

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет
имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Кафедра педиатрии ИПО

Зав. кафедрой: д.м.н, проф. Таранушенко Т. Е.

Проверил: к.м.н., ассистент Моргун А. В.

Реферат

«Лабораторные аспекты гемостаза новорожденных»

Выполнил: врач-ординатор Душанина М. О.

Отлично, все.

Красноярск
2019 г.

Моргун

*М.В. Душанина
М.В. Душанина*

Список литературы

Введение	3
Особенности системы гемостаза в первый год жизни новорожденного: концепция «развивающегося гемостаза».....	4
Тромбоцитарное звено.	4
Плазменное звено.....	8
Фибринолиз	11
Сосудистое звено	11
Современные методы лабораторной оценки состояния гемостаза и их информативность у новорожденных	12
Стандартные тесты.	12
Глобальные тесты гемостаза.	14
Заключение	17
Список литературы.....	20

Введение

Новорожденные составляют группу высокого риска тромботических и геморрагических осложнений. Несмотря на то что в целом частота тромбозов и кровотечений различного характера в общей популяции новорожденных невелика, риски как тромбозов, так и кровотечений существенно повышаются при наличии у новорожденного осложнений, в том числе недоношенности. Механизмы, лежащие в основе возникновения тромботических и геморрагических осложнений у новорожденных, до конца не поняты и остаются спорными. Система гемостаза у новорожденных существенно отличается от гемостаза у взрослых и даже от гемостаза у детей старше 1 года. Тем не менее, несмотря на наличие количественных и качественных отличий практически всех параметров системы гемостаза от параметров у взрослых, здоровые новорожденные в целом имеют клинически нормальный функциональный гемостаз без тенденции к коагулопатии или тромбозу. По-видимому, система гемостаза у новорожденных находится в некотором альтернативном «балансе», который отличается от «баланса» гемостаза у взрослых. Вопрос об устойчивости этого баланса по-прежнему остается открытым. Из-за особенностей гемостаза у новорожденного лабораторная диагностика нарушений этой системы сильно затруднена, и лечащий врач вынужден ориентироваться исключительно на клиническую картину. В данном обзоре приведены основные сведения о системе гемостаза у новорожденных, а также произведена критическая оценка существующих лабораторных тестов с точки зрения их применимости и информативности для данной группы пациентов. Новорожденные составляют группу высокого риска тромботических и геморрагических осложнений [1, 2]. Несмотря на то, что в целом частота тромбозов и кровотечений различного характера в общей популяции новорожденных невелика, риски и тромбозов, и кровотечений существенно повышаются при наличии у новорожденного осложнений, в том числе недоношенности. Механизмы, лежащие в основе возникновения тромбогеморрагических осложнений у новорожденных, до конца не поняты и остаются спорными. То, что система гемостаза у новорожденных сильно отличается от гемостаза у взрослых и даже от гемостаза у детей старше 1 года – факт давно известный, однако вопрос о балансе компонентов в системе свертывания у новорожденного и устойчивости этого баланса по-прежнему открыт. Из-за особенностей гемостаза новорожденного клиническая лабораторная диагностика нарушений этой системы сильно затруднена, и лечащий врач вынужден ориентироваться исключительно на клиническую картину, которая в большинстве случаев проясняется после того, как тромбогеморрагическое осложнение уже развилось и прогрессирует.

В течение последних двух десятилетий развитие методик ухода за новорожденным позволило отделениям реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) выхаживать новорожденных от 22 нед. гестации. Многие методики, которые сделали это возможным, включают использование центрального венозного и артериального доступов. Около 15% всех детей, поступивших в ОРИТН, и 50% тех, кто имеет массу тела ≤ 1000 г, нуждаются в катетеризации [3]. Внедрение центрального венозного и артериального доступов

обуславливает резкое возрастание рисков катетер-ассоциированных тромбозов, которые могут привести к клинически значимым тромбозам и тромбоэмболиям. Так, частота тромбозов в общей популяции новорожденных крайне низка и составляет всего 0,0007–0,0051%, однако среди пациентов ОРИТН достигает 2,4–7% [2]. Наиболее распространенные геморрагические осложнения неонатального периода – внутричерепные кровоизлияния, среди них наиболее часты внутрижелудочковые кровоизлияния (ВЖК), которые обнаруживают у 20% недоношенных новорожденных [1]. ВЖК ассоциированы с повышенной летальностью и задержками в последующем развитии ребенка. Прочие типы кровотечений менее распространены, однако также нередко приводят к летальным исходам. Так, частота легочных кровотечений в популяции недоношенных новорожденных достигает 11–12% [4].

Особенности системы гемостаза в первый год жизни новорожденного: концепция «развивающегося гемостаза»

Баланс системы гемостаза в целом зависит от многих параметров, включая сосудистое, тромбоцитарное и плазменное звенья. Гемостатическая система изменяется в течение всего времени созревания плода [5]. Показано, что факторы свертывания крови материнского происхождения неспособны пересечь плацентарный барьер. Синтез некоторых белков свертывания (например, фибриногена) в печени плода начинается уже на 5-й нед. беременности [6]. В то же время в крови плода появляются первые тромбоциты [7]. Уже после 11 нед. кровь плода способна сворачиваться [8]. У плодов 19–23 нед. гестации уровень различных белков свертывания в среднем находится в пределах от 10 до 30% нормы взрослых и к 38-й нед. гестации постепенно увеличивается, достигая для некоторых белков 50% нормы взрослых [9]. После рождения ребенка система гемостаза продолжает развиваться, достигая «взрослых» значений для большинства параметров в течение 6 мес. после рождения [10].

Тромбоцитарное звено.

