

Новые направления в терапии и диагностике нарушений свертывания

А.М. Шибеко, А.Н. Баландина, М.А. Пантелеев

ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Вслед за появлением новых подходов в исследовании свертывания крови, позволяющих выявлять механизмы регуляции, связанные с транспортными процессами, пространственной локализацией процессов, взаимодействием с системами иммунитета, комплемента, фибринолизом, меняются и диагностические и терапевтические подходы, используемые в клинико-лабораторной практике. В данном обзоре будут описаны современные методы диагностики нарушений гемостаза, основанные на интегральном подходе и оценивающие сразу множество аспектов состояния системы свертывания, чувствительные не только к проявлениям кровоточивости, но и к протромботическим состояниям, а также позволяющие производить мониторинг терапии различными лекарственными препаратами, как оральными антикоагулянтами, так и антигемофильными агентами. Также будет рассказано о новых подходах в терапии нарушений гемостаза, связанных с пониманием управляющих механизмов, таких как использование биспецифичных антител как альтернативы кофакторам свертывания, ингибирование ингибиторов и разработка новых методов доставки препаратов.

Ключевые слова: лабораторные тесты, мониторинг терапии, свертывание крови, антикоагулянты, гемофилия

Шибеко А.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020; 19 (4): 243–250.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-243-250

New approaches to the diagnosis and treatment of coagulation disorders

A.M. Shibeko, A.N. Balandina, M.A. Panteleev

Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow
Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

With the advent of new approaches in coagulation studies capable of identifying regulatory mechanisms involved in transport processes, the spatial localization of processes and interaction between the coagulation system and the immune system, the complement system, and fibrinolysis, the existing diagnostic and treatment approaches used in clinical and laboratory practice are changing as well. This review describes modern diagnostic methods for hemostasis disorders that are based on an integrative approach and are used to assess many aspects of the coagulation system at once. The reviewed methods are sensitive not only to bleeding but also to prothrombotic states, and enable monitoring of treatment with various medications including both oral anticoagulants and antihemophilic agents. We will also cover new approaches to the treatment of hemostasis disorders made possible by the understanding of the involved control mechanisms, such as the use of bispecific antibodies as an alternative to coagulation cofactors, the inhibition of inhibitors and the development of new drug delivery techniques.

Key words: laboratory testing, treatment monitoring, coagulation, anticoagulants, hemophilia

Shibeko A.M., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020; 19 (4): 243–250.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-243-250

Смертность от проблем сердечно-сосудистой системы, таких как тромбозы и кровотечения, а также от сопутствующих им осложнений, инфарктов и инсультов, прочно занимает 1-е место в мире [1]. Своевременная диагностика нарушений свертывания крови, подбор лекарственного препарата, лабораторный контроль его эффективности необходимы для улучшения качества жизни и снижения смертности среди населения.

Трансляция фундаментальных представлений об устройстве системы свертывания, механизмах ее регуляции и взаимодействии с такими близкими системами, как комплемент и иммунитет, привела к

появлению новых подходов в разработке терапевтических препаратов – антикоагулянтов нового типа, препаратов против кровотечений, не вызывающих иммунного ответа, не требующих внутривенного введения, обладающих пролонгированным действием, или даже в рамках генной терапии потенциально способных излечить заболевание, а не временно купировать симптомы.

Одновременно с развитием терапии не стоят на месте и методы лабораторного контроля состояния гемостаза. Интегральные методики показывают не уровень отдельного фактора в крови безотносительно всего остального, а оценивают цельную картину. С их

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 19.03.2020
Принята к печати 20.05.2020

Контактная информация:

Шибеко Алексей Михайлович,
канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: alshibeko@gmail.com

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»
Received 19.03.2020
Accepted 20.05.2020

Correspondence:

Alexey M. Shibeko,
PhD, leading researcher, laboratory of biophysics, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: alshibeko@gmail.com

помощью можно определить риски кровоточивости или тромбоза, они обладают чувствительностью к большей части про- и антикоагулянтных препаратов и позволяют проводить персонализированный подбор препарата и его дозировки у пациента.

В данном обзоре будут освещены основные тенденции в разработке новых методов в лечении нарушений гемостаза и описаны методы лабораторной диагностики, позволяющие наиболее точно диагностировать состояние пациента и эффективно контролировать терапию.

Лекарственная регуляция системы свертывания крови

Механизмы нарушения свертывания крови и принципы их коррекции

Существует 2 основных типа нарушений свертывания крови: коагулопатия (гипокоагуляция, тенденция к кровоточивости) и протромботическое состояние (гиперкоагуляция, тенденция к образованию тромбов). Первое возникает при дефиците факторов свертывания, связанных с генетическими заболеваниями (гемофилии А и В, дефицит фактора VIII или IX соответственно), израсходовании факторов при больших кровопотерях или при диссеминированном внутреннем свертывании (коагулопатия потребления).

Стандартный способ лечения коагулопатии – заместительная терапия. Гемофилии А и В лечат переливанием отсутствующего фактора [2]; при коагулопатии потребления (дефицит множества факторов, возникающий, например, при диссеминированном внутрисосудистом свертывании) [3] или при массивных кровопотерях переливают плазму крови и ее компоненты – клетки: тромбоциты, эритроциты [4]. Заместительная терапия, однако, не всегда возможна: иногда при лечении гемофилии возникают антитела к переливаемому фактору (или они развиваются сами, приводя к приобретенной гемофилии), в таких случаях используют шунтирующую терапию, заключающуюся в инфузиях высоких концентраций активированного фактора VIIa или активированного протромбинового комплекса [5]. Смысл такой терапии в том, чтобы «обойти» неработающий участок системы свертывания и запустить генерацию тромбина через «шунт»: в случае терапии фактором VIIa его высокие концентрации напрямую активируют фактор X [6], что делает образование комплекса внутренней теназы (VIIIa:IXa) необязательным; в случае переливания активированного протромбинового комплекса он напрямую активирует тромбин.

Причина возникновения протромботических состояний не столь ясна. Она может быть связана как с дефицитом ингибиторов свертывания (довольно редко), так и с повышенным уровнем циркулирующих

в крови микровезикул с фосфолипидной поверхностью, на которых происходит сборка мембранных комплексов – теназы и протромбиназы. На везикулах могут присутствовать тканевый фактор (ТФ), фактор XIa и некоторые другие активные факторы, которые также усиливают свертывание [7]. Другой причиной возникновения протромботических состояний могут быть нарушения системы фибринолиза, например повышенный уровень ингибитора активатора плазминогена [8].

Поскольку при протромботических состояниях имеется избыток ферментов (активированных факторов свертывания), их терапия сложнее, чем при коагулопатиях. Один из вариантов – это уменьшение концентрации факторов свертывания в крови (варфарин и подобные ему антагонисты витамина К нарушают синтез ряда факторов свертывания в печени); другая опция – усиление ингибирования свертывания гепаринами (кофактор общего ингибитора системы свертывания крови антитромбина) или введением прямых ингибиторов тромбина (дабигатран, аргатробан) или фактора Ха (ривароксабан, апиксабан).

При этом избыток заместительной терапии при коагулопатии может привести к тромбозам или вызвать иммунный ответ (выработку антител к переливаемому фактору), а некорректная доза антикоагулянта при протромботическом состоянии – к кровотечениям. А использование прямых антикоагулянтов связано с такой проблемой, как отсутствие контроля за состоянием гемостаза. Несмотря на то, что производители препаратов и постулируют отсутствие необходимости мониторинга их эффективности, но, например, при терапии дабигатраном международное нормализованное отношение (МНО), которое используют для оценки гемостаза при терапии антагонистами витамина К, на пике активности повышается до 3,5, а уже через 12 ч после приема снижается до 1 у здоровых добровольцев [9]. В случае повышенного риска тромбоза МНО может быть меньше 1, и тогда на терапии дабигатраном состояние пациента будет в течение дня колебаться между гиперкоагуляцией (МНО < 1) и гипокоагуляцией (МНО > 1,5).

Разумным способом коррекции было бы точечное воздействие на систему гемостаза в целях устранения локального нарушения без воздействия на нее в целом.

Новые подходы в терапии

Одним из новых подходов в разработке препаратов для коррекции гемостаза стал поиск не прямых мишеней, на которые воздействует лекарство. Так, для лечения гемофилии одно время разрабатывался аптамер, связывающийся с ингибитором пути ТФ (ТФПИ) [10]. Этот олигонуклеотид связывается с

ТФПИ и предотвращает ингибирование фактора Ха и внешней теназы, тем самым улучшая свертывание в модели гемофилии на обезьянах. Однако он приводил к многократному повышению уровня свободного полноразмерного ТФПИ в организме и вызывал кровотечения [11], что стало причиной прекращения клинических испытаний. Но зато его аналог – человеческое моноклональное антитело к ТФПИ, которое связывается с доменом ТФПИ K2, предотвращая его взаимодействие с фактором Ха, показало безопасность, толерантность и благоприятную фармакокинетику и фармакодинамику у здоровых добровольцев [12], а исследования *ex vivo* на крови гемофиликов показали, что его способность восстанавливать гемостаз сопоставима с эффектом заместительной терапии [13].

Другим способом терапии гемофилии стала разработка биспецифичного антитела к активированному фактору IXa и фактору X, которое выполняет функцию отсутствующего при гемофилии А фактора VIIIa, связывая факторы IXa и X [14]. Вводимый подкожно этот препарат показал свою эффективность у пациентов с ингибиторной формой гемофилии [15].

Наблюдения показали, что дефицит факторов XI и XII приводит к легкому кровотечению по сравнению с дефицитом других факторов свертывания крови, а повышенные уровни фактора XI являются фактором риска тромбоэмболии. Из этого возникла гипотеза, что ингибиторы факторов XIa и XIIa могут стать новым средством терапии тромбозов [16, 17]. Так, ингибитор фактора XIIa инфестин-4 предотвращает окклюзивные артериальные тромбозы, не оказывая влияния на кровотечения [18]. Схожими эффектами обладает и ингибитор фактора XIa, который останавливает образование тромбов в артериях и венах в модели тромбоза FeCl₃, не влияя на ТФ-зависимый гемостаз [19].

Помимо поиска новых целей и способов коррекции гемостаза имеются тренды, направленные на улучшение уже имеющихся методов. К ним можно отнести удлинение времени жизни препарата в организме. Это достигается пришивкой факторов к липосомам, модифицированным полиэтиленгликолем [20], что позволяет удвоить время действия препарата. Однако иногда терапия липосомными препаратами может сопровождаться увеличением частоты дыхания и приливов крови [21, 22]. Этот тип реакции гиперчувствительности известен как псевдоаллергия, связанная с активацией комплемента, и в отличие от IgE-опосредованных реакций они возникают при первом лечении и становятся более мягкими или исчезают при повторном воздействии [22, 23].

Использование сложных композитных молекул, таких как BIVV001 (rFVIIIIFc-VWF-XTEN), состоящих

из одноцепочечного фактора VIII, Fc-домена человеческого иммуноглобулина G1, FVIII-связывающего D'D3-домена фактора Виллебранда и 2 полипептидов XTEN (неструктурированных гидрофильных, биоразлагаемых белковых полимеров, предназначенных для увеличения времени жизни терапевтических пептидов и белков), дает четырехкратный выигрыш во времени защиты от кровотечений по сравнению с нативным фактором VIII, при этом такая терапия хорошо переносится и не приводит к развитию ингибиторных антител [24].

Другим способом увеличить время жизни и обеспечить адресную доставку лекарств может стать пришивка к магнитным наночастицам. Урокиназа, находящаяся на поверхности магнитных наночастиц, может быть сконцентрирована в области тромба, требующего лизиса, и осуществить этот лизис быстрее и эффективнее, чем свободная урокиназа [25].

Еще один вариант коррекции нарушений свертывания крови – исправление сломанного гена, отвечающего за синтез неработающего белка при помощи генной терапии. При генной терапии гемофилии происходит доставка вирусного вектора, кодирующего фактор VIII или IX. В качестве средства доставки в большинстве случаев используют аденовирусные или лентивирусные векторы. Более 30 различных клинических испытаний в фазах I и II проводятся сейчас в мире. Результаты этих клинических испытаний демонстрируют безопасность и эффективность генной терапии. За последнее десятилетие было сообщено о многих положительных наблюдениях. Однако долговременная экспрессия трансгена была существенно ниже, чем в доклинических исследованиях. Помимо этого, в ряде случаев развивается токсическое поражение печени и происходит образование ингибиторов. Для борьбы с этим используют тканеспецифичные промоторы, нацеленные на тромбоциты или эндотелиальные клетки, или преднизолон для предварительного кондиционирования перед генной терапией для снижения токсического поражения печени. Использование оптимизированной формы гена фактора VIII или IX для генной терапии также может повлиять на период полужизни *in vivo* и уровень экспрессии трансгена [26].

Как мы видим, у внешней (лекарственной) регуляции системы свертывания крови существует 2 задачи, требующие решения. И если первая – подбор или разработка препарата, корректирующего гемостаз нужным образом в нужном месте, – это задача по большей части научная, то вторая проблема – контроль эффективности препарата, определяемый его фармакодинамикой, подбор индивидуальной дозировки – это задача лабораторная.

Лабораторная диагностика**Диагностика нарушений свертывания**

Отправной точкой в вопросе лечения и/или диагностики нарушений свертывания крови в большинстве случаев является факт тромбоза (инфаркт, ишемический инсульт, венозный тромбоз, тромбоэм-

болия легочной артерии и т. д.) или кровотечения, как правило, многократного или же вызванного внешними факторами, такими как травма.

При кровоточивости важно, в каком именно отделе системы гемостаза присутствует поломка. Для выяснения этого врач ориентируется на клиниче-

Таблица

Методы диагностики и терапии различных нарушений гемостаза

Table

Diagnostic and treatment methods for various hemostasis disorders

Принцип измерения Principle of measurement	Тест Test	Чувствительность Sensitivity					
		кровоточивость bleeding tendency	протромботические состояния prothrombotic states	нарушение фибринолиза fibrinolysis disorders	гемостатическая терапия hemostatic therapy	антикоагулянтная терапия anticoagulant therapy	фибринолитическая терапия fibrinolytic therapy
Механическая плотность Mechanical density	Тромбоэластография/ тромбоэластометрия Thromboelastography/ thromboelastometry	+	+	-	+	+	+
Оптическая плотность Optical density	АЧТВ aPTT	Дефицит факторов внутреннего и общего пути Deficiency of intrinsic and common pathway factors	-	-	+	НФГ UFH	-
	ПВ PT	Дефицит факторов внешнего и общего пути Deficiency of extrinsic and common pathway factors	-	-	+	АВК VKA	-
	ТВ TT		-	-	-	Дабигатрана этексилат Dabigatran etexilate	-
	Тромбодинамика Thrombodynamics		+	+	-	НМГ, НФГ, АВК LMWH, UFH, VKA	+
	Тромбодинамика-4D Thrombodynamics-4D		+	+	-	НМГ, НФГ, АВК, ингибиторы тромбина, ингибиторы фактора Ха LMWH, UFH, VKA, thrombin inhibitors, factor Xa inhibitors	+
	Общий гемостатический потенциал Overall hemostatic potential		+	+	-	+	+
	Анализ формы кривой АЧТВ aPTT waveform analysis		+	?	-	+	-
T-TAS		+	+	-	+	+	?
Хромогенные/ флюорогенные тесты Chromogenic/fluorogenic tests	Тест генерации тромбина Thrombin generation assay		+	-	+	НМГ, НФГ, АВК, ингибиторы фактора Ха LMWH, UFH, VKA, factor Xa inhibitors	-
	Маркеры тромбообразования и лизиса (ТАТ-комплекс, F1+2 фрагменты, D-димеры, РФМК) Markers of thrombus formation and lysis (TAT complex, F1+2 fragments, D-dimers, SFMC)		-	-	-	-	-
	Анти-Ха-активность Anti-Xa activity		-	-	-	НМГ, ингибиторы фактора Ха LMWH, factor Xa inhibitors	-

