

На правах рукописи

Шпилюк Маргарита Александровна

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ТЕСТА
ТРОМБОДИНАМИКИ В ДОРОДОВОМ И В ПОСЛЕРОДОВОМ
ПЕРИОДЕ У ЖЕНЩИН, РОДОРАЗРЕШЕННЫХ ПУТЕМ
ОПЕРАЦИИ КЕСАРЕВА СЕЧЕНИЯ

3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

Автореферат

диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Иванец Татьяна Юрьевна

доктор медицинских наук, профессор РАН

Шмаков Роман Георгиевич

Официальные оппоненты:

Егорова Марина Олеговна - доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский институт).

Зыбина Наталья Николаевна - доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в __ часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.04 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук в ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.rsmu.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.058.04

доктор медицинских наук, профессор

Гордеев Иван Геннадьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Изменения в системе гемостаза являются уникальной особенностью гестационного процесса, они поддерживаются существованием фетоплацентарного комплекса и после завершения беременности подвергаются регрессу (Момот А.П., 2017) (Ataullakhanov F.I., 2016) (Hedengran K.K., 2016). Тромботические и тромбоэмболические осложнения с преимущественной локализацией в венозной системе занимают одно из ведущих мест в акушерской патологии (Parunov L.A., 2015) (James A.H., 2005). В настоящее время частота венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО) составляет 0,76-1,72 на 1000 родоразрешений, что в 4 раз выше, чем вне беременности (Parunov L.A., 2015) (James A.H., 2006). В исследование Heit J.A. et al. за более чем 30 летний период, было показано, что частота наступления ВТЭО в 5 раз выше в послеродовом периоде, чем во время беременности, при этом самый высокий риск наблюдается в первую неделю (Heit J.A., 2005).

По данным исследований Confidential Enquiry Into Maternal And Child Health (СЕМАСН) (Weindling A.M., 2003), проведенных в Великобритании, за последние годы было отмечено снижение материнской смертности из-за ВТЭО. Это может свидетельствовать о своевременном назначении антитромботической терапии, которая должна осуществляться в зависимости от группы риска развития ВТЭО. Однако на практике выделение групп затруднено, так как невозможно учесть все факторы риска, а суммарный эффект от множества незначительных факторов может стать существенным. На сегодняшний день врачи пользуются балльными шкалами, разработанными на основе небольших ретроспективных, эпидемиологических исследований и мнения экспертов (Vain E., 2014). Однако они учитывают только анамнестические данные, но не показатели системы гемостаза. Вероятно, это связано с тем, что используемые на практике лабораторные тесты гемостаза плохо отражают риски ВТЭО у этих пациентов.

Стандартные лабораторные тесты гемостаза, отражающие времена свертывания - активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и протромбин по Квику - во время беременности существенно не изменяются

(Галстян, Г. М., 2012) (Kane E.V., 2013) (Момот А.П., 2014). Общеоценочные интегральные тесты гемостаза, в целом, регистрируют гиперкоагуляционные изменения во время беременности. Так, тромбоэластометрия показывает достоверное усиление свертываемости, однако сами изменения незначительны (Karlsson O., 2012) (Huissoud C.L., 2009) (de Lange N.M., 2014) (Norman E. Shreeve 1., 2016) (Gootjes D.V., 2019)

До сих пор не определены тесты и методы системы гемостаза на фоне приема нефракционированных (НФГ) и низкомолекулярных гепаринов (НМГ) во время беременности и в послеродовом периоде. АЧТВ обладает линейной зависимостью от концентрации гепарина в крови, характерной для терапевтических доз препарата. Использование фиксированных значений АЧТВ не рекомендуется (Samuel S., 2016). Данный метод может выполняться при контроле за НФГ, однако, малоинформативен при использовании НМГ. Для препаратов НМГ рекомендуется использование определения антиХа активности (Hirsh J., 2008). При введении НМГ в профилактических дозах определение антиХа активности не имеет решающего значения, не определяет безопасность введения препарата, не является широко распространенным и обязательным исследованием (Вавилова Т.В., 2004) (Kolettis D., 2018). Лабораторным критерием эффективности антикоагулянтной терапии является снижение уровня маркеров тромбинемии вплоть до полной нормализации (Макацария А.Д., 2003) (Вавилова Т.В., 2004). Наиболее используемым маркером является уровень D-димера. На фоне длительной антикоагулянтной терапии снижение уровня D-димеров является критерием успешности лечения (Palareti G.L., 2006). Однако данный показатель говорит о свершившемся факте тромбообразования и является результатом гиперкоагуляции, а не наоборот (Baglin T., 2006) (Момот А.П., 2017).

Поэтому поиск метода для оценки общей свертываемости крови у женщин в послеродовом периоде, особенно в присутствии НМГ, представляет особый интерес.

Одним из таких методов является тест тромбодинамики (ТД) – это интегральный тест, позволяющий регистрировать динамику формирования фибринового сгустка не только во времени, но и в пространстве.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день тест тромбодинамики апробирован в различных областях медицины при изучении нарушений свертывания крови: при гемофилиях А и В (Ovanesov M.V., 2002); (Ovanesov M.V., 2003) (Negrier С., 2006); при других дефицитах факторов свертывания (Ovanesov M.V., 2005) (Panteleev M.A., 2006); для выявления гиперкоагуляционных состояний, например, при сепсисе (Сошитова Н.П., 2012) (Яценко А.А., 2017), у пациентов из групп высокого риска развития ВТЭО (Ivanov P., 2012) (Бернс С. А., 2020) (Шихметов А.Н., 2019) (Дементьева Г.И., 2019), (Суворин П.А., 2021), у пациентов, перенесших тромбоз глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей (Черняков А.В., 2016) и тромбоемболию легочной артерии (ТЭЛА) (Бернс С.А., 2020), у пациентов с множественной миеломой (Gracheva M.A., 2015), для мониторинга эффективности антикоагулянтной терапии, в том числе и низкомолекулярных гепаринов (Полетаев А.В., 2013) (Balandina A.N., 2018) (Лобастов К.В., 2016) и др. Также определены значения нормальных показателей параметров теста для практически здоровых небеременных женщин (Атауллаханов Ф.И., 2015), (Будыкина Т.С., 2015) и диапазон значений в разные сроки физиологически протекающей беременности (Ворошилина Е.С., 2016) (Момот А.П., 2015) (Кузник Б.И., 2018). В настоящее время появляются единичные работы, посвященные исследованию гемостаза с помощью ТД при различных акушерских осложнениях (Курманбаев Т.Е., 2016) (Пешкова А.Д., 2019). Однако их недостаточно, при этом метод представляет клинический интерес, особенно в оценке эффективности НМГ во время беременности и в послеродовом периоде.

Все это диктует необходимость проведения исследования, на основании результатов которого будет разработана оптимальная профилактика тромботических осложнений в послеродовом периоде у женщин, родоразрешенных путем операции кесарева сечения.

Цель исследования. Определить клинико-лабораторную значимость теста тромбодинамики для оценки тромботического риска накануне родов и в послеродовом периоде у женщин, родоразрешенных путем операции кесарева сечения

Задачи исследования

1. Сравнить параметры теста тромбодинамики и рутинных методов оценки системы гемостаза накануне родов и в послеродовом периоде у женщин с неотягощенным акушерским анамнезом после абдоминального родоразрешения.
2. Оценить корреляционную связь показателей системы гемостаза, в том числе и теста тромбодинамики, с тромбоземболическими рисками, с учетом бальной шкалы RCOG Green-top Guidelines.
3. Сравнить лабораторные показатели системы гемостаза (теста тромбодинамики) у женщин накануне родов и в послеродовом периоде в зависимости от типа родоразрешения (плановое или экстренное КС).
4. Оценить влияние антикоагулянтной терапии на показатели гемостаза, в том числе на параметры теста тромбодинамики, у пациенток в послеродовом периоде.
5. Определить значимость скорости роста сгустка (V_{st}) в тесте тромбодинамики как критерия эффективности антикоагулянтной терапии.
6. На основании полученных данных усовершенствовать лабораторный алгоритм оценки показаний для коррекции нарушений системы гемостаза у женщин после операции кесарева сечения.

