

КОАГУЛОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА ТРОМБОЗОВ И ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ТЕРАПИИ

А.Б. Добровольский, Е.В. Титаева

Институт клинической кардиологии им. А.Л.Мясникова ФГУ РКНПК Росмедтехнологий, г. Москва

Система гемостаза обеспечивает сохранение жидкого состояния крови в пределах кровеносных сосудов, быстрое образование локальных тромбов в зоне повреждения стенки сосуда и их растворение после восстановления поврежденной области. Достигается это благодаря множественным взаимодействиям компонентов стенки сосуда, клеток крови и плазменных факторов. Исторически сложилось так, что первыми были установлены компоненты и реакции, ведущие к образованию фибрина — белковой основы тромбов, затем ингибиторы свертывания и компоненты, регулирующие растворение фибрина. Дальнейшие исследования показали, что процессы свертывания крови, противосвертывания и фибринолиза, выполняющие, по сути, противоположные по физиологической значимости функции, в действительности тесно взаимосвязаны и во многом регулируются одним ферментом — тромбином.

Образование тромбина

До конца 80-х годов в активации свертывания крови выделяли 2 пути — внешний, инициатором которого является тканевой фактор (ТФ), содержащийся в стенке сосуда, и внутренний, все компоненты которого присутствуют в плазме, а инициатором является контактная активация фактора XII. Это деление соответствовало данным о влиянии дефицита того или иного фактора свертывания на скорость образования фибрина в одном из 2-х скрининговых тестов — активированном частичном тромбопластиновом времени (АЧТВ) или протромбиновом тесте (ПТ-тест). Основным недостатком такого деления являлось то, что оно не позволяло объяснить почему дефицит фактора XII не связан с повышенной кровоточи-

востью, а дефицит стоящих ниже в каскаде свертывания факторов VIII и IX (гемофилия А или В) проявляется в виде тяжелых геморрагий.

Объяснить это противоречие удалось благодаря исследованиям, выполненным в 80-90-е годы прошлого века, результаты которых привели к существенной модификации классической схемы реакций активации свертывания крови. Во-первых, было установлено, что комплекс ТФ-фактор VIIa — теназа внешнего пути активирует не только фактор X, но и фактор IX. Во-вторых, было показано, что теназа внутреннего пути — комплекс факторов VIIIa и IXa в присутствии фосфолипидов активирует фактор X со скоростью в 50-100 раз большей, чем теназа внешнего пути. В третьих, было показано, что фактор XI активируется не под действием фактора XIIa, как предполагалось в классической схеме реакций, а тромбином при участии гликопротеина Iba тромбоцитов [1, 2]. Эти данные послужили основанием для внесения существенных модификаций в схему реакций активации свертывания крови (рис. 1).

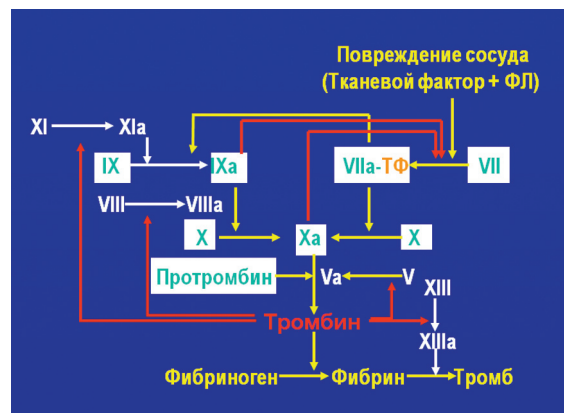


Рис. 1. Схема реакций активации свертывания крови.

Пусковой реакцией является связывание ТФ с фактором VIIa. Этот комплекс активирует факторы IX и X. Образующийся фактор Xa обеспечивает начальную генерацию тромбина, который активирует тромбоциты и часть факторов V и VIII. Фактор VIIa формирует на поверхности активированных тромбоцитов комплекс с фактором IXa — теназу внутреннего пути, которая значительно повышает скорость образования фактора Xa и тромбина. Тромбин далее усиливает свое образование, активируя факторы V, VIII и XI.

Очень важные для понимания физиологии гемостаза данные были получены при исследовании динамики образования тромбина. Оказалось, что в начальном периоде активации свертывания крови тромбин образуется с относительно низкой скоростью, затем в процессе наступает перелом, и его скорость резко возрастает. Соответственно, в образовании тромбина выделяют две фазы — инициации и распространения (тромбиновой вспышки). Причем эти фазы обеспечиваются разными факторами и регулируются разными ингибиторами. Фаза инициации обеспечивается теназой «внешнего пути» — комплексом ТФ-фактор VIIa + фактор X на мембранах поврежденных клеток, а ее основным регулятором является ингибитор пути тканевого фактора. Фаза распространения обеспечивается теназой «внутреннего пути» — комплексом факторов VIIa и IXa + фактор X, формирующимся на поверхности активированных тромбоцитов, а ее основными регуляторами являются антитромбин и протеин C.

При свертывании крови *in vitro* образование фибрина (сгустка) происходит примерно в точке перехода фазы инициации в фазу распространения, когда количество образовавшегося тромбина составляет ~5% от максимального. «Дополнительный» тромбин, который образуется уже после свертывания фибриногена, играет важную роль в стабилизации тромбов. Об этом свидетельствуют данные как экспериментальных, так и клинических исследований. Дефицит факторов VIII и IX (гемофилия A или B), определяющих фазу распространения образования тромбина, связан с кровоточивостью,

а дефицит ингибиторов, ограничивающих ее — антитромбина или системы протеина C, повышает риск тромбозов.