Различия между новорожденными и взрослыми наблюдаются уже на этапе производства тромбоцитов. Несмотря на то, что основные этапы тромбоцитопоэза (продукция тромбопоэтина, пролиферация предшественников мегакариоцитов, дифференциация и созревание мегакариоцитов путем эндомитоза и цитоплазматических изменений, продукция и выход тромбоцитов в кровоток) представлены в равной мере и у новорожденных, и у взрослых, существуют качественные различия на каждом этапе (таблица 1). Концентрация тромбопоэтина (основного стимулирующего агента тромбоцитопоэза) в крови повышена у здоровых новорожденных по сравнению со здоровыми взрослыми [11]. Эксперименты с культурами клеток показывают, что предшественники мегакариоцитов новорожденных способны к более быстрой пролиферации по сравнению со взрослыми, образуют более крупные колонии в исследованиях с использованием культур на твердых средах [12] и образуют в 10 раз больше мегакариоцитов в расчете на один предшественник в экспериментах с жидкими средами [3]. Однако мегакариоциты, генерируемые фетальными и неонатальными

предшественниками, значительно меньше и обладают более низкой ploидностью, чем взрослые мегакариоциты, что показали как *in vitro*, так и *in vivo* исследования [4]. У мегакариоцитов новорожденных также значительно снижена скорость производства тромбоцитов в расчете на отдельный мегакариоцит, что, вероятнее всего, является следствием их малого размера [5]. Все эти характеристики указывают на общую незрелость мегакариоцитов новорожденных по сравнению со взрослыми. Стоит, однако, отметить, что культивирование неонатальных и взрослых мегакариоцитов с тромбопоэтином показало, что, несмотря на сниженный уровень ploидности, мегакариоциты новорожденных оказались более цитоплазматически зрелыми, то есть имели более высокий уровень экспрессии CD42b (маркер зрелых мегакариоцитов), а также были более зрелыми по ультраструктурным показателям [7]. Эти наблюдения не только развеяли представление о том, что мегакариоциты новорожденных «незрелые», но выявили также уникальную по своей природе картину фетального/неонатального мегакариопоэза, характеризующуюся быстрой пролиферацией с последующим полным цитоплазматическим созреванием без полиploидизации. Конечный результат этого процесса – производство большого количества высокоцитоплазматически зрелых, низкоploидных мегакариоцитов. С онтогенетической точки зрения, этот механизм может позволить плодам и новорожденным заселять быстро расширяющееся пространство костного мозга и объема крови в период быстрого роста ребенка при сохранении в среднем нормальных показателей концентрации тромбоцитов.

Концентрация тромбоцитов в периферической крови новорожденных обычно находится в пределах $100\text{--}450 \times 10^9/\text{л}$, что несколько шире нормального диапазона у взрослых. Традиционно уровень концентрации тромбоцитов менее $150 \times 10^9/\text{л}$ у новорожденных определяется как тромбоцитопения, однако показатели от 100 до $150 \times 10^9/\text{л}$ достаточно часто встречаются у относительно здоровых детей (в большинстве случаев у недоношенных новорожденных) и редко приводят к каким-либо клиническим осложнениям [6]. Встречаемость тромбоцитопении обратно пропорциональна гестационному возрасту новорожденного и варьирует в широких пределах – от 1 до 80% в зависимости от изучаемой популяции (доношенные здоровые новорожденные, все новорожденные, новорожденные с осложнениями) [16]. С момента рождения концентрация тромбоцитов постепенно увеличивается во всех группах недоношенных новорожденных, однако у глубоко недоношенных показатели остаются устойчиво более низкими по сравнению с более зрелыми новорожденными [12]. В популяции глубоко недоношенных маловесных новорожденных (масса тела при рождении < 1000 г) встречаемость тромбоцитопении достигает 70% [7]. Средний объем тромбоцитов, так же как их количество, находится в обратной зависимости от гестационного возраста новорожденного и прогрессивно возрастает с течением времени [8].

Подсчет количества тромбоцитов в периферической крови – пока единственный объективный лабораторный критерий принятия решения о профилактике кровотечения, несмотря на то что во многих исследованиях корреляции между концентрацией тромбоцитов у новорожденных и частотой

кровотечений не обнаружено [9]. Наличие пациентов с кровотечениями при значениях концентрации тромбоцитов в пределах $50-100 \times 10^9/\text{л}$ при нормальной коагулограмме и, наоборот, с тромбоцитопенией менее $50 \times 10^9/\text{л}$ [2], протекающей без клинических проявлений, говорит о том, что, возможно, имеет значение не только количество тромбоцитов, но и их качество. Первые свидетельства различий в функциональной активности тромбоцитов новорожденных и взрослых были получены при исследовании агрегации тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме.

Таблица 1. Основные различия в тромбоцитопозе здоровых новорожденных и взрослых

Параметр	Новорожденные	Взрослые
Концентрация тромбопоэтина в крови	78 пг/мл (межквартильный размах 55–107 пг/мл)	< 32,5 пг/мл
Предшественники мегакариоцитов	<ul style="list-style-type: none"> • Высокое содержание в периферической крови • Обладают высокой пролиферативной активностью (образуют в 10 раз больше мегакариоцитов в расчете на один предшественник по сравнению со взрослыми) • Более чувствительны к стимуляции низкими концентрациями тромбопоэтина 	<ul style="list-style-type: none"> • Низкое содержание в периферической крови • Прролиферативная активность ниже, чем у новорожденных • Менее чувствительны к стимуляции низкими концентрациями тромбопоэтина
Размер и плоидность мегакариоцитов	Мелкие, низкая плоидность (2N/4N in vitro)	Крупные, высокая плоидность
Созревание мегакариоцитов	Достигают цитоплазматической зрелости при низком уровне плоидности	Цитоплазматическая зрелость коррелирует с плоидностью
Производство тромбоцитов	Низкая скорость производства тромбоцитов (образуют примерно в 3 раза меньше тромбоцитов в расчете на один мегакариоцит по сравнению со взрослыми в одинаковый промежуток времени)	Высокая скорость производства тромбоцитов

Было показано, что тромбоциты новорожденных менее чувствительны к таким агонистам, как АДФ, эпинефрин, коллаген, тромбин и аналог тромбоксана U46619. Тем не менее последующие исследования показали, что адгезия и агрегация тромбоцитов на поверхности, покрытые иммобилизованным

коллагеном или фактором фон Виллебранда, в условиях потока в проточных камерах не отличаются у здоровых новорожденных и взрослых [12].