Положения, выносимые на защиту

1. Согласно показателям теста тромбодинамики, у женщин, родоразрешенных путем операции кесарева сечения, наблюдается гиперкоагуляционное состояние, характеризующееся увеличением скорости роста сгустка и его размера через 30 мин (CS), повышением собственного прокоагулянтного потенциала крови за счет образования спонтанных сгустков.

2. У женщин в послеродовом периоде отсутствует взаимосвязь между анамнестическими данными, полученными из оценки степени риска развития венозных тромбозомболических осложнений, и результатами лабораторных исследований системы гемостаза. Лабораторные тесты несут дополнительную, не дублирующую информацию о состоянии свертывающей системы пациентов.

3. Скорости роста сгустка (V , V_i , V_{st}) в тесте тромбодинамики являются критерием эффективности использования низкомолекулярных гепаринов для профилактики тромбозомболических осложнений в послеродовом периоде у женщин, родоразрешенных путем операции кесарева сечения.

Научная новизна. Впервые проведена комплексная оценка исходного состояния системы гемостаза в дородовом и послеродовом периодах у женщин после операции кесарева сечения с использованием как стандартных (концентрация фибриногена, протромбин по Квику, АЧТВ, D-димер, антитромбин III, протеин С, фактор VIII, фактор Виллебранда), так и интегральных методов (тромбоэластометрия, тромбодинамика). Прослежена динамика показателей свертывающей системы в послеродовом периоде.

Оптимизирован диагностический подход к выявлению изменений системы гемостаза в послеродовом периоде путем введения нового современного лабораторного метода тромбодинамики.

Установлено, что анамнестические данные и лабораторные параметры системы гемостаза, в целом, дают различную картину состояния пациенток, и комплексный подход потенциально может привести, с одной стороны, к снижению риска материнской тромбозомболии в послеродовом периоде, с другой – к более рациональному использованию НМГ.

Проведена сравнительная оценка лабораторных тестов контроля за антикоагулянтной терапией и разработаны критерии оценки эффективности НМГ на основе показателей тромбодинамики.

Практическая значимость работы. Установлены наиболее значимые лабораторные показатели для оценки состояния системы гемостаза в дородовом и послеродовом периоде. Показано, что для адекватной оценки и динамического контроля состояния системы гемостаза важную роль имеют

тест ТД, уровень D-димера, фактора Виллебранда, фибриногена. На основании результатов исследования определен диапазон значений (референсный интервал) параметров теста ТД в послеродовом периоде.

Показано, что показатель скорости роста сгустка в ТД на фоне НМГ обладает чувствительностью 62,5% и специфичностью 85,5% у женщин в послеродовом периоде, а значение под кривой, равное 0,759, позволяет использовать данный метод в акушерско-гинекологической практике.

Разработан алгоритм лабораторной оценки показаний для коррекции нарушений системы гемостаза у женщин после операции кесарева сечения.

Методология и методы исследования. Для выполнения цели исследования, реализации поставленных задач и обоснования основных положений были использованы анализ литературы, современные методы клинической лабораторной диагностики и методы статистической обработки данных. Работа выполнена в дизайне наблюдательного исследования с использованием лабораторных, аналитических и статистических методов исследования.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность полученных результатов исследований определяется достаточным (репрезентативным) объемом выборок обследованных пациентов и качеством исследований, проведенных современными методами клинической лабораторной диагностики; кроме того, достоверность результатов подтверждена методами статистической обработки данных, адекватных поставленным задачам.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на XVIII Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и дитя» (Москва, 2017), III Всероссийской научно-практической конференции «Неотложные состояния в акушерстве» (Москва, 2018), XXIII Всероссийской научно-практической конференции «Традиции и новации клинической лабораторной диагностики» (Москва, 2018), VIII Межрегиональная НПК специалистов лабораторной службы «Лабораторная медицина - взгляд в будущее» (Нижний Новгород, 2018), II национальном конгрессе «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к

практике» (Москва, 2020), VI Всероссийская научно-практическая конференция "Неотложные состояния в акушерстве" (Москва, 2022).

Личный вклад автора. Диссертант лично участвовал в планировании и организации научной работы, разработал проект исследования. Автор лично выполнил исследования теста тромбодинамики и коагулологические исследования всех обследованных лиц. Все материалы, представленные в диссертационном исследовании, получены, обобщены, статистически обработаны и проанализированы автором лично.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты диссертационной работы используются в клинической деятельности ФГБУ «НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России и ГБУЗ МО «МОНИИАГ».

Публикации результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, включая 6 публикации в научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицами и 42 рисунками. Библиография включает 223 источников, из них 56 – отечественных и 167 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Общая клиническая характеристика пациенток и распределение их по группам

Исследование было выполнено на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России (далее –

Центр) в период с 2015-2017 гг. Исследования проводились в лаборатории клинической иммунологии и клинико-диагностической лаборатории Центра.

В исследование было включено 235 рожениц (средний возраст составил $32,7 \pm 4,6$ лет) после абдоминального родоразрешения.

Общими критериями исключения явились: наличие гематомы различной локализации, инфекции в стадии обострения, заболевания системы крови, использование препаратов протеолитических ферментов, желание пациента прекратить участие в испытании, решение лечащего врача - исследователя о невозможности продолжать испытание у конкретного пациента.

Наблюдение за каждой женщиной продолжалось с момента начала подготовки к родоразрешению (до каких-либо манипуляций с пациенткой) до истечения 4-х дней с момента родов:

- точка 1 – непосредственно перед кесаревым сечением;
- точка 2 – через 3-5 часов после окончания операции;
- точка 3 – через 2 суток после окончания операции (перед очередной инъекцией НМГ, если таковая проводилась);
- точка 4 – через 4 суток после окончания операции (перед очередной инъекцией НМГ, если таковая проводилась).

Для решения 1-ой задачи из 235 женщин, участвовавших в исследовании, была выделена группа женщин (n=122) с неотягощенным акушерским анамнезом, без назначения антикоагулянтной терапии, которой был проведен динамический контроль параметров гемостаза в 4-х точках (рисунок 1).

Для решения 2-ой задачи для всех женщин, участвовавших в исследовании (n=235), была проведена оценка риска ВТЭО согласно шкале RCOG Green-top Guidelines №37a. Степень риска развития ВТЭО определяли по сумме баллов (рисунок 1).

Для решения 3-ей задачи сформировали две группы в зависимости от типа родоразрешения: плановое (n=161) и экстренное (n=36).

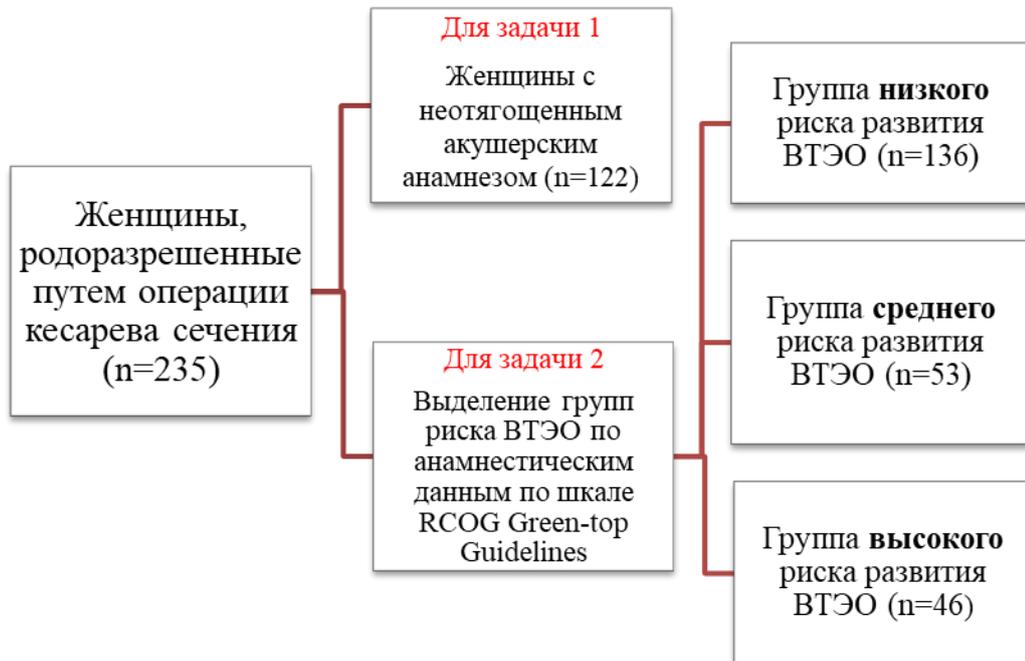


Рисунок 1 - Дизайн исследования для задачи 1,2

Для решения задачи 4-ой и 5-ой было проведено одномоментное исследование в 3-ей точке (на 2-е сутки после к/с) у 97 пациенток, из которых 39 получали НМГ в профилактических дозах 1 раз в сутки (рисунок 2).