Ингибиторы свертывания крови

Образование тромбина и его активность регулируется на нескольких уровнях. В данной статье ограничимся кратким описанием 2-х упомянутых выше ингибиторов свертывания крови, дефицит которых связан со значительным увеличением риска венозных тромбозов.

Антитромбин

Антитромбин (приставка III в настоящее время не используется) ингибирует протеазы системы свертывания, образуя с ними ковалентный комплекс. Скорость ингибирования значительно повышается в присутствии сульфатированных олигосахаридов, одним из представителей которых является гепарин. Минимальной структурой гепарина, обеспечивающей увеличение скорости ингибирования, является последовательность из 5-и остатков сахара, содержащая 4 специфически расположенные сульфогруппы. Связывание с этой структурой повышает на 3 порядка скорость ингибирования. Молекулы гепарина, содержащие более 18 звеньев, могут еще на порядок повышать скорость ингибирования, выполняя роль матрицы, обеспечивающей эффективное взаимодействие протеазы с ингибитором. Эффект матрицы проявляется в случае ингибирования тромбина и факторов IXa и XIa, но не фактора Xa, который с гепарином не связывается. В кровеносных сосудах активация антитромбина обеспечивается гликопротеидами люминальной поверхности эндотелия, содержащими гепарансульфат. Связывание антитромбина с этими структурами является одним из механизмов, обеспечивающих антитромботические свойства эндотелия.

Система протеина C

Эндотелий сосудов не только инактивирует тромбин, но и может с помощью тромбина пре-

рывать каскад коагуляции. Осуществляется это с помощью системы протеина С, основными компонентами которой являются два циркулирующих в плазме витамин К-зависимых белка — протеины С и S и два компонента мембран эндотелия — тромбомодулин и рецептор протеина С. Тромбин, вымывающийся из зоны тромбообразования, при контакте с неповрежденным эндотелием связывается с тромбомодулином. Это связывание изменяет субстратную специфичность тромбина. Он теряет прокоагулянтные свойства (способность активировать тромбоциты, факторы V и VIII, свертывать фибриноген), но приобретает способность активировать связанный с эндотелиальным рецептором протеин С. Активированный протеин С расщепляет факторы Va и VIIIa, что прерывает каскад коагуляции.

Функции тромбина

Тромбин был открыт как фермент образующий фибрин — структурную основу тромба. До середины 70-х годов прошлого века он рассматривался как высокоспециализированный фермент системы свертывания крови. Дальнейшие исследования показали, функции тромбина много шире (рис. 2).

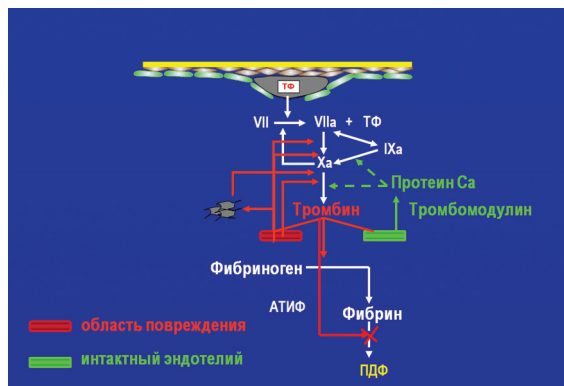


Рис. 2. Тромбин — многофункциональный фермент. Красными стрелками отмечены прокоагулянтные и провоспалительные реакции тромбина, зелеными — антикоагулянтные и противовоспалительные.

Самым удивительным является то, что он может выполнять противоположные по фи-

зиологической значимости функции. В области повреждения эндотелия он стимулирует свое образование, активируя тромбоциты и факторы свертывания крови, а также провоспалительные реакции. При связывании с тромбомодулином неповрежденного эндотелия он активирует протеин С, который не только прерывает каскад свертывания, но и обладает противовоспалительными функциями. Кроме этого, комплекс тромбин-тромбомодулин активирует прокарбоксипептидазу В, получившую название активированного тромбином ингибитора фибринолиза, который замедляет фибринолиз и инактивирует С5а компонент комплемента [3]. Такое разнообразие функций обеспечивается тем, что помимо активного центра тромбин обладает участками специфического связывания ряда модуляторов его реакций. Это открывает перспективы создания фармакологических препаратов, которые блокировали бы лишь «нежелательные» функции тромбина.

Коагулологические факторы риска тромбозов

Еще в середине 19-го века *Вирхов Р.* выделил 3 фактора, предрасполагающих к тромбообразованию: 1) нарушения тока крови, 2) повреждение стенки сосуда и 3) гиперкоагуляционные изменения крови. Дальнейшие исследования подтвердили справедливость гипотезы *Вирхова Р.* Единственное уточнение, которое может быть сделано, заключается в том, что врожденные тромбофилии в значительно большей степени повышают риск венозных, чем артериальных тромбозов.

Наиболее значимыми факторами риска венозных тромбозов является дефицит компонентов системы противосвертывания, а наиболее часто встречающиеся в европейской популяции тромбофилии — фактор V Лейден, ПТ G20210А и МТГФР С677Т связаны лишь с умеренным повышением риска (табл. 1).

