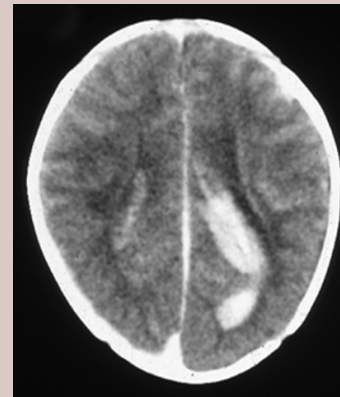


**Тест генерации тромбина.
Перспективы использования при лабораторной
диагностике нарушений в системе гемостаза**

Момот Андрей Павлович

Алтайский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр»
Минздрава России

Клинические проявления нарушений гемостаза ...



**Междисциплинарный
характер
клинической
гемостазиологии**

Классификация методов исследования системы гемостаза

1. Клинико-функциональные пробы при исследовании сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза:

- определение ломкости микрососудов с помощью пробы манжеточной компрессии (проба Кончаловского-Румпель-Леде),
- определение времени кровотечения из микрососудов без дополнительной компрессии (проба Дьюка с проколом уха и др.), либо на фоне венозного стаза (сдавление плеча манжетой до 40 мм рт. ст. с проколами или надрезами кожи предплечья) – пробы Айви и Борхгревика, и ряд других;

2. Лабораторные методы, в том числе:

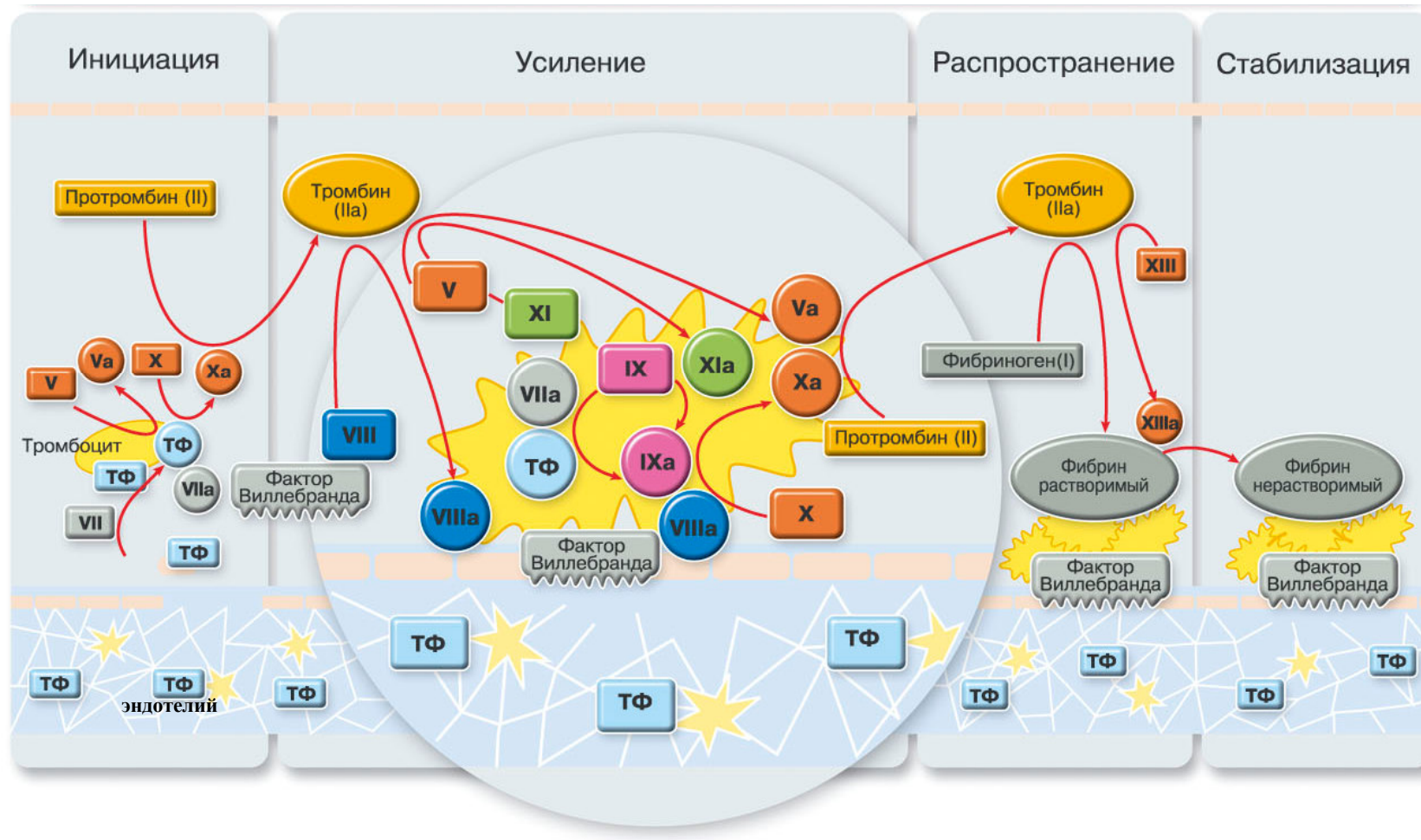
- для измерения числа и функции тромбоцитов (адгезии и агрегации) путем микроскопии или с использованием гематологических анализаторов (при скрининговых исследованиях) и агрегометров;
- *функциональные коагуляционные* или так называемые «клоттинговые» (по оценке времени свертывания мануально или с использованием коагулометров разных конструкций), либо *при функциональной оценке фибринолиза* по измерению времени лизиса или растворения фибринового сгустка;
- *амидолитические* (тесты с использованием хромогенных субстратов к тромбину, плазмину, фактору Ха, XIIIa и др. и фотометров с фиксированной длиной волны измерений);
- *иммунологические* методы, позволяющие выявить уровень искомого антигена (или антител) при АФС, ГИТ, гипергомоцистеинемии, при измерении D-димера и др., за счет иммуноферментных определений или на основе агглютинации макрочастиц (латекса, золота и др.);
- *методы выявления генетических аномалий* полимеразной цепной реакцией – ПЦР (мутации Лейден - резистентности фактора Va к активированному протеину C, гена протромбина G 20210 и др.);
- *интегральные методы:* тромбоэластометрия/графия, **тест генерации тромбина**, «Тромбодинамика»