Примечание. ТАТ-комплекс – тромбин-антиромбин III комплекс; РФМК – растворимый фибрин-мономерный комплекс; НМГ – низкомолекулярный гепарин; НФГ – нефракционированный гепарин; АВК – антагонисты витамина К; T-TAS – система полного анализа тромбообразования; «+» – тест информативен, «-» – тест неинформативен

Notes. aPTT – activated partial thromboplastin time; PT – prothrombin time; TT – thrombin time; TAT complex – thrombin-antithrombin III complex; SFMC – soluble fibrin monomer complex; LMWH – low-molecular-weight heparin; UFH – unfractionated heparin; VKA – vitamin K antagonists; T-TAS – Total Thrombus-Formation Analysis System; «+» – the test is informative; «-» – the test is not informativ

скую картину заболевания, а также назначает проведение диагностической панели лабораторных тестов [2]. Первый этап диагностики включает в себя тесты, позволяющие определить, в каком блоке присутствует нарушение. Для этого определяют время свертывания при активации его по внешнему и по внутреннему пути. Второй этап позволяет выделить конкретный белок. На сегодняшний день в большинстве случаев удается установить точный диагноз в случае проблемы с плазменным гемостазом.

Несколько хуже дело обстоит с диагностикой причин тромботических осложнений. Причиной является то, что и среди исследователей нет четкого понимания механизмов развития тромбоза. К таким причинам относят: повышенное содержание везикул в крови (в том числе фосфатидилсерин-положительных или ТФ-положительных), повышенное содержание липопротеидов (преимущественно высокой плотности), наличие онкопроцесса, воспалительных реакций и т. д. Известен ряд генетических мутаций/полиморфизмов, ассоциированных с повышенным риском развития тромбоза [27]. Кроме этого, в развитии тромбоза играют роль антифосфолипидные антитела [28]. По-видимому, единой для всех и единственной у конкретного пациента причины тромбоза не существует. Зачастую для реализации тромбоза необходима провокация. Так, риск тромбоза повышен во время беременности, после проведения операции, при химиотерапии, при ограниченной подвижности. Кроме проблем дифференциальной диагностики причин тромбоза существует проблема собственно выявления гиперкоагуляции в лабораторных тестах. Собственно тестов для диагностики гиперкоагуляции, рекомендованных международными или отечественными гайдлайнами, не существует.

Второй, но не менее важной задачей лабораторных тестов является контроль за эффективностью и безопасностью проводимой терапии. Доля осложнений, связанных с неэффективностью и небезопасностью терапии все еще составляет, по разным оценкам, до 5% [29]. Привлечение лаборатории для подбора терапии диктует свои условия: наличие соответствующих лабораторных тестов и высокая подготовка в сфере гемостаза у лечащего врача.

Лабораторные тесты системы свертывания

На сегодняшний день существует более сотни тестов гемостаза. Для того, чтобы уверенно ориентироваться в этом многообразии, важно понимать принципы, на которых данные тесты основаны, и, соответственно, их диагностические возможности (таблица).

В результате работы системы свертывания крови образуется сгусток, и оценка его качества является основным способом определить, нормально ли функционирует система в целом.

Фибриновый сгусток обладает рядом характеристик, которые определяют качество сгустка. Одна из них – механическая плотность, способность сгустка сопротивляться механическим деформациям, вызываемым в организме, как правило, потоком. Увеличенная жесткость сгустка ассоциируется с повышением риска инфаркта миокарда [30]. Множество факторов, таких как pH, ионный состав, концентрация белков в плазме, влияют на структуру и механические свойства сгустка, изменяя скорости протекания различных этапов полимеризации фибрина [31, 32]. Сгустки, стабилизированные фактором XIIIa, менее эластичны [33]. Механические свойства тромба определяют вероятность окклюзии сосуда, склонность тромба к эмболизации и эффективность лечения при ангиопластике. Этот параметр можно измерить при помощи тестов тромбоэластомерии/тромбоэластографии.