Тромбофилии выявляются лишь у ~1/3 больных с венозными тромбозами, а частота их встречаемости в европейской популяции достигает ~10%, что значительно выше, чем частота веноз-

Таблица 1

Врожденные тромбофилии и риск венозных тромбозов. По данным Европейского консенсуса (Int Angiol 2005; 24: 1-26)

Тромбофилия	Частота (%)		ОР
	В популяции	Больные с тромбозом глубоких вен нижних конечностей или легочной тромбоэмболией	
Дефицит анти-тромбина	0,07-0,16	1-3	20
Дефицит протеина С	0,2-0,4	3-5	10
Дефицит протеина S	0,03-0,13	1,5	10
Лейденская мутация V фактора свертывания крови	3-15	20	5
Повышение уровня фактора свертывания крови VIII	1-2	4-7	2,5
Мутация протромбина G20210A	5	10	2,5
Гипергомоцистеинемия	11	25	5

Примечание. Здесь и далее ОР — относительный риск, ДИ — доверительный интервал.

ных тромбозов. По рекомендации Европейского консенсуса по венозным тромбозам скрининг на тромбофилию целесообразно проводить в случаях, когда выше вероятность ее выявления, или ее наличие может повлиять на проводимую терапию:

- венозное тромбоэмболическое осложнение, возникшее спонтанно или в возрасте до 50 лет даже при наличии провоцирующего фактора;
- венозное тромбоэмболическое осложнение у женщин, принимающих гормональные

контрацептивы, заместительную гормональную терапию, беременных;

- повторные тромбозы независимо от наличия факторов риска;
- больные с повторным тромбофлебитом поверхностных вен без онкологических заболеваний и варикозного расширения вен;
- нетипичные места локализации тромбов (церебральный венозный синус, вены брыжейки, печени);
- больные с индуцированным варфарином некрозом кожи и младенцев с молниеносной пурпурой, не связанной с сепсисом;
- члены семьи носителей тромбофилии, в первую очередь женщин в детородном возрасте;
- повторные выкидыши или гибель плода после 20-й недели;
- тяжелая преэклампсия.

Тромботические осложнения атеросклероза являются ведущей причиной смертности населения развитых стран мира. Наиболее значимым коагулологическим фактором риска атеротромбоза является фибриноген, который проявил себя как независимый фактор риска во многих проспективных исследованиях [5]. Патогенетическая значимость фибриногена может быть обусловлена тем, что он повышает вязкость плазмы, агрегацию тромбоцитов и эритроцитов, проникает в атеросклеротические бляшки, где превращается в фибрин, связывающий тромбин и стимулирующий пролиферацию гладкомышечных клеток и моноцитов. В ряде исследований выявлена связь фактора фон Виллебранда и ингибитора активаторов плазминогена типа 1 (ИАП-1) с риском сердечно-сосудистых заболеваний.

Повышение ИАП-1 является наиболее часто встречающейся причиной снижения фибринолитической активности. Однако необходимо помнить, что ИАП-1 является быстрореагирующим белком острой фазы, и его повышение может быть следствием заболевания. Например, в ряде исследований, включая и наше [6], было показано, что активность ИАП-1 повышается в 2 раза в течение 12 часов от начала развития инфаркта миокарда. Основным регулятором синте-

за ИАП-1 является инсулин. Повышение ИАП-1 может играть важную роль в развитии атеротромбоза при метаболическом синдроме [7].

Данные о связи других компонентов системы гемостаза с риском сердечно-сосудистых заболеваний противоречивы. Результаты двух мета-анализов, объединивших большое число наблюдений, показали, что значимость наиболее распространенных тромбофилий в риске атеротромбоза в популяции много ниже, чем в риске венозных тромбозов (табл. 2). Исключение составляют женщины в молодом возрасте, у которых носительство фактора V Лейден, или C677T полиморфизма метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) в сочетании с приемом гормональных контрацептивов или курением связано со значительным повышением риска ишемического инсульта (табл. 3).

Таблица 2

Связь врожденных тромбофилий с риском атеротромбоза в популяции (по данным двух мета-анализов Kim R.J, Becker R.C., 2003 и Zheng Ye et al., 2006)

Тромбофилия	ОР (95% ДИ)
Фактор V Лейден	1,17 (1,08-1,28)
Протромбин 20210А	1,31 (1,12-1,52)
ИАП-1 [-675] 4G	1,06 (1,02-1,10)
МТГФР 677ТТ	1,20 (1,02-1,41)
Фактор VII 10976А, GPIa 807Т, GPIIb [-5]С, GPIIIa 1565Т	Не значимо

Маркеры активации свертывания крови

Тромбин образуется и действует локально. Поэтому оценить его образование можно лишь косвенно по маркерам активации свертывания, которые вымываются потоком крови из зоны образования. Исследованию 6-ти из них уделялось наибольшее внимание (табл. 4). Наиболее значимыми для диагностики оказались те, которые отражают образование фибрина, а из них — Д-димер. Его отличительными характеристиками являются относительно высокая концентрация,

Таблица 3

Врожденные тромбофилии и риск ишемического инсульта у женщин: число больные/контроль и относительный риск ишемического инсульта у женщин в возрасте до 49 лет (Slooter A. et al., 2005)