**Скрининговые
коагуляционные тесты**
(АПТВ/АЧТВ, протромбиновый тест)



Фиксация времени образования фибрина в
плазме крови при образовании не более 5%
потенциального количества тромбина

Современная схема гемостатических реакций



Основные функции тромбина – ключевого фермента системы гемостаза

- активация тромбоцитов
- стимуляция выброса тканевого фактора (TF) эндотелиального происхождения
- активация ф.V, VII, VIII, XI и XIII (фибринстабилизирующего фактора)
- протеолиз фибриногена до фибрин-мономера (дез-ААВВ-фибриногена)
- активация протеина С посредством комплекса «тромбин-тромбомодулин»
- активация TAFI (регуляция фибринолиза)
- участие в процессах воспаления (стимуляция экспрессии Р-селектина, провоспалительных цитокинов, простациклина, оксида азота, адгезии лейкоцитов)
- Повышение проницаемости эндотелия и стимуляция пролиферации гладкомышечных клеток сосудов

Принцип теста генерации тромбина

заключается в измерении количества тромбина (в нМ), который образуется при рекальцификации цитратной плазмы в присутствии фиксированной концентрации тканевого фактора (ТФ) и флюорогенного субстрата



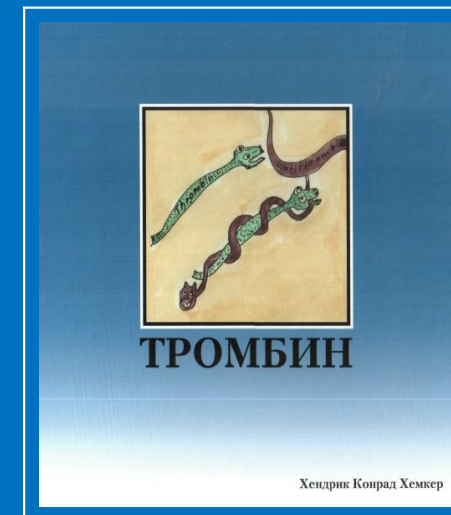
Конрад Хемкер

Hemker, H.C. et al. The thrombogram: Monitoring thrombin P., Al Dieri R. et al. Calibrated generation in platelet-rich plasma // Thromb Haemost. - 2000. – V. 83, № 4. - P. 589-591.

Hemker H., Giesen automated thrombin generation Thromb. - 2003. - Vol. 33, № 1. - P. 4-15.

measurement in clotting plasma // Pathophysiol Haemost

Hemker H.C. et al. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system // Thromb Haemost. - 2006. – V. 96, № 5. - P. 553-561.

