

Лабораторный мониторинг терапии низкомолекулярными гепаринами при инфаркте мозга. Часть 2

** ГУ Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии*

***ГУО Белорусская медицинская академия последипломного образования*

Широкое внедрение в повседневную клиническую практику антикоагулянтных средств ставит перед клиницистами и специалистами клинической лабораторной диагностики задачу по разработке и внедрению лабораторного контроля за их применением. Лабораторный мониторинг используется не только для контроля дозировки применяемых препаратов, но и для оценки достаточности антикоагулянтной терапии, когда лабораторные методы предназначены отразить, в какой степени удалось снизить уровень тромбинемии и устранить риск дальнейшего тромбообразования.

Периодичность, сроки и характер лабораторного контроля применения препаратов гепарина детерминируется дозами и путем введения препарата [3,15]. Активность нефракционированного гепарина определяется по его способности удлинять парциальное тромбопластиновое время свертывания крови (АПТВ). Для достижения терапевтического эффекта АПТВ поддерживают на уровне, в 1,5-2 раза превышающем нормальные значения показателя [14]. Необходимо подчеркнуть, что профилактические дозы низкомолекулярных гепаринов (НМГ), как правило, не вызывают геморрагических осложнений и не требуют временного лабораторного мониторинга. При их назначении у больных с инфарктом мозга АПТВ не изменяется или незначительно удлиняется. При курсовом приёме НМГ в определённых клинических ситуациях, сопряженных с риском кровотечения и опасностью передозировки рекомендуется проводить лабораторный контроль проводимой терапии [6]:

- при слабой и умеренной почечной недостаточности (клиренс, рассчитанный по формуле Кокрофта: 30-60 мл/мин);
- при пониженной массе тела или ожирении;
- при кровотечениях неясного генеза.

Лабораторный мониторинг применения НМГ рекомендуется проводить на основе теста анти-Ха-активности плазмы (анти-Ха, единица измерения - МЕ/мл), ставить который следует перед очередным введением препарата. Тест анти-Ха заключается в измерении оставшегося фактора активного фактора X (Ха) с использованием специфического хромогенного субстрата. Уровень анти-Ха для разных препаратов колеблется от 0,2 до 1,5 анти-Ха МЕ/мл. Терапевтический диапазон анти-Ха при терапии различными НМГ представлен в таблице.

Таблица. Терапевтический диапазон анти-Ха при терапии различными НМГ

Препарат	Показания	Дозировка	Анти-Ха (МЕ/мл)
Фраксипарин Клексан Фрагмин	Профилактика венозного тромбоза - умеренный риск	0,3 мл п/к 1 р/сут 0,2 - 0,4 мл п/к 1 р/сут 2500 МЕ п/к 1 р/сут	Мониторинг не требуется 0,2-0,4 МЕ/мл 0,1-0,4 МЕ/мл
Фраксипарин Клексан Фрагмин	Профилактика венозного тромбоза - высокий риск	0,3 – 0,6 мл п/к 1 р/сут 0,4мл п/к 1 р/сут или 0,3мл п/к 2 р/сут 5000 МЕ п/к 1 р/сут	0,2-0,4 МЕ/мл 0,4-1,0 МЕ/мл (определяется до 24 ч после однократной п/к инъекции) 0,5-1,0 МЕ/мл
Фраксипарин Клексан Фрагмин	Интенсивная терапия при инфаркте миокарда, венозных и артериальных тромбозах	0,1 мл/10 кг п/к 2 р/сут 1мг/кг п/к 2 раза /сут 100-120 МЕ/кг п/к 2 р/сут	0,8-1,2 МЕ/мл ≈ 1,0 МЕ/мл (определяется до 24 ч после однократной п/к инъекции) ≈1,0-1,5 МЕ/мл
Фраксипарин Клексан Фрагмин	Экстракорпоральное кровообращение, гемодиализ < 4 часов	65 МЕ/кг интраваскулярно в артериальный шунт петли диализа 1 мг/кг 5000 МЕ однократно в/в болюсно или в/в болюсно 30-40 МЕ/кг, затем 10 – 15 МЕ/кг/час	0,5-1,0 МЕ/мл ≈ 1,0-1,3 МЕ/мл (определяется до 24 ч после однократной п/к инъекции) 0,5-1,0 МЕ/мл
Фраксипарин Клексан Фрагмин	Экстракорпоральное кровообращение, гемодиализ > 4 часов	0,3 – 0,6 мл в зависимости от массы тела 1 мг/кг 30-40 МЕ/кг, затем 10-15МЕ/кг/час	≈ 1,2 МЕ/мл ≈ 1,3 МЕ/мл (определяется до 24 ч после однократной п/к инъекции) ≈ 1,2 МЕ/мл

При исследовании анти-Ха-активности плазмы очень важно соблюдать время получения пробы - через 3-4 ч после инъекции для профилактических доз при однократном введении и в середине между двумя инъекциями при двукратном введении. Исследование должно быть проведено в течение 1-2 ч. В тесте используют фермент яда гадюки Рассела, активирующий фактор X (RVV-X - factor X activation enzyme from Russel viper venom), или яда гюрзы обыкновенной (лебетоксовый тест). Фактор Ха определяют в прямой реакции с хромогенным субстратом. Принцип метода представлен на рисунке 1, где pNA - это паранитроанилин, а измерение проводится при длине волны 405 нм фотометрическим методом.

