

Интегральные лабораторные тесты гемостаза в диагностике гиперкоагуляции и оценке риска тромбоза

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

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

² Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН;

Россия, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4;

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

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

Контакты: Михаил Александрович Пантелеев taranteliev@yandex.ru

Часть I. Патопфизиология гиперкоагуляции и тромбоза

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

Ключевые слова: интегральные тесты гемостаза, гиперкоагуляция, тромбоз, D-димеры, фибринопептид, антитромбиновый комплекс

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

Integrated laboratory coagulation tests in hypercoagulation diagnosis and thrombosis risk assessment

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

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

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

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

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

Part I. The pathophysiology of thrombosis and hypercoagulation

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

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

Введение

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

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

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

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

Венозный тромбоз

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

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

Артериальный тромбоз

Артериальные тромбозы возникают в основном при разрушении атеросклеротической бляшки. При этом на поверхность выходят коллаген, VWF и ТФ. Из-за высокой скорости кровотока в артериях основной механизм артериального тромбоза – агрегация тромбоцитов (поток крови размывает факторы свертывания, но зато ускоряет доставку тромбоцитов к месту повреждения), а образование фибрина – вторичный фактор, стабилизирующий тромб [14, 15]. Это подтверждается преобладанием тромбоцитов в таком тромбе (так называемом белом тромбе) и эффективностью препаратов, угнетающих адгезию тромбоцитов [16]. Риск артериального тромбоза повышен при нарушении адгезии и агрегации тромбоцитов вследствие повышения концентрации VWF, снижения металлопротеиназы, которая расщепляет VWF на мелкие, менее прокоагулянтные фрагменты (фермент AD-AMTS13) [17], а также при усиленной агрегации тромбоцитов *in vitro* в ответ на активацию низкими концентрациями аденозиндифосфата и/или адреналина (синдром липких тромбоцитов) [18].

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

Микрососудистый тромбоз

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

Причины гиперкоагуляции при различных состояниях

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

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

Гиперкоагуляционное состояние при конкретных патологиях

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

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

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

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

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

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

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

Заключение

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

средственные активаторы свертывания – МВ, активирующие свертывание по контактному пути [44], TF, циркулирующий на клетках или МВ (при раке или диабете), фактор XIa (ишемические цереброваскулярные события, стабильная стенокардия), раковый прокоагулянт, бактерии. Другая категория включает механизмы, не активирующие свертывание сами, но ускоряющие рост сгустка, сдвигая баланс свертывания: увеличение концентрации, активности или времени жизни прокоагулянтных факторов (врожденные нарушения, беременность, оральные контрацептивы, такие мутации, как протромбин G20 210A [45], фактор V Лейдена [46, 47], уменьшенная концентрация или активность противосвертывающих молекул (наследственный или приобретенный дефицит AT-III, PS, РС [48, 49]), сниженный фибринолиз, ADAMTS13, повышение VWF [17]. Данные для нескольких протромботических состояний представлены в таблице, в которой сделана попытка соотнести механизмы прокоагулянтных изменений, патологии, вызывающие их, и тип вызываемого ими тромбоза.

Л И Т Е Р А Т У Р А

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

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