

# Применение проточных систем в лабораторной диагностике для интегральной оценки системы гемостаза

О.Е. Ушакова<sup>1, 2, 3</sup>, Д.Ю. Нечипуренко<sup>2, 3, 4</sup>, А.А.Бутылин<sup>3, 4</sup>,  
М.А. Пантелеев<sup>2, 3, 4, 5</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

<sup>5</sup> ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва

Одна из важнейших задач лабораторной диагностики нарушений работы в системе гемостаза – оценка риска тромбозов и кровотечений. Для этой цели плохо подходят узкоспециализированные тесты, направленные на выявление патологий отдельных звеньев или отдельных маркеров: дефицитов антигемофильных факторов – VIII, IX, XI, уровня D-димеров, тромбоцитарные тесты на активацию АДФ серотонином и агрегацию в присутствии ацетилсалициловой кислоты. Перспективным подходом считаются интегральные тесты, имитирующие процессы гемостаза *in vivo*, – тромбоэластография, тромбодинамика, генерация тромбина. При их создании ставится задача оценки риска тромбоза или кровотечения при сочетании дефектов гемостаза различной природы, а также скрининг и мониторинг лекарственной терапии. Один из подходов при создании интегральных тестов – применение проточных систем – микрокамер, в которых над активатором гемостаза формируется поток плазмы или цельной крови, а рост тромба регистрируется оптически. Существуют коммерчески доступные образцы таких устройств, накапливается опыт их применения в клинике, однако каких-либо единых стандартов и клинических рекомендаций в этой области пока нет. В данном обзоре рассмотрены примеры применения проточных камер для диагностики, описаны существующие проблемы при их использовании и те возможности, которые они могут предоставить клиницисту.

**Ключевые слова:** интегральные тесты гемостаза, микрофлюидика, функциональные тесты, тромбоз.

## Application of flow systems in laboratory diagnostics for the integral evaluation of the hemostatic system

O.E. Ushakova<sup>1, 2, 3</sup>, D.Y. Nechipurenko<sup>2, 3, 4</sup>, A.A. Butylin<sup>3, 4</sup>, M.A. Panteleev<sup>2, 3, 4, 5</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

<sup>2</sup> Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow

<sup>3</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

<sup>4</sup> Faculty of Physics, Moscow State University, Moscow

<sup>5</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

The assessment of thrombosis and bleeding risks is one of the most important tasks of laboratory diagnostics of disorders in the hemostasis system. For this purpose the highly specialized tests are not always appropriate, because these assays are focused on specific markers or pathologies of individual links: the level of coagulation factors, the level of D-dimers, ADP- and serotonin-induced platelet activation, effects of acetyl salicylic acid on aggregation. Nowadays, integral assays are the most promising approach, simulating hemostatic process *in vivo* – thromboelastography, thrombodynamics, thrombin generation. These tests are designed to specify the risk of thrombosis or bleeding with co-origin, as well as screening and monitoring of drug therapy. One of the approaches in the development of integral assays are flow systems where plasma or whole blood flow is formed over the hemostatic activator, and the growth of the thrombus is recorded on the video. There are commercially available samples of such devices, and some experience of its application in clinic. However, there are no uniform standards and clinical guidelines. This review describes examples of flow chambers exploitation for diagnosis, existing problems of its usage and the opportunities that it can provide to the clinicians.

**Key words:** integral assays of hemostasis, microfluidics, functional assays, thrombosis.

### Контактная информация:

Пантелеев Михаил Александрович,  
д-р физ.-мат. наук, профессор,  
заведующий лабораторией клеточного гемостаза и тромбоза Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.  
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1  
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-117-129

### Correspondence:

Mikhail A. Panteleev,  
PhD, DSc, Head of the Laboratory of cellular hemostasis and thrombosis of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.  
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1  
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

Тромбозы и кровотечения – ведущая причина смерти и инвалидности при широком круге патологических состояний: сепсисе, аутоиммунных, онкологических и гематологических заболеваниях (а также при их химио- и лучевой терапии), заболеваниях сердечно-сосудистой системы, печени, при беременности, травмах и др. Своевременная диагностика, массовый скрининг и контроль лечения лекарственными препаратами, влияющими на систему гемостаза, имеют решающее значение.

Все лабораторные тесты гемостаза можно разделить на три группы:

- высокоспецифичные тесты для определения состояний отдельных элементов системы (например, уровня факторов свертывания крови);
- биомаркеры для выявления последствий ее работы (например, анализ D-димеров);
- функциональные/интегральные тесты для оценки работы системы или больших ее частей в целом (различные времена свертывания, агрегометрия, тромбоэластография) [1].

Функциональные тесты играют особую роль в диагностике, они в определенной степени имитируют работу системы гемостаза в организме и потенциально способны показать общую картину происходящего, учитывая вклад основных механизмов в гемостатический потенциал крови, за исключением, может быть, только стенки сосуда. Именно такие тесты необходимы при скрининге, при оценке рисков в смешанных дефектах гемостаза (которые встречаются гораздо чаще, чем изолированные), при мониторинге во время хирургических операций, при приеме лекарственных препаратов, в том числе во время химиотерапии. Последняя является примером смешанного дефекта, когда на исходное патологическое состояние пациента «накладывается» лечение. Однако большая часть нынешних функциональных тестов была разработана 50 лет назад и ранее, когда представления о механизме гемостаза были совершенно другими (по нынешним меркам, упрощенными и в основном неправильными). Возможное решение в этой ситуации – использование интегральных тестов, которые *in vitro* имитируют процесс остановки кровотечения. Чтобы лучше понять проблемы оценки риска тромбоза и прогнозирования его развития с использованием диагностических тестов *in vitro*, необходимо знать, какие биохимические и гидродинамические процессы лежат в основе формирования тромба.

При движении жидкости в сосуде различные слои перемещаются с различными линейными скоростями. Линейная скорость течения максимальна на оси сосуда (если он не искривлен) и считается равной нулю у его стенки. Причина существования этого распределения скоростей – вязкое трение между

взаимодействующими слоями жидкости. В результате в направлении, перпендикулярном направлению потока, возникает градиент линейных скоростей, который называют скоростью сдвига ( $\gamma$  – направление, перпендикулярное потоку):

$$\gamma = \frac{dv}{dy}$$

Эта величина, как видно из формулы, выражается в сек<sup>-1</sup> (1/сек).

Наиболее очевидная идея о роли потока состоит в том, что поток приносит неактивные факторы к месту активации и уносит активированные. При исследовании кинетики образования фибринового сгустка в стеклянных капиллярах с нанесенным активатором [2] при разных сдвиговых скоростях авторы получили пороговое поведение: в некотором диапазоне скоростей сгусток образуется примерно за одно и то же время, а когда скорость становится выше порога, сгусток вообще не появляется. При этом порог определяется размером активатора: чем больше активатор, тем при больших скоростях сдвига достигается порог, и наоборот.

Полноценных исследований, в которых изучали бы перенос потоком всех факторов свертывания – активных и неактивных, пока нет. Одна из интересных работ в этой области [3] посвящена активации фактора X при различных скоростях сдвига, кинетика активации которого важна для понимания влияния потока на тромбообразование, поскольку этот фактор входит в состав протромбиназы – основного активатора тромбина. Согласно [4], скорость активации фактора X внешней теназой (комплексом VIIa–TF) растет при увеличении сдвиговой скорости потока, а удаление фактора Xa из реакционной зоны приводит к увеличению активности комплекса внешней теназы, что связано с освобождением активного сайта и присоединением следующей молекулы субстрата. В то же время в соответствии с исследованием активации фактора Xa внутренней теназой (комплексом IXa–VIIIa) [4] при увеличении скорости сдвига скорость его наработки уменьшается. Так как для запуска свертывания важна активация фактора Xa внешней теназой, а для роста сгустка – функционирование комплексов внутренней теназы и протромбиназы, при увеличении скорости сдвига мы будем наблюдать уменьшение скорости роста сгустка.

Не менее важно влияние потока на тромбоцитарное звено гемостаза, которое складывается из следующих компонентов: количество тромбоцитов, приносимых к месту повреждения сосудистой стенки; их взаимодействие с фактором Виллебранда; механическое напряжение, возникающее на мембране тромбоцита («сдвиговый стресс»). Последнее,

согласно данным исследования [5], может активировать механочувствительные кальциевые каналы, что способствует повышению внутриклеточной концентрации кальция и активации тромбоцита. При этом в условиях *in vivo* тромбоциты подвергаются чрезвычайно широкому диапазону скоростей сдвига в сосудах разного диаметра – от нескольких десятков  $\text{с}^{-1}$  (в капиллярах) до нескольких тысяч  $\text{с}^{-1}$  (в артериолах); в стенозированных артериях скорость сдвига может достигать  $40\,000\ \text{с}^{-1}$  [6].

Существенный недостаток почти всех интегральных тестов состоит в том, что они не учитывают взаимодействие потока с поврежденной поверхностью сосуда, а значит, условия тромбообразования неправдоподобны. На сегодняшний день наибольший интерес представляют подходы, в той или иной степени воссоздающие геометрию и динамику потока крови в сосудах, уже реализованные в некоторых коммерчески доступных проточных системах, например, PFA-100 и PFA-200 (*platelet function analyzer*) [7], а также в плоскопараллельных проточных камерах, таких как T-TAS (*total thrombus-formation analysis system*) [8].

