

ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ Д – ДИМЕРА В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ: ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ, ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ И ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Токарева Е.В., Прокаева П.А., Фурман О.Л., Коньшина М.Н.
ГБУЗ «Пензенская областная клиническая больница им. Н. Н. Бурденко»,
Россия

Тромбоэмболические осложнения (ТЭО), возникающие в артериальном и венозном руслах кровообращения, являются наиболее распространенными и опасными в клинической практике, часто приводящие к нарушению трудоспособности, инвалидизации и летальным исходам. Многие заболевания (сердечнососудистой системы, болезни печени, инсульты, онкологические заболевания, воспалительные процессы, ДВС-синдром и т.д.) сопровождаются нарушениями в системе гемостаза с повышением прокоагулянтной активности и изменениями реологических свойств крови (1-11). Формирование тромбов – это естественный физиологический процесс. В норме существует баланс между факторами свертывающей и противосвертывающей систем. Нарушение этого равновесия сопровождается патологическим тромбозом или кровотечением. Гемодинамические нарушения с гиперкоагуляцией, повышением агрегации эритроцитов и тромбоцитов, вязкости крови, будут усугублять течение любого заболевания, повышая риск тромботических событий и ограничивая реабилитационный потенциал пациента. Активация свертывающей и фибринолитической систем в подавляющем большинстве случаев возникает сопряжено, в связи, с чем в плазме крови одновременно возрастает как количество продуктов протеолиза факторов свертывания крови, так и фибринолиза. Основным механизмом свертывания крови является образование тромбина, который превращает растворимый фибриноген первоначально в фибрин-мономер, который состоит из 2-х доменов Д и домена Е. В следующую стадию мономерные молекулы фибрина полимеризуются, соединяясь друг с другом, бок в бок и конец в конец, и формируют сеть растворимого фибрина. На этом этапе образуются водородные связи между Д-доменами одной молекулы и Е-доменом другой молекулы. Далее под действием XIIIa фактора свертывания крови образуется нерастворимый фибрин-полимер, отличающийся от растворимого тем, что в нем Д-домены соседних молекул фибрин-мономера ковалентно связаны между собой с образованием Д-димерных комплексов. Волокна фибрина образуют основной каркас сгустка крови и тромба. В ответ на активацию свертывающей системы, активируется фибринолитическая система гемостаза, вызывающая гидролиз фибрина с образованием продуктов его деградации (ПДФ). В отличие от конечных продуктов расщепления фибриногена, которые представлены в виде отдельных фрагментов Д и Е, при расщеплении поперечно-сшитых фактором XIIIa волокон фибрина образуются более крупные фрагменты молекул Д-димера и тримера Д-Е-Д, поскольку плазмин не способен разрезать ковалентную связь между Д-доменами. Их концентрация пропорциональна активности фибринолиза и количеству

лизируемого фибрина, поэтому они являются специфическими маркерами повышения гемостатического потенциала крови (1-11).