Тест функциональной активности тромбоцитов при помощи проточной цитометрии напрямую дает полную информацию о функциональном состоянии тромбоцитов и их способности к активации в присутствии агонистов. Тест основан на цитофлуориметрической детекции специфических антител и иных маркеров, меченых флуорофорами, связывающихся с поверхностными антигенами, и позволяет оценить состояние тромбоцитов в покое и при активации, выявить нарушения различных их функций – адгезии, агрегации, секреции разных типов гранул, прокоагулянтной активности. Существуют противоречивые данные относительно вопроса о том, является ли поверхностное количество гликопротеина Ib (ГП Ib, рецептор фактора фон Виллебранда – vWF, который обеспечивает адгезию тромбоцитов на поврежденный субэндотелий) и общего (неактивированного) гликопротеина IIb–IIIa (ГП IIb–IIIa, рецептор фибриногена и vWF, обеспечивает формирование тромбоцитарного агрегата) у новорожденных более низким, равным или увеличенным по сравнению со взрослыми [12]. Однако стоит отметить, что основное значение имеет не общее количество ГП IIb–IIIa, а его способность переходить в состояние с высокой аффинностью (активированную форму), что является критическим этапом в образовании агрегата тромбоцитов и позволяет образовывать фибриногеновые «мостики» между соседними тромбоцитами. Экспрессия ГП IIb–IIIa в активированной форме снижена на тромбоцитах новорожденных по сравнению со взрослыми [3]. Прокоагулянтная активность тромбоцитов оценивается по доле активированных тромбоцитов, несущих на своей поверхности фосфатидилсерин, от общего определяемого количества активированных тромбоцитов. Фосфатидилсерин при активации тромбоцита выходит на внешний слой мембраны у части тромбоцитов, что ведет к связыванию белков свертывания крови и ускорению реакций с их участием. Прокоагулянтная активность тромбоцитов одинакова у новорожденных и взрослых [4]. Активация тромбоцитов сопровождается высвобождением плотных и альфа-гранул. В плотных гранулах накапливаются и хранятся АДФ (неметаболический пул), серотонин, адреналин, норадреналин и ионы кальция. Альфа-гранулы содержат тромбоцитарный фактор IV, а также другие белки, участвующие в свертывании, такие как тромбоспондин, фибронектин и vWF. Выделение гранулярного содержимого способствует аутокринной и паракринной стимуляции, усиливает адгезию тромбоцитов и активирует близлежащие тромбоциты. Неонатальные тромбоциты в покое могут содержать такое же количество плотных гранул, как и взрослые тромбоциты, но после стимуляции тромбином высвобождение плотных гранул снижено по сравнению со взрослыми. Выход альфа-гранул, определяемый по маркеру Р-селектину, снижен у новорожденных по сравнению со взрослыми и остается ниже на протяжении первых 12 дней жизни. Показатель выхода альфа-гранул находится в обратной зависимости от гестационного возраста новорожденного [5].

Генерация и высвобождение тромбоксана A₂ (TxA₂) позволяет стимулировать соседние тромбоциты, усиливая их адгезию, активацию и в

конечном счете агрегацию. Тромбоксан В2 (ТхВ2) – это мета-болит ТхА2, который часто используется в качестве маркера генерации ТхА2. При стимуляции тромбином и коллагеном генерация ТхВ2 не отличается у новорожденных и взрослых, повышена у новорожденных при стимуляции арахидоновой кислотой и снижена при стимуляции эпинефрином [6].

Ультраструктурно неактивированные тромбоциты новорожденных и взрослых не отличаются. Было показано, что тромбоциты новорожденных и взрослых могут отличаться при активации по количеству псевдоподий, микротрубочковой и микрогранулярной структуре, однако данные отличия могут проявляться из-за различий в технике забора крови, а не собственно из-за отличия новорожденных от взрослых [7].

Обобщенные сведения о параметрах тромбоцитарного звена гемостаза новорожденных приведены в таблице 2. Молекулярные механизмы, обуславливающие различия между тромбоцитами взрослых и новорожденных, на данный момент подробно не изучены. Общепринятое мнение состоит в том, что различия между лабораторными параметрами тромбоцитов новорожденных и взрослых возникают из-за общей незрелости тромбопоэза новорожденных, поэтому имеют многофакторную природу. Они могут быть связаны с различиями метаболизма фосфолипидов и тромбоксана, различиями в регуляции активации ГП IIb/IIIa, нарушениями в мобилизации кальция, внутриклеточной сигнализации, гранулярной секреции и агрегации [8]. На данный момент не выяснено также, как долго сохраняется гипореактивность тромбоцитов новорожденных: одни авторы приводят данные о том, что гипореактивность проходит в течение первых недель жизни новорожденного [12], другие показывают постепенную нормализацию тромбоцитарных параметров в течение первых 15 лет жизни ребенка [9].

Плазменное звено.

Системы свертывания у новорожденного и взрослого сильно отличаются. В крови новорожденного на момент рождения присутствуют все белки свертывания, однако их концентрации достигают «взрослой» нормы только по прошествии 6 мес., а изменения концентрации некоторых белков не прекращаются до подросткового возраста [3].

При рождении только концентрации коагуляционных факторов (ф)VIII, V и фибриногена находятся на уровне нормы взрослых или хотя бы приближены к ней (таблица 3). Концентрации витамин К-зависимых факторов свертывания (фII, фVII, фIX и фX), факторов контактного пути (фXI, фXII, прекалликреин), высокомолекулярного кининогена в первые дни жизни новорожденного находятся в среднем на уровне 30–50% от «взрослой» нормы. Концентрации этих факторов у здоровых новорожденных быстро растут на протяжении первых недель жизни и существенно перекрываются со взрослым диапазоном через 6 мес. после рождения, хотя средние значения концентраций большинства факторов до подросткового возраста остаются приблизительно на 20% ниже средних концентраций у взрослых [10]. Исследования, посвященные выявлению свободно циркулирующего тканевого фактора (в виде микровезикул, несущих тканевый

фактор на поверхности), показали, что концентрация в крови новорожденного при рождении превышает концентрации, обнаруживаемые в периферической крови взрослых, примерно в 1,5 раза [11]. К сожалению, исследований, посвященных выявлению динамики концентрации тканевого фактора в крови новорожденных, не существует, поэтому остается неясным, является ли этот тканевый фактор следствием травматичности самих родов и последующего перерезания пуповины или это некий механизм, возникающий у плода еще до момента родов и призванный защитить ребенка от травм во время прохождения родовых путей. Концентрация vWF повышена у новорожденных по сравнению со взрослыми и остается повышенной приблизительно в течение 3 мес. после рождения [12]. Возможно, повышенная концентрация vWF компенсирует сниженную функциональную активность тромбоцитов новорожденных.

