

Генерация тромбина у пациентов с наследственной тромбофилией, получающих антикоагулянтную терапию.

Карпич С.А., Шмелева В.М., Головина О.Г., Капустин С.И., Смирнова О.А., Папаян Л.П.
*ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Россия,
Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская д.16*

*Контактное лицо: Карпич Светлана Александровна, e-mail: sveticlis@yandex.ru , тел.:
89214476319*

Резюме:

Наследственная тромбофилия ассоциируется с высоким риском развития венозного тромбоза (ВТЭ). Для лечения и профилактики ВТЭ применяют антикоагулянтную терапию. В настоящее время появились новые оральные антикоагулянты (НОАК), которые наряду с варфарином используют в клинической практике. Ривароксабан – прямой ингибитор фактора Ха – один из таких препаратов. В работе представлены результаты теста генерации тромбина (ТГТ) у носителей мутаций в генах факторов II (G20210A) и V (G1691A), получающих антикоагулянтную терапию варфарином или ривароксабаном. Лечение и варфарином и ривароксабаном сопровождалось снижением скорости генерации и максимальной концентрации тромбина. Эффективность работы системы протеина С была нарушена у пациентов, получающих варфарин. Прием ривароксабана способствовал выраженному увеличению антикоагулянтного действия системы протеина С. Выявленные особенности названных препаратов расширяют возможности клиницистов для индивидуального подхода к реализации лечения и профилактики ВТЭ в зависимости от клинической ситуации.

Ключевые слова: наследственная тромбофилия, тест генерации тромбина, венозный тромбоз, варфарин, ривароксабан.

Thrombin generation in patients with hereditary thrombophilia, receiving anticoagulant therapy.

Karpich S., Shmeleva V., Golovina O., Kapustin S., Smirnova O., Papayan L.

FGBU «Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, FMBA of Russia»

Abstract:

Inherited thrombophilia is associated with a high risk of developing venous thromboembolism (VTE). Anticoagulant therapy is used for the treatment and prevention of VTE. Currently, new oral anticoagulants (NOAC), were appeared which, along with warfarin are used in clinical practice. Rivaroxaban – direct inhibitor of factor Xa is one of such drugs.

The paper presents the results of the thrombin generation test (TGT) for carriers of mutations in genes of factors II (G20210A) and V (G1691A), receiving anticoagulant therapy with warfarin or rivaroxaban. Treatment with warfarin or rivaroxaban was accompanied by a decrease in the velocity and maximum concentration of thrombin. The efficiency of the protein C system was disrupted in patients receiving warfarin. Therapy with rivaroxaban contributed to a marked increase in the anticoagulant action of protein C system.

The peculiarities of the mentioned drugs enhance the ability of clinicians to the individual approach to the treatment and prevention of VTE depending on clinical situation.

Key words: hereditary thrombophilia, thrombin generation test, venous thromboembolism, warfarin, rivaroxaban.

Введение.

Тромбозы занимают важное место в современной медицине и являются актуальной проблемой здравоохранения, что обусловлено высоким уровнем заболеваемости, инвалидизации, смертности, а также материальных затрат на лечение. Частота венозных тромбозов составляет 150-200 человек на 100000 в популяции [1]. Крайне важно отметить, что в последние десятилетия значительно чаще отмечается развитие тромбоза в молодом возрасте. Данный факт ещё больше поднимает медико-социальную значимость этой проблемы.