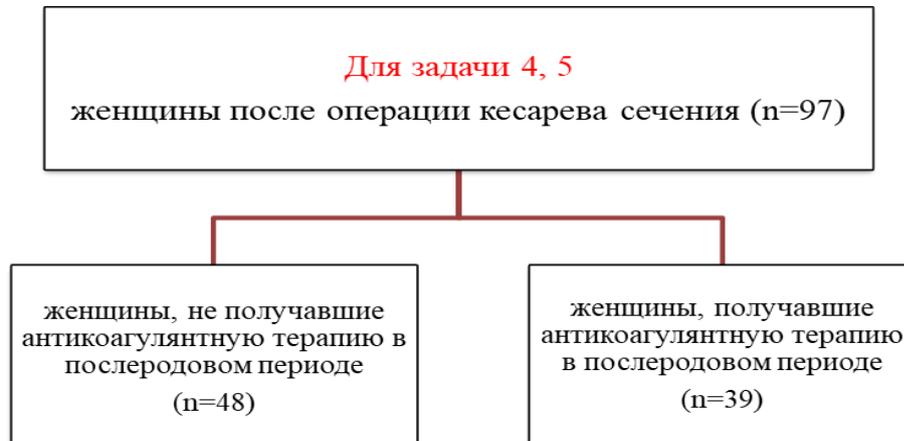


Рисунок 2 - Дизайн исследования для задачи 4,5

1.2. Материалы исследования

Материалом для исследования служили образцы венозной крови. Взятие крови осуществляли из периферической вены с помощью закрытых систем для взятия венозной крови «S-Monovette®» (SARSTEDT, Германия) с 106 мМ (3,2%) цитрата натрия в соотношении кровь: цитрат - 9:1. Кровь доставляли в лабораторию в течение 30 минут от момента взятия. Для

проведения исследований использовались как свежие образцы цельной венозной крови, сыворотки и плазмы, так и аликвоты образцов сыворотки или плазмы, полученные в соответствии с правилами пробоподготовки и хранившиеся до анализа при температуре -80°C .

1.3. Лабораторные методы исследования

Тест тромбодинамики проводили на диагностической лабораторной системе «Регистратор Тромбодинамики Т-2» (ООО Гемакор, Россия) с использованием соответствующих реагентов и расходных материалов. Основные параметры, которые были оценены – скорость роста сгустка (V), начальная скорость роста сгустка (V_i), стационарная скорость сгустка (V_{st}), размер сгустка через 30 минут (CS), время задержки (T_{lag}), плотность сгустка (D), наличие спонтанных сгустков (T_{sp}).

Тромбоэластометрию проводили в цельной крови на приборе ROTEM (Rentapharm, Германия) с использованием 0,2 М раствор кальция хлорид (модуль – NATEM). Оценивали следующие параметры: время коагуляции (CT), время формирования сгустка (CFT), максимальная амплитуда (MCF), угол α ($^{\circ}$).

Параметры плазменного звена гемостаза (концентрация фибриногена, АЧТВ, протромбин по Квику (%), уровень D-димера, протеин С, антитромбин III, активности VIII фактора и фактора Виллебранда) определяли на автоматическом коагулометре Sysmex CA-1500 (Sysmex Corporation, Япония) с использованием реагентов Siemens, Германия. Определение уровня анти-Ха активности (мониторинг гепаринотерапии) производили на автоматическом коагулометре ACL TOP 700 (IL Werfen, США).

Статистический анализ полученных результатов производился с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, MedCalc® Software версия 16.8.4. Для описания количественных признаков использовали стандартные показатели описательной статистики (среднее арифметическое значение, стандартное отклонение ($\text{среднее} \pm SD$), или медиана, 25 и 75 процентиль Me). Сравнение двух независимых переменных, распределенных по нормальному закону, проводили с помощью параметрического Т-теста Стьюдента. При сравнении больше двух групп

использовали дисперсионный анализ. Две группы независимых переменных сравнивались тестом Манна-Уитни. Анализ прогностической значимости для значения ТД, а также оценку уровня пороговых значений этого теста осуществляли с помощью ROC-анализа. Уровень значимости всех статистических тестов принимался меньше 0,05.

2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ РАБОТЫ

2.1. Динамика параметров гемостаза накануне родов и в послеродовом периоде у женщин после операции кесарева сечения

Интегральные методы оценки гемостаза. Тромбодинамика.

В тесте ТД было выявлено, что все показатели скорости роста сгустка перед родами были значительно выше референсных значений для III триместра беременности (для 28-40 недель), возможно вследствие взятия крови непосредственно перед родами (рисунок 3).

На протяжении всего периода наблюдений показатель лаг-тайм (Tlag), характеризующего фазу инициации свертывания, не изменялся. Изменения показателя относительной плотности сгустка (D) происходили внутри референсного интервала для III триместра беременности. Так было отмечено его увеличение во 2-й точке сразу после оперативного вмешательства ($p < 0,0001$) и дальнейшее снижение до значений дородового периода. Данный показатель характеризует плотность образовавшегося фибринового сгустка и его структуру. Параметр размера сгустка (CS) находился по верхней границы референтного диапазона для III триместра беременности в дородовом и послеродовом периодах. На момент выписки (4-я точка) для данного показателя было отмечено достоверное снижение ($p = 0,0019$). Ко 2-м послеоперационным суткам произошло значимое снижение скоростей роста сгустка (V_i и V_{st}) ($p = 0,0078$ и $p = 0,0046$ соответственно), свидетельствующее о нормализации состояния гемостаза. В 4-ой точке медиана данных показателей лежала внутри референсного диапазона для III триместра беременности (рисунок 3).

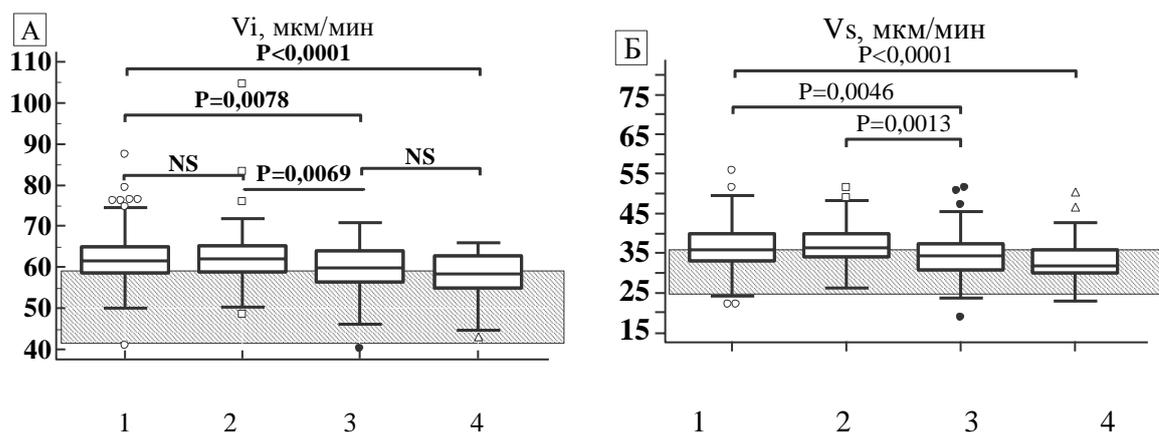


Рисунок 3 - Динамика показателей скоростей сгустка V_i (А) и V_{st} (Б) в дородовом и послеродовом периоде. 1 - до операции; 2 - через 3-5 часов; 3 - на 2-е сутки; 4 - на 4-е сутки. Заштрихованная область – референсный интервал для III триместра беременности

Доля пациентов со спонтанным тромбообразованием (Тсп) снижалась, более чем в 4 раза в послеоперационном периоде (рисунок 4).