Таблица 2. Характеристика тромбоцитарного звена гемостаза новорожденных

Пуповинная кровь	Периферическая кровь	Параметр	Сравнение со взрослыми	Достигает значений взрослых в течение
Количество тромбоцитов				
	x	Концентрация тромбоцитов	Расширенный диапазон референсных значений: у новорожденных – $100-550 \times 10^9/\text{л}$ у взрослых – $150-450 \times 10^9/\text{л}$	-
Качество тромбоцитов				
<i>Размерные характеристики</i>				
	x	Объем тромбоцита	Снижен примерно до 70–80% нормы для взрослых	От 1 мес. до 15 лет
<i>Экспрессия гликопротеиновых рецепторов</i>				
x	x	Гликопротеин Ib	Не отличается от взрослых при оценке неактивированных тромбоцитов либо снижен	-
x	x	Гликопротеин IIb/IIIa (общий)	Не отличается от показателя у взрослых при оценке неактивированных тромбоцитов либо снижен	-
	x	Гликопротеин IIb/IIIa (высокоаффинная форма)	Выход при стимуляции тромбоцитов снижен до 30–40% нормы для взрослых	От 1 мес. до 15 лет
<i>Прокоагулянтная активность</i>				
	x	Процент PS+ тромбоцитов	Не отличается от взрослых	-
<i>Секреторные функции</i>				
x		Плотные гранулы	Количество снижено в покоящихся тромбоцитах до 40–50% нормы для взрослых; секреция также снижена	От 1 мес. до 15 лет
	x	α -гранулы	Выход при стимуляции тромбоцитов снижен до 30–40% нормы для взрослых	От 1 мес. до 15 лет
x		Высвобождение тромбоксана A2	При стимуляции тромбином и коллагеном не отличается у новорожденных и взрослых; повышена у новорожденных при стимуляции арахидоновой кислотой и снижена при стимуляции эпинефрином	-
<i>Агрегация и адгезия на различные покрытия в условиях потока</i>				
	x	Агрегация и адгезия на коллаген в условиях потока	Не отличается от взрослых	-
	x	Агрегация и адгезия на vWF в условиях потока	Не отличается от взрослых	-

Концентрации естественных антикоагулянтов также снижены у новорожденных (таблица 3). Концентрации антитромбина III (АТ III) и кофактора гепарина II (НС II) снижены примерно в два раза по сравнению с их значениями у взрослых. На протяжении первых трех месяцев жизни уровень этих ингибиторов постепенно возрастает и к концу третьего месяца нормализуется [12]. Уровень ингибитора пути тканевого фактора также снижен примерно в два раза по сравнению со взрослыми и может оставаться сниженным до достижения подросткового возраста. Уровни протеинов С и S при рождении снижены более выражено, их концентрация составляет всего 30–40% от нормы взрослых и остается низкой до 6-месячного возраста [12]. Повышенная концентрация α 2-макроглобулина теоретически может быть фактором, частично компенсирующим достаточно серьезное снижение уровней всех остальных естественных антикоагулянтов. Уровень α 2-макроглобулина повышен по сравнению с нормой для взрослых в 1,7–2 раза – эти значения сохраняются по крайней мере в течение первых 6 мес. жизни [11, 12].

Таблица 3. Характеристика плазменного звена гемостаза новорожденных

Пуповинная кровь	Периферическая кровь	Параметр	Сравнение со взрослыми	Достигает значений взрослых в течение
Факторы свертывания				
<i>Внешний путь активации свертывания</i>				
x		TF	Повышен до 140–150% нормы для взрослых	Нет данных
	x	VII	Снижен до 65–85% нормы для взрослых	До 16 лет
<i>Внутренний и общий путь активации свертывания</i>				
	x	vWF	Повышен до 140–150% нормы для взрослых	3 мес.
	x	VIII	Не отличается	–
	x	V	Снижен до 70–95% нормы для взрослых	До 16 лет
	x	IX	Снижен до 30–50% нормы для взрослых	До 16 лет
	x	X	Снижен до 40–50% нормы для взрослых	До 16 лет
	x	II	Снижен до 40–60% нормы для взрослых	До 16 лет
	x	Fg	Не отличается	–
<i>Контактный путь активации свертывания</i>				
	x	XII	Снижен до 35–50% нормы для взрослых	До 16 лет
	x	XI	Снижен до 30–60% нормы для взрослых	1 год
	x	PK	Снижен до 30–40% нормы для взрослых	6 мес.
	x	HMWK	Снижен до 50–60% нормы для взрослых	6 мес.
Ингибиторы свертывания				
	x	АТ III	Снижен до 35–65% нормы для взрослых	3 мес.
	x	α 2-MG	Повышен до 130–170% нормы для взрослых	До 16 лет
	x	НС II	Снижен до 30–50% нормы для взрослых	6 мес.
	x	Pr C	Снижен до 30–45% нормы для взрослых	До 16 лет
	x	Pr S	Снижен до 30–55% нормы для взрослых	1 мес.
x	x	TFPI	Снижен до 50–55% нормы для взрослых	До 16 лет

Фибринолиз

Концентрации белков системы фибринолиза, отвечающей за устранение сгустка, образовавшегося в результате работы системы гемостаза, в крови новорожденных также существенно отличаются от «взрослых» значений. Фибринолитическая система, как и система свертывания, представляет собой каскад ферментативных реакций, конвертирующий неактивный предшественник, пламиноген, в активированную форму – пламин, который впоследствии разрезает полимеризованный фибрин. В целом у новорожденных имеется тенденция к общему снижению концентраций профибринолитиков (пламиногена, тканевого и урокиназного активатора пламиногена) и повышению концентраций ингибиторов фибринолиза (ингибитора активатора пламиногена-1, $\alpha 2$ -макроглобулина) (таблица 4). При этом концентрация еще одного ингибитора фибринолиза – $\alpha 2$ -антипламина – находится на уровне, примерно равном взрослой норме. Несмотря на то что баланс всего фибринолитического каскада смещен в сторону снижения фибринолиза, в крови новорожденных обнаруживаются повышенные концентрации продуктов деградации фибрина и высокие концентрации D-димеров [5].