Общепризнано, что тромбоз является мультифакторным процессом, значимую роль в котором играет генетическая предрасположенность индивида к этой патологии. Мутации в генах факторов II (G20210A) и V (G1691A) свертывания крови являются безусловными детерминантами наследственной тромбофилии и ассоциированы с высоким риском развития венозного тромбоэмболизма (ВТЭ) [2]. Известно, что для носителей Лейденской мутации в гене фактора V (G1691A) характерно наличие резистентности к активированному протеину С (activated protein C resistance - APCR), в результате чего нарушается действие одной из наиболее значимых систем естественных антикоагулянтов – системы протеина С, которая препятствует появлению большого количества тромбина в циркуляции. Мутация в гене фактора II (G20210A) является причиной высокого уровня протромбина, что может сопровождаться усилением процесса образования тромбина. Долгие годы в качестве антикоагулянтного препарата, предназначенного для лечения и профилактики ВТЭ, использовали варфарин – непрямой оральный антикоагулянт из группы препаратов кумаринового ряда. Под действием препарата нарушается синтез витамин-К-зависимых прокоагулянтных факторов свертывающей системы (II, VII, IX, X), что приводит к снижению генерации тромбина, тем самым уменьшая риск тромбообразования. В то же время прием варфарина сопровождается ингибированием синтеза основных компонентов системы естественных антикоагулянтов – протеина С и протеина S, которые также являются витамин-К-зависимыми факторами [3]. К особенностям препарата можно отнести узкое «терапевтическое окно», большое число межлекарственных взаимодействий, необходимость строгого соблюдения диеты и постоянного контроля МНО с подбором безопасной и эффективной дозы препарата [3, 4]. Все выше перечисленное снижает приверженность пациентов к антикоагулянтной терапии варфарином.

В последнее десятилетие в распоряжении у клиницистов появились новые препараты – прямые оральные антикоагулянты. Принципиальным отличием этих препаратов от варфарина является то, что их действие направлено на прямую ингибицию какого-то одного определенного коагуляционного фактора. В настоящее время в качестве таких факторов выступают тромбин или активный фактор X (фХа). Одним из высокоселективных прямых ингибиторов фХа является ривароксабан [5]. Препарат нейтрализует как свободный, так и связанный фХа, уменьшая образование тромбина [6].

Максимальная концентрация препарата в плазме достигается через 2-4 часа после его приема, нормализация активности фактора Ха происходит примерно через 24 часа [6]. Ривароксабан, как и другие новые оральные антикоагулянты, позиционируется как препарат, не нуждающийся в контроле за проводимой терапией. На данный момент не существует стандартизированного лабораторного метода, который позволил бы оценить антикоагулянтное действие препарата на организм человека. Особенностью ривароксабана является широкое «терапевтическое окно», практически отсутствие межлекарственных взаимодействий, отсутствие необходимости соблюдения диеты, простота дозировки и режима приема препарата.

Оба препарата, и варфарин и ривароксабан, несмотря на различный механизм действия, ингибируют образование тромбина. При этом варфарин, в отличие от ривароксабана, приводит не только к снижению интенсивности прокоагулянтных реакций, но и к нарушению функционирования системы протеина С. Суммарный эффект про- и антикоагулянтных взаимодействий можно определить с помощью интегрального теста – теста генерации тромбина (ТГТ), который в последнее время достаточно широко применяется для оценки коагуляционного потенциала крови пациентов, получающих антикоагулянтную терапию [7].

Цель. Оценить особенность генерации тромбина у пациентов с наследственной тромбофилией, находящихся на терапии различными антикоагулянтными препаратами. **Материалы и методы.** Обследовано 34 пациента – гетерозиготных носителей мутации в гене фактора V G1691A (Лейденская мутация) или/и мутации G20210A в гене протромбина с эпизодом тромбоза в анамнезе (11 мужчин и 23 женщин, Ме возраста составила 41 год). На момент обследования все пациенты находились на стационарном или амбулаторном лечении в ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» и получали антикоагулянтную терапию.