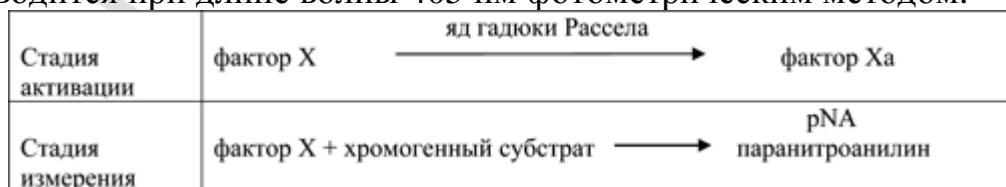


Рис. 1. Принцип метода прямой реакции с хромогенным субстратом

Актуальность определения активности против фактора Ха возрастает при геморрагии, почечной недостаточности, избыточной массы тела больного или длительном (несколько месяцев) использовании препарата. При неотложной терапии требуются большие дозы НМГ. Терапевтическая концентрация должна соответствовать уровню 0,5-1,5 анти-Ха МЕ/мл. Исследование анти-Ха позволяет избежать геморрагических осложнений.

Применяются также тесты для выявления гепарина в плазме, так как антикоагулянтное действие низкомолекулярного гепарина АПТВ не улавливает [4]:

- определение НМГ с помощью хромогенных субстратов;
- определение НМГ с помощью коагуляционных методов

В тесте с хромогенным субстратом гепарин определяется опосредованно: используется его способность усиливать комплексообразование фактора Ха с антитромбином (АТ) и тем самым подавлять его активность, после чего определяется остаточная активность фактора Ха (рисунок 2). Метод определения остаточной анти-Ха-активности применяется при контроле за лечением короткоцепочечным фракционированным гепарином, который обладает большей тропностью к фактору Ха, чем к тромбину.

Стадия ингибции	фактор Ха _{избыток} + АТ $\xrightarrow{\text{гепарин}_{\text{проба}}}$ X-АТ _{неакт.} + фактор Ха _{остаток}
Стадия измерения	фактор Ха _{остаток} + хромогенный субстрат \longrightarrow pNA

Рис. 2. Определение НМГ с помощью хромогенного субстрата

Тест может выполняться в разных модификациях: как кинетический метод, определение по начальной скорости или метод по конечной точке. В некоторых тестах используется насыщающая концентрация АТ, тогда тест обозначается как «общий гепарин», в других - используется эндогенный АТ пробы, в этих случаях тест обозначается как набор для определения комплекса гепарин-АТ или «активный гепарин». Определение гепарина с использованием хромогенных субстратов легко адаптируется для автоматических биохимических анализаторов. На результаты теста с хромогенными субстратами не оказывают влияния продукты деградации фибрина (ПДФ) и повышенное содержание фактора VIII, которые меняют результаты при определении АПТВ. Для тестов на определение гепарина разработаны и промышленно выпускаются калибраторы - лиофильно высушенные препараты плазмы со стандартным содержанием гепарина. Калибраторы должны быть протестированы по стандарту ВОЗ, которому придано значение активности 1,0 анти-Ха МЕ/мл.

Принцип коагуляционного метода определения НМГ основан на ингибировании свободного фактора Ха на первом этапе коагуляционного каскада (фаза образования протромбиназы). После инкубационного периода выпадение сгустка вызывается добавлением реагентов, содержащих фосфолипиды с адсорбированными на них фактором V, протромбином, фибриногеном из бычьей плазмы и хлоридом кальция (рисунок 3). Тест может выполняться в цельной крови на коагулометрах с механической системой регистрации.

