

Тест генерации тромбина в лабораторном контроле эффективности терапии тромбастении Гланцманна препаратом Коагил-VII

В.В.Вдовин¹, Ю.А.Наместников², П.В.Свирин^{1,3}, Е.Э.Шиллер¹, Л.П.Папаян²

¹Гематологический центр при Измайловской детской городской клинической больнице, Москва;

²Российский научно-исследовательский институт гематологии

и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург;

³Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздрава России, Москва

В статье представлены результаты лабораторной оценки эффективности терапии тромбастении Гланцманна препаратом Коагил-VII с помощью теста генерации тромбина по H.Hemker – глобального функционального теста диагностики гемостаза. В исследовании определено действие препарата Коагил-VII на временные и количественные показатели теста, что позволило сделать вывод о положительном влиянии препарата на скорость образования и количество тромбина в плазме.

Ключевые слова: дети, тромбастения Гланцманна, тест генерации тромбина, Коагил-VII, эндогенный тромбиновый потенциал, калиброванная автоматизированная тромбограмма

Calibrated automated thrombin generation measurement for laboratory control of the efficiency of Coagil-VII therapy for Glanzmann's thrombasthenia

V.V.Vdovin¹, Yu.A.Namestnikov², P.V.Svirin^{1,3}, E.E.Shiller¹, L.P.Papayan²

¹Hematology Center, Izmailovo Pediatric Municipal Clinical Hospital, Moscow;

²Russian Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg;

³Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow

This report presents the results of laboratory evaluation of the efficiency of Coagil-VII therapy for Glanzmann's thrombasthenia. The study was carried out by H.Hemker's calibrated automated thrombin generation measurement, a global functional test for hemostasis diagnosis. The effects of Coagil-VII on the time and quantitative values of the measurement have been evaluated. The results indicated a positive effect of the drug on thrombin generation rate and plasma level.

Key words: children, Glanzmann's thrombasthenia, thrombin generation measurement, Coagil-VII, endogenous thrombin potential, calibrated automated thrombogram

Препараты рекомбинантного активированного фактора VII (rFVIIa) в настоящее время используются для профилактики и лечения кровотечений не только у больных с ингибиторной формой гемофилии, но и у пациентов с различными формами тромбоцитарной патологии.

Известно, что адекватная лабораторная оценка влияния препарата на систему свертывания крови способствует по-

вышению эффективности гемостатической терапии. При проведении заместительной терапии важно знать, насколько повышается активность дефицитного фактора. Что касается rFVIIa, то для определения его гемостатического действия, за исключением случаев врожденного дефицита FVII, используются методы глобальной оценки системы свертывания крови.

За последние годы были опубликованы результаты ряда исследований, в которых в качестве способа глобальной оценки эффективности терапии rFVIIa был применен тест генерации тромбина (ТГТ) [1–6].

В настоящей работе ТГТ был использован для оценки гемостатического эффекта rFVIIa (Коагил-VII®, ЗАО «ГЕНЕРИУМ», Россия) у 2 больных тромбастенией Гланцманна.

Для корреспонденции:

Наместников Юрий Андреевич, аспирант Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16

Телефон: (812) 717-3582

Факс: (812) 717-2550, 274-9227

E-mail: namestnikov@inbox.ru

Статья поступила 16.08.2011 г., принята к печати 23.09.2011 г.

Пациенты и методы

Коагил-VII вводили однократно внутривенно струйно для купирования кровотечений у 2 больных тромбастенией Гланцманна 1-го типа. У девочки 8 лет (масса тела 25 кг) с кровотечением из лунки удаленного зуба (наблюдение №1) доза препарата составила 192 мкг/кг (4,8 мг), у девочки 13 лет (масса тела 43 кг) с носовым кровотечением (наблюдение №2) – 111,6 мкг/кг (4,8 мг).

Другие препараты, оказывающие влияние на систему гемостаза, не назначали.

Для исследования венозную кровь забирали в вакуумные пробирки (Vacuett, “Greiner”, Австрия), содержащие 3,2% цитрата натрия основного в молярной концентрации 0,109 моль/л, в следующие временные точки: до введения препарата, через 15 мин и 2 ч после инъекции. Во всех случаях использовали иглы диаметром 1,2 мм, антикоагулянт в пробирках был комнатной температуры, соотношение крови и антикоагулянта составляло 9 : 1.

Свежезабранную кровь (в течение получаса после венопункции) центрифугировали при ускорении 150 g в течение 10 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы. Для исследования забирали верхнюю часть фракции полученной плазмы.

В качестве контроля использовали образцы плазмы, полученные от 2 здоровых добровольцев. Постановку ТГТ проводили одновременно в контрольных образцах и в образцах плазмы пациентов.

Для постановки ТГТ использовали реагенты и программное обеспечение производства Thrombinoscope™ bv (Нидерланды). В качестве триггера, содержащего 1 пмоль рекомбинантного человеческого тканевого фактора, использовали реагент PRP-Reagent. Калибровку проводили в каждом исследованном образце плазмы с помощью тромбинового калибратора Thrombin Calibrator (“Thrombinoscope™ bv”, Нидерланды) с активностью человеческого тромбина 580 нмоль. Свежую смесь специфичного для тромбина субстрата, меченного флюорогенным аминотетилкумарином (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), и хлорид кальция готовили непосредственно перед каждой постановкой теста из реагентов “Fluo-Buffer” и “Fluo-Substrate”. Постановку ТГТ проводили по методике, предложенной Н.Нemker и соавт. [7], в дублях на планшетном флуориметре Fluoroskan Ascent®, оборудованном диспенсером (“ThermoFisher SCIENTIFIC”, Финляндия). Измерение продолжали в течение 60 мин. Построение и расчет показателей кривых генерации тромбина с учетом автоматической калибровки осуществляли с помощью программного обеспечения Thrombinoscope® версия 3.0.0.26. В настоящем исследовании определяли следующие показатели ТГТ: Lag time (время фазы инициации свертывания крови, мин) – время от момента внесения смеси флюорогенного субстрата и ионизированного кальция в лунку с образцом и триггером до момента отклонения флуоресцентного сигнала от основной горизонтальной линии более чем на 2 стандартных отклонения; Peak thrombin (максимальное количество тромбина, нмоль) – максимальное количество тромбина, образующееся в процессе его генерации; Time to peak или ttPeak – время достижения максимального количества тромбина (мин); ETP (endogenous

thrombin potential – эндогенный тромбиновый потенциал, нмоль × мин) – количество тромбина, которое образовалось в плазме за определенный промежуток времени, измеряется площадью под кривой генерации тромбина. Показатель ETP был предложен Н.Нemker и соавт. [8] для количественного выражения генерации тромбина.

Результаты исследования и их обсуждение

У обеих пациенток кровотечение прекратилось через 5 мин после однократного введения препарата Коагил-VII и не возобновлялось в течение 48 ч наблюдения.

Как видно из графиков на рис. 1–4, под действием препарата Коагил-VII у обеих пациенток наблюдались изменения как временных (Lag time и ttPeak), так и количественных показателей (Peak thrombin и ETP).

У девочки 8 лет с кровотечением из лунки удаленного зуба (наблюдение №1) время фазы инициации свертывания крови (Lag time) через 15 мин после введения препарата Коагил-VII уменьшилось на 37% по сравнению с исходным и оставалось примерно таким же через 2 ч после введения препарата. Аналогичные изменения наблюдались и в отношении времени достижения максимального количества тромбина (ttPeak): через 15 мин после инъекции препарата Коагил-VII оно сократилось на 31%, а через 2 ч – на 33% по сравнению с исходным значением. Введение препарата Коагил-VII сопровождалось повышением максимального количества тромбина (Peak thrombin): значение этого показателя через 15 мин после инъекции увеличилось на 29%, а через 2 ч – на 38% по сравнению с исходным. ETP через 15 мин после введения препарата Коагил-VII повысился на 14%, а через 2 ч – на 23% по сравнению с исходным значением. Выявленные лабораторные изменения подтвердили клиническую эффективность проведенной терапии, действие которой, согласно полученным данным, сохранялось по крайней мере в течение 48 ч наблюдения.

У девочки 13 лет с носовым кровотечением (наблюдение №2) отмечалось аналогичное изменение показателей ТГТ в ответ на введение препарата Коагил-VII. Максимальное количество тромбина (Peak thrombin) у нее исходно было ниже, чем у девочки с кровотечением из лунки зуба (78,7 и 155,37 нмоль соответственно). Это различие коррелировало с более тяжелым течением тромбастении Гланцманна во втором случае. В результате введения препарата Коагил-VII у девочки с носовым кровотечением значительно сократилось время фазы инициации свертывания крови (Lag time): на 53 и 55% через 15 мин и 2 ч по сравнению с исходным. Время достижения максимального количества тромбина (ttPeak) в эти же сроки уменьшилось на 32 и 37% по сравнению с исходным. Увеличение максимального количества тромбина (Peak thrombin) через 15 мин после введения препарата Коагил-VII у пациентки с носовым кровотечением было менее выраженным (на 16% от исходного значения), чем у пациентки с кровотечением из лунки зуба, однако через 2 ч наблюдалось уже значительное повышение этого показателя – на 37% по сравнению с исходным. ETP увеличился на 21% через 15 мин после введения препарата Коагил-VII, но затем снизился, оставаясь тем не менее через 2 ч на 13% выше исходного значения.