Цель данного обзора – обсуждение преимуществ и недостатков проточных систем, проблем, связанных с внедрением метода в клиническую практику, а также сравнение их с классическими тестами и некоторыми интегральными методами диагностики.

### Современное представление о гемостазе

Наши представления о диагностике гемостаза в последние десятилетия претерпели радикальные изменения. Перед тем как рассказывать об устройстве новых тестов гемостаза, рассмотрим основные его характеристики. Гемостаз состоит из нескольких ключевых звеньев. Различают первичный (сосудисто-тромбоцитарный) и вторичный (плазменный) гемостаз. Несмотря на то что активация первичного и вторичного звеньев гемостаза происходит одновременно, сначала формируется первичный агрегат из слабо активированных тромбоцитов, который создает препятствие кровопотере, а затем – прочная фибриновая сеть, укрепляющая сгусток. Но прежде чем сформировать первичный агрегат, тромбоцитам необходимо зацепиться за поврежденную поверхность.

В настоящее время считается, что в формировании первого слоя тромба в условиях высоких скоростей сдвига, характерных для артериального русла и микрососудов, главную роль играет фактор фон Виллебранда (ФВ) [9] – гликопротеин, циркулирующий в кровотоке в виде мультимеров. Мономер ФВ состоит из нескольких субъединиц, среди которых можно выделить следующие домены: А1, который связывается с рецептором тромбоцитов GPIIb; А2 – механо-

чувствительный домен; А3, связывающийся с коллагеном и С1, который связывает интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  и  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  на поверхности тромбоцитов. Активность ФВ наиболее ощутима при скоростях сдвига в пределах  $1000\text{--}10000\ \text{с}^{-1}$  за счет того, что при скорости сдвига выше  $1000\ \text{с}^{-1}$  ФВ более интенсивно меняет конформацию под действием гидродинамических сил и появляется больше сайтов для связывания с тромбоцитами [10]. ФВ содержится в плазме крови, в эндотелии в тельцах Вейбеля–Паладе и в альфа-гранулах тромбоцитов и мегакариоцитов. В плазме крови находятся мультимеры ФВ разной длины, молекулярная масса которых варьируется от примерно 500 кДа (димер) до 10 000 кДа ФВ, причем гемостатически активной считается фракция длинных мультимеров – массой от 5 до 10 мДа. Мультимеры могут находиться как в развернутом (активном) состоянии, так и в состоянии глобулы (неактивном). При активации эндотелия из телец Вейбеля–Паладе высвобождаются ультрадлинные молекулы ФВ массой более 10 мДа, которые легко разворачиваются в потоке и активно разрезаются металлопротеиназой ADAMTS13 на менее крупные фрагменты. Ультрадлинные молекулы ФВ, регистрируемые в плазме пациентов с различными патологиями, обладают большим тромботическим потенциалом и могут приводить к тромбозам [11, 12]. При повреждении сосудистой стенки ФВ связывается с коллагеном, становясь «ловушкой» для тромбоцитов. Еще один источник ФВ при повреждении сосудистой стенки – это субэндотелиальный ФВ, который находится в ультрадлинной форме. Считается также, что при повреждении некоторые компоненты межклеточного матрикса способны связывать плазменный ФВ [10].

Связывание тромбоцитов с ФВ происходит через гликопротеин Ib (GPIb) [9]; этот этап – один из ключевых, так как позволяет затормозить тромбоциты у поврежденной поверхности, далее происходит их связывание напрямую с коллагеном через гликопротеин VI (GPVI). Это приводит к активации тромбоцита (и как следствие – к активации интегринов  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ), который прочно связывает ФВ и фибриноген, и  $\alpha\text{1}\beta\text{2}$ , обеспечивающего крепкую фиксацию тромбоцита на коллагене [10], что ведет к формированию тромбоцитарных агрегатов [13] (*рис. 1*).

Другое следствие активации тромбоцитов – выброс гранул. Альфа-гранулы наиболее многочисленны и содержат адгезивные белки, факторы свертывания, факторы роста, ингибиторы протеаз. Дельта-гранулы включают в себя АДФ, тромбоксан  $A_2$ , серотонин, кальций, катехоламины [14]. Тромбоксан  $A_2$  (ТХА<sub>2</sub>), действуя через TP-рецепторы, а катехоламины – через  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы, вызывают активацию тромбоцитов, которые будут



на поверхности клеток кальций-зависимого комплекса VIIa-TF, который путем протеолиза активирует факторы IX и X; Ха-фактор в присутствии кальция активирует реакцию превращения протромбина в тромбин, дополнительно активирует фактор VII, а также формирует комплекс с Va-фактором, который активируется тромбином [18]. Комплекс Ха-Va способен ускорять реакцию превращения протромбина в тромбин на несколько порядков. Образование тромбина – это центральное событие плазменного звена; как и предыдущие факторы, будучи сериновой протеиназой, он является активатором ряда прокоагулянтных факторов – V, XI, XIII, расщепляет комплекс VIII-ФВ на активный фактор VIIIa и ФВ, катализирует реакцию превращения фибриногена в фибрин-мономер. Фактор XI, превращаясь в свою активную форму XIa, активирует IX фактор, который образует мембранно-связанный комплекс IXa-VIIIa, увеличивая на порядки скорость активации фактора X. Фактор XIII – фибринстабилизирующий, в активной форме он образует поперечные сшивки между молекулами фибрина. Этот фактор синтезируется в мегакариоцитах, его дефицит сопровождается кровотечениями и медленным заживлением ран [17].

Полимеризация фибрина представляет собой процесс «желирования» крови в месте повреждения и приводит к окончательной остановке кровотечения, поскольку такой сгусток плотно соединен с эндотелиальной стенкой и тромбоцитами, к тому же он удерживает другие форменные элементы крови и плазму [17].

Тромбин также активирует антикоагулянтный фактор протеин С, который инактивирует комплекс IXa-VIIIa.

Контактный путь плазменного звена начинается с активации фактора XII отрицательно заряженной поверхностью, которая может быть предоставлена поверхностью коллагеновых волокон либо фосфатидилсерином тромбоцитов [19], высокомолекулярными кининогенами и калликреином. Фактор XIIa активирует фактор XI, запуская каскад свертывания [20].

Взаимодействие тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза происходит на нескольких этапах: связывание тромбина с комплексом GPIIb-V-IX и активация тромбином рецепторов PAR-1 и PAR-4 и на поверхности тромбоцита, что приводит к активации сигнального пути с участием фосфолипазы C и IP<sub>3</sub>, в результате происходит переключение интегрина αIIbβ<sub>3</sub> в активное состояние, он становится способен связывать фибриноген, а через него и другие тромбоциты [21]; выставление фосфатидилсерина на поверхность и связывание плазменных факторов; выброс альфа-гранул [1].

Пример дефекта тромбоцитарного звена – синдром Бернара-Сулье (дефект комплекса GPIIb-V-IX

[22]). Тромбоциты в таком случае не имеют возможности затормозить у поврежденной поверхности при быстром потоке крови. В отсутствие тромбоцитарного агрегата факторы свертывания моментально вымываются из места повреждения потоком, не успевая сформировать фибриновый сгусток, а при наличии агрегата задерживаются в нем и образуют прочную фибриновую сеть.

При недостаточности плазменного звена могут возникать кровотечения из-за того, что поток вымывает тромбоцитарную пробку, например, при гемофилиях [23], в то время как фибриновые сети должны плотно ее стабилизировать [3], либо возникают кровотечения смешанного типа, например, качественные и количественные дефекты ФВ при болезни Виллебранда.

Эти утверждения больше справедливы для артериального тромбоза из-за высокой скорости сдвига в артериях, что обеспечивает приток большого количества тромбоцитов к месту повреждения, например, при изъязвлении атеросклеротической бляшки. Если говорить о венозном тромбозе, например, при воспалении сосудистой стенки (тромбофлебит), то агрегация тромбоцитов играет куда меньшую роль, так как основной вклад в тромбообразование вносит плазменное звено [24]. В данном случае активированный эндотелий высвобождает ФВ и P-селектины, к которым могут прикрепляться тромбоциты, нейтрофилы, моноциты. Считается, что последние, в свою очередь, при воспалении под действием цитокинов экспрессируют на своей мембране TF, что активирует путь тканевого фактора плазменного звена [25].

В случае повреждения микрососудов происходит вазоконстрикция, которая сама по себе способна остановить кровотечение и дать больше времени на тромбообразование. Высвобождающиеся из гранул активированных тромбоцитов и поврежденного эндотелия TXA<sub>2</sub> и серотонин активируют TP и 5-HT рецепторы соответственно, которые располагаются на поверхности гладких миоцитов сосуда, в результате чего и происходит вазоконстрикция [26].

