

616.151.5
D-64

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА

В.В. Долгов

Т.В. Вавилова

П.В. Свирин



ФГБОУ ДПО «РОССИЙСКАЯ
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
НЕПРЕРЫВНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Эл.В.
ФГБУ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
им. В.А. АЛМАЗОВА»
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



УТВЕРЖДЕНО
учебно-методическим советом
ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России
(Протокол № 1 от 28 января 2019 г.)

В.В. ДОЛГОВ, Т.В. ВАВИЛОВА, П.В. СВИРИН

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ



МОСКВА 2019

ILMIY-TIBBIY
ADABIYOTLAR

TOSHKENT TIBBIYOT
AKADEMIYASI
№ 45840

ДОЛГОВ

Владимир Владимирович

Профессор, д. м. н., заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ, Москва

ВАВИЛОВА

Татьяна Владимировна

Профессор, д. м. н., зав. кафедрой лабораторной медицины и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, врач-гематолог СПб ГБУЗ «Городской консультативно-диагностический центр № 1», Санкт-Петербург

СВИРИН

Павел Вячеславович

Врач-гематолог высшей категории отделения гематологии Морозовской детской городской клинической больницы, Москва

УДК 616.151.5

ББК 54.11

Д64

Рецензенты

А.М. Иванов – член-корреспондент РАН, профессор, зав. кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова»

С.Н. Шатохина – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»

В.Л. Эмануэль – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики, директор научно-методического центра по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

Долгов В.В., Вавилова Т.В., Свири П.В.

Д64 Лабораторная диагностика нарушений гемостаза: учебно-методическое пособие. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2019. – 400 с. ISBN 978-5-94789-877-4

Учебно-методическое пособие создано согласно учебному плану и программе подготовки врачей клинической лабораторной диагностики в ординатуре и на профильных циклах повышения квалификации. В настоящем пособии состояние свертывающей системы крови рассматривается с разных позиций: общих биологических закономерностей функционирования многокомпонентных систем, патофизиологических механизмов нарушений процесса свертывания крови, строения и функции отдельных компонентов системы гемостаза, методологических подходов, приборного обеспечения, стандартизации, контроля качества. Особенность пособия – изложение алгоритмов лабораторного сопровождения нозологических форм патологии и контроля эффективности лечения. Изложение материала сопровождается клиническими примерами. Материал подобран на основе многолетнего опыта преподавания вопросов лабораторной диагностики нарушений гемостаза на кафедрах клинической лабораторной диагностики и практического диагностического опыта специалистов, работающих в клиниках со взрослыми пациентами и детьми.

Пособие предназначено для специалистов клинической лабораторной диагностики, врачей клинических отделений, заинтересованных в лабораторной диагностике системы гемостаза, а также студентов медицинских вузов.

© В.В. Долгов, Т.В. Вавилова,
П.В. Свири, 2019

© Оформление
ООО «Издательство «Триада», 2019

ISBN 978-5-94789-877-4

ББК 54.11

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	9
ВВЕДЕНИЕ	12
Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА	13
<i>В.В. Долгов, Т.В. Вавилова, П.В. Свириг</i>	
Общее представление о гемостазе, гемостатический баланс	13
Принципы организации системы гемостаза	16
Принцип контактной активации	17
Принцип протеолитической активации.....	20
Принцип защитного ингибирования	24
Принцип каскадного усиления сигнала	27
Принцип комплексного участия.....	29
Принцип обратной связи	30
Принцип избыточности.....	36
Принцип сетевого реагирования	38
Современная модель свертывания крови.....	40
Вопросы к главе 1.....	41
Тесты к главе 1.....	42
Глава 2. СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ	46
<i>В.В. Долгов, Т.В. Вавилова, П.В. Свириг</i>	
Структура и функции эндотелия сосудистой стенки.....	46
Антикоагулянтная активность интактного эндотелия	48
Прокоагулянтная роль эндотелия, регуляция сосудистого тонуса	51
Субэндотелий	53
Компоненты субэндотелиальных структур, участвующие в гемостазе	54

Тромбоциты	57
Структура тромбоцитов	58
Тромбоцитарные факторы	66
Функции тромбоцитов	68
Молекулы адгезии	70
Активация тромбоцитов	73
Вопросы к главе 2	76
Тесты к главе 2	76
 Глава 3. ПЛАЗМЕННАЯ СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА	 80
<i>В.В. Долгов, Т.В. Вавилова, П.В. Свирин</i>	
Плазменные компоненты (факторы) свертывания	80
Витамин-К-зависимые белки	82
Неферментные активаторы свертывания крови	83
Коагуляционный каскад активации протромбиназы	84
Внешний путь образования протромбиназы	84
Внутренний путь образования протромбиназы	85
Конечный этап свертывания плазмы – образование фибринового сгустка	88
Антикоагулянты	93
Ингибиторы ферментов системы гемостаза	93
Ингибиторы коферментов	98
Ингибиторы активных комплексов	101
Система фибринолиза	102
Компоненты фибринолиза	103
Механизмы активации фибринолиза	106
Ингибиторы фибринолиза	109
Продукты деградации фибрина/фибриногена и D-димеры	112
Плазмин-независимый фибринолиз	114
Вопросы к главе 3	114
Тесты к главе 3	115

Глава 4. ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА	118
--	------------

В.В. Долгов, Т.В. Вавилова, П.В. Свирин, А.И. Мининкова

Преаналитический этап	118
Подготовка пациента к исследованию свертывания крови	118
Взятие крови	120
Подбор антикоагулянтов	125
Обработка крови перед исследованием	131
Приборное и методическое обеспечение исследований гемостаза	139
Агрегометры	139
Коагулометры	148
Автоматизированные системы исследования гемостаза	155
Методы оценки состояния компонентов гемостаза	157
Обеспечение качества лабораторной оценки системы гемостаза	164
Стандартизация коагулологических исследований	164
Калибраторы и контрольные материалы	169
Внутрилабораторный контроль качества	172
Внешняя оценка качества	175
Вопросы к главе 4	176
Тесты к главе 4	178

Глава 5. ТЕСТЫ ОЦЕНКИ ГЕМОСТАЗА	182
--	------------

В.В. Долгов, Т.В. Вавилова, П.В. Свирин

Методы оценки тромбоцитарного гемостаза	182
Время кровотечения	182
Тромбоцитарные показатели на гематологических анализаторах	183
Показатели функциональной активности тромбоцитов	186
Тесты оценки плазменного гемостаза	192
Скрининговые методы оценки плазменного гемостаза	192

Дополнительные тесты для оценки плазменного гемостаза.....	206
Принцип дифференцирования истинного дефицита факторов и действия ингибиторов	208
Определение антикоагулянтов	211
Определение показателей системы протеина С.....	211
Определение плазменного антитромбина.....	217
Тесты для исследования фибринолитической системы	218
Спонтанный зуглобулиновый лизис.....	220
Определение компонентов фибринолиза	221
Глобальные тесты исследования гемостаза	222
Тромбоэластометрия	222
Тест генерации тромбина	227
Тромбодинамика	231
Сравнительная характеристика глобальных тестов.....	233
Тесты научного поиска патологии плазменного гемостаза	233
Маркеры активации свертывания крови	238
D-димеры	239
Фактор Виллебранда	241
Тесты научного поиска тромботических заболеваний	244
Вопросы к главе 5	251
Тесты для главы 5	252
 Глава 6. ПАТОЛОГИЯ ГЕМОСТАЗА	 256
<i>В.В. Долгов, Т.В. Вавилова, П.В. Свирин, О.В. Сироткина, В.В. Самойленко</i>	
Задачи лабораторной службы при ведении пациентов с подозрением на нарушения системы гемостаза	258
Лабораторный скрининг	260
Алгоритмы развернутой оценки критических звеньев нарушения свертывания крови.....	265
Наследственные геморрагические заболевания.....	267
Гемофилия А.....	267

Гемофилия В	275
Редкие наследственные геморрагические заболевания.....	278
Афибриногенемия, гипофибриногенемия и дисфибриногенемии.....	285
Дефицит факторов контактной активации	287
Врожденные нарушения тромбоцитов	288
Болезнь Виллебранда	292
Приобретенные нарушения гемостаза.....	302
Иммунные тромбоцитопении	303
Неиммунные тромбоцитопении	312
Приобретенный дефицит факторов свертывания крови	316
Нарушения гемостаза, связанные с заболеваниями печени.....	318
Гиперактивация фибринолиза	320
Кровотечения, связанные с патологией сосудов	321
Сосудистые аномалии	321
Врожденная геморрагическая телеангиэктазия (болезнь Рэндю–Ослера–Вебера).....	322
Нарушения свертывания крови, связанные с массивной кровопотерей	322
Нарушения гемостаза, связанные с патологией почек.....	323
Амилоидоз	324
Тромботические заболевания	324
Тромбозы глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии.....	324
Тромбоцитоз.....	329
Тромбофилии	331
Генетическая диагностика тромбофилий и тромбозов	342
Антифосфолипидный синдром	349
Синдром ДВС.....	356
Вопросы к главе 6	371
Тесты для главы 6	371

Глава 7. ПРИНЦИПЫ И ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ	375
---	------------

Т.В. Вавилова, В.В. Долгов

Антитромботические средства	375
Лабораторный контроль гепаринотерапии	377
Контроль за лечением антагонистами витамина К	380
Контроль за лечением пероральными антикоагулянтами – прямыми ингибиторами факторов Ха и IIa	386
Лабораторный контроль за терапией антиагрегантами.....	389
Лабораторный контроль за лечением фибринолитическими препаратами	390
Вопросы к главе 7.....	392
Тесты для главы 7	393

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА	396
--	------------

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТЫ	397
---------------------------------	------------

Список сокращений

ABK	антивитамин К препараты
aKЛ	антитела к кардиолипину
α_2 -АП	α_2 -антиплазмин
АПФ	ангиотензинпревращающий фермент
АТ	антитромбин
АЧТВ	активированное частичное тромбопластиновое время
АФА	антифосфолипидные антитела
АФС	антифосфолипидный синдром
БВ	болезнь Виллебранда
БЕ	Бетезда единица
ВА	волчаночный антикоагулянт
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВМК	высокомолекулярный кининоген
ВОК	внешняя оценка качества
ВТЭ	венозная тромбоэмболия
ВТЭО	венозные тромбоэмболические осложнения
ГБ	гипертоническая болезнь
ГИТ	гепарин-индуцированная тромбоцитопения
ГУС	гемолитико-уремический синдром
ДВС	диссеминированное внутрисосудистое свертывание
ДДАВП	десмопрессин (1-диамино-8-D-аргинин вазопрессин), англ. – DDAVP
ЖДА	железодефицитная анемия
ИЛ	интерлейкин
ИТП	иммунная тромбоцитопеническая пурпура
ИФА	иммуноферментный анализ
ИХА	иммунохимический анализ
ЛПЗ	лимфопролиферативные заболевания
МЕ	международная единица
МИЧ (ISI)	международный индекс чувствительности
МНО	международное нормализованное отношение
НМГ	низкомолекулярный гепарин
НФГ	нефракционированный гепарин
ОПП	острое повреждение почек
ОЦК	объем циркулирующей крови
ПВ	протромбиновое время
ПГ	простагландин

ПДЗ	предельно допустимое значение
ПДФ	продукты деградации фибрина
ПО	протромбиновое отношение
ПТ	протромбиновый тест
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РА	ревматоидный артрит
РНП-плазма	референтная нормальная пулированная плазма
РФМК	растворимые фибрин-мономерные комплексы
СГТ	синдром геморрагической тромбоцитемии
СКВ	системная красная волчанка
СОП	стандартная операционная процедура
СФ	сфингомиелин
ТАТ	комплекс «тромбин-антитромбин»
ТВ	тромбиновое время
β -ТГ (β -TG)	β -тромбоглобулин
ТГВ	тромбоз глубоких вен
ТГТ	тест генерации тромбина
ТМ	тромбомодулин
ТМА	тромботические микроангиопатии
ТФ	тканевой фактор
ТЭГ	тромбоэластография
ТЭЛА	тромбоэмболия легочной артерии
ТЭМ	тромбоэластометрия
ф.	фактор
ФИ	фосфатидилинозитол
ФЛ	фосфолипиды
ФНО- α	фактор некроза опухоли альфа
ФС	фосфатидилсерин
ФСВОК	Федеральная система внешней оценки качества
ФХ	фосфатидилхолин
ФЭ	фосфатидилэтаноламин
ХБП	хроническая болезнь почек
ЦОГ	циклооксигеназа
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
ЭТ	эндотелин
АРС	активированный протеин С
АРСР	резистентность к активированному протеину С
AUC	площадь под агрегационной кривой

CLSI	Clinical and laboratory standards institute
C1-Ing	C1-ингибитор комплемента
C4-bP	C4-связывающий протеин
CV	коэффициент вариации
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Твердофазный иммуноферментный анализ
F1+2	фрагмент протромбина
FPA/FPB	фибринопептиды A/B
ISO	международная организация стандартизации
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis. Международное общество тромбоза и гемостаза
GP	гликопротеин
MPV	средний объем тромбоцитов
MTHFR	фермент метилентетрагидрофолатредуктаза
PAI-1	ингибитор активатора плазминогена 1-го типа
PAP	плазмин-антиплазминовый комплекс
PAR	protease-activated receptor, рецептор, активируемый протеазой
PC	протеин C
PCT	тромбоцитокрит
PS	протеин S
PDW	дисперсия распределения тромбоцитов по объему
PF3(ф3)	фактор 3 тромбоцитов
PF4 (ф4)	фактор 4 тромбоцитов
PFA	анализатор функции тромбоцитов
PDGF	фактор роста тромбоцитов
PLT	тромбоцит
pNA	паранитроанилин
PRP	плазма, богатая тромбоцитами
RBC	эритроцит
TAFI	активируемый тромбином ингибитор фибринолиза
TFPI	ингибитор внешнего пути свертывания
t-PA	тканевой активатор плазминогена
TRAP	пептид-активатор рецепторов к тромбину
TXA	тромбоксан
u-PA	урокиназный активатор плазминогена
VASP	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein. Фосфопротеин, стимулируемый вазодилататором
vWF	фактор Виллебранда

ВВЕДЕНИЕ

Кровь – важнейшая интегрирующая система, которая обеспечивает обмен метаболитами и информацией между тканями и клетками, пластическую и защитную функции организма. Протекая по закрытому контуру, кровь контактирует со всеми органами. Общая поверхность капилляров человеческого организма составляет около 1000 м². Многообразие и важность функций, огромная протяженность приводят к значительной уязвимости системы кровообращения. Гемостаз призван поддерживать нормальное агрегатное состояние крови. Изменения в системе гемостаза могут стать причиной развития как геморрагических, так и тромботических состояний, которые возникают у пациентов с самыми разными заболеваниями. Огромное значение системы гемостаза в патогенезе заболеваний современного человека доказывается статистикой – такие гемостатические нарушения, как тромбоз коронарных и церебральных сосудов, тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА), являются непосредственной причиной инвалидности и смерти больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Неправильно и несвоевременно диагностированные геморрагические заболевания также вносят свою печальную лепту в смертность, особенно в практике акушеров-гинекологов и педиатров. Неконтролируемое применение препаратов, прямо или косвенно воздействующих на гемостаз, может оказаться опаснее самого заболевания. Лабораторная диагностика состояния системы гемостаза – важнейший фактор эффективности лечения многих заболеваний и снижения смертности населения. В свою очередь, современная лабораторная диагностика основана на понимании общебиологических закономерностей функционирования системы гемостаза и выбора адекватных методов их оценки.

Исследованию гемостаза уделяется большое внимание. Появляются новые диагностические методы, лекарственные препараты, схемы лечения больных. Необходима качественная подготовка как специалистов клинической лабораторной диагностики, так и клиницистов для эффективной, своевременной диагностики и адекватного лечения гемостатических нарушений.

В подготовке пособия принимали участие О.В. Сироткина – профессор кафедры лабораторной медицины и генетики НМИЦ им. В.А. Алмазова, В.В. Самойленко – ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, А.И. Мининкова – врач КДЛ ГКБ им С.П. Боткина ДЗ Москвы. Они, как соавторы отдельных глав, указаны в содержании.

Надеемся, что изложенный материал, который во многом включил собственные наблюдения, умения, клинический опыт лечения и многолетние навыки преподавания вопросов нарушения свертывания крови, будет полезен как врачам клинической лабораторной диагностики, так и врачам-клиницистам.

Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Общее представление о гемостазе, гемостатический баланс

Гемостаз: функция организма, которая, с одной стороны, направлена на поддержание жидкого агрегатного состояния крови в неповрежденном сосудистом русле, с другой – на остановку кровотечения и предотвращение физиологически значимой кровопотери при повреждении сосудистой стенки. Элементы системы гемостаза участвуют в таких важных процессах жизнедеятельности, как воспаление, репарация тканей, поддержание гомеостаза и других. Система гемостаза активно реагирует на экзогенные и эндогенные воздействия, может иметь врожденные и приобретенные функциональные особенности – «болезни системы гемостаза».

На гемостаз могут оказывать влияние как физиологические, так и нефизиологические (патологические) факторы. К последним относятся бактериальные токсины, яды животных, собственные протеолитические ферменты, лекарственные препараты.

