

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-005.1-08:612.115.12

ТЕСТ ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА КАК ИНТЕГРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА: ТЕХНИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ В КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

Мельничникова О. С., Жиленкова Ю. И., Золотова Е. А.,
Пищулов К. А., Сироткина О. В., Симакова М. А., Вавилова Т. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Мельничникова Ольга Сергеевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: olga4403@gmail.com

Статья поступила в редакцию 04.04.2022
и принята к печати 08.05.2022.

РЕЗЮМЕ

Данный обзор литературы посвящен одному из интегральных тестов оценки системы гемостаза — тесту генерации тромбина (ТГТ), его техническим характеристикам, проблемам в стандартизации и возможному клиническому использованию. Оценка генерации тромбина (ГТ) более чувствительна к изменениям, происходящим в системе гемостаза, поскольку учитывает действие как прокоагулянтных, так и антикоагулянтных факторов в процессе образования тромбина. Важно отметить, что существуют варианты постановки ТГТ в богатой тромбоцитами плазме или в цельной крови, что приближает исследователя к условиям *in vivo*. Однако, несмотря на явные преимущества этого анализа при сравнении со скрининговыми тестами оценки системы гемостаза, существует ряд ограничений, в том числе отсутствие стандартизации, что не позволяет на данный момент внедрить ТГТ в клиническую практику. В данном обзоре обсуждаются технические характеристики ТГТ и варианты наборов реагентов в зависимости от поставленной клинической задачи, а также приводятся результаты последних исследований в области клинического применения ТГТ, демонстрирующие перспективность анализа ГТ для оценки риска как геморрагических осложнений, так и тромботических событий.

Ключевые слова: кровотечение, тест генерации тромбина, тромбиновый потенциал, тромбоз.

Для цитирования: Мельничникова О.С., Жиленкова Ю.И., Золотова Е.А., Пищулов К.А., Сироткина О.В., Симакова М.А., Вавилова Т.В. Тест генерации тромбина как интегральный анализ системы гемостаза: технические возможности и применение в клинико-лабораторной практике. *Российский журнал персонализированной медицины.* 2022;2(3):119-128. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-119-128

THROMBIN GENERATION TEST AS AN INTEGRAL ANALYSIS OF THE HEMOSTASIS SYSTEM: TECHNICAL CAPABILITIES AND APPLICATION IN LABORATORY PRACTICE

Melnichnikova O. S., Zhilenkova Yu. I., Zolotova E. A., Pishchulov K. A., Sirotkina O. V., Simakova M. A., Vavilova T. V.

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Melnichnikova Olga S.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: olga4403@gmail.com

Received 04 April 2022; accepted 08 May 2022..

ABSTRACT

This review is devoted to one of the integral tests for assessing the hemostasis system — the thrombin generation test (TGT), its technical characteristics, problems in standardization and possible clinical use. Evaluation of thrombin generation (TG) is more sensitive to changes occurring in the hemostasis system, since it takes into account the effect of both procoagulant and anticoagulant factors in the process of TG. It is important to note that there are options for setting TGT in platelet-rich plasma or in whole blood, which brings the researcher closer to *in vivo* conditions. However, despite the obvious advantages of this analysis when compared with routine screening tests for assessing the hemostasis system, there are number of limitations, including the lack of standardization, which does not currently allow the introduction of TGT into clinical practice. This review discusses the technical characteristics of TGT and variants of reagent kits depending on the clinical task, and provides the results of recent studies in the field of clinical use of TGT, demonstrating the prospects of GT analysis for assessing the risk of both hemorrhagic complications and thrombotic events.

Key words: bleeding, thrombin generation test, thrombin potential, thrombosis.

For citation: Melnichnikova OS, Zhilenkova YuI, Zolotova EA, Pishchulov KA, Sirotkina OV, Simakova MA, Vavilova TV. Thrombin generation test as an integral analysis of the hemostasis system: technical capabilities and application in laboratory practice. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):119-128. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-119-128

Список сокращений: АФС — антифосфолипидный синдром, АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, ГТ — генерация тромбина, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ЛАГ — легочная артериальная гипертензия, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ПС — протеин С, роТЭМ — ротационная тромбоэластометрия, ТГТ — тест генерации тромбина, ТМ — тромбомодулин, ТФ — тканевой фактор, ТЭГ — тромбоэластография, ЧКВ — чрескожные коронарные вмешательства, ЕТР (от англ. endogenous thrombin potential) — эндогенный тромбиновый потенциал, ЛТ (от англ. Lag time) — время инициации свертывания, ЛТА (от англ. light transmission aggregometry) — оптическая индуцированная агрегатометрия, Peakthr. (от англ. peak thrombin) — высота пика образования тромбина, ttPeak (от англ. time to peak) — время достижения пика тромбина, VI (от англ. velocity index) — индекс скорости образования тромбина.