#### Функциональные тесты системы гемостаза

Функциональные тесты системы гемостаза можно разделить на две большие группы: классические (время свертывания, агрегометрия, проточная цитометрия), которые позволяют охарактеризовать работу компонентов системы, и интегральные (генерация тромбина, тромбоэластография, тромбодинамика), позволяющие имитировать физиологические условия [2] (табл.). Классические тесты – это первая ступень в оценке системы гемостаза, именно сочетание этих тестов и определение количества тромбоцитов назначают при первичном обследовании пациента: активированное частичное тромбопластиновое вре-

Таблица

**Функциональные тесты системы гемостаза**

Метод	Образец	Принцип работы	Адгезия	Агрегация	Коагуляция		
					инициация	эластичность	лизис
АЧТВ [2]	PPP	Измеряет время до образования сгустка после активации внешнего и внутреннего путей при добавлении каолина, кефалина и CaCl <sub>2</sub> (светооптический метод)	-	-	+	-	-
Протромбиновое время [2]	PPP	Измеряет время до образования сгустка при добавлении тромбина в бедную тромбоцитами плазму с CaCl <sub>2</sub> (светооптический метод)	-	-	+	-	-
<b>Функциональные тромбоцитарные тесты</b>							
Агрегометрия [2]	PRP	Измеряет увеличение светопропускной способности после добавления агониста	-	+	-	-	-
Проточная цитометрия [2]	ЦК, PRP	Определяет экспрессию рецепторов тромбоцитов, их функциональную активность с помощью флуоресцентных моноклональных антител	-	+	-	-	-
<b>Тесты, основанные на способности тромбоцитов к адгезии в условиях напряжения сдвига</b>							
PFA-100 [2]	ЦК	Измеряет время до закрытия просвета капиллярной трубки тромбом под действием агонистов тромбоцитов в условиях потока	+	+	-	-	-
T-TAS [56]	ЦК	Измеряет изменение давления в проточной камере с течением времени в условиях тока крови над активатором	+	+	-	-	-
Microfluidics [48, 50]	ЦК	Визуальный мониторинг тромбообразования в стеклянных капиллярах либо PDMS-камерах	+	+	-	-	-
Тест тромбодинамики [2]	ЦК, PRP, PPP	Мониторинг динамики свертывания начиная с инициации. Регистрируется рассеянный свет от сети фибрина	-	-	+	-	-
<b>Вязкоэластичные тесты</b>							
TEG [2, 31]	ЦК	Мониторинг образования тромба под действием активаторов. Регистрируется на мониторе в виде площади под графиком. Все три метода представляют собой измерительный прибор, который состоит из стержня, подсоединенного к компьютеру, и цилиндрической кюветы, в которую помещают небольшой объем крови и добавляют активаторы, затем кювета совершает колебательные движения. Как только образовывается сгусток, стержень также начинает совершать осцилляции, его движения записывает компьютер. Получаемые данные: время образования сгустка (отображает работу плазменного звена), кинетика образования сгустка (время, необходимое для достижения определенной плотности сгустка), максимальная амплитуда (предел прочности сгустка; эта фаза отражает взаимодействие тромбоцитарного и плазменного звеньев), время фибринолиза (отражает прочность и стабильность сгустка)	-	-	-	+	+
ROTEM [2, 31]	ЦК		-	-	-	+	+
FOR [31]	ЦК		-	-	+	+	+

Примечание: ЦК – цельная кровь; PRP – *platelet rich plasma* (плазма, насыщенная тромбоцитами); PPP – *platelet poor plasma* (плазма, обедненная тромбоцитами)..

мя (АЧТВ), протромбиновое (ПВ) и тромбиновое (ТВ) время, тест агрегометрии [27]. Данные тесты хорошо подходят для мониторинга терапии, например, антагонистами витамина К (ПВ), гепарином (АЧТВ), а также лежат в основе диагностики гемофилии, геморрагических состояний вследствие печеночной недостаточности [28, 29].

АЧТВ и ПВ могут быть не всегда чувствительны к низким и терапевтическим дозам дабигатрана (прямой ингибитор тромбина), ривароксабана (прямой ингибитор FXa) и апиксабана (прямой ингибитор FXa) [30]. Также эти тесты не позволяют диагностировать гиперкоагуляционные состояния, не имеющие характерной клинической картины, но характеризующиеся повышенной готовностью крови к свертыванию [31]. В основной массе эти тесты несут информацию об инициации свертывания, но не о гемостатическом потенциале крови [32].

Чувствительность интегральных тестов выше, но они играют вспомогательную роль и широко не применяются, так как есть ограничения в плане их интерпретации. Тромбоэластография основана на измерении физической прочности сгустка. Небольшое количество крови (менее 1 мл) помещается в кювету, которая совершает медленные вращательные колебания на несколько градусов. В камеру помещают стержень датчика и добавляют активаторы свертывания. Когда в кювете формируется сгусток, стержень начинает вращаться вместе со сгустком. Амплитуда отклонения стержня регистрируется как функция времени. Хотя кривая практически симметрична относительно оси абсцисс вследствие того, что амплитуд на самом деле две (для колебаний в каждую сторону), в тромбоэластографии традиционно изображают обе половинки кривой. На ней можно выделить разнообразные параметры, характеризую-

щие как скорость формирования сгустка, так и его финальные характеристики. Основные достоинства тромбозластографии: 1) возможность измерить свертывание в цельной крови, что более физиологично, чем работа с плазмой; 2) возможность измерять реальную прочность сгустка, а не условные оптические (светопропускание) характеристики; 3) возможность использовать все разнообразие активаторов свертывания и фибринолиза позволяет изучать и диагностировать нарушения разных элементов гемостаза [20].

Тест генерации тромбина позволяет оценить кинетику наработки тромбина, которая недоступна при простом наблюдении за процессом полимеризации фибрина. Наблюдение обычно проводят с помощью хромогенных или флюорогенных субстратов. Такой синтетический субстрат представляет собой молекулу, которая распознается и разрезается сериновой протеиназой. Эта реакция ведет к отщеплению от субстрата сигнальной молекулы – метки. Метка либо изменяет оптическую плотность раствора (хромогенный, то есть окрашивающий субстрат), либо способна флуоресцировать при освещении (флюорогенный субстрат). Скорость увеличения сигнала пропорциональна концентрации тромбина, так что зависимость концентрации тромбина от времени получается из экспериментальной кривой путем дифференцирования. Как правило, в этой кривой генерации тромбина выделяют два основных параметра: лаг-тайм (время задержки свертывания) и тромбиновый потенциал (площадь под кривой). Многочисленные эксперименты и испытания показали, что два эти параметра – эффективные показатели патологических процессов. Как и при тромбозластографии, результаты теста генерации тромбина существенно зависят от условий эксперимента – метода активации, концентрации активатора, использования бедной или богатой тромбоцитами плазмы (улучшения позволили проводить этот тест также и с цельной кровью [32]), а также от добавления вспомогательных веществ. Меняя эти параметры, можно выявлять разнообразные нарушения свертывания. Генерация тромбина в богатой плазме может дополнительно выявлять нарушения тромбоцитарного свертывания, успешно обнаруживая склонность к кровотечению при тромбастении Гланцманна, болезни Бернара–Сулье, приеме антитромбоцитарных препаратов. Добавление в плазму тромбомодулина делает этот тест максимально близким к условиям *in vivo*, что делает тест чувствительным даже к особенностям генерации тромбина при некоторых тромбофилических нарушениях: полиморфизм G20210A гена протромбина, последствия приема оральных контрацептивов и др. [20, 33].

Тест тромбодинамики [34–42] был разработан и использовался в качестве исследовательского ин-

струмента в течение почти двух десятилетий и стал доступен в клинической практике в 2012 году. Тромбодинамика как метод диагностики гемостаза учитывает пространственно-неоднородные процессы, происходящие при свертывании крови. Для этого образцы плазмы крови помещают в каналы измерительной кюветы, которая находится в водяном термостате. Затем в каналы кюветы вводят специальную вставку-активатор, на торце которой иммобилизован активатор свертывания – тканевый фактор. Как только плазма крови соприкасается с активатором, запускается процесс свертывания, и от локализованного на торце вставки тканевого фактора в объем плазмы начинает расти фибриновый сгусток – в точности, как на поврежденной стенке сосуда *in vivo* (в условиях малых потоков крови). Процесс возникновения и роста фибринового сгустка регистрирует в рассеянном свете цифровая видеокамера. Полученная серия кадров дает детальную информацию о динамике свертывания крови во времени и пространстве. На основе этих данных рассчитывают численные параметры пространственно-временной динамики роста фибринового сгустка: время задержки роста, скорость роста, наличие спонтанного тромбообразования (вдали от активатора). Тест тромбодинамики характеризует время задержки свертывания ( $T_{lag}$ ) – начальную фазу формирования сгустка; скорость роста сгустка (характеризует пространственную фазу формирования сгустка); плотность и размеры сгустка (характеризуют структуру фибринового сгустка, концентрацию фибриногена в плазме крови и процесс роста сгустка в целом); время образования спонтанных сгустков ( $T_{sp}$ ) (характеризует прокоагулянтный потенциал плазмы и состояние гиперкоагуляции). ТТ способен выявлять состояние гиперкоагуляции у пациентов с сепсисом, что подтверждалось последующим увеличением уровня D-димеров и тромбозами. Спонтанное свертывание и увеличение скорости роста сгустка наблюдалось у пациентов с известной степенью риска тромбозов: инфаркт миокарда, гемолитические анемии, тромбофилии, лимфомы, острые лейкозы [24, 36].