Активность разных компонентов системы гемостаза может меняться в широких пределах из-за генетических особенностей или экзогенных воздействий на организм. Взаимодействие компонентов гемостаза организовано серией механизмов «прямой» и «обратной» связи, которые обеспечивают несвертываемость крови и циркуляцию ее в сосудах в течение всей жизни человека. При относительно низкой или высокой активности какого-либо элемента общая интегрирующая активность гемостаза может оставаться среднефизиологической за счет компенсаторного изменения других компонентов системы. Сохранение общей активности гемостаза в физиологических пределах можно определить как поддержание **гемостатического баланса** (рис. 1.1). Этот баланс имеет высокий запас прочности, но при смещении баланса за рамки физиологических норм возникают условия для развития патологических кровотечений или тромбозов.

При отсутствии повреждения система препятствует свертыванию крови. При возникновении повреждения запускается процесс остановки кровотечения: происходит спазм сосуда, в зоне повреждения начинается процесс свертывания крови. Через короткое время сформированный гемостатический тромб закрывает повреждение и прекращает кровопотерю. На поврежденном участке, защищенном тромбом, происходят процессы репарации. По мере восстановления повреждения тромб лизируется. Система гемостаза возвращается в исходное состояние.

Первое знакомство с физиологией и патологией системы гемостаза создает впечатление излишней перегруженности разными элементами. Однако система гемостаза высших животных великолепно отрегулирована и способна эффективно функционировать в разных физиологических и патологических условиях. Поскольку в организме мелкие повреждения возникают часто, в системе прак-

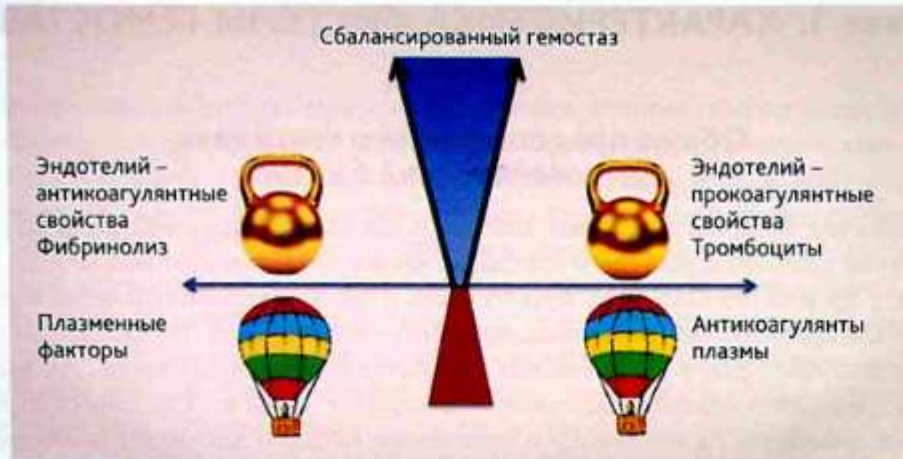


Рис. 1.1. Гемостатический баланс обеспечивает физиологические задачи поддержания жидкого состояния крови в сосудистом русле и предотвращения кровопотери при травме. При повреждениях сосудов кровь быстро сворачивается, купируя кровотечение. При смещении гемостатического баланса за рамки физиологических норм возникают условия для развития кровотечений или тромбозов

тически постоянно происходят локальные процессы. При нормальном гемостатическом балансе чувствительная для организма кровопотеря происходит лишь при массивном повреждении. Однако при нарушении гемостатического баланса в сторону гипокоагуляции значимая кровопотеря может возникнуть при незначительных повреждениях (рис. 1.2).

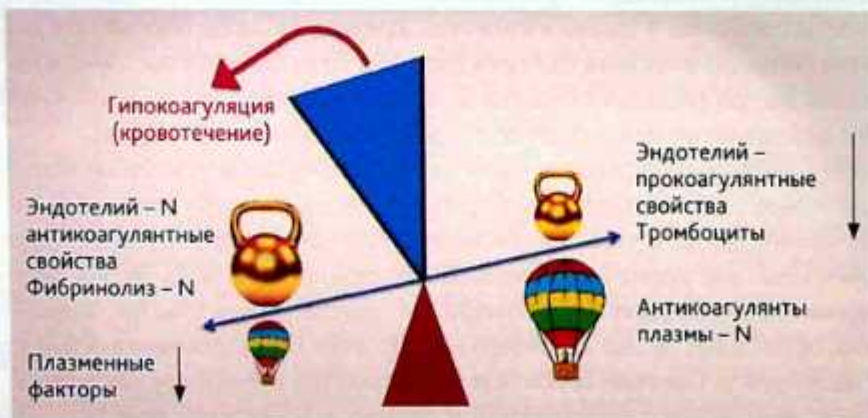


Рис. 1.2. Гипокоагуляционный синдром – к гипокоагуляции приводят снижение активности плазменных факторов (коагулопатия), агрегационной способности тромбоцитов (тромбоцитопатия) или их количества (тромбоцитопения) и прокоагулянтного потенциала эндотелия (снижение количества, активности или дефект фактора Виллебранда)

Патологическое тромбообразование или неконтролируемое распространение процесса роста тромба приводит к нарушению кровообращения в жизненно важных органах. При постановке лабораторных тестов это состояние характеризуется гиперкоагуляцией (рис. 1.3).

Возможно также возникновение смешанной проблемы – неконтролируемое тромбообразование приводит к потреблению прокоагулянтов и развитию ишемии и одновременно патологического кровотечения, то есть синдрому диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (синдрому ДВС) (рис. 1.4).

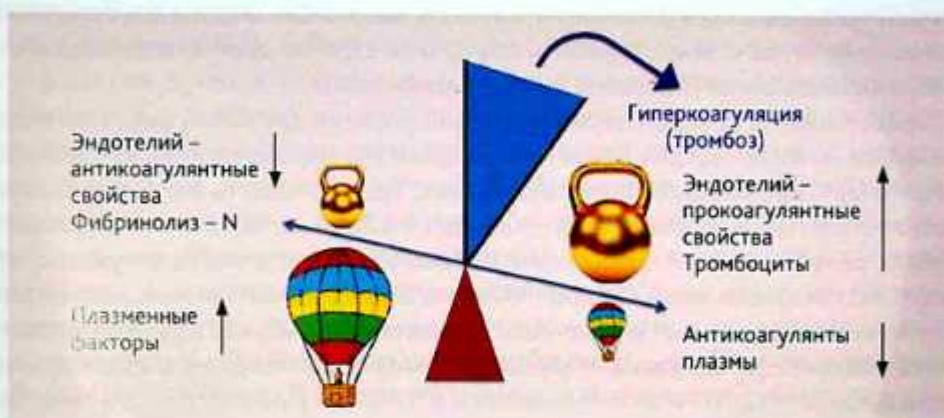


Рис. 1.3. Гиперкоагуляционный синдром – потеря антикоагулянтных свойств эндотелия с увеличением его прокоагулянтной активности, активности факторов свертывания и уменьшением естественных антикоагулянтов формирует условия для развития тромбозов

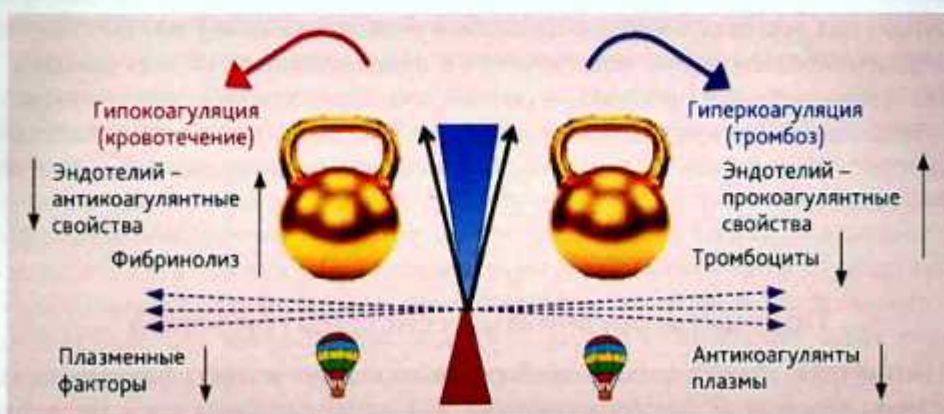


Рис. 1.4. Синдром ДВС – дисбаланс гемостатических реакций, потребление плазменных факторов, естественных антикоагулянтов, активация тромбоцитов со снижением их количества, дисфункция эндотелия с преобладанием прокоагулянтных процессов, активация фибринолиза. Потеря устойчивости гемостаза приводит к одновременному развитию тромбозов и кровотечений

Система гемостаза динамична, она имеет особенности у новорожденных, детей, беременных, людей старческого возраста. Это необходимо учитывать при оценке лабораторных показателей и назначении лекарственных препаратов, арсенал которых активно пополняется. Появляются таргетные препараты, которые назначаются на основе оценки состояния молекулярных особенностей персон. Персонализированная медицина – ближайшая перспектива в гемостазиологии.

Система гемостаза регулируется не только своими внутренними механизмами. Она тесно связана с функционированием организма в целом, способна менять свое функциональное состояние в зависимости от состояния макроорганизма. Кровотечение и особенно тромбоз могут быть смертельно опасны для организма. Эти состояния легче предотвратить, чем лечить. Все это диктует необходимость лабораторной оценки состояний системы гемостаза.

Представление о нормальном функционировании системы гемостаза очень условно и не имеет четких рамок. Клинически трудно определить нормальную кровопотерю при каждой конкретной травме. Резистентность к протромботическим воздействиям вообще клинически оценить нельзя. Человек, не имевший в течение своей жизни ни одной тяжелой травмы, может никогда не узнать, что у него легкая форма коагулопатии. Относительно низкий уровень ингибитора свертывания крови может клинически проявиться тромбозом в старости или во время тяжелого заболевания, и развившийся тромбоз не будет оценен врачом правильно.

Поскольку лабораторные нормы определяют при исследовании здоровых лиц, врачи, как правило, не имеют четких границ, когда оценивать измененные показатели гемостаза как патологические. В сложных случаях диагноз всегда строится на анализе лабораторных и клинических данных. Многие компоненты системы гемостаза лабильны, а на результаты анализа влияет целый ряд факторов. Поэтому для решения вопроса о диагнозе в сомнительных случаях необходимо проводить неоднократные исследования с использованием разных методов, а клиническое решение принимать в составе мультидисциплинарной команды.

Ниже мы рассмотрим отдельно разные элементы гемостаза, их взаимодействие и патологические процессы, являющиеся следствием нарушения гемостатического баланса.

Принципы организации системы гемостаза

В этой главе охарактеризованы общие принципы, на которых функционирует система гемостаза. После представления отдельного принципа приводятся примеры его реализации при физиологических условиях функционирования гемостаза, методы или основы оценки свертывания, клинические проявления данного принципа при патологических состояниях и заболеваниях. Описание проявления принципов затрагивает разные аспекты: организацию системы гемостаза, методы исследования, клинические проявления патологии системы гемостаза. При этом

используются терминология и понятия, которые будут представлены в последующих главах. В то же время дальнейшее изложение материала будет опираться на приведенные в этой главе принципы организации системы гемостаза.

Принцип контактной активации

Контактный компонент является, по-видимому, наиболее значимым в определении агрегатного состояния крови – жидкая или свернувшаяся.

Фазовое состояние определяет разнообразие многих форм существования материи. В частности, переход «лед – вода – пар» принципиально меняет физическое состояние H_2O , делает абсолютно разными свойства вещества. Фазовые переходы биологических мембран с изменением вязкости и переходом от жидкого тела к твердому и наоборот используется при локальном охлаждении при оперативных вмешательствах, предотвращении необратимых повреждений тканей и органов в трансплантологии. Переход клеточной мембраны из текучего состояния в твердое предупреждает продольное перемещение молекул, в частности при сборке рецепторных элементов, вызывая эффект десинситизации рецепторов, и делает ткань не восприимчивой к действию лигандов, например, гормонов. В текучем состоянии в клеточных мембранах происходит постоянный поперечный перенос электролитов, субстратов, метаболитов, в частности, работает Na,K -АТФаза. В состоянии измененной текучести функционирование этого фермента и других трансмембранных переносчиков резко замедляется. Этот эффект используется организмом при переходе в состояние плегии, когда вероятный патологический фактор может быть ограничен по попаданию внутрь клетки, которая в этом состоянии перестает активно взаимодействовать с внешней средой. В системе гемостаза функционирует принцип контактного взаимодействия с участием компонентов разного фазового состояния.

Сосудистая стенка на всем своем протяжении, включая артерии, капиллярную сеть и венозную часть, полностью покрыта эндотелием. Целостность эндотелиального покрова является основой нормального функционирования кровеносных сосудов. Площадь поверхности эндотелиального покрова в сосудах взрослого человека сопоставима с площадью футбольного поля. Клеточная мембрана эндотелиоцитов обладает **высокой текучестью**, сравнимой с текучестью оливкового масла, что является важным условием антитромбогенных свойств сосудистой стенки. Высокая текучесть обеспечивает гладкую внутреннюю поверхность эндотелия (рис. 1.5), который функционирует как целостный пласт, и исключает контакт прокоагулянтов плазмы крови с субэндотелиальными структурами. При контакте клеток крови и плазменных факторов с неповрежденным эндотелием не происходит активации свертывания крови из-за отсутствия активирующего коагуляцию стимула.

Активирующим действием на клетки крови (в первую очередь тромбоциты) и плазменные факторы обладает субэндотелиальный слой сосудистой стенки, который расположен сразу под одноклеточным слоем эндотелия. В состав

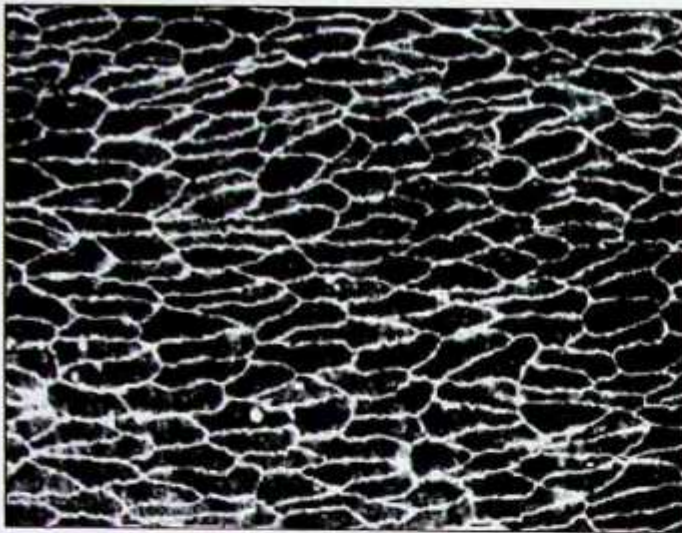


Рис. 1.5. Эндотелиальный покров сосудов. Гладкая поверхность покрыта монослоем эндотелиальных клеток. Целостность эндотелиального покрова – важнейшее условие сохранения жидкого состояния крови

субэндотелия (рис. 1.6) входят коллаген, эластин, фибронектин, витронектин, ламинин, протеогликаны, гликозаминогликаны, тромбоспондин, фибробласты, макрофаги. Субэндотелий является стимулятором адгезии тромбоцитов и активации каскадной системы свертывания крови. Это, в первую очередь, связано с тем, что компоненты субэндотелия, особенно коллаген, имеют характеристики твердого тела. Твердое тело – фактор контактной активации как тромбоцитов, так и плазменных факторов. В условиях *in vivo* при контакте с твердой поверхностью происходит взаимоактивация факторов XII, XI совместно с прекалликреином (ПК) и высокомолекулярным кининогеном (ВМК). Этому пути активации придается особое значение; помимо активации плазменного

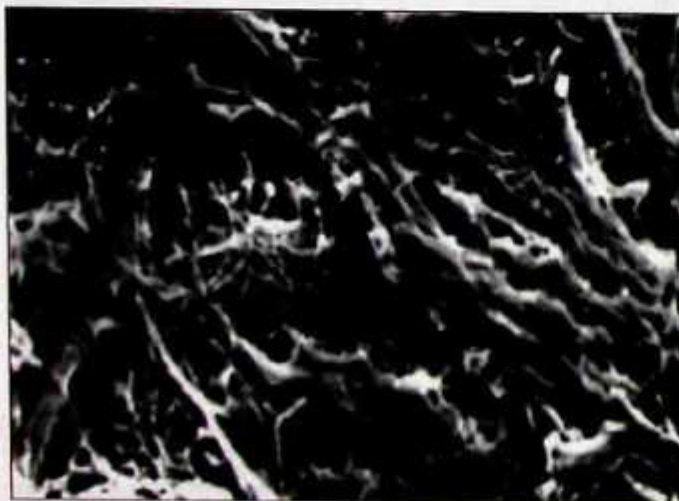


Рис. 1.6. Субэндотелий сосудистой стенки организован полимерными белками: коллагеном, эластином и другими. Субэндотелий обладает выраженным тромбогенным эффектом, стимулируя процессы свертывания крови

гемостаза это в большей степени активация фибринолиза, систем калликреин-кининовой и комплемента.

