

**Федеральное медико-биологическое агентство  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии  
Федерального медико-биологического агентства»**

**Алгоритм диагностики гемостаза и мониторинг антитромботической терапии**

Методические рекомендации

Санкт-Петербург

2016

## Предисловие

Методические рекомендации посвящены интегральной оценке функционального состояния системы гемостаза с помощью теста генерации тромбина. Представленная постановка теста генерации тромбина в отличие от общепринятых в клинической практике методов исследования гемостаза позволяет дать количественную характеристику образования тромбина в целом с учетом взаимодействия прокоагулянтных и антикоагулянтных компонентов. Предлагаемый диагностический подход важен для выявления ранних признаков активации гемостаза, что может быть использовано с целью прогнозирования тромбоэмболических осложнений, а также при коррекции схем лечения или/и профилактики тромботических осложнений.

Предназначены для специалистов, занимающихся лабораторной диагностикой нарушений системы гемостаза и их осложнений, а также для гематологов, хирургов, кардиологов, неврологов, терапевтов и врачей других специальностей.

Область применения: гематология, кардиология, хирургия, акушерство, онкология.

**Авторы:** Л.П. Папаян, О.Г. Головина, А.В. Чечеткин, С.С. Бессмельцев, С.И. Капустин, В.Д. Каргин, В.М. Шмелева, О.Ю. Матвиенко, О.А. Смирнова, Ю.А. Наместников

**Рецензенты:** доктор медицинских наук, профессор Н.Н. Петрищев  
доктор медицинских наук, профессор, засл. врач РФ И.Г. Дуткевич

**Организация разработчик:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

Утверждены заместителем руководителя Федерального медико-биологического агентства Е.Ю. Хавкиной 22.10.2015, Рег. №51-2015

## Содержание

Введение .....	4
Обозначения и сокращения .....	7
Основные нормативные положения .....	8
1 Методика проведения исследования .....	8
1.1 Материалы исследования .....	8
1.2 Оборудование и расходные материалы .....	8
1.3 Реактивы .....	8
1.4 Выполнение исследования .....	9
1.5 Оценка результатов исследования .....	11
Заключение .....	13
Приложение А. Эффективность использования методики .....	14
Библиография .....	20

## Введение

Значимость лабораторной оценки состояния системы свертывания крови в современной клинической практике сложно переоценить. Основная причина этого заключается в важнейшей патофизиологической роли, которую играет гемостатический баланс в развитии осложнений различных заболеваний. Проявлениями его являются либо геморрагические, либо тромбоземболические осложнения, в том числе и на микроциркуляторном уровне, приводящие к нарушениям функционирования пораженного органа, системы органов или организма в целом. Коррекция изменений гемостаза лежит в основе успеха патогенетической терапии и профилактики осложнений, возникающих в результате многих заболеваний. Без общего представления о функциональном состоянии системы свертывания крови во время болезни, а главное – влияния на нее проводимой терапии, невозможна эффективная коррекция выявленных изменений.

Сегодня на первое место среди причин смертности выступают заболевания, в патогенезе которых большую роль играет состояние гиперкоагуляции. Поэтому, особенно важным представляется выявление признаков активации гемостаза при различных заболеваниях [1].

К сожалению, большинство существующих методов лабораторной оценки гемостаза нечувствительны к выявлению гиперкоагуляции, что диктует необходимость включения в общепринятый алгоритм оценки гемостаза новых информативных методов обследования. Подтверждением сказанному являются следующие данные. Так, результаты, рутинно используемых коагуляционных тестов определения активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) и протромбинового теста (ПТ), чаще всего остаются неизменными даже при развитии тромбоза [2]. Исследование отдельных факторов: концентрации фибриногена, активности факторов VIII и Виллебранда, а также активности естественных антикоагулянтов (антитромбина, протеинов С и S) может выявить отклонения от референтного интервала, но не позволит судить о наличии гиперкоагуляции в целом. Объясняется это тем, что изменения отдельных компонентов свертывающей системы крови могут быть нивелированы в организме включением компенсаторных механизмов [3]. Исследование таких маркеров активации гемостаза, как уровень D-димера, ТАТ-комплексов, фрагментов протромбина F1+2 дают лишь косвенную оценку тромбоземии.