Другим параметром фибринового сгустка является литическая плотность – способность сопротивляться лизису. Этот параметр используется в очень ограниченном ряде тестов [34] в том числе и из-за сложности интерпретации результатов. Он может меняться из-за тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза (ТАФИ), фактора XIIIa, контракции тромбоцитами. Структура сгустка влияет не только на его механические свойства, но и на резистентность к лизису: более плотный сгусток с тонкими фибриллами лизирует медленнее, чем более рыхлый [35]. Тромбин активирует фактор XIII, который стабилизирует сгусток, создавая в нем поперечные сшивки и пришивая к нему α 2-антиплазмин [36], который инактивирует плазмин и защищает сгусток от лизиса. ТАФИ, активируемый тромбином в присутствии тромбомодулина ингибитора фибринолиза, отсекает от фибрина с-концевые лизины, через которые к сгустку прикрепляются плазминоген и его тканевый активатор [37], что также приводит к ухудшению лизиса. Аномально высокая резистентность сгустка к лизису может приводить к увеличению риска тромбоза и к уменьшению эффективности тромболитической терапии при инсультах и инфарктах.

Самым широко используемым параметром является оптическая плотность, которая характеризует свойство фибриновой сети рассеивать и/или пропускать свет. Этот параметр не влияет напрямую на протекание свертывания, но является очень важным, так как именно его измеряют во всех клоттинговых тестах и в ряде глобальных тестов. Чем тоньше фибриновые нити и плотнее они упакованы, тем меньше светорассеяние [38]. Параметры фибриновой сетки, в свою очередь, зависят от концентрации тромбина, активировавшего фибрин [35]: тромбин в высокой концентрации (> 10 нМ) делает сгусток, состоящий из более тонких фибрилл, которые более

плотно упакованы и чаще ветвятся, чем тромбин в низкой концентрации (< 1 нМ).

Наиболее распространенные тесты этого ряда – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ) и тромбиновое время (ТВ). Область применения АЧТВ – выявление дефицита факторов внутреннего и общего пути, а также контроль терапии нефракционированным гепарином. ПВ и его вариации (протромбиновый индекс, МНО) используют для выявления дефицита факторов внешнего и общего пути и контроля терапии варфарином и другими антагонистами витамина К. Ряд тестов на основе АЧТВ и ПВ позволяет определить функциональную активность тех или иных факторов свертывания [2]. ТВ позволяет выявить некоторые нарушения превращения фибриногена в фибрин и его последующей полимеризации, а также в модификации используется для контроля терапии ингибиторами тромбина [39].

Сравнительно молодой класс тестов свертывания – глобальные тесты. В них можно воспроизвести процесс свертывания крови приближенно к тому, что происходит в организме, это позволяет получить информацию о нарушениях различных участков системы. Также в отличие от большинства рутинных тестов гемостаза в глобальных тестах измеряется кинетика процесса свертывания, что также позволяет получить больше информации. К глобальным тестам относят: тест генерации тромбина, тромбоэластограмму/тромбоэластометрию, тромбодинамику/тромбодинамику-4D, некоторые типы проточных систем.

Самый распространенный глобальный тест – тест генерации тромбина – регистрирует динамику образования основного регуляторного белка свертывания – тромбина. Несмотря на отсутствие явной связи с реальным результатом свертывания – сгустком – этот тест является высокочувствительным к нарушениям свертывания в обе стороны [40]. Однако уже многие годы этот тест не может перешагнуть некий барьер, отделяющий область научного исследования от области клинической рутинной диагностики. Причины этого схожи для всех глобальных тестов: 1) отсутствие единого стандарта проведения и, как следствие, высокая межлабораторная вариабельность; 2) использование полуавтоматических методов, влекущих за собой ошибки; 3) фактическая невозможность набрать достаточное число пациентов для клинического испытания вследствие сравнительно низкой частоты неблагоприятных исходов при современных методах лечения и недостаточного финансового обеспечения компаний-производителей. Существенным минусом теста в стандартном варианте является его нечувствительность к ингибиторам тромбина [41]. Анализ формы кривой светопропускания в тесте АЧТВ можно в некотором приближении

рассматривать как фибриновый аналог теста генерации тромбина [42].

Тромбодинамика позволяет учитывать процессы диффузии факторов свертывания, отделяя процесс активации от процесса роста сгустка [43]. Кроме того, благодаря геометрии кюветы тест позволяет наблюдать за собственным патологическим прокоагулянтным потенциалом системы свертывания – формированием спонтанных сгустков фибрина за счет наличия активных частиц [44]. Тест показал высокую чувствительность к нарушениям свертывания в сторону гипо- и гиперкоагуляции [45, 46], а также к антикоагулянтной терапии гепаринами [47]. Модификация этого теста (тромбодинамика-4D) позволяет одновременно наблюдать рост фибринового сгустка и генерацию тромбина [48]. Этот вариант теста кажется перспективным для диагностики коагулопатий [49] и контроля терапии прямыми ингибиторами тромбина и фактора Ха [50].

Общий гемостатический потенциал позволяет оценить как формирование, так и лизис сгустка [34], но в целом изучен слабо. Проточные системы в большинстве своем рассчитаны на изучение тромбоцитарных агрегатов, однако есть разновидности, использующие в качестве активатора ТФ, такие как T-TAS [51]. К сожалению, данных клинических исследований по этому методу практически нет.

Кроме теста генерации тромбина существуют следующие классы тестов, которые не связаны с оценкой формирования фибринового сгустка: определение ферментативной активности факторов и ингибиторов свертывания, концентрации маркеров тромбообразования (D-димеров, тромбин-антитромбин-комплексов, фрагментов F1+2, растворимых фибрин-мономерных комплексов) и ингибирующей активности при терапии гепаринами или ингибиторами фактора Ха. Первые используются для детальной диагностики коагулопатий. D-димеры в основном используются для исключения тромбоза. Кроме этого, некоторые исследователи расценивают их как маркеры риска тромбоза [52]. Однако тут есть логическая ловушка – эти маркеры появляются всегда в процессе разрушения ранее сформированного тромба и «запаздывают» [53]. Другие маркеры образуются в процессе активации системы свертывания и в этом смысле являются предикторами тромбоза [54], однако так как формирование тромба – процесс достаточно быстрый, то клиническая значимость этих тестов спорна. Определение активности анти-Ха далеко не всегда информативно лишь для оценки эффективности и безопасности терапии, так как позволяет оценить напрямую концентрацию ингибитора, но не суперпозицию состояния системы свертывания на фоне проводимой терапии [55].

Таким образом, можно заключить, что с точки зрения научного подхода революция лабораторной диагностики нарушений системы гемостаза уже совершилась, тогда как с точки зрения практической медицины она еще только предстоит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие лабораторно-диагностических методов привело к появлению глобальных тестов, способных выявлять не только тенденции к кровоточивости, но и к тромботическим состояниям. Более того, с их помощью можно локализовать нарушения и оценить эффективность корректирующей терапии.

Внедрение этих методов во врачебную практику, переход к персонализированному подбору терапии, учет состояния всех взаимодействующих со свертыванием

крови систем позволит значительно повысить эффективность лечения и снизить количество побочных эффектов, связанных с нарушениями гемостаза у пациентов с широким спектром заболеваний.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ №19-115-50174. Funding. The reported study was funded by RFBR, project number 19-115-50174.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Shibeko A.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1494-3125>

Balandina A.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7032-6951>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература

- GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392 (10159): 1736-88. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7
- Srivastava A., Brewer A.K., Mauser-Bunschoten E.P., Key N.S., Kitchen S., Llinas A., et al.; Treatment Guidelines Working Group on Behalf of The World Federation of Hemophilia. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 2013; 19 (1): e1-47. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x
- Wada H., Matsumoto T., Yamashita Y. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J Intensive Care* 2014; 2 (1): 15. DOI: 10.1186/2052-0492-2-15
- Mannucci P.M., Levi M. Prevention and treatment of major blood loss. *N Engl J Med* 2007; 356 (22): 2301-11. DOI: 10.1056/NEJMr067742
- Huth-Kühne A., Baudo F., Collins P., Ingerslev J., Kessler C.M., Lévesque H., et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia A. *Haematologica* 2009; 94 (4): 566-75. DOI: 10.3324/haematol.2008.001743
- Shibeko A.M., Woodle S.A., Lee T.K., Ovanesov M.V. Unifying the mechanism of recombinant FVIIa action: dose dependence is regulated differently by tissue factor and phospholipids. *Blood* 2012; 120 (4): 891-9. DOI: 10.1182/blood-2011-11-393371
- Lipets E.N., Antonova O.A., Shustova O.N., Losenkova K.V., Mazurov A.V., Ataulakhov F.I. Platelet, erythrocyte, endothelial, and monocyte microparticles in coagulation activation and propagation. *PLoS One* 2020; 15 (5): e0227932. DOI: 10.1371/journal.pone.0227932
- Ribo M., Montaner J., Molina C.A., Arenillas J.F., Santamarina E., Alvarez-Sabín J. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost* 2004; 91 (6): 1146-51. DOI: 10.1160/TH04-02-0097
- Stangier J., Rathgen K., Stähle H., Gansser D., Roth W. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64 (3): 292-303. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2007.02899.x
- Waters E.K., Genga R.M., Schwartz M.C., Nelson J.A., Schaub R.G., Olson K.A., et al. Aptamer ARC19499 mediates a procoagulant hemostatic effect by inhibiting tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 2011; 117: 5514-22.
- Dockal M., Pachlinger R., Hartmann R., Knappe S., Sorensen B., Wong W.Y., et al. Biological Explanation of Clinically Observed Elevation of TFPI Plasma Levels After Treatment with TFPI-Antagonistic Aptamer BAX 499. *Blood* 2012; 120: 1104.
- Cardinal M., Kantaridis C., Zhu T., Sun P., Pittman D.D., Murphy J.E., Arkin S. A first-in-human study of the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of PF-06741086, an anti-tissue factor pathway inhibitor mAb, in healthy volunteers. *J Thromb Haemost* 2018; 16 (9): 1722-31. DOI: 10.1111/jth.14207
- Patel-Hett S., Martin E.J., Mohammed B.M., Rakhe S., Sun P., Barrett J.C., et al. Marstacimab, a tissue factor pathway inhibitor neutralizing antibody, improves coagulation parameters of ex vivo dosed haemophilic blood and plasmas. *Haemophilia* 2019; 25 (5): 797-806. DOI: 10.1111/hae.13820
- Kitazawa T., Igawa T., Sampei Z., Muto A., Kojima T., Soeda T., et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med* 2012; 18 (10): 1570-4. DOI: 10.1038/nm.2942
- Oldenburg J., Mahlangu J.N., Kim B., Schmitt C., Callaghan M.U., Young G., et al. Efficacy of Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med* 2017; 377 (9): 809-18. DOI: 10.1056/NEJMoal703068
- Schumacher W.A., Luetgen J.M., Quan M.L., Seiffert D.A. Inhibition of factor XIa as a new approach to anticoagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30 (3): 388-92. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.197178
- Müller F., Gailani D., Renné T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr Opin Hematol* 2011; 18 (5): 349-55. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283497e61
- Hagedorn I., Schmidbauer S., Pleines I., Kleinschnitz C., Kronthaler U., Stoll G., et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation* 2010; 121 (13): 1510-7. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924761
- Schumacher W.A., Seiler S.E., Steinbacher T.E., Stewart A.B., Bostwick J.S., Hartl K.S., et al. Antithrombotic and hemostatic effects of a small molecule factor XIa inhibitor in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 570 (1-3): 167-74. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.05.043
- Yatuv R., Robinson M., Dayan-Tarshish I., Baru M. The use of PEGylated liposomes in the development of drug delivery applications for the treatment of hemophilia. *Int J Nanomedicine* 2010; 5: 581-91. DOI: 10.2147/ijn.s8603
- Powell J.S., Nugent D.J., Harrison J.A., Soni A., Luk A., Stass H., Gorina E. Safety and pharmacokinetics of a recombinant factor VIII with pegylated liposomes in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (2): 277-83. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02856.x
- Martinowitz U., Lalezari S., Luboshitz J., Lubetsky A., Spira J. Infusion rates of