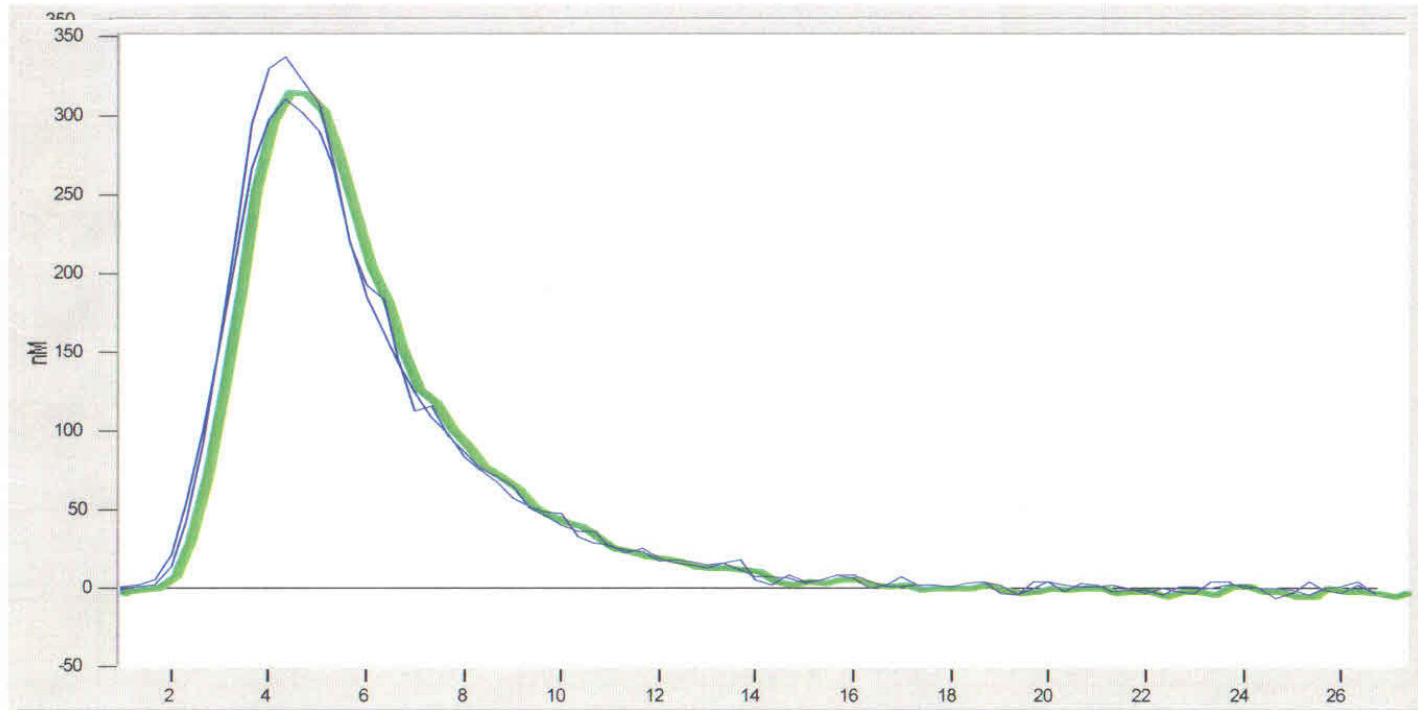


28.10.07 № 71

GroupName : Group10 10

Кушурова

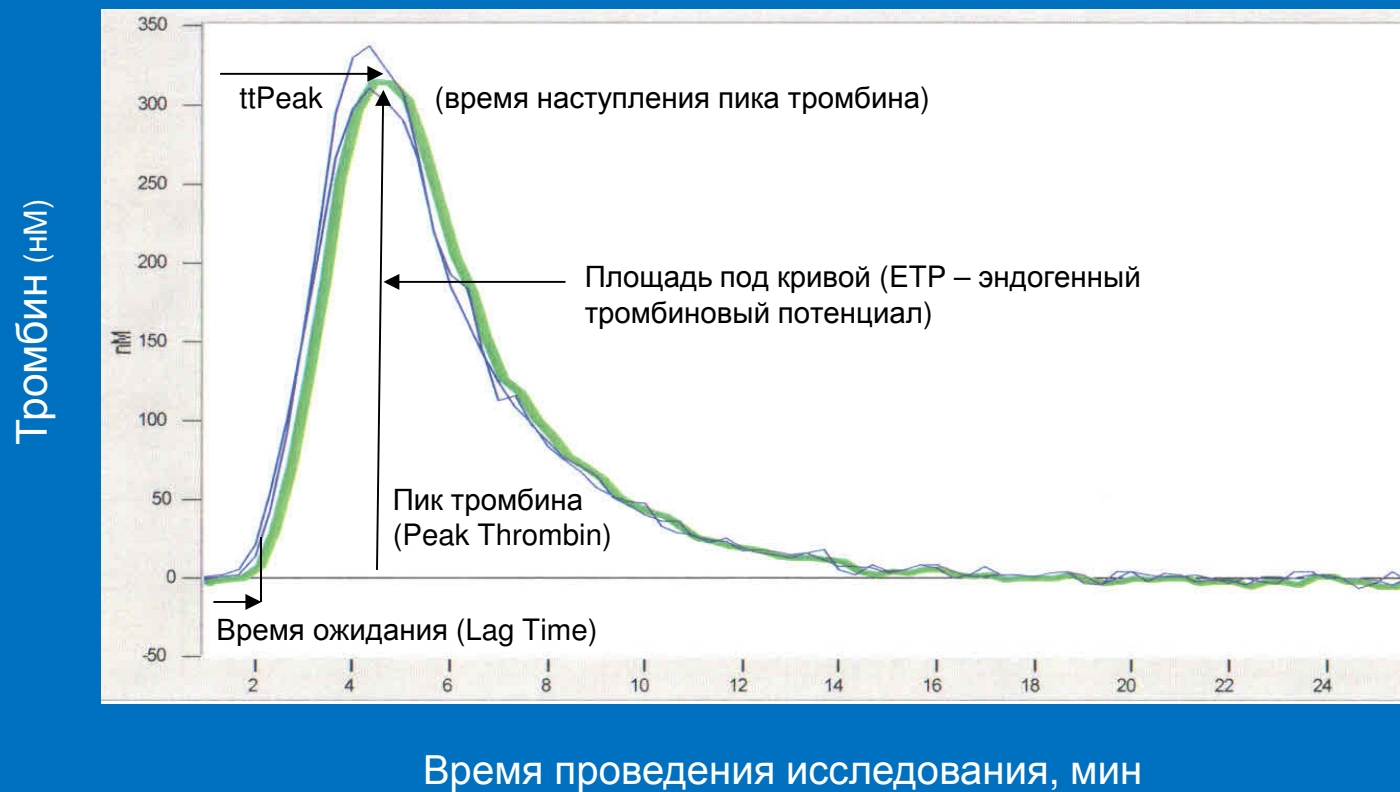
Filename : C:\Program Files\Thrombinoscope\Users\ли\Rawdata\ли_110528A_02.dat