Прокоагулянтные свойства клеток субэндотелия (макрофагов, фибробластов, лейкоцитов и гладких мышечных клеток) обусловлены наличием на их поверхности тканевого фактора. Коллаген субэндотелия является субстратом для адгезии тромбоцитов. Связь коллагена с рецепторами тромбоцитов вызывает активацию последних. Кроме того, коллаген, как структура с характеристиками твердого тела, обладает свойством активировать белки системы контактной активации.

Таким образом, принцип контактной активации заключается в сохранении интактного состояния клеток крови и плазменных факторов свертывания при контакте с поверхностью, характеризующейся высокой текучестью, и активации, в первую очередь, тромбоцитов и плазменных факторов, участвующих в контактной активации, при взаимодействии с поверхностью, фазовое состояние которого характеризуется свойствами твердого тела. Принцип контактной активации постоянно реализуется *in vitro*, он является основой для выполнения многих лабораторных тестов. В организме этот принцип проявляется в случаях попадания или длительного нахождения в кровотоке инородного тела – искусственного клапана сердца, сосудистого протеза.

Проявления принципа контактной активации

Кровь при взятии в пробирку с цитратом должна прямо попадать в антикоагулянт, перемешиваясь с ним (рис. 1.7). Не допускается, чтобы кровь стекала по коже пальца, по стенке пробирки, попадала на любую поверхность.

В то же время, если кровь используется для получения сыворотки, она должна свернуться, и для этого может стекать по стенке пробирки. Многие производители наполняют пробирки для получения сыворотки инертными гранулами, увеличивающими поверхность контактного взаимодействия крови с поверхностью твердого тела, для усиления процесса сворачивания крови и отделения сгустка от сыворотки.

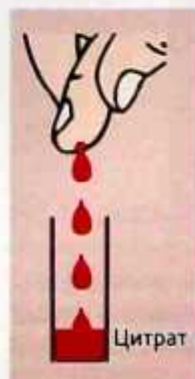


Рис. 1.7. При взятии крови в антикоагулянт не допускается стекание крови по коже пальца, по стенке пробирки и любой другой поверхности, так как мгновенно происходит контактная активация процесса свертывания. Кровь самотеком из прокола должна попадать прямо в антикоагулянт, перемешиваясь с ним. Пример отражает принцип контактной активации, однако следует учитывать, что в современной лабораторной практике открытый забор крови в пробирку не проводится. Подробно правила взятия крови описаны в главе 4

Тромб в организме формируется в местах повреждения эндотелиального покрова, там, где происходит контакт с субэндотелием или другими поверхностями со свойствами твердого тела. Интактный эндотелиальный слой – условие того, что тромбообразования в этих местах не будет. Поврежденный эндотелиальный монослой – место формирования пристеночного тромба.

Каолин – высокодисперсная белая глина – используется в тесте «активированное частичное тромбопластиновое время» (АЧТВ), так как химически интактен, но активирует свертывание путем контактной активации на частицах твердого тела.

Холестерин – природный полициклический липофильный спирт, содержащийся в липидной части клеточных мембран всех живых организмов. Он придает клеточным мембранам определенную жесткость, противодействуя текучести жирных кислот, входящих в состав фосфолипидного бислоя мембран. Избыток холестерина в составе мембран эндотелиальных клеток способствует уменьшению их текучести и тем самым способствует процессу тромбоатерогенеза.

Принцип протеолитической активации

Практически все факторы системы свертывания крови циркулируют в кровотоке в форме неактивных проферментов или в форме неактивных кофакторов. Процесс активации представляет собой ограниченный протеолиз неактивных предшественников до активных энзимов и пептидов (рис. 1.8). Плазменные факторы свертывания по рекомендации ВОЗ принято обозначать римскими цифрами. Это их название, а не порядковый номер. Правильно говорить фактор двенадцать, а писать ф.ХІІ, неправильно говорить «двенадцатый фактор». Это касается всех плазменных факторов. Неактивные факторы обозначаются только римской цифрой, активированные факторы – римской цифрой с аббревиатурой «а». Соответственно, неактивный – ф.ХІІ, активированный – ф.ХІІа.

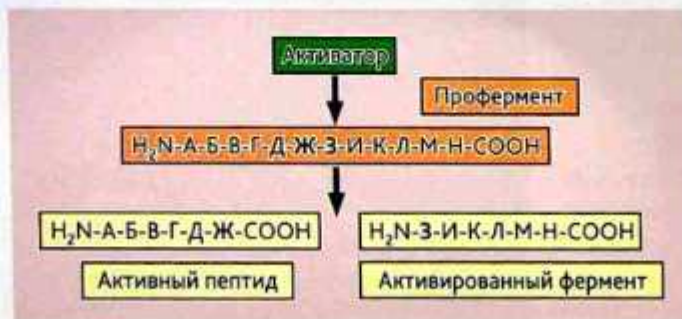


Рис. 1.8. Протеолитическая активация факторов гемостаза. Путем ограниченного протеолиза из неактивного предшественника образуются активированный фермент и пептид, который можно использовать для характеристики активности протеолитических реакций гемостаза

Большинство плазменных факторов вырабатывается печенью, циркулирует в крови в виде проферментов. После активации (частичного протеолиза) большинство активных факторов является сериновыми протеазами, такое название они получили из-за наличия в активном центре аминокислоты серина. Сериновыми протеазами являются активированные факторы IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, также калликреин, протеин C, плазмин и ряд других протеолитических ферментов.

Использование принципа протеолитической активации

Амидолитические методы с использованием хромогенных и флуоресцентных субстратов основаны на специфичности протеолитической реакции, достигаемой тем, что протеолитический фермент разрывает пептидную связь, ориентируясь на определенную последовательность аминокислот. Используют синтетические хромогенные пептиды, которые имеют специфическую последовательность аминокислот, аналогичную участкам естественных субстратов, и сопряженный с ними хромоген. Принцип тестов с хромогенными субстратами представлен на рис. 1.9. Протеаза расщепляет короткоцепочечный пептид (из 3–10 аминокислот), к которому через эфирную связь пришит хромоген (в нашем случае паранитроанилин – pNA). Комплекс «пептид–pNA» имеет максимум поглощения в области короткого ультрафиолета, свободный pNA – при 380 нм. Итоговая концентрация pNA пропорциональна активности протеазы и определя-

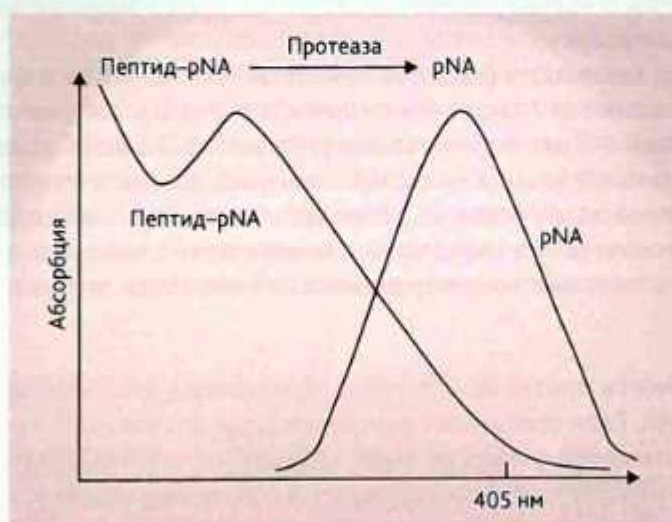


Рис. 1.9. Принцип определения активности протеолитического фермента (протеазы) с использованием хромогенного субстрата. При длине волны 405 нм паранитроанилин, связанный с пептидом, практически не поглощает световую волну. В этой области спектра поглощает только свободная форма хромогена. Отщепление от хромогенного субстрата окрашивающего хромогена позволяет по степени развивающейся окраски определить активность действующего фермента

ется по увеличению поглощения светового потока при длине волны 405 нм. Для каждой отдельной сериновой протеазы системы гемостаза известна структура участка гидролиза. Моделирование в короткоцепочечном пептиде специфической для конкретной протеазы последовательности из аминокислот позволяет исключить влияние других протеаз на результаты исследования. При синтезе хромогенных субстратов для повышения специфичности используются L- или D-стереоизомеры аминокислот, а также различные блокирующие группировки, чтобы предупредить деградацию их неспецифическими аминопептидазами. Кроме того, в тестах используется концентрация хромогенного субстрата в несколько сотен мкмоль/л, что существенно выше, чем константа Михаэлиса соответствующих ферментов, поэтому скорость реакции не зависит от концентрации субстрата.

Хромогенные субстраты позволяют проводить прямые измерения биологической активности энзимов. Амидолитические методы легко выполняются на фотометрах, характеризуются точностью и воспроизводимостью результатов, а также возможностью их полной автоматизации. Применение синтетических хромогенных субстратов явилось прорывом при исследовании отдельных ферментов или ингибиторов, которые не учитываются простыми коагуляционными тестами или очень трудны для стандартизации. Во многих случаях хромогенные субстраты являются специфичными и позволяют определить протеолитическую активность отдельных компонентов плазменного гемостаза и их ингибиторов. Эти тесты схожи с тестами клинической химии, могут выполняться на биохимических анализаторах.

Для оценки активности факторов гемостаза используются и флуорогенные субстраты, в частности 7-амино-4-метилкумарин (АМК), который имеет максимум эмиссии при 440 нм. Флуорогенные субстраты обладают большей аналитической чувствительностью и позволяют измерить специфическую активность компонентов гемостаза в большем диапазоне, чем хромогенные субстраты. Они могут использоваться для определения компонентов гемостаза, присутствующих в плазме в следовых концентрациях или обладающих относительно низкой активностью.

Необратимость протеолиза является характеристикой этого типа ферментативных реакций. Если происходит расщепление профермента, то восстановления его вновь до нативной формы не может осуществиться. Поэтому система протеолитических ферментов функционирует в одном направлении: орган, синтезирующий профермент (как правило, печень) → освобождение профермента в систему циркуляции → активация до фермента путем частичного протеолиза → удаление фрагментов из кровотока. Такая организация предполагает зависимость протеолитической активности крови от функции органов и систем, синтезирующих проферменты. В частности, генетические аномалии, заболевания печени могут быть причиной нарушенного свертывания крови из-за недостатка компонентов. Дефицит витамина К, нарушение процесса всасывания жирорастворимых

компонентов приводят к нарушению процесса постсинтетической обработки, и как следствие, активации витамин-К-зависимых белков. Проявлением этой возможности могут быть коагулопатии при циррозе печени, механической желтухе, синдроме мальабсорбции.

Фрагмент протромбина F1+2 (F1+2) – пептид, образующийся при превращении протромбина в тромбин в процессе активации плазменного гемостаза (рис. 1.10). F1+2 имеет относительно продолжительный период циркуляции в системе кровотока, поэтому он характеризует активацию системы гемостаза на длительном отрезке времени. Определение F1+2 характеризуется высокой аналитической чувствительностью, поэтому его увеличение можно зарегистрировать до появления клинических признаков тяжелых нарушений в системе свертывания крови. Определение F1+2 проводится в рамках научных исследований с целью диагностики состояния гипер- и гипокоагуляции.

В случаях гиперкоагуляции F1+2 может быть значимым при остром и хроническом ДВС, тромбозе глубоких вен бедра, эмболии легочной артерии, злокачественных опухолях и острых миелоидных лейкозах (протекающих с активацией системы свертывания), наличии факторов риска тромбозов, остром инфаркте миокарда и последующей тромболитической терапии.

Гиперкоагуляция – проявление избыточной активации, как правило, плазменных факторов гемостаза. Для гиперкоагуляции нехарактерно избыточное содержание факторов предшественников из-за усиленного их образования, гиперкоагуляция – это протеолитическая гиперактивация факторов под влиянием активатора, которым может быть фактор контактной активации или непосредственно протеолитический агент. Поэтому при регистрации гиперкоагуляции необходимо выяснять причину гиперкоагуляции, которая может быть неявной, формироваться при хроническом воспалительном процессе, клинически не выраженном опухолевом процессе и т. д. Гипокоагуляция может быть проявлением уменьшения количества факторов, нарушения их образования или избыточного потребления.

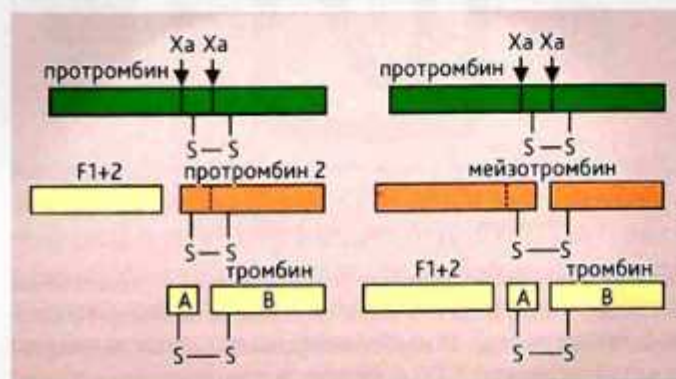


Рис. 1.10. Образование фрагмента протромбина F1+2. Протромбин расщепляется протромбиназным комплексом в 2 участка в 2 этапа с образованием разных промежуточных продуктов, но обязательным формированием тромбина и фрагмента F1+2

Принцип защитного ингибирования

Компоненты системы гемостаза, как прокоагулянты, так и антикоагулянты, постоянно присутствуют в кровотоке, где достаточно высокая степень дезактивации, включая наличие постоянно активных макрофагов-моноцитов и фильтрацию в капиллярной сети и в почках. Принцип защитного ингибирования используется для сохранения в системе кровотока компонентов гемостаза. Принцип защитного ингибирования в данном контексте рассматривается как механизм, защищающий компоненты гемостаза от неконтролируемой активации и последующей дезактивации.

Проявления принципа защитного ингибирования

Проферменты, в виде которых вырабатываются факторы свертывания, можно рассматривать как своеобразную самозащиту. На рис. 1.11 представлена модель протромбина. Активный центр сериновой протеазы закрыт компонентом, который отщепляется под действием активного ф.Ха. Второй сайт расщепления расположен таким образом, что после действия ф.Ха образуются 2 цепи тромбина, удерживаемые между собой дисульфидным мостиком. Таким образом собственный компонент протромбина защищает активный центр и всю молекулу от активации и последующей деградации. Тромбин в свободном виде в системе циркуляции в норме не присутствует. Аналогично компонентам протромбина/тромбин укрывают свой активный центр другие сериновые протеазы: факторы VII, IX, X, XI, XII, протеин С, плазминоген.

Формирование комплексов используется в качестве защитного механизма от деградации факторов. Классическим примером такого взаимодействия является комплекс «фактор VIII – фактор Виллебранда» (ф. VIII–vWF), состоящий из 2 отдельных белков (рис. 1.12), которые выполняют в гемостазе разные функции,



Рис. 1.11. Модель протромбина. Стрелками показаны места протеолитического расщепления под влиянием ф.Ха. Треугольником обозначен каталитически активный остаток серина протеазного центра. N-концевая область содержит до 14 карбоксилированных остатков, взаимодействующих с ионами Ca^{2+}

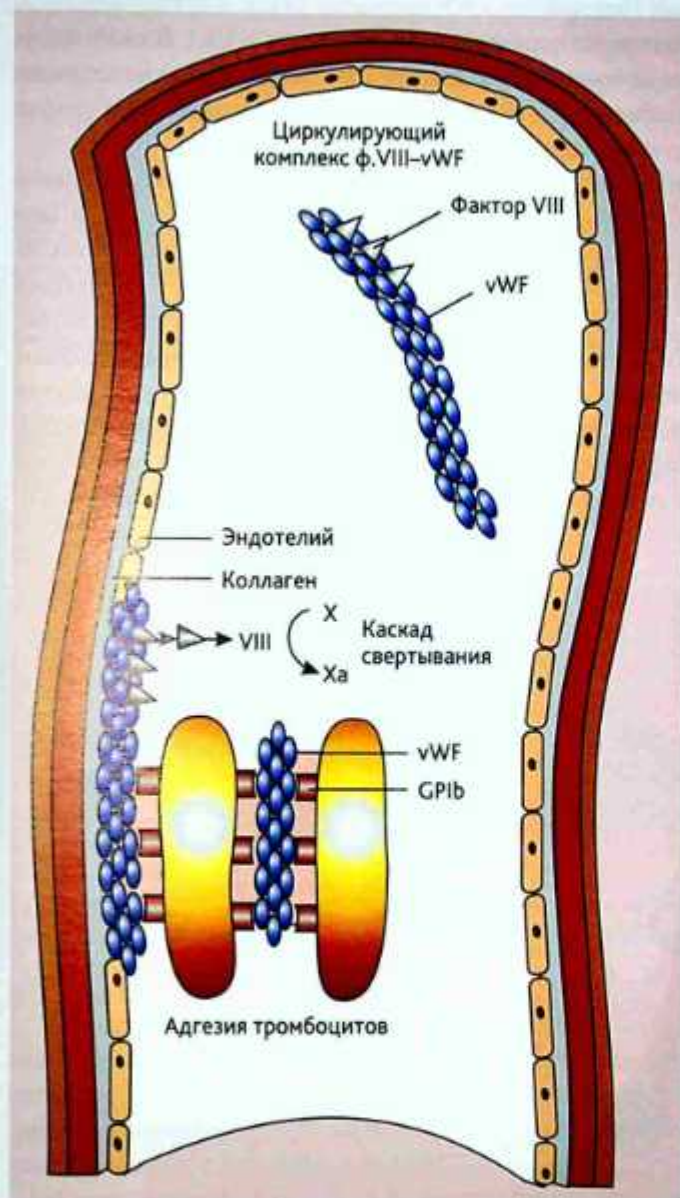


Рис. 1.12. Комплекс «фактор VIII – фактор Виллебранда» (ф.VIII-vWF) в кровотоке функционирует как система защиты от деградации и транспорта для ф.VIII. При травмах и повреждениях vWF адгезируется в участках деэндоотелизации, при этом ф.VIII освобождается и выполняет роль кофактора при активации ф.X (перехода ф.X в активный фактор Xa). В свободном состоянии ф.VIIIa быстро разрушается, поэтому недостаток vWF часто вызывает вторичный дефицит ф.VIII

имеют разную химическую и иммунологическую структуру. Фактор VIII необходим для активации фактора X в каскаде свертывания крови, его дефицит вызывает гемофилию А. Фактор Виллебранда (vWF) – полимерный белок, выполняющий роль «биологического клея», он необходим для адгезии тромбоцитов к поврежденной стенке сосудов, обеспечивает взаимодействие коллагена с гликопротеиновыми комплексом тромбоцитов. При адгезии фактора Виллебранда к поврежденной сосудистой стенке ф.VIII освобождается из комплекса и участвует в

каскаде свертывания плазмы. Недостаток vWF приводит к болезни Виллебранда. В то же время vWF выполняет роль транспортного белка для ф. VIII. В свободном состоянии ф. VIII быстро разрушается протеазами плазмы, поэтому недостаток vWF вызывает вторичный дефицит ф. VIII, который протекает клинически сходно с гемофилией А.