Сосудистое звено

Лабораторная оценка функционирования сосудистого эндотелия ограничена несколькими маркерами, определяемыми с помощью иммуноферментного анализа. Потенциальными маркерами дисфункции эндотелия являются эндотелин-1 и тромбомодулин. Эндотелин-1 – вазоконстрикторный пептид; в неонатологии наличие циркулирующего эндотелина-1 наиболее широко ассоциируется с легочной гипертензией вследствие гипоксии и бронхолегочной дисплазии [6, 7]. Тромбомодулин является рецептором к тромбину и представляет собой гликопротеин, локализованный на поверхности эндотелиальных клеток. При связывании с тромбомодулином тромбин изменяет свою конфигурацию и начинает функционировать не как прокоагулянт, а как антикоагулянт. Повышение концентрации циркулирующего тромбомодулина указывает на повреждение сосудистого эндотелия.

Концентрации маркеров дисфункции сосудистого эндотелия у новорожденных повышены по сравнению со взрослыми и детьми более старшего возраста [8] (таблица 5). У здоровых новорожденных впоследствии наблюдается постепенное снижение концентрации эндотелина в течение первых трех месяцев жизни [9]. Гестационный возраст ребенка не влияет на концентрацию эндотелина. Концентрация тромбомодулина существенно повышена у новорожденных по сравнению со взрослыми (до 15 раз в первые дни жизни) [8]. Чем ниже гестационный возраст ребенка, тем выше уровень тромбомодулина [4], даже в условиях отсутствия перинатальной асфиксии.

Полученные лабораторные данные указывают на общую подактивированность эндотелия у новорожденных в течение первых месяцев жизни, возникающую из-за механического стресса во время родов и последующей адаптации кровеносной системы, а также кратковременного состояния гипоксии,

однако не ясно, имеет ли эта подактивированность какую-либо клиническую значимость.

Таблица 4. Характеристика фибринолитической системы новорожденных

Пуповинная кровь	Периферическая кровь	Параметр	Сравнение со взрослыми	Достигает значений взрослых в течение
Профибринолитические белки				
	x	Плазминоген	Снижен до 30–60% нормы для взрослых	6 мес.
	x	tPA	Повышен до 120–190% нормы для взрослых при рождении, однако быстро снижается до 50% нормы для взрослых в течение первых дней жизни	6 мес.
	x	uPA	Снижен до 50–75% нормы для взрослых	7 мес.
Ингибиторы фибринолиза				
	x	α 2-AP	Снижен до 80–90% нормы для взрослых	5 дней
	x	PAI-1	Повышен до 180% нормы для взрослых	5 дней

Примечание: tPA – тканевый активатор плазминогена; uPA – урокиназный активатор плазминогена; α 2-AP – α 2-антиплазмин; PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена-1.

Таблица 5
Маркеры дисфункции сосудистого эндотелия у новорожденных

Пуповинная кровь	Периферическая кровь	Параметр	Сравнение со взрослыми	Достигает значений взрослых в течение
x	x	Эндотелин-1	Повышен при рождении в среднем до 150% нормы для взрослых либо не отличается от взрослых; варьирует в очень широких пределах	Нет данных
	x	Тромбомодулин	Повышен при рождении до 1560% нормы для взрослых	Нет данных

Современные методы лабораторной оценки состояния гемостаза и их информативность у новорожденных

Стандартные тесты.

Агрегометрия наряду с подсчетом тромбоцитов в периферической крови – наиболее распространенный тест, оценивающий состояние тромбоцитарного звена гемостаза. Обычно активатор тромбоцитов (АДФ, коллаген, ристацитин и др.) добавляют в богатую тромбоцитами плазму, при этом степень агрегации определяют по степени увеличения светопропускания в процессе агрегации тромбоцитов [4]. Кроме того, существуют приборы, позволяющие определять агрегацию тромбоцитов в цельной крови по изменению электрического импеданса. Применение агрегометрии в неонатологии сильно ограничено в первую очередь чисто техническими проблемами, связанными с маленьким объемом циркулирующей крови и, как следствие, невозможностью забора нужного объема образца из периферической вены. Исследования, проведенные на пуповинной крови, показывают, что агрегация тромбоцитов с широким спектром агонистов (АДФ, коллаген, эпинефрин) снижена у новорожденных по сравнению со взрослыми [4] (таблица 6). По-видимому, это следствие сниженной функциональной активности тромбоцитов у новорожденных, показанной при

помощи проточной цитометрии. Исследования агрегации тромбоцитов у новорожденных практически не проводятся, поэтому данные о клинической эффективности данного теста в этой группе отсутствуют.

Таблица 6. Показатели стандартных тестов гемостаза у новорожденных

Пуповинная кровь	Периферическая кровь	Параметр	Сравнение со взрослыми	Достигает значений взрослых в течение
Стандартные тесты				
<i>Тромбоцитарное звено</i>				
<i>Агрегометрия:</i>				
x		с АДФ	Снижена до 60% нормы для взрослых	Нет данных
x		с коллагеном	Снижена до 80% нормы для взрослых	Нет данных
x		с тромбином	Снижена до 80% либо не отличается от нормы для взрослых	Нет данных
x		с арахидоновой кислотой	Не отличается от нормы для взрослых	Нет данных
x		с ристоцетином	Не отличается от нормы для взрослых или повышена	Нет данных
x		с эпинефрином	Снижена до 50–60% нормы для взрослых	Нет данных
<i>Плазменное звено</i>				
x		АЧТВ	Удлинено до 120–130% нормы для взрослых	От 6 мес. до 16 лет
x		ПВ	Удлинено до 120–130% нормы для взрослых	От 1 мес. до 16 лет
x		ТВ	Не отличается от нормы для взрослых либо слегка удлинено	-
<i>Фибринолиз</i>				
x		Концентрация D-димеров в плазме крови	Повышена до 800% нормы для взрослых	Снижаются до 120–140% нормы для взрослых в течение 1 мес.: могут оставаться повышенными до 16 лет