В зависимости от получаемого антикоагулянтного препарата пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 16 больных, получающих варфарин, из них 12 носителей Лейденской мутации и 4 носителя мутации в гене протромбина (G20210A). Во

вторую группу вошло 20 пациентов, принимающих ривароксабан, из них 17 носителей мутации в гене фактора V (G1691A) и 3 носителя мутации в гене протромбина (G20210A). Для исследования образцы крови получали в утреннее время путем пункции кубитальной вены иглой диаметром 0,9 мм, самотёком. Для пациентов получающих варфарин время взятия крови не зависело от последнего приема препарата, а у больных принимающих ривароксабан, забор крови производился не ранее, чем через 12-24 часа после последнего приема таблетки. Для молекулярно-генетического тестирования кровь стабилизировали 2,5% раствором К2ЭДТА в соотношении 9:1. При взятии образцов крови для проведения теста генерации тромбина в качестве антикоагулянта использовали 3,2% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1.

Молекулярно-генетическое тестирование на наличие мутаций FV G1691A и FII G20210A проводилось методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом.

Постановка ТГТ выполнялась по методике Н. Hemker в бедной тромбоцитами плазме. [8].

В качестве триггерного агента использовали смесь рекомбинантного человеческого тканевого фактора (конечная концентрация 5 пМоль) и отрицательно заряженных прокоагулянтных фосфолипидов (конечная концентрация 4 мкМоль). Для оценки эффективности работы системы протеина С использовали параллельную постановку ТГТ с и без добавления ТМ, для чего применяли соответствующий реагент - PPP Reagent+/-TM (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) [9]. Использовался планшетный флюориметр (Fluoroscanner Ascent, Thermolab system, Finland). Кривые генерации тромбина построены и обчислены при помощи Thrombinoscope software (Thrombinoscope BV, The Netherlands).

В тромбограмме оценивали следующие показатели: РТ (Peak thrombin - максимальное количество тромбина, образующегося в образце, нМоль), ЕТР (endogenous thrombin potential - эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль*мин) и V (скорость образования тромбина, нМ/мин). Скорость образования тромбина рассчитывали по формуле $RT/(tt_{Peak} - \text{Lag-time})$, где tt_{Peak} – время генерации максимального количества тромбина в образце (мин) и Lag-time – время инициации свёртывания (мин). Выполнение теста с добавлением ТМ, позволяло рассчитывать величину падения показателей ЕТР и РТ (%) под действием ТМ. Незначительное или выраженное снижение показателей ЕТР и РТ после добавления

ТМ расценивали как нарушение или усиление эффективности работы системы протеина С соответственно.

Референтные интервалы для показателей ТГТ установлены при обследовании 34 здоровых волонтеров.

Для анализа полученных данных определяли значение медианы (Ме) и 95% доверительный интервал (ДИ). Статистический анализ результатов выполняли с помощью непараметрических методов (программное обеспечение STATISTICA 6.1.). Оценку достоверности различий между двумя независимыми выборками проводили с использованием критерия Манна-Уитни, различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Показатели ТГТ пациентов с наследственной тромбофилией, получающих терапию различными антикоагулянтными препаратами, представлены в таблице.

Таблица. Показатели ТГТ в контрольной группе и в группах пациентов с наследственной тромбофилией, получающих терапию варфарином или ривароксабаном (Ме, 95% ДИ).

Показатели ТГТ	Контрольная группа (n=34)	Группа пациентов, получающих варфарин (n=16)	Группа пациентов, получающих ривароксабан (n=18)
ЕТР (ТМ-) (нМоль×мин)	1642,3 1221,6-2137,0	890,0* ° 302,5-1641,0	1528,5 768,5-2422,5
падение ЕТР (%)	52,9 38,7-67,5	25,0* ° 11,0-46,0	70,0* 28,0-83,0
РТ (ТМ-) (нМоль)	285,8 205,0-345,2	143,5* 59,9-280,8	137,4* 52,8-325,9
падение РТ (%)	42,1 28,0-57,2	5,0* ° 0,0-30,0	34,0* 13,0-56,0
V (нМ/мин)	95,4 48,9-128,4	53,7* 19,8-133,7	34,0* 7,1-125,4

Примечания:

* - статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,01$).