Внутриклеточные контейнеры. В организме есть факторы, оказывающие мощные физиологические, регулирующие дозозависимые воздействия, а при избыточной концентрации – выраженные патологические эффекты. Их высокая концентрация необходима локально, для точечной значительной коррекции гемостатического баланса. Такие вещества организм заключает внутрь клеток, выполняющих роль направленных транспортеров. К таким клеткам с полным основанием относятся тромбоциты, содержащие активные метаболиты в гранулах (рис. 1.13). Все эти компоненты, циркулируя в крови в высокой концентрации, приведут к неконтролируемому нарастанию прокоагулянтного потенциала. Свободная циркуляция пептидов, вызывающих пролиферацию, опасна, в частности,

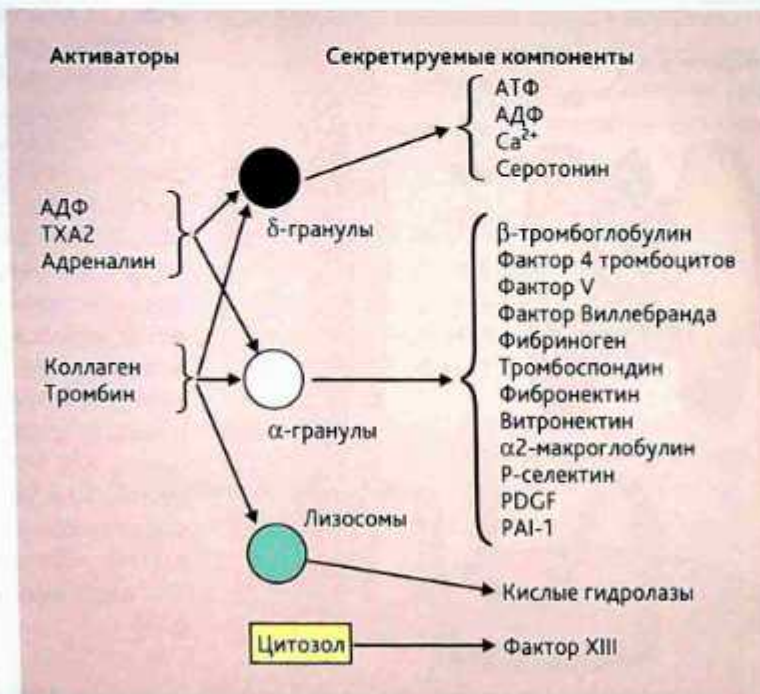


Рис. 1.13. Компоненты гранул тромбоцитов содержат разнообразно гемостатически активные белковые компоненты, в том числе прокоагулянты, способствующие свертыванию крови, ростовые факторы, в частности инсулиноподобный фактор роста и фактор роста тромбоцитов (PGGF). Освобождаясь из адгезированных на местах повреждения тромбоцитов, эти компоненты обеспечивают значимый локальный прокоагулянтный потенциал, стимулируют образование сгустка, пролиферацию и репарацию поврежденной ткани.

из-за стимуляции злокачественного роста тканей. Но доставленные точно, в нужное место, в нужное время, они приводят к созданию оптимального местного гемостатического и репарационного потенциала.

Принцип каскадного усиления сигнала

Процесс образования фибрина – многостадийный процесс, который происходит по механизму проферментного-ферментного преобразования. Это обеспечивает нарастание сигнала – активация одной молекулы предшествующего уровня в системе свертывания приводит к активации от нескольких десятков до нескольких сотен тысяч последующих молекул (рис. 1.14).



Рис. 1.14. Каскадный принцип усиления сигнала. Каждый предыдущий компонент системы свертывания активирует много последующих. ТФ – тканевой фактор

Многостадийность позволяет гибко регулировать процесс. Практически на каждом этапе каскада действуют как активаторы, так и ингибиторы. Их взаимодействие во многом определяет несвертываемость крови в нормальных условиях кровотока и локальность свертывания и тромбообразования в местах повреждения.

В классическом каскаде свертывания крови выделяют 2 пути активации.

- Активация тканевым фактором (ТФ). Так как ТФ не относится к плазменным факторам, в обычных условиях не контактирует с кровью, но появляется в плазме только при повреждении тканей, то активация с его участием обозначается как внешний путь свертывания.
- Активация ф.ХІІ при контакте с отрицательно заряженной поверхностью твердого тела, или контактная активация. Поскольку все факторы, включая ф.ХІІ, присутствуют в плазме в норме, этот путь активации обозначается как внутренний. В современной модели свертывания роль ф.ХІІ пересмотрена.

Внешний и внутренний пути взаимодействуют между собой, а их разделение достаточно условно. Внешний и внутренний пути сходятся на факторе X. Последний со своим кофактором – ф. Va участвует в образовании протромбиназы – ферментативного комплекса, который активирует протромбин с образованием тромбина. Дальше активация продолжается до выпадения фибрина.

Использование принципа каскадного усиления сигнала

Коагулограмма – комплексный анализ показателей свертываемости крови. Плазменный гемостаз оценивают не путем определения отдельных факторов, их количества или активности, а проводят оценку путем регистрации времени от места запуска каскада свертывания плазмы до выпадения фибрина. Так, тест «протромбиновое время» (ПВ) – это время от добавления к цитратной плазме тромбопластина вместе с ионами Ca. ПВ оценивает внешний каскад свертывания. Тест «активированное частичное тромбопластиновое время» – это время, необходимое для образования фибрина от момента запуска внутреннего каскада свертывания, начиная с ф. IX. Тромбиновое время (ТВ) – период, необходимый для формирования сгустка под влиянием активированного ф. IIa.

Клинические проявления патологии компонентов плазменного каскада свертывания. Так как компоненты (факторы) системы свертывания являются белками, то их синтез может быть нарушен при генетических аномалиях. В результате возникают наследственные заболевания – *геморрагические коагулопатии*, при которых страдает тот или иной фактор. Клиническая значимость и проявления геморрагических коагулопатий разные, одним из важных моментов является уровень блока каскадных реакций (рис. 1.15). Так, наименее клинически выраженными являются геморрагические коагулопатии с отсутствием начальных компонентов каскада. Отсутствие ф. XII – *болезнь Хагемана* – клинически мало выражено, хотя частота болезни Хагемана, по некоторым данным, оценивается как 2% популяции.



Рис. 1.15. Модель каскада усиления сигнала при геморрагических коагулопатиях. Если отсутствует ф. XII, то активация начнется с ф. XI. Количество последующих активных факторов в этом случае будет меньше. Если отсутствует ф. II (протромбин), то коагуляции вообще не произойдет

Клинически выраженные кровотечения возникают при гемофилиях, затрагивающих центральные этапы активации протромбиназы. Гемофилия А, возникающая из-за недостаточности ф. VIII, и гемофилия В (недостаточность ф. IX) клинически могут протекать с выраженными кровотечениями. Наследственный дефицит ф. XI свертывания крови имеет клинические проявления менее выраженные, чем при гемофилиях А и В. Очевидно, это связано с тем, что запуск каскада активации происходит с разного уровня. Не описаны случаи пациентов с дефицитом фактора II менее 4%. При отсутствии протромбина происходит внутриутробная гибель плода из-за отсутствия ключевого фактора гемокоагуляции и нарушений таких фундаментальных процессов, как апоптоз и воспаление.

Принцип комплексного участия

Плазменные ферменты и ингибиторы системы гемостаза эффективно функционируют только в определенном микроокружении. Эффективность функционирования факторов IX, X, антикоагулянтов протеина С, антитромбина в присутствии своих кофакторов возрастает в десятки тысяч раз. На рис. 1.16 показана степень активации тромбина фактором Ха в разных условиях микроокружения. Комплекс фактора Ха, фактора Va, фосфолипиды и Ca^{2+} (протромбиназный комплекс) значительно эффективнее активирует тромбин, нежели один фактор Ха, причем в комплексе с кофакторами фактор Ха защищен от деградации антикоагулянтом антитромбином.



Рис. 1.16. Влияние условий микроокружения на образование тромбина фактором Ха. Комплекс фактора Ха, фактора Va, фосфолипиды и Ca^{2+} (протромбиназный комплекс) значительно эффективнее активирует тромбин, нежели фактор Ха один или в комбинации только с фосфолипидами и/или Ca^{2+} .

Проявления принципа комплексного участия

Сборка комплексов. Большинство реакций протеолитической активации предшественников ферментов эффективно протекают только на «твердой фазе», роль которой играют отрицательно заряженные фосфолипиды клеточных мембран. Для эффективного взаимодействия и активации белков свертывания крови необходимо образование комплексов (рис. 1.17), в которых участвуют фосфолипидная подложка (фосфолипиды фибробластов, макрофагов, активированных тромбоцитов, в патологических ситуациях — мембраны поврежденных клеток,

бактерий), активированный кофактор (высокомолекулярный кининоген, факторы VIIIa, Va), фермент (активный плазменный фактор – протеолитический фермент), субстрат (профермент), ионы Ca (Ca^{2+}). Эти условия не могут возникнуть в жидкой фазе – в кровотоке или на поверхности неповрежденных эндотелиоцитов. В большинстве случаев процессы активации факторов свертывания протекают на местах повреждения сосудистой стенки, в зонах дезэндотелизации. Таким образом, пристеночное тромбообразование ограничено в размерах и не распространяется на всю систему циркуляции. Принцип комплексного участия факторов обеспечивает локальность свертывания крови в организме.

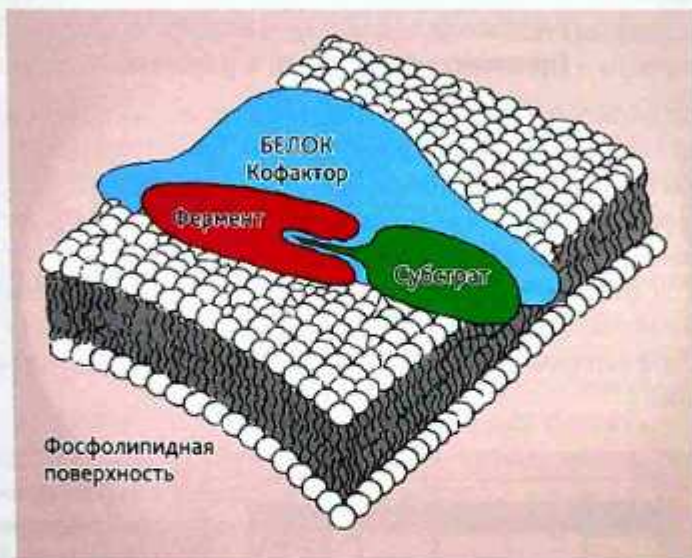


Рис. 1.17. Модель сборки комплекса факторов свертывания крови. На поверхность твердой фазы (фосфолипид, тромбоцитарный фактор 3) прикрепляется (интернализуются) крупный кофакторный белок (ф.VIIIa, ф.Va), который организует место контакта факторов свертывания, те, в свою очередь, взаимодействуют друг с другом по принципу комплементарности. Сборка комплексов обеспечивает локальность свертывания только на поврежденной или чужеродной поверхности

Принцип обратной связи

Многие характеристики гемостаза невозможно понять без представления об обратных связях, как положительных, так и отрицательных. В частности, если исходить из чисто каскадного механизма активации протромбиназы, то формирование фибрина должно нарастать постепенно. Однако этого не наблюдается. Свертывание плазмы происходит резко и быстро по всему объему пробирки, в которой регистрируется выпадение фибрина. Объяснение этому связано с накоплением критической концентрации тромбина, которая происходит за счет включения положительных обратных связей.

При первичной активации как внутреннего, так и внешнего путей активации протромбиназы происходит образование только «затравочного» количества тромбина, которого недостаточно для перевода фибриногена в фибрин. Критически значимое количество активного тромбина происходит за счет механизма обратной связи. При внутреннем пути активации протромбиназы затравочный тромбин способен активировать ф. XI, ф. V и ф. VIII (рис. 1.18). Активный фактор VIIIa вместе с фактором IXa, ионами Ca^{2+} и фосфолипидами очень эффективно активируют фактор Xa, который значительно повышает концентрацию тромбина. Повышенный уровень тромбина по механизму положительной обратной связи дополнительно активирует факторы XI, VIII и V. В результате достигается критическая концентрация тромбина, при которой весь фибриноген переходит в фибрин, кровь сворачивается.

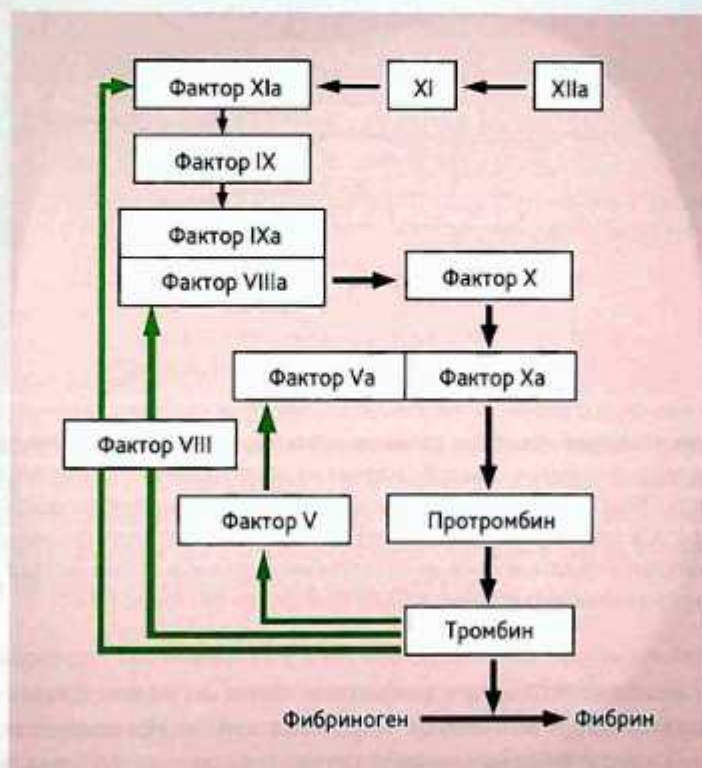


Рис. 1.18. Положительные обратные связи во внутреннем каскаде активации протромбиназы. Внутренний каскад начинается с активации контактных факторов системы гемостаза. Фактор XIIa переводит фактор XI в XIa. Фактор XIa активирует фактор IX. Фактор IXa активирует фактор X, но эта реакция не очень эффективная. Однако как только сформируется тромбин, то он активирует фактор VIII. Активный фактор VIIIa вместе с фактором IXa, ионами Ca^{2+} и фосфолипидами очень эффективно активируют фактор Xa. Аналогично действует обратная связь с участием тромбина, фактора Va, фактора Xa. Обратная связь поддерживает развитие процесса за счет активации тромбином факторов V, VIII и XI

Внешний путь образования протромбиназы короткий, что ведет к быстрому тромбинообразованию. Активация происходит через тканевой фактор.

При контакте ТФ и ф.VIIa формируется комплекс, который активирует ф.X. Фактор Xa при участии фактора Va в присутствии ионов Ca^{2+} на отрицательно заряженной фосфолипидной поверхности формируют протромбиназу. Внешний путь образования протромбиназы достаточно быстрый. Активность внешнего пути образования протромбиназы в физиологических условиях также поддерживается за счет механизма положительной обратной связи (рис. 1.19).