С помощью флуориметра и компьютерной обработки результатов за определенный отрезок времени измеряется площадь кривой генерации тромбина, имеющей восходящую часть, участок достижения максимума и нисходящую часть, характеризующую инактивацию этого фермента

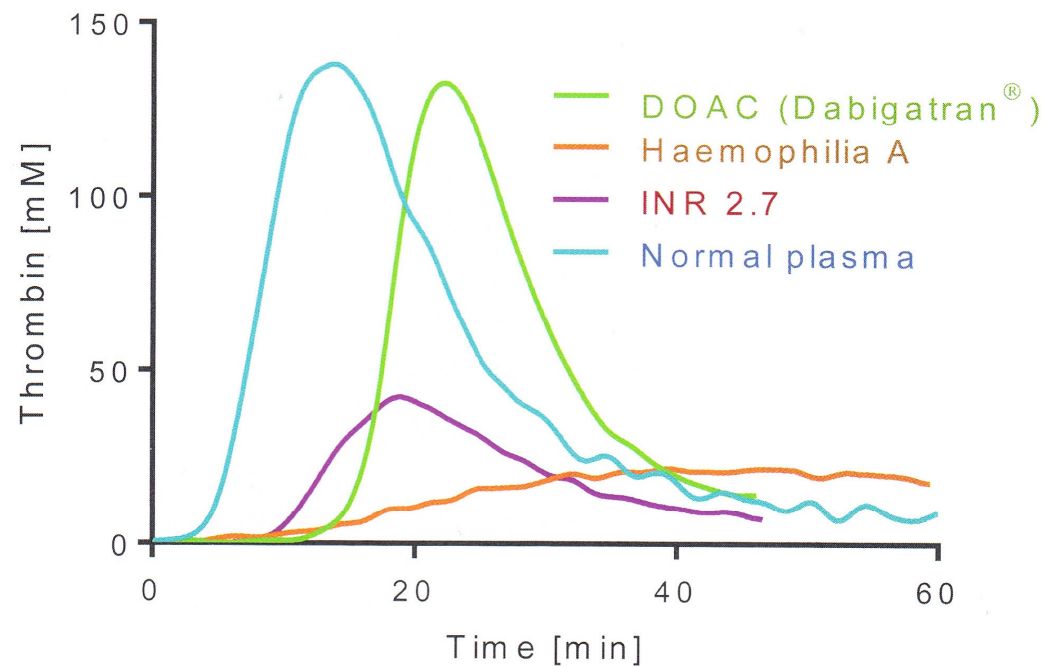
Калиброванная Автоматизированная Тромбограмма®

Новейший физиологический функциональный тест
глобальной оценки системы гемостаза



Калиброванная Автоматизированная Тромбограмма®

Новейший физиологический функциональный тест
глобальной оценки системы гемостаза



**Опыт Алтайского филиала ФГБУ
«Гематологический научный центр» МЗ РФ по
оценке тромбогенности крови при
физиологически протекающей беременности
(2011-2014 г.г.)**

Гемостаз и беременность

Беременность ассоциируется с прогрессирующей во времени ее течения тромбогенностью, создаваемой организмом матери для снижения кровопотери в родах, что приводит к повышению риска тромбообразования

Парадокс – исследованию системы гемостаза придается большое значение для ведения беременности и предупреждения ее осложнений, однако границы нормы и патологии на различных сроках гестации (по результатам большинства современных методов лабораторной диагностики) остаются неизвестными для специалистов

Методы исследования системы гемостаза

89 параметров

- Количество и функция тромбоцитов
- Фактор Виллебранда и эндотелин 1
- Уровень гомоцистеина в сыворотке крови
- Скрининговые коагуляционные тесты
- Факторы свертывания крови
- Конечный этап свертывания крови
- Маркеры активации свертывания крови, тромбинемии и состоявшегося фибринолиза
- Физиологические антикоагулянты
- Методы выявления волчаночного антикоагулянта
- Фибринолитическая система
- Интегральная инструментальная оценка системы гемостаза (ТГТ, тромбоэластометрия, «Тромбодинамика»)