ВВЕДЕНИЕ

Арсенал методов лабораторной оценки системы гемостаза велик, но, к сожалению, сохраняет фрагментарность представлений о процессах, происходящих *in vivo*, кроме того, большинство скрининговых тестов обладают низкой чувствительностью к состоянию гиперкоагуляции. Такие стандартные показатели коагулограммы, как активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ) и тромбиновое время, чаще всего остаются неизменными даже при наступлении тромбоза. Регистрация времени образования сгустка при определении клоттинговых тестов коагулограммы происходит на начальной фазе образования тромбина, когда образовалось всего лишь около 5 % от его общего количества [1]. Это означает, что 95 % генерируемого тромбина не измеряется при определении ПВ и АЧТВ. Результаты измерения этих тестов могут ответить нам, есть ли дефицит свертывания одного или нескольких прокоагулянтных факторов, но является ли этот недостаток скомпенсированным антикоагулянтной системой, а также гиперкоагуляцию эти тесты оценить не могут. Таким образом, определение времени образования сгустка в пробирке не может дать клиницисту полной информации о процессах свертывания, происходящих *in vivo*. Более подробную информацию о процессах в системе гемостаза дают интегральные тесты, к которым относятся вязкоупругие тесты (тромбоэластография — ТЭГ и ротационная тромбоэластометрия — роТЭМ), тест тромбодинамики и ТГТ.

Тромбоэластография/метрия (ТЭГ или роТЭМ) — метод графической регистрации процессов свертывания крови и фибринолиза, получивший наибольшее распространение сегодня в хирургии и анестезиологии. Эти методы базируются на измерении физической прочности сгустка. Несомненным достоинством методов является использование цельной крови в качестве материала, что приближает оценку к условиям *in vivo* и позволяет не тратить время на подготовку плазмы, а также возможность применять все разнообразие активаторов свертывания и фибринолиза, что позволяет изучать и диагностировать нарушения разных элементов системы свертывания. На сегодняшний день ТЭГ и роТЭМ применяются в основном для оценки риска кровотечений, а также для динамического контроля гемостатической или антитромботической терапии. Однако использование этих технологий для анализа протромботических изменений остается дискуссионным. Кроме того, важным недостатком является сложность массовых параллельных анализов с учетом технической реализации метода.

Относительно новым интегральным анализом оценки системы гемостаза является тест тромбодинамики, который предназначен для исследования *in vitro* пространственно-временной динамики свертывания крови, инициированной локализованным активатором свертывания. При этом тест тромбодинамики оценивает только конечный результат коагуляционного каскада — образование фибринового сгустка, что является ограничением метода. Проведенные исследования подтверждают, что этот тест информативен в отношении оценки риска развития тромбозов и кровотечений, показана информативность в оценке эффективности проводимой антикоагулянтной терапии. Однако на сегодня недостаточно данных для внедрения теста тромбодинамики в клиническую практику, протестировано ограниченное количество пациентов (до 100 человек) и оцениваемых событий в виде тромбозов и кровотечений [2].

Одним из широко обсуждаемых и изучаемых интегральных тестов является ТГТ. Методика определения ГТ была предложена еще в 1953 году R. Macfarlane и R. Biggs. Однако она была полностью ручной, трудоемкой, и результаты исследования сильно варьировали. [3]. В последующем группа исследователей из Маастрихтского университета под руководством Н. Nemker видоизменила технологию и разработала автоматизированный метод исследования ГТ одновременно в нескольких образцах плазмы крови, что стандартизовало и упростило оценку результатов [4]. ГТ *in vitro* демонстри-

рует эндогенную способность системы гемостаза и может свидетельствовать о тромботическом или геморрагическом риске, поскольку, в отличие от рутинных скрининговых тестов, она отражает вклад прокоагулянтных и антикоагулянтных факторов, включая двойственную функцию тромбина.

1. БИОХИМИЯ ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА

Тромбин — ключевой фермент каскада свертывания крови и имеет решающее значение в поддержании гемостатического баланса. Следовые количества тромбина образуются на стадии инициации коагуляции *in vivo* через фактор Ха, продуцируемый комплексом TF/фактор VIIa. Реакция коагуляции достигает всплеска образования тромбина во время фазы амплификации, когда еще действие ингибиторов не наступило и тромбин дополнительно способен иницировать полимеризацию и стабилизацию фибрина, делая формирующийся сгусток гемостатически стабильным. Тромбин часто называют белком с лицом Януса, потому что он принимает противоположные прокоагулянтные и антикоагулянтные функции в течение того времени, когда формируется кровяной сгусток. Тромбин активирует путем прямого ограниченного протеолиза другие белки свертывания с образованием активных ферментов, таких как факторы X, V, VIII,