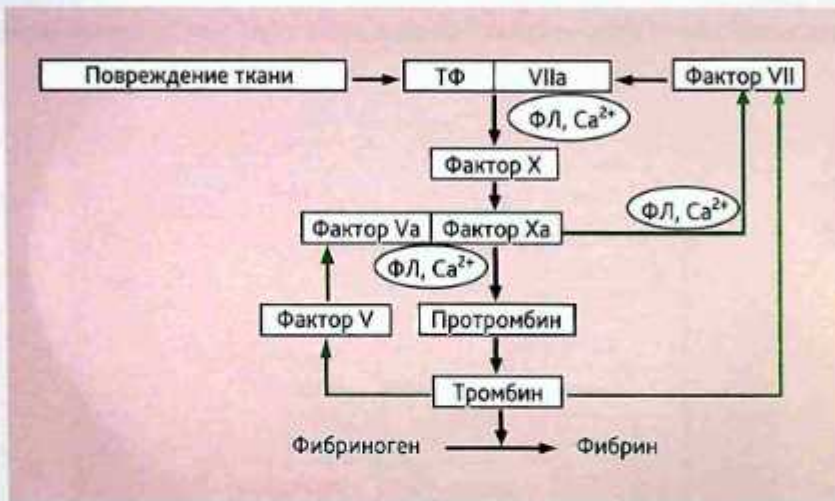


Рис. 1.19. Положительные обратные связи во внешнем каскаде активации протромбиназы. Внешний каскад начинается с высвобождения из поврежденной ткани тканевого фактора (ТФ). При контакте ТФ и ф.VIIa формируется комплекс, который активирует ф.X. Фактор Xa при участии фактора Va в присутствии Ca^{2+} на фосфолипидной поверхности формируют протромбиназу. Положительная обратная связь включается на нескольких этапах каскада свертывания. Наиболее существенными являются активация тромбином факторов VII и V

Наряду с положительными в регуляции системы гемостаза не менее значимыми являются отрицательные обратные связи. На принципе обратной отрицательной связи функционирует антикоагулянтная система протеина С. Активированный протеин С (APC) является специфической сериновой протеазой. Основная функция его в гемостазе – инактивация активных факторов Va и VIIIa.

Система обратной связи протеина С включает мембранный белок тромбомодулин (ТМ), непосредственно сам протеин С (РС) и его кофактор протеин S (PS). Таким образом, тромбин оказывает как прокоагулянтный, так и антикоагулянтный эффекты через соответственно положительную и отрицательную обратные связи (рис. 1.20).

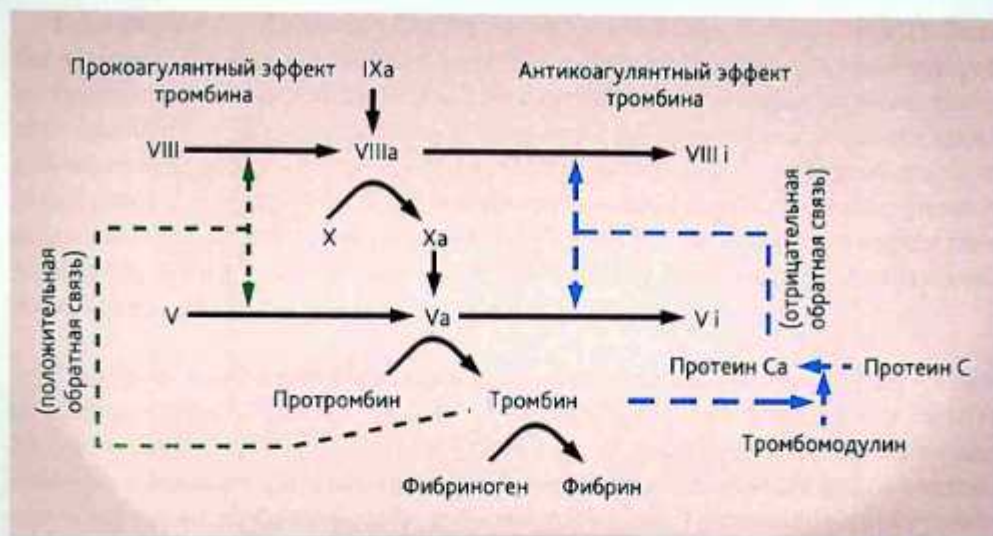


Рис. 1.20. Прокоагулянтный и антикоагулянтный эффекты тромбина. Тромбин оказывает прямой активирующий эффект на факторы V и VIII. Одновременно тромбин на поверхности эндотелиальных клеток связывается с тромбомодулином, этот комплекс стимулирует антикоагулянт – протеин С. Активированный протеин С (APC) лизирует ф. Va и ф. VIIIa до неактивных ф. Vi и ф. VIIi

Проявления принципа обратной связи

Кровь не сворачивается в физиологических условиях в организме человека в течение всей жизни, при этом постоянно возникают условия для активации свертывания. Одним из эффективных, постоянно работающих механизмов, препятствующих свертыванию, является активность системы протеина С, которая функционирует на принципе отрицательной обратной связи и предупреждает накопление тромбина в критической концентрации.

Тест генерации тромбина (ТГТ) – интегральный метод, который дает информацию о динамике образования и ингибирования тромбина после активации коагуляции в образце крови, фактически об активности положительной обратной связи формирования тромбина и отрицательной обратной связи – его инактивации. Тромбин, образующийся в ходе реакции, разрушает пептидную связь флюорогенного субстрата. Оценивают площадь под кривой образования тромбина (восходящая часть), достигаемый максимум и нисходящая часть, которая характеризует инактивацию тромбина (рис. 1.21).

С помощью теста генерации тромбина можно определить состояние гипо- и гиперкоагуляции, оценить действие лекарственных препаратов, выявить нарушения в системе естественных антикоагулянтов. ТГТ является универсальным методом оценки тромбогенного потенциала гемостаза и может быть использо-

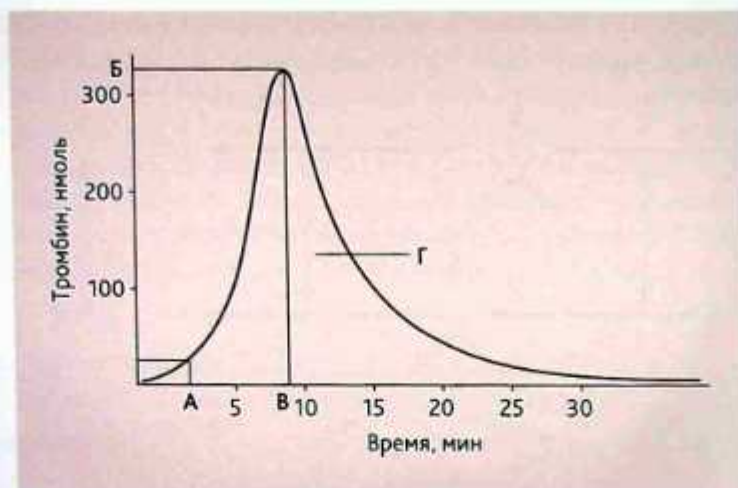


Рис. 1.21. Кривая генерации тромбина и измеряемые параметры. Определяют следующие показатели: А – время инициации свертывания, мин (Lag time/LT); Б – пиковая концентрация тромбина, нмоль/л (Peak thrombin); В – время достижения пиковой концентрации тромбина, мин (Time to peak); Г – эндогенный тромбиновый потенциал – площадь под кривой генерации тромбина (ETP)

ван для диагностики гиперкоагуляционного синдрома, в т. ч. в педиатрии; выявления гемофилии; мониторинга терапии гемофилии при наличии ингибитора фактора VIII; мониторинга антикоагулянтной терапии, направленной на ингибирование тромбина и фактора Ха; контроля эффективности антикоагулянтов; оценки активности гемостаза при беременности; контроля состояния гемостаза при синдроме ДВС. Накапливаются научные данные для представления теста в практике лабораторий для принятия клинических решений на основе его результатов.

Недостаточность антикоагулянтной системы протеина С может носить врожденный и приобретенный характер. Наследственный дефицит встречается в популяции в 0,2–0,5% случаев. При этом имеет место предрасположенность к развитию рецидивирующих сосудистых тромбозов, как артериальных, так и венозных. Одним из наиболее значимых проявлений дефицита протеина С является фульминантная пурпура – тромбоз мелких артерий кожи, подкожной клетчатки, терминальных отделов конечностей, реже глаз, головного мозга, почек. Приобретенный дефицит встречается при патологии печени, нарушении поступления в организм витамина К, беременности. Кроме того, поскольку система протеина С в целом запускается тромбином, блокирование тромбообразования может формировать склонность к тромбозам из-за нарушения принципа обратной связи. Этот феномен рассматривается некоторыми исследователями как парадокс действия прямых ингибиторов тромбина.

Гемофилия А – болезнь, обусловленная недостатком антигена ф.VIII. Если бы не принципиальная важность положительной обратной связи, при которой происходит активация ф.VIII, то при повреждении тканей с освобождением тканевого фактора в месте повреждения должна была бы произойти коагуляция крови с выпадением фибрина, так как внешний каскад активации протромбиназы не затрагивает активации ф.VIII. Однако при клинически выраженной гемофилии А развиваются тяжелый геморрагический синдром, в генезе которого определяющую роль играет недостаточность формирования тромбина из-за отсутствия положительной обратной связи от тромбина на ф.VIII.

Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания – крайнее проявление активации системы гемостаза с включением всех его звеньев за счет положительных и отрицательных обратных связей. Основопологающее событие в генезе острого синдрома ДВС – чрезмерная активация свертывающей системы крови с образованием избытка тромбина. Постоянное присутствие в системе циркуляции тромбина сопровождается активацией тромбоцитов с падением их уровня за счет агрегации и потребления, активацией факторов свертывания крови, антикоагулянтов, выпадением фибрина и повышением активности фибринолиза (рис. 1.22). При постоянном повышенном уровне тромбина практически все звенья и компоненты гемостаза могут активироваться путем положительных и отрицательных обратных связей, что приводит к истощению как тромбоцитов, так и плазменных факторов – тромбоцитопатии и коагулопатии потребления.

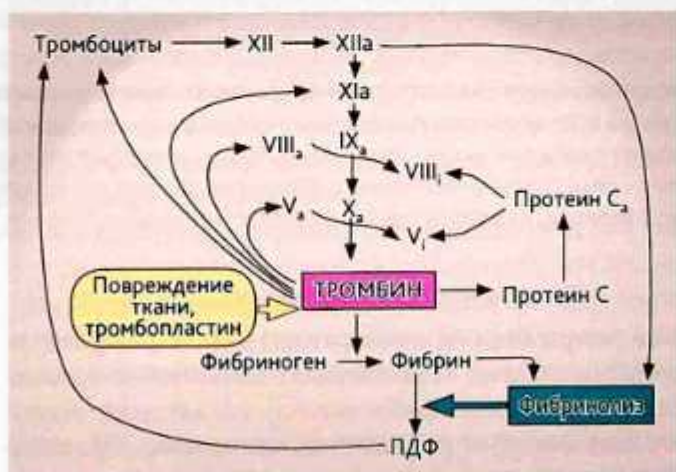


Рис. 1.22. Множественные обратные связи, задействованные в патогенезе синдрома ДВС. Избыток тромбина, вызванный повреждением ткани и активацией системы коагуляции, приводит к активации тромбоцитов, факторов свертывания крови, антикоагулянтов, сопровождается повышением активности фибринолиза. Формируются порочные круги активации и дезактивации, которые приводят к тромбоцитопении и коагулопатии потребления

Принцип избыточности

Содержание компонентов гемостаза, в том числе тромбоцитов, плазменных факторов свертывания в системе циркуляции существенно больше, чем необходимо для формирования тромба. Процесс свертывания происходит в условиях насыщения субстратами (рис. 1.23). Гемостатический баланс сохраняется в широком диапазоне концентрации компонентов системы гемостаза. Клинические проявления геморрагического синдрома развиваются, как правило, при значительном снижении того или иного компонента. В то же время у гемостазиологически здоровых пациентов при травмах, особенно связанных с хирургическим лечением, выраженность геморрагических проявлений может быть различна. В таких ситуациях бывает сложно провести границу между нормой и минимальной геморрагической патологией.



Рис. 1.23. Соотношение между концентрацией факторов и скоростью процесса свертывания. В норме скорость коагуляции практически не определяется концентрацией факторов, так как они присутствуют в избытке, процесс свертывания крови происходит в состоянии насыщения компонентами. Только после значительного истощения фактора его концентрация будет влиять на скорость реакции, и соответственно, на скорость свертывания крови

Проявления принципа избыточности

Определение содержания (концентрации) отдельных факторов гемостаза при первичных скрининговых исследованиях гемостаза не проводят (за исключением определения количества фибриногена), так как даже значительные колебания концентрации факторов не являются, как правило, причиной нарушений коагуляции. Поэтому основной подход при оценке плазменного гемостаза — это клоттинговые методы, которые оценивают функциональное состояние отдельных участков системы по времени коагуляции, от запуска соответствующего каскада до момента выпадения фибрина. Если же имеется подозрение на наследственную или приобретенную коагулопатию, тогда исследуется содержание отдельных компонентов гемостаза.

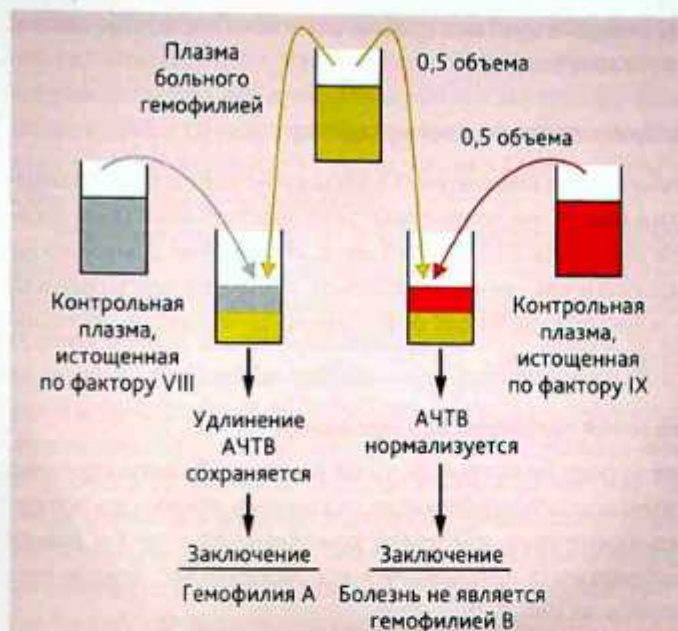


Рис. 1.24. Принцип проведения коррекционной пробы при гемофилии. К плазме больного добавляются плазмы, дефицитные по одному из факторов – ф. VIII или ф. IX. Если свертывание после добавления не восстанавливается, то в плазме больного и дефицитной плазме отсутствует один и тот же фактор. Если свертывание плазмы восстанавливается до нормы, значит в плазме больного отсутствует другой фактор – не тот, который отсутствует в добавленной плазме

Коррекционные пробы или микс-тесты используются для определения типа гемофилии. Принцип проведения коррекционных проб представлен на рис. 1.24. Смешивание даже половинных доз контрольной плазмы, содержащей все факторы, с плазмой больного гемофилией позволяет восстановить нормальное свертывание. При использовании контрольных плазм, дефицитных по определенному фактору, выявить дефицит конкретного фактора удастся, если в контрольной плазме и в плазме больного гемофилией отсутствует один и тот же фактор, так как в этом случае восстановления нормального свертывания смешанной плазмы не происходит. Данный принцип применяется и для диагностики других коагулопатий и пофакторного анализа плазмы.

Гемофилия А – клинически значимые кровотечения даже при небольших травмах возникают у пациентов, если уровень ф. VIII меньше, чем 5% нормального содержания. В этом случае жизненно необходимо определять уровень (концентрацию) ф. VIII, так как лечение таких больных сводится к введению донорского ф. VIII. Аналогичная ситуация имеет место при гемофилии В, но в этом случае вводится ф. IX.

При синдроме ДВС развивается коагулопатия потребления, то есть истощаются несколько факторов коагуляции и естественных антикоагулянтов и развивается тромбо-геморрагический синдром. Наиболее эффективным способом коррекции коагулопатии потребления является использование криоплазмы. Криоплазма – это плазма, замороженная в течение 1 часа от момента взятия крови у донора. В этой плазме сохраняются все компоненты как плазменного гемостаза, так и системы антикоагулянтов. Не выясняют, какой компонент истощен больше, какой мень-

медиатором воспаления в участке повреждения. Фактор XIIa активирует C1-компонент комплемента, что в конечном счете приводит к аутолизу поврежденных клеток и активации гуморального и клеточного иммунитета. Таким образом, повреждение сосудистой стенки через механизм контактной активации запускает сетевые механизмы реагирования, которые могут реализоваться разными клиническими проявлениями.