Стадия ингибции	фактор Ха _{избыток} + АТ $\xrightarrow{\text{гепарин}_{\text{проба}}}$ X-АТ _{неакт.} + фактор Ха _{остаток}
Стадия измерения	ф. Ха _{остаток} + ф. V-ф. II-фибриноген-ФЛ-Са ²⁺ -реагент \longrightarrow сгусток

Рис. 3. Определение НМГ с помощью коагуляционных методов

Основным критерием терапевтической эффективности препаратов НМГ можно считать купирование тромбинемии, так как пока в крови больного образуется активный тромбин, у него сохраняется риск развития и прогрессирования тромбоза. Выявление этого риска основывается на определении промежуточных продуктов превращения протромбина в тромбин или фибриногена в фибрин - маркёров тромбинемии. Терапевтическая эффективность характеризуется снижением или исчезновением лабораторных признаков тромбинемии: снижение уровня растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), снижение содержания в плазме комплексов тромбин-антитромбин (ТАТ) и уровня фрагментов протромбина F1+2, уменьшение в плазме количества фибринопептида А. Определение продуктов паракоагуляции (этаноловый, в-нафтоловый тесты) тоже возможно, но менее специфично.

При ряде форм патологии, характеризующихся активацией свертывания крови (тромбозы, тромбофилии), в т.ч. при инфаркте мозга, происходит расширение пула фибриногена: за счет свободного тромбина происходит постоянный процесс трансформации фибриногена в фибрин с появлением в крови фибринопептидов А и В, накоплением мономеров фибрина. Активация фибринолиза сопровождается повышенным образованием ПДФ, которые взаимодействуют с фибрин-мономерами, увеличивая количество РФМК (это фибрин-мономеры, олигомеры, а также их комплексы с ПДФ). В норме в крови из пула фибриногена присутствует практически только сам фибриноген в количестве 1,8-3,5 г/л. Метод количественного определения в плазме РФМК осуществляется с помощью ортофенантролинового теста, принцип которого основан на оценке времени появления в исследуемой бедной тромбоцитами цитратной плазме хлопьев фибрина после добавления к ней фенантролина [1]. В качестве реактива используется 0,78% водный раствор о-фенантролина гидрохлорида, приготовленный непосредственно перед исследованием. Тест считается положительным, если в плазме в первые 150 с образуются хорошо видимые в проходящем свете хлопья или зерна паракоагулята. Отмечают время его появления в секундах и по таблице, построенной на основе калибровочного графика, определяют количество РФМК в исследуемой плазме. У 94% здоровых людей содержание в плазме РФМК не превышает 40,0 мг/л и лишь у 6% находится в пределах 45,0-50,0 мг/л.

Клиренс тромбин-антитромбинового комплекса из системы циркуляции достаточно быстрый, он удаляется в течение нескольких минут. Поэтому его присутствие в плазме свидетельствует об образовании тромбина *in vivo* непосредственно в момент взятия крови на исследование и о возможности истощения антикоагулянтов. В методе иммуноферментного анализа на твердую фазу нанесены антитела к тромбину. После отмывки проявляющие антитела связываются с антитромбином, присутствующим в ТАТ, оценка количества ТАТ проводится цветной реакцией. Определение ТАТ очень информативно в острой ситуации, непосредственно при тромбообразовании.

Тест определения фрагментов протромбина (F1+2) отражает активность превращения протромбина в тромбин с участием протромбиназного комплекса (фактор Ха, фактор Va, фосфолипиды и Ca²⁺), который формируется при активации системы коагуляционного гемостаза.

Определение F1+2, так же как ТАТ, проводится с целью диагностики состояния гиперкоагуляции, которое может быть значимым при тромботических состояниях и

последующей тромболитической терапии [2,4]. Исследование F1+2 полезно использовать при мониторинге лекарственной коррекции состояния гиперкоагуляции, в частности при лечении гепарином и концентратами антитромбина. Определение ТАТ и F1+2 характеризуется высокой аналитической чувствительностью, поэтому их увеличение можно зарегистрировать до появления клинических признаков ДВС-синдрома. Фрагменты протромбина, в отличие от ТАТ, имеют относительно продолжительный период циркуляции в системе кровотока. Состояние гиперкоагуляции можно зарегистрировать с помощью как ТАТ, так и F1+2, тогда как состояние гипокоагуляции можно выявить только по уменьшению уровня F1+2. Поэтому определение F1+2 проводится иногда с целью мониторинга применения антикоагулянтов непрямого действия, эффективности профилактического подкожного или внутривенного введения гепарина.

Фибринопептид А (ФПА) отщепляется от молекулы фибриногена тромбином, поэтому при тромбинемии его количество в плазме увеличивается. Определение ФПА достаточно давно используется как маркер активации гемостаза [4]. В современных наборах используется метод иммуноферментного анализа с моноклональными антителами. Это очень чувствительный тест на потребление фибриногена, его концентрация повышается при различных заболеваниях с тромбофилией. Результаты теста очень сильно зависят от процедуры взятия крови, даже небольшие отступления от прописанной схемы могут вызвать значительные сдвиги в уровне ФПА в пробе.