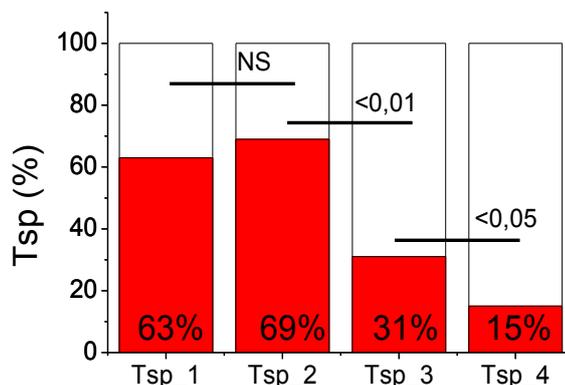


Рисунок 4 - Доля (%) пациентов со спонтанными сгустками у женщин в дородовом и послеродовом периоде. 1 - до операции; 2 - через 3-5 часов; 3 - на 2-е сутки; 4 - на 4-е сутки

В ходе работы нами был определен допустимый диапазон значений для теста ТД в послеродовом периоде у женщин родоразрешенных путем операции кесарева сечения с неотягощённым акушерско-гинекологическим анамнезом: T_{lag} 0,75-0,85 мин; V_i 56-60 мкм/мин; V_{st} 31-34 мкм/мин; V 31-34, мкм/мин; D 30726-32249 отн.ед., Тсп отсутствует.

Тромбоэластометрия. В нашем исследовании ротационная тромбоэластометрия (ROTEM) выполнялась в модуле Natem, особенностью которого является использование рекальцинированной крови, без дополнительных активаторов свертывания. В ходе работы было выявлено укорочение времени коагуляции (СТ) через 3-5 часов после операции

($p=0,0406$), что говорит о гиперкоагуляционном состоянии, возможно, как реакция на интраоперационную кровопотерю. В дальнейшем происходило достоверное удлинение СТ (рисунок 5А). Время формирования сгустка (CFT) на всем протяжении наблюдений находилось в референсном диапазоне III триместра беременности, отмечалось удлинение только к 4 суткам ($p=0,0456$) (рисунок 5Б). Для таких показателей, как максимальная плотность сгустка (MCF) и угол α , изменений выявлено не было, однако стоит отметить, что для некоторых пациенток наблюдались разбросы в значениях от выраженной гипо- до гиперкоагуляции. Результаты MCF были ниже референсного интервала для III триместра беременности (рисунок 5В).

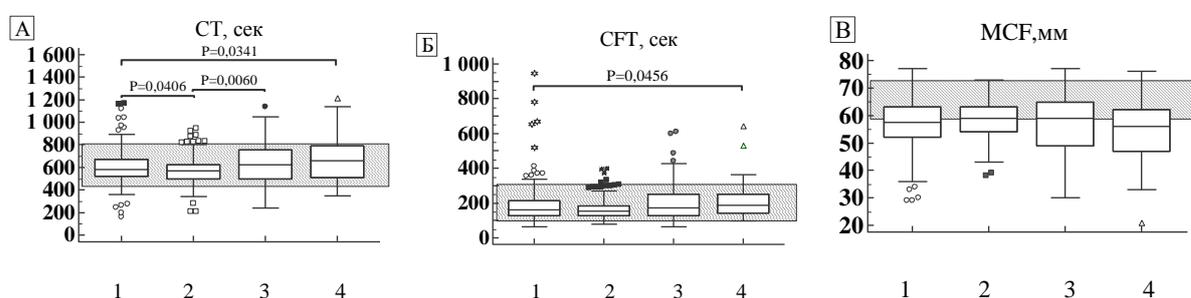


Рисунок 5 - Динамика показателей тромбэластометрии в 4-х точках.
 Заштрихованная область – референсный интервал для III триместра беременности

Оценка скрининговых тестов системы гемостаза. В ходе данной работы было выявлено, что достоверное удлинение АЧТВ происходило сразу же после операции (во 2-й точке) ($p<0,0001$) и значения были статистически выше таковых в дородовом периоде. При этом все результаты на протяжении всего периода наблюдений не выходили за пределы референсного интервала для III триместра беременности (рисунок 6А). Протромбин не отличался в дородовом и в раннем послеродовом периоде. Увеличение происходило со 2-х суток (в 3-ей и 4-ой точке) ($p\leq 0,0001$), что могло свидетельствовать об усилении свертывания крови (рисунок 6Б). В результате проведенного исследования нами было выявлено, что концентрация фибриногена выше перед родами, по сравнению с полученными значениями через 3-5 часов после кесарева сечения ($p=0,0024$). Вероятно, снижение происходило вследствие интраоперационной кровопотери. Ко 2-ым суткам концентрация фибриногена повышалась ($p\leq 0,0001$) и оставалась высокой на момент

выписки, что в целом характерно для послеоперационного периода (Lison S., 2011) (рисунок 6В).

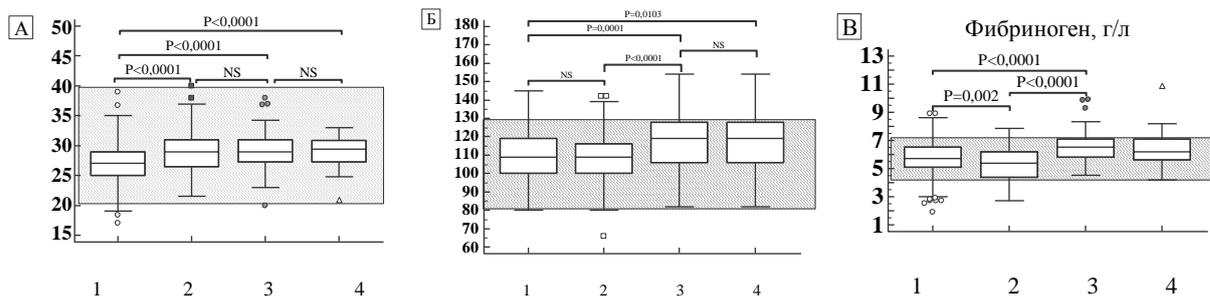


Рисунок 6 - Динамика показателей АЧТВ (А), Протромбин по Квику (Б), концентрация фибриногена (В) в 4-х точках. Заштрихованная область – референсный интервал для III триместра беременности

Динамика изменений маркеров активации свёртывания крови и состояния эндотелия. В настоящем исследовании пик повышения уровня D-димера приходился на послеоперационный период через 3-5 часов ($p < 0,0001$). Однако уже на 2-е сутки концентрация D-димера значительно снижалась и была чуть выше референсного диапазона для III триместра (по медиане) до конца периода наблюдения, что согласуется с предыдущими исследованиями (Zhi-Hua Zhou, 2014.) (Xu D., 2016.) (рисунок 7А).

В последнее время появилось большое число работ, в которых высокий уровень фактора VIII рассматривался, как фактор риска тромбозов (Kyrle P.A., 2000), (Cristina L., 2004), (Bobrow R.S., 2005), (Erkekol, 2006)). Некоторыми исследователями (Мамаев А.Н., 2005) предполагается, что его повышение более 175 % следует считать риском развития тромботического эпизода. При этом диапазон колебаний активности фактора VIII для III триместра беременности весьма широк и составляет 90-340%. В нашем исследовании среднее значение перед родами составило $115,45 \pm 24,26\%$, что входило в референсный диапазон для небеременных женщин. Значимое увеличение VIII фактора наблюдалось в 4-ой точке по сравнению с дородовым периодом ($p = 0,0069$), при этом на момент выписке у 15 % уровень фактора VIII был выше 175% (рисунок 7Б).

При оценке дисфункции эндотелия было выявлено, что в дородовом периоде активность ФВ в среднем составляла $227,0 \pm 68,72\%$. Сразу после родоразрешения через 3-5 часов происходило значимое снижение ФВ

($p=0,0002$), вплоть до базового уровня к моменту выписки ($p<0,0001$). Повышенный синтез ФВ, как маркера эндотелиальной дисфункции, является фактором риска патологической активации тромбоцитов, повышения их адгезии и агрегации, запуска внешнего и внутреннего механизмов свертывания и, как следствие, развития диссеминированного внутрисосудистого свертывания (рисунок 7В).