Аспиринный эффект. Ацетилсалициловая кислота является нестероидным противовоспалительным препаратом – ингибитором циклооксигеназы (ЦОГ). ЦОГ формирует из арахидоновой кислоты (освобождается из фосфолипидов поврежденной клеточной мембраны) эндоперикиси, которые затем в лейкоцитах превращаются в лейкотриены – медиаторы воспаления, в эндотелиальных клетках – в простагландины и простациклин, в тромбоцитах – в тромбоксан (рис. 1.26). Ацетилсалициловая кислота (Аспирин®) ацетирует и ингибирует фермент ЦОГ 1-го типа в тромбоцитах и эндотелиальных клетках, что способствует ингибированию синтеза в них соответственно тромбоксана (TxA₂) и простациклина (ПГІ₂). Инактивация происходит очень быстро и практически необратимо. Тромбоциты не способны ресинтезировать ЦОГ (они получают ее из мегакариоцитов), тогда как метаболически активные эндотелиальные клетки вновь ресинтезируют ЦОГ и восстанавливают образование ПГІ₂, поэтому ацетилсалициловая кислота в первую очередь подавляет метаболизм арахидоновой кислоты в тромбоцитах и тем самым оказывает антиагрегантный эффект. Аспирин достаточно широко используется для лечения и как профилактическое средство артериальных тромбозов. Однако не следует применять его в очень высоких концентрациях, так как при этом может быть заблокировано образование простациклина и возникнут тромботические осложнения. Необходимо также учитывать возможность активации шунтирующего пути через ЦОГ 2-го типа со снижением эффекта аспирина.



Рис. 1.26. Каскады производных арахидоновой кислоты. Арахидоновая кислота (C24, имеет 4 ненасыщенные двойные связи) под влиянием циклооксигеназы и пероксидазы в лейкоцитах превращается в медиаторы воспаления лейкотриены, в эндотелиальных клетках – в дезагрегант простациклин и простагландины, в тромбоцитах – в проагрегант тромбоксан. Аспирин ингибирует циклооксигеназу

Современная модель свертывания крови

Представления об основных принципах и формах организации системы гемостаза менялись по мере накопления фундаментальных и клинических знаний. За 160 лет от классического трехкомпонентного представления Вирхова через теорию коагуляционного каскада (пирамиды) научное сообщество перешло к современной модели гемостаза, которая была предложена в конце XX – начале XXI века и получила название клеточной теории. Согласно последним представлениям, в гемостатические реакции на всех этапах вовлечены и играют ключевую роль различные клетки и клеточные мембраны: тромбоциты, моноциты, нейтрофилы, эндотелиальные клетки. Общебиологические принципы, описанные выше, в полной мере реализуются и нисколько не противоречат этим подходам. Более того, признано, что в ситуации *in vivo* внутренний и внешний пути не разделяются и функционируют совместно; такое разделение весьма условно и применимо в большей мере к моделированию гемостатических реакций *in vitro*.

В современной модели активации плазменного гемостаза выделяют несколько фаз.

- **Фаза инициации** – запуск свертывания крови в ответ на повреждение сосудистой стенки и появление тканевого фактора, который соединяется с фактором VIIa. Небольшое количество активной формы ф. VIIa, готового к работе, всегда находится в кровотоке, что отличает ф. VII от других факторов свертывания. В результате образуется небольшое количество тромбина, который активирует тромбоциты и превращает ф. V и ф. VIII в активные формы. Также активируются ф. XI, ф. X по принципу обратной связи. Пока в небольшом количестве. Уже на этом этапе под действием тромбина и других биологически активных веществ начинается активация тромбоцитов, мембрана которых служит в дальнейшем основной матрицей для последующих реакций.
- **Фаза амплификации** свертывания крови – дальнейшая активация коагуляции тромбином. Комплекс «фактор Виллебранда – ф. VIII» связывается с тромбоцитами, ф. VIII освобождается из комплекса и активируется тромбином. При активации из тромбоцитов высвобождается ф. V, который активируется ф. Xa или тромбином. Таким способом запускается каскад биохимических реакций, который лавинообразно, но на ограниченном пространстве в зоне повреждения, ведет к дальнейшим событиям.
- **Фаза распространения** – в результате активации всей системы формируется значительное количество протромбиназы и большое количество тромбина, превращающего фибриноген в фибрин. Процесс приводит к очень быстрому формированию локального фибринового сгустка, закрывающего поврежденную поверхность. Часто фазы усиления и распространения объединяют в один процесс, а третью фазу называют фазой генерации тромбина и фибрина.

- *Фаза стабилизации* – упрочнение первично рыхлого фибринового сгустка под действием фибриназы (ф. XIII) и образование плотного, поперечно-сшитого фибринового тромба с последующей его ретракцией (стягиванием) под действием тромбоцитарных белков. Этот тромб подвергается действию системы фибринолиза (плазмина), высвобождая в кровоток продукты деградации фибрина, в частности D-димер.

Роль фактора XII в современной модели пересмотрена, и акценты смещены на его значение для фибринолиза. Правильность такого подхода подтверждается тем, что дефицит ф. XII не сопровождается клиническими проявлениями кровоточивости как у пациентов, так и в экспериментальных моделях, а в ряде случаев отмечается повышенное тромбообразование.

Клеточные основы функционирования системы гемостаза подтверждаются ее органичным включением в работу многих органов и тканей организма, тесной связью гемостатических, иммунных и онкологических процессов.

Лабораторные исследования системы гемостаза также базируются на принципах организации системы гемостаза. Врач, знающий принципы организации и закономерности функционирования коагуляционных реакций, способен предложить адекватную программу лабораторного обследования для пациента. Избыточное или нецелое исследование с применением многочисленных тестов может не только не помочь, но и увести в сторону от выяснения истинных причин нарушения свертывания крови.

В последующих главах будут изложены принципы лабораторных методов исследования системы гемостаза, типичные патологические процессы, даны рекомендации по лабораторному тестированию наиболее распространенных нарушений, принципы коррекции и лабораторные методы мониторинга терапии.

Вопросы к главе 1

1. Если используется стеклянная посуда при исследовании свертывания крови, то ее рекомендуется силиконировать. С какой целью?
2. Почему при попадании крови даже на полностью стерилизованную поверхность стола ее нельзя собирать и использовать для определения тестов коагулограммы?
3. Почему перед взятием венозной крови нельзя сильно и надолго пережимать предплечье?
4. Влияют ли суточные ритмы синтеза факторов плазмы на результаты скрининговых тестов коагулограммы?
5. Обязательно ли исследовать коагулограмму в утренние часы до завтрака?
6. В чем состоит некорректность фразы «пятый фактор свертывания крови»?
7. В каких единицах и какой размерности определяют клоттинговые тесты?
8. Каковы функции плазменных факторов в каскадной активации коагуляции?

9. Что может предупредить выпадение фибрина, если произошла активация каскада свертывания?
10. Почему факторы коагуляции могут относительно долго находиться в системе циркуляции?
11. Могут ли плазменные факторы, являющиеся протеолитическими ферментами, из активного состояния вновь восстановиться до проферментов?
12. Почему плазма не сворачивается при использовании таких комплексонов, как цитрат или оксалат?
13. Является ли образование избыточного количества факторов гемостаза в печени основной причиной гиперкоагуляции?
14. Каким образом транспортные белки, синтезируемые печенью, могут влиять на свертывание крови?
15. Чем обеспечивается локальность свертывания крови?

Тесты к главе 1

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

01.01. Коагулограммой называется:

- А) направление на исследование системы гемостаза
- Б) определение протромбинового времени
- В) исследование агрегационных свойств тромбоцитов
- Г) набор гемокоагулологических тестов, отвечающих на поставленную клиницистом задачу
- Д) проведение исследований гемостаза на коагулометре

01.02. Гемостазиологически активные белки плазмы крови являются в основном:

- А) протеолитическими системами
- Б) гормональными системами
- В) системами липопротеидов
- Г) водно-электролитной системой
- Д) иммунной системой

01.03. На рис. 1.27 показаны внутренний и внешний каскады активации протромбиназы. Какие плазменные факторы активируются под влиянием тромбина?

- А) XII, XI и IX
- Б) IX и VIII
- В) VII и X
- Г) XI, VIII и V
- Д) IX и V

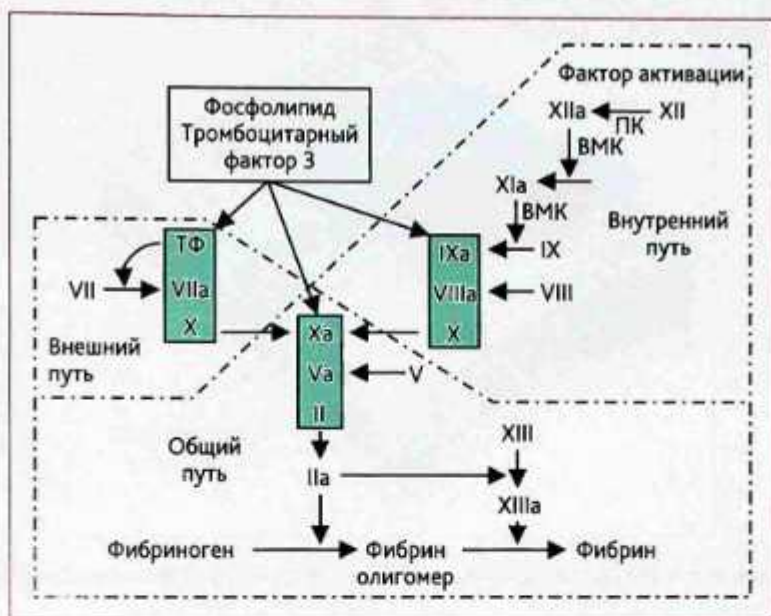


Рис. 1.27. Схема последовательных звеньев активации протромбиназы за счет внутреннего и внешнего каскадов плазменных факторов

01.04. К фактору контактной активации относится:

- А) фактор VII
- Б) фактор X
- В) фактор XII
- Г) протеин С
- Д) протромбин

01.05. Укажите источник фосфолипидной поверхности, изображенной на рис. 1.28, участвующий в сборке комплексов при активации плазменного гемостаза в организме человека

- А) эритроциты
- Б) эндотелий
- В) кефалин
- Г) активированные тромбоциты
- Д) фибрин

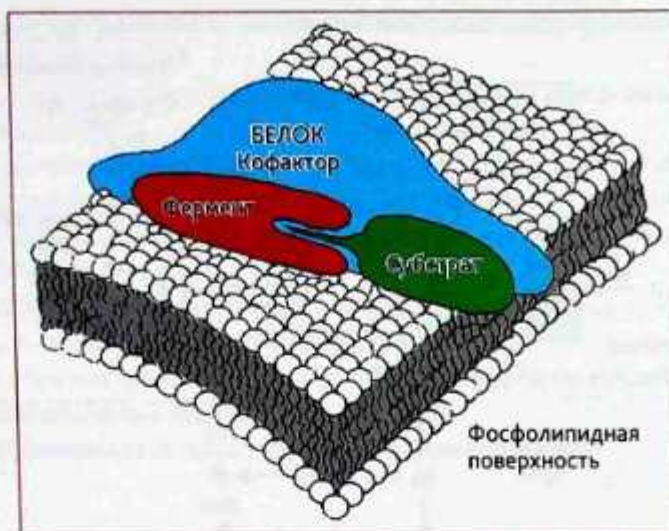


Рис. 1.28. Комплекс на фосфолипидной подложке, формирующийся при активации плазменных факторов

01.06. Тромбинообразованию препятствуют:

- А) ионы кальция
- Б) кининоген высокой молекулярной массы
- В) фактор Виллебранда
- Г) антикоагулянты
- Д) фибриноген

01.07. Для современной модели свертывания крови верно утверждение:

- А) Факторы свертывания крови находятся в кровотоке в активном состоянии
- Б) Гемостатические реакции происходят с активным участием тромбоцитов, белков крови и сосудистой стенки
- В) Гемостатические реакции *in vivo* происходят или по внешнему, или по внутреннему пути
- Г) Фактор XII имеет большее значения для коагуляции, чем для фибринолиза
- Д) Тромбоциты формируют агрегаты в зоне повреждения и не имеют значения для плазменных реакций гемостаза

01.08. При гемофилии имеется дефицит факторов:

- А) плазменного гемостаза
- Б) тромбоцитов
- В) лейкоцитов
- Г) эндотелия
- Д) фибринолиза

01.09. Под термином «система гемостаза» понимают тесное взаимодействие неразрывно связанных друг с другом:

- А) клеток крови и плазменных факторов
- Б) эндотелия сосудистой стенки и тромбоцитов
- В) факторов плазменных, фибринолиза и антикоагулянтов
- Г) комплемента и калликреин-кининовой системы
- Д) сосудистой стенки, тромбоцитов и белков плазмы крови

01.10. Принцип сборки комплексов обосновывает механизм:

- А) кровотока
- Б) антикоагулянтного эффекта
- В) локального тромбообразования
- Г) фибринолиза
- Д) активации нескольких протеолитических систем

Глава 2. СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ

После повреждения сосудов формируется цепь реакций, которая приводит к остановке кровотечения. Последовательность событий включает реакции со стороны сосудистой стенки, тромбоцитов, плазменных факторов и затем фибринолиза и антикоагулянтов. Наиболее активно и быстро реагируют на повреждение сосудистая стенка и тромбоциты, поэтому их реакцию принято обозначать как первичный сосудисто-тромбоцитарный гемостаз. Реакцию со стороны плазменного звена, фибринолиза и антикоагулянтов – как вторичный гемостаз (рис. 2.1). Разделение это условно, в действительности реакция на повреждение комплексная, доминирование того или иного компонента зависит от типа и глубины повреждения.



Рис. 2.1. Компоненты гемостаза. Сосудистая стенка и тромбоциты, как наиболее быстро реагирующие компоненты, отнесены к первичному гемостазу; плазменные факторы, компоненты фибринолиза и антикоагулянты – к вторичному гемостазу

Структура и функции эндотелия сосудистой стенки

Кровь в организме человека протекает по замкнутой системе кровеносных сосудов. Сосуды не только пассивно ограничивают объем циркуляции и механически предотвращают кровопотерю, но и обладают целым спектром активных функций в гемостазе:

- механическое ограничение кровотока;
- регуляция кровотока по сосудам, в том числе спастическая реакция поврежденных сосудов;
- регуляция гемостатических реакций путем синтеза и представления на поверхности эндотелия и в субэндотелиальном слое белков, пептидов и небелковых веществ, непосредственно участвующих в гемостазе;
- представление на поверхности клеток рецепторов для энзиматических комплексов, вовлеченных в коагуляцию и фибринолиз.

Сосудистая стенка имеет активную поверхность, с внутренней стороны выстланную эндотелиальными клетками. Эндотелий – активный эндокринный ор-

ган, диффузно рассеянный вместе с сосудами по всем тканям. Эндотелий, по классическому определению гистологов, – однослойный пласт специализированных клеток, выстилающих изнутри все сердечно-сосудистое дерево, весом около 1,8 кг. Это триллион клеток со сложнейшими биохимическими функциями, включающий системы синтеза белков и низкомолекулярных веществ, рецепторы, ионные каналы. В физиологических условиях неповрежденный эндотелий, контактирующий с кровью, имеет характеристики клеточных мембран, по течению характерных для жидкого тела; это способствует поддержанию жидкого состояния крови. Эндотелий формирует на поверхности и выделяет в кровоток вещества, которые препятствуют свертыванию (табл. 2.1). Это свойство предотвращает образование тромба на интактном эндотелии и в случае повреждения ограничивает рост тромба за пределы дезэндотелизации.

Таблица 2.1. Продукты эндотелиоцитов, участвующие в гемостазе

Антикоагулянты	Прокоагулянты
Гепарансульфат	Тканевой фактор
Тромбомодулин	Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1)
Аденозиндифосфатаза	Фактор Виллебранда
Простаглицлин, PGE_2 , PGD_2	Рецептор для фактора Ха
Оксид азота	Коллаген IV (рецептор для фактора IX)
Тканевой активатор плазминогена	Индукцированный гипоксией активатор фактора X
Урокиназный активатор плазминогена	Липополисахаридиндуцированный активатор протромбина
Ингибитор пути тканевого фактора	
Аннексин II и V	
Эндотелиальный рецептор протеина C	
Протеин S	
Эндотелий-продуцируемый фактор релаксации	

При повреждении или воспалении стенка сосуда принимает участие в образовании тромба. Субэндотелиальные структуры, контактирующие с кровью только при повреждении или развитии патологического процесса, обладают мощным тромбогенным потенциалом. Кроме того, эндотелий в зоне повреждения активируется, и у него появляются прокоагулянтные свойства.

Антикоагулянтная активность интактного эндотелия

Антикоагулянтные свойства эндотелия обеспечиваются несколькими механизмами.

- Интактный эндотелий имеет мембраны с высокой текучестью, что является условием поддержания в неактивной форме клеточных и плазменных компонентов системы гемостаза.
- Эндотелий предотвращает контакт крови с субэндотелиальными структурами, обладающими выраженными прокоагулянтными свойствами.
- Интактный эндотелий синтезирует, выделяет в кровь или представляет на своей поверхности вещества, препятствующие коагуляции, адгезии, агрегации и спазму сосудов.

