–433)	Па max, нМ 297 (216–427)	0,001			
			Плаг. мин 10,4 (6,3–25,8)	Плаг. мин 7,8 (5,6–13,6)	< 0,001			
Сахарный диабет	43; 60 — контрольная группа	Только Са	ЭТП, нМ·мин 1678 (539–2231)	ЭТП, нМ·мин 1781 (288–2598)	0,05	—	[19]	—
			Па max, нМ 151 (41–289)	Па max, нМ 202 (128–350)	< 0,001			
			Плаг. мин 12,6 (7,0–29,5)	Плаг. мин 10,8 (7,2–16,1)	< 0,001			
		5 пМ ТГ; 4 мкМ ФЛ	ЭТП, нМ·мин 1566,4 \pm 240,7	ЭТП, нМ·мин 1876,5 \pm 390,0	< 0,001	—	[18]	—
			Па max, нМ 252,8 \pm 44,6	Па max, нМ 308,9 \pm 39,5	< 0,001			
			Плаг. мин 4,15 \pm 0,74	Плаг. мин 3,59 \pm 0,62	< 0,001			

Окончание табл. 2

Причина гиперкоагуляции	Число пациентов	Активатор генерации тромбина и дозировки относительно базовой постановки	Диапазон значений		Достоверность	Предказательная сила	Ссылка	Комментарии
			Контрольная группа, среднее ± СО, если не подписано иначе	Группа с гиперкоагуляцией, среднее ± СО, если не подписано иначе				
Нормальная беременность	19 здоровых беременных; 10 – контрольная группа	5 пМ ТГФ, 20 мкМ ФЛ, 0,1 мг/мл СТИ	ЭТП, нМ·мин 1553 ± 567	До беременности, ЭТП, нМ·мин 1162 ± 446	Достоверная разница ЭТП до и во время ранней/поздней беременности $p < 0,001$	–	[38]	–
				Па тах, нМ 81 ± 41				
				Ранняя беременность, ЭТП, нМ·мин 2157 ± 466				
			Па тах, нМ 159 ± 100	Па тах, нМ 219 ± 117				
				Поздняя беременность, ЭТП, нМ·мин 2410 ± 543				
				Па тах, нМ 336 ± 178				
	I триместр ($n = 36$)	5 пМ ТГФ, 4 мкМ ФЛ	ЭТП в нормальной пулированной плазме достоверно ниже, чем у беременных. Точное значение параметров не приведено	ЭТП, нМ·мин 2123 ± 335	Нет достоверной разницы между триместрами	–	[40]	–
	Па тах, нМ 366 ± 43							
	II триместр ($n = 42$)			ЭТП, нМ·мин 2067 ± 326				
				Па тах, нМ 374 ± 42				
	III триместр ($n = 23$)			ЭТП, нМ·мин 1915 ± 261				
				Па тах, нМ 336 ± 49				

Таблица 3. Чувствительность ТЭГ к различным гиперкоагуляционным состояниям

Причина гиперкоагуляции	Число пациентов	Версия ТЭГ	Диапазон значений		Достоверность	Предсказательная сила	Ссылка	Комментарии
			Контрольная группа, среднее \pm СО, если не подписано иначе	Группа с гиперкоагуляцией, среднее \pm СО, если не подписано иначе				
Острый ишемический инсульт	93 неблагоприятных исхода в течение года, оцененные по шкале Rankin; 91 благоприятный исход	Цитратная плазма смешивалась с каолином и помещалась в кювету с гепариновой	Среднее \pm ошибка среднего МА, мм $63,2 \pm 0,5$	Среднее \pm ошибка среднего МА, мм $66,1 \pm 0,6$	< 0,001	Предсказание неблагоприятного исхода по верхнему тертилю МА ОШ 1,192	[49]	Проспективное исследование
Постоперационные тромботические осложнения	240 пациентов после различных операций, 10 тромботических осложнений	Цельная кровь в течение 4 мин после забора активировалась цеолитом	МА 66 ± 9	МА 71 ± 9	—	—	[51]	Проспективное исследование, ТЭГ проводилась сразу после операции
	6 инфарктов миокарда		МА 66 ± 9	МА 74 ± 5		ОШ 1,16		
Постоперационные тромботические осложнения	152 пациента в критическом состоянии из хирургического отделения интенсивной терапии; 16 тромботических осложнений	Быстрая ТЭГ (г-ТЕГ) на цельной крови, активированной каолином, человеческим рекомбинантным ТГ, с добавлением ФЛ	—	—	—	$G > 12,4$ дин/см ОШ 1,25	[50]	—
Нормальная беременность	65/65	Рекальцифицированная цитратная плазма	R, мин $7,8 \pm 2,5$	R, мин $6,1 \pm 1,8$	< 0,001	—	[59]	—
			K, мин $2,7 \pm 2,3$	K, мин $1,4 \pm 0,5$				
			Alfa, град. $57,7 \pm 11,6$	Alfa, град. $70,6 \pm 6,5$				
			MA, мм $61 \pm 5,9$	MA, мм $71 \pm 3,8$				
			Ly 30, % $0,8 \pm 1,7$	Ly 30, % $0,3 \pm 0,7$				