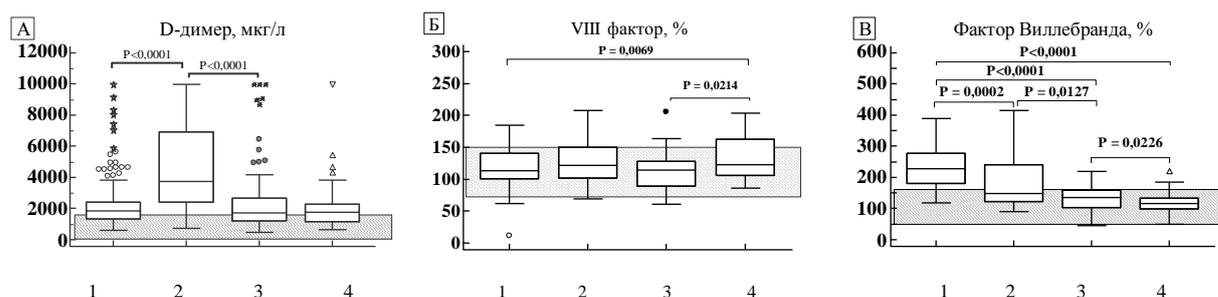


Рисунок 7 - Динамика показателей D-димера, VIII фактора, фактора Виллебранда в 4-х точках. Заштрихованная область – референсный интервал для III триместра беременности

Динамика изменений антикоагулянтной активности. В нашем исследовании активность АТ перед родами была значительно выше, чем через 3-5 часов после кесарева сечения ($p<0,0001$) и, хотя медиана лежала в пределах референтного диапазона, у 28% рожениц значения превышали его верхнюю границу. На 2-е сутки после родов происходило снижение ($p<0,0001$), возможно, связанное с потреблением исследуемого антикоагулянта во время кесарева сечения, затем к 4-ым суткам наблюдений происходило повышение (рисунок 8А).

Активность протеина С была ниже перед родами по сравнению с 4-ми сутками после кесарева сечения ($p=0,0020$) (рисунок 3.15.). Значимые различия были выявлены между 2-ми и 4-ми сутками после операции кесарева сечения. Данное изменение могло указывать на наличие эффективных защитных механизмов, препятствующих тромбообразованию в этот период (рисунок 8Б).

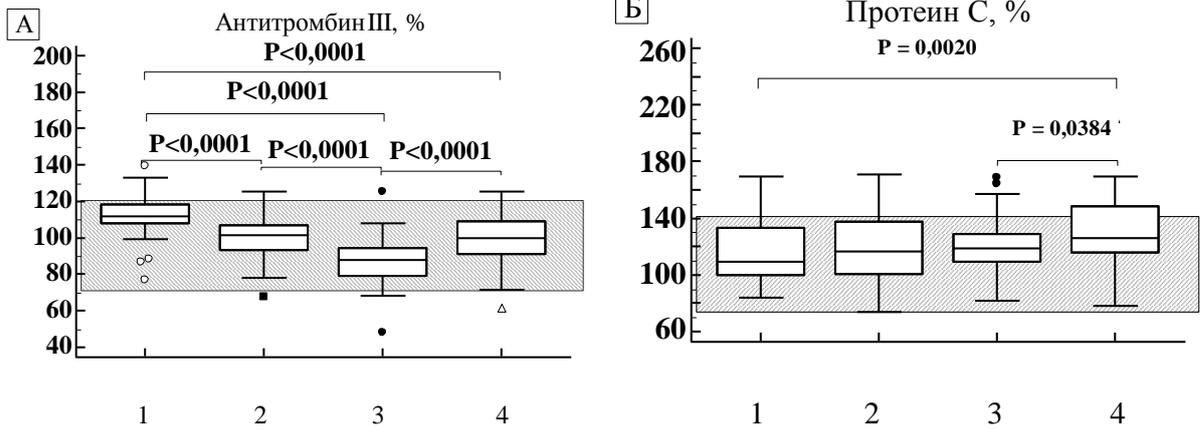
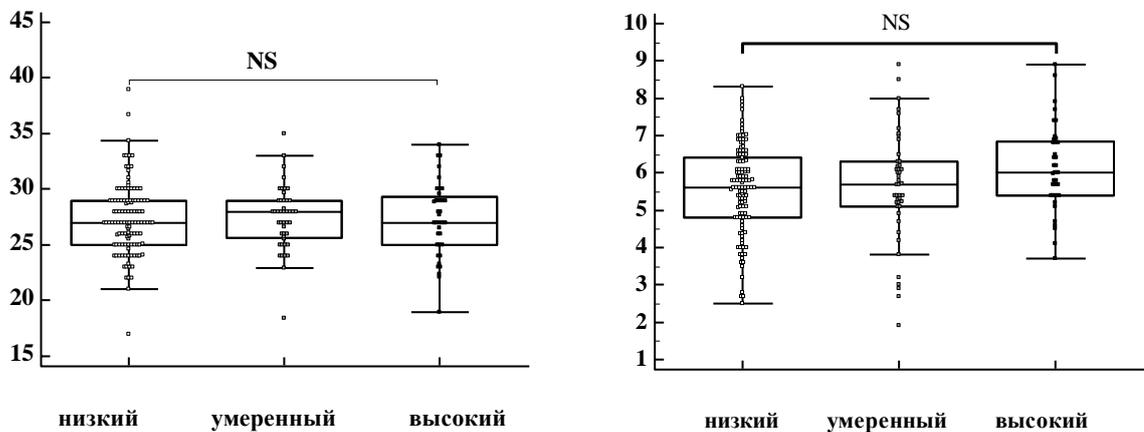


Рисунок 8 - Динамика показателей Антитромбина III и Протеина С в 4-х точках. Заштрихованная область – референсный интервал вне беременности

2.2. Взаимосвязь показателей гемостаза в дородовом и послеродовом периодах у женщин после операции кесарева сечения с факторами риска развития венозных тромбоэмболических осложнений

В ходе анализа никаких значимых различий в показателях тестов гемостаза до начала кесарева сечения между группами низкого, умеренного и высокого риска развития ВТЭО обнаружено не было (рисунок 9, 10). Аналогичные расчеты были проведены для точек 2, 3 и 4.



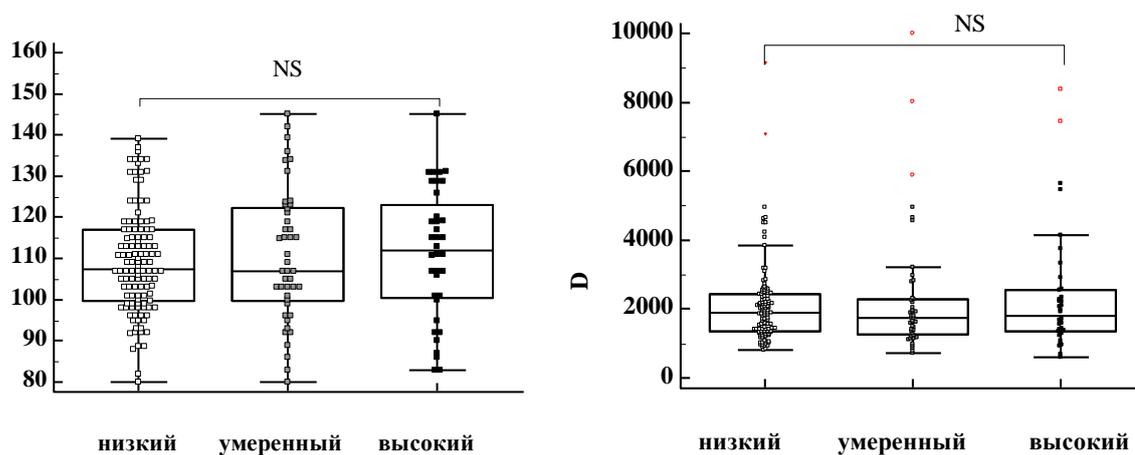


Рисунок 9 - Показатели плазменного звена гемостаза в зависимости от степени риска в первой точке АЧТВ, концентрация фибриногена, протромбин по Квику D-димер. NS не представляет существенной разницы