Гликокаликс

Со стороны просвета сосуда на поверхности эндотелиальных клеток сформирован слой гликокаликса, состоящий из протеогликанов, гликопротеидов, гликолипидов (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Гликокаликс эндотелиального покрова представляет собой молекулярный слой, состоящий из протеогликанов, гликопротеидов, гликолипидов, именно в нем осуществляются пристеночные метаболические процессы. Слой гликокаликса практически предупреждает прямой контакт клеток крови с поверхностью эндотелиальных клеток

Основу гликокаликса образуют молекулы протеогликанов (рис. 2.3). На долю гепарансульфата в некоторых зонах эндотелиального покрова приходится до 80% глюкозаминогликанов. Гепарансульфат обладает мощным антикоагулянтным действием. Именно гепарансульфат служит основой гепарина, когда последний получают вытяжкой из биологических тканей. Комплекс «гепарансульфат–антитромбин» является самым активным ингибитором свертывания. На его долю приходится около 80% антикоагулянтной активности крови.

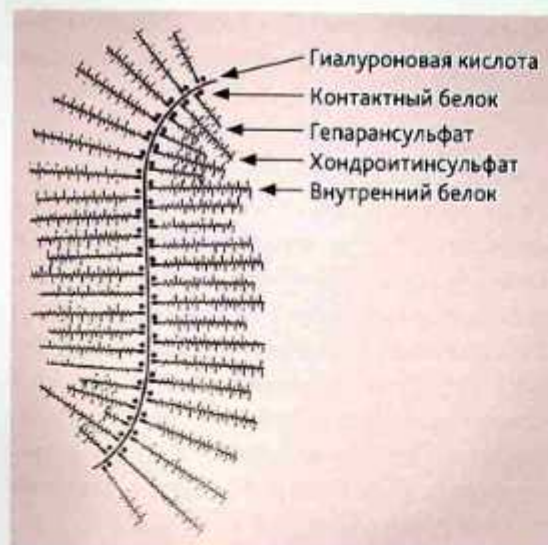


Рис. 2.3. Протеогликан – основной элемент гликокаликса, сформированного на поверхности сосудистой стенки. Стержнем протеогликанов служит очень длинный филамент гиалуроновой кислоты. К гиалуронату с помощью контактных белков крепятся внутренние (ядерные) белки. Основными элементами протеогликанов являются цепочки глюкозаминогликанов, в частности гепарансульфата и хондроитинсульфата, расположенные на внутреннем (ядерном) белке. На одной молекуле ядерного белка длиной около 300 нм размещается до 200 молекул глюкозаминогликанов

Отрицательный поверхностный заряд

Крайними молекулами глюкозаминогликанов, как правило, являются **сиаловые кислоты**, которые формируют отрицательный поверхностный заряд. Клетки крови также имеют на поверхности сиаловые кислоты, поэтому между поверхностью сосудистой стенки и клетками крови формируются силы электростатического отталкивания – дзета-потенциал. Величина его очень незначительна – несколько десятков милливольт. Однако этого вполне достаточно, чтобы эритроциты отталкивались от стенки сосуда.

Пристеночный молекулярный слой

Внутренние пространства протеогликанов гидратированы и формируют вязкий гель, устойчивый к компрессионному давлению. В результате образуется пристеночный молекулярный слой, куда, с одной стороны, не проникают крупные клеточные элементы, с другой стороны, именно в этом слое функционируют такие ферменты как липопроотеинлипаза, целый ряд АДФаз, ферменты, разрушающие кинины, серотонин, норадреналин и другие биологически активные вещества, в том числе обладающие прокоагулянтной активностью. Особенно сильно развит этот слой в сосудах легких, поэтому при прохождении крови через легкие происходит детоксикация до 80–90% вазоактивных веществ.

Контроль активности тромбоцитов

Способность интактного эндотелия контролировать активность тромбоцитов связана с постоянным синтезом простациклина, экто-аденозиндифосфатазы и оксида азота (NO), которые препятствуют активации, адгезии и агрегации тромбоцитов. К антитромбоцитарным свойствам эндотелия относится его способность

удалять из кровотока АДФ – важнейшего активатора тромбоцитов. При этом разрушение АДФ и других аденонуклеотидов (АТФ, АМФ) приводит к образованию аденозина – молекулы, которая препятствует активации тромбоцитов.

Оксид азота (NO)

Оксид азота – низкомолекулярная и не несущая заряда молекула, способная быстро диффундировать и свободно проникать через плотные клеточные слои и межклеточное пространство. По строению NO содержит неспаренный электрон, имеет высокую химическую активность и легко реагирует со многими клеточными структурами и химическими компонентами, что обуславливает исключительное многообразие ее биологических эффектов. Эндогенный NO – важный компонент системы регуляции кальциевого гомеостаза в клетках, и соответственно, активности Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ. Образование NO в организме происходит при ферментативном окислении L-аргинина. Синтез NO осуществляется семейством цитохром – P-450-подобных гемопротеинов – NO-синтаз.

NO – мощный антиагрегант, подавляет активность тромбоцитов за счет повышения цГМФ. NO образуется в сосудистой стенке под влиянием постоянно экспрессированной на эндотелии NO-синтазы. Брадикинин, гистамин, ацетилхолин повышают образование и освобождение NO из эндотелиальных клеток. NO вызывает вазодилатацию, но может вызывать и вазоконстрикцию.

Простаглицлин (PGI_2)

Простаглицлин образуется в эндотелиальных клетках из полиненасыщенной арахидоновой кислоты при участии специфического мультиферментного комплекса циклооксигеназы. Это самый сильный из известных ингибиторов адгезии и агрегации тромбоцитов. Простаглицлин защищает места спонтанной репарации эндотелия, где создаются кратковременно участки дезэндотелизации. Антиагрегационное действие простаглицлина связано со способностью усиливать действие аденилатциклазы тромбоцитов. Это ведет к увеличению синтеза цАМФ, удалению ионов Ca^{2+} в плотные гранулы и снижению способности тромбоцитов к агрегации (рис. 2.4).

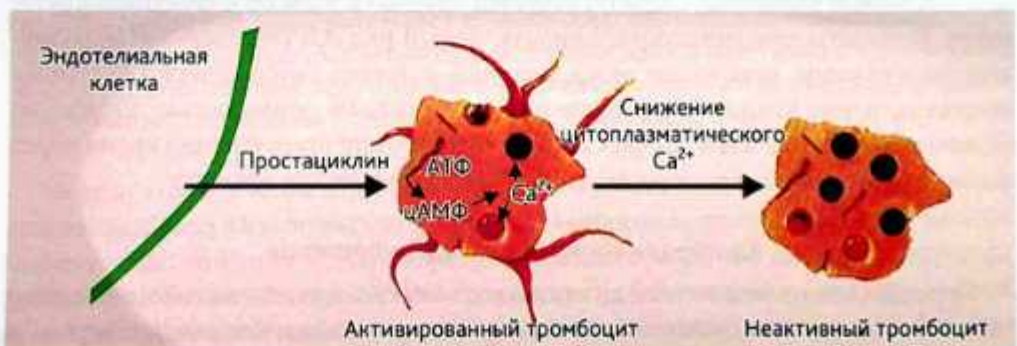


Рис. 2.4. Механизм подавления активации тромбоцитов путем выработки простаглицлина

Интактный эндотелий синтезирует, выделяет в кровь или представляет на своей поверхности несколько активных молекул, которые за счет разных механизмов подавляют активацию плазменного гемостаза:

- ингибитор внешнего пути свертывания (TFPI);
- тромбомодулин, протеин С, протеин S;
- тканевой активатор плазминогена (t-PA).

Функция этих белков будет представлена ниже.

Прокоагулянтная роль эндотелия, регуляция сосудистого тонуса

В ответ на различные стимулы эндотелиоциты отвечают активацией и изменением направленности воздействия на гемостаз. Наиболее значимыми стимулами, активирующими эндотелиоциты, являются воспалительные цитокины, эндотоксины, тромбин, гистамин, гипоксия, свободные радикалы кислорода, турбулентные потоки крови, внутриклеточные инфекционные агенты, механические повреждения, иммунные комплексы.

Прокоагулянтные свойства эндотелия

У стимулированных эндотелиальных клеток появляются прокоагулянтные свойства:

- стимулированные эндотелиоциты могут представлять на своей поверхности тканевой фактор (ТФ);
- на стимулированных эндотелиальных клетках снижается количество тромбомодулина;
- они начинают активно синтезировать и секретировать молекулы адгезии – коллаген, фибронектин, тромбоспондин, ламинин, селектины, а также ингибитор активатора плазминогена PAI-1, что препятствует активации фибринолиза, и фактор активации тромбоцитов;
- из пула хранения эндотелиоцитов (тельца Вайбеля–Паладе) высвобождается фактор Виллебранда; наиболее активными стимулами высвобождения фактора Виллебранда являются тромбин и гистамин;
- происходит изменение фосфолипидного состава наружной поверхности мембраны эндотелиальных клеток с появлением рецепторов для ферментных комплексов коагуляционного каскада.

Помимо прямого влияния активированных эндотелиальных клеток на гемостаз существует обратное влияние белков гемостаза на эндотелиальные клетки. Комплекс «фактор VIIa – ТФ», тромбин, фактор Ха передают сигналы на эндотелиоциты, вызывающие выработку медиаторов, влияющих на глубокие слои сосудистой стенки, в частности на гладкомышечные клетки меди. Как правило, эти влияния вызывают сокращение гладкомышечных клеток и спазм сосудов, особенно выражено в области прекапиллярных сфинктеров.

Роль эндотелия в регуляции сосудистого тонуса

В течение нескольких секунд после повреждения сосудистой стенки происходит сокращение поврежденного и соседних кровеносных сосудов, свободные края сосуда вокруг повреждения вворачиваются внутрь кровеносного русла, при этом кровоток в месте повреждения частично перекрывается. Ведущую роль в регуляции этих изменений выполняет эндотелин.

Эндотелин

Эндотелин (ЭТ) относится к числу биологически активных бициклических полипептидов широкого спектра действия. На сегодняшний день эндотелин является одним из наиболее значимых регуляторов функционального состояния эндотелия сосудов. Эндотелин – пептидный гормон, состоящий из 21 аминокислоты, относится к группе цитокинов, имеет 3 изоформы (ЭТ-1, ЭТ-2 и ЭТ-3). Образуется эндотелин из предшественника препро-ЭТ (который иногда обозначается как большой эндотелин) при участии металлопептидазы – эндотелин-превращающего фермента.

Концентрация эндотелина-1 в плазме крови человека в норме 0,1–1 фмоль/мл или не выявляется. Именно уровень концентрации определяет, какой эффект (расслабление или сокращение) будет реализован. При невысоких концентрациях эндотелин действует на эндотелиальные клетки, высвобождая факторы релаксации, а повышение концентрации активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, и наблюдается сосудистый спазм.

ЭТ-1 – наиболее сильный вазоконстриктор из всех известных факторов, доминирует в эндотелиальных клетках сосудов человека. Синтез ЭТ-1 и освобождение его из эндотелиальных клеток стимулируют тромбин, адреналин, ангиотензин, вазопрессин, некоторые цитокины. ЭТ-1 является самым мощным вазоконстриктором, который в 10 раз сильнее ангиотензина II и в 100 раз превышает эффект норадреналина. При определении аминокислотной последовательности установлено, что данный белок имеет колоссальное сходство с токсическим компонентом яда пауков и некоторых видов змей, но незначительные различия в химической структуре яда и эндотелина являются существенными для специфики связывания лигандов с рецепторами эндотелинов.

Большая часть ЭТ секретируется внутрь сосудистой стенки, где расположены специфичные высокоаффинные рецепторы. ЭТ, секретируемый наружу, взаимодействует с собственными рецепторами на клеточной мембране, а также стимулирует ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), который переводит неактивный ангиотензин I в вазоконстриктор ангиотензин II (рис. 2.5).

Дисбаланс эндотелий-зависимой сократимости и релаксации сосудов при артериальной гипертензии может способствовать повышению общего периферического сопротивления сосудов и появлению сердечно-сосудистых осложнений. Характерно увеличение эндотелина крови с возрастом. Наиболее высокий уровень эндотелина отмечен при атеросклерозе, неспецифическом аортоартериите,

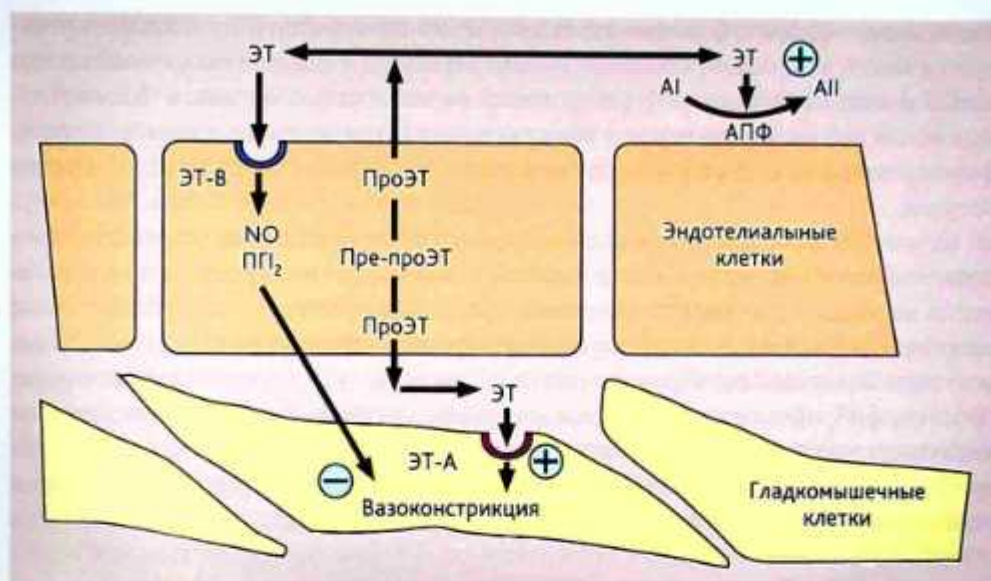


Рис. 2.5. Эндотелин – основной вазоконстриктор сосудистой стенки, вырабатывается и реализуется сосудистым эндотелием. ЭТ – эндотелин, AI и AII – ангиотензин I и ангиотензин II, АПФ – ангиотензинпревращающий фермент, ЭТ-А и ЭТ-В – рецепторы к эндотелину

облитерирующем тромбангиите, т. е. при заболеваниях, протекающих с повреждением эндотелия.

Определение ЭТ-1 используется в качестве лабораторного теста активности процесса повреждения сосудистой стенки и прогноза течения болезни.

Таким образом, эндотелий обладает выраженными эффектами, которые в первую очередь реализуются в системе гемостаза. Причем эндотелий способен оказывать как прокоагулянтные, так и антикоагулянтные эффекты. Взаимодействие и соотношение прокоагулянтных и антикоагулянтных компонентов и эффектов эндотелиальных клеток в конкретных ситуациях до конца непонятны. Кроме того, факторы, вырабатываемые эндотелием, участвуют в регуляции сосудистого тонуса, перераспределении крови между тканями и органами, в процессах репарации и пролиферации. Эти функции столь разнообразны, что порой об эндотелии говорят не как об одноклеточном пласте, покрывающем внутреннюю поверхность сосудов, а как о диффузном органе со специфическими функциями и характеристиками.

Субэндотелий

В состав субэндотелиальной базальной мембраны (см. рис. 1.6) входят разные типы коллагена, фибронектин, витронектин, ламинин, протеогликаны, гликозаминогликаны, тромбоспондин, фактор Виллебранда, а в местах повреждения и

воспаления – фибрин. Большая часть этих компонентов синтезируется и секретируется эндотелиальными клетками, однако перициты и гладкие мышечные клетки также вносят свой вклад в формирование внеклеточного матрикса. Внеклеточные белки субэндотелия играют важную роль в межклеточном взаимодействии, формировании скелета сосуда, процессе клеточной адгезии, репарации и росте сосудов.

Структурные белки субэндотелия, характеризующиеся свойствами твердого тела, являются факторами контактной активации: адгезии тромбоцитов и активации каскадной системы свертывания крови. Повреждение сосудистой стенки сопровождается стимуляцией свертывания крови, прежде всего за счет механизма контактной активации. Прокоагулянтные свойства клеток субэндотелия (макрофагов, фибробластов, лейкоцитов и гладких мышечных клеток) обусловлены наличием на их поверхности тканевого фактора. Коллаген субэндотелия является субстратом для адгезии тромбоцитов. Связь коллагена со специализированными рецепторами тромбоцитов вызывает активацию последних.

