

**В.М.Шмелева, О.Ю.Матвиенко, А.П.Полякова, О.Г.Головина,
Ю.А.Наместников, В.А.Кобилянская, С.И.Капустин, Л.П.Папаян**
**ОЦЕНКА ТРОМБОФИЛИЧЕСКОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С
РАННИМ ДЕБЮТОМ ВЕНОЗНОГО ТРОМБОЭМБОЛИЗМА С
ПОМОЩЬЮ КАЛИБРОВАННОЙ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ
ТРОМБОГРАММЫ**

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России»,
Санкт-Петербург

Медицинская и социальная значимость проблемы адекватной терапии и вторичной профилактики венозного тромбоемболизма (ВТЭ) остается значимой, несмотря на многолетний положительный опыт в лечении и профилактике ВТЭ, появление в арсенале врача принципиально новых антикоагулянтов. В многочисленных отечественных и международных руководствах по профилактике и лечению венозных тромбозов отсутствует единое мнение по продолжительности и интенсивности антикоагулянтной терапии идиопатических тромбозов и тромбофилических состояний. Важно также отметить низкий уровень доказательности многих рекомендаций. В каждом конкретном случае решение остается в компетенции лечащего врача, опирающегося на совокупность клинических и лабораторных данных. Основная задача лаборатории состоит в предоставлении клиницисту достоверной информации о функциональном состоянии системы гемостаза и изменениях в ней, вызываемых проводимой терапией. Тест генерации тромбина (ТГТ) представляет собой метод определения динамики образования и инактивации тромбина *in vitro*. Тромбин – ключевой энзим гемостаза, его количеством и динамикой образования определяется скорость и интенсивность превращения фибриногена в фибрин и, в конечном счете, коагуляционный потенциал. Тест был впервые предложен в 1953 г. R. Macfarlane и R. Biggs для оценки состояния свертывающей системы у больных гемофилией. В последующем группа ученых из Маастрихтского университета под руководством проф. Н.С. Hemker модифицировала тест и разработала автоматизированный метод детекции генерации тромбина – калиброванную автоматизированную тромбограмму (КАТ) [1]. Схематично представить смысл калиброванной автоматизированной тромбограммы можно так – избыток тромбина – риск тромбоза, мало тромбина – риск кровотечения. Соотношение рисков этих двух состояний во многом определяет длительность и интенсивность антикоагулянтной терапии. Показано, что пролонгированная терапия предотвращает 80 эпизодов повторного тромбоза (из расчета на 1000 больных), но провоцирует от 20 до 60 больших геморрагических осложнений. Имеющиеся шкалы для оценки риска геморрагий не всегда помогают адекватно оценить риски, не говоря уже о том, что большая их часть создана для кардиологических больных, а не пациентов с ВТЭ. Именно поэтому вопрос адекватной оценки тромбофилического статуса пациентов с идиопатическими тромбозами и,

соответственно пролонгации либо отмены терапии АНД сохраняет свою актуальность.

В постановке теста с использованием в качестве активатора rh-TF и смеси фосфолипидов не учитывается вклад в генерацию тромбина системы протеина С, так как исследуемые образцы не содержат тромбомодулин (ТМ), который *in vivo* экспонирован на мембране эндотелия. Система протеина С является важнейшим компонентом антикоагулянтной защиты организма и обеспечивает ингибицию избыточного тромбинообразования. Добавление в реакционную смесь кроличьего или рекомбинантного человеческого тромбомодулина (rh-ТМ) или активированного протеина С позволяет оценить вклад системы протеина С в генерацию тромбина *in vitro*. Благодаря подобной модификации тест становится чувствительным к состоянию системы протеина С и способен оценить резистентность к активированному протеину С как наследственного, так и приобретенного характера [2].

Целью настоящей работы было установление целесообразности использования калиброванной автоматизированной тромбограммы для оценки тромбофилического статуса пациентов с ранним дебютом венозного тромбоза. Обследовано 38 пациентов с ранним дебютом венозного тромбоза (до 45 лет) находившихся на стационарном или амбулаторном лечении в Российском НИИ гематологии и трансфузиологии, либо направленных для диагностических исследований нарушений гемостаза в лабораторию свертывания крови РосНИИГТ специалистами профильных лечебных учреждений (М/Ж 15/23, средний возраст 38,0±9,0 г.).