Несмотря на все преимущества уже используемых интегральных тестов, они не учитывают вклад тока крови и его взаимодействие с сосудистой стенкой и нуждаются в стандартизации, что дополнительно затруднено из-за невозможности использовать эти тесты в рутинной клинической практике. Имеется ряд и других важных недостатков. Тромбозластография нечувствительна к тромбоцитарным дефектам, работе фактора фон Виллебранда, который участвует в инициации образования сгустка, также есть подозрения, касающиеся работы фибрин-стабилизирующего XIII фактора и адекватного отображения в результатах теста эффектов низкомолекулярных гепари-

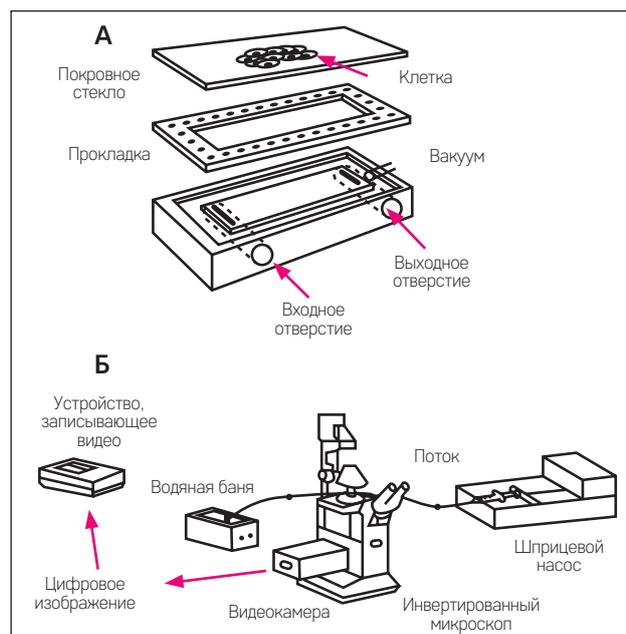
нов. Более того, между различными лабораториями была показана широкая вариабельность результатов тромбоэластографии [43, 32].

Результаты теста генерации тромбина (ТГТ) сильно зависят от представленного образца. Использование цельной крови позволит сэкономить время и снизить возможные побочные эффекты после центрифугирования при подготовке плазмы. Недостаток практического применения использования различ-

ных типов и концентраций реагентов пока не позволяет установить границы нормальных значений ТГТ для постановок теста. Отсутствие единого мнения по поводу необходимости ингибирования контактного пути активации. Ещё один важный недостаток ТГТ – отсутствие чувствительности к изменениям эндотелия [44]. На данный момент попытка воссоздания движения крови по сосудам рассматривается в экспериментах с перфузионными системами [45].

### Рисунок 3

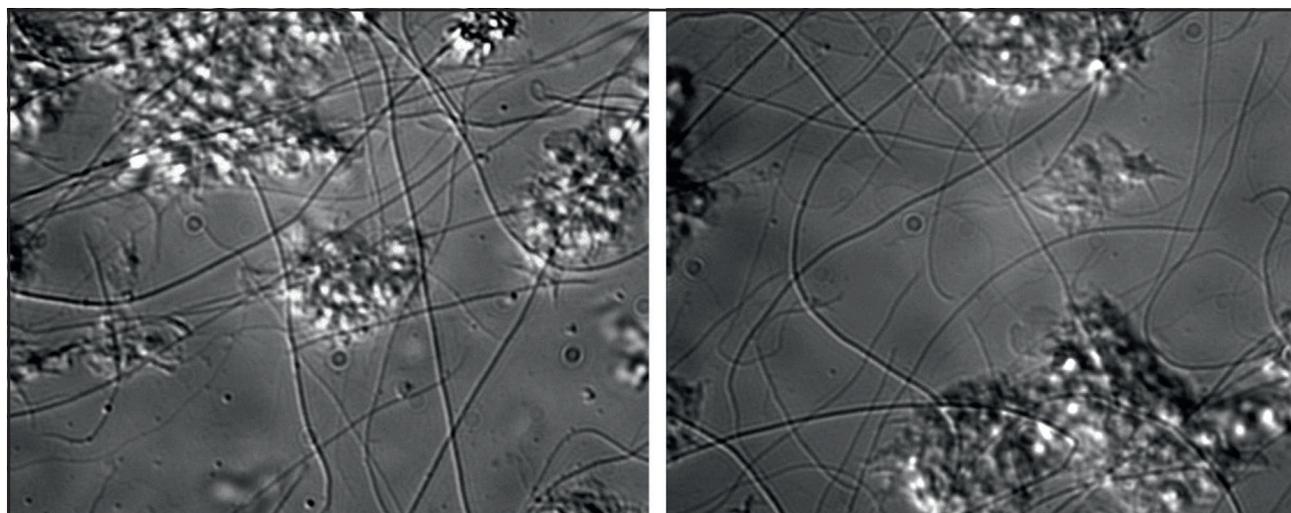
Проточная система *Lawrence и коллег* (1987)



Предназначалась для визуализации взаимодействия лейкоцитов с эндотелием. Культура клеток наносилась на покровное стекло, затем соединялась с помощью прокладки (для создания герметичности и формы канала) с предметным слайдом, имевшим входное и выходное отверстия. Водяная баня содержала суспензию клеток, которая с помощью шприцевого насоса прокачивалась через канал проточной камеры.

### Рисунок 5

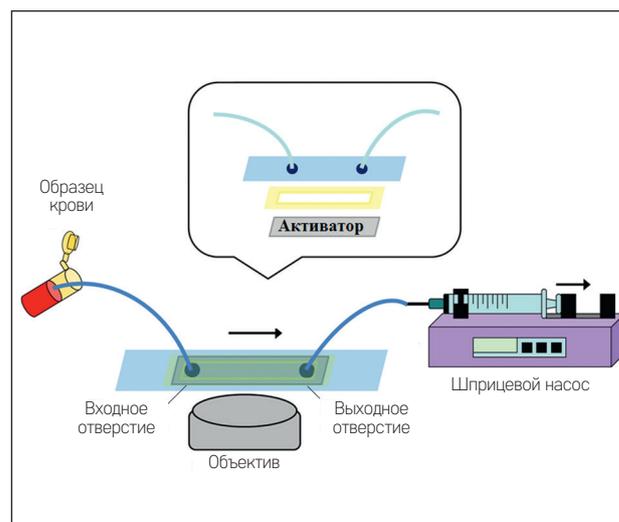
Рост тромбов в проточной камере: используемое покрытие – коллаген 1-го типа (200 мкг/мл); скорость сдвига –  $200 \text{ c}^{-1}$ ; увеличение  $\times 100$ , размер кадра –  $66 \times 49 \text{ мкм}^2$



В данном эксперименте использовалась проточная камера, через канал которой в течение 10 мин прокачивалась цельная цитратная кровь, затем канал промывали буферным раствором для удаления эритроцитов из поля зрения. Съемка проведена по окончании эксперимента.

### Рисунок 4

Проточная система с проточной камерой



Камера включает в себя пластиковый слайд с двумя отверстиями – входным и выходным, покровное стекло размером  $2,54 \times 2,54 \text{ см}$  с нанесенным на него активатором и прослойку из двустороннего скотча для герметичного соединения покровного и предметного стекол и создания формы канала. С помощью шприцевого насоса через канал сначала прокачивают буфер с альбумином для «закрытия» всех неспецифических сайтов связывания на покровных стеклах, чтобы избежать контактной активации крови со стенками канала; далее кровь из эппендорфа прокачивается через канал; тромбообразование в канале регистрируется с помощью конфокального микроскопа.

## Проточные устройства для исследования гемостаза *in vitro*

Проточные устройства представляют собой перфузионные системы, в которых моделируется ток крови по сосудам для изучения роста тромба в условиях потока. Устройство таких систем может быть разным: с одним плоским каналом или со сложной геометрией, с разными активаторами и условиями кровотока, с активаторами на стенке или в объеме крови, с постоянным потоком или постоянным давлением (или пульсирующим потоком) [46] и т. п.

Такая модель представляет особый интерес для лабораторной диагностики, она позволяет комплексно оценить систему гемостаза, то есть исследовать взаимодействие плазменного и тромбоцитарного звена при разных условиях тока крови. Это дает возможность определить клиническую значимость существующих дефектов и их сочетанное влияние на тромбообразование. Некоторые варианты таких моделей коммерчески доступны, но в лабораторной диагностике широко не используются.

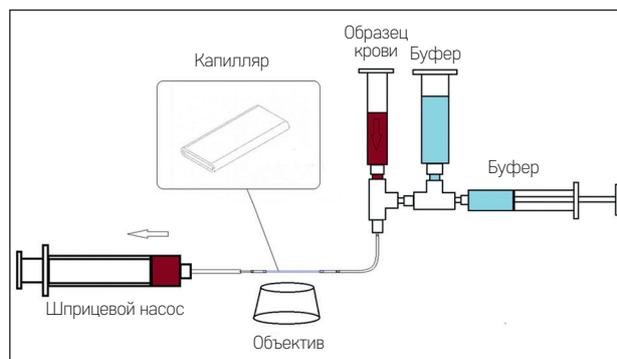
Одну из первых плоскопараллельных проточных камер представили *Lawrence* и коллеги в 1987 году (рис. 3) [47]. Устройство предназначалось для визуализации взаимодействия лейкоцитов с сосудистой стенкой. Система представляла собой непосредственно проточную камеру с подложкой, имеющей входное и выходное отверстия, и покровным стеклом с нанесенными клетками (HUVEC – *human umbilical vein endothelial cells*); между покровным стеклом и подложкой располагалась силиконовая прокладка, с помощью которой достигалась герметичность камеры и создавался канал шириной 250 микрон (рис. 3 А). Эта система включала также водяную баню с суспензией клеток, которую пропускали через камеру с помощью шприцевого насоса, подсоединенного к выходному отверстию (рис. 3 Б).