Компоненты субэндотелиальных структур, участвующие в гемостазе

Тканевой фактор

Тканевой фактор (ТФ) – трансмембранный белок (рис. 2.6), локализован на клетках субэндотелия (фибробластах, макрофагах, гладких мышечных клетках). Предположительно ТФ есть на базальной мембране эндотелиоцитов, а на апикальной мембране он может появляться после активации клеток. ТФ в норме нет в системе циркуляции, на поверхности лейкоцитов или эритроцитов. В первой редакции ВОЗ-классификации факторов гемостаза для обозначения участия в свертывании плазмы ТФ ему был придан символ III. В настоящее время римская нумерация для ТФ не используется, так как он не относится к плазменным факторам свертывания. При этом именно из-за ТФ каскад активации протромбиназы,

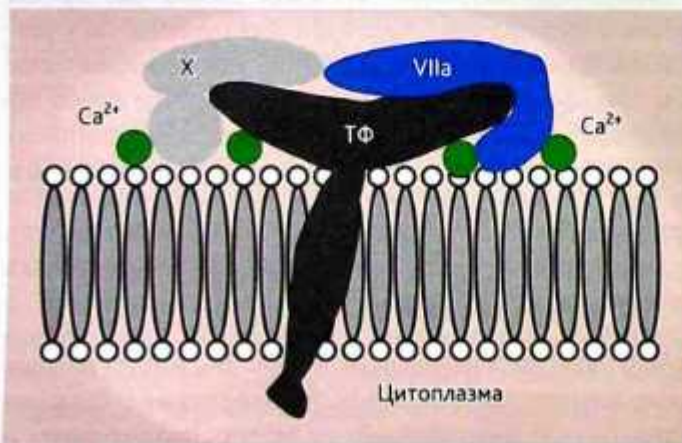


Рис. 2.6. Формирование активного комплекса внешнего пути активации свертывания на тканевом факторе. ТФ – тканевой фактор, VIIa – активный фактор VII свертывания крови (протеолитический фермент), X – неактивный фактор X свертывания крови (субстрат)

начинающийся с ТФ, обозначен как внешний (тканевой фактор – это компонент вне плазмы крови).

Роль ТФ в процессе свертывания крови заключается в связывании ф. VIIa и формировании активного комплекса, который в присутствии ионов Ca^{2+} активирован ф. X. Этот процесс является основным физиологическим путем запуска процесса свертывания крови при повреждении.

ТФ обладает очень большой тромбогенной активностью. При патологии он выявлен на некоторых опухолевых клетках. Это является одним из факторов риска развития тромбоза при онкологических заболеваниях.

ТФ присутствует практически во всех тканях, кроме сухожилий. Атеросклеротические бляшки и моноциты после стимуляции липополисахаридами (например, клеточной мембраной бактерий) или ИЛ-1 могут генерировать ТФ. После повреждения или после стимуляции клеток ТФ может экспонироваться или вновь синтезироваться. Физиологическими стимуляторами синтеза ТФ являются ИЛ-1, фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), фрагмент комплемента C5a. Повышение экспрессии ТФ на моноцитах обнаружено при воспалении, сепсисе, опухолях, при сердечно-сосудистой патологии, особенно у больных, перенесших инфаркт миокарда, после экстравазкулярной циркуляции крови. Имеются отдельные сообщения, что стероидные контрацептивы, принимаемые внутрь, курение вызывают повышение ТФ в системе циркуляции, что увеличивает риск тромбоза.

Определение экспрессии ТФ на моноцитах проводят методом проточной цитометрии. Есть предположения, что этот метод для оценки состояния гиперкоагуляции в будущем может заменить коагулометрические методы, проводимые на цельной крови.

Коллаген

Коллагены – наиболее распространенные белки в организме животных. Они составляют 25% от общего количества белка. Коллагены образуют нерастворимые нити (фибриллы), которые входят в состав межклеточного матрикса и соединительных тканей.

Типичная молекула коллагена состоит из трех полипептидных цепей разных типов (α -спиралей), скрученных в виде тройной спирали. В свою очередь, полипептидные цепи построены из часто повторяющихся фрагментов, имеющих характерную последовательность -Gly-X-Y-. Каждым третьим аминокислотным остатком является глицин. Пролин (Pro) часто встречается в положениях X, положение Y может быть занято как пролином, так и 4-гидроксипролином (4Hyp). Кроме того, молекула коллагена содержит остатки 3-гидроксипролина (3Hyp) и 5-гидроксизина (5Hyl). Присутствие в полипептидной цепи остатков гидроксисаминнокислот является характерной особенностью коллагена. Остатки пролина и лизина гидроксилируются посттрансляционно, т. е. после включения в полипептидную цепь. На одном из концов молекула коллагена сшита поперечными

связями, образованными боковыми цепями остатков лизина. Количество поперечных связей возрастает по мере старения организма. Известно, по крайней мере, 12 вариантов коллагена, характеризующихся разными сочетаниями полипептидных α -цепей. Молекулы коллагенов обладают свойством спонтанно агрегировать с образованием более сложных структур, микрофибрилл и фибрилл. Большинство коллагенов образуют фибриллы цилиндрической формы (диаметром 20–500 нм) с характерными поперечными полосами, повторяющимися через каждые 64–67 нм.

В гемостазе коллагены выполняют несколько важных функций.

- Они образуют эластичный «каркас» сосуда и во многом определяют его прочность, устойчивость к нагрузкам и реологические характеристики.
- Коллаген III и VI типов обладает высокой прокоагулянтной активностью, связывая с высокой аффинностью фактор Виллебранда, и тем самым обеспечивает адгезию тромбоцитов.
- Коллаген I и IV типов непосредственно взаимодействует с тромбоцитарным рецептором GP Ia-IIa, следствием чего также является адгезия тромбоцитов.
- Коллаген I, III, IV и V типов активируют тромбоциты, воздействуя непосредственно на тромбоцитарные рецепторы или опосредованно через фактор Виллебранда. Это влечет за собой изменение формы тромбоцитов, их адгезию и дегрануляцию.

Фибронектин

Фибронектин представлен в организме двумя основными формами: нерастворимой формой межклеточного матрикса и растворимой формой плазмы крови. Нерастворимый фибронектин – это неколлагеновый структурный гликопротеин межклеточного матрикса, синтезируемый и выделяемый в межклеточное пространство эпителиальными клетками и фибробластами. Растворимый, или плазменный, фибронектин синтезируется гепатоцитами. Это гликопротеин, концентрация циркулирующего фибронектина составляет 0,25–0,4 г/л. Обе формы фибронектина способствуют адгезии и распространению эпителиальных и мезенхимальных клеток, стимулируют пролиферацию и миграцию эмбриональных и опухолевых клеток, контролируют дифференцировку и поддержание цитоскелета клеток, активно участвуют в воспалительных и репаративных процессах.

Фибронектин состоит из двух практически идентичных полипептидных цепей, каждая по 220 кДа, соединенных дисульфидными мостиками у своих С-концов (рис. 2.7). Димерная структура позволяет ему функционировать как молекулярный клей. Полипептидная цепь фибронектина содержит 7–8 доменов, на каждом из которых расположены специфические центры для связывания коллагена, протеогликанов, гиалуроновой кислоты, углеводов и фосфолипидов плазматических мембран, гепарина. Фибронектин выполняет интегрирующую роль в организации межклеточного вещества, способствует адгезии клеток.

Фибронектин играет существенную роль в образовании фибринового сгустка, адгезии и агрегации тромбоцитов, фибринолизе, хемотаксисе, фагоцитозе и

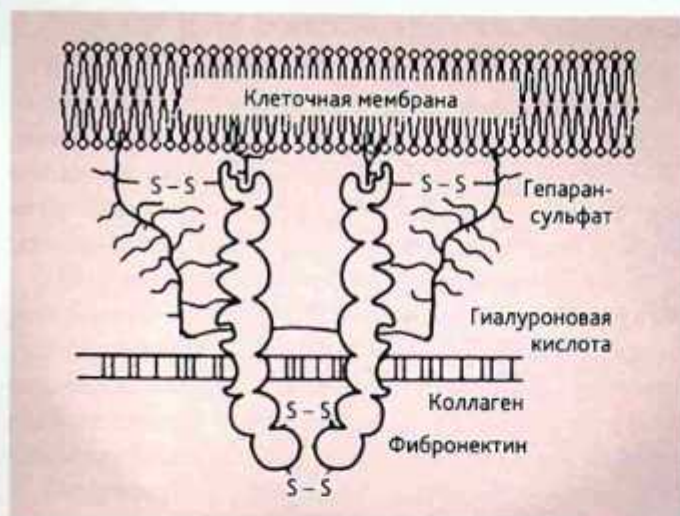


Рис. 2.7. Фибронектин – гликопротеид межклеточного матрикса. В субэндотелии он выполняет роль цементирующего элемента, так как состоит из нескольких доменов, способных связываться с коллагеном, протеогликанами, гиалуроновой кислотой, углеводами и фосфолипидами плазматических мембран, гепарином

опсонизации. Сниженный уровень фибронектина в плазме ассоциирован с сепсисом, травмой, может наблюдаться в послеоперационный период. Заболевания печени часто сопровождаются уменьшением уровня фибронектина. Фибронектин связывается с фибрином с помощью фактора XIII, поэтому его уровень в плазме может быть снижен при активации системы коагуляции. Фибронектин является белком острой фазы, его уровень может быть повышен во время острой фазы воспаления и осложненной беременности. Часто злокачественные опухоли ассоциированы с высоким уровнем фибронектина в плазме; в то же время в межклеточном матриксе, окружающем трансформированные (или опухолевые) клетки, количество фибронектина заметно снижено, что может быть одной из причин метастазов. Содержание фибронектина в плазме повышено более чем у половины больных со злокачественными опухолями печени, поджелудочной железы или желчевыводящих протоков. При первичном раке печени диагностическая чувствительность определения фибронектина выше, чем α -фетопротейна, при одновременном их определении – выше 80%. Диагностическое значение фибронектина ограничено его неспецифичностью и частым увеличением при доброкачественных опухолях.

Тромбоциты

Тромбоциты – безъядерные клетки, образующиеся вследствие отшнуровки фрагментов цитоплазмы мегакариоцитов в костном мозге. Около 1/3 всей массы тромбоцитов находится в селезенке (селезеночный пул): при спленомегалии этот пул возрастает, что может приводить к перераспределительной тромбоцитопении. При стимуляции адренорецепторов (физическая нагрузка, стресс) происходит выброс тромбоцитов в циркуляцию, что приводит к кратковременному тромбоци-

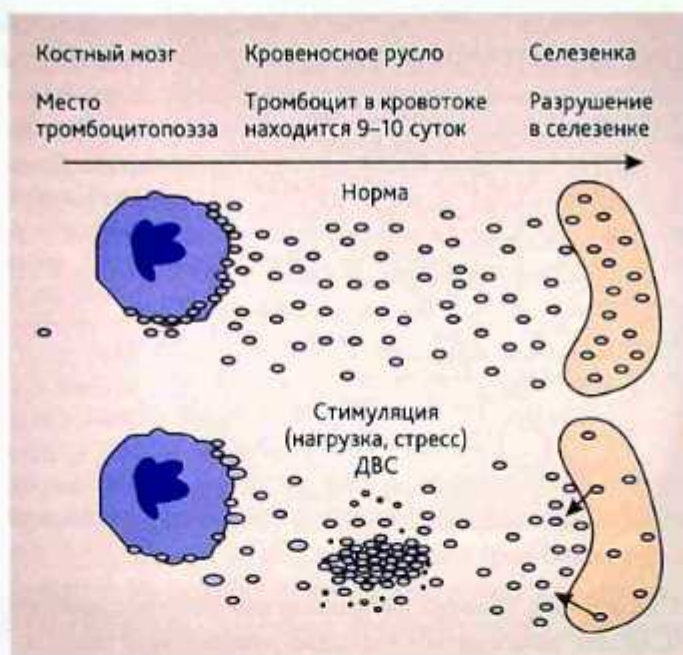


Рис. 2.8. Жизненный цикл тромбоцитов. Тромбоциты образуются в костном мозге из мегакариоцитов, около 2/3 периферического пула находится в системе циркуляции, 1/3 – в селезенке. При стимуляции адренорецепторов может возникнуть временный тромбоцитоз из-за выброса тромбоцитов в систему циркуляции из костного мозга и селезенки. При тромбоцитопении потребления могут появляться макротромбоциты с недостаточными функциональными свойствами адгезии и агрегации – возникает тромбоцитопатия

тозу (рис. 2.8). Остальные 2/3 тромбоцитов циркулируют в крови на протяжении 9–10 суток.

У здорового человека количество тромбоцитов может меняться в течение суток. В настоящее время наиболее распространенным референтным интервалом для количества тромбоцитов являются значения от 150 до 400 и даже $450 \times 10^9/\text{л}$. С помощью автоматических гематологических анализаторов можно измерить средний объем тромбоцитов (MPV), дисперсию распределения тромбоцитов по объему (PDW) и оценить гистограмму распределения тромбоцитов по объему, подсчитать тромбокрит.

Структура тромбоцитов

Интактные тромбоциты имеют форму диска или пластины диаметром 2,8–3,4 мкм, толщиной 0,8–1,2 мкм и объемом от 5,7 до 8,9 мкм³. В циркулирующем пуле преобладают зрелые пластинки диаметром 2–3 мкм (80–95%), «молодые» формы – макротромбоциты размером свыше 3 мкм составляют 1–10%, а «старые» – микротромбоциты менее 2 мкм – 3–15%.

Мембрана и цитоскелет тромбоцитов

Структура поверхностной мембраны тромбоцита сложна, она двухслойная, внедряется внутрь с образованием многочисленных переплетенных канальцев, связанных с внесклеточным пространством. Эта структура называется связанной с поверхностью канальцевой системой, или открытой канальцевой системой, на которой имеются те же гликопротеиды, что и на внешней мембране тромбоцитов. Это значительно увеличивает активную тромбоцитарную поверхность.

Непосредственно в подмембранном пространстве расположены плотные микротрубочки, образующие особую плотную микротубулярную систему, которая участвует в формировании цитоскелета тромбоцитов, является местом депонирования кальция и синтеза простагландинов. Выделяют мембранный цитоскелет, расположенный непосредственно под плазматической мембраной, тубулиновые микротрубочки и цитоплазматический актиновый скелет.

Наружная оболочка тромбоцитов (гликокаликс) содержит несколько разных гликопротеинов, которые являются рецепторами для адгезивных белков и индукторов агрегации и адгезии тромбоцитов. Молекулы гликокаликса, как правило, заканчиваются силовыми кислотами, что создает отрицательный заряд поверхности тромбоцита и отталкивает его от отрицательно заряженной поверхности эндотелиального покрова сосудистой стенки.

Важное свойство мембраны интактных тромбоцитов – разный фосфолипидный состав наружной и внутренней поверхности. Основными фосфолипидами, входящими в состав тромбоцитов, являются фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), сфингомиелин (СФ), представленные на внешней поверхности неактивированных тромбоцитов, а также фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидилинозитол (ФИ), обнаруживаемые только на внутренней поверхности неактивированных тромбоцитов. Кислые фосфолипиды мембраны тромбоцитов – ФС и ФИ, известные как *фактор 3 тромбоцитов (ф3, PF3)*, или *тромбоцитарный тромбопластин*, составляют около 15% от всех фосфолипидов тромбоцитарной мембраны. В процессе активации тромбоцитов ФС и ФИ «мигрируют» на внешнюю поверхность мембраны и образуют положительно заряженную поверхность, необходимую для фиксации, активации и взаимодействия плазменных белков гемостаза.

Рецепторы мембраны тромбоцитов

Специфические функции тромбоцитов в гемостазе требуют активного взаимодействия с другими тромбоцитами, плазменными белками и небелковыми веществами. Важную роль во взаимодействии тромбоцитов с другими участниками процесса свертывания играют рецепторы тромбоцитов.

Поверхностные гликопротеиновые рецепторы

Гликопротеиновые (GP) рецепторы – одни из самых значимых тромбоцитарных рецепторов. Один конец молекулы фиксирован в цитоплазме тромбоцитов,

Таблица 2.2. Основные гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов

Мембранные рецепторы	Связываемые лиганды	Число рецепторов на 1 тромбоците
GP1b-V-IX (CD42b/42a)	Фактор Виллебранда, тромбин	50 000
GP1Ib-IIIa (Cd36)	Фибриноген, фактор Виллебранда, фибрин, фибронектин, витронектин, тромбоспондин	50 000
GP1c-IIa (CD49e/CD29)	Фибронектин, ламинин	1000
GP1a-IIa (CD49b/CD29)	Коллаген	1000

Гликопротеиновый комплекс GP1b-V-IX тромбоцитов участвует в опосредованной фактором Виллебранда адгезии тромбоцитов к субэндотелиальным структурам. Гликопротеин Ib – рецептор для фактора Виллебранда. Фактор Виллебранда обеспечивает адгезию тромбоцитов в условиях воздействия высокой скорости кровотока. Контакт молекулы фактора Виллебранда с субэндотелиальным слоем, особенно при воздействии высокой скоростью кровотока, приводит к конформационным изменениям в A1 домене молекулы, что значительно повышает аффинность фактора Виллебранда к GP1b-V-IX. Нефизиологическими стимуляторами процесса взаимодействия фактора Виллебранда и GP1b-V-IX являются антибиотик ристомидин и протеин змеиного яда – ботроцетин. Ристомидин связывается с богатыми пролином последовательностями домена A1 молекулы фактора Виллебранда и с одним или более доменами GP1b, а ботроцетин – только с локусами домена A1 молекулы фактора Виллебранда. Эти воздействия приводят к аналогичным физиологическим конформационным изменениям молекулы фактора Виллебранда и GP1b-V-IX. Взаимодействие GP1b-V-IX и фактора Виллебранда вызывает активацию GP1Ib-IIIa и агрегацию тромбоцитов. GP1b-V-IX также является высокоаффинным местом связывания тромбина.

При врожденной недостаточности рецