

• 综 述 •

血栓弹力图、凝血酶生成试验和血栓动力学分析研究进展*

薛雨佳 综述,李子坚[△] 审校

兰州大学第一临床医学院,甘肃兰州 730000

摘 要:在静脉血栓栓塞及血小板减少等疾病中,出血与血栓形成是造成患者死亡的重要原因。因此,及时评估出血及血栓形成的风险和监测抗凝药物或止血药物的治疗效果就变得至关重要。传统的凝血检测指标[活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、国际标准比值(INR)]不能全面地反映体内凝血过程,因而不能可靠地用于预测体内的出血、凝血情况。全凝血试验如血栓弹力图、凝血酶生成试验和血栓动力学分析因可以反映凝血全过程,被认为较传统凝血试验能更有效评估出血及血栓形成风险。本文对血栓弹力图、凝血酶生成试验和血栓动力学分析 3 种全凝血试验的原理进行综述,阐述其与传统凝血试验相比的优势,以及目前存在的局限性,以期最大限度地发挥临床应用价值。

关键词:凝血检测; 血栓弹力图; 凝血酶生成试验; 血栓动力学分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.11.021

中图法分类号:R446

文章编号:1673-4130(2022)11-1379-04

文献标志码:A

Research progress on thrombelastography, thrombin generation test and thrombodynamics assay*

XUE Yujia, LI Zijian[△]

First School of Clinical Medicine, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China

Abstract: Hemorrhage and thrombosis are the important causes of death in the diseases such as venous thromboembolism and thrombocytopenia. Therefore, timely assessment of the risk of bleeding and thrombosis and monitoring of the therapeutic efficacy of anticoagulants or hemostatic drugs are of great importance. The traditional coagulation test indicators (APTT, PT, INR) cannot fully reflect the whole process of blood coagulation in vivo, and therefore cannot be used to reliably predict the bleeding and blood coagulation situation in vivo. The total coagulation assay, such as thromboelastography, thrombin generation test and thrombodynamics assay, are considered to be more effective than traditional coagulation tests in assessing the risk of bleeding and thrombosis because they can reflect the whole process of coagulation. This paper reviews the principles of the above three kinds of total coagulation tests, and elaborates their advantages than the traditional coagulation tests and current existing limitations so as to maximize their clinical application value.

Key words: coagulation tests; thrombelastography; thrombin generation test; thrombodynamics assay

在生理状态下,人体内的止血过程是通过维持血管内皮上血小板的黏附和聚集、凝血反应、纤溶以及抗纤溶机制激活之间的平衡来实现的,打破这种微妙的平衡可能导致血栓形成或出血^[1]。目前,临床上最常用的评估出血及血栓形成风险的试验指标为活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、国际标准比值(INR),这些指标反映血栓形成的初始阶段,然而 95% 的凝血酶生成发生在这一步之后^[2]。也就是说,传统的检测结果只评估凝血反应的开始阶

段,而在血凝块形成和最大凝血酶生成方面是无法准确反映的。因此,对凝血系统进行更全面的评估,包括对凝血反应最终产物的分析,如凝血酶和纤维蛋白的生成与降解^[3],便于研究者更加准确地预测出血及血栓形成风险。

理想的评估血栓形成和出血风险的试验应该是可靠、可重复、简便且快速的。此外,还应考虑体内血流条件与内皮之间的相互作用、血小板作用以及人体生理条件,如 pH 值和温度等^[4]。目前这种理想状态

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81300427)。

[△] 通信作者, E-mail: ldyj_lizj@lzu.edu.cn.