В последующие несколько десятилетий предпринимались попытки разработать альтернативные устройства; в основном это было обусловлено необходимостью охарактеризовать влияние скорости потока на клеточную адгезию в течение одного эксперимента: камера с переменной шириной потока, проточная камера с пульсирующим потоком, камера переменного по высоте потока, модификация проточной камеры с рециркуляционным руслом для минимизации использования реагента [46]. В последние несколько лет появились микрокамеры, в которых воссозданы бифуркации и другие физиологически реальные геометрические формы, например, стеноз. Эти устройства использовали для изучения адгезии лейкоцитов [48] и адгезии тромбоцитов [49]. Тем не менее ни одна из этих улучшенных проточных камер не нашла практического применения в связи с трудоемкостью изготовления и дороговизной [46].

Среди достоинств таких камер – возможность изменять скорость сдвига в потоке и использовать цельную кровь, это интегральный метод диагностики системы гемостаза, который дает информацию о гемостатическом потенциале системы свертывания, суммируя эффекты плазменного и тромбоцитарного звена [50]. На данный момент наибольшие перспективы внедрения в клиническую практику имеют пластиковые камеры с одним каналом (рис. 4, 5) либо системы, в состав которых входит стеклянная капиллярная трубка (рис. 6, 7). Последний вариант наиболее прост и быстр в изготовлении, позволяет сделать систему более надежной с точки зрения ее герметичности, минимизации случайного изменения ширины канала (а значит, сведения к нулю изменения за счет этого скорости сдвига в разных экспериментах) и попадания посторонних микрочастиц. Обе системы включают предварительную обработку бу-

### Рисунок 6

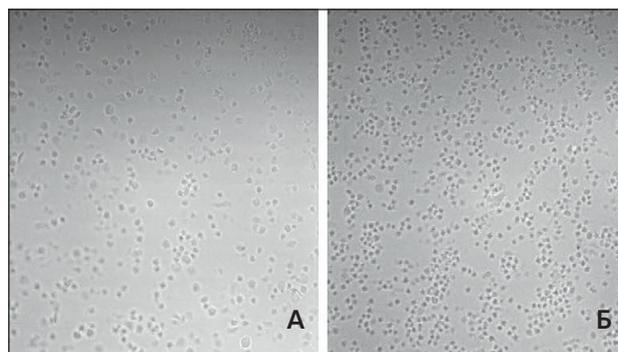
Проточная система с капиллярной трубкой



Система включает в себя стеклянный капилляр с размером сечения  $0,2 \times 2$  мм и длиной 10 см, внутрь которого предварительно вводят раствор с активатором, инкубируется на протяжении ночи для преципитации активатора к поверхности стекла, затем капилляр промывают буферным раствором с альбумином для «закрытия» сайтов связывания на стекле во избежание контактной активации крови, а также для удаления пузырей воздуха из системы. С помощью шприцевого насоса кровь прокачивается через капилляр, рост тромбов регистрируется с помощью конфокального микроскопа.

### Рисунок 7

Рост тромбов в стеклянном капилляре, используемое покрытие – фактор Виллебранда (20 мкг/мл), скорость сдвига –  $300 \text{ с}^{-1}$  (А) и  $1500 \text{ с}^{-1}$  (Б), увеличение  $\times 100$ , размер кадра –  $132,47 \times 132,47 \text{ мкм}^2$



В данном эксперименте через капилляр прокачивали цельную кровь с гирудином (1%) в течение 3 мин; съемку вели в потоке.

ферным раствором с альбумином для изоляции всех неспецифических сайтов связывания тромбоцитов.

Существуют и другие материалы для изготовления проточных систем – полидиметилсилоксан (PDMS) [51] – полимерное органическое соединение, позволяющее вырастить эндотелий внутри такой модели. Такой подход может быть интересным с точки зрения исследования тромбоцитарно-эндотелиальных взаимодействий, но на сегодняшний день является сложно осуществимым в клинической практике, так как такие варианты являются слишком затратными и трудно выполнимыми в лабораторной диагностике. Клетки требуют особых условий культивирования и постоянного наблюдения, в течение длительного времени (недели) [52], при этом сама «сосудистая сеть» требует также особой обработки перед заселением клеток: промывание стерильной эндотелиальной базальной средой, инкубирование с фибронектином при 37 °С в условиях 5% CO<sub>2</sub>. Равномерность распределения клеток регистрируется с помощью микроскопа. Еще одна сложность заключается в ежедневном обновлении питательной среды и окрашивании клеток (йодид пропидия) для проверки их жизнеспособности [53]. Однако, сами по себе PDMS камеры все же имеют ряд важных преимуществ: возможность воссоздания любых размеров и форм сосуда с множеством стенозов и бифуркаций, минимизация используемого объема крови и реагентов, экономия времени, необходимого на постановку серии экспериментов [46].

Проточные системы позволяют оценить реальные параметры: высоты, площади, объемы тромбов, а использование флуоресцентных красителей рас-

ширяет возможности диагностики, позволяя оценить вклад различных компонентов системы свертывания в формирование тромба. Например, использование аннексина V, меченного *Alexa Fluor*, который присоединяется к фосфотидилсерину, позволяет оценить степень активации тромбоцитов, а добавление в кровь DiOC6 (окрашивает внутриклеточные структуры: эндоплазматический ретикулум, мембраны везикул и митохондрий [54]) позволяет подойти к оценке тромбообразования с другой стороны, основываясь на сравнении интегральной флуоресценции тромбов, а также определить количество тромбоцитов в поле зрения [55].

Рабочая поверхность камеры может быть покрыта различным набором белков, чаще всего используются коллаген I и III типов, фактор Виллебранда, фибриноген, фибронектин, фибрин, ламинин [55, 56], а возможность применения широкого диапазона скоростей позволяет исследовать тромбообразование, как в венозных, так и в артериальных условиях тока крови.

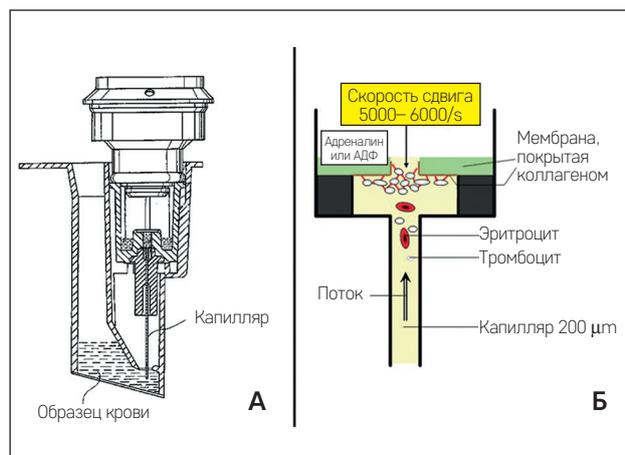
Все анализы, проводимые с проточными системами обязательно должны проводиться под контролем гематокрита и количества тромбоцитов, иначе это может привести к неверной трактовке результатов.

В настоящее время существуют два вида микрофлюидных устройств для исследования тромбообразования, которые вышли за пределы научных исследований и применяются в клинике, – PFA-100 и T-TAS.

Одним из главных доступных на рынке проточных устройств является platelet function analyzer (PFA-100, *Dade-Behring, Marburg, Germany, рис. 8*). Его рабочая область представляет собой капилляр-

**Рисунок 8**

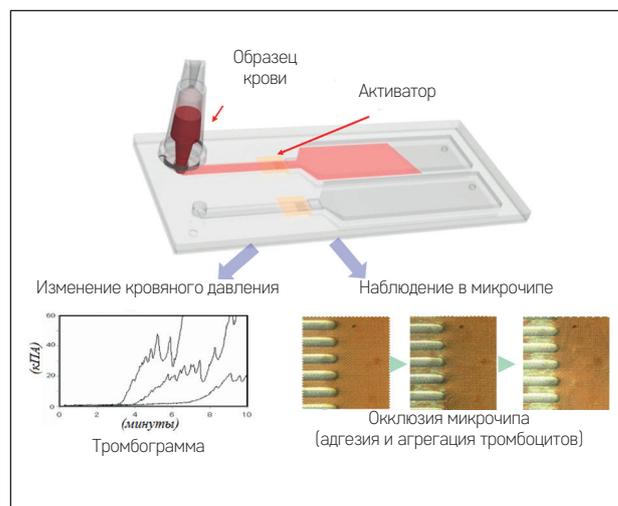
Система PFA-100: **А** – Sourav K. Kundu, 1999; **Б** – Nicoline J. Breet, Jurriën M. ten Berg, 2016



Кровь с помощью шприцевого насоса поднимается вверх по капилляру со скоростью сдвига 5000–6000 с<sup>-1</sup>. На пути тока крови капилляр сужается с 200 до 150 мкм. Сужение образовано мембраной покрытой коллагеном и адреналином/АДФ. Тромбообразование регистрируется по окклюзии отверстия тромбом и прекращению тока крови, не позволяя визуализировать сам процесс внутри капилляра.