- recombinant FVIII-FS with PEGylated liposomes in haemophilia A. *Haemophilia* 2008; 14 (5): 1122–4. DOI: 10.1111/J.1365-2516.2008.01699.X
- 23 Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology* 2005; 216 (2–3): 106–21. DOI: 10.1016/j.tox.2005.07.023
 - 24 Konkle B.A., Shapiro A., Quon D., Staber J., Suzuki T., Poloskey S., et al. BIVV001: The First Investigational Factor VIII Therapy to Break Through the VWF Ceiling in Hemophilia A, with Potential for Extended Protection for One Week or Longer. *Blood* 2018; 132: 636.
 - 25 Prilepskii A.Y., Fakhardo A.F., Drozdov A.S., Vinogradov V.V., Dudanov I.P., Shtil A.A., et al. Urokinase-Conjugated Magnetite Nanoparticles as a Promising Drug Delivery System for Targeted Thrombolysis: Synthesis and Preclinical Evaluation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018; 10 (43): 36764–75. DOI: 10.1021/acsami.8b14790
 - 26 Guo X.-L., Chung T.-H., Qin Y., Zheng J., Zheng H., Sheng L., et al. Hemophilia Gene Therapy: New Development from Bench to Bed Side. *Curr Gene Ther* 2019; 19 (4): 264–73. DOI: 10.2174/1566523219666190924121836
 - 27 Martinelli I., Mannucci P.M., De Stefano V., Taioli E., Rossi V., Crosti F., et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998; 92 (7): 2353–8.
 - 28 Sammaritano L.R. Antiphospholipid syndrome: review. *South Med J* 2005; 98 (6): 617–25; quiz 626–7, 645. DOI: 10.1097/01.CMJ.0000166748.90089.65
 - 29 Xue Z., Zhou Y., Wu C., Lin J., Liu X., Zhu W. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in Asian patients with atrial fibrillation: evidences from the real-world data. *Heart Fail Rev* 2019; 5 (6): 957–964. DOI: 10.1007/s10741-019-09878-y
 - 30 Scrutton M.C., Ross-Murphy S.B., Bennett G.M., Stirling Y., Meade T.W. Changes in clot deformability—a possible explanation for the epidemiological association between plasma fibrinogen concentration and myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5 (5): 719–23. DOI: 10.1097/00001721-199410000-00007
 - 31 Carr M.E., Hardin C.L. Fibrin has larger pores when formed in the presence of erythrocytes. *Am J Physiol* 1987; 253 (5 Pt 2): H1069–73. DOI: 10.1152/ajpheart.1987.253.5.H1069
 - 32 Carr M.E., Gabriel D.A., McDonagh J. Influence of Ca²⁺ on the structure of reptilase-derived and thrombin-derived fibrin gels. *Biochem J* 1986; 239 (3): 513–6. DOI: 10.1042/bj2390513
 - 33 Roberts W.W., Lorand L., Mockros L.F. Viscoelastic properties of fibrin clots. *Biorheology* 1973; 10 (1): 29–42. DOI: 10.3233/bir-1973-10105
 - 34 Curnow J. The Overall Hemostatic Potential (OHP) Assay. *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 523–31. doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1_38
 - 35 Collet J.P., Park D., Lesty C., Soria J., Soria C., Montalescot G., Weisel J.W. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20 (5): 1354–61. DOI: 10.1161/01.atv.20.5.1354
 - 36 Sakata Y., Aoki N. Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest* 1982; 69: 536–42.
 - 37 Wang W., Boffa M.B., Bajzar L., Walker J.B., Nesheim M.E. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1998; 273 (42): 27176–81. DOI: 10.1074/jbc.273.42.27176
 - 38 Carr M.E., Hermans J. Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules* 1978; 11 (1): 46–50. DOI: 10.1021/ma60061a009
 - 39 Avecilla S.T., Ferrell C., Chandler W.L., Reyes M. Plasma-diluted thrombin time to measure dabigatran concentrations during dabigatran etexilate therapy. *Am J Clin Pathol* 2012; 137 (4): 572–4. DOI: 10.1309/AJCPAU70QM0SRPZQ
 - 40 Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem* 2016; 62 (5): 699–707. DOI: 10.1373/clinchem.2015.248625
 - 41 Gribkova I.V., Lipets E.N., Rekhtina I.G., Bernakevich A.I., Ayusheev D.B., Ovsepyan R.A., et al. The modification of the thrombin generation test for the clinical assessment of dabigatran etexilate efficiency. *Sci Rep* 2016; 6: 29242. DOI: 10.1038/srep29242