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220506.1134.002.html\(2022-05-07\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220506.1134.002.html(2022-05-07))

下的凝血检测方法还不存在,但是近年来已经有至少部分满足这些要求的实验室检测方法,即血栓弹力图(TEG)^[5]、凝血酶生成试验(TGT)^[6]和血栓动力学分析(TD)^[7]等凝血检测方法。

1 TEG

TEG 是一种可以动态反映血液凝固变化的测试方法,包括检测纤维蛋白的形成速度、溶解状态和凝块的坚固性。TEG 检测设备主要组成部分为振荡加热杯和自由悬挂的探针,将全血与探针均放置于试验杯内,并使试验杯以 $4^{\circ}45'$ 来回摆动。当血凝块开始形成时,探针和杯壁间逐渐产生阻力,且血液标本中生成的纤维蛋白会黏附于探针,进一步产生阻力,从而会影响探针的活动^[8-9]。探针在血液凝固的过程中随着阻力的不断改变而旋转,从而产生不断变化的电流信号,信号经过电脑软件的处理后形成相应的曲线,进而获得 TEG 的一系列参数。

TEG 的检测类型主要包括普通 TEG、肝素酶对比检测和血小板图等。不同的检测类型通过使用不同的抗凝剂和激活剂得到相应的检测结果。在现有的研究中,TEG 已被证明适用于指导成分输血^[10],以及心脏手术^[11]和肝移植后的凝血状态监测^[12-13];同时对于严重创伤导致凝血功能障碍的患者,TEG 可用于指导其使用凝血因子浓缩物的替代治疗^[14]。根据 TEG 的结果来指导血制品输注,可在不增加出血风险的情况下减少新鲜冰冻血浆及血小板的输注量,也可以节约血制品的使用从而减少输血相关风险^[8]。

但是,TEG 也有其局限性。一方面,TEG 可以模拟血管中血液流动情况,但当患者血管壁受损,或伴有遗传或药物诱导的血小板功能障碍时,TEG 无法反映血小板的黏附及血小板与血管内皮细胞之间的相互作用对凝血功能的影响;另一方面,TEG 对检测血管性血友病因子(vWF)及凝血因子ⅩⅢ(FⅩⅢ)的作用不敏感,而 vWF 与血栓形成的启动有关^[4],FⅩⅢ是构成稳定的纤维蛋白凝块所必需的凝血因子^[15]。最后,TEG 的检测温度通常是 37°C ,但部分外科手术需在低体温下进行,从而使 TEG 无法检测处于低体温状态患者的凝血情况,尽管可以对血液标本进行温度调整,但温度仍会对 TEG 的结果产生影响。目前 TEG 虽已广泛应用于临床,但各个地区仍没有统一的正常值范围,同时因为影响因素较多,给最终临床评估也带来一定的难度,仍需不断地研究及实践来完善和改进。

2 TGT

凝血酶是凝血级联反应的关键酶,凝血酶的生成量直接反映了机体的凝血功能^[16]。TGT 是一种实时监测凝血酶生成的试验,能够全面地反映机体凝血酶

生成状况。其主要原理为向血浆中加入激活剂(如组织因子)来模拟血管壁损伤,同时加入凝血酶的荧光底物,当激活剂启动凝血反应生成凝血酶时,凝血酶便与底物反应产生荧光^[17-18],将检测到的荧光信号通过相应软件换算为凝血酶生成量,从而得到一条凝血酶生成曲线。与常规凝血检测相比,凝血酶生成试验有以下优点:(1)常规的凝血试验只能检测从凝血反应开始到纤维蛋白形成这一段时间,并不能反映后续的凝血通路的级联反馈过程,也无法在低纤维蛋白血症时反映凝血酶的活性,而 TGT 不仅可以检测凝血反应开始到结束这一过程中凝血酶的初始生成时间及量,同时可以检测凝血酶的实时生成量,且不受纤维蛋白形成的影响^[19];(2)通过使用合适的凝血激动剂,可以检测不同病理生理状态下患者血液的凝血酶生成量,评估患者的血栓形成风险或出血风险,并可以对患者进行个体化治疗,如对于血友病 A 的患者,检测其凝血酶生成量比检测 FⅧ活性更能明确患者病情严重程度及出血风险^[20];(3)TGT 也可用于替代治疗和抗凝剂抗凝效果的监测^[21]。

然而,TGT 也有其局限性。TGT 是在血浆中进行的,这就需要一定时间来制备合适的血浆,因此该方法不适用于快速诊断。此外,该检测方法的变量和正常值目前还没有标准化,如缺乏触发物质的种类及数量的参考范围,在是否需要使用接触激活途径的抑制剂(如玉米胰蛋白酶抑制剂)等方面仍具有争议^[2,22]。目前关于 TGT 最新的进展为全血凝血酶检测,它允许使用红细胞和其他血细胞共同存在的全血进行检测,由于血细胞参与体内凝血,而在血浆凝血酶生成检测中红细胞的作用无法被反映出来,因此在对体内凝血过程的还原度上,全血凝血酶分析可能较血浆凝血酶生成更有优势。另外,使用全血可以节省时间,不需要血液离心的步骤,这会加速试验分析,使其便于快速诊断^[23]。然而这些仍然处于基础研究阶段,还需要大量的临床数据来支持,这使得 TGT 应用于临床可能还需要一个漫长的时间。

3 TD

凝血级联反应在受损的血管表面被激活,同时可传播到相应的血管腔内,可见人体内的血液凝固过程不仅是随着时间的延长而发展,在空间上也有相应的改变^[24]。TD 作为一种新的凝血检测方法,与之前的凝血检测方法不同之处就在于,TD 模拟血管中凝血的空间分布特性,评估血凝块生长的空间动力学^[25],并且该试验对低凝及高凝状态均高度敏感^[26]。这种检测方法在与 APTT 试验类似的再钙化的血浆中进行。但是,与检测 APTT 时促凝物质与血浆均匀混合的反应状态不同,TD 检测到的凝血过程是由固定在

反应容器一端的接触标本的薄层接触面中低浓度 (100 pmol/m^2) 组织因子 (TF) 触发, 并传播到不含 TF 的血浆标本中, 这与人体内局部血管损伤后的凝血过程更加接近。同时凝块形成和传播的过程被一台每 15 秒拍摄一张照片的光散射相机记录下来, 得到一条纤维蛋白凝块的生长曲线^[27-28]。

相比于 TEG 和 TGT 两种检测方法, TD 的优点在于 TD 特有的检测方法更能体现人体生理状态下凝血因子活化的情况, 同时其对使用抗凝药物如肝素的患者来说, 在评估出血及血栓形成风险上更有优势。在一项关于使用 TD 检测不同浓度肝素存在时人体凝血效率的研究中, 便证明了 TD 的优点为它测量的是患者体内药物的实际抗凝活性, 而不是肝素在血液中的浓度^[25], 并且该试验的参数在不同年龄及性别的人群中无明显差异, 表明 TD 是一种稳定性好、重复度高和敏感性佳的试验, 且具有集中的参数分布, 能够准确地描述所有种类肝素的药效学, 其对肝素的敏感性高于 APTT, 与 TGT 和 TEG 相当或更高^[25, 29]。同时, TD 也可以用于检测血小板在凝血中的作用。在一项研究中, 使用 TD 来评估加入活化血小板或血小板微粒 (PMPs) 后血浆中凝块的形成效率, 与无血小板血浆相比, 加入活化血小板或 PMPs 后加速了凝块生长速度, 在同一研究中, TGT 提供了证据证明在血浆中加入活性血小板或 PMPs 可加速凝血起始时间, 并增加了最大的凝血酶生成量^[30], 这提示 TD 在临床上可用于指导血小板减少患者是否需要输注血小板预防出血。

有研究将 TD 与 D-二聚体测定法比较, 以评估脓毒症患者的高凝状态, 结果表明 D-二聚体水平仅在血栓形成后升高, 而 TD 在血栓发生前 1 d 便证实了血液的高凝状态, 并且此时的 APTT 和 PT 均在正常范围内^[26]。在显示高凝的标本中, 有 99% 伴有远离接触面未接触薄层 TF 活化剂的自发凝块形成。这种自发的血栓形成可能是炎性反应导致可溶性 TF 释放至血浆标本中引起的继发性血液凝固, 与严重炎性反应所导致的高凝状态一致。这似乎表明 TD 在血栓形成前便可预测患者体内是否处于高凝状态, 从而指导临床抗凝策略。但是, 目前 TD 仍主要在体外凝血功能检测的基础研究中使用, 仍需要更多的相关临床研究来确定该方法实际的临床应用价值。