° - статистически значимое отличие группы пациентов, получающих варфарин, от группы пациентов, получающих ривароксабан ($p < 0,01$).

ЕТР (ТМ-) – эндогенный потенциал тромбина в постановке ТГТ без добавления ТМ

падение ЕТР – процент падения показателя ЕТР после добавления ТМ

РТ (ТМ-) – максимальная концентрация тромбина в постановке ТГТ без добавления ТМ

падение РТ – процент падения показателя РТ после добавления ТМ

V – скорость образования тромбина

Анализ результатов ТГТ обнаружил выраженные отличия между показателями, полученными у пациентов, находящихся на антикоагулянтной терапии, и у здоровых людей. Для обеих групп пациентов, получающих разные антикоагулянты, было характерно значительное снижение скорости генерации тромбина, а также максимальной концентрации тромбина в постановке теста без ТМ. Показатель эндогенного потенциала тромбина значительно понижен в группе больных, которые принимали варфарин, тогда как терапия ривароксабаном не сопровождалась выраженными изменениями ЕТР по сравнению со здоровыми лицами. Наибольший интерес представляла разница между обеими группами пациентов в показателях, характеризующих процент падения ЕТР и РТ после добавления ТМ. Так, если в группе получающих варфарин процент падения и ЕТР и РТ значительно ниже нормальных показателей, то при приеме ривароксабана процент падения ЕТР после добавления ТМ увеличивался относительно того же показателя в контрольной группе. Процент падения РТ после добавления ТМ менялся не так выражено, но при этом значительно превышал значение, характеризующее пациентов, принимающих варфарин.

Обсуждение. Наличие наследственной тромбофилии, обусловленной носительством мутаций в генах факторов II (G20210A) и/или V (G1691A) свёртывания крови, предполагает развитие эпизодов ВТЭ значительно чаще, чем в общей популяции [10]. Для лечения и/или профилактики тромботических осложнений используют различные антикоагулянтные препараты, которые ограничивают генерацию тромбина и, следовательно, тромбообразование. Несмотря на единую конечную цель – снижение образования тромбина, механизм действия препаратов может кардинально отличаться.

Так, варфарин, являясь антагонистом витамина К, приводит к нарушению синтеза ряда прокоагулянтных факторов (II, VII, IX, X), тем самым значительно уменьшая генерацию тромбина [3, 4]. В ТГТ, выполненным нами в группе пациентов, получающих варфарин, эта особенность действия препарата проявляется выраженным снижением всех показателей тромбограммы (ЕТР, РТ и V). В то же время, процент падения ЕТР и РТ после добавления ТМ в этой группе пациентов значительно ниже, чем у здоровых людей. Данный факт указывает на несостоятельность антикоагулянтной системы протеина С у больных обследованной группы. Такой результат можно объяснить не только наличием у них APCR, обусловленной лейденской мутацией в гене фактора V, но и тем, что синтез протеинов С и S, являющихся одними из основных составляющих этой системы, под действием варфарина нарушается также, как и синтез прокоагулянтных факторов [3, 4]. В результате APCR, характерная для носителей лейденской мутации, в значительной мере усугубляется, что может нежелательным образом сказаться на лечении таких пациентов. Снижение образования тромбина под действием препарата ривароксабана, прямого ингибитора фХа, в ТГТ проявляется в первую очередь выраженным падением скорости его генерации, а также уменьшением максимальной концентрации тромбина. Изменение данных показателей практически не отличается в обеих группах обследованных больных. Однако ЕТР при терапии ривароксабаном значительно выше одноименного показателя в группе пациентов, получающих варфарин, и не обнаруживает достоверных отличий от нормы. Такие же результаты были обнаружены другими авторами [11]. Обращает на себя внимание принципиальное различие показателей ТГТ между двумя группами больных, которое проявляется в степени падения ЕТР и РТ после добавления ТМ. Если в случае приёма варфарина падение ЕТР и РТ было незначительным и составляло 25% и 5%, то под действием ривароксабана данные показатели вырастали до 70% и 34% соответственно. Такая особенность, отмеченная ранее у пациентов без наследственной тромбофилии, проходящих терапию ривароксабаном и варфарином [12], может указывать на возможность данного препарата оказывать выраженное антикоагулянтное действие независимо от наличия у пациентов APCR, не нарушая при этом синтез как про-, так и антикоагулянтных факторов системы свёртывания крови.