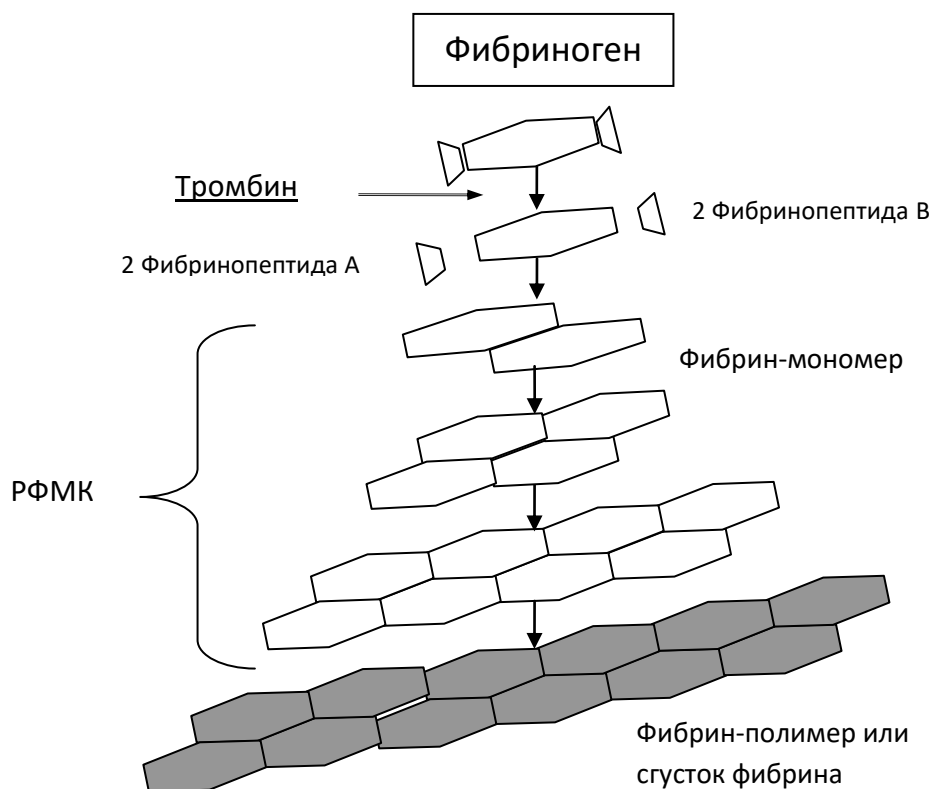


Рис. №1 Принципиальная схема превращения фибриногена в фибрин.

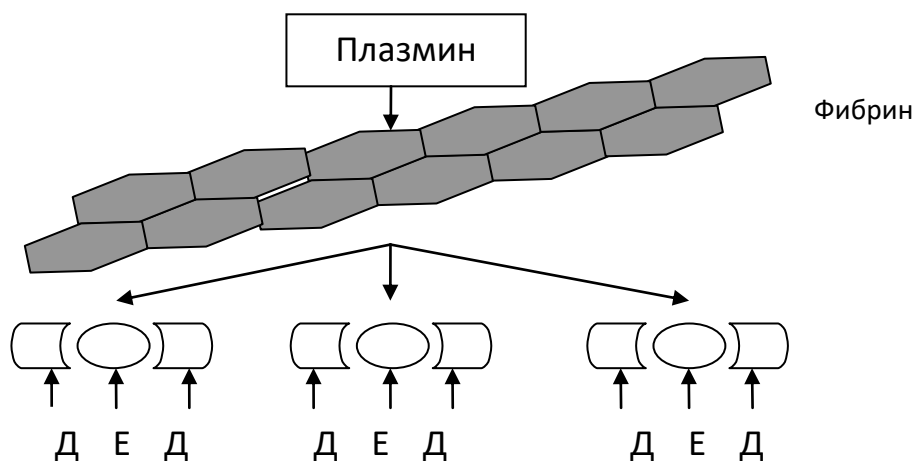


Рис №2. Схема расщепления фибрина на Д-димеры

В настоящее время для определения Д-димера используются несколько методов диагностики (4-11). Во всех методах исследования Д-димера применяются моноклональные антитела к неоантигенным эпитопам на Д-димере, которые образуются при расщеплении нерастворимого фибрина плазмином, но их нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономерах.

Поскольку эти моноклональные антитела не реагируют с фибриногеном, исследования можно проводить как в плазме, так и в цельной крови (4-11). В своей лабораторной практике мы применяем для исследования Д-димера иммуноферментный анализ (ИФА) и методы латексной агглютинации (ЛА), количественный и полуколичественный. Принцип метода ИФА основан на одностадийном «сэндвич» варианте твердофазового иммуноферментного анализа. В лунки стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами вносятся калибровочные и контрольный образцы с известными концентрациями Д-димера, исследуемые образцы плазмы и пероксидазный конъюгат антител к Д-димеру. Образовавшиеся иммунные комплексы «моноклональные антитела – Д-димер – конъюгат» после отмывания избытка конъюгата, выявляют ферментативной реакцией с перекисью водорода и раствором тетраметилбензидина. После остановки реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов, степень окрашивания пропорциональна концентрации Д-димера, которая рассчитывается по калибровочному графику. Полуколичественный тест ЛА основан на времени появления агглютинации на планшет-карте при добавлении к плазме, содержащий Д-димер, латексных шариков, покрытых моноклональными антителами против Д-димера. Суть количественного метода ЛА заключается в том, что при добавлении плазмы пациента, содержащий Д-димер, к реагенту происходит увеличение оптической плотности реагента, представляющего собой взвесь микрولاتексных частиц, покрытых моноклональными антителами против Д-димера. При этом наблюдается увеличение оптической плотности пропорционально концентрации Д-димера в исследуемом образце (4-11). В своей практической деятельности мы используем все три метода, но при разных клинических ситуациях. ИФА мы применяем для больных, которым данное обследование проводится по стандартам оказания медицинской помощи населению, и нет клинических проявлений ТЭО. Методы ЛА – при urgentных ситуациях, когда время для постановки диагноза ограничено. ИФА проводится на серии образцов плазмы, поэтому он более длительный, а методы ЛА можно проводить индивидуально в течение нескольких минут, даже непосредственно у постели больных (4-11). Данные методы ничем не отличаются друг от друга по специфичности и чувствительности, кроме времени и стоимости исследования. Они имеют высокую чувствительность (90-96%), но более низкую специфичность (52-60%) (4-11). Стоимость одного анализа по нашей лаборатории методом ЛА количественного составляет – 980,56 рублей, качественного – 229,76 , а ИФА – 196,26. Низкие цены методом ИФА обусловлены стоимостью наборов АО «ВЕКТОР-БЕСТ» и серийностью постановки. Мы осуществляли постановки 2-3 раза в неделю по 10-12 человек, что не влияет на обследование пациентов, но уменьшает стоимость анализов.