Получая результаты большого количества лабораторных исследований гемостаза, клиницист, к сожалению, вместо ответа на вопрос о том, в каком состоянии у пациента в

данный момент времени находится система свертывания крови, сталкивается с вопросом: «как же соотнести показатели между собой? Будет ли в результате их взаимодействия смещен гемостатический баланс в сторону гиперкоагуляции или нет?». Для широкой клинической практики наряду с общепринятыми методами исследования коагуляционного звена гемостаза важными представляются данные интегральных тестов, которые отражают функциональное состояние системы гемостаза в целом с учетом взаимодействия всех ее составляющих.

Одним из таких методов, является тест генерации тромбина (ТГТ), который позволяет оценить динамику образования и инактивации ключевого энзима гемостаза – тромбина. Показатели ТГТ отражают функциональное состояние гемостаза в целом, возникающее при взаимодействии между собой как про-, так и антикоагулянтных факторов [4, 5].

Не менее важна для клинициста проблема, связанная с мониторингом антикоагулянтной терапии. Например, у пациентов, получающих варфарин, руководствуются правилом достижения целевого значения МНО, при котором терапия считается адекватной. Но, как показывает практика, клинический эффект при достижении одного и того же целевого значения МНО может значительно отличаться у разных больных. Существует мнение, что в отличие от варфарина мониторинг терапии низкомолекулярными гепаринами (НМГ) не обязателен по причине линейной зависимости влияния их на активный фактор X. Мониторинг в случае необходимости предлагается проводить по изменению анти-Ха активности, то есть по изменению активности только одного фактора. Но, как показали исследования Al Diegi и соавт. [6], при назначении одинаковых доз низкомолекулярного гепарина даже здоровым лицам недостаточный антикоагулянтный эффект наблюдался в 13% случаях, а передозировка – в 11%. Эта работа демонстрирует неправомочность суждения о гемостазе в целом по изменению всего лишь одного показателя, в данном случае по анти-Ха-активности.

В настоящих методических рекомендациях описана последовательность процедуры исследования теста генерации тромбина, интегрального метода оценки состояния системы гемостаза с учетом про- и антикоагулянтных механизмов.

## Обозначения и сокращения

АПТВ	– активированное парциальное тромбопластиновое время
КОК	– комбинированные оральные контрацептивы
ПТ	– протромбиновый тест
ТГТ	– тест генерации тромбина
ЕТР	– эндогенный тромбиновый потенциал
Lag time	– время инициации свертывания
Peak thrombin	– максимальное количество тромбина
PPP	– бедная тромбоцитами плазма
rh-TF	– рекомбинантный человеческий тканевой фактор
rh-TM	– рекомбинантный человеческий тромбомодулин
TM	– тромбомодулин
ttPeak	– время достижения пика

## Основные нормативные положения

### 1 Методика проведения исследования

#### 1.1 Материалы исследования

Анализ проводят на образцах плазмы, полученной из кубитальной вены самотеком в пробирки типа Vacuett, содержащие 3,2% раствор цитрата натрия основного в молярной концентрации 0,109, при соотношении антикоагулянта и крови 1:9. Кровь центрифугируют при комнатной температуре в два этапа: после 10 минут при 130g отбирают полученную плазму и центрифугируют вторично 30 минут при 2500g. После этого полученные образцы аликвотируют и хранят при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  до момента проведения исследования.

#### 1.2 Оборудование и расходные материалы

Иглы инъекционные диаметром 0,9 мм.

Перчатки резиновые хирургические.

Вакуумные пробирки типа Vacuett.

Полипропиленовые центрифужные пластиковые пробирки объемом 12 мл.

Дозаторы пипеточные переменного объема одноканальные (типа Биохит, Финляндия) со сменными наконечниками (5 – 1000 мкл, допустимая погрешность до 2,5%).

Центрифуга лабораторная настольная, поддерживающая режим центрифугирования в 130 и 2500g.

Пробирки пластиковые типа Эппендорф объемом 1,5 мл.

Лабораторный холодильник с морозильной камерой, обеспечивающей поддержание температуры  $-70^{\circ}\text{C}$ .

96-луночный планшет типа Immulon 2НВ производства «ТермоФишер Саентифик», США.