Выводы. Выполнение ТГТ при обследовании двух групп пациентов с наследственной тромбофилией позволило оценить особенность действия антикоагулянтных препаратов –

варфарина и ривароксабана. Оба препарата приводят к значительному снижению максимальной концентрации тромбина и скорости его генерации. Наряду с этим, приём варфарина сопровождается выраженной несостоятельностью работы системы протеина С. Терапия ривароксабаном, напротив, способствует повышению её эффективности. Выявленные особенности антикоагулянтного действия названных препаратов расширяют возможности клиницистов для индивидуального подхода к реализации лечения и профилактики ВТЭ в зависимости от клинической ситуации.

Список литературы:

1. Генетические факторы риска развития венозных тромбозов в раннем возрасте / А.М. Шейдина, О.В. Сироткина и др. // Вопросы современной педиатрии. – 2005. – Т. 4. – №2. – С. 42-46.
2. Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European prospective cohort on thrombophilia / Vossen C.Y., Conard J., Fontcuberta J. et al. // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2005. – № 3. – P. 459-64.
3. Бокерия О.Л. Откажемся ли мы от варфарина? / О.Л. Бокерия, Т.И. Копалиани // Анналы аритмологии. – 2016. – Т. 13. – №2. – С. 87-95.
4. Галстян Г.М. Нарушение гемостаза, обусловленные дефицитом витамин К-зависимых факторов свертывания крови – патогенез, способы коррекции и рекомендации по лечению / Г.М. Галстян // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т. 57. – №2. – С. 7-21.
5. Paikin J.S. Rivaroxaban for stroke prevention in atrial fibrillation: a critical review of the ROCET AF trial / J.S. Paikin, J.J. Manolagos, J.W. Eikeldoom // Expert Review of Cardiovascular Therapy. – 2012. – 10(8) – P. 965-972.
6. Никонов В.В. Механизм действия антикоагулянтов и перспективы клинического применения ривароксабана – первого эффективного ингибитора фактора Ха с возможностью энтерального введения / В.В. Никонов, С.В. Курсов // Медицина неотложных состояний. – 2011. – №10(34) – С. 52-57.
7. Use of calibrated automated thrombography thrombomodulin to recognize the prothrombotic phenotype / Dargaud Y., Trzeciak M., Borget J. et al. // Thrombosis and Haemostasis. – 2006. – № 96. – P. 562-567.

8. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. / Hemker H.C., Giesen P., Dierikx R. Al et al // Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis. – 2003. – №33 – P. 4-15.
9. Значение теста генерации тромбина в клинической практике / Ю.А. Наместников, О.Г. Головина, Л.П. Папаян // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2011 – 4(48) – С. 47-49.
10. MacCallum, P. Diagnosis and management of heritable thrombophilias / P. MacCallum, L. Bowles, D. Keeling // British Medical Journal. – 2014. - №17 – P. 349 – 358.
11. Изменение антикоагулянтного действия ривароксабана на протяжении суток / И.В. Гельцер, О.А. Смирнова, О.Ю. Матвиенко, О.Г. Головина, Л.П. Папаян // Вестник хирургии им. И.И.Грекова. – 2015. – Т. 174. – №4. – С. 77-79.
12. Особенности действия пероральных антикоагулянтов / И.В. Гельцер, О.А. Смирнова, О.Ю. Матвиенко и др. // Сердце: журнал для практикующих врачей. – 2015. – Т. 14. -№3. – С. 154-157.