Специализированное оборудование, использованное в работе

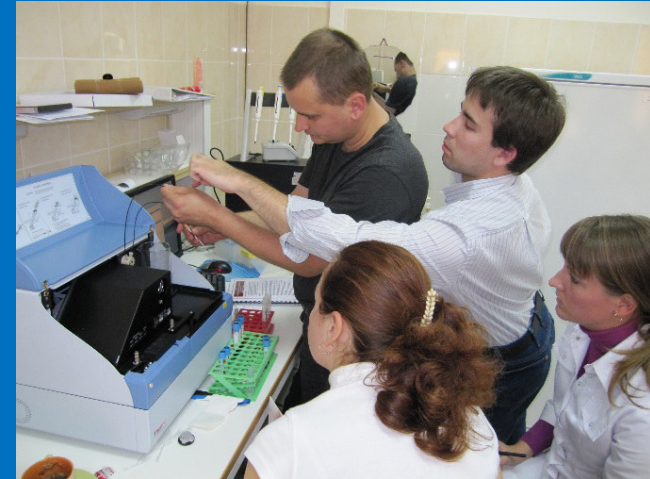


Контрольные точки исследования

- *Прегравидарный период*
- *6-8 недель (2-я волна инвазии трофобласта)*
- *12-13 недель (3-я волна инвазии трофобласта)*
- *22-24 недели (время старения плаценты)*
- *34-36 недели (поздние сроки беременности)*
- *2-3-е сутки после физиологического родоразрешения*