Фактор	ФакторV	Фактор V Leiden	МТГФР C677T CC/CT	МТГФР C677T TT
Оральные контрацептивы (-)	83/463 ОР=1	2/24 ОР=0,4 (0,1-1,9)	82/441 ОР=1	10/46 ОР=1,1 (0,5-2,4)
Оральные контрацептивы (+)	82/254 ОР=2,6 (1,7-4,0)	12/16 ОР=11,2 (4,3-29)	85/248 ОР=2,8 (1,8-4,3)	16/23 ОР=5,4 (2,4-12)
Курение (-)	109/477 ОР=1	10/35 ОР=1,6 (0,7-3,6)	110/472 ОР=1	16/41 ОР=1,4 (0,7-2,8)
Курение (+)	56/242 ОР=1 (0,7-1,5)	4/5 ОР=6,3 (1,3-31)	57/219 ОР=1 (0,7-1,5)	10/28 ОР=1,7 (0,7-4,1)

что упрощает определение, и большая продолжительность циркуляции в кровотоке. Последнее повышает значимость Д-димера как маркера тромбозов, т.к. активация свертывания может протекать волнообразно, но ограничивает возможность использования этого показателя как маркера эффективности (достаточности) фармакологической антикоагуляции. Определение Д-димера пока не может помочь в оптимизации терапии гепаринами.

Таблица 4

Маркеры активации свертывания крови

Маркер	Концентрация в норме	Время полувыведения
Фактор VIIa	≤ 0,1 нМ	2,5 час
Фрагмент 1+2	≤ 0,7 нМ	1,5 час
Комплекс ТАТ	≤ 0,015 нМ	1 час
Фибринопептид А	≤ 1,5 нМ	5 мин
Фибрин-мономер	≤ 15 нМ	3-12 час
Д-димер	≤ 5 нМ	3-12 час

Что измеряется с помощью диагностикумов на Д-димер?

По определению Д-димер — это один из конечных продуктов деградации поперечно сшитого фибрина. Именно его используют для иммунизации мышей и выбора антител, которые узнают новую структуру (назовем её Д-Д), образующуюся при взаимодействии двух Д-доменов фибриногена, но не реагируют с нативным фибриногеном.

В действительности Д-Д-структура появляется уже на стадии образования «растворимых комплексов фибрин-мономеров» (РКФМ), которые остаются растворимыми до тех пор, пока их концентрация не достигнет критической (рис. 3). Антитела к Д-димеру взаимодействуют со всеми производными фибриногена, содержащими Д-Д-структуру. В их число входят как собственно Д-димер, образующийся в результате лизиса тромбов, так и РКФМ, которые образуются в результате активации свертывания крови и являются предшественниками тромбов. Подтверждение этого получено в исследовании FАСТ [11], в котором сравнение данных определений с использованием 23 диагностикумов на Д-димер и 5 на РКФМ* показало, что корреляция между РКФМ и Д-димером примерно такая же, как и между значениями Д-димера, определенными с разными диагностикумами, и составляет от 0,62 до 0,98. Кроме этого было выявлено, что разные диагностикумы на Д-димер на порядок отличаются по чувствительности к высоко- и низкомолекулярным производным, т.е. к РКФМ и собственно Д-димеру.

Различия в чувствительности к разным производным фибриногена не столь важны, когда определение Д-димера используется для диагностики тромбоза глубоких вен нижних конечностей (ТГВ)/тромбоэмболии легочной артерии

* Речь идет о диагностикумах, в которых определение основано на использовании антител, или способности плазмы стимулировать активацию плазминогена тканевым активатором плазминогена. Выпускаемый в России под сходным названием о-фенантролиновый тест относится к паракоагуляционным, диагностическая значимость которых из-за низкой чувствительности и специфичности представляется сомнительной.

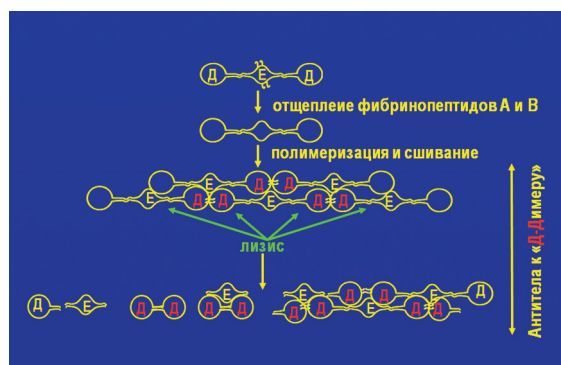


Рисунок 3. Схема образования и расщепления фибрина.

(ТЭЛА). Во-первых, в плазме больных ТГВ повышается уровень и высоко- и низкомолекулярных производных. Во-вторых, для каждого метода установлено свое «пограничное значение». Однако стандартизация теста крайне необходима, т.к. в ряде больших исследований показано, что уровень Д-димера может быть более значимым предиктором осложнений атеротромбоза, чем традиционные клинические и биохимические.

Диагностическая значимость Д-димера

Д-димер является высокочувствительным маркером венозных тромбозов. Благодаря разработке экспресс методов анализа, приближающихся по чувствительности к 100%, определение Д-димера стало первым шагом в алгоритме диагностики ТГВ/ТЭЛА. При нормальном уровне Д-димера и невысокой клинической вероятности диагноз исключается, а при повышенном Д-димере больному проводятся дальнейшие исследования [12-13]. Анализ большого числа наблюдений показал, что вероятность не выявления ТГВ при таком подходе очень низкая (табл. 5), и он позволяет на ~30% снизить назначение инструментальных исследований.

При высокой чувствительности теста его специфичность как маркера ТГВ не превышает 50%. Это обусловлено тем, что свертывание крови повышается при многих заболеваниях, а также с возрастом, у лежачих больных, при травмах и у беременных. Ещё одним важным фактором, который ограничивает значимость определения

Таблица 5

Осложнения в течение 3-х месяцев у больных с подозрением на тромбоз глубоких вен нижних конечностей и нормальным уровнем Д-димера, которым дальнейшее обследование не проводилось и антикоагулянты не назначались

(ten Cate-Hoek A.J., Prins M.H., 2005)

Метод определения Д-димера	Клиническая вероятность	Эпизоды ТГВ / Кол-во больных	Риск ТГВ (95% ДИ)
Качественный	Низкая	3/712	0,42 (0,1-1,2)
Качественный или количественный	Низкая	5/534	0,94 (0,3-2,2)
Количественный	Низкая + средняя	2/958	0,21 (0-0,83)

Д-димера, является «возраст тромба». При длительности симптомов более 2 недель чувствительность Д-димера как маркера ТГВ снижается [14].

Снижение чувствительности Д-димера с увеличением «возраста» тромба, а также то, что его специфичность как маркера ТГВ не превышает 50%, на наш взгляд является косвенным подтверждением того, что Д-димер является в первую очередь маркером гиперактивации свертывания крови. Это согласуется с данными исследования FАСТ, в котором электрофоретический анализ показал, что в плазме больных ТГВ большая часть производных фибриногена, реагирующих с антителами к Д-димеру, имеет мол. массу выше, чем фибриноген. Если это так, то не может ли уровень Д-димера быть критерием, определяющим необходимость назначения или продолжения антикоагулянтной терапии?

Ответить на этот вопрос должно было многоцентровое исследование PROLONG, первая фаза которого завершилась, но его решено было продолжить, т.к. результаты оказались несколько неожиданными [15]. В этом исследовании, как и в ряде других, у больных ТГВ/ТЭЛА, получавших антагонисты витамина (АВК) в течение

≥3 месяцев, уровень Д-димера, определенный через 1 месяц после прекращения лечения варфарином, оказался предиктором ретромбозов. Больные с повышенным Д-димером рандомизировались в две подгруппы — возобновления лечения АВК и контрольную. В подгруппе больных с повышенным Д-димером, которым возобновили терапию АВК, суммарная частота осложнений (ретромбозы + кровотечения) оказалась значительно ниже, чем в контрольной подгруппе (2 против 10,9 на 100 человеко-лет), и даже несколько ниже, чем у больных с нормальным Д-димером, у которых частота ретромбозов составила 4,4 на 100 человеко-лет (рис. 4). Таким образом, результаты первой фазы исследования показали, что больным с повышенным Д-димером целесообразно возобновить лечение АВК. Однако из-за относительно высокой частоты ретромбозов у больных с нормальным Д-димером этот показатель не может служить критерием оптимизации дальнейшего лечения. Авторы предположили, что однократное определение Д-димера недостаточно информативно и исследование решено было продолжить, включив в него периодическое измерение Д-димера после прекращения первого курса лечения АВК.

Таблица 6

Связь факторов свертывания и маркеров воспаления с риском ИБС (M.Woodward et al., 2007)

Маркер	ОР при сравнении 1 и 3 терцилей значений показателя (однофакторный анализ)	ОР при сравнении 1 и 3 терцилей значений показателя (многофакторный анализ)
С-реактивный белок	2,9 (p=0,0005)	1,96 (p=0,1)
Фибриноген	1,79 (p=0,006)	0,62 (p=0,29)
Фактор фон Виллебранда	1,69 (p=0,02)	1,24 (p=0,57)
Интерлейкин-6	2,84 (p<0,0001)	2,79 (p=0,03)
Д-димер	3,52 (p<0,0001)	3,1 (p=0,01)
ТАП	2,76 (p<0,0001)	1,1 (p=0,81)
Лп(а)	1,51 (p=0,03)	1,03 (p=0,95)



Рисунок 4. Д-димер и риск осложнений у больных, получавших АВК после 1-го эпизода не спровоцированной ТГВ/ТЭЛА, рандомизированных в группы возобновления лечения и контроля (по материалам исследования Palareti G. et al., 2006).
АВК — антагонисты витамина К.

Тромбоз является основной причиной развития осложнений атеросклероза. Неудивительно, что Д-димер проявил себя как независимый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний в ряде проспективных исследований. В таблице 6 представлены данные одного из популяционных исследований, в котором наряду с традиционными клиническими и биохимическими факторами риска, анализировалась значимость факторов свертывания крови и маркеров воспаления. Примечательно, что при включении в многофакторный анализ всех исследованных показателей независимыми предикторами ИБС оказались Д-димер и интерлейкин-6.

Скрининговые тесты и контроль антикоагулянтной терапии

Нарушения системы гемостаза по клиническим проявлениям могут быть отнесены к трем вариантам: тромбозы, кровотечения и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС). Лабораторные исследования призваны выявить по возможности причины этих заболеваний, определить степень функциональных нарушений и обеспечить контроль терапии выявленных нарушений. Лабораторные тесты должны иметь установленные:

- чувствительность и специфичность;
- метод калибровки (стандартизации);
- систему контроля качества.

Алгоритм диагностики нарушений гемостатических функций должен строиться стандартно — от скрининговых тестов (табл. 7) к специальным. Активация свертывания крови является сложным многофакторным процессом, но благодаря наличию определенной последовательности реакций активации можно, используя всего 3 лабораторных теста — ПТ, АЧТВ и фибриноген, выявить клинически значимые нарушения свертываемости крови, если они обусловлены дефицитом плазменных компонентов этой системы. Исключение составляют ФХIII и фактора фон Виллебранда, если его аномалия не является причиной дефицита ФVIII. Необходимость выполнения других скрининговых тестов и алгоритм дальнейших исследований определяется результатами этих анализов и предполагаемым диагнозом.

Подчеркнем две важные особенности ПТ-теста и АЧТВ:

1. Они выполняются при добавлении избытка активаторов.
2. Регистрируют начальную фазу образования тромбина.

Таблица 7

Диагностика нарушений гемостатических функций: скрининговые тесты

ОСНОВНЫЕ ТЕСТЫ
Протромбиновый тест
Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время
Фибриноген
Д-димер
Фактор фон Виллебранда
Тромбиновое (рептилазное) время
НЕ СТАНДАРТИЗИРОВАННЫЕ ТЕСТЫ
Время свертывания крови
Каолиновое и кефалиновое время
Тромбоэластография
Время лизиса эуглобулинов
Время кровотечения
Агрегация тромбоцитов

Поэтому они позволяют выявить дефицит факторов и контролировать антикоагулянтную терапию, но мало информативны для выявления гиперкоагуляции. Реактивы содержат избыток фосфолипидов. Поэтому прием больными препаратов, ингибирующих активацию тромбоцитов, не влияет на результат ПТ-теста и АЧТВ, даже если они выполняются на цельной крови.

Такие тесты как время свертывания, каолиновое и кефалиновое время, а также тромбоэластография зависят от тех же факторов, что и 3 первых теста, но не стандартизованы. Время лизиса эуглобулинов, время кровотечения и агрегация тромбоцитов могут дать дополнительную информацию, но сложности стандартизации и отсутствие надежной системы контроля качества ограничивает их диагностическую значимость.

Агрегация тромбоцитов

Наиболее распространенным методом исследования функциональной активности тромбоцитов является оптическая агрегатометрия. Тест с успехом применяется для выявления тромбоцитопатии (синдром Бернара-Сулье, тромбоастения Гланцманна) и определения фактора фон Виллебранда по индуцированной ристомидином агрегации фиксированных тромбоцитов. Значимость агрегатометрии в оценке риска тромбозов и контроле антитромботической терапии пока не установлена. Среди многих причин, которые могут ограничивать возможности агрегатометрии, отметим на наш взгляд главные:

- зависимость от преаналитических условий;
- разнообразие приборов и методик;
- отсутствие системы контроля качества;
- тест не отражает образование тромбина — ключевого фермента, определяющего стабильность тромбов.

Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время

В этом тесте активируется «внутренний» путь свертывания крови, который зависит от



Рисунок 5. Факторы и реакции, активирующиеся в АЧТВ и протромбиновом тесте. ПТ-тест зависит от факторов VII, X, V, II и фибриногена. Из-за использования высокой концентрации тромбопластина начальная активация фактора X и протромбина обеспечивается практически полностью комплексом фактор VII-ТФ. АЧТВ зависит от всех плазменных факторов свертывания за исключением факторов VII и XIII. Реакцией, лимитирующей скорость, является активация фактора VIII, которая контролируется антитромбином.

всех плазменных факторов свертывания за исключением ФVII и XIII (рис. 5). Лимитирующей скоростью реакции является активация тромбином ФVIII. Эта реакция контролируется антитромбином и зависит от присутствия гепарина. Поэтому АЧТВ используется как для выявления дефицита факторов, так и для контроля терапии нефракционированным гепарином (НФГ). Результат теста обычно представляют в виде секунд свертывания с указанием диапазона нормальных значений, или отношения — время свертывания плазмы больного, деленное на время свертывания нормальной плазмы.

Время забора крови для определения уровня гепарина зависит от способа введения. При перфузионном введении кровь может забираться в любое время, при внутривенном введении — за 1 час до следующей инъекции, а при подкожном — между двумя инъекциями. В дополнение к АЧТВ необходимо периодически контролировать уровень тромбоцитов во избежание развития индуцированной гепарином тромбоцитопении.

В течение длительного времени считалось общепринятым, что терапевтическому уровню антикоагуляции НФГ (0,3-0,7 анти-Ха Ед/мл) соответствует удлинение АЧТВ в 1,5-2,5 раза. Одна-

ко исследования, выполненные в последние годы, показали, что современные реактивы имеют высокую чувствительность к гепарину и верхняя граница терапевтической области для некоторых из них может соответствовать 6-ти кратному удлинению АЧТВ. Поэтому Американская коллегия торакальных врачей рекомендует лабораториям самостоятельно установить терапевтическую область, определив АЧТВ для плазм, содержащих 0,3 и 0,7 анти-Ха Ед/мл НФГ [17].

Следует отметить, что кроме универсальных реактивов ряд фирм выпускают реактивы специально адаптированные для конкретных задач — контроля терапии НФГ, или выявления волчаночных антикоагулянтов.

Недостатком АЧТВ, как метода контроля терапии НФГ, является зависимость теста от многих факторов. Дефицит факторов свертывания, антитромбина, или повышенный уровень продуктов деградации фибриногена (например, при синдроме ДВС) увеличивает чувствительность теста, а повышенный уровень фибриногена, фактора VIII и активация тромбоцитов ее снижают. Более точный мониторинг терапии гепаринами обеспечивает определение анти-Ха активности, на которое перечисленные выше факторы не влияют.

Анти-Ха активность

В этом тесте исследуемая плазма предварительно инкубируется с фактором Ха в присутствии экзогенного антитромбина, затем остаточная активность фактора Ха измеряется в клоттинговом или хромогенном тесте. Этот метод может использоваться и для контроля терапии низкомолекулярными гепаринами (НМГ).

Контроль терапии низкомолекулярными гепаринами

Благодаря высокой биодоступности применение НМГ обычно не требует лабораторного контроля. Исключение составляют младенцы, беременные, больные с избыточной массой тела (≥ 150 кг) и нарушением почечной функции (клиренс креатинина < 30 мл/мин) при назначении

терапевтических доз. В этих случаях во избежание накопления НМГ рекомендуется определять уровень анти-Ха активности в точке, соответствующей пику абсорбции применяемого препарата. Вероятность развития тромбоцитопении при лечении НМГ ниже, чем при НФГ, но для повышения безопасности терапии необходимо периодически контролировать уровень тромбоцитов.

Протромбиновый тест

В ПТ-тесте активируются реакции «внешнего» пути свертывания крови (рис. 5). Тест зависит от 5-ти факторов, 3 из которых являются витамин К-зависимыми. Это определило его место в диагностике — выявление дефицита факторов VII, X, V, II и фибриногена и контроль терапии АВК. Реактивом является частично очищенный экстракт ткани мозга (тромбопластин), содержащий тканевой фактор и фосфолипиды. Он должен содержать добавки, инактивирующие терапевтические дозы гепарина, т.к. нередко ситуации, когда подбор дозы АВК осуществляется на фоне терапии гепарином.

Особенностью ПТ-теста является необходимость использования двух систем калибровки и представления результатов — % протромбина по Квику и Международного Нормализованного Отношения (МНО), а контроль качества должен обязательно включать образцы с патологическим уровнем значений. Вероятность выявления систематической ошибки в вычислении МНО будет больше при использовании патологической плазмы, чем нормальной. Желательно использовать контрольные образцы со значениями вблизи верхней и нижней границ терапевтической области (40-20% – ПТ, МНО 2-3,5).

Калибровка по методу Квика основана на определении времени свертывания серии разведений пула плазм крови доноров, в котором активность факторов протромбинового комплекса принимается за 100%. Представление результата ПТ-теста в виде % от нормы используется при подозрении на дефицит факторов и для мониторинга коагулопатии потребления. Нормальные значения составляют $\geq 70\%$. Патологическая

значимость величины, превышающей 100%, не установлена.

Другой метод калибровки — система МНО — заключается в определении международного индекса чувствительности тромбопластина (МИЧ), который вычисляется по отношению к первичному стандарту, чувствительность которого была принята за 1. Этот метод калибровки основан на наличии линейной зависимости между логарифмами протромбинового времени, измеренного с разными тромбопластинами, у больных, находящихся в стабильной фазе терапии АВК. Это позволяет с помощью возведения в степень равную значению МИЧ скорректировать различия в определении протромбинового отношения, обусловленные использованием разных тромбопластинов.

$$МНО = \left[\frac{\text{протромбиновое время больного}}{\text{среднее нормальное протромбиновое время}} \right]^{\text{МИЧ}}$$

Наиболее вероятной причиной систематических отклонений вычисления МНО является ошибка в определении знаменателя формулы — среднего нормального протромбинового времени. Наибольшей точности определения удастся достичь при использовании в качестве этого показателя среднего геометрического протромбинового времени плазм как минимум 20 здоровых доноров обоих полов и разного возраста. Нередки ситуации, когда вместо этого показателя используется время свертывания пула плазм доноров, или коммерческая «нормальная плазма».

У больных, принимающих АВК, МНО необходимо определять:

- ежедневно, начиная со 2-3 дня приема до стабилизации показателя: пока не будут получены близкие значения 2-х смежных определений, соответствующие терапевтической области;
- 2-3 раза в неделю в течение первых 2 недель;
- не менее 1 раза в месяц, если не меняется доза АВК, или сопутствующая терапия;
- через 1 неделю после перехода на новую партию препарата.

Для помощи в подборе дозы АВК разработано несколько компьютерных программ, одна из них находится в свободном доступе по адресу: www.warfarindosing.org.

Внедрение системы МНО, которая специально разрабатывалась для обеспечения контроля терапии АВК, значительно повысило сопоставимость результатов определений, выполненных в разных лабораториях, или с разными тромбопластинами. Однако необходимо помнить, что значения МНО, определенные с разными тромбопластинами, в первые дни лечения, т.е. до стабилизации показателя, или при превышении МНО >4,5, т.е. за пределами калибровки, могут существенно различаться.