Планшетный флуориметр, оборудованный диспенсером, типа Флуроскан Асцент производства ТермоФишер Саентифик, Финляндия (с прилагаемым программным обеспечением Thrombinoscope<sup>®</sup>, версия 3.0.0.26.). Длина волны экстинкции составляет 390 нм, эмиссии – 460 нм.

#### 1.3 Реактивы

Выполнение теста генерации тромбина осуществляют с использованием следующих реактивов производства «Thrombinoscope bv», Нидерланды:

триггерный реагент «PPP-Reagent-TM» – смесь рекомбинантного человеческого тканевого фактора (th-TF) и отрицательно заряженных прокагулянтных фосфолипидов

(фосфатидилсерина 20%, фосфатидилэтаноламина 20% и фосфатидилхолина 60%) в конечной концентрации 5 пМоль и 4 мМоль, соответственно;

триггерный реагент «PPP-Reagent +TM» с добавлением рекомбинантного человеческого тромбомодулина (rh-TM);

«Thrombin Calibrator» – тромбиновый калибратор (синтетический аналог тромбина с заведомо известной активностью, высокоспецифичный к добавляемому в реакционную смесь субстрату);

«Fluo-Substrate» – специфичный тромбину, медленно реагирующий флюорогенный субстрат;

«Fluo-Buffer», содержащий хлорид кальция.

В качестве контрольного материала используется аликвотированная пулированная плазма от 20 здоровых доноров, полученная в аналогичных условиях.

#### 1.4 Выполнение исследования

Перед началом работы во флаконы с триггерными реагентами и калибратором добавляют по 1 мл дистиллированной воды и выдерживают 30 минут. Образцы плазмы размораживают, постановку осуществляют в дублях.

В первые две лунки горизонтального ряда планшета помещают по 20 мкл раствора триггерного реагента, не содержащего тромбомодулин (rh-TM -), в соседние две лунки – по 20 мкл раствора триггерного реагента с тромбомодулином (rh-TM +), и в следующие две лунки – по 20 мкл раствора тромбинового калибратора (Cal) (рисунок 1).

rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal
rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal	rh-TM -	rh-TM -	rh-TM +	rh-TM +	Cal	Cal

Рисунок 1 – Расположение реактивов в 96-луночном планшете



После этого в лунки с триггерными реагентами и калибратором добавляют по 80 мкл исследуемой плазмы (в исследовании одного образца плазмы задействованы 6 лунок) в соответствии с протоколом исследования, созданным с помощью программного обеспечения. Таким образом, за одну постановку выполняется исследование 15 плазм и 1 контрольного материала (рисунок 2).

Обра зец 1	Обра зец 1	Обра зец 1	Обра зец 1	Обра зец 1	Обра зец 1	Обра зец 9	Обра зец 9	Обра зец 9	Обра зец 9	Обра зец 9	Обра зец 9
Обра зец 2	Обра зец 2	Обра зец 2	Обра зец 2	Обра зец 2	Обра зец 2	Обра зец 10	Обра зец 10	Обра зец 10	Обра зец 10	Обра зец 10	Обра зец 10
Обра зец 3	Обра зец 3	Обра зец 3	Обра зец 3	Обра зец 3	Обра зец 3	Обра зец 11	Обра зец 11	Обра зец 11	Обра зец 11	Обра зец 11	Обра зец 11
Обра зец 4	Обра зец 4	Обра зец 4	Обра зец 4	Обра зец 4	Обра зец 4	Обра зец 12	Обра зец 12	Обра зец 12	Обра зец 12	Обра зец 12	Обра зец 12
Обра зец 5	Обра зец 5	Обра зец 5	Обра зец 5	Обра зец 5	Обра зец 5	Обра зец 13	Обра зец 13	Обра зец 13	Обра зец 13	Обра зец 13	Обра зец 13
Обра зец 6	Обра зец 6	Обра зец 6	Обра зец 6	Обра зец 6	Обра зец 6	Обра зец 14	Обра зец 14	Обра зец 14	Обра зец 14	Обра зец 14	Обра зец 14
Обра зец 7	Обра зец 7	Обра зец 7	Обра зец 7	Обра зец 7	Обра зец 7	Обра зец 15	Обра зец 15	Обра зец 15	Обра зец 15	Обра зец 15	Обра зец 15
Обра зец 8	Обра зец 8	Обра зец 8	Обра зец 8	Обра зец 8	Обра зец 8	Конт роль	Конт роль	Конт роль	Конт роль	Конт роль	Конт роль