с тромбофилией [57]. Отсутствие чувствительности ТЭГ к тромбофилиям подтверждалось также в других работах [56, 58]. ТЭГ выявляет гиперкоагуляцию при беременности, увеличивающуюся в течение всего срока [59–61] по параметрам R, K, α , MA.

Подобно ТГТ, ТЭГ выявляет гиперкоагуляцию в группах пациентов с известным повышенным риском тромбоза и в группах пациентов с клинически подтвержденным тромбозом. Область чувствительности ТЭГ отличается от ТГТ: например, ТЭГ лучше работает при беременности, но хуже — при тромбофилии. Более широкое применение метода ограничивают те же недостатки: разброс между параметрами ТЭГ для доноров даже больше, чем в ТГТ, что приводит к малому различию в рисках (табл. 3). Также требуется дальнейшая стандартизация.

Новые тесты

Существует несколько новых, пока не имеющих активного применения в клинической практике интегральных тестов гемостаза, которые кажутся перспективными, так как учитывают аспекты свертывания, отсутствующие в рассмотренных ранее методах. Некоторые из них представляют собой модификации уже существующих методов (например, существует множество реологических подходов кроме ТЭГ [62]), в то время как другие используют совершенно новые принципы. Ниже мы обсудим методы, для которых имеются данные о способности выявлять гиперкоагуляцию.

Генерация тромбина и плазмина

Существует несколько вариаций метода одновременной регистрации тромбина и плазмина [63–65]. Усиленное свертывание и подавленный фибринолиз выявлены методом суммарного гемостатического потенциала (overall hemostasis potential) у пациентов, страдающих диабетом с микроциркуляторными осложнениями, у больных с преэклампсией, пожилых женщин с коронарной болезнью сердца [63]. Хотя данные пока очень скудные, метод кажется интересным, так как это единственная альтернатива ТЭГ для оценки функции фибринолиза.

Тромбодинамика

Новая стратегия исследования системы свертывания предложена в отечественном тесте тромбодинамики, созданном как исследовательский инструмент почти 20 лет назад и ставшем коммерчески доступным в 2012 г. В данном методе по сигналу светорассеяния детектируется распространение в пространстве свертывания, активированного от иммобилизованого на поверхности TF [66]. Существует вариант метода, в котором можно регистрировать зависимость тромбина от времени и расстояния от активатора параллельно с фибрином [67].

Основная идея метода заключается в том, чтобы учесть пространственную неоднородность свертыва-

ния крови; другими словами, активация свертывания и его распространение происходят в пространственно разделенных регионах [68]. Так же как при свертывании *in vivo* в ране, TF локализован на поверхности, а сгусток растет за счет активации и диффузии факторов свертывания [69]. Важно отметить, что разделение фазы активации и распространения делает тест особенно чувствительным к присутствию активаторов свертывания в плазме, таких как циркулирующий TF [69] или фактор XIa [70]. Скорость роста сгустка отражает общий прокоагулянтный потенциал, а образование независимых от активатора спонтанных центров свертывания показывает наличие МВ и долгоживущих факторов свертывания [70]. Преаналитическая стандартизация данного теста недавно стала доступной [71].

Эти биохимические находки недавно были подтверждены в нескольких поисковых исследованиях. Состояние гиперкоагуляции, выявленное в тесте тромбодинамики у пациентов с сепсисом, подтвердилось в дальнейшем повышением уровня D-димеров и случаями развития тромбозов [72]. Спонтанное свертывание и увеличение скорости роста сгустка наблюдались у пациентов с известным риском тромбоза, страдающих лимфомами, лимфогранулематозом, тромбофилией, гемолитической анемией, острым лейкозом, инфарктом миокарда [70]; то же самое получено в подробном исследовании множественной миеломы [73]. В исследовании клинического случая была показана возможность обнаружения состояния гиперкоагуляции с использованием теста тромбодинамики при β -талассемии [74]; тромбоз воротной вены развился через несколько недель после того, как у пациента было выявлено ускорение роста сгустка. В некоторых из упомянутых работ проводилось сравнение результатов тромбодинамики с ТГТ и ТЭГ, которые не обнаружили гиперкоагуляции в большинстве случаев.