Постановка и анализ результатов ТГТ выполнялись по методике Nemker H., в бедной тромбоцитами плазме (PPP). В качестве триггерного агента использована смесь рекомбинантного человеческого тканевого фактора в конечной концентрации 5 пМоль и отрицательно заряженных прокоагулянтных фосфолипидов в конечной концентрации 4 мМоль. Для параллельной постановки с и без ТМ применялся соответствующий реагент - PPP plasma+/- ТМ reagent (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands). Использовался планшетный флуориметр (Fluoroscans Ascent, Thermolab system, Finland). Кривые генерации тромбина построены и обчислены при помощи Thrombinoscope software (Thrombinoscope BV, The Netherlands). Молекулярно-генетическое тестирование проводилось методом ПЦР. При выявлении волчаночного антикоагулянта использовали стандартный алгоритм, включающий скрининг (удлинение АПТВ, тест с разведенным ядом гадюки Рассела), коррекционный и подтверждающий тесты. Коагулологическое исследование включало определение активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового теста по Квику (ПТ), тромбинового времени (ТВ), концентрации фибриногена, активности фактора VIII протеина С и антитромбина III.

В селективной выборке больных, включенных в данное исследование, были репрезентативно представлены такие значимые формы тромбофилии, как носительство волчаночного антикоагулянта (ВА) – 4 больных, мутация G1691A в гене фактора V (14 гетерозиготных носителей) и G20210A в гене

протромбина (3 гетерозиготных носителя), изолированно повышенная активность фактора VIII свертывания крови (6 больных). Пациентов с дефицитом естественных антикоагулянтов (антитромбина и протеина С) в указанной выборке не было.

Все пациенты, вошедшие в данное исследование, получили пролонгированные курсы противотромботической терапии (не менее 6 месяцев). На момент обследования 18 пациентов продолжали прием антикоагулянтов непрямого действия (АНД), среди них 6 пациентов с МНО в оптимальном терапевтическом интервале 2,0-3,0 и 12 пациентов с более низкими значениями МНО (1,2 -1,9). Статистический анализ выполнен с помощью пакета STATISTICA 6.1.

Для определения референтных интервалов были обследованы 28 здоровых волонтеров. В калиброванной автоматизированной тромбограмме оценивались следующие показатели: Lag time (время инициации свертывания, мин), РТ (Peak thrombin - максимальное количество тромбина образующееся в образце, нМоль), ttPeak (время генерации максимального количества тромбина в образце, мин) и ЕТР (endogenous thrombin potential - эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль*мин). В тесте, выполненном с добавлением ТМ, регистрировали снижение указанных показателей за счет активации системы протеина С.

Показатели Lag-time, ЕТР, РТ и ttPeak при постановке ТГТ без ТМ в контроле составили $2,9 \pm 0,5$, $1731,4 \pm 253,7$, $292,3 \pm 50,0$ и $6,1 \pm 0,9$, соответственно, при постановке ТГТ с ТМ $2,8 \pm 0,4$, $932,8 \pm 272,6$, $196,2 \pm 58,1$ и $5,2 \pm 0,6$, соответственно. Значения ЕТР выше 95^{го} перцентиля в контрольной группе (>2114 нМмин без ТМ и >1433 нМмин с ТМ) трактовались, как повышенные. На момент обследования ни один из пациентов не имел повышенные значения ЕТР и РТ, в том числе и гетерозиготные носители мутации G20210A в гене протромбина.

Для расчета степени угнетения активности системы протеина С были использованы показатели ЕТР и РТ, полученные в параллельной постановке с и без ТМ. Степень снижения ЕТР (\downarrow ЕТР) рассчитывалась по формуле $(\text{ЕТР в РРР}_{-ТМ} \text{ минус ЕТР in РРР}_{+ТМ}) / \text{ЕТР в РРР}_{-ТМ} \times 100\%$, а степень снижения РТ (\downarrow РТ) соответственно $(\text{РТ в РРР}_{-ТМ} \text{ минус РТ в РРР}_{+ТМ}) / \text{РТ в РРР}_{-ТМ} \times 100\%$. Референтные интервалы для \downarrow ЕТР и \downarrow РТ составили 21-62% и 14-51% соответственно (5-95% перцентили данных, полученных в контрольной группе). Ингибирование ЕТР менее 21% и/или РТ менее 14% (т.е. резистентность к активированному протеину С) была выявлена у 8 (57%) больных – носителей мутации фактора V Leiden, 4 (100%) пациентов с носительством АФА волчаночного типа, 3 (50%) больных с изолированно повышенной активностью фактора VIII свертывания крови. Заслуживает внимания тот факт, что недостаточное ингибирование РТ отмечено у всех указанных больных с наследственной/или приобретенной АПСР, в то время как недостаточное ингибирование ЕТР – в 50% образцов плазмы носителей мутации фактора V Leiden, 75 % пациентов с носительством АФА волчаночного типа, и 75% больных с изолированно повышенной активностью

фактора VIII свертывания крови. Таким образом, показатель \downarrow PT оказался более чувствительным к выявлению АПСР чем показатель \downarrow ЕТР.