Рисунок 2 – Расположение исследуемых плазм в 96-луночном планшете

Подготовленный планшет с исследуемыми плазмами загружается в прибор и инкубируется 10 минут при 37<sup>0</sup>С. В это время подготавливается смесь из реагентов «Fluo-Buffer» (предварительно прогретого до 37<sup>0</sup>С) и «Fluo-Substrate» в количестве 3200 и 80 мкл соответственно. По окончании инкубации приготовленная смесь автоматически добавляется в каждую лунку планшета с помощью диспенсера, после чего немедленно запускается измерение флюоресценции через 20-секундные интервалы на протяжении всего процесса генерации тромбина. Построение и расчет показателей кривых генерации тромбина производится, исходя из первичных данных изменения флюоресценции во времени, с помощью программного обеспечения Thrombinoscope<sup>®</sup>.

## 1.5 Оценка результатов исследования

После калибровки результатов ТГТ, которая производится автоматически путем сопоставления сигналов, получаемых из лунки с исследуемым образцом и лунки с калибратором, программным обеспечением выстраивается кривая генерации тромбина. Для оценки результатов, отражающих количественные и динамические характеристики генерации тромбина, используют параметры кривой, представленные на рисунке 3.

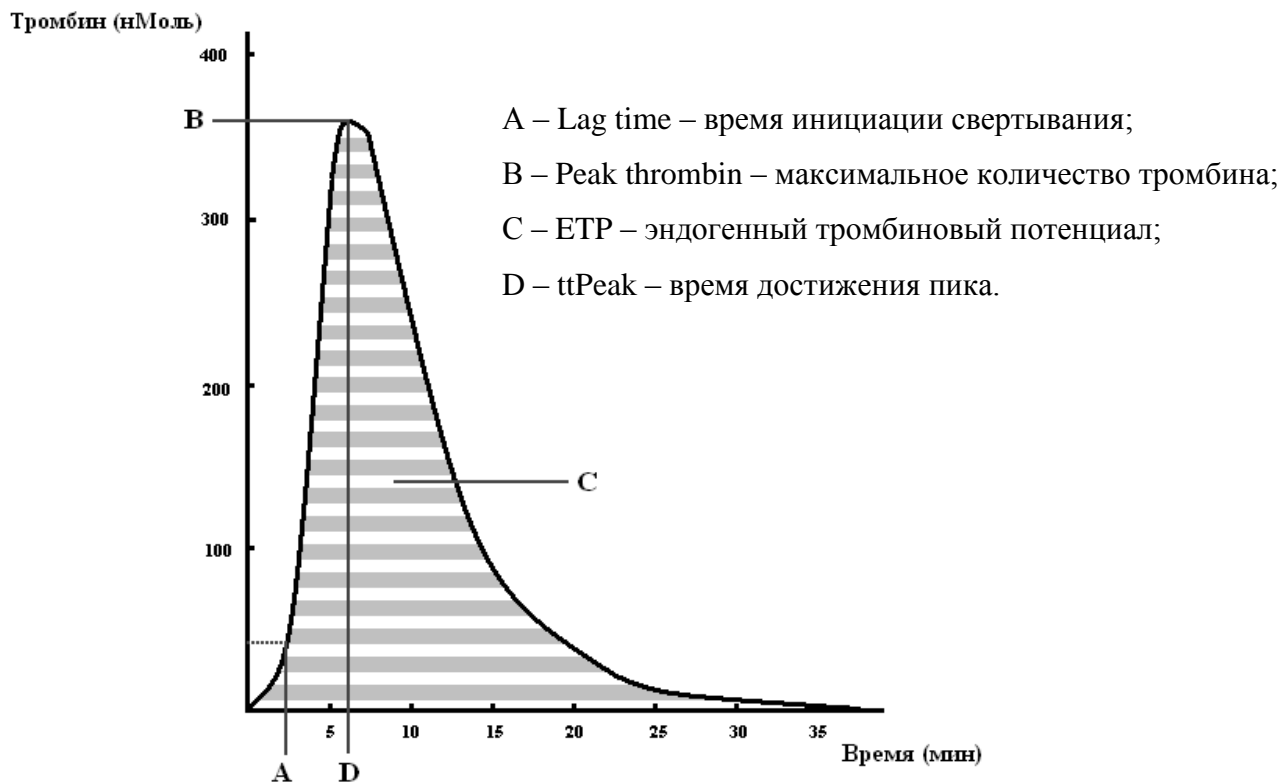


Рисунок 3 – Кривая генерации тромбина и измеряемые параметры

В кривой генерации тромбина оценивают следующие показатели:

Lag time (время запаздывания, мин) – время, измеренное от момента внесения смеси флюорогенного субстрата и ионизированного кальция в лунку с образцом и активатором до момента отклонения флуоресцентного сигнала от основной горизонтальной линии более чем на 2 стандартных отклонения; характеризует начало образования тромбина, достаточного для образования первых нитей фибрина;

Peak thrombin (пиковое количество тромбина, нМоль) – максимальное количество тромбина, образующееся в процессе его генерации в образце плазмы;

Time to peak, обозначаемый как *ttPeak* (время достижения пика, мин), – время, за которое в образце образуется максимальное количество тромбина;

Endogenous thrombin potential, обозначаемый как ЕТР (эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль\*мин), измеряется площадью под кривыми генерации тромбина.

Кроме того, существуют и расчетные показатели, характеризующие процесс генерации тромбина:

Скорость образования тромбина (*V*, нМ/мин) рассчитывается по следующей формуле:

$$V = \frac{Peak}{ttPeak - Lag\ time}$$

Чувствительность к тромбомодулину (%) определяется следующим образом: из значений ЕТР *Peak thrombin*, полученных в постановке без добавления тромбомодулина, вычитается значение ЕТР, и *Peak thrombin* соответственно, полученное в параллельной постановке с добавлением тромбомодулина, и полученная разница делится на значение ЕТР или *Peak thrombin* в постановке без добавления тромбомодулина:

$$\text{Чувствительность к тромбомодулину} = \frac{ETP_{(без\ rh-TM)} - ETP_{(с\ rh-TM)}}{ETP_{(без\ rh-TM)}} \times 100\%$$

$$\text{Чувствительность к тромбомодулину} = \frac{Peak\ thrombin_{(без\ rh-TM)} - Peak\ thrombin_{(с\ rh-TM)}}{Peak\ thrombin_{(без\ rh-TM)}} \times 100\%$$

## Заключение

Тест генерации тромбина, представленный в данных методических рекомендациях, является интегральным методом оценки активации гемостаза. В результате сравнительного анализа результатов исследования генерации тромбина у практически здоровых лиц без тромботических эпизодов в анамнезе (контрольная группа) и пациентов, имеющих предпосылки для развития гиперкоагуляции, установлено, что данный метод в отличие от коагуляционных тестов позволяет оценить степень выраженности активации гемостаза по результатам изменения таких показателей как ЕТР (эндогенный тромбиновый потенциал), Peak thrombin (пик тромбина), а также чувствительности к тромбомодулину.

Эффективность использования в клинической практике описанного в настоящей работе теста генерации тромбина обусловлена тем, что он способствует более четкому выделению групп риска по развитию тромбоэмболических осложнений, а также позволяет оценить индивидуальную чувствительность пациента к препаратам антикоагулянтного действия. Применение предлагаемого методического подхода для мониторинга антитромботической терапии у пациентов, получающих антикоагулянты различного механизма действия, позволит оптимизировать подбор эффективной дозы препарата, что приведет к снижению риска развития геморрагических и тромбоэмболических осложнений.

## Приложение А (рекомендуемое)

### Эффективность использования методики

#### *Показатели теста генерации тромбина у здоровых лиц*

ТГТ, являясь глобальным функциональным методом оценки гемостаза, учитывает взаимодействие между собой не только факторов прокоагулянтной, но и антикоагулянтной направленности. Стандартная постановка ТГТ без добавления rh-TM характеризует гемостаз с учетом влияния только антитромбина, но не оценивает вклад второго по значимости антикоагулянта – системы протеина С. В связи с этим для оценки системы гемостаза в целом мы рекомендуем использовать представленную в настоящих методических рекомендациях модифицированную постановку ТГТ, которая, наряду с определением стандартных показателей генерации тромбина, предусматривает определение чувствительности к тромбомодулину по степени снижения ETP и Peak thrombin в плазме без и с добавлением rh-TM.