XI, а также активирует тромбоциты, проявляя тем самым прокоагулянтные свойства. Посредством взаимодействия с клеточным рецептором — тромбомодулином (ТМ) активируется антикоагулянтная система протеина С (ПС). В гемостазе ПС обеспечивает ферментативный лизис факторов Va и VIIIa. Комплекс тромбин/ТМ не только многократно усиливает активацию ПС, но также блокирует тромбин-опосредованное превращение фибриногена в фибрин и обеспечивает связывание тромбина с клеточными рецепторами тромбоцитов, лейкоцитов, макрофагов. Также чрезмерная активация тромбина контролируется антитромбином III и ингибитором пути тканевого фактора (TFPI — tissue factor pathway inhibitor, англ.) [5].

Таким образом, ГТ — это многоступенчатый, сложный биохимический процесс, регистрация которого требует специализированного теста, такого как ГТТ. Анализ ГТ измеряет протеолитическое расщепление тромбином синтетического субстрата, высвобождающего хромоген или флуорофор, выходной сигнал которого постоянно измеряется и пропорционален количеству образовавшегося тромбина. Затем специальное компьютерное программное обеспечение вычисляет активность тромбина по сравнению со стандартом тромбина, отслеживает кривую ГТ и вычисляет ее соответствующие параметры, описывающие тромбограм-

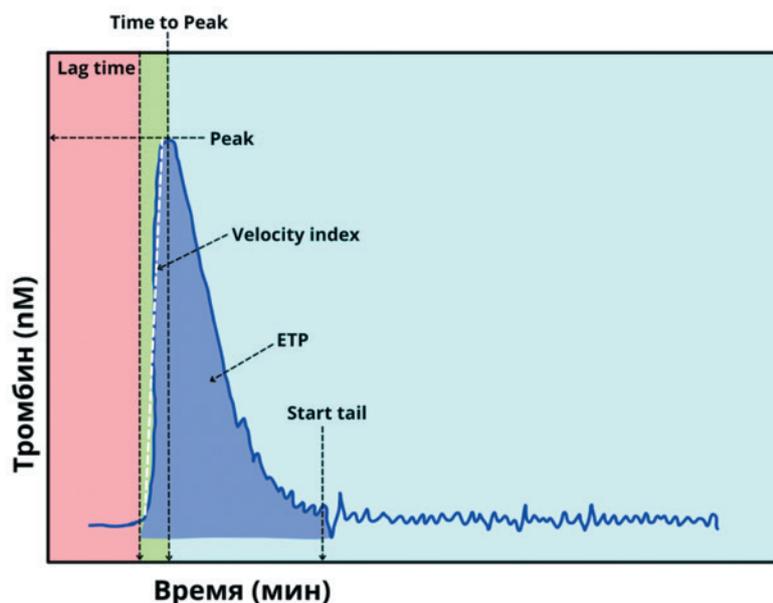


Рис. 1. Фазы генерации тромбина и измеряемые параметры.

Lag time — время инициации свертывания, мин; Peakthr — пиковая концентрация тромбина, нМоль; Time to peak — время достижения пиковой концентрации тромбина, мин; ETP — эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль/мин; розовым цветом обозначена фаза инициации, зеленым — фаза амплификации, голубым — фаза разрешения

му (рис. 1) [6]. Кинетика реакции состоит из трех фаз: инициации, амплификации и разрешения (рис. 1). Фаза инициации соответствует времени начального образования фибрина или времени свертывания рутинных тестов, таких как ПВ или АЧТВ, которые требуют только следовых количеств тромбина (т.е. $\approx 5\%$ от общего количества образовавшегося тромбина). В фазу амплификации преобразование протромбина происходит быстрее, чем ингибирование тромбина. При фазе разрешения наступает интенсивное действие различных ингибиторов, присутствующих в образце плазмы, таких как активированный ПС, антитромбин (АТ) и альфа-2-макрोगлобулин.

2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Технология измерения генерации тромбина методом калибровочной автоматизированной тромбограммы (КАТ) в сравнении с рутинными коагулологическими тестами обладает следующими преимуществами: прямая регистрация и оценка нескольких фаз ГТ, высокая чувствительность; комплексный подход к анализу тромбинемии; модификации теста с использованием тромбомодулина для оценки антикоагулянтной системы ПС; возможность модуляции триггерных реагентов в зависимости от клинической задачи. Кроме того, возможность измерения в бедной и богатой тромбоцитами плазме [7], в замороженно-размороженной плазме [8], а также в цельной крови. [9]. При анализе ТГТ в богатой тромбоцитами плазме оценивается вклад тромбоцитов в ГТ, а в случае использования цельной крови анализируются также и лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия.