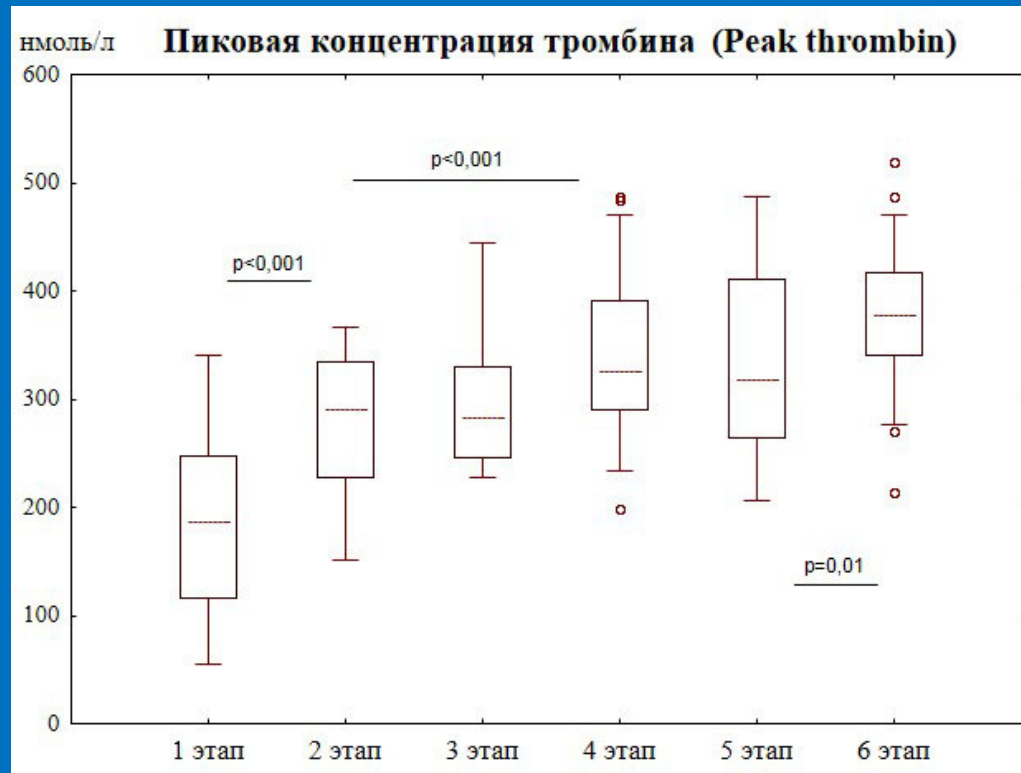


Особенности методики



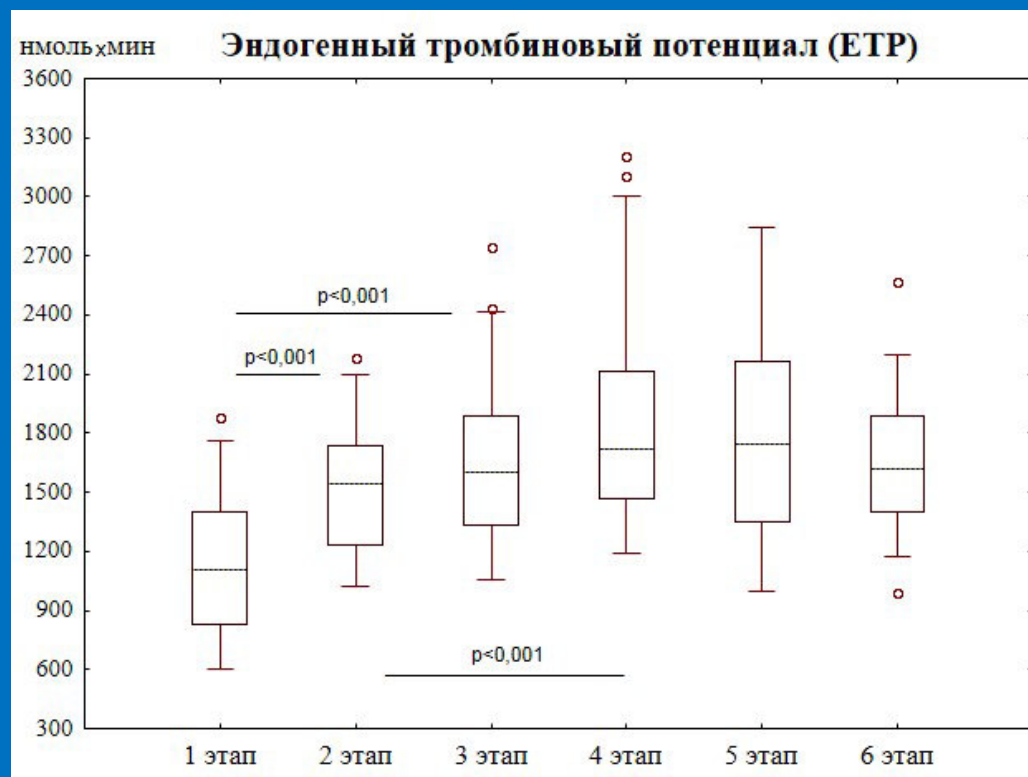
Для выполнения ТГТ использовался планшетный флюориметр Fluoroskan Ascent «ThermoFisher SCIENTIFIC» (Финляндия), оснащенный диспенсером, с программным обеспечением «Thrombinoscope 3.0.0.26». Коагуляция исследуемой плазмы крови осуществлялась в присутствии 5 пмоль тканевого фактора и 4 мкмоль фосфолипидов (PPP-Reagent 5 рМ, Thrombin Calibrator, FluCa-Kit)

Динамика изменения показателя Peak thrombin в плазме крови во время физиологической беременности



Примечание: здесь и на следующем рисунке Me – горизонтальная разделяющая линия внутри прямоугольника; 50% полученных значений – прямоугольник, заполненный серым цветом; значения, соответствующие 2,5 и 97,5 перцентилю - нижний и верхний вертикальные бары

Динамика изменения показателя ЕТР в плазме крови во время физиологической беременности



Тканевой фактор и ингибитор пути тканевого фактора в разные сроки физиологической беременности

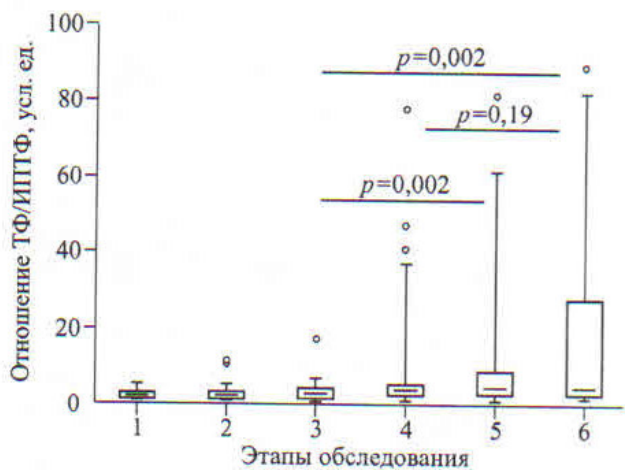
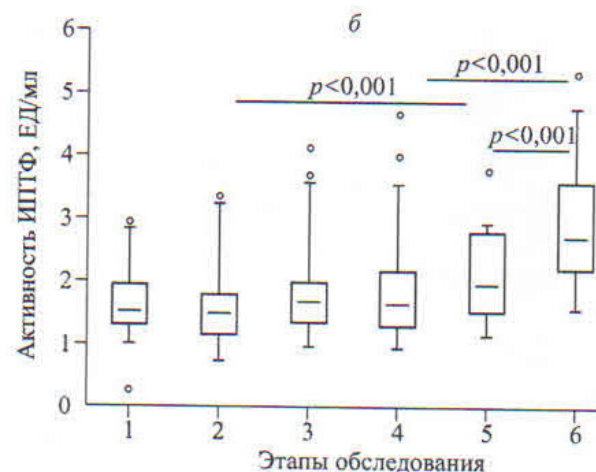
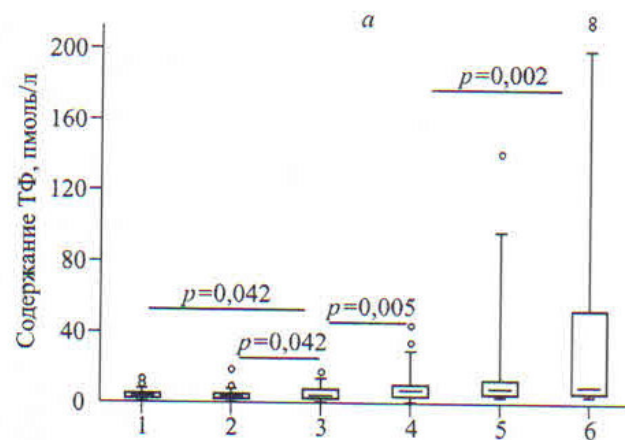