Значения референс-диапозона для показателей, характеризующих генерацию тромбина в стандартной постановке без добавления rh-TM и с добавлением rh-TM, получены на плазме крови 89 практически здоровых лиц (52 женщин и 37 мужчин, средний возраст – 36,75 лет) (таблица 1, 2).

Таблица 1 – Пределы нормальных значений показателей ТГТ в стандартной постановке

Показатели ТГТ	Lag time, мин	ETP, нМоль*мин	Peak thrombin, нМоль	ttPeak, мин
Медиана (Me)	2,33	1756,0	293,9	5,03
ДИ, 95%	1,67 – 2,89	1220,6 – 2159,9	198,7 – 376,1	4,03 – 6,39

Таблица 2 – Пределы нормальных значений показателей ETP и Peak thrombin и чувствительности к ТМ (Me, 95% ДИ)

ETP, нМоль* мин	ETP с rh-TM, нМоль* мин	Чувствительность к ТМ (снижение ETP при добавлении rh-TM), %	Peak thrombin, нМоль	Peak thrombin с rh-TM, нМоль	Чувствительность к ТМ (снижение Peak thrombin при добавлении rh-TM), %
1756,0	878,0	51,5	293,9	174,5	35,8
1220,6-2159,9	538,8-1381,0	22,9-64,4	198,7-376,1	113,8-310,0	14,8-53,1

“– rh-TM” – постановка ТГТ без добавления ТМ, “+ rh-TM” – постановка ТГТ с добавлением ТМ

Снижение показателей ЕТР менее чем на 23%, и Peak thrombin менее чем на 15% при постановке ТГТ с rh-ТМ расценивается как признак недостаточной чувствительности системы гемостаза к добавляемому ТМ, которая может быть в результате APC-резистентности как врожденного, так и приобретенного характера. Снижение чувствительности к тромбомодулину, в свою очередь, ведет к развитию гиперкоагуляции и повышает риск развития тромбоэмболических осложнений.

*Чувствительность теста генерации тромбина к выявлению гиперкоагуляции*

Для оценки чувствительности теста генерации тромбина к выявлению гиперкоагуляции была обследована плазма крови 34 женщин, принимающих КОК, которые, как известно, вызывают развитие гиперкоагуляционного состояния, ассоциированного с повышенным риском венозного тромбоэмболизма. В качестве контрольной группы обследованы 28 женщин, не принимавших КОК. Использовали модифицированную методику постановки теста с добавлением rh-ТМ. Результаты исследования приведены в таблице 3. Как видно из таблицы, показатели ТГТ – ЕТР и Peak thrombin – в группе женщин, принимающих КОК, были достоверно выше, чем в контрольной группе, не принимавших КОК, причем как в постановке без добавления, так и с добавлением rh-ТМ ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3 – Показатели теста генерации тромбина у женщин, принимающих комбинированные оральные контрацептивы, в постановке без и с добавлением тромбомодулина

Показатели	Контрольная группа (n=28)	Женщины на фоне приема КОК (n=34)
ЕТР–rh-ТМ, нМоль*мин	1756,0 (1220,6 – 2159,9)	2007,75* (1461,88-2845,50)
ЕТР+ rh-ТМ, нМоль*мин	878,0 (538,8 – 1381,0)	1178,50* (657,75-1975,63)
Реак thrombin –rh-ТМ, нМоль	293,9 (198,7 – 376,1)	388,57* (280,67-501,87)
Реак thrombin +rh-ТМ, нМоль	174,5 (113,8 – 310,0)	246,88* (141,11-377,60)
Чувствительность к ТМ по показателю ЕТР, %	51,5 (22,9-64,4)	42,35* (26,35-60,34)
Чувствительность к ТМ по показателю Peak thrombin, %	35,8 (14,8 – 53,1)	35,48 (21,32-54,07)