Несмотря на преимущества ТГТ, открытым остается вопрос стандартизации. На сегодняшний день не существует единых рекомендаций по преаналитическим условиям. Хотя достигнуты определенные успехи и выполнены несколько исследований, позволяющих сформулировать рекомендации. Так, Loeffen и коллеги провели обширное исследование, сравнивающее различные процедуры взятия крови, и выпустили преаналитические рекомендации [10]. Также Международное общество тромбоза и гемостаза (ISTH) совместно с Научным комитетом по стандартизации (SSC) предложило стандартизированные преаналитические и аналитические условия для измерения ГТ для конкретного заболевания — гемофилии [11].

Вторым важным аспектом остается отсутствие единой рекомендации по концентрации и условиям происхождения триггерных реагентов, а именно ТФ и фосфолипидов. Сегодня производители реак-

тивов рекомендуют для диагностики склонности к кровотечению использовать низкие концентрации ТФ (диапазоне от 0,4 до 2 пМ) и очень низкие концентрации фосфолипидов (0,4 до 4 мкМ). Такая комбинация реагентов подходит для выявления гипокоагуляции, вызванной дефицитом факторов VIII или IX, а также для мониторинга гемостатической терапии у пациентов с гемофилией [12, 13]. Другие нарушения свертываемости крови могут требовать иных условий. Так, при дефиците фактора XI корреляция между ТГТ с клиническим риском кровотечения наблюдалась только тогда, когда коагуляция инициировалась в образцах без ингибитора контактной активации с очень низкими уровнями ТФ в присутствии тромбоцитов [11, 14]. Для тромботических состояний предлагается использовать высокие или средние концентрации ТФ (от 5 до 40 пМ) и низкие концентрации фосфолипидов. Именно такое сочетание триггерного реактива показало информативность в оценке риска рецидивирующего тромбоза глубоких вен и рак-ассоциированного тромбоза, а также при наследственных формах тромбофилии и тромбозах, вызванных экзогенными факторами риска [1]. Реагенты с высокими концентрациями ТФ (от 20 до 50 пМ) и фосфолипидов (около 4 мкМ) рекомендованы для мониторинга антикоагулянтной терапии.

В дополнение к точным концентрациям компонентов триггерных реактивов, на ТГТ влияет их способ приготовления, размер везикул, тип и источник фосфолипидов, а также интеграция и ориентация ТФ. Таким образом, очень важно определить соответствующий триггер для соответствующего анализа, так как при использовании неправильно реагента у пациента с гемофилией не будет наблюдаться снижение образования тромбина, а у пациента, принимающего антикоагулянты, вообще не будет образования тромбина [1].

Существует несколько модификаций предложенных прототипных триггерных реагентов. Так, для определения активности системы ПС используют реагенты с добавлением ТМ. Поскольку в ТГТ, активированном только ТФ и фосфолипидами, образуется только ограниченное количество активированного ПС, возможность исследования его функции отсутствует. Чтобы восполнить этот пробел, добавление ТМ к реагенту может способствовать изучению функции ПС. Совсем недавно было показано, что активатор контактного пути, содержащий триггерные реагенты, а точнее фактора XIa или эллаговую кислоту, подходит для изучения ГТ в присутствии нефактор-заместительной терапии [15]. Для изучения прокоагулянтной активности микрочастиц используют реагент без добавления

ТФ, реакция коагуляции инициируется за счет наличия на микрочастицах собственного ТФ.

В настоящий момент существует несколько производителей тест-системы и приборной базы для ТГТ: КАТ (Thrombinoscope BV, Maastricht, Нидерланды) с использованием отдельного флюориметра Fluoroscan (Thermo Scientific, Финляндия); автоматический коагулологический анализатор Severon с модулем для ТГТ (Technoclone, Vienna, Austria); оценка ЕТР на автоматическом коагулологическом анализаторе компании Siemens (США); полностью автоматизированный ТГТ на отдельном приборе ST Genesis (Stago, Франция). Все описанные выше технологии определения ГТ используют флуорогенный субстрат, который с течением времени показал большую чувствительность по сравнению с хромогенным.

Таким образом, для создания стандартизованного ТГТ необходимы специальный анализатор с жестким контролем температуры и интенсивности света, утвержденные схемы пипетирования для соответствующего реагента, включая оптимизированное время измерения, хорошо контролируемый субстрат, стандарты флуоресценции, наличие специальных средств контроля качества, охватывающих диапазон аналитических измерений, а также стандартизованных реагентов или триггеров.

3. КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Кровотечение и тромбоз являются критическими состояниями, и оценка гемостатического баланса пациента имеет решающее значение в терапии. Рутинные и специализированные параметры коагуляции помогают диагностировать изменения коагуляции, но могут не выявить пациентов с риском кровотечения или тромбоза. Тогда как интегральные тесты, в том числе ТГТ, являются потенциальными технологиями для диагностики, прогнозирования, профилактики и лечения наследственных и приобретенных коагулопатий [16]. Наличие автоматизированных систем, предложение по стандартизации, применение в дополнение к основным клиническо-лабораторным анализам может проложить путь к внедрению ТГТ в рутинную клиническую практику.

3.1. Оценка риска кровотечения и мониторинг терапии

Проблема диагностики гемофилии заключается в том, что фенотип кровотечения может различаться у пациентов с гемофилией с одинаковым уровнем фактора. ТГТ может лучше разделять больных с тяжелой формой гемофилии с идентичными уровнями факторов, но с различными фенотипами

кровотечений в соответствии с их гемостатической способностью [17].

ТГТ можно использовать для мониторинга эффективности терапии, например, рекомбинантных факторов [18], а также с его помощью персонализировать лечение пациентов с гемофилией. Информативность ТГТ для оценки эффективности фактор-специфической заместительной терапии и для нефактор-заместительной терапии (агенты обходного действия) или их комбинации изучалась у хирургических и нехирургических пациентов [19]. Как и в других исследованиях, авторы подчеркивают, что уровень фактора VIII не точно отражает способность к коагуляции у больных гемофилией [20]. Напротив, ТГТ подтвердил свою способность прогнозировать серьезные кровотечения. При таком персонализированном подходе, учитывающем общий эффект про- и антикоагулянтного статуса, ТГТ может представлять собой полезный инструмент для выявления пациентов с тяжелой тенденцией к кровотечениям, которым требуется ранняя профилактика дефицита фактора VIII, а также для оптимизации и мониторинга эффективности лечения. По этой же причине именно ТГТ был предложен также как дополнительный инструмент для оценки риска кровотечения при болезни Виллебранда [21]. Напротив, вязкоупругие тесты (ТЭГ и роТЭМ) считались недостаточно стандартизованными для оценки пациентов с гемофилией [19].

3.2. Оценка риска тромбоемболических событий

Достаточно много исследований посвящено оценке риска венозных тромбоемболических (ВТЭ) осложнений с помощью ТГТ. Повышенный уровень D-димера и повышенная ГТ были связаны с повышенным риском первого события (отношение шансов: 1,8–3,4) [22]. У пациентов с наследственным дефицитом протеина S (n = 242) продемонстрированы повышенный ЕТР и сокращение времени инициации (LT). Повышенная ГТ была обнаружена и у пациентов с дефектом антитромбина, дефицитом ПС, мутацией гена протромбина и Лейдена с резистентностью к активированному ПС [23, 24].

В результате идиопатической венозной тромбоемболии пациенты подвержены риску рецидива. Однако предрасполагающие факторы, включая наследственную тромбофилию, слабо связаны с повторными событиями, что затрудняет оценку рецидива тромбоза. В то же время коррекция антикоагулянтной терапии может подвергнуть пациентов чрезмерному риску кровотечения или тромбоза. ТГТ был предложен в качестве надежного инструмента для оценки риска рецидива тромбоза [22, 25, 26, 27].

Одним из серьезных заболеваний, имеющих высокий риск тромбоза, является антифосфолипидный синдром (АФС). К сожалению, лабораторная диагностика АФС остается затруднительной, так как на сегодня нет стандартизации тестов на волчаночный антикоагулянт и присутствует гетерогенность определяемых антител к фосфолипидам. В ряде исследований были показаны повышенный уровень ГТ при АФС и связь с приобретенной резистентностью к активированному ПС [28, 29]. Сочетание ТГТ с используемыми в настоящее время тестами на антифосфолипидные антитела может обеспечить более чувствительную и информативную начальную диагностику. Также ТГТ можно использовать для оценки эффективности антикоагулянтной терапии у пациентов с АФС [30, 31, 32].

Еще одно направление для клинического применения ТГТ — это оценка риска тромботических событий при атеротромбозе. Как известно, ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из ведущих причин смерти в большинстве развитых стран. В предыдущих наших исследованиях было показано, что уровень ЕТР возрастает с увеличением тяжести атеросклеротического повреждения и вовлечением в процесс нескольких сосудистых бассейнов и может быть использован в качестве дополнительного и неинвазивного метода диагностики распространенности атеросклеротического поражения сосудистого русла [33]. Кроме того, у больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда, применение ТГТ выявляет увеличение количества и скорости образования тромбина, что определяет перспективность применения теста для оценки тромботического риска и для персонализации терапии [34].

Тромбоз коронарного стента — редкое, но серьезное осложнение чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ), проявляющееся инфарктом миокарда с частыми смертельными исходами. В исследовании типа «случай–контроль» у пациентов с тромбозом стента наблюдалось гиперкоагуляционное состояние при выполнении ТГТ, что связано с усиленной контактной активацией и ослаблением антикоагулянтной активности по пути ПС [35]. В нашем предыдущем исследовании показано, что повышение показателей ТГТ у пациентов, перенесших ЧКВ, отражает риск повторной реваскуляризации и может использоваться как дополнительный критерий прогнозирования риска неблагоприятных исходов ЧКВ и прогрессирования атеросклероза [36].

Также в недавнем исследовании ТГТ у пациентов с легочной гипертензией (ЛАГ) было показано, что у лиц с длительным течением идиопатической ЛАГ наблюдалось достоверное снижение ГТ, что объяснялось эффектом потребления факторов свер-

тывания на фоне тромбоза *in situ*. В то время как у пациентов с ЛАГ, ассоциированной с системной склеродермией, отмечалась гиперкоагуляция, ассоциированная с тяжестью течения заболевания [37].

Значительная связь между увеличением ГТ и возникновением острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по ишемическому типу была обнаружена в важном проспективном исследовании, включавшем более 9000 пациентов в возрасте старше 65 лет с 4-летним периодом наблюдения. Таким образом, профилактика ОНМК должна быть направлена на снижение риска тромбоэмболии, потенциально отражаемого ТГТ [38].

В венском исследовании рака и тромбоза пациентов с впервые диагностированным раком или прогрессированием заболевания после ремиссии ($n = 1033$) оценивалось прогнозирование венозной тромбоэмболии путем измерения образования тромбина. Пациенты с повышенным пиковым уровнем тромбина (определяемым как значения тромбина ≥ 611 нМ, представляющие 75-й перцентиль от общей исследуемой популяции) имели повышенный риск ВТЭ с отношением рисков 2,1 (95 % ДИ, от 1,3 до 3,3, $p = 0,002$). Кумулятивная вероятность развития ВТЭ через 6 месяцев была значительно выше у пациентов с повышенным пиком тромбина, чем у лиц с более низким Peakthr [39].

3.3. Исследования коагулопатии при COVID-19

Тяжелая инфекция COVID-19 была связана с коагулопатией, обусловленной воспалением, возникающим в результате цитокинового шторма. Как показано, генерируется избыточное количество тромбина с последующим состоянием гиперкоагуляции, что приводит к высокому риску тромбоза и летальному исходу. В нескольких статьях сообщалось об использовании ТГТ для оценки профилей гемостаза у пациентов с тяжелой формой COVID-19. Поскольку наиболее тяжелые пациенты получают гепарин в различных дозах, будь то стандартная или усиленная профилактическая доза, доступны только результаты ТГТ на фоне приема гепарина. Результаты ТГТ подтверждают избыточную ГТ, ЕТР в пределах нормы даже в присутствии гепарина. Эти лабораторные данные согласуются со сниженной частотой тромбозов у пациентов, получающих профилактику высокими дозами гепарина, без увеличения частоты кровотечений [40]. ТГТ был оптимизирован и валидирован для тестирования образцов плазмы, содержащих гепарин, и показал дозозависимое снижение Peak и ЕТР [41]. В другом исследовании у 127 госпитализированных пациентов с подтвержденным COVID-19 параметры ЕТР и LT коррелирова-

ли с провоспалительными маркерами и маркерами лизиса клеток, а соотношение D-димер/ЕТР применялось для оценки риска серьезных осложнений во время инфекции [42]. Аналогичным образом, в проспективном исследовании было обнаружено, что Peakthg связан с повышенным риском смертности у пациентов с COVID-19 [43]. В недавнем исследовании показано, что у пациентов с COVID-19 был повышен ЕТР, несмотря на профилактическую антикоагулянтную терапию. Обнаружена связь удлинения времени ЛТ с увеличением тяжести заболевания при COVID-19 [44]. Однако предположение о том, что ТГТ отражает состояние гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19, является предметом дискуссий в литературе, и сообщается о вариабельности результатов исследований в зависимости от экспериментальных условий [45]. Все же ТГТ стал ценным инструментом для оценки общего коагуляционного статуса пациентов с COVID-19 за относительно короткое время [46, 47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое внедрение ТГТ в клиническую практику в настоящее время ограничено из-за отсутствия единых рекомендаций по стандартизации данной технологии. При этом в последние годы производители предприняли значительные усилия, чтобы предложить стандартизированные реагенты и эталонный контрольный материал для нормализации результатов, что помогло получить сопоставимые результаты в различных лабораториях. Это привело к значительному снижению межлабораторной изменчивости. Многие исследования, как показано в этом обзоре, доказали потенциальную роль ТГТ в диагностике кровотечений и тромботических событий, но большинство из них были проведены на небольших группах пациентов с использованием различных систем и реагентов. В то же время сочетание точности, чувствительности и универсальности современных методов ТГТ предлагает широкий спектр клинического и научного применения. Показана эффективность использования ТГТ в оценке риска кровотечения и тромбообразования, включая диагностику и прогнозирование наследственных и приобретенных нарушений свертывания крови, а также мониторинг связанного с ними лечения. Кроме того, недавняя пандемия COVID-19 доказала связь высокой частоты тромботических проявлений с инфекционными заболеваниями и необходимость антитромботической профилактики в ряде клинических ситуаций. Таким образом, ТГТ представляется перспективным лабораторным методом интегральной оценки системы гемостаза с целью