4 小 结

相比于传统的实验室凝血检测, 新的凝血检测方法分别从凝血酶生成量、纤维蛋白凝块的生成及溶解等方面较为全面地评估人体内血液凝固情况, 在诊断出血性疾病和监测止血或抗凝治疗效果方面显示了相当可观的临床应用潜力。TEG 可能特别适用于急

性出血, 能够对血小板与凝血级联之间的相互作用进行全面评估, 比传统试验具有更加全面、直观、快速等优点, 因此已被广泛应用于临床凝血功能状态的监测, 能够较好地指导血浆等血制品的替代治疗方案, 并显示出较好的效益风险优势。TGT 作为监测止血治疗的工具可能具有更好的临床价值, 然而还需要提高其准确性以及检测和结果判读方法的标准化, 同时需要更多的临床研究数据来证实其潜在应用价值。TD 在理论上讲是目前最能还原人体内血液凝固过程的检测方法, 它并非对血液凝固过程中某一特定指标进行检测, 而是评估整体凝血情况并可以监测血小板与凝血因子间的相互作用, 同时也可以对体内高凝状态进行准确评估。在这些检测方法中, 除了 TEG 外, TGT 和 TD 目前仍是进行凝血基础研究的主要工具, 但尚未对不同人群、不同类型疾病等进行大样本临床验证。因此, 这些新技术临床诊断性能的普适性尚需进一步深入探讨。只有充分研究每一个新技术的检测原理、优缺点及适用范围, 才能对其做到合理应用, 最大限度地发挥其价值, 以进一步发展为诊断、监测和评判血栓与出血性疾病预后的可靠工具。

参考文献

- [1] O'DONNELL J S, O'SULLIVAN J M, PRESTON R. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis [J]. Br J Haematol, 2019, 186(1): 24-36.
- [2] DARGAUD Y, WOLBERG A S, LUDDINGTON R, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study [J]. Thromb Res, 2012, 130(6): 929-934.
- [3] LIM H Y, O'MALLEY C, DONNAN G, et al. A review of global coagulation assays: is there a role in thrombosis risk prediction? [J]. Thromb Res, 2019, 179: 45-55.
- [4] LANCÉ M D. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis [J]. Thromb J, 2015, 13: 1.
- [5] SHENOY A, INTAGLIATA N M. Thromboelastography and utility in hepatology practice [J]. Clin Liver Dis, 2020, 16(4): 149-152.
- [6] TALON L, SAPIN A F, FOURNEYRON V, et al. Study of thrombin generation in healthy children [J]. Anna Biol Clin, 2020, 78(6): 629-638.
- [7] LIPETS E N, ANTONOVA O A, SHUSTOVA O N, et al. Use of thrombodynamics for revealing the participation of platelet, erythrocyte, endothelial, and monocyte microparticles in coagulation activation and propagation [J]. PLoS One, 2020, 15(5): e0227932.