\*  $p < 0,05$

Анализ частоты встречаемости снижения чувствительности к ТМ в зависимости от результатов определения ЕТР и Peak thrombin выявил некоторые особенности (таблица 4). Снижение чувствительности к ТМ было установлено в 15% случаев при нормальном показателе ЕТР и в 9 % случаев при нормальном показателе Peak thrombin в постановке без ТМ. В 3% случаев снижение чувствительности к ТМ зарегистрировано при нормальном ЕТР в обоих вариантах постановки ТГТ. Снижение чувствительности к ТМ наблюдалось более чем у 40% обследованных женщин, принимающих КОК. Этот факт свидетельствует о воздействии КОК на работу системы протеина С и раскрывает один из механизмов возникновения гиперкоагуляции при гормональной терапии.

Таблица 4 – Частота встречаемости снижения чувствительности к тромбомодулину у женщин, принимающих комбинированные оральные контрацептивы, с различными показателями теста генерации тромбина

Характер изменений показателей	Частота встречаемости снижения чувствительности к тромбомодулину по показателю:	
	ЕТР	Peak thromin
Снижение чувствительности к тромбомодулину во всей группе	41% (14/34)	44% (15/34)
Снижение чувствительности к тромбомодулину в образцах с нормальным значением в постановке без gh-ТМ	15% (5/34)	9% (3/34)
Снижение чувствительности к тромбомодулину в образцах с нормальным значением в обеих постановках: без и с gh-ТМ	3% (1/34)	0% (0/34)

Подобная скрытая гиперкоагуляция, обусловленная нарушениями в системе протеина С, трудно диагностируется. Выявить её возможно только по степени снижения показателей ЕТР и Peak thrombin в ответ на добавление gh-ТМ. Именно такой вариант ТГТ можно рекомендовать как наиболее чувствительный к выявлению гиперкоагуляционного синдрома.

Обращает на себя внимание тот факт, что снижение чувствительности к ТМ, оцененное по Peak thrombin, при нормальном значении в постановке без добавления gh-ТМ выявлено лишь в 9% случаев, против 15% при определении по ЕТР. А снижение

чувствительности к ТМ при нормальном Peak thrombin в обоих вариантах постановки выявлено не было, в то время как по ЕТР это состояние присутствовало в 3% случаев. Из этого можно сделать вывод о большей значимости оценки гиперкоагуляции по показателю ЕТР, как более глобальному, чем по Peak thrombin.

Наряду с исследованием ТГТ в двух вариантах постановки, женщинам, принимавшим КОК, были определены следующие показатели коагулограммы: активированное парциальное тромбопластиновое время, протромбиновый тест по Квику, тромбиновое время, активность фактора свертывания VIII, активность фактора Виллебранда, активность антитромбина и уровень D-димера. Из 23-х обследованных с повышением показателей ЕТР и Peak thrombin увеличение активности фактора VIII наблюдалась у 9% (2/23), фактора Виллебранда у 26% (6/23), снижение активности антитромбина – у 9% (2/23) и повышение уровня D-димера у 35% (8/23) обследованных. Повышение отдельных показателей коагулограммы, свидетельствующих о наличии гиперкоагуляции, без повышения параметров ТГТ, наблюдалось у 9% (3/34) обследованных. При этом в одном случае у обследуемой была незначительно повышена только активность фактора Виллебранда – показателя эндотелиальной дисфункции. Еще в одном случае наблюдалось сочетанное повышение активностей факторов Виллебранда и VIII. В третьем случае имело место повышение активности фактора Виллебранда и незначительное увеличение уровня D-димера.

Повышение количественных показателей ТГТ (ЕТР и/или Peak thrombin) при неизменных показателях коагулограммы наблюдалось у 29% (10/34) женщин, принимавших КОК. Этот факт свидетельствует о том, что, несмотря на отсутствие изменений отдельных параметров коагуляции, гемостатический баланс может быть смещен в сторону гиперкоагуляции. Использование в клинической практике коагуляционных тестов для выявления гиперкоагуляции не позволяет определить наличие данного состояния примерно в 30% случаев. Объясняется это тем, что отдельные параметры коагуляции не отражают общей тенденции гемостаза в формировании тромбина. Отличительной чертой ТГТ, особенно в постановке с ТМ, является оценка генерации тромбина с учетом составляющих, как про-, так и антикоагулянтов, что повышает чувствительность данного метода к выявлению гиперкоагуляции и обосновывает его включение в алгоритм исследования гемостаза.