Рис. 1. Динамика содержания ТФ (а), активности ИПТФ (б) и отношения ТФ/ИПТФ (в) в плазме крови у беременных и небеременных женщин. Здесь и на рис. 2 линиями обозначены медианы, прямоугольниками – верхний и нижний квартили, «усами» – 95-процентные доверительные интервалы, кружками – выбросы

Фактор VIIa, уровень фибринопептида А и D-димеров в разные сроки физиологической беременности

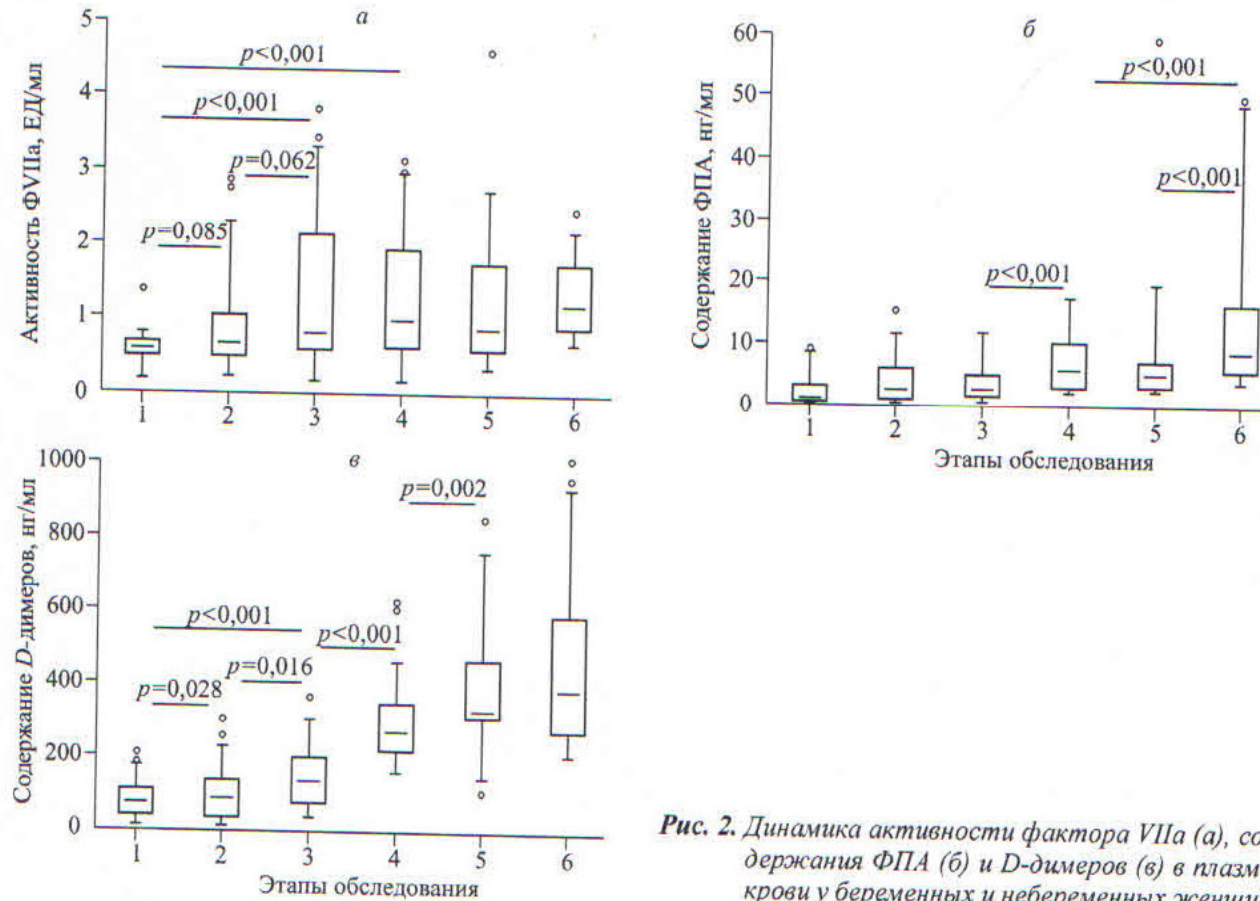


Рис. 2. Динамика активности фактора VIIa (а), содержания ФПА (б) и D-димеров (в) в плазме крови у беременных и небеременных женщин

doi: 10.17116/repro20152189-97

Референтные значения показателей системы гемостаза при физиологически протекающей беременности и после родоразрешения

