

УДК 616-006.04:616.151.5-07

## ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТРОМБИНА III С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Н. Н. КОЛЯДКО, докт. мед. наук В. В. ДМИТРИЕВ, проф. В. И. ПРОХОРОВА

*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
им. Н. Н. Александрова, пос. Лесной, Минская обл.,  
Республика Беларусь*

**Предложен способ оценки функциональной активности антитромбина III на основе теста генерации тромбина у онкологических больных с использованием всех параметров торможения генерации тромбина, что позволит определить предрасположенность к тромбоэмболическим осложнениям и даст возможность индивидуализировать антикоагулянтную профилактику и лечение.**

*Ключевые слова: тромбоэмболические осложнения, функциональная активность антитромбина III, тест генерации тромбина, онкологические больные.*

Риск возникновения тромбоэмболических осложнений (ТЭО) у онкологических больных крайне высок. Эту проблему пытаются решить ученые всего мира с того момента, как была выявлена связь между развитием злокачественного новообразования и гиперкоагуляционными изменениями крови. Одним из направлений в этой области является изучение различных лабораторных показателей свертывания крови, например таких, как концентрация Д-димеров, количество тромбоцитов, уровень растворимого Р-селектина и др. [1, 2] для оценки риска развития ТЭО. В качестве факторов риска, отражающих процесс генерации тромбина, изучались уровень тромбин-антитромбинового комплекса, концентрация фрагментов протромбина 1 + 2, а также эндогенный потенциал тромбина (ЭПТ) [3, 4]. Однако ни один из этих показателей не отражает статус антикоагулянтного звена системы гемостаза, в частности таких естественных антикоагулянтов, как протеин С (ПрС) и антитромбин III (АТ III). Недостаточность этих компонентов у онкологических больных может послужить самостоятельной причиной развития ТЭО, кроме того недостаточность АТ III не только не позволит определенным видам антикоагулянтных препаратов, в частности

нефракционированному гепарину (НФГ) и низкомолекулярным гепаринам (НМГ), действовать наиболее эффективно и предотвращать развитие ТЭО, но и может способствовать их противоположному действию.

Группой исследователей было показано, что после добавления к плазме, не содержащей АТ III, нефракционированного или низкомолекулярного гепарина и инициирования коагуляционных превращений гепариноид ведет себя как прокоагулянт, ускоряющий генерацию тромбина за счет непосредственного воздействия на тромбин [5].

На сегодняшний день актуальным является создание такого лабораторного метода, который отражал бы потенциальный дефицит естественных антикоагулянтов. Поиск указанного интегрального показателя необходим для выявления больных, у которых нарушение гемостаза может быть причиной тромбоза. Доступность такого исследования должна выявить среди множества пациентов тех, кто нуждается в детализации нарушений путем регистрации уровня естественных антикоагулянтов, генетических нарушений и определении маркеров антифосфолипидного синдрома.

Для оценки функции ПрС было предложено несколько способов, основанных на использовании

теста генерации тромбина или Calibrated Automated Thrombogram.

Известен способ, основанный на регистрации ЭПТ исследуемой плазмы после добавления в пробу тромбомодулина (ТМ) [6]. ТМ вызывает активацию ПрС, что способствует торможению синтеза тромбина. Регистрация степени торможения ЭПТ по сравнению с результатом параллельного исследования ЭПТ в пробе без добавления ТМ, выраженная в процентах, является основанием для количественной оценки функциональных резервов антикоагулянтной системы ПрС.

Второй способ основан на регистрации ЭПТ исследуемой плазмы после добавления в пробу активатора ПрС, выделенного из яда змеи Agkistrodon contortrix. В данном способе предлагается вычисление ингибирования генерации тромбина под действием указанного активатора по формуле [7]:

$$СТГТ = \frac{100 \times (\text{ЭПТ}_1 - \text{ЭПТ}_2)}{\text{ЭПТ}_1}, \quad (1)$$

где СТГТ — степень торможения генерации тромбина;

ЭПТ<sub>1</sub> — ЭПТ, измеренный без добавления активатора;

ЭПТ<sub>2</sub> — ЭПТ, измеренный в присутствии активатора.

Принимая во внимание важность антикоагуляционной системы и отсутствие способов, учитывающих все факторы, которые определяют активность этой системы, представляет интерес разработка новых методических подходов.

Целью нашего исследования была разработка способа оценки функциональной активности АТ III на основе теста генерации тромбина.