### *Мониторинг антитромботической терапии*

Мониторинг терапии антикоагулянтами является актуальной клинической задачей. Информативность ТГТ была оценена для мониторинга эффективности терапии антикоагулянтами непрямого действия (варфарином).

С учетом наличия общепринятого стандарта лабораторного контроля терапии антикоагулянтами непрямого действия (АНД) – международного нормализованного отношения (МНО), представлялось целесообразным оценить степень корреляции с ним показателей ТГТ у больных, получающих варфаринотерапию. Все показатели тромбограммы демонстрировали достоверную и значимую корреляцию с МНО. Сильная обратная корреляция отмечалась между МНО и ЕТР ( $r = -0,85$ ,  $p < 0,05$ ), а также между МНО и РТ ( $r = -0,84$ ,  $p < 0,05$ ). Показатели Lag time и ttPeak демонстрировали положительную корреляцию с МНО ( $r = 0,61$  и  $r = 0,57$  соответственно,  $p < 0,05$ ). В то же время у больных с одинаковым значением МНО отмечена высокая вариабельность показателей тромбограммы, что свидетельствует о целесообразности использования ТГТ наряду со стандартизованным тестом для оценки эффективности антикоагулянтной терапии при подборе дозы варфарина, особенно у тяжелых больных. Так, у одного из обследованных с терапевтическим значением МНО = 2.8 показатели тромбограммы были настолько снижены, что послужили основанием для коррекции дозы во избежание геморрагических осложнений.

Показатели Lag-time, ЕТР, Peak thrombin и ttPeak при постановке в плазме бедной тромбоцитами 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, у пациентов с МНО 2,0-3,4 –  $12,6 \pm 9,3$ ,  $358,1 \pm 210,4$ ,  $66,5 \pm 39,2$ ,  $15,9 \pm 11,0$  и у пациентов с МНО 1,5-1,9 –  $6,1 \pm 0,9$ ,  $642 \pm 129$ ,  $118 \pm 22,1$  и  $9,0 \pm 0,8$ . В группе пациентов с МНО в оптимальном терапевтическом интервале (2,0-3,4) ЕТР был достоверно ниже, чем у больных с МНО 1.5-1.9. Следует отметить следующий важный факт – в группе пациентов с МНО 1,5-1,9, имело место двукратное снижение ЕТР по сравнению с контролем, что свидетельствует о допустимости ведения таких больных на более низких дозах АНД. Что касается группы с МНО ниже 1,5, то показатели тромбограммы не демонстрировали значимых отличий от контроля, снижение тромбинового потенциала было очень слабо выражено. Полученные данные свидетельствуют о том, что с помощью ТГТ можно не только проводить мониторинг антикоагулянтной терапии, но и с большей точностью оценить антикоагулянтное действие препарата по степени ингибиции генерации тромбина.

Таким образом, представленная в настоящих методических рекомендациях модификация постановки ТГТ с добавлением ТМ является информативным интегральным показателем для выявления гиперкоагуляции и оценки эффекта антитромботической терапии.

## Библиография

- [1] Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. – СПб: ФормаТ, 2006. – 208 с.
- [2] Hemker H.C., Al Dieri R., Вйguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance // *Curr Opin Hematol.* – 2004. – Vol. 11. – P. 170-175.
- [3] Van Veen J.J., Gatt A., Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? // *British Journal of Haematology.* – 2008. – Vol. 142. – P. 889-903.
- [4] Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system / H.C. Hemker, R. Al Dieri, E. De Smedt et al. // *Thromb Haemost.* – 2006. – Vol. 96. – P. 553-561.
- [5] Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence / A. Hylckama, S. Christiansen, R. Luddington et al. // *British Journal of Haematology.* – 2007. – Vol. 138. – P. 769-774.
- [6] Al. Dieri R., De Laat B., Hemker H.C. Thrombin generation: what have we learned? // *Blood.* – 2012. – Vol. 26. – P. 197-203.