Таким образом, тест тромбодинамики имеет хорошие перспективы как инструмент выявления гиперкоагуляции и оценки тромботического риска, но необходимы дополнительные клинические исследования для установления надежной связи результатов теста и риска тромбоза.

Проточные камеры

Образование тромбоцитарно-фибринового тромба в проточных камерах, наблюдаемое при помощи микроскопии, является потенциально «окончательным» интегральным тестом, способным одновременно оценивать функционирование тромбоцитов (включая адгезию, агрегацию и прокоагулянтную активность) и системы свертывания. Такие приборы в настоящее время активно разрабатываются и используются в разных приложениях (см. недавний обзор [75]). Обзор этой быстро развивающейся области находится за рамками данной статьи. Следует отметить, что есть публикации о способности проточных

Таблица 4. Эффективность применения интегральных тестов, прошедших значительное количество клинических испытаний, при конкретных патологиях (по данным, рассмотренным в статье)

Причины гиперкоагуляции	АЧТВ	ТГТ	ТЭГ
Рецидив ВТЭ	+	+	—
Онкологические заболевания	-	+	+
Беременность	+ / —	+ / —	+
Прием оральных контрацептивов	—	+ (с добавлением аРС)	—
Сахарный диабет	-	+	—
ДВС	+ (в варианте с lot waveform analysis)	+	—
Постоперационные тромботические осложнения	-	—	+
Ишемический инсульт	—	+ (в богатой тромбоцитами плазме)	+

камер выявлять гиперкоагуляционные изменения в крови [76–78]. Однако клинических исследований крайне мало и метод крайне слабо стандартизован [79]. Хотя из теоретических представлений проточные камеры имеют большой потенциал, пройдет еще немало времени до того, как они войдут в клиническую практику.

Заключение

Первый вывод данного анализа: интегральные тесты в значительной степени способны выявлять гиперкоагуляцию. По сравнению с АЧТВ и МНО чувствительность новых интегральных тестов определенно выше и охватывает больший круг патологий и причин гиперкоагуляции. Скорее всего это объясняется тем, что новые тесты используют меньшие концентрации активаторов, не скрывающие эффект циркулирующих прокоагулянтных факторов или частиц (или активация и распространение свертывания пространственно разнесены).

Однако существуют серьезные проблемы, осложняющие использование интегральных тестов для оценки риска тромбоза. Наиболее важная заключается в том, что вывод о чувствительности теста, как правило, достигается только при рассмотрении больших групп. Стандартные ошибки велики, и разница в средних величинах показателей тестов становится достоверной за счет набора большой статистики (см. табл. 1–3). Другими словами, если мы пытаемся определить границы и отнести пациентов к группам с разным риском тромбоза исходя из результатов теста, разница степени риска между этими группами

в основном невелика. Достаточна ли эта разница, чтобы влиять на решения в клинической практике, неясно. Некоторые новые тесты показали высокую чувствительность, но возможность их применения в клинике требует проверки.

Другая проблема — недостаток стандартизации. Существует множество вариантов каждого теста, в клинических исследованиях часто используют разные подходы, а чувствительность тестов сильно зависит от выбранного протокола. Поэтому может быть сложно воспроизвести и интерпретировать результаты, полученные в перечисленных в данной статье работах. Усилия по стандартизации некоторых наиболее разработанных интегральных тестов (таких как ТГТ [80–82]) позволяют надеяться, что эта проблема может быть решена и интегральные тесты найдут более широкое практическое применение.

На основании рассмотренных работ авторы собрали в табл. 4 свои выводы об эффективности применения интегральных тестов, прошедших многочисленные клинические испытания при различных патологиях.

Благодарность

Мы глубоко признательны Ирине Марченко за организационную и техническую помощь при работе с рукописью. Работа авторов поддержана грантом Президента РФ для молодых ученых МД-6347.2015.4, грантами РФФИ 14-04-00670 и 15-54-45036, а также грантом по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».