Цель нашего исследования – обобщить опыт определения Д-димера данными методами, дать их диагностическую, прогностическую и экономическую оценку.

Материалы и методы. Материалом для исследования служит цитратная плазма. Исследования методом количественной ЛА проводились на автоматическом биохимическом анализаторе «OLYMPUS AU-400» (Япония) с реагентами фирмы BECKMAN COULTER, полуколичественный ЛА - на планшет-картах с использованием тест-наборов фирмы Diagnostics. ИФА – на анализаторе STAT FAX-3200 (США) с реактивами фирмы АО «ВЕКТОР БЕСТ» – «Д-димер – ИФА- БЕСТ».

Результаты исследования. Изучили показатели уровня Д-димеров у 2116 пациентов реанимационного, нейрохирургического, кардиологического и неврологического отделений, в возрасте от 40 до 83 лет. Всего исследований выполнено 6348, из них - методом ЛА - 3456 (54,4%), методом ИФА - 2892 (45,6%). Определение показателей проводилось в первый день поступления в стационар, и при повышенных уровнях Д-димера на 3-8 сутки антикоагулянтной терапии. Из 3456 исследований, проведенных методом ЛА, полуколичественным тестом выполнено 1420 анализов, в основном по приемному и реанимационному отделениям. Положительных результатов – 568(40,0%), высокий процент обусловлен целенаправленным обследованием больных, с клиническими проявлениями ТЭО. Количественным методом ЛА проведено 2036 исследований, из них положительных – 788(38,7%). Из 2892 анализов, выполненных методом ИФА, положительных – 1108(38,3%). Положительные результаты сравнивали с инструментальными методами обследования больных: контрастной венографией (КВГ), ультразвуковой доплерографией (УДГ) и ангиографией (АГ). В 16% случаев венографии и 37% УДГ отмечены совпадения с повышенными результатами Д-димера у больных с тромбозом глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей и 42% при АГ легких с подозрением на тромбоэмболию легочной артерии (ТЭЛА). Полученные данные свидетельствуют, что положительный результат теста на Д-димер не гарантирует 100% подтверждения диагноза тромбоза или тромбоэмболии, что обусловлено недостаточной специфичностью метода. Повышение уровня Д-димера выявлялось и при многих других заболеваниях, не сопровождающихся тромбообразованием: сердечнососудистых, инфекционных, онкологических, воспалительных, сепсисах, болезнях печени, после хирургических вмешательств и т. д. (4-11). Уровень Д-димера также колебался в разных возрастных группах, он был выше нормы у всех лиц старше 80 лет и у 46% пациентов старше 70 лет, без каких либо тромботических осложнений. Причем у лиц более молодого возраста, процесс нормализации концентрации Д-димера при адекватной антикоагулянтной терапии, наступал быстрее, чем у пожилых пациентов (4-11). Отмечено влияние на показатели Д-димера величины тромба, времени от начала клинических проявлений до назначения антикоагулянтной терапии и приема антикоагулянтов на догоспитальном этапе (4-11). Чем больше тромб и больше времени уходит до назначения тромболитической терапии, тем выше показатели Д-димера и прогноз неблагоприятный. При применении антикоагулянтов на амбулаторном этапе, хотя Д-димеры и выявляются, но уровень их не высокий. На определение Д-димера не влияют техника забора крови, примесь тромбоцитов, не требуется