 - 42 Matsumoto T., Shima M., Takeyama M., Yoshida K., Tanaka I., Sakurai Y., et al. The measurement of low levels of factor VIII or factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (1): 377–84. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01730.x
 - 43 Balandina A.N., Koltsova E.M., Shibeko A.M., Kuprash A.D., Ataulkhanov F.I. Thrombodynamics: a new method to the diagnosis of hemostasis system disorders. *Pediatr Hematol Immunopathol* 2018; 17: 114–26.
 - 44 Lipets E., Vlasova O., Urnova E., Margolin O., Soloveva A., Ostapushchenko O., 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.
 - 45 Gracheva M.A., Urnova E.S., Sinauridze E.I., Tarandovskiy I.D., Orel E.B., Poletaev A.V., et al. Thromboelastography, thrombin generation test and thrombodynamics reveal hypercoagulability in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2015; 56: 3418–25.
 - 46 Tarandovskiy I.D., Balandina A.N., Kopylov K.G., Konyashina N.I., Kumsikova M.A., Pantelev M.A., Ataulkhanov F.I. Investigation of the phenotype heterogeneity in severe hemophilia A using thromboelastography, thrombin generation, and thrombodynamics. *Thromb Res* 2013; 131 (6): e274–80. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.04.004
 - 47 Balandina A.N., Serebriyskiy I.I., Poletaev A.V., Polokhov D.M., Gracheva M.A., et al. Thrombodynamics-A new global hemostasis assay for heparin monitoring in patients under the anticoagulant treatment. *PLoS One* 2018; 13 (6): e0199900. DOI: 10.1371/journal.pone.0199900
 - 48 Dashkevich N.M., Ovanesov M.V., Balandina A.N., Karamzin S.S., Shestakov P.I., Soshitova N.P., et al. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys J* 2012; 103 (10): 2233–40. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.10.011
 - 49 Kuprash A.D., Shibeko A.M., Vijay R., Nair S.C., Srivastava A., Ataulkhanov F.I., et al. Sensitivity and Robustness of Spatially Dependent Thrombin Generation and Fibrin Clot Propagation. *Biophys J* 2018; 115 (12): 2461–73. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.11.009
 - 50 Dashkevich N., Pivovarova E., Ataulkhanov F. Propagation of thrombin generation in space reveals difference in effects of heparin, dabigatran and rivaroxaban: CA37. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 24–5.
 - 51 Al Ghaithi R., Mori J., Nagy Z., Maclachlan A., Hardy L., Philippou H., et al. Evaluation of the Total Thrombus-Formation System (T-TAS): application to human and mouse blood analysis. *Platelets* 2019; 30 (7): 893–900. DOI: 10.1080/09537104.2018.1535704
 - 52 Kleinegris M.-C.F., ten Cate H, ten Cate-Hoek A.J. D-dimer as a marker for cardiovascular and arterial thrombotic events in patients with peripheral arterial disease. A systematic review. *Thromb Haemost* 2013; 110 (2): 233–43. DOI: 10.1160/TH13-01-0032
 - 53 Soshitova N.P., Karamzin S.S., Balandina A.N., Fadeeva O.A., Kretchetova A.V., Galstian G.M., et al. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23 (6): 498–507. doi: 10.1097/MBC.0b013e328352e90e
 - 54 Estivals M., Pelzer H., Sie P., Pichon J., Boccalon H., Boneu B. Prothrombin fragment 1 + 2, thrombin-antithrombin III complexes and D-dimers in acute deep vein thrombosis: effects of heparin treatment. *Br J Haematol* 1991; 78 (3): 421–4. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1991.tb04458.x
 - 55 Lobastov K., Dementieva G., Soshitova N., Bargandzhiya A., Barinov V., Laberko L., Rodoman G. Utilization of the Caprini score in conjunction with thrombodynamic testing reduces the number of unpredicted postoperative venous thromboembolism events in patients with colorectal cancer. *J Vasc surgery Venous Lymphat Disord* 2020; 8: 31–41.