

© Коллектив авторов, 2013
УДК 616.381-002-06:616.94-06:612.115

Х. А. Гамзатов¹, Д. В. Гуржий,¹ С. М. Лазарев,² Ю. А. Наместников³, А. А. Лернер³,
Л. П. Папаян³, О. Г. Головина³, Е. А. Хаит³, О. А. Смирнова³, О. Ю. Матвиенко³

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТА ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА ДЛЯ ОЦЕНКИ КОАГУЛЯЦИОННОЙ И АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ С АБДОМИНАЛЬНЫМ СЕПСИСОМ

¹ Кафедра факультетской хирургии (зав. — проф. В. П. Земляной), Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова; ² СПбГБУЗ «Городская больница святой преподобномученицы Елизаветы» (главврач — проф. Е. К. Гуманенко); ³ ФГУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства России (дир. — проф. А. В. Чечёткин), Санкт-Петербург

Ключевые слова: перитонит, абдоминальный сепсис, нарушения в системе гемостаза, тест генерации тромбина, вклад системы протеина С в угнетение генерации тромбина

Введение. Абдоминальный сепсис (АС), осложняющий течение различных внутрибрюшных воспалительных и деструктивных процессов, — наиболее сложная проблема как в диагностическом и лечебном плане, так и в экономическом отношении. Общая летальность при АС составляет 24–35%, при развитии септического шока — 60–70%, при формировании полиорганной недостаточности (ПОН) — доходит до 90% [2, 4, 6, 12]. Общеизвестным фактором, осложняющим течение сепсиса, считается развитие гиперкоагуляционного синдрома, формирующегося за счёт активации всех звеньев системы гемостаза с образованием большого количества тромбина, который является ключевым ферментом коагу-

ляционного каскада [21]. Увеличение генерации тромбина указывает на повышение риска образования тромбов в сосудах микроциркуляторного русла, приводящее к формированию ПОН [1, 5, 6, 8, 13, 16, 18–20]. Активация системы гемостаза в значительной степени влияет на ослабление основных систем естественных антикоагулянтов: антитромбина III (АТ III), ингибирующего активные факторы свёртывания (тромбин Па, Ха, XIa, IXa) путём образования с ними комплексов и системы протеина С (ПС), которая протеолитически ингибирует активные факторы Va и VIIIa [12]. Нарушение баланса между коагуляционной и антикоагулянтной системами в значительной степени повышает генерацию тромбина и ведёт к ещё большему повышению гемостатического потенциала крови у больных с АС. Такие общепризнанные рутинные тесты, как активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ) и протромбино-

Сведения об авторах:

Гамзатов Хизри Ахметович (e-mail: gamzatov-net@yandex.ru), *Гуржий Дмитрий Витальевич* (e-mail: doctor_gurzhiy@ro.ru), Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, Кирочная 41;

Лазарев Сергей Михайлович (e-mail: sergelazarev@list.ru), Городская больница святой преподобномученицы Елизаветы, 195257, Санкт-Петербург, ул. Вавиловых, 14;

Наместников Юрий Андреевич (e-mail: namestnilov@inbox.ru), *Лернер Анна Александровна* (e-mail: sever67@bk.ru), *Папаян Людмила Петровна* (e-mail: papayan@mail.ru), *Головина Ольга Георгиевна* (e-mail: olda.golovina.48@mail.ru), *Хаит Екатерина Александровна* (e-mail: zina-74@mail.ru), *Смирнова Ольга Анатольевна* (e-mail: olasova@rambler.ru), *Матвиенко Олеся Юрьевна* (e-mail: matolesya@mail.ru), Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16

вый тест (ПТ), применяемые для оценки состояния системы гемостаза, не всегда отражают истинный уровень гиперкоагуляции у данной категории больных [3]. Также оценка отдельных факторов: уровня фибриногена, активности фактора VIII и Виллебранда, антитромбина, протеинов С и S может выявить нарушения в системе гемостаза, но не позволит судить о гиперкоагуляционных нарушениях, так как изменения в свёртывающей системе могут быть нивелированы в организме включением компенсаторных механизмов. В связи с этим представляется необходимым использовать в клинической практике тесты, которые дают возможность врачу оценить состояние системы гемостаза в целом. В последние годы появился новый метод оценки состояния системы гемостаза — тест генерации тромбина (ТГТ), который отражает ферментативную активность тромбина и показывает функциональное состояние, возникающее при взаимодействии между собой про- и антикоагулянтов [9–11, 18].