Оценку состояния плазменного звена гемостаза проводят путем измерения отдельно прокоагулянтных и антикоагулянтных компонентов при помощи тестов времен свертывания при добавлении различных активаторов. Основные тесты – протромбиновое, активированное частичное тромбопластиновое и тромбиновое времена (ПВ, АЧТВ, ТВ). Ни один из стандартных тестов в действительности не имитирует то, что происходит *in vivo*; эти тесты имеют свои ограничения, связанные с составом реагентов. В стандартных тестах используют крайне высокие концентрации активаторов свертывания, далекие от физиологических, что снижает чувствительность системы (тесты способны регистрировать только сильные сдвиги в системе). Точно так же ни антикоагулянтное действие антитромбина, ни протеина С не могут быть полностью имитированы *in vitro*, поскольку эти белки активируются *in vivo* тромбомодулином, расположенным на эндотелиальных клетках [3]. Реагенты и контрольные плазмы, используемые в наборах для измерения ПВ, АЧТВ и ТВ, не содержат достаточного количества таких активаторов. Таким образом, времена свертывания способны указывать на дефицит прокоагулянтных компонентов, но не способны показать, является ли дефицит прокоагулянтов в достаточной мере уравновешенным дефицитом антикоагулянтов. Времена свертывания, безусловно, эффективны при исследовании состояний, связанных с врожденными недостатками

прокоагулянтов (гемофилии, наследственные дефициты), но намного менее информативны в исследованиях состояний, характеризующихся наличием приобретенных дефицитов – одновременно и про-, и антикоагулянтов (в число которых входит и новорожденность). Так, даже у абсолютно здоровых новорожденных АЧТВ и ПВ длиннее примерно в 1,5 раза по сравнению с нормальным диапазоном у взрослых [3] (таблица 6). В большинстве клинических ситуаций такие показатели тестов стоило бы рассматривать как индикатор гипокоагуляционного состояния и предрасположенности пациента к кровоточивости. Однако, несмотря на существенное удлинение времен свертывания, частота кровотечений в популяции здоровых новорожденных крайне низка, что, как уже было сказано, среди всего прочего обусловлено дефицитом естественных антикоагулянтов, балансирующим дефицит прокоагулянтов. Помимо этого, концентрации и соотношение антикоагулянтов и прокоагулянтов различаются в зависимости от срока гестации и сопутствующих осложнений у новорожденного. Из-за невозможности оценки степени сбалансированности системы при помощи стандартных тестов, входящих в рутинную коагулограмму, лабораторная диагностика коагулопатий и предикция возможных тромбгеморрагических осложнений у новорожденных в настоящее время сильно затруднена. Концентрация

D-димеров в крови новорожденных существенно повышена сразу после рождения и имеет тенденцию к снижению в течение первого месяца жизни, однако может оставаться повышенной на протяжении всего периода детства (таблица 6). Это независимо подтверждают различные исследователи [5], однако объяснения этого явления по-прежнему остаются довольно спорными. Повышенное содержание продуктов деградации фибрина и высокая концентрация D-димеров наблюдаются у 65% здоровых младенцев с нормальными сроками гестации, предположительно, в ответ на родовой стресс или как ответ на перерезание пуповины. D-димеры – достаточно крупная молекула, поэтому трансплацентарный проход маловероятен. Другое возможное объяснение заключается в том, что D-димеры – индикаторы слабой активации свертывания вследствие сосудистых изменений, таких как закрытие венозного и артериального протоков после рождения. Еще один из предполагаемых механизмов – сниженный почечный клиренс D-димеров у новорожденных [4]. Таким образом, ориентация на показатели концентрации D-димеров при прогнозировании или диагностике тромбгеморрагических осложнений у новорожденных не надежна.

Глобальные тесты гемостаза.

Это новое поколение методов, разработанных с целью наиболее полной имитации условий свертывания *in vivo*, что делает эти тесты чувствительными к более широкому диапазону нарушений в системе гемостаза. Особенно важно применение глобальных тестов в ситуациях, когда происходит одновременное изменение концентрации многих составляющих системы свертывания. Например, в случае одновременного снижения концентрации факторов свертывания и ингибиторов. Так как цель тестов – наиболее полная имитация свертывания, то такие анализы часто одновременно учитывают как тромбоцитарный, так и плазменный гемостазы, поэтому строгого разделения не существует. Однако

некоторые из этих тестов более чувствительны к тромбоцитарным нарушениям, а другие – к плазменным.

Основные тромбоцитарные глобальные анализы на основе адгезии включают анализатор функций тромбоцитов (PFA) и различные проточные камеры. С помощью PFA оценивают первичный гемостаз *in vitro*, измеряя время, необходимое для того, чтобы цитратная кровь закрывала апертуру в мембране тестового картриджа, который покрыт различными агонистами тромбоцитов. Однако PFA фокусируется на адгезии тромбоцитов, не оценивая эффективность свертывания крови [5]. Каждый тест PFA состоит из двух измерений времени закрытия: одно – с коллагеном и эпинефрином в качестве активирующих агентов тромбоцитов (СТ-Ері), а другое – с коллагеном и АДФ (СТ-ADP).

Существует небольшое количество исследований PFA у новорожденных. Известно, что среднее время закрытия в образцах пуповинной крови значительно короче, чем в образцах взрослых и здоровых детей более старшего возраста (таблица 7) [6]. При этом времена закрытия в образцах периферической крови новорожденных достоверно длиннее, чем в пуповинной крови. Время закрытия СТ-Ері в образцах периферической крови новорожденных не отличается от этого показателя у взрослых, а СТ-ADP укорочено, но в меньшей степени, чем в пуповинной крови [7]. Предположительно, укорочение времен закрытия в тесте – это следствие более высоких концентраций vWF, более высокого гематокрита и более крупного среднего объема эритроцитов (MVC) в образцах новорожденных, которые в совокупности потенциально компенсируют гиподисфункциональность неонатальных тромбоцитов [5].

Проточные камеры обычно представляют собой устройства с микроскопическими каналами, в которых с помощью видеомикроскопии наблюдается адгезия тромбоцитов к поверхности, покрытой активатором (как правило, коллагеном) в условиях физиологического потока крови. На данный момент существует крайне мало исследований агрегации и адгезии тромбоцитов у новорожденных в условиях по тока. Результаты исследования S.M. Baker-Groberg с соавт. [12] (таблица 2) показывают, что в условиях потока агрегация и адгезия неонатальных и взрослых тромбоцитов на коллаген и vWF не отличаются.