Из графиков на рис. 1 и 2 видно, что после введения препарата Коагил-VII временные показатели ТГТ (Lag time и ttPeak) значительно сократились, став при этом даже меньше значений контрольных образцов. Эти изменения свидетельствуют о значительном ускорении развития гемостатической реакции после введения препарата Коагил-VII в ответ на ее активацию тканевым фактором. Значение количественного показателя Peak thrombin у пациентки с кровотечением из лунки зуба (наблюдение №1) исходно превышало значение аналогичного показателя в контрольной группе, в то время как у пациентки с носовым кровотечением (наблюдение №2) оно было ниже аналогичного показателя в контрольной группе на 42%. Подобные различия можно объяснить как степенью тяжести течения заболевания, так и различным количеством тромбоцитов в образцах исследуемой плазмы пациентов. У пациентки с носовым кровотечением (наблюдение №2) введение препарата Коагил-VII не позволило достичь значения максимального количества тромбина в контрольной группе при явном увеличении этого показателя. Несмотря на явный положительный ответ на введение препарата

Коагил-VII у обеих пациенток, значение ЕТР не достигло значений в контрольной группе.

Значительное ускорение фазы инициации свертывания крови и времени достижения максимального количества тромбина в богатой тромбоцитами плазме при выраженном увеличении максимального количества тромбина и ЕТР свидетельствует о том, что введение препарата Коагил-VII не только сокращает время развития гемостатической реакции, но и усиливает ее качество посредством увеличения количества образовавшегося тромбина, что в свою очередь улучшает качество сгустка [9]. Выявленные изменения ТГТ позволяют сделать вывод о том, что под действием препарата Коагил-VII происходит ускорение свертывания крови и усиление гемостаза за счет повышенной генерации тромбина. При этом ускорение свертывания крови представляется более важным при нарушении сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, наблюдающемся у больных тромбастенией Гланцманна.

Таким образом, проведение ТГТ по методике, описанной Н.Нemker и соавт. [7], позволяет на лабораторном уровне зарегистрировать изменения в системе гемостаза, наблюдающиеся при введении больным тромбастенией Гланцманна

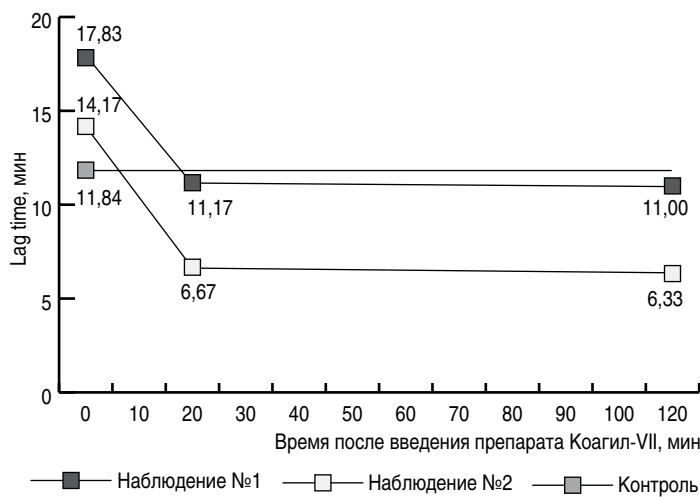


Рис. 1. Изменение времени фазы инициации свертывания крови (Lag time) в результате введения препарата Коагил-VII.

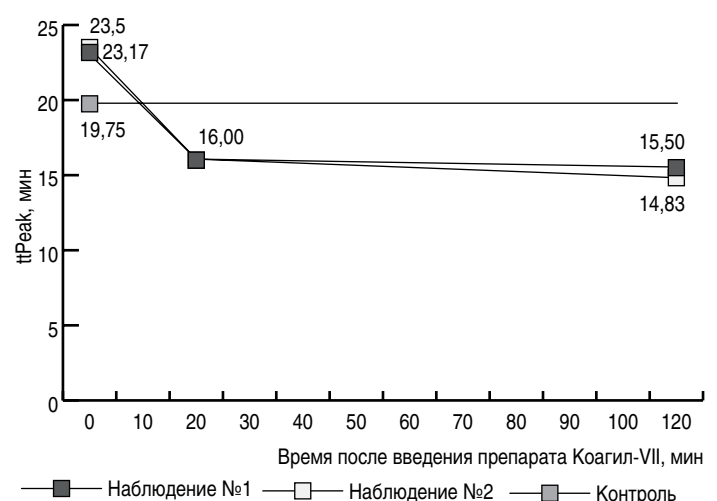


Рис. 2. Изменение времени достижения максимального количества тромбина (ttPeak) в результате введения препарата Коагил-VII.

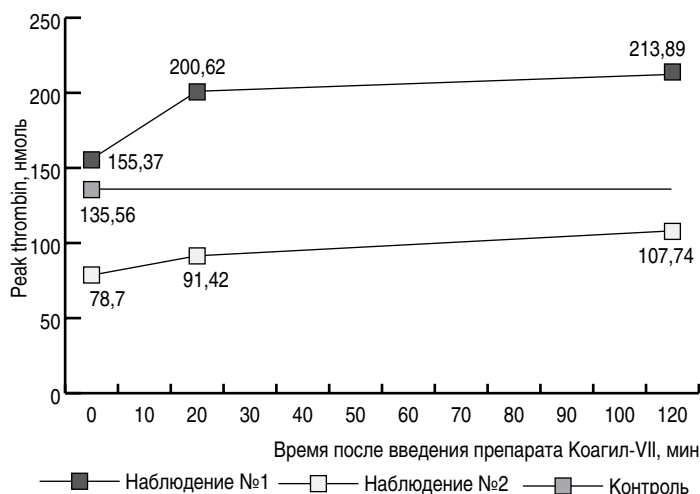


Рис. 3. Изменение максимального количества тромбина (Peak thrombin) в результате введения препарата Коагил-VII.



Рис. 4. Изменение эндогенного тромбинового потенциала (ЕТР) в результате введения препарата Коагил-VII.

препарата rFVIIa – Коагил-VII. Использование этого метода для количественной оценки эффективности терапии препаратом Коагил-VII дает объективное представление о влиянии проводимого лечения на гемостаз, а также, возможно, позволит индивидуально подбирать дозу назначаемого лекарственного средства.

Литература

1. Altman R., Scasiotta A., De Lourdes Herra M., et al. Recombinant factor VIIa reverses the inhibitory effect of aspirin or aspirin plus clopidogrel on in vitro thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2022–7.
2. Dargaud Y., Lambert T., Trossaert M. New advances in the therapeutic and laboratory management of patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia* 2008; 14(Suppl. 4): 20–7.
3. Livnat T., Martinowits U., Zivelin A., Seligsohn U. Effects of factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA), recombinant factor VIIa or both on thrombin generation in normal and haemophilia A plasma. *Haemophilia* 2008; 14(4): 782–6.
4. Tanaka K., Szlam F., Dickneite G., et al. Effects of prothrombin complex concentrate and recombinant activated factor VII on vitamin K antagonist induced anticoagulation. *Thromb Res* 2008; 122(1): 117–23.
5. Van Veen J., Gatt A., Bowyer A., et al. The effect of tissue factor concentration on calibrated automated thrombography in the presence of inhibitor bypass agents. *International J of Laboratory Hematology* 2009; 31(2): 189–98.
6. Poon M.C., d'Oiron R., von Depka M., et al. International data collection on recombinant factor VIIa and congenital platelet disorders study group. Prophylactic and therapeutic recombinant factor VIIa administration to patients with Glanzmann's thrombasthenia: results of an international survey. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1096–103.
7. Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(1): 4–15.
8. Hemker H.C., Wielders S., Kessels H., et al. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 1993; 70(4): 617–24.
9. Dargaud Y., Bordet J.C., Treциак M.C., et al. A case of Glanzmann's thrombasthenia successfully treated with recombinant factor viia during a surgical procedure: observations on the monitoring and the mechanism of action of this drug. *Haematologica* 2006; 91(6, Suppl.): ECR20.

Информация о соавторах:

Вдовин Владимир Викторович, заведующий Гематологическим центром при Измайловской детской городской клинической больнице
Адрес: 105007, Москва, Верхняя Первомайская ул., 48/15
Телефон: (495) 465-6083
E-mail: vdovin.v@gmail.com

Свирин Павел Вячеславович, врач Гематологического центра при Измайловской детской городской клинической больнице, заведующий отделением геморрагических заболеваний с центром гемофилии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России
Адрес: 105007, Москва, Верхняя Первомайская ул., 48/15
Телефон: (495) 465-6083

Шиллер Екатерина Эдуардовна, врач Гематологического центра при Измайловской детской городской клинической больнице
Адрес: 105007, Москва, Верхняя Первомайская ул., 48/15
Телефон: (495) 465-6083

Папаян Людмила Петровна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории свертывания крови Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России
Адрес: 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16
Телефон: (812) 717-35-82
Факс: (812) 717-2550, 274-92-27
E-mail: papayan@mail.ru