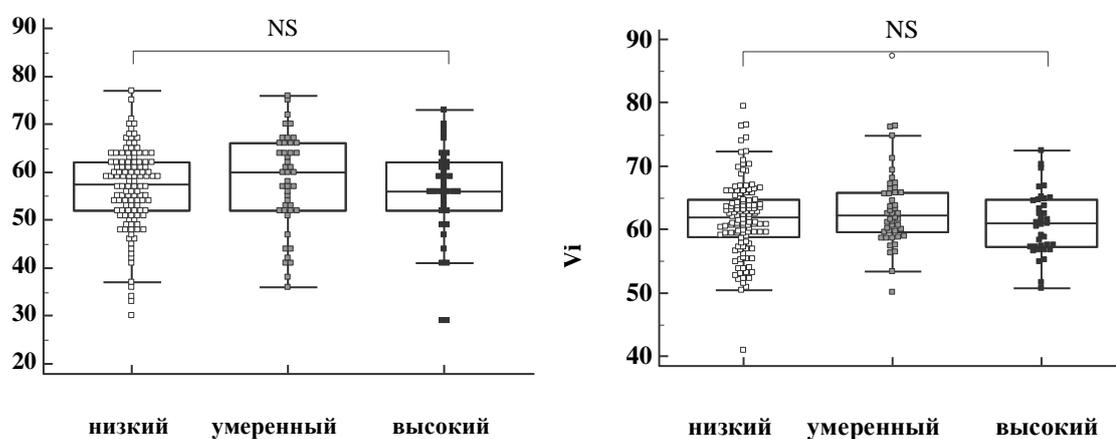


Рисунок 10 - Показатели MCF (ROTEM) и Vi (ТД) в зависимости от степени риска в первой точке. NS не представляет существенной разницы

Таким образом, оценка степени риска развития ВТЭО у женщин в послеродовом периоде, полученная из анализа анамнестических данных и лабораторные анализы системы гемостаза, в целом дают различную картину состояния пациенток. Представленные расчёты позволяют утверждать, что с помощью только лабораторных показателей гемостаза, невозможно выделить группы риска по развитию тромбозомболическим осложнениям.

2.3. Взаимосвязь показателей теста тромбодинамики у женщин с факторами риска развития венозных тромбозомболических осложнений в дородовом периоде

В результате анализа взаимосвязи основных факторов тромбозомболических осложнений с показателями теста тромбодинамики

было обнаружено, что скорость роста сгустка плазмы крови достоверно выше у женщин с тромбоэмболическим анамнезом, чем без него ($p=0,001$). Также было отмечено, что у женщин с показаниями к экстренному кесареву сечению показатель V имел более высокие значения в сравнении с плановым родоразрешением ($p<0,001$) (таблице 1).

Таблица 1 - Скорость роста сгустка плазмы у женщин накануне родоразрешения в зависимости от наличия или отсутствия фактора риска ВТЭО, $M\pm SD$

Факторы риска	Скорость роста сгустка (V), мкм/мин (n)		p
	Отсутствие фактора риска	Наличие фактора риска	
Возраст >35, лет (%)	42,208+12,612 (n=182)	40,374+10,363 (n=20)	0,531
Тромботический анамнез (%)	41,480+11,437 (n=176)	45,093+17,400 (n=27)	0,001
Хроническая гипертензия (%)	42,203+12,441 (n=191)	37,731+11,383 (n=11)	0,813
Наличие НМГ в 3-м триместре (%)	42,513+12,641 (n=176)	38,789+10,143 (n=26)	0,195
Многоплодная беременность (%)	42,185+12,537 (n=188)	39,149+10,507 (n=15)	0,459
Эклампсия	42,020+12,605 (n=184)	41,384+10,498 (n=19)	0,370
Экстренное кесарево сечение (%)	40,939+10,814 (n=164)	46,469+17,537 (n=37)	< 0,001
Реинфузия (%)	42,032+12,526 (n=192)	40,709+10,389 (n=11)	0,530
Индекс массы тела >30кг/м ²	42,117+12,306 (n=167)	41,259+12,971 (n=37)	0,643

2.4. Взаимосвязь показателей теста тромбодинамики с маркерами активации у женщин в послеродовом периоде

В ходе исследования был проанализирован вклад лабораторных показателей в активацию свертывания крови у женщин в послеродовом периоде. Было отмечено отсутствие корреляции между маркерами активации свертывания и показателями теста тромбодинамики через 3-5 часов и через 4 суток после родоразрешения.

На 2-е сутки после к/с была выявлена положительная корреляционная связь уровня D-димера с показателями скорости роста сгустка (V) ($r=0,264$,

$p=0,011$) (рисунок 11) и размером фибринового сгустка (CS) ($r=0,311$, $p=0,003$) (рисунок 12) в тесте тромбодинамики.

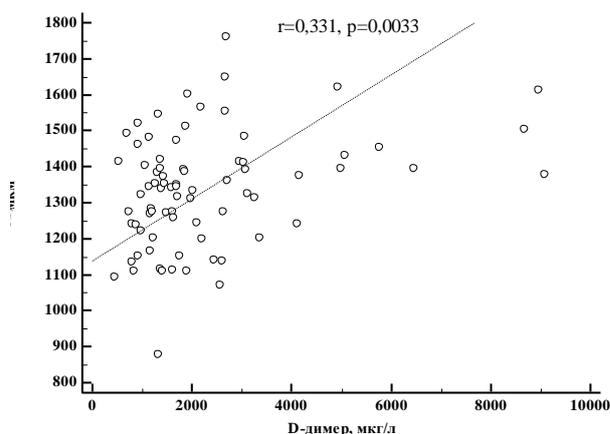


Рисунок 11 - Положительная прямая корреляция между размером сгустка (CS) и уровнем D-димера у женщин в послеродовом периоде (2-е сутки после к/с)

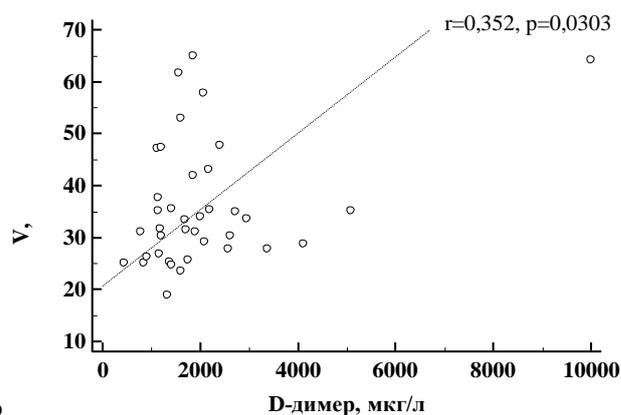


Рисунок 12 - Положительная прямая корреляция между скоростью роста сгустка (V) и уровнем D-димера у женщин в послеродовом периоде (2-е сутки после к/с)

Увеличение концентрации фибриногена коррелировало с повышением скорости роста сгустка ($r=0,360$, $p=0,006$) и с выявлением спонтанного тромбообразования (Tsp) ($r=0,273$, $p=0,0074$).

Далее были оценены маркеры активации свертывания у женщин через 2-е сутки после к/с в подгруппе с уровнем скорости роста сгустка $V < 34$ мкм/мин и > 34 мкм/мин (таблица 2).

Таблица 2 - Маркеры активации внутрисосудистого свертывания у женщин в послеродовом периоде (2-е сутки после к/с) в зависимости от значения скорости роста сгустка, $M \pm SD$

Показатель	$V < 34$, мкм/мин (n)	$V > 34$, мкм/мин (n)	p
D-димер, мкг/л	$1763,900 \pm 853,641$ (n=40)	$2892,865 \pm 2502,263$ (n=52)	0,0076
Активность фактора VIII, %	$116,153 \pm 34,876$ (n=17)	$116,000 \pm 34,876$ (n=25)	0,9878
Активность фактора Виллебранда, %	$143,229 \pm 42,667$ (n=17)	$124,060 \pm 45,320$ (n=25)	0,1761
Фибриноген, г/л	$6,1324 \pm 0,869$ (n=41)	$6,950 \pm 1,154$ (n=54)	0,0002

Таким образом, у женщин в послеродовом периоде (на 2-е сутки после к/с) одновременно с показателями теста тромбодинамики повышались и другие маркеры активации свертывания, отражающие основные звенья

развития ВТЭО, включающие усиленное фибринообразование (уровень D-димера) и воспалительные изменения (концентрация фибриногена).