Использование ТГТ в клинической практике может дать возможность определить количественно суммарный эффект взаимодействия факторов системы гемостаза, а также оценить вклад системы протеина С в генерацию тромбина.

Цель исследования: с помощью теста генерации тромбина оценить коагуляционную и антикоагулянтную активность системы гемостаза у больных с абдоминальным сепсисом.

Материал и методы. Обследовано 30 пациентов [18 мужчин и 12 женщин, средний возраст — $(61,0 \pm 18,3)$ года] с диагнозом распространённый перитонит, находящихся на лечении в клинике им. Петра Великого. Всем больным было проведено оперативное лечение с последующим дренированием брюшной полости. После операции больные получали комплексную терапию. Пациенты были разделены на две группы: 1-я группа — выжившие пациенты — благоприятный исход (20 человек), 2-я группа — умершие пациенты — неблагоприятный исход (10 человек). Контрольную группу (КГ) составили 65 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу. Всем пациентам и лицам КГ исследование системы гемостаза включало: определение индекса АПТВ, ПТ, активности фактора VIII (фVIII), антитромбина (АТ), протеина С. Также пациентам и здоровым лицам был проведён ТГТ, который оценивал: эндогенный тромбиновый потенциал, нмоль/мин (ЭТП), пиковую концентрацию тромбина, нмоль/л (ПКТ). Постановка ТГТ проводилась в дублях на планшетном флюориметре «Fluoroskan Ascent[®]», оборудованном диспенсером производства «ThermoFisher SCIENTIFIC» (Финляндия). Построение кривых генерации тромбина, а также расчет показателей ЭТП и ПКТ осуществлялись при помощи программного обеспечения «Thromboscore[®]» версия 3.0.0.26. Для оценки вклада антикоагулянтного действия системы ПС в угнетение генерации тромбина у больных с АС тест генерации тромбина был модифицирован добавлением в реакционную смесь рекомбинантного человеческого тромбомодулина (рчТМ). Изменения функциональных резервов антикоагулянтной системы ПС и резистентности к активи-

рованному ПС (АПС-резистентность) выражались степенью снижения показателей ЭТП (%) и ПКТ (%), которая у лиц КГ составляла более 50 и 40% соответственно. Меньшие значения данных показателей свидетельствуют о нарушении работы системы ПС, обусловленной снижением активности системы ПС и(или) развитием АПС-резистентности [15]. Оценку показателей системы гемостаза и ТГТ производили на 1-е и 7-е сутки послеоперационного периода. Исследование системы гемостаза и ТГТ проводили в РосНИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА. Для обработки полученных данных применяли программы Microsoft Excel и Statistica 6.0. Использованы непараметрические методы (критерий Манна—Уитни). Для описания распределений применяли медиану (Me) и интерквартильный размах, указанный в виде 25-й и 75-й перцентилей. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При оценке показателей системы гемостаза нами было отмечено, что у всех больных с АС состояние системы гемостаза характеризовалось значительными изменениями (табл. 1).

Анализ полученных данных коагулограммы показал, что у больных с АС в обеих группах индекс АПТВ был несколько выше, чем в КГ, что является закономерным, так как больные получали гепарин. При этом, хотелось бы отметить, что полученные значения АПТВ у больных как 1-й, так и 2-й групп не отражали оптимальный для них уровень гипокоагуляции (для достижения терапевтического эффекта гепарина значение индекса АПТВ должно в 1,5–2,5 раза превышать верхний предел нормальных колебаний — 0,8–1,1). Показатели ПТ в группе больных с благоприятным исходом находились в пределах общепринятых нормальных значений (80–120%), в то время как данные ПТ в группе больных с неблагоприятным исходом были достоверно ниже показателей в КГ как в 1-е, так и 7-е сутки ($97,5-80,0-84,0$; $97,5-60,5-53,0$, $p < 0,05$ соответственно). Также показатели ПТ во 2-й группе были значимо ниже, чем в 1-й группе ($84,0-53,0$, $p < 0,05$) на 7-е сутки течения болезни. Протромбиновый тест отражает активность факторов протромбинового комплекса (II, VII, X, V), которые синтезируются в печени. Таким образом, снижение ПТ у больных с неблагоприятным исходом возможно связано с нарушением синтетической функции печени.

Существуют несколько механизмов регуляции образования и разрушения тромбина в крови. Тромбин, активируя факторы VIII и V, усиливает свёртывание крови, а связываясь с тромбомодулином на мембранах эндотелиальных клеток и активируя ПС, способствует инактивации активных факторов VIIIa и Va и усилению фибринолиза. Исходя из этого, нами оценивалась активность факторов VIII и V, АТ, ПС (рисунк).

Таблица 1

Показатели системы гемостаза у пациентов с абдоминальным сепсисом

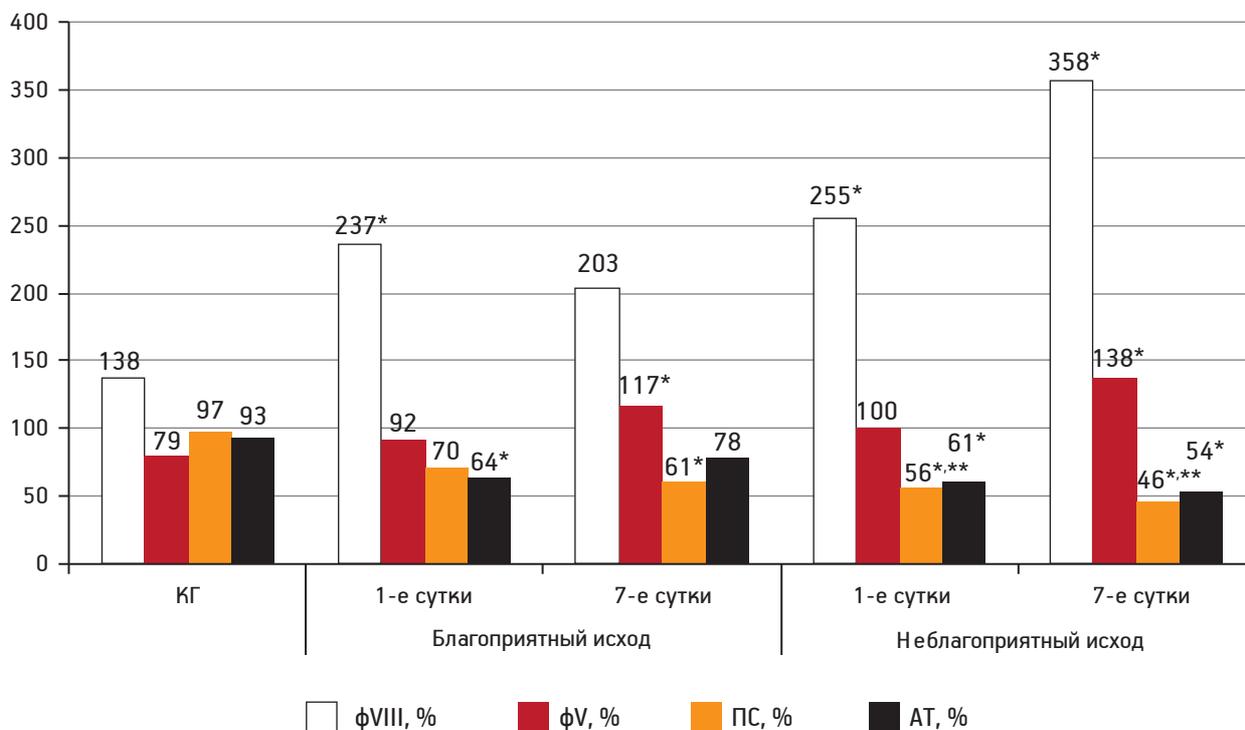
Показатель	Контрольная группа (n=65)	Больные с абдоминальным сепсисом			
		1-я группа (n=20)		2-я группа (n=10)	
		1-е сутки	7-е сутки	1-е сутки	7-е сутки
Индекс АПТВ	0,98 (0,94; 1,0)	1,07 (0,94; 1,2)	1,01 (0,93; 1,2)	1,26 (0,97; 1,64)	1,36 (0,98; 1,6)
Протромбиновый тест по Квику, %	97,5 (96; 102)	80,0 (61,5; 87,5)	84,0 (62,0; 93,0)	60,5* (50,0; 66,0)	53,0* ^{**} (48,9; 59,0)
Активность фактора VIII, %	138,0 (89,0; 156,0)	237,0* (193,0; 334,5)	203,0 (155,0; 268,0)	255,0* (174,0; 317,0)	358,0* ^{**} (270,0; 413,0)
Активность фактора V, %	79,0 (71,0; 103,0)	92,0 (80,5; 105,0)	117,0* (100,0; 127,0)	100,0 (98,0; 109)	137,0* (130,0; 143,0)
Активность антитромбина, %	93,0 (89,0; 98,0)	64,0* (51,0; 77,0)	78,0 (62,0; 89,0)	61,0* (57,0; 67,0)	54,0* (40,0; 69,0)
Активность протеина С, %	97,0 (80,1; 105,9)	70,0 (54,5; 84,0)	61,0* (54,7; 86,7)	56,0* ^{**} (48,6; 62,8)	46,0* ^{**} (36,2; 52,7)

Здесь и на рисунке: * Статистически значимое отличие от контрольной группы, p<0,05.

** Статистически значимое отличие от группы с благоприятным исходом, p<0,05.

Как видно на рисунке, в 1-й группе активность фактора VIII (фVIII) в 1-е сутки была достоверно выше значений КГ, на 7-е сутки имела тенденцию к повышению (138,0–237,0, p<0,05; 138,0–203,0), во 2-й группе активность фVIII и на 1-е, и на 7-е сутки достоверно значимо превышала значения в КГ, а также значения в группе с благоприятным исходом на 7-е сутки заболевания

(138,0–255,0–358,0, p<0,05; 203,0–358,0, p<0,05 соответственно). При этом к 7-м суткам активность фVIII в 1-й группе снижалась на 16%, а во 2-й повышалась на 71%. Активность фV в обеих группах превышала значения в КГ. На 7-е сутки и в 1-й, и во 2-й группах она была достоверно выше, чем в КГ (79,0–117,0–137,0, p<0,05 соответственно). В то же время, в обеих группах



Изменения активности факторов VIII и V, протеина С и антитромбина у больных с абдоминальным сепсисом с благоприятным и неблагоприятным исходом заболевания

уровень активности фV имел тенденцию к повышению на 7-е сутки, 27 и 37% соответственно. Анализируя полученные значения активности АТ и ПС, нами было отмечено: в 1-й группе активность АТ в 1-е сутки была статистически значимо ниже, чем в КГ (93,0–64,0, $p<0,05$), но к 7-м суткам она повысилась на 21%; во 2-й группе и в 1-е и 7-е сутки активность АТ была достоверно ниже КГ (93,0–61,0–54,0, $p<0,05$), и при этом в отличие от группы с благоприятным исходом к 7-м суткам она снизилась на 22%. Уровень активности ПС в 1-е сутки в 1-й группе имел тенденцию к снижению, а на 7-е сутки статистически значимо снижался в сравнении с КГ (97,0–70,0; 97,0–61,0, $p<0,05$), во 2-й группе в обеих точках исследования уровень активности ПС статистически значимо был ниже значений КГ, а также значений, полученных в 1-й группе (97,0–56,0; 97,0–46,0, $p<0,05$; 70,0–56,0, 61,0–46,0, $p<0,05$ соответственно). Хотя в обеих группах больных с АС активность ПС имела тенденцию к снижению к 7-м суткам, но в группе с неблагоприятным исходом это снижение было более значительным (15–22%). При использовании ТГТ для оценки динамики изменения концентрации тромбина и вклада антикоагулянтного действия ПС в группах больных с АС было показано, что у них имеет место развитие тромбинемии (табл. 2).

Анализ показателей ЭТП и ПКТ при постановке ТГТ без рчТМ– показал, что в обеих группах больных генерация тромбина в сравнении с КГ имела тенденцию к повышению. При этом, в группе больных с благоприятным исходом на 7-е сутки

ЭТП повышался на 5%, тогда как в группе с неблагоприятным исходом — на 11%. В то же время, при добавлении рчТМ+ были получены данные, свидетельствующие о нарушениях в системе ПС и(или) развитии АПС-резистентности. Данные изменения подтверждаются небольшим снижением показателей ЭТП и ПКТ после добавления в реакционную смесь тромбомодулина. В обеих группах полученные показатели ЭТП (рчТМ+) и ПКТ (рчТМ+) статистически значимо отличались от КГ (1496; 1029; 1595; 1926–779, $p<0,05$; 243; 224; 250; 230–164, $p<0,05$ соответственно), но при этом в 1-й группе тромбиновый потенциал на 7-е сутки снижался на 45%, а во 2-й группе повышался на 18%. Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных с неблагоприятным исходом происходило нарастание тромбинемии. В рамках данного исследования важным было оценить антикоагулянтный потенциал, обусловленный работой системы ПС. Процент снижения ЭТП и ПКТ у больных в группе с благоприятным исходом был достоверно ниже в сравнении с КГ в 1-е сутки, а в группе с неблагоприятным исходом — и на 1-е, и на 7-е сутки (12–52; 11–52; 9–52, $p<0,05$; 23–42; 21–42; 11–42, $p<0,05$ соответственно). При этом, прослеживалась определённая закономерность: в группе с благоприятным исходом к 7-м суткам процент снижения ЭТП и ПКТ значительно увеличивался (на 175 и 48% соответственно); а в группе с неблагоприятным исходом — уменьшался (на 18 и 48% соответственно). Таким образом, можно отметить, что ТГТ характеризует динамику образования тромбина и гиперкоагуляционных

Таблица 2

Показатели теста генерации тромбина у пациентов с абдоминальным сепсисом

Показатели	Контрольная группа (n=65)	Больные абдоминальным сепсисом			
		1-я группа (n=20)		2-я группа (n=10)	
		1-е сутки	7-е сутки	1-е сутки	7-е сутки
ЭТП (рчТМ–), нмоль/мин	1642 (1491; 1798)	1726 (1245; 2060)	1812 (1432; 1996)	1744 (1183; 1968)	1945 (1216; 2231)
ЭТП (рчТМ+), нмоль/мин	779 (595; 920)	1496* (1133; 1890)	1029* (835; 1677)	1595* (1129; 1931)	1926* (965; 2039)
Снижение ЭТП, %	52 (46; 59)	12*,** (3; 40)	33 (15; 48)	11* (4; 29)	9*,# (0,7; 19)
ПКТ (рчТМ–), нмоль/л	288 (264; 321)	324 (306; 378)	306 (235; 360)	302 (236; 367)	245 (241; 344)
ПКТ (рчТМ+), нмоль/л	164 (135; 195)	243* (195; 298)	224* (184; 304)	250* (214; 312)	230* (204; 323)
Снижение ПКТ, %	42 (34; 47)	23* (18; 41)	34 (22; 56)	21* (13; 28)	11*,# (7; 13)

* Статистически значимое отличие от контрольной группы, $p<0,05$.** Статистически значимое отличие показателя в 1-е сутки от показателя на 7-е сутки в группе с благоприятным исходом, $p<0,05$.# Статистически значимое отличие от группы с благоприятным исходом на 7-е сутки, $p<0,05$.

изменений у больных с абдоминальным сепсисом. При этом, используя ТГТ в клинической практике, также можно оценить вклад системы протеина С в угнетение генерации тромбина.

Выводы. 1. У больных с абдоминальным сепсисом обнаружено развитие гиперкоагуляционного синдрома, что подтверждает тест генерации тромбина, который практически у всех больных выявил повышенный эндогенный тромбиновый потенциал крови.

2. С помощью теста генерации тромбина у большинства больных с абдоминальным сепсисом выявлены нарушения в системе протеина С, которые могут быть обусловлены как снижением его активности, так и развитием активированного протеина ПС-резистентности.

3. Отсутствие снижения или незначительное снижение показателей эндогенного тромбинового потенциала (ЭТП) и пиковой концентрации тромбина (ПКТ) у больных с абдоминальным сепсисом может являться неблагоприятным признаком для исхода заболевания.

4. Полученные данные свидетельствуют, что, используя показатели ТГТ у больных с абдоминальным сепсисом, возможно, осуществлять оценку коагуляционной и антикоагулянтной активности системы гемостаза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Алексеев Н. А. Гематология и иммунология детского возраста. СПб.: Гиппократ, 2009.
- Алексеев С. А. Абдоминальный хирургический сепсис. Минск: Юнипак, 2005.
- Брехов Е. И., Пасечник И. Н., Калинин В. В. и др. Роль нарушений системы гемостаза в формировании полиорганной недостаточности у больных деструктивным панкреатитом // Российск. мед. вестн. 2008. № 4. С. 49–56.
- Гельфанд Б. Р., Гологорский В. А., Бурневич С. З. и др. Абдоминальный сепсис: современный взгляд на нестарющуюся проблему. Стратегия и тактика лечения // Вестн. интенсивн. тер. 1997. № 1. С. 10–16.
- Долгов В. В., Свириной П. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М., 2005.
- Ерюхин И. А., Насонкин О. С., Шашков Б. В. Эндотоксикоз как проблема клинической хирургии // Вестн. хир. 1989. № 3. С. 3–7.
- Ерюхин И. А., Шляпников С. А. Хирургический сепсис (дискуссионные аспекты проблемы) // Хирургия. 2000. № 3. С. 44–46.
- Зубаиров Д. М. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования. Казань, 2000.
- Колядко Н. Н., Прохорова В. И., Машевский А. А. и др. Процесс генерации тромбина у онкологических больных // Онкол. журн. 2009. № 2. С. 12–17.
- Наместников Ю. А. Тест генерации тромбина — интегральный показатель системы свёртывания крови // Гематол. и трансфузиол. 2010. № 2. С. 32–39.
- Наместников Ю. А., Головина О. Г., Папаян Л. П. Значение теста генерации тромбина в клинической практике // Онкогематология. 2011. № 2. С. 1–3.
- Папаян Л. П. Современное представление о механизме регуляции свёртывания крови // Тромбоз, гемостаз и реология. 2003. № 2. С. 3–8.
- Папаян Л. П. Новое представление процесса свёртывания крови // Трансфузиология. 2004. № 1. С. 7–22.
- Савельев В. С., Гельфанд Б. Р., Гологорский В. А. Сепсис в хирургии: современное состояние проблемы // Российск. мед. вестн. 2000. № 3. С. 4–8.
- Хаит Е. А., Наместников Ю. А., Матвиенко О. Ю. и др. Изменения в системе протеина С у больных множественной миеломой // Гематол. и трансфузиол. 2011. № 5. С. 3–6.
- Feterowski C., Weighardt H., Emmanuilidis K. Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis // Eur. J. Immunol. 2001. Vol. 31. P. 1268–1277.
- Hemker H. C., Béguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance // Curr Opin Hematol. 2004. Vol. 11. P. 170–175.
- Hemker H. C., Béguin S. Phenotyping the clotting system // Thromb. Haemost. 2000. Vol. 84. P. 747–751.
- Satran R., Almog Y. The Coagulopathy of Sepsis: Pathophysiology and Management // IMAJ. 2003. Vol. 5. P. 516–520.
- Shakh B.N., Lapshin V. N., Il'ina V. A. Changes in the kallikrein-kinin system and lipid peroxidation in patients with diffuse peritonitis, complicated by adult respiratory distress syndrome // Vestn. Khir. 2001. Vol. 160. P. 58–61.
- Solymoss S. Risk factors for thromboembolism: pathophysiology and detection // CMAJ. 2000. Vol. 16. P. 991–994.

Поступила в редакцию 27.03.2013 г.

Kh. A. Gamzatov¹, D. V. Gurzhy¹, S. M. Lazarev², Yu. A. Namestnikov³, A. A. Lerner³, L. P. Papayan³, O. G. Golovina³, E. A. Khait³, O. A. Smirnova³, O. Yu. Matvienko³

USE OF THROMBIN GENERATION ASSAY FOR THE EVALUATION OF COAGULATION AND ANTICOAGULANT ACTIVITY OF HEMOSTASIS SYSTEM IN PATIENTS WITH ABDOMINAL SEPSIS

¹ Department of faculty surgery, Northwest State Mechnikov Medical University, Saint-Petersburg; ² Municipal hospital of Saint Elizabeth, Saint-Petersburg; ³ Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology

Generally recognized factor, which complicates the course of sepsis, is the development of hypercoagulation syndrome. The increase of thrombin coagulation indicates on the elevation of risk of thrombus formation in microcirculation vessels, which could cause the formation of multiple organ failure. The thrombin generation assay is a new method of the evaluation of homeostasis system status. The test reflects the fermentation activity of thrombin and shows the functional condition, which arises in the interaction of procoagulant and anticoagulant. The diagnosis of generalized peritonitis had 30 patients (18 men and 12 women, aged 61±18,3 years) and they were included in the research. It was shown, that the use of thrombin generation assay in patients with the abdominal sepsis could give the well-timed analysis of hypercoagulation changes and the assessment of protein C system investment in the thrombin generation.

Key words: peritonitis, abdominal sepsis, dyscrasia, thrombin generation assay, protein C system investment in thrombin depression