Определение протромбина в капиллярной крови. Использование капиллярной крови для анализа представляется привлекательным, т.к. не требует пункции вены, однако при кажущейся простоте, в действительности сопряжено с рядом проблем.

Первая заключается в большей вероятности активации свертывания при заборе капиллярной крови. Кровь, проходя через поврежденную ткань, контактирует с тромбогенной поверхностью и может активироваться. Это увеличивает вероятность преданалитической ошибки. Поэтому продолжительность забора капиллярной крови является критически важной для качества определения. В капилляре кровь с антикоагулянтом практически не перемешивается, поэтому предварительный забор цитрата в капиллярную проблему не решает.

Вторая связана с влиянием величины гематокрита на результат теста. При внесении пипеткой стандартного объема цельной крови объем плазмы и, следовательно, концентрация факторов в реакционной смеси будет зависеть от величины гематокрита. Подчеркнем, что коррекция объема цитрата в зависимости от уровня гематокрита обеспечивает только сохранение стандартного соотношения между антикоагулянтом и плазмой. На объем плазмы в аликвоте крови эта коррекция не влияет.

Определение протромбина в капиллярной крови возможно с применением комбинированных реактивов, в состав которых кроме

тромбопластина входит фибриноген и фактор V. Эти добавки обеспечивают возможность определения с использованием всего 10-20 мкл капиллярной крови. Такой реактив должен быть прекалиброван и содержать номограмму для коррекции влияния гематокрита на результат теста. В домашних условиях определение протромбина возможно с использованием портативных приборов, которые снабжаются прекалиброванными картриджами.

Фибриноген

Определение Фг должно входить в число скрининговых методов, т.к. он является:

- фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний;
- белком острой фазы;
- маркером развития коагулопатии потребления.

Наиболее часто для определения фибриногена используется метод Клаусса. В некоторых моделях автоматических анализаторов предусмотрена возможность определения Фг параллельно с определением протромбина, АЧТВ, или тромбинового времени по величине светорассеяния после образования сгустка. На биохимических анализаторах определение возможно с применением «кинетического» метода с рептилазой, или иммунологических.

Литература

1. Бутенас С., Манн К.Г. Свертывание крови (обзор). Биохимия 2002, 67, 5-15.
2. Spronk H., Govers-Riemsag J.W.P., ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. BioEssays 2003; 25: 1220-1228.
3. Crawley J.T.B., Zanardelli S., Chion C.K.N.K., Lane D.A. The central role of thrombin in hemostasis. J Thromb Haemost 2007; 5 (suppl. 1): 95-101.
4. Nicolaidis A.N., Breddin H.K., Carpentier P, et al. Thrombophilia and venous thromboembolism. International consensus statement. Int Angiol 2005; 24: 1-26.
5. Folsom A.R. Hemostatic risk factors for atherothrombotic disease: An epidemiologic view. Thromb Haemost 2001; 86: 366-373.
6. Казан-Пономарев М.Я., Добровольский А.Б., Староверов И.И. и соавт. Коагулологические особенности у больных инфарктом миокарда при раннем спонтанном и медикаментозном восстановлении коронарного кровотока. Кардиология 1994; №11: 4-10.
7. Juhan-Vague I., Alessi M-C., Mavri A., Morange P.E. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. J Thromb Haemost 2003; 1: 1575-1579.
8. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. Am Heart J 2003; 146: 948-57.
9. Ye Z, Liu EHC, Higgins JPT, Keavney BD, Lowe GDO, Collins R, Danesh J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66 155 cases and 91 307 controls. The Lancet 2006; 367: 651-658.
10. Slooter AJC, Rosendaal FR, Tanis BC, Kemmeren JM, van der Graaf Y, Algra A. Prothrombotic conditions, oral contraceptives, and the risk of ischemic stroke. J Thromb Haemost 2005; 3: 1213-1217.
11. Dempfle C.-A., Zips S., Ergül H., Heene D.L. and the FACT study group. The fibrin assay comparison trial (FACT). Evaluation of 23 quantitative D-dimer assays as basis for the development of D-dimer calibrators. Thromb Haemost 2001; 85: 671-678.
12. ten Cate-Hoek AJ, Prins MH. Management studies using a combination of D-dimer test result and clinical probability to rule out venous thromboembolism: a systematic review. J Thromb Haemost 2005; 3: 2465-2470.
13. Righini M, Perrier A, De Moerloose P, Bounameaux H. D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. J Thromb Haemost 2008; 6: 1059-1071.
14. de Bastos MRD, Bogutchi T, Carneiro-Proietti ABF, Rezende SM. Duration of symptoms and D-dimer testing in the ruling-out of venous thromboembolism. J Thromb Haemost 2006; 4: 2079-2080.

15. *Palareti G, Cosmi B, Legnani C, Tosetto A, et al.* for the PROLONG Investigators. D-dimer testing to determine the duration of anticoagulation therapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 1780-1789.
16. *Woodward M, Rumley A, Welsh P, MacMahon S, Lowe G.* A comparison of the associations between seven hemostatic or inflammatory variables and coronary heart disease. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1795-1800.
17. *Hirsh J, Bauer K, Donati M.B., Gould M., Samama M.M., Weitz J.I.* Parenteral anticoagulants: American College Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th edition). *Chest* 2008; 133: 141-159.