Глобальные анализы плазменного гемостаза многочисленны и различны по своему дизайну. Один из способов характеристики образования сгустка – реометрия, которая имеет дополнительное преимущество: возможность применения в цельной крови. Тромбоэластография (ТЭГ)/тромбоэластометрия (ТЭМ) – наиболее ранние глобальные анализы гемостаза. В этих тестах образование сгустка и агрегацию тромбоцитов оценивают одновременно с использованием реометрии с вынужденными колебаниями.

Таблица 7. Показатели глобальных тестов гемостаза у новорожденных

Пуповинная кровь	Периферическая кровь	Параметр	Сравнение со взрослыми	Достигает значений взрослых в течение
Глобальные тесты				
<i>PFA</i>				
x	x	CT-Epi	Укорочено до 30–50% в образцах пуповинной крови, не отличается в образцах периферической крови	Нет данных
x	x	CT-ADP	Укорочено до 30–50% в образцах пуповинной крови, укорочено до 50–70% в образцах периферической крови	Нет данных
<i>Тромбоэластография/тромбоэластометрия (TEG/ROTEM)</i>				
x	x	R (CT)	Укорочено до 60–70% от нормы для взрослых	3 мес.
x	x	K (CFT)	Укорочено до 80–90% от нормы для взрослых либо не отличается	3 мес.
x	x	α	Не отличается от взрослых либо слегка увеличен	3 мес.
x	x	MA (MCF)	Не отличается от взрослых	–
<i>Тест генерации тромбина</i>				
x	x	ЭТП	Снижен до 50–70% от значений взрослых	От 3 мес. до 16 лет
x	x	ЭТП в присутствии тромбомодулина	Не отличается от взрослых	–
	x	Амакс	Снижен до 50–70% от значений взрослых	От 3 мес. до 16 лет
<i>Тромбодинамика</i>				
	x	Ttag	Не отличается от взрослых	Нет данных
	x	Vi	Увеличен до 130% от нормы для взрослых	Нет данных
	x	Vst	Увеличен до 140% от нормы для взрослых	Нет данных
	x	D	Не отличается от взрослых	Нет данных

На сегодняшний день это единственные глобальные тесты, которые широко используют в клинической практике благодаря тому, что их можно применять «у постели больного», а время ожидания ответа составляет порядка 10–15 мин (в отличие от большинства тестов, требующих времени для приготовления плазмы крови). Однако и эти тесты не лишены недостатков, основной из них – низкая чувствительность к прокоагулянтным нарушениям [8].

У новорожденных параметры ТЭГ сдвинуты в сторону гиперкоагуляции [9, 10], однако величины этих сдвигов незначительны (таблица 7). ТЭГ показывает хорошую чувствительность к кровотечениям у новорожденных [9], однако не существует исследований, посвященных предикции этих кровотечений при помощи данного теста.

Генерация тромбина, изобретенная в ее нынешнем виде группой Н.С. Hemker из Маастрихтского университета [5], использует тромбиночувствительный флюорогенный субстрат для определения концентрации тромбина в зависимости от времени. Кривая обычно имеет характерную колоколообразную форму. Корреляция параметров теста с клиническими проявлениями кровоточивости или тромбоза установлена, хотя проблемы стандартизации еще существуют. В настоящее время представлено множество модификаций генерации тромбина, включая несколько имеющихся в продаже версий.

У новорожденных параметры теста генерации тромбина сдвинуты в сторону гипокоагуляции (таблица 7) и могут оставаться сниженными в течение всего периода детства [3, 4, 5]. Тем не менее добавление в систему растворимого тромбомодулина, «включающего» работу протеина С, которая обычно не учитывается в лабораторных тестах, выравнивает значения взрослых и новорожденных [4]. Тромбоциты новорожденных, несмотря на свою гипореактивность, нормально поддерживают генерацию тромбина в богатой тромбоцитами плазме [12]. Таким образом, результаты теста генерации тромбина указывают на баланс между прокоагулянтными и антикоагулянтными компонентами системы гемостаза у здоровых новорожденных, который не может быть оценен с помощью стандартных тестов.

Тромбодинамика с помощью видеомикроскопии позволяет регистрировать образование фибринового сгустка, иницированного иммобилизованным на поверхности тканевым фактором. При этом сгусток первоначально формируется на активирующей поверхности, а затем распространяется в плазме. Такой подход позволяет учитывать пространственную гетерогенность свертывания крови *in vivo*, то есть тот факт, что начало и распространение свертывания происходит в пространственно-разделенных областях [5]. Этот тест показал высокую чувствительность к гипо- и гиперкоагулянтным нарушениям, а также к терапии антикоагулянтами [4, 5]. Модификация этого теста (тромбодинамика-4D) позволяет наравне с регистрацией фибрина проводить также регистрацию генерации тромбина [6]. Этот тест пригоден для работы с богатой тромбоцитами плазмой и чувствителен к снижению концентрации тромбоцитов и нарушению их функции [7]. Скоростные параметры тромбодинамики у новорожденных сдвинуты в сторону гиперкоагуляции (таблица 7); в целом это коррелирует с данными ТЭГ. Пока не ясны механизмы, обуславливающие эту гиперкоагуляцию. Не ясна также клиническая информативность этого теста у данной группы пациентов. Для выяснения клинической информативности требуются дальнейшие исследования с клиническими исходами.

Заключение

Несмотря на количественные и качественные отличия практически всех параметров системы гемостаза от тех же параметров у взрослых, здоровые новорожденные в целом имеют клинически нормальный функциональный гемостаз без тенденции к коагулопатии или тромбозу.