Д.м.н., проф. А.П. МОМОТ^{1,2}, к.м.н. И.В. МОЛЧАНОВА², к.м.н. Т.А. БАТРАК², асп. Д.Е. БЕЛОЗЕРОВ³, асп. Д.А. ТРУХИНА³, И.Ю. КУДИНОВА³, Н.В. МАКСИМОВА³, д.м.н., проф. Н.И. ФАДЕЕВА², д.м.н. Г.В. СЕРДЮК^{1,2}, к.м.н. В.В. РОМАНОВ⁴

¹Алтайский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава РФ, Барнаул, 656045; ²ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Барнаул, 656038; ³КГБУЗ «Краевая клиническая больница», Барнаул, 656045; ⁴ООО «Инвитро-Сибирь», Новосибирск, 630000

Цель исследования — определить референтные значения широкого спектра показателей системы гемостаза у женщин в прегравидарном периоде, в различные сроки физиологически протекающей беременности и через 2—3 дня после естественного родоразрешения.

Материал и методы. С помощью современного лабораторного оборудования учитывали показатели, характеризующие различные звенья системы гемостаза — сосудисто-тромбоцитарное, коагуляционное, антикоагулянтное и фибринолитическое. В ходе исследований использовались зарегистрированные в Российской Федерации тест-системы, поставляемые или производимые в нашей стране.

Результаты. Установлены допустимые значения показателей системы гемостаза по 70 различным параметрам. Полученные данные могут быть использованы в качестве ориентировочных при обследовании беременных женщин и учитываться при отборе их в группы высокого риска по тромботическим, геморрагическим и акушерским осложнениям.

Ключевые слова: физиологически протекающая беременность, система гемостаза, референтные интервалы лабораторных показателей, генерация тромбина.

Тромбофилии

- 🚩 Мутация FV Leiden, протромбина, полиморфизм генов PAI 1, MTGFR, MTR, MTRR, FI, ITGA2- α 2, ITGB3-b и др.
- 🚩 Сахарный диабет, гипер- и дислипидемии, рак, варикозная болезнь, легочная и сердечная недостаточность, антифосфолипидный синдром, полиглобулия, инфекция ...

Результат один – возможное усиление генерации тромбина

Универсальный маркер этого состояния – показатели теста генерации тромбина!

В клинической практике с целью ограничения образования тромбина при активации свертывания крови «золотым стандартом» признано использование гепарина и его низкомолекулярных аналогов – НМГ

Позиция

- Противопоставлять измерения интенсивности генерации тромбина и уровня D-димеров во время беременности неправомерно, поскольку данные лабораторные подходы имеют различное диагностическое значение.
- Очевидно, что избыточная генерация тромбина является объективной предпосылкой для *профилактического* назначения НМГ (с контролем по этому же тесту необходимой длительности гепаринопрофилактики и режима дозирования антикоагулянта), традиционное же место определения D-димеров наряду с УЗИ – диагностика ВТЭО (ТГВ и ТЭЛА) с неизменным учетом референтных значений этих продуктов лизиса фибрина на тех или иных сроках беременности, с последующим применением *лечебных доз* антикоагулянтов.

Момот А.П. и др. Способность плазмы крови к образованию тромбина при физиологически протекающей беременности и после родоразрешения. Тромбоз, гемостаз и реология. – 2015. - № 2(62), июнь. – С. 21-30.

Заключение

- ✓ Тест генерации тромбина отражает конечный результат сложной последовательности ферментативных реакций свертывания крови
И измерение индивидуальной способности к тромбообразованию может стать лучшим индикатором тромботической направленности по сравнению с определением известных маркеров тромбинемии – растворимого фибрина и D-димеров
- ✓ Тест генерации тромбина видится уникальным инструментом для определения групп риска по кровотечениям и тромбозам, контроля за антитромботической или гемостатической терапией

**Более подробные сведения о технологии ТГТ
и сферах его возможного применения можно
получить в ряде отечественных работ,
опубликованных в последние годы**

Наместников Ю.А. Тест генерации тромбина – интегральный показатель состояния системы свертывания крови // Гематология и трансфузиология. - 2010. - № 2. - С. 32-39.

Момот А.П., Цывкина Л.П., Тараненко И.А. и др. Современные методы распознавания состояния тромбоцитической готовности: Монография [под ред. А.П.Момота]. - Барнаул: Изд-во Алтайского государственного университета, 2011. - 138 с.

Наместников Ю.А., Головина О.Г., Матвиенко О.Ю. и др. Условия постановки теста генерации тромбина для выявления состояния гиперкоагуляции // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 7. - С. 35-38.

Сошитова Н.П., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. Использование глобальных методов оценки состояния гемостаза при сепсисе // Проблемы клинической медицины. - 2012. - № 1. - С. 27-35.

Соловьев О.Н., Петренко Т.И. Глобальный тест оценки состояния системы гемостаза - эндогенный потенциал тромбина // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. - 2013. - № 3. - С. 41-43.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