Материалом исследования служила цитратная плазма крови 20 онкологических больных

с клинически и инструментально доказанным ТЭО (основная группа) и 57 больных, страдающих онкологическими заболеваниями без клиники тромбоза/ТЭЛА (группа сравнения), сопоставимых по полу, возрасту, стадии заболевания. В качестве группы контроля были обследованы 27 практически здоровых доноров.

Забор крови у больных группы сравнения производился до начала специального лечения, у больных основной группы — до введения лечебной дозы гепарина.

Исследование свертывания крови включало определение активированного парциального тромбoplastинового времени (АПТВ) по Саен, активности факторов протромбинового комплекса, тромбинового времени, концентрации фибриногена и Д-димеров. Активность АТ III определяли с использованием хромогенных субстратов. Исследования выполняли реагентами фирмы «Stago» на анализаторе «STA Compact» фирмы «Roche Diagnostics» (Germany).

Тест генерации тромбина (ТГТ) производился флуоресцентным методом по Н. С. Hemker с использованием наборов реагентов фирмы «Thromboscope BV» (Maastricht, Netherlands) на приборе «Fluoroscan Ascent» производства «Thermo Electron Corporation». Регистрировались следующие показатели ТГТ: Lag phase (LP), EPT (endogenous thrombin potential), Peak (максимальное количество тромбина), Time to peak (ТТР) (рис. 1).

В качестве активатора АТ III был использован агент — синтетический пентасахарид, позволявший АТ III включиться в процесс торможения генерации тромбина, при этом данный агент сам непосредственно на тромбин не влиял. Действие АТ III потенцирует НФГ и препараты из группы НМГ, которые кроме воздействия на АТ III способны оказывать непосредственное влияние на тромбин, тормозя или ускоряя генерацию последнего. От-

www.imj.kh.ua

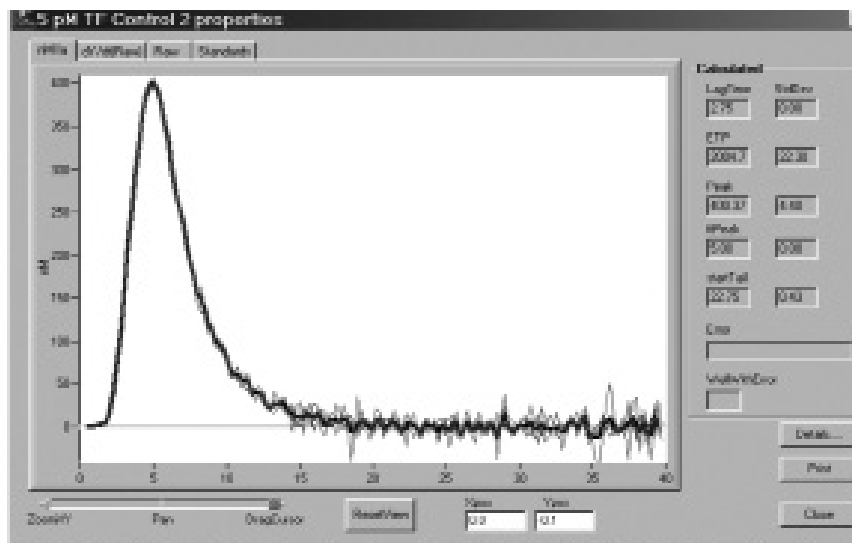


Рис. 1. Тромбограмма — регистрация процесса генерации тромбина

личить непосредственное влияние препаратов на тромбин от торможения генерации тромбина под влиянием комплекса АТ III – препарат не представляется возможным. Действие выбранного активатора реализуется благодаря его способности к формированию комплекса с АТ III. Активация АТ III приводит к ингибированию фактора Ха и торможению генерации тромбина в процессе коагуляционных превращений. При этом известно, что синтетический пентасахарид на активность тромбина не влияет, в отличие от НФГ или НМГ. Степень торможения генерации тромбина (СТГТ) АТ III в присутствии предлагаемого агента или буферного раствора позволяет оценить функциональную активность АТ III.

Для оценки функциональной активности АТ III выполняли лабораторное исследование по следующей схеме.

1. Добавляли к исследуемой плазме активатор в буферированном растворе, не изменяющем рН среды, после чего измеряли ЭПТ с помощью ТГТ.

2. Добавляли к тому же самому образцу исследуемой плазмы буферированный раствор, после чего регистрировали ЭПТ по ТГТ.

3. Результат торможения генерации тромбина рассчитывали по вышеприведенной формуле 1 и выражали в процентах.

По той же формуле рассчитывали СТГТ с использованием максимального количества тромбина (Пик).

Было выявлено, что активация АТ III в контрольной группе в случае с предложенным активатором приводит к изменению в сторону гипокоагуляции всех параметров ТГТ в различной степени, т. е. к увеличению лаг-фазы и ТТР, уменьшению Пика и ЭПТ. Мы предположили, что для оценки степени торможения генерации тромбина можно использовать все имеющиеся параметры ТГТ, а не только эндогенный потенциал (рис. 2).

Кроме этого, по формуле, использованной Rugeri L. и соавт. [8] и Samama M. M. и соавт. [9], рассчитывали скорость генерации тромбина – Velocity Rate Index (VRI) как в пробе с буферным раствором, так и в пробе с активатором АТ III.

$$VRI = \frac{Peak}{TTP - LP}, \quad (2)$$

где Peak (Пик) – максимальное количество тромбина, нМоль тромбина;

TTP – время достижения максимального количества тромбина, мин;

LP – лаг-фаза генерации тромбина, мин.

Показатель СТГТ, по нашему мнению, может быть вычислен не только по параметру ЭПТ (как в формуле 1), но и по другим параметрам ТГТ, таким как Пик, VRI. Эти три параметра (ЭПТ, Пик и VRI) под воздействием активатора АТ III изменяются в сторону гипокоагуляции в различной степени, что и говорит об активации АТ III. По сути, снижение этих параметров под действием активированного АТ III будет говорить о функции АТ III.

Для формулы 1 мы использовали показатели ТГТ, проведенного с буфером (ЭПТ<sub>1</sub>, Пик<sub>1</sub> или VRT<sub>1</sub>), и ТГТ, проведенного с активатором АТ III (ЭПТ<sub>2</sub>, Пик<sub>2</sub> или VRI<sub>2</sub>). Путем подставления указанных показателей в формулу 1 мы можем оценить влияние активатора АТ III на каждый конкретный показатель (ЭПТ, Пик или VRT) и выразить это влияние в процентах.

Таким образом, СТГТ под действием активатора АТ III определялась нами с использованием всех параметров ТГТ.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета статистических программ «Статистика 6.0». Достоверность различия  $p < 0,05$  вычисляли по U-критерию Манна – Уитни для независимых выборок.

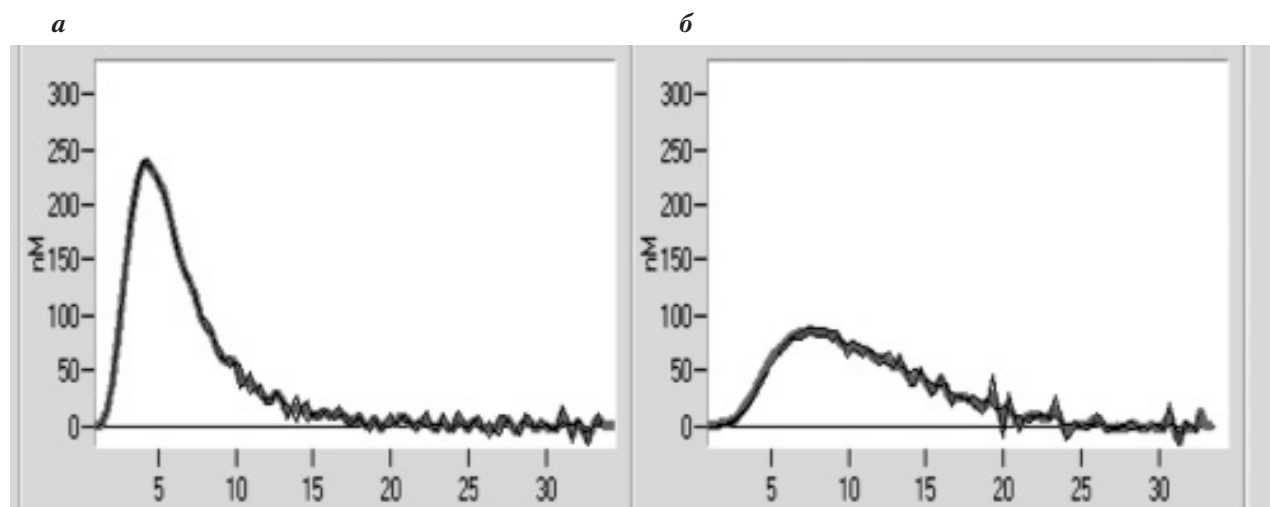


Рис. 2. Действие активатора АТIII на процесс генерации тромбина в плазме практически здорового донора: а – генерация тромбина без добавления активатора; б – генерация тромбина с добавлением активатора

**Сравнение параметров свертывания крови у доноров группы контроля и у больных основной группы и группы сравнения**

Показатель	Группа контроля, $n = 27$	Группа сравнения, $n = 57$	Основная группа, $n = 20$	$p_1$	$p_2$	$p_3$
ЭПТ, %	17,6 (13,0; 34,8)	21,1 (5,5; 38,2)	7,43 (0,9; 18,3)	0,662	0,005	0,053
Пик, %	48,9 (40,1; 61,3)	45,0 (22,0; 65,0)	22,32 (15,5; 43,3)	0,268	0,0008	0,023
VRI, %	70,1 (63,2; 80,0)	78,0 (64,5; 89,0)	42,49 (27,8; 67,6)	0,122	0,0006	0,000072
АЧТВ, с	36,7 (34,2; 38,2)	35,0 (32,7; 36,6)	37,4 (35,0; 42,3)	0,116	0,314	0,020
ПТИ, %	98,5 (90,0; 106,0)	96,0 (92,0; 102,0)	77,00 (65,0; 88,0)	0,598	0,00003	0,000001
Концентрация фибриногена, г/л	2,4 (2,1; 2,7)	4,05 (3,29; 4,93)	3,92 (3,1; 4,73)	0,000001	0,000019	0,862
Концентрация Д-димеров, мкг/мл	0,22 (0,16; 0,26)	0,47 (0,26; 0,85)	5,7 (3,9; 10,69)	0,000005	0,000001	0,000001
АТ III, %	104,0 (100,5; 110,0)	104,0 (91,0; 112,0)	88,00 (76,0; 114,0)	0,613	0,057	0,037
ТВ, мин	17,00 (16,4; 18,7)	17,9 (17,0; 18,6)	18,50 (16,1; 21,2)	0,331	0,260	0,381

Примечание. Данные представлены значениями медианы и квартилей;

$p_1$  — достоверность различий между группами контроля и сравнения;

$p_2$  — достоверность различий между группой контроля и основной группой;

$p_3$  — достоверность различий между группой сравнения и основной группой.

В таблице приведены данные групп контроля, сравнения и основной группы.

При сравнении групп контроля и сравнения было выявлено их достоверное различие по показателям концентрации фибриногена и Д-димеров, что является закономерным, так как у значительного числа онкологических больных процесс развития опухоли сопровождается состоянием гиперкоагуляции.

При изучении новых параметров СТГТ достоверных различий между группами выявлено не было. Однако у части больных было определено снижение СТГТ по некоторым параметрам, что, на наш взгляд, является признаком наличия определенной степени нарушения функциональной активности АТ III.

При сравнении показателей группы контроля и основной группы были выявлены достоверные различия по концентрации фибриногена и Д-димеров, а также ПТИ, что, вероятно, отражает потребление факторов свертывания в результате развития тромбоза. Однако при этом сравнении выявлены и достоверные различия между группами по всем параметрам степени торможения генерации тромбина, что говорит об изменении функции АТ III в сторону снижения его противосвертывающей активности. Достоверных различий по активности АТ III, определенной хромогенным методом, обнаружено не было.

Сравнивая показатели больных группы сравнения с основной группой, мы выявили значимые различия по таким параметрам, как АЧТВ (хотя в обеих группах показатель был в пределах

нормы), ПТИ (различия по той же причине, что и с группой доноров), концентрация Д-димеров, а также активность АТ III, определяемая хромогенным методом. Оценивая параметры степени торможения генерации тромбина в этих группах, мы выявили достоверные различия по Пик, т. е. максимальному количеству тромбина, и по VRI. СТГТ по ЭПТ между группами достоверно не отличались, что может указывать на наличие у части больных нарушений в функции АТ III, сходных с нарушениями в основной группе.

При проведении корреляционного анализа по Спирмену мы ставили целью определить взаимосвязь параметров, отражающих степень торможения генерации тромбина и показателей коагулограммы. Во всех трех группах проявлялась достоверная умеренная корреляционная связь между активностью АТ III, определенной хромогенным методом и степенью торможения, выраженной через Пик генерации тромбина. Наиболее сильная корреляция наблюдалась в основной группе. Также в этой группе активность АТ III умеренно коррелировала с VRI. В то же время в группе контроля выявлена умеренная корреляция Пик и VRI с концентрацией фибриногена.

Нами обнаружено, что в основной группе больных снижение показателей СТГТ происходило неодинаково: в 55 % случаев наблюдалось снижение сразу трех показателей СТГТ (ЭПТ, Пика и VRI), в 15 % случаев изменений выявлено не было.

Таким же образом была проанализирована и группа сравнения. В 33,3 % случаев изменения не выявлены. В 31,6 % случаев происходило

одновременное снижение СТГТ по параметрам ЭПТ и Пик. Сочетанное снижение сразу трех параметров СТГТ (ЭПТ, Пик и VRI), наблюдаемое нами в основной группе, в группе сравнения обнаружено не было.

Случаи возникновения ТЭО даже на фоне применения стандартных схем антикоагулянтной профилактики НМГ или НФГ позволяют сделать вывод, что у данной категории больных имеется препятствие для эффективного проявления противотромботического действия антикоагулянтов. Вероятно, этим препятствием является нарушение функционирования АТ III.

Возможность использовать ТГТ для оценки не только общего коагуляционного потенциала, но и состояния основных компонентов противосвертывающей системы увеличивает его значимость как метода оценки системы гемостаза.

Таким образом, дальнейшее исследование описанных показателей позволит определить их информативность и значимость в оценке предрасположенности к ТЭО. Вероятно, это даст возможность индивидуализировать антикоагулянтную профилактику и лечение, назначая препараты, которые будут эффективны для каждого конкретного больного.

#### Литература

1. Conolly G. C., Khorana A. A. Emerging risk stratification approaches to cancer-associated thrombosis: risk factors, biomarkers and a risk score // *Thrombosis Research.*— 2010.— Vol. 125, Suppl. 2.— P. 1–7.
2. Ay C., Pabinger I. Tests predictive of thrombosis in cancer // *Thrombosis Research.*— 2010.— Vol. 125, Suppl. 2.— P. 12–15.
3. D-dimer and prothrombin fragment 1 + 2 predict venous thromboembolism in patients with cancer: results from Vienna Cancer and Thrombosis Study / C. Ay, R. Vormittag, D. Dunkler et al. // *J. Clin. Oncol.*— 2009.— Vol. 27, Suppl. 25.— P. 4124–4129.
4. Coenraad Hemker H., Raed Al Dieri, Suzette Beguin. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance // *Curr. Opin. Hemat.*— 2004.— Vol. 1.— P. 170–175.
5. Smith S. A., Morrissey J. H. Heparin is procoagulant in absence of antithrombin // *Thromb Haemost.*— 2008.— Vol. 100, Suppl. 1.— P. 160–162.
6. Use of calibrated automated thrombinography±thrombomodulin to recognize the prothrombotic phenotype / Y. Dargaud et al. // *Thromb Haemost.*— 2006.— Vol. 96.— P. 562–567.
7. Protein C deficiency screening using a thrombin-generation assay / N. Hezard, L. Bouaziz-Borgi, M-R. Remi et al. // *Thromb Haemost.*— 2007.— Vol. 97.— P. 165–166.
8. Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease/ L. Rugeri, S. Beguin, C. Hemker et al. // *Haematologica.*— 2007.— Vol. 92.— P. 1639–1646.
9. Effect of argatroban versus recombinant hirudin on tissue-factor-mediated thrombin generation: an in vitro study / M. M. Samama, L. Le Flem, C. Guinet, F. Depasse // *Seminars in thrombosis and hemostasis.*— 2008.— Vol. 34, Suppl. 1.— P. 87–90.

### ОЦІНКА ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ АНТИТРОМБІНУ III ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТУ ГЕНЕРАЦІЇ ТРОМБІНУ В ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ

Н. М. КОЛЯДКО, В. В. ДМИТРИЄВ, В. І. ПРОХОРОВА

Запропоновано спосіб оцінки функціональної активності антитромбіну III на основі тесту генерації тромбіну в онкологічних хворих із використанням усіх параметрів гальмування генерації тромбіну, що дозволить визначити схильність до тромбоемболічних ускладнень і дасть можливість індивідуалізувати антикоагулянтну профілактику та лікування.

*Ключові слова:* тромбоемболічні ускладнення, функціональна активність антитромбіну III, тест генерації тромбіну, онкологічні хворі.

### ASSESSMENT OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF ANTITHROMBIN III USING THE TEST OF THROMBIN GENERATION IN CANCER PATIENTS

N. N. KOLIADKO, V. V. DMITIRYEV, V. I. PROKHOROVA

A method of assessment of functional activity of antithrombin III based on the test of thrombin generation in cancer patients using all parameters of inhibition of thrombin generation, which allows to determine predisposition to thromboembolic complications and individualize anticoagulation prevention and treatment, was suggested.

*Key words:* thromboembolic complications, antithrombin III functional activity, test of thrombin generation, cancer patients.

Поступила 23.01.2012