В последнее время публикуется значительное число исследований, доказывающих, что эндогенный гемостатический потенциал, оцениваемый при постановке ТГТ, в большей степени коррелирует с фенотипом обследуемого по сравнению с традиционными коагулологическими тестами, позволяет проводить скрининг на наличие тромбофилии, а также точнее оценивать эффективность проводимой противотромботической профилактики и риск развития возможных осложнений, как тромботических, так и геморрагических [3]. Оценка вклада системы протеина С в генерацию тромбина *in vitro* осуществляется добавлением в реакционную смесь тромбомодулина. Патология проявляется отсутствием снижения или небольшим снижением показателей тромбинового потенциала. Когда параллельно проводится тест с и без ТМ можно оценить работу системы протеина С вне зависимости от абсолютного уровня тромбина, т.е. на как на фоне противотромботической терапии прямыми и непрямими антикоагулянтами, так и при общепринятой вторичной профилактике тромбообразования с помощью антикоагулянтов непрямого действия. Таким образом, калиброванная автоматизированная тромбограмма позволяет оценить систему гемостаза в целом, во взаимодействии всех механизмов, обеспечивающих образование и инактивацию тромбина. Последнее особенно важно, поскольку все клоттинговые тесты имеют конечной точкой 5% от всего образовавшегося тромбина.

Показано, что как генетически детерминированная, так и приобретенная АПСР ассоциирована с повышенным риском рецидивирования венозного тромбоза [4]. При этом, основное внимание клиницистов сфокусировано на АПСР, вызванной мутацией в гене фактора V Leiden. Как показали наши данные, гетерозиготное носительство мутации G1691A в гене фактора V фенотипически проявляется резистентностью к активированному протеину С далеко не во всех случаях (в нашей селективной выборке - в 75%). В то же время нами отмечена высокая частота встречаемости приобретенной АПСР у больных с ранним дебютом венозного тромбоза. Таким образом, выявляемое с помощью КАТ состояние резистентности к АПС (любого генеза) является значимым лабораторным аргументом в пользу пролонгации терапии АНД. Вопрос целесообразности длительной терапии АНД у гетерозиготных носителей мутации в гене фактора V Leiden, фенотипически не проявляющейся АПСР, требует дальнейшего изучения. Также требует дальнейшего изучения вопрос перспективности и утилитарной значимости теста генерации тромбина для скрининга различных форм тромбофилии.

В то же время можно с уверенностью сказать, что постановка теста с добавлением тромбомодулина, являющегося активатором работы системы протеина С, позволяет эффективно оценить вклад последнего в снижение эндогенного гемостатического потенциала. При параллельной постановке теста с использованием соответствующего коммерческого реагента (PPP

plasma+/-TM reagent) наиболее чувствительным к выявлению наследственной и/или приобретенной АПС резистентности является недостаточное ингибирование такого показателя, как РТ. Параллельная постановка теста генерации тромбина с и без ТМ позволяет более точно оценивать риск рецидивирования тромботических осложнений.

В целом полученные результаты подтверждают перспективность оценки протромботического фенотипа у больных с ВТЭ с помощью калиброванной автоматизированной тромбограммы. Полученные в тесте генерации тромбина данные могут способствовать индивидуализации противотромботической терапии и профилактики

Список литературы

1. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma / H.C. Hemker, P. Giesen, R. Al Dieri et al. // *Pathophysiol Haemost Thromb.* – 2003. – Vol. 33. – P. 4–15.
2. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population / A. W. Dielis, E. Castodoli, H. M. R.Spronk, R.V. Oerle et al. // *J Thromb Haemost* – 2008. –Vol. 6, №1 – P. 125 –131.
3. Use of calibrated automated thrombography□thrombomodulin to recognize the prothrombotic phenotype. / Dargaud Y., Trzeciak M., Borget J., Ninet J., Negrier C. // *Thromb Haemost* – 2006. –Vol. 96 – P. 562 –567.
4. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. /G. Hron, M. Kollars, B. Binder, S. Eichinger, P. Kyrle // *JAMA*, - 2006 – Vol.296 – P.397-402.