Необходимость периодического контроля содержания тромбоцитов (1 раз в 5-7 дней) сохраняется при использовании любых препаратов гепарина в любой дозировке.

Прямые ингибиторы тромбина и фактора Ха все шире используются в клинической практике. Это препараты, которые вводятся парентерально (гирудин) или принимаются per os (Хи-мелагатран) и блокируют тромбин без посредников [13]. В последние годы получены пентасахариды (Арикстра), которые являются ингибиторами фактора Ха и высокоэффективным средством профилактики тромбозов. Клинические исследования этих препаратов продолжаются [8].

Одним из перспективных методов лечения инфаркта мозга является внутриартериальный, а также внутривенный тромболизис путем введения тканевого активатора плазминогена (алтеплазы) [5,9,10,11]. Применение других препаратов для тромболитической терапии, в частности, стрептокиназы, из-за опасности геморрагических осложнений инфаркта мозга признано неэффективным [12]. В среднем тромболизис с алтеплазой позволяет добиться полного функционального восстановления у 50% больных с ишемическим инсультом, а риск развития кровотечения при этом составляет около 6% [5]. В настоящее время в Республике Беларусь тромболитическая терапия при инфаркте мозга является актуальным направлением развития ангионеврологической службы.

Таким образом, в настоящее время признано, что антикоагулянтная терапия - один из немногих реальных способов профилактики и лечения тромбоэмболического инсульта. Установленными показаниями к терапии прямыми антикоагулянтами являются случаи инфаркта мозга, когда существует угроза нарастания неврологического дефицита. Исследования последних лет характеризуются применением при инфаркте мозга низкомолекулярных гепаринов в связи с их более избирательным действием на механизм гемокоагуляционного каскада и низким количеством геморрагических осложнений. Особые перспективы применения низкомолекулярных гепаринов могут быть связаны с профилактикой и лечением

кардиоэмболических ишемических инсультов у больных с нарушением сердечного ритма, острым коронарным синдромом и застойной сердечной недостаточностью.

Лабораторный мониторинг эффективности антикоагулянтных препаратов позволяет поднять на более высокий уровень лечение и профилактику цереброваскулярных заболеваний, осуществлять оптимальный индивидуальный подбор антикоагулянтов, дозировок и сроков их применения.

Литература

1. Баркаган, З. С. Очерки антитромботической фармакопрофилактики и терапии / З. С. Баркаган. М.: Ньюдиамед, 2000. 148 с.
2. Баркаган, З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. М.: Ньюдиамед, 2001. 296 с.
3. Вавилова, Т. В. Антитромботическая терапия и методы ее лабораторного контроля / Т. В. Вавилова // Клин. лаб. диагностика. 2004. № 12. С. 21 - 32.
4. Долгов, В. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В. В. Долгов, П. В. Сверин. М.-Тверь: ООО «Триада», 2005. 227 с.
5. Клинические рекомендации. Неврология и нейрохирургия / под ред. Е. И. Гусева, А. Н. Коновалова, А. Б. Гехт. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 368 с.
6. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. 15-е изд. М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2005. 1200 с.
7. Физиология гемостаза / В. П. Балуда, М. В. Балуда, И. И. Деянов, И. К. Тлепшуков. М.: Медицина, 1995. 238 с.
8. Di Nisio, M., Middeldorp, S., Voller, H.R. Direct Thrombin Inhibitors // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 353, N. 10. P. 2827.
9. Rickles, F.R. Thrombolytic (fibrinolytic) drugs and progress in treating cardiovascular disease // FASEB J. 2005. Vol. 19. P. 671 - 671.
10. Seitz, R. J., Meisel, S., Moll, M. et al. The effect of combined thrombolysis with rtPA and tirofiban on ischemic brain lesions // Neurology. 2004. Vol. 62. P. 2110 - 2112.
11. Straub, S., Junghans, U., Jovanovic, V. et al. Systemic Thrombolysis With Recombinant Tissue Plasminogen Activator and Tirofiban in Acute Middle Cerebral Artery Occlusion // Stroke. 2004. Vol. 35. P. 705 - 709.
12. Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. The Multicenter Acute Stroke Trial-Europe Study Group // N. Engl. J. Med. 1996. Vol. 335. P. 145 - 150.
13. Turpie, A.G.G. New oral anticoagulants in atrial fibrillation // Eur. Heart. J. 2008. Vol. 29. P. 155 - 165.
14. Villanueva, P. Intensive care unit monitoring. In Neurosurgical Intensive Care. Edited by BT Andrews. New York: McGrawHill, 1993. P. 43 - 55.
15. Wetz, J.I. Low molecular weight heparin // N. Engl. J. Med. Vol. 337. P. 688 - 693.