Рисунок

«Баланс» системы гемостаза у новорожденного

	ТРОМБОТИЧЕСКИЙ РИСК	ГЕМОРРАГИЧЕСКИЙ РИСК
Тромбоцитарное звено	<ul style="list-style-type: none">• Повышенная концентрация фактора фон Виллебранда	<ul style="list-style-type: none">• Сниженная функциональная активность тромбоцитов• Сниженный размер тромбоцитов
Плазменное звено	<ul style="list-style-type: none">• Сниженные концентрации ингибиторов свертывания	<ul style="list-style-type: none">• Сниженные концентрации факторов свертывания
Фибринолиз	<ul style="list-style-type: none">• Сниженные концентрации активаторов фибринолиза• Повышенные концентрации ингибиторов фибринолиза	<ul style="list-style-type: none">• Повышенные концентрации продуктов деградации фибрина
Сосудистое звено	<ul style="list-style-type: none">• Повышенные концентрации маркеров активации сосудистого эндотелия	<ul style="list-style-type: none">• Наличие хрупких васкуляризованных областей (у недоношенных новорожденных)• Нестабильная гемодинамика

Сниженные концентрации факторов свертывания компенсируются сниженными концентрациями ингибиторов; сниженная функциональная активность тромбоцитов, возможно, компенсируется повышенной концентрацией vWF и т.д., что приводит нас к мысли, что система гемостаза новорожденных находится в некотором «балансе», который отличается от «баланса» гемостаза у взрослых и характеризуется наличием множества компенсатор механизмов, которые еще до конца не изучены (см. рисунок). Наличие возрастных различий в параметрах системы гемостаза вообще не понятно по своей природе, с точки зрения чисто функции свертывания. Одна из гипотез, объясняющих смысл «развивающегося гемостаза», заключается в том, что изменения, связанные с возрастом, необходимы, учитывая альтернативные функции некоторых коагуляционных белков. Например, было показано, что антитромбин обладает противовоспалительной, противовирусной и антиангиогенной активностью [8, 9]. Снижение производства плазменного антитромбина в течение первых нескольких месяцев жизни может относиться, например, к контролю ангиогенеза, и следовательно, компенсационные изменения, такие как увеличение альфа-2-макроглобулина, требуются системе свертывания для поддержания эффективной регуляции тромбина. Кроме того, низкий внутриматочный уровень витамина К может быть полезен для развивающегося эмбриона. Уменьшение синтеза витамина К-зависимого фермента остеокальцина, который является промотором хрящевой минерализации, предотвращает преждевременное созревание хрящей плода [6]. На сегодняшний день отсутствует доказательная база, которая позволила бы четко объяснить физиологический смысл изменений, которые претерпевает система гемостаза в течение первого года жизни.

Тем не менее, вопрос о том, насколько устойчив альтернативный баланс, устанавливающийся между прокоагулянтными и антикоагулянтными элементами системы свертывания новорожденных, остается открытым. Несмотря на крайне низкую частоту спонтанных тромбозов и кровотечений у здоровых доношенных новорожденных, наличие сопутствующих осложнений (недоношенности, воспалительных процессов) резко увеличивает риски тромботических и геморрагических осложнений в данной группе. При этом существенные различия в параметрах системы гемостаза внутри групп с осложнениями (например, между недоношенными разных сроков гестации) делают лабораторную диагностику нарушений гемостаза у таких пациентов, а также профилактику и лечение тромбогеморрагических осложнений достаточно нетривиальной задачей из-за невозможности создания универсальной схемы диагностики и терапии.

Нормальные значения рутинных тестов гемостаза у новорожденных сильно отличаются от таковых у взрослых. В основном это связано с тем фактом, что рутинные тесты рассматривают отдельные элементы системы гемостаза или отдельные функциональные связки элементов, не принимая во внимание поведение системы в целом. С одной стороны, это облегчает лечащему врачу понимание, в каком именно месте системы искать «поломку», но с другой стороны, в присутствии взаимокомпенсирующих сдвигов прокоагулянтных и антикоагулянтных элементов (как в случае с новорожденными) такой подход может привести к ложным или взаимоисключающим выводам. Уже сегодня можно говорить о высоком потенциале глобальных тестов для диагностики сложных коагулопатий с вовлечением различных звеньев системы гемостаза. Однако внедрение глобальных тестов в рутинную клиническую практику в неонатологии требует проведения большего количества клинических исследований, а также повышения квалификации медицинского персонала. Для новорожденных, баланс гемостаза которых отличается от такового у взрослых даже в норме, применение глобальных тестов может решить проблему неинформативности стандартных тестов в области предикции тромбогеморрагических осложнений, а также контроля антикоагулянтной и прокоагулянтной терапии.

Список литературы

1. Szpecht D., Szymankiewicz M., Nowak I., Gadzinowski J. Intraventricular hemorrhage in neonates born before 32 weeks of gestation-retrospective analysis of risk factors. *Childs Nerv Syst* 2016; 32: 1399–404.
2. Bhat R., Monagle P. The preterm infant with thrombosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012; 97: F423–8.
3. Veldman A., Nold M.F., Michel-Behnke I. Thrombosis in the critically ill neonate: incidence, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 1337–48.
4. Yum S.K., Moon C.-J., Youn Y.-A., Lee H.S., Kim S.-Y., Sung I.K. Risk factor profile of massive pulmonary haemorrhage in neonates: the impact on survival studied in a tertiary care centre. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016; 29: 338–43.
5. Toulon P. Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. *Int J Lab Hematol* 2016; 38: 66–77.
6. Gitlin D., Biasucci A. Development of gamma G, gamma A, gamma M, beta IC-beta IA, C 1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomucoid, betalipoprotein, alpha 2-macroglobulin, and prealbumin in th. *J Clin Invest* 1969; 48: 1433–46.
7. Sola-Visner M. Platelets in the neonatal period: developmental differences in platelet production, function, and hemostasis and the potential impact of therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 2012: 506–11.
8. Zilliacus H., Ottelin A.M., Mattsson T. Blood clotting and fibrinolysis in human fetuses. *Biol Neonat* 1966;10: 108–12.
9. Reverdiau-Moalic P., Delahousse B., Body G., Bardos P., Leroy J., Gruel Y. Evolution of blood coagulation activators and inhibitors in the healthy human fetus. *Blood* 1996; 88: 900–6.
10. Jaffray J., Young G. Developmental hemostasis. clinical implications from the fetus to the adolescent. *Pediatr Clin North Am* 2013;60: 1407–17.
11. Walka M.M., Sonntag J., Dudenhausen J.W., Obladen M. Thrombopoietin concentration in umbilical cord blood of healthy term newborns is higher than in adult controls. *Biol Neonate* 1999; 75: 54–8.
12. Ferrer-Marin F., Liu Z.J., Gutti R., Sola- Visner M. Neonatal Thrombocytopenia and Megakaryocytopoiesis. *Semin Hematol* 2010; 47: 281–8.