- [8] 杨建业,秦磊磊,李飞龙,等.血栓弹力图临床应用的研究进展[J].重庆医学,2020,49(1):149-154.
- [9] FERNANDES J C. Thromboelastography: clinical application, interpretation, and transfusion management [J]. AANA J, 2016, 84(2):129-134.
- [10] SCHMIDT A E, ISRAEL A K, REFAAI M A. The utility of thromboelastography to guide blood product transfusion[J]. Am J Clin Pathol, 2019, 152(4):407-422.
- [11] FLEMING K, REDFERN R E, MARCH R L, et al. TEG-directed transfusion in complex cardiac surgery: impact on blood product usage [J]. J Extra Corpor Technol, 2017, 49(4):283-290.
- [12] KATSANOULAS K, GEORGOPOULOU E, MARKOPOULOS I, et al. Thromboelastometry-based algorithm and transfusion management during orthotopic liver transplantations[J]. Eur J Anaesthesiol, 2021, 38(4):444-446.
- [13] SAKAI T. Viscoelastic testing in liver transplantation[J]. Transfusion, 2020, 60 Suppl 6:S61-S69.
- [14] SCHÖCHL H, NIENABER U, HOFER G, et al. Goal-directed coagulation management of major trauma patients using thromboelastometry (ROTEM)-guided administration of fibrinogen concentrate and prothrombin complex concentrate[J]. Crit Care, 2010, 14(2):R55.
- [15] PITKÄNEN H H, JOUPPILA A, LEMPONEN M, et al. Factor XIII deficiency enhances thrombin generation due to impaired fibrin polymerization: an effect corrected by Factor X III replacement[J]. Thromb Res, 2017, 149:56-61.
- [16] NEGRIER C, SHIMA M, HOFFMAN M. The central role of thrombin in bleeding disorders[J]. Blood Rev, 2019, 38:100582.
- [17] PANOVA-NOEVA M, MEIJDEN P, CATE H T. Clinical applications, pitfalls, and uncertainties of thrombin generation in the presence of platelets[J]. J Clin Med, 2019, 9(1):92.
- [18] DUARTE R C F, FERREIRA C N, RIOS D R A, et al. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations[J]. Rev Bras Hematol Hemoter, 2017, 39(3):259-265.
- [19] TRIPODI A. Usefulness of thrombin generation[J]. Hamostaseologie, 2020, 40(4):509-514.
- [20] DAVE R G, GEEVAR T, MAMMEN J J, et al. Clinical utility of activated partial thromboplastin time clot waveform analysis and thrombin generation test in the evaluation of bleeding phenotype in Hemophilia A[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2021, 64(1):117-122.
- [21] ARTANG R, ANDERSON M, RILEY P, et al. Assessment of the effect of direct oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and apixaban in healthy male volunteers using a thrombin generation assay[J]. Res Pract Thromb Haemos, 2017, 1(2):194-201.
- [22] LJUNGKVIST M, STRANDBERG K, BERNTORP E, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation using the calibrated automated thrombogram: a nordic study[J]. Haemophilia, 2019, 25(2):334-342.
- [23] WAN J, KONINGS J, YAN Q, et al. A novel assay for studying the involvement of blood cells in whole blood thrombin generation[J]. J Thromb Haemost, 2020, 18(6):1291-1301.
- [24] KUPRASH A D, SHIBEKO A M, VIJAY R, et al. Sensitivity and robustness of spatially dependent thrombin generation and fibrin clot propagation [J]. Biophys J, 2018, 115(12):2461-2473.
- [25] SINAURIDZE E, VUIMO T, TARANDOVSKIY I D, et al. Thrombodynamics, a new global coagulation test: measurement of heparin efficiency [J]. Talanta, 2018, 180:282-291.
- [26] SOSHITOVA N P, KARAMZIN S S, BALANDINA A N, et al. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2012, 23(6):498-507.
- [27] TUKTAMYSHOV R, ZHDANOV R. The method of in vivo evaluation of hemostasis: spatial thrombodynamics [J]. Hematology, 2015, 20(10):584-586.
- [28] ROULLET S, LABROUCHE S, FREYBURGER G. Fibrinolysis during liver transplantation: analysis by the thrombodynamics method [J]. J Clin Pathol, 2019, 72(9):636-638.
- [29] BALANDINA A N, SEREBRIYSKIY I I, POLETAEV A V, et al. Thrombodynamics: a new global hemostasis assay for heparin monitoring in patients under the anticoagulant treatment [J]. PLoS One, 2018, 13(6):e0199900.
- [30] LIPETS E N, ANTONOVA O A, SHUSTOVA O N, et al. Use of thrombodynamics for revealing the participation of platelet, erythrocyte, endothelial, and monocyte microparticles in coagulation activation and propagation [J]. PLoS One, 2020, 15(5):e0227932.

(收稿日期:2021-11-12 修回日期:2022-02-28)