специфическая обработка исследуемой плазмы для удаления перекрестно реагирующего фибриногена, так как моноклональные антитела реагируют только с неоантигенными эпитопами Д-димера (4-11). Анализируя положительные результаты Д-димеров, выявлены пределы их колебаний. Так из 38,3% положительных тестов, обнаруженных методом ИФА, при норме менее 285 нг/мл, отмечено повышение до 1000 у 20,5% лиц; до 5000 – у 10,5%; до 10 000 – у 4,5% и более 10 000 нг/мл – у 2,8%. Из 38,7% положительных результатов латексной агглютинации, выявлено увеличение концентрации Д-димера до 5 мкг/мл (норма – до 0,5) у 20,8% пациентов, до 10 – у 11,2%, до 20 – у 4,6% и более 20 мкг/мл – у 2,1%. Неблагополучный исход отмечен у больных с высокими показателями Д-димера, более 10 000 нг/мл при методе ИФА и 20 мкг/мл ЛА. Отрицательный результат теста является более значимым для исключения тромбоза и ТЭО (4-11). В своей практике мы не сталкивались случаями, чтобы при нормальных показателях Д-димера, выявлялись какие либо осложнения со стороны системы гемостаза.

Таким образом. Определение Д-димера служит полезным тестом для исключения диагноза тромбоэмболизма (при отрицательных результатах), что позволяет избежать применения дорогостоящих методов инструментальной диагностики и необоснованного лечения антикоагулянтами, а также дает возможность судить об эффективности антикоагулянтной терапии (при положительных тестах). При положительных результатах нет 100% гарантии подтверждения диагноза ТЭО. При высоких уровнях Д-димера отмечается всегда неблагоприятный исход. Наш опыт практической деятельности показывает, что при постановке теста 2-3 раза в неделю методом ИФА не влияет на качество обследования больных, но дает существенную экономическую выгоду, снижая стоимость одного исследования.

Литература:

1. Баркаган З.С., Момот А.Л. Основы диагностики нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед АО, 1999.
2. Баркаган З.С., Момот А.Л. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2001.
3. Момот А.Л. Патология гемостаза. СПб.: Формат Т, 2006.
4. Комаров А.В. Д-димер и тромбоцитов как предикторы тромботических осложнений с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей (результат пятилетнего наблюдения). Кардиология. 2000. – Т.40, №9.- С. 16-22.
5. Кузнецов О.Е., Якубцевич Р.Э., Протасевич П.П. Д-димеры в клинической практике. Пособие для врачей, стажеров и студентов. Гродно: ГрГМУ, 2009.
6. Воробьева Н.М., Панченко Е.П., Добровольский А.Б., Титаева Е.В. Повышение Д-димера у больных с сердечнососудистыми заболеваниями без тромбоэмболических осложнений: с чем это связано и что делать. Ангиология и сосудистая хирургия. 2010,-№4.-С34-41.
7. Попова О.А., Чернышева Г.Г., Таращук Е.Ю. Д-димер – тест выбора в диагностике нарушений системы гемостаза у больных с ишемической болезнью сердца. Тромбоз гемостаз и реология. 2011.-№1. С.69-76.

8. Орел Е.Б., Виноградов В.Л., Андреева А.С., Васильев С.А. Д-димер – маркер диагностики, мониторингования и прогнозирования тромбозов. Тромбоз гемостаз и реология. 2012.-№4.-С.33-40.
9. Мощев Д.А., Лубнин А.Ю., Мошкин А.В., Моченова Н.Н., Мадорский С.В., Лукьянов В.И. Анализ прогностической значимости исследования уровня Д-димера фибрина у плановых нейрохирургических больных до госпитализации. Анестезиология и реаниматология. 2013.-№4.-С.59-63.
10. Тодуа Ф.И., Цивцивадзе Г.Б., Барамидзе А.М., Воробьева Е.О., Ахвледиани М.В., Гачечиладзе Д.Г. Диагностическое значение Д-димера, гомоцистеина и мультidetекторной компьютерной томографии при тромбоэмболии легочной артерии. Тромбоз гемостаз и реология. 2015.-№3.-С.75-78.
11. Папаян Л.П., Князева Е.С.. Под редакцией Петрищева Н.Н.. Д-димер в клинической практике. Пособие для врачей. - М.:ООО «Инсайт полиграфик», 2002.- 20С.