2.5. Оценка показателей системы гемостаза в послеродовом периоде у женщин после операции кесарева сечения на фоне приема антикоагулянтов

Антикоагулянтная терапия НМГ в профилактических дозировках назначалась женщинам через 12-24 часа после кесарева сечения, поэтому для оценки эффекта антикоагулянтной терапии были проанализированы показатели гемостаза в точке 3 (2-е сутки после к/с). Таким образом, были оценены результаты 97 пациенток, из которых 39 получали НМГ в профилактических дозах 1 раз в сутки. Среди всех проанализированных параметров гемостаза, скорости роста сгустка (V_i , V , V_{st}) и размер фибринового сгустка (CS) в тесте тромбодинамики продемонстрировали разницу между группами женщин получавших и не получавших НМГ (рисунок 13).

Стоит отметить, что, несмотря на проводимую профилактику НМГ, у 30% женщин в обеих группах в тесте тромбодинамики регистрировались спонтанные сгустки.

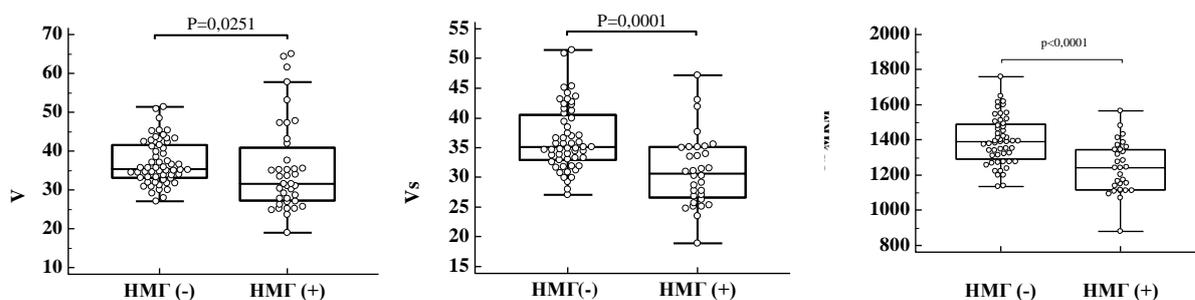


Рисунок 13 - Изменение параметров V , V_{st} и CS в тесте тромбодинамики в зависимости от назначения антикоагулянтной терапии на 2-е сутки после кесарева сечения (3-я точка). НМГ (-) – пациентки, не получающие НМГ в послеоперационном периоде, НМГ (+) – на терапии НМГ

Для оценки чувствительности и специфичности параметров (АЧТВ, D-димер, СТ в тромбозеластометрии, V , V_{st} в тромбодинамике) на фоне приема антикоагулянтной терапии на стабилизацию гемостаза после операции кесарева сечения применялся ROC-анализ. Для V_{st} в тесте тромбодинамики

данный показатель был максимальным (рисунок 14) и составил 0,759 (0,655-0,941, $p < 0,0001$) при скорости роста сгустка ниже 32 мкм/мин. Чувствительность и специфичность метода составили 62,5% и 85,5% соответственно.

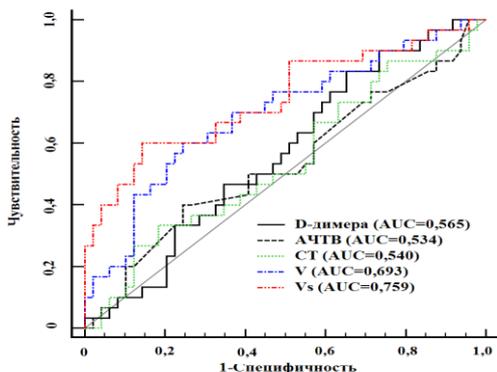


Рисунок 14 - ROC-кривые для параметров D-димера, АЧТВ, СТ в тромбоэластометрии, V, Vst в тромбодинамике при профилактической терапии НМГ у женщин в послеоперационном периоде (точка 3 – 2е сутки после к/с)

Таким образом, данный показатель может быть использован в оценке адекватности назначения профилактики НМГ в послеродовом периоде.

Для оценки эффективности антикоагулянтов с помощью параметров системы гемостаза проанализированы данные рожениц в зависимости от наличия (анти-Ха > 0 МЕ / мл, $n = 10$) или отсутствия (анти-Ха = 0 МЕ/мл, $n=29$) анти-Ха активности и в зависимости от отрицательной (имеющий сдвиг в сторону гиперкоагуляции) и положительной (нормализация параметров) динамики в послеродовом периоде в группе получавших НМГ. Точкой отсечки приняли значение для III триместра беременности, при котором наблюдается гиперкоагуляция (D-димер > 1800 мкг/л; СТ < 539 сек; V > 35 мкм/мин). Отмечено, что V в ТД был единственным параметром, для которого наличие анти-Ха активности было сопряжено с положительной динамикой гемостаза (рисунок 15).

Поскольку эффективная тромбопрофилактика требует постоянной защиты пациентов от ВТЭО между инъекциями, в нашем исследовании мы решили оценить эффект терапии спустя 24 часа от введения НМГ, тем самым мы проанализировали реальное состояние системы гемостаза и риск тромбоза у рожениц, получающих профилактику, а не эффект гепарина на пике его активности. Было установлено, что у части пациентов анти-Ха активность не определялась, что в сочетании со стойкой гиперкоагуляцией могло привести к ВТЭО.

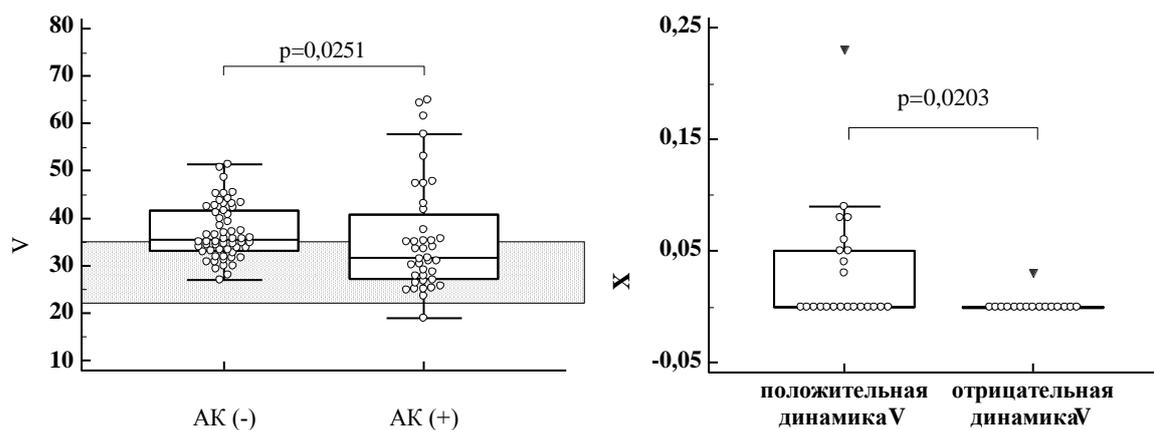


Рисунок 15. Результаты параметра скорости роста сгустка (V) в ТД в зависимости от наличия или отсутствия анти-Ха активности и положительной/отрицательной динамики. Заштрихованная область – референсный интервал для III триместра беременности

Таким образом, параметры тромбодинамики чувствительны к минимальным уровням гепаринемии при профилактических режимах применения НМГ в послеродовом периоде.