персонализированного подхода в выборе антиромботической терапии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Depasse F, Binder NB, Mueller J, et al. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *J Thromb Haemost.* 2021; 19: 2907–2917.
2. Баландина А.Н., Кольцова Е.М., Шибeko А.М. Тромбодинамика: новый подход к диагностике нарушений системы гемостаза. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2018; 17: 114–116.
3. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* 1953; 6: 3–8.
4. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33: 4–15.
5. Ten Cate H. Thrombin generation in clinical conditions. *Thromb Res.* 2012; 129: 367–370.
6. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016; 62: 699–707.
7. Panova-Noeva M, van der Meijden PEJ, ten Cate H. Clinical Applications, Pitfalls, and Uncertainties of Thrombin Generation in the Presence of Platelets. *J Clin Med.* 2019; 9: 92.
8. Regnault V, Béguin S, Lecompte T. Calibrated Automated Thrombin Generation in Frozen-Thawed Platelet-Rich Plasma to Detect Hypercoagulability. *PHT.* 2003; 33: 23–29.
9. Prior SM, Mann KG, Freeman K, et al. Continuous thrombin generation in whole blood: new applications for assessing activators and inhibitors of coagulation. *Anal Biochem.* 2018; 551: 19–25.
10. Loeffen R, Kleinegris M-CF, Loubele STBG, et al. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J Thromb Haemost.* 2012; 10: 2544–2554.
11. Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, et al. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2017; 15: 1704–1707.
12. Salvagno GL, Astermark J, Ekman M, et al. Impact of different inhibitor reactivities with commercial

factor VIII concentrates on thrombin generation. *Haemophilia*. 2007; 13: 51–56.

13. Váradi K, Turecek PL, Schwarz HP. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy. *Haemophilia*. 2004; 10 Suppl 2: 17–21.

14. Pike GN, Cumming AM, Hay CRM, et al. Sample conditions determine the ability of thrombin generation parameters to identify bleeding phenotype in FXI deficiency. *Blood*. 2015; 126: 397–405.

15. Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto N, et al. A modified thrombin generation assay to evaluate the plasma coagulation potential in the presence of emicizumab, the bispecific antibody to factors IXa/X. *Int J Hematol*. 2020; 112: 621–630.

16. Binder NB, Depasse F, Mueller J, et al. Clinical use of thrombin generation assays. *J Thromb Haemost*. 2021; 19: 2918–2929.

17. Teichman J, Chaudhry HR, Sholzberg M. Novel assays in the coagulation laboratory: a clinical and laboratory perspective. *Transfus Apher Sci*. 2018; 57: 480–484.

18. Váradi K, Negrier C, Berntorp E, et al. Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 2374–2380.

19. Dargaud Y, Lienhart A, Janbain M, et al. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica*. 2018; 103: e181–e183.

20. Valke LLFG, Bukkems LH, Barteling W, et al. Pharmacodynamic monitoring of factor VIII replacement therapy in hemophilia A: Combining thrombin and plasmin generation. *J Thromb Haemost*. 2020; 18: 3222–3231.

21. Rugeri L, Beguin S, Hemker C, et al. Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica*. 2007; 92: 1639–1646.

22. van Hylckama Vlieg A, Baglin CA, Luddington R, et al. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study. *J Thromb Haemost*. 2015; 13: 1642–1652.

23. Simioni P, Castoldi E, Lunghi B, et al. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. *Blood*. 2005; 106: 2363–2365.

24. Alhenc-Gelas M, Canonico M, Picard V. Influence of natural SERPINC1 mutations on ex vivo thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2010; 8: 845–848.

25. Chaireti R, Jennersjö C, Lindahl TL. Is thrombin generation at the time of an acute thromboembolic episode a predictor of recurrence? The Linköping Study on Thrombosis (LIST)--a 7-year follow-up. *Thromb Res*. 2013; 131: 135–139.

26. Lim HY, O'Malley C, Donnan G, et al. A review of global coagulation assays — Is there a role in thrombosis risk prediction? *Thromb Res*. 2019; 179: 45–55.

27. Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, et al. The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2007; 121: 353–359.

28. Zuily S, Ait Aissa K, Membre A, et al. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012; 21: 758–760.

29. Liestøl S, Sandset PM, Mowinckel M-C, et al. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost*. 2007; 5: 2204–2210.

30. Efthymiou M, Lawrie AS, Mackie I, et al. Thrombin generation and factor X assays for the assessment of warfarin anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome. *Thromb Res*. 2015; 135: 1191–1197.

31. Cohen H, Hunt BJ, Efthymiou M, et al. Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial. *Lancet Haematol*. 2016; 3: e426–436.

32. Bergstrom CP, Zia A, Sarode R, et al. Thrombin Generation in a patient with Triple Positive Antiphospholipid Syndrome Treated with Three Different Anticoagulants. *Transfus Apher Sci*. 2020; 59: 102815.

33. Мельничникова О.С., Лапин С.В., Тишков А.В. и др. Тест генерации тромбина в диагностике гиперкоагуляции у пациентов с атеросклерозом. *Медицинский Алфавит*. 2016; 4: 29–33.

34. Мельничникова О.С., Семенов А.П., Панов А.В. и др. Исследование генерации тромбина у больных со стабильной ишемической болезнью с предшествующим инфарктом миокарда. *Трансляционная медицина*. 2019; 6: 37–45.

35. Loeffen R, Godschalk TC, van Oerle R, et al. The hypercoagulable profile of patients with stent thrombosis. *Heart*. 2015; 101: 1126–1132.

36. Напалкова О.С., Эмануэль В.Л., Карпенко М.А. и др. Оценка риска повторной операции реваскуляризации миокарда с помощью теста генерации тромбина. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2016. С. 65–71.

37. Melnichnikova O, Simakova M, Moiseeva O, et al. The dynamics of thrombin formation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Thromb Res*. 2021; 208: 230–232.

38. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, et al. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 1445–1451.

39. Ay C, Dunkler D, Simanek R, et al. Prediction of venous thromboembolism in patients with cancer by measuring thrombin generation: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2099–2103.

40. Chistolini A, Ruberto F, Alessandri F, et al. Effect of low or high doses of low-molecular-weight heparin on thrombin generation and other haemostasis parameters in critically ill patients with COVID-19. *Br J Haematol*. 2020; 190: e214–e218.

41. van de Berg TW, Hulshof A-MM, Nagy M, et al. Suggestions for global coagulation assays for the assessment of COVID-19 associated hypercoagulability. *Thromb Res*. 2021; 201: 84–89.

42. de la Morena-Barrio ME, Bravo-Pérez C, Miñano A, et al. Prognostic value of thrombin generation parameters in hospitalized COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11: 7792.

43. Billoir P, Alexandre K, Dufлот T, et al. Investigation of Coagulation Biomarkers to Assess Clinical Deterioration in SARS-CoV-2 Infection. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8: 670694.

44. Bouck EG, Denorme F, Holle LA, et al. COVID-19 and Sepsis Are Associated With Different Abnormalities in Plasma Procoagulant and Fibrinolytic Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021; 41: 401–414.

45. Hardy M, Lecompte T, Douxfils J, et al. Management of the thrombotic risk associated with COVID-19: guidance for the hemostasis laboratory. *Thrombosis Journal*. 2020; 18: 17.

46. Benati M, Salvagno GL, Nitto SD, et al. Thrombin Generation in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Semin Thromb Hemost*. 2021; 47: 447–450.

47. von Meijenfелдt FA, Havervall S, Adelmeijer J, et al. Prothrombotic changes in patients with COVID-19 are associated with disease severity and mortality. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021; 5: 132–141.

Информация об авторах:

Мельничникова Ольга Сергеевна, к.м.н., старший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Жиленкова Юлия Исмаиловна, к.м.н., доцент кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Золотова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Пищулов Константин Анатольевич, младший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Сироткина Ольга Васильевна, д.б.н., главный научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины», профес-

сор кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Симакова Мария Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Вавилова Татьяна Владимировна, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Melnichnikova Olga S., PhD, Senior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Zhilenkova Yulia I., PhD., Assistant Professor, Laboratory Medicine and Genetics Department, Almazov National Medical Research Centre;

Zolotova Ekaterina A., Junior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Pishchulov Konstantin A., Junior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Sirotkina Olga V., D.Sc., Chief Researcher, Research Group of Cardio-oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, professor of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Simakova Maria A., PhD., Head, Senior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Vavilova Tatiana V., MD, D.Sc., Head, Laboratory Medicine and Genetics Department, Almazov National Medical Research Centre.