**Рисунок 9**

Система T-TAS, Fujimori Kogyo Co. Ltd.



Данная система включает в себя чипы двух видов – PL и AR. T-TAS представляет собой проточную камеру с несколькими каналами. Тромбообразование регистрируется по изменению кровяного давления внутри канала и выводится в виде графика на мониторе.

ную трубку диаметром 200 микрон, погружённую в ёмкость с образцом цитратной крови. Цельная кровь заходит в капилляр, имеющий сверху сужение диаметром 150 микрон, и проходит через мембрану, содержащую либо коллаген и АДФ (CADP), либо коллаген с андреналином (CEPI). Прибор измеряет время, за которое происходит полное перекрытие просвета капилляра тромбоцитарным агрегатом. Результаты теста сильно зависят от уровня плазменного фактора фон Виллебранда, что делает тест чувствительным к различным подтипам болезни Виллебранда, но одновременно является и его недостатком, грубым тромбоцитарным дефектам (тромбастения Гланцмана, синдром Бернара–Сулье), антитромбоцитарным препаратам за исключением клопидогрела, к которому PFA-100 часто остается нечувствительным. Для выполнения исследования требуется небольшой объем крови, и оно занимает всего 8 мин. Однако, тест обладает низкой чувствительностью по отношению к болезням недостаточности пула хранения гранул (синдром Германского–Пудлака) и нарушениям реакции высвобождения гранул [57]. PFA-100 не чувствителен и к дефектам классических факторов свертывания (включая факторы VIII, IX и XI) [58], а также к фактору VIIa, что не позволяет использовать данный тест для мониторинга терапии рекомбинантным фактором (rFVIIa), который используется в терапии некоторых тромбоцитарных дефектов, например, тромбастения Гланцмана [59]. Исследования, проведенные Jilma B., 2001 [7], показывают, что чувствительность при анализе крови пациентов с болезнью Виллебранда или тромбастенией Гланцмана с помощью PFA-100 и агрегометра составляла 96 против 80%. Согласно тем же исследователям, при гематокрите 10% и ниже (в норме у мужчин 40–48%, а у женщин 36–46%) и при тромбоцитопении  $10 \times 10^9$  1/л окклюзии капилляра происходить не будет, что можно использовать для определения необходимости в трансфузиях. PFA-100, также, как и все проточные устройства, не позволяет диагностировать какое-то специфическое расстройство, поэтому время закрытия просвета капилляра тромбом должно быть интерпретировано в сочетании с коагулограммой. [57] Более того, на результаты этого теста может влиять способ взятия крови, существуют подозрения, что использование вакуумных пробирок может приводить к изменению результатов анализа [60].

Еще один коммерчески доступный вариант проточных систем – T-TAS, плоскопараллельная проточная камера с прямоугольным сечением (ширина – 300 мкм, высота – 80 мкм, длина – 15 мм) и микроципами, имеющими тромбогенные покрытия – *platelet chip* ([PL] с коллагеном) и *atheroma chip* ([AR] с коллагеном и тканевым фактором), и несколькими каналами для перфузии крови (рис. 9). Степень окклюзии

определяется по изменению давления в канале и отражается на мониторе в виде графика. Исследования M. Ito, et al. (2016), показывают, что AR чипы можно успешно использовать для мониторинга эффектов антикоагулянтной терапии (варфарин, гепарин, NOACs), а PL чипы – для мониторинга антитромботической терапии (аспирин, клопидогрел, прасугрел) у пациентов с ишемической болезнью сердца [8].

Проточные системы можно использовать для диагностики у пациентов при не явно выраженном геморрагическом анамнезе, а также при индивидуальном подборе доз антикоагулянтных и антитромбоцитарных препаратов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Главные критерии, необходимые для внедрения проточных систем в клиническую практику, – высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость. Тест должен быть чувствителен к различным по выраженности патологиям гемостаза и отображать наличие даже тех патологий, которые не проявляют себя в повседневной жизни. Специфичность теста – это способность диагностического метода не давать ложноположительных результатов, иначе говоря, его надежность. Для этого должны быть определены критерии оценки и точный протокол. И разумеется, такой тест должен демонстрировать одинаковую картину при проведении повторных проб.

Проточные системы еще далеки от внедрения в широкую клиническую практику, они работают далеко не идеально, не стандартизированы и не валидированы полноценно, но в долгосрочной перспективе, возможно, станут надежным методом глобальной диагностики системы гемостаза. Данный метод не выявляет природу нарушений и требует проведения дополнительных анализов для постановки диагноза, но потенциально способен дать критически важную информацию о состоянии системы гемостаза, необходимую для принятия клинических решений. Несмотря на то что до полноценного клинического внедрения этих камер еще далеко, они уже сегодня могут быть полезны врачу, заинтересованному в научной работе или получении дополнительной информации.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом эндаунтмент-фонда «Врачи, инновации, наука – детям», грантами РФФИ 16-04-01163 и 17-04-01309, грантами Президента РФ для молодых ученых МК-2706.2017.4 и МД-229.2017.4

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

### ORCID

М.А. Пантелеев <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

## Литература

1. Полохов Д.М., Пантелеев М.А. Современные подходы в лабораторной диагностике тромбоцитарного гемостаза. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe* 2016; 2: 270–90.
2. Shen F., Kastrup C.J., Liu Y., Ismagilov R.F. Threshold response of initiation of blood coagulation by tissue factor in patterned microfluidic capillaries is controlled by shear rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2035–41.
3. Andree H.A., Contino P.B., Repke D., Gentry R., Nemerson Y. Transport rate limited catalysis on macroscopic surfaces: the activation of factor X in a continuous flow enzyme reactor. *Biochemistry* 1994; 33: 4368–74.
4. Katoh S., Matsubara I., Sada E. Effect of shear rate on activation rate of factor X. *Ann Biomed Eng* 1978; 6: 60–7.
5. Ilkan Z., Wright J.R., Goodall A.H., Gibbins J.M., Jones C.I., Mahaut-Smith M.P. Evidence for shear-mediated Ca<sup>2+</sup> entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line. *J Biol Chem* 2017; 292: 9204–17.
6. Ruggeri Z.M., Orje J.N., Habermann R., Federici A.B., Reininger A.J. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 2006; 108: 1903–10.
7. Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 152–63.
8. Ito M., Kaikita K., Sueta D., Ishii M., Oimatsu Y., Arima Y., Iwashita S., et al. Total Thrombus-Formation Analysis System (T-TAS) Can Predict Periprocedural Bleeding Events in Patients Undergoing Catheter Ablation for Atrial Fibrillation. *J Am Heart Assoc* 2016; 5.
9. Ruggeri Z.M. Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 257–79.
10. Qiu Y., Ciciliano J., Myers D.R., Tran R., Lam W.A. Platelets and physics: How platelets "feel" and respond to their mechanical microenvironment. *Blood Rev* 2015; 29: 377–86.
11. Siedlecki C.A., Lestini B.J., Kottke-Marchant K.K., Eppell S.J., Wilson D.L., Marchant R.E. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996; 88: 2939–50.
12. Stocksclaeder M., Schneppenheim R., Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014; 25: 206–16.
13. Jackson S.P. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109: 5087–95.
14. Gale A.J. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol* 2011; 39: 273–80.
15. Kauskot A., Hoylaerts M.F. Platelet receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2012; 23–57.
16. Thon J.N., Italiano J.E. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol* 2012; 3–22.
17. Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. Свертывание крови: биохимические основы. *Клиническая онкогематология* 2008; 1: 50–62.
18. Vadivel K., Bajaj S.P. Structural biology of factor VIIa/tissue factor initiated coagulation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17: 2476–94.
19. Renne T., Schmaier A.H., Nickel K.F., Blomback M., Maas C. In vivo roles of factor XII. *Blood* 2012; 120: 4296–303.
20. Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. Свертывание крови: методы исследования и механизмы регуляции (часть 2). *Клиническая онкогематология* 2008; 1: 174–81.
21. Stalker T.J., Newman D.K., Ma P., Wannemacher K.M., Brass L.F. Platelet signaling. *Handb Exp Pharmacol* 2012; 59–85.
22. Lopez J.A., Andrews R.K., Afshar-Kharghan V., Berndt M.C. Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998; 91: 4397–418.
23. Воробьев А.И. Руководство по гематологии в 3-х тт. – М.: Изд. "Нью-диамед" 2002.
24. Lipets E.A.F. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thrombosis journal* 2015; 13: 15.
25. Lawson C.A., Yan S.D., Yan S.F., Liao H., Zhou Y.S., Sobel J., Kisiel W., et al. Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest* 1997; 99: 1729–38.
26. de Groot P.G., Urbanus R.T., Roest M. Platelet interaction with the vessel wall. *Handb Exp Pharmacol* 2012; 87–110.
27. Panizza R., Priora R., Liotta A.A., Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag* 2015; 11: 133–48.
28. Lippi G., Favaloro E.J., Salvagno G.L., Franchini M. Laboratory assessment and perioperative management of patients on antiplatelet therapy: from the bench to the bedside. *Clin Chim Acta* 2009; 405: 8–16.
29. Haas T., Spielmann N., Mauch J., Madjdpour C., Speer O., Schmutz M., Weiss M. Comparison of thromboelastometry (ROTEM(R)) with standard plasmatic coagulation testing in paediatric surgery. *Br J Anaesth* 2012; 108: 36–41.
30. Cuker A., Siegal D.M., Crowther M.A., Garcia D.A. Laboratory measurement of the anticoagulant activity of the non-vitamin K oral anticoagulants. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64: 1128–39.
31. Липец Е.Н., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. Интегральные лабораторные тесты гемостаза в диагностике гиперкоагуляции и оценке риска тромбоза. *Онкогематология* 2015; 10: 73–91.
32. Lance M.D. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb J* 2015; 13: 1.
33. Kyrle P.A., Mannhalter C., Beguin S., Stumpflen A., Hirschl M., Weltermann A., et al. Clinical studies and thrombin generation in patients

- homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1287–91.
34. Dashkevich N.M., Ovanesov M.V., Balandina A.N., Karamzin S.S., Shestakov P.I., Soshitova N.P., Tokarev A.A., et al. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys J* 2012; 103: 2233–40.
  35. Dashkevich N.M., Vuimo T.A., Ovsepyan R.A., Surov S.S., Soshitova N.P., Panteleev M.A., Ataulakhanov F.I., et al. Effect of pre-analytical conditions on the thrombodynamics assay. *Thromb Res* 2014; 133: 472–6.
  36. Lipets E., Vlasova O., Urnova E., Margolin O., Soloveva A., Ostapushchenko O., Andersen J., 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: e87692.
  37. Ovanesov M.V., Panteleev M.A., Sinauridze E.I., Kireev D.A., Plyushch O.P., Kopylov K.G., Lopatina E.G., et al. Mechanisms of action of recombinant activated factor VII in the context of tissue factor concentration and distribution. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19: 743–55.
  38. Panteleev M.A., Dashkevich N.M., Ataulakhanov F.I. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* 2015; 136: 699–711.
  39. Panteleev M.A., Ovanesov M.V., Kireev D.A., Shibeko A.M., Sinauridze E.I., Ananyeva N.M., Butylin A.A., et al. Spatial propagation and localization of blood coagulation are regulated by intrinsic and protein C pathways, respectively. *Biophys J* 2006; 90: 1489–500.
  40. Parunov L.A., Fadeeva O.A., Balandina A.N., Soshitova N.P., Kopylov K.G., Kumskova M.A., Gilbert J.C., et al. Improvement of spatial fibrin formation by the anti-TFPI aptamer BAX499: changing clot size by targeting extrinsic pathway initiation. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1825–34.
  41. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Panteleev M.A., Krymskaya O.V., Ataulakhanov F.I. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007; 97: 425–34.
  42. Soshitova N.P., Karamzin S.S., Balandina A.N., Fadeeva O.A., Kretchetova A.V., Galstian G.M., Panteleev M.A., et al. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23: 498–507.
  43. Solomon C., Asmis L.M., Spahn D.R. Is viscoelastic coagulation monitoring with ROTEM or TEG validated? *Scand J Clin Lab Invest* 2016; 76: 503–7.
  44. Duarte R.C.F., Ferreira C.N., Rios D.R.A., Reis H.J.D., Carvalho M.D.G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2017; 39: 259–65.
  45. Panteleev M.A., Hemker H.C. Global/integral assays in hemostasis diagnostics: promises, successes, problems and prospects. *Thromb J* 2015; 13: 5.
  46. Prabhakarandian B., Shen M.C., Pant K., Kiani M.F. Microfluidic devices for modeling cell-cell and particle-cell interactions in the microvasculature. *Microvasc Res* 2011; 82: 210–20.
  47. Lawrence M.B., McIntire L.V., Eskin S.G. Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* 1987; 70: 1284–90.
  48. Schaff U., Mattila P.E., Simon S.I., Walcheck B. Neutrophil adhesion to E-selectin under shear promotes the redistribution and co-clustering of ADAM17 and its proteolytic substrate L-selectin. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 99–105.
  49. Runyon M.K., Johnson-Kerner B.L., Ismagilov R.F. Minimal functional model of hemostasis in a biomimetic microfluidic system. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43: 1531–6.
  50. Neeves K.B., Onasoga A.A., Wufsus A.R. The use of microfluidics in hemostasis: clinical diagnostics and biomimetic models of vascular injury. *Curr Opin Hematol* 2013; 20: 417–23.
  51. Prabhakarandian B., Pant K., Scott R.C., Pattillo C.B., Irimia D., Kiani M.F., Sundaram S. Synthetic microvascular networks for quantitative analysis of particle adhesion. *Biomed Microdevices* 2008; 10: 585–95.
  52. Isenberg B.C., Williams C., Tranquillo R.T. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng* 2006; 34: 971–85.
  53. Rosano J.M., Touse N., Scott R.C., Krynska B., Rizzo V., Prabhakarandian B., Pant K., et al. A physiologically realistic in vitro model of microvascular networks. *Biomed Microdevices* 2009; 11: 1051–7.
  54. Koning A.J., Lum P.Y., Williams J.M., Wright R. DiOC6 staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993; 25: 111–28.
  55. van Kruchten R., Cosemans J.M., Heemskerk J.W. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers – a practical guide. *Platelets* 2012; 23: 229–42.
  56. Neeves K.B., Maloney S.F., Fong K.P., Schmaier A.A., Kahn M.L., Brass L.F., Diamond S.L. Microfluidic focal thrombosis model for measuring murine platelet deposition and stability: PAR4 signaling enhances shear-resistance of platelet aggregates. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 2193–201.
  57. Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol* 2005; 130: 3–10.
  58. Favaloro E.J. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34: 709–33.
  59. Poon M.C., d'Oiron R., Hann I., Negrier C., de Lumley L., Thomas A., Karafoulidou A., et al. Use of recombinant factor VIIa (NovoSeven) in patients with Glanzmann thrombasthenia. *Semin Hematol* 2001; 38: 21–5.
  60. Lippi G., Ippolito L., Zobbi V., Sandei F., Favaloro E.J. Sample collection and platelet function testing: influence of vacuum or aspiration principle on PFA-100 test results. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24: 666–9.

# Liquid Biopsy in Pediatric Brain Cancers: A Theragnostic Opportunity

J. Nazarian<sup>1</sup>, A.E. Druy<sup>2, 3</sup>, L.A.Yasko<sup>2</sup>, L.I. Papusha<sup>2</sup>, G.A. Novichkova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Children's National Health System, Washington

<sup>2</sup>Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

<sup>3</sup>Research Institute Of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg

## Correspondence:

Alexander E. Druy, MD, PhD, senior researcher Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russian Federation. Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1  
Tel.: +7 (495) 287-6570, ext. 5427  
E-mail: Dr-Drui@yandex.ru

Pediatric brain tumors are amongst the most challenging childhood cancers. This challenge is posed by tumor's sensitive anatomical location, relative rapid progression, and lack of sensitive disease monitoring system. Current tumor diagnostic and monitoring including MR imaging often lack sensitivity, fail to detect early recurrence, and requires general anesthesia when used for in young children. Liquid biopsy, where serum, plasma or cerebrospinal fluid (CSF) is used for detection of circulating tumor DNA (ctDNA) is emerging as a platform for therapeutic and diagnostic (theragnostic) tumor monitoring. Liquid biopsy provides a non-to-minimally invasive method that is sensitive, specific, cost effective approach for monitoring tumor growth, relapse and response to treatment. In this review, we will discuss liquid biopsy, and its current use and its potential for theragnostic use in childhood CNS malignancies.

**Key words:** *liquid biopsy, circulating tumor DNA, pediatric neurooncology.*

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-130-132

## Molecular biology

Recently, there has been a substantial expansion of our understanding of the biology of childhood CNS cancers. This includes, the detailed molecular sub classification of medulloblastoma [1], ependymoma [2] and gliomas [3]. These discoveries have resulted in reclassification of pediatric CNS cancers by the World Health Organization (WHO) [4, 5]. As such, tumor classification is informed by molecular aberrations of each tumors type. For example, diffuse gliomas are classified into new subclasses including H3K27M mutant midline gliomas, IDH wild-type glioblastoma, IDH-mutant glioblastoma, while medulloblastoma are sub classified based on gene alterations including WNT, SHH-activated and TP53 mutant, SHH-activated ad TP53 wild-type, non-WNT/non-SHH [6, 7]. Such findings has provided a new opportunity to establish personalized or precision medicine where a mutation or a group of mutations are targeted. In contrast, traditional approach where histological characterization driven therapy, a 'crop dusting' approach was often applied (e.g. all WHO grade V gliomas treated with the same drug). Indeed, such approach has failed as in indicated by over 45 years of unsuccessful clinical trials.