Выводы

1. У беременных женщин с неосложненным акушерским анамнезом по данным тромбодинамики накануне родов выявляется выраженная гиперкоагуляция, связанная с увеличением кинетики реакции образования сгустка и повышением собственного прокоагулянтного потенциала крови.
2. К моменту выписки из стационара (4-5-е сутки) скорость роста сгустка V (ТД) снижается в 1,27 раз ($p \leq 0,0001$), активность фактора Виллебранда уменьшается в 1,97 раза ($p \leq 0,0001$) по сравнению с дородовым периодом, уровень D-димера снижается в 2,03 раза ($p \leq 0,0001$) по сравнению с ранним послеродовым периодом. У части женщин к 4-м суткам сохраняется активация коагуляционного потенциала крови: уровень D-димера выше 2000 мкг/л - у 39%, активность фактора VIII выше 175% - у 15%, наличие спонтанных сгустков Tsp - у 15%.
3. Показатель скорости роста сгустка в тесте тромбодинамики накануне родов ассоциирован с такими факторами риска венозных тромбоэмболических осложнений как тромботический анамнез, тип родоразрешения. У женщин, с предшествующим рецидивирующим ВТЭО, а также с семейным тромботическим анамнезом, достоверно увеличено значение скорости роста сгустка на 10% по сравнению с пациентами без

тромботического анамнеза ($p=0,001$). Группа пациенток с экстренным родоразрешением имеют достоверно более высокую скорость роста сгустка по сравнению с группой женщин с плановым кесаревым сечением ($p < 0,001$).

4. У женщин в послеродовом периоде (на 2-е сутки после к/с) одновременно с показателями теста тромбодинамики повышаются и другие маркеры активации свертывания, отражающие основные звенья развития ВТЭО: усиленное фибринообразование (уровень D-димера) и воспалительные изменения (концентрация фибриногена).

5. В тесте тромбодинамики скорости роста сгустка (V_i , V , V_{st}) демонстрируют разницу между группами женщин получавших и не получавших НМГ. Показатель V_{st} ниже 32 мкм/мин обладает чувствительностью - 62,5% и специфичностью - 85,5% на фоне НМГ, его целесообразно использовать в оценке эффективности антикоагулянтной профилактики в послеродовом периоде. Стандартные методы оценки гемостаза (АЧТВ, D-димер) не чувствительны к профилактике НМГ.

6. Показатель V_{st} в тесте тромбодинамики коррелирует с положительной динамикой состоянием системы гемостаза при наличии анти-Ха активности, что свидетельствует об эффективности тромбопрофилактики НМГ.

Практические рекомендации

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, акушеров-гинекологов.

1. Полученные допустимые диапазоны значений для параметров теста тромбодинамики у женщин, родоразрешенных путем операции кесарева сечения с неотягощённым акушерско-гинекологическим анамнезом, могут быть использованы в качестве референсных интервалов в других клинко-диагностических лабораториях после соответствующей валидации: T_{lag} 0,75-0,85 мин; V_i 56-60 мкм/мин; V_{st} 31-34 мкм/мин; V 31-34, мкм/мин; D 30726-32249 отн.ед.; T_{sp} отсутствует.

2. Мониторинг показателей гемостаза накануне родов без дополнительных факторов тромботического риска представляется нецелесообразным ввиду низкой диагностической значимости.

3. Применение теста тромбодинамики для оценки состояния системы гемостаза в дополнение к анамнестической бальной шкале степени риска развития венозных тромбоэмболических осложнений, с последующим мониторингом антикоагулянтной терапии, позволяет обеспечить персонализированный подход к тромбопрофилактике у женщин в послеродовом периоде.

4. У женщин в послеродовом периоде на фоне профилактики НМГ рекомендуется применение теста тромбодинамики. Показатель V_{st} выше **32 мкм/мин** требует коррекции дозы и/или кратности введения НМГ.

Статьи в научных журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий

1. Шпилюк М.А. Изменения показателей плазменного звена гемостаза в дородовом и послеродовом периодах у женщин, родоразрешенных путем операции кесарева сечения / М.А. **Шпилюк**, Е.М. Кольцова, А.Н. Баландина, К.И. Грищук, О.С. Безнощенко, И.И. Серебрянский, А.В. Пырегов, Ф.И. Атауллаханов, Т.Ю. Иванец, Р.Г. Шмаков // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2017. - Т. 71. - № 3. - С. 88-94.

2. Шпилюк М.А. Опыт ведения венозных тромбозов у новорожденных: два клинических наблюдения / Морозова Н.Я., Буров А.А., Дорофеева Е.И., Подуровская Ю.Л., **Шпилюк М.А.**, Филиппова Е.А., Пыков М.И., Виноградова М.А., Свирин П.В., Дегтярев Д.Н. // Неонатология: новости, мнения, обучение. - 2017. - № 2 (16). - С. 91-98.

3. Shpilyuk M.A. The laboratory control of anticoagulant thromboprophylaxis during the early postpartum period after cesarean delivery / Е.М. Koltsova , А.Н. Balandina , К.И. Grischuk , **М.А. Shpilyuk**, Е.А. Seregina , N.M. Dashkevich , А.V. Poletaev , А.V. Pyregov , G.T. Sukhih , I.I. Serebriyskiy, F.I. Ataulakhanov // Journal of Perinatal Medicine. - 2018. – Vol.46. - № 3. - P. 251-260.

4. Шпилюк М.А. Тромбоз правого предсердия у новорожденного: благоприятный исход. / Морозова Н.Я., Буров А.А., Дорофеева Е.И., Подуровская Ю.Л., **Шпилюк М.А.**, Филиппова Е.А., Барышникова И.Ю., Пыков М.И., Виноградова М.А., Свирин П.В., Дегтярев Д.Н. // Вопросы

гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2018. - Т. 17. - № 1. - С. 87-92

5. Шпилюк М.А. Безопасность регионарной анестезии при родоразрешении беременных с вращением плаценты // А.Ю. Королев, А.В. Пырегов, Т.А. Федорова, Р.Г. Шмаков, Ю.А. Герасимов, **М.А. Шпилюк**, А.А. Медведева. // **Акушерство и гинекология**. - 2019. - № 1. - С. 92-97.

6. Shpilyuk M.A. Effect of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles on Human Blood Coagulation. / D.N. Silachev, K.V. Goryunov, **M.A. Shpilyuk**, O.S. Beznoschenko, N.Y. Morozova, E.E. Kraevaya, V.A. Popkov, I.B. Pevzner, L.D. Zorova, E.A. Evtushenko, N.L. Starodubtseva, A.S. Kononikhin, A.E. Bugrova, E.G. Evtushenko, E.Y. Plotnikov, D.B. Zorov, G.T. Sukhikh.// **Cells**. - 2019 - Vol.19 - №8(3) – P.258.

7. Шпилюк М.А. Результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с персистенцией антифосфолипидных антител / Краевая Е.Е., Долгушина Н.В., Менжинская И.В., **Шпилюк М.А.**, Безнощенко О.С., Кречетова Л.В. // **Акушерство и гинекология**. - 2020. - № 4. - С. 97-103.

8. Шпилюк М.А. Частота выявления и длительность циркуляции волчаночного антикоагулянта у пациентов с COVID-19 / Безнощенко О.С., **Шпилюк М.А.**, Иванец Т.Ю., Кречетова Л.В., Пырегов А.В., Кодацкий Д.С., Тавлуева Е.В., Мелкумян А.Р., Городнова Е.А., Долгушина Н.В. // **Российский иммунологический журнал**. - 2021. - Т. 24. - № 3. - С. 413-418.

9. Шпилюк М.А. Использование теста тромбодинамики в диагностике нарушений гемостаза у больных COVID-19 разной степени тяжести./ Л.В. Кречетова, Д.Ю. Нечипуренко, **М.А. Шпилюк**, О.С. Безнощенко, Е.А. Береснева, М.И. Маркелов, Т.Ю. Иванец, Т.Ю. Гаврилова, И.Ф. Козаченко, Р.М. Есаян, А.В. Пырегов, Н.А. Хачатрян, Д.С. Кодацкий, И.С.Спиридонов, Н.В. Долгушина, Е.А. Городнова, Ф.И.Атауллаханов, А.Г. Румянцев, Д.Н.Дегтярев // **Клиническая практика**. 2021. - Т. 12. - № 4. - С. 23-37

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РОТЕМ - ротационная тромбоэластометрия

АК - антикоагулянты

АТ - антитромбин III

АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время

ВТЭО - венозные тромбоэмболические осложнения

к/с - кесарево сечение

НМГ - низкомолекулярный гепарин

НФГ - нефракционированный гепарин

ТГВ - тромбоз глубоких вен

ТД - тромбодинамика

ТЭЛА - тромбоэмболия легочной артерии

ФВ - фактор Виллебранда