Given the novelty of these molecular findings, new molecularly-informed approaches are needed to integrate the biology in clinical decision makings. For example, despite such advancement in profiling the molecular characterization of pediatric CNS cancers, to date, clinical interventions heavily rely on MR imaging or, at best, the molecular profiling of (biopsied, debulked) tumor specimen. Both MR imaging and surgical access have specific limitations. Precisely, MR imaging lacks resolution for detecting tumor recurrence; conflicts pseudo progression with actual progression; and often not suitable for frequent tumor monitoring in young patients who require general anesthesia for MR imaging. Surgical resection or biopsy procedures are often not applicable for recurrent tumors or tumors with anatomically sensitive locations (e.g. brainstem). Thus, while our knowledge of biological tumor classification has greatly improved, such classifications are yet to translate to clinical settings where tumor genome aberrations are used to drive therapeutic decisions. Here, we discuss the potential of liquid biopsy as a complementary to at times substitution for MRI and surgical interventions.

### Circulating Tumor DNA

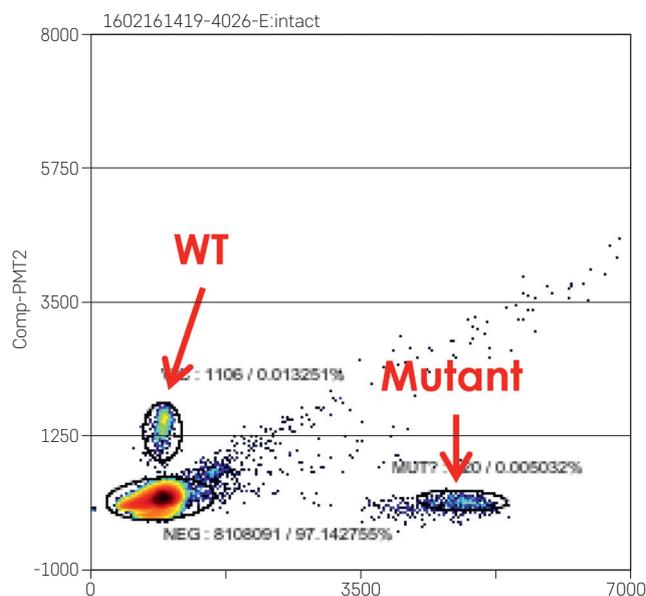
Circulating tumor DNA (ctDNA) is often referred to as detectable nucleic acid that is detectable in circulating bodily fluids. Such fluids (also referred to as biofluids) may include cerebrospinal fluid (CSF), serum, plasma, and urine. Analysis of circulating DNA has also been defined as cell free DNA (ctDNA) assuming that detectable nucleic acid is a direct contribution of circulating tumor cells. Moreover, exosomes-cell secreted nanoparticles- are also thought to contribute to ctDNA detected in biofluids. Another likely source of ctDNA is tumor cell lysis due to apoptosis or medical interventions. While most tested (CSF, plasma, urine) biofluids contain detectable levels of tumor associated DNA, the exact source of ctDNA is not fully recognized [8]. Moreover, the exact contributor (cell free, exosome, tumor cells lysis) to ctDNA may be highly cancer-type depended where a highly vascularized and metastatic-prone cancers contribute more cells or nucleic acid to the biofluid [9]. Thus, more research is needed in order to identify ctDNA source specific to each tumor type as well as the most suitable medium (CSF, Plasma, Urine, etc) for tumor surveillance. Digital droplet PCR (ddPCR) is one of the most sensitive methods of detection and quantification of ctDNA when compared to Sanger sequencing, quantitative PCR, and next generation sequencing platforms [10]. For example, while Sanger sequencing of H3F3A mutation in CSF of DIPG patients is feasible, such an approach does not allow for calculating mutation allelic frequencies and lacks sensitivity for clinical applications [11, 12].

### ctDNA in pediatric CNS cancers

Despite the recent surge of data indicating the presence, identification and characterization of ctDNA in major adult cancers, pediatric brain cancers remain as a relatively unexplored area for the theragnostic potential of ctDNAs [13–18]. For example, a recent study has shown the possibility of identification of histone 3 (H3k27M) using CSF of patients diagnosed with DIPG [11]. However, such methodologies have yet to be translated to minimally (plasma) to non-invasive (urine) and more comprehensive multiplexing (e.g. major DIPG driver mutations) that identify tumor's driver and its' partner mutations [19]. Unpublished data from us and our collaborators, show the high potential of detecting histone mutation in plasma and CSF collected from DIPG patients (*Figure*). Our data indicate the high concentration of ctDNA in CSF compared to plasma, however, confirms the suitability of plasma as a clinically relevant medium for studying tumor biology. Such studies stress the emerging role of liquid biopsy as a non-invasive alternative to study childhood CNS cancers.

### Figure

ddPCR analysis of plasma obtained from a patient diagnosed with DIPG identified histone K27M mutant (Mutant) as well as the healthy wild type (WT) copy using circulating DNA



### Potentials of liquid biopsy for theragnostic

Theranostic is an emerging field that intends to deliver therapy and diagnostics on the same platform [20–22]. In the case of liquid biopsy, one could envision that identification of tumor associated mutations result in personalized treatment (Therapy), where on the other hand, liquid biopsy could predict recurrence (diagnostics), hence delivering theragnostic values to the field of pediatric oncology. Such methodology could be beneficial in many clinical cases such as midline gliomas where surgery or biopsy are not routinely performed as well as aggressive recurrent embryonal tumors where recurrence is assessed by MRI. Perhaps early detection of tumor recurrence by liquid biopsy will both eliminate the complexities associated with MR imaging (e.g. anesthesia) and provide a more rapid and cost effective approach for tumor surveillance.

### Conclusions

Oncological diagnosis, treatment and response monitoring are major components of delivering effective treatments for childhood CNS cancers. MR imaging is the current state-of-art for diagnosis, monitoring response and assessing relapse. Given limitations associated with MR imaging associated above, there is a dire need to incorporate emerging technologies for the treatment of childhood CNS cancers. Given our current observation of liquid biopsy as a promising platform and the need for improving clinical assessment of tumor biology, response, growth and recurrence, we highly recommend the integration of such resources in the routine assessments of clinical oncology.

## References

- Taylor M.D., Northcott P.A., Korshunov A., Remke M., Cho Y.J., Clifford S.C., et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2012 Apr; 123 (4): 465–72.
- Pajtler K.W., Mack S.C., Ramaswamy V., Smith C.A., Witt H., Smith A., et al. The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. *Acta Neuropathol* 2017 Jan; 133 (1): 5.
- Sturm D., Pfister S.M., Jones D.T.W. Pediatric Gliomas: Current Concepts on Diagnosis, Biology, and Clinical Management. *J Clin Oncol* 2017 Jul 20; 35 (21): 2370–7.
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016 Jun; 131 (6): 803–20.
- Gupta A., Dwivedi T. A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. *J Neurosci Rural Pract* 2017 Oct-Dec; 8 (4): 629–41.
- Lopez G.Y., Oberheim Bush N.A., Phillips J.J., Bouffard J.P., Moshel Y.A., Jaeckle K. Diffuse midline gliomas with subclonal H3F3A K27M mutation and mosaic H3.3 K27M mutant protein expression. *Acta Neuropathol* 2017 Dec; 134 (6): 961–3.
- Wesseling P., Capper D. WHO 2016 Classification of Gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2017 Aug; 16.
- Connolly I.D., Li Y., Gephart M.H., Nagpal S. The "Liquid Biopsy": the Role of Circulating DNA and RNA in Central Nervous System Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016 Mar; 16 (3): 25.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4; 144 (5): 646–74.
- Benesova L., Belsanova B., Suchanek S., Kopeckova M., Minarikova P., Lipska L., et al. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal Biochem* 2013; 433: 227–34.
- Diaz L.A., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014 Feb 20; 32 (6): 579–86.
- Huang T.Y., Piunti A., Lulla R.R., Qi J., Horbinski C.M., Tomita T., et al. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun* 2017 Apr 17; 5 (1): 28.
- Dawson S.J., Tsui D.W., Murtaza M., et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 1199–209.
- Delgado P.O., Alves B.C., Gehrke Fde S. Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2013; 34: 983–6.
- Hashad D., Sorour A., Ghazal A. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J Clin Lab Anal* 2012; 26: 467–72.
- Taniguchi K., Uchida J., Nishino K. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 7808–15.
- Sozzi G., Boeri M. Potential biomarkers for lung cancer screening. *Transl lung cancer Res* 2014; 3: 139–48.
- Zaporozhchenko I.A., Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Laktionov P.P. The potential of circulating cell-free RNA as cancer biomarker: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn* 2018 Jan; 15: 1–13.
- Nikbakht H., Panditharatna E., Mikael L.G., Li R., Gayden T., Osmond M., et al. Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Commun* 2016 Apr 6; 7: 11185.
- Armengol C., Cairo S. Identification of theranostic biomarkers to improve the stratification of patients with pediatric liver cancer: Opportunities and challenges. *Hepatology* 2018 Jan 12.
- Peneta M., Chena Z., Kakkada S., Pompera M.G., Bhujwalla Z.M. Theranostic imaging of cancer. *Eur J Radiol* 2012 Sep; 81 (01): S124–S126.
- Ghorbani M., Bigdeli B., Jalili-Baleh L., Baharifar H., Akrami M., Dehghani S. Curcumin-lipoic acid conjugate as a promising anticancer agent on the surface of gold-iron oxide nanocomposites: A pH-sensitive targeted drug delivery system for brain cancer theranostics. *Eur J Pharm Sci* 2017 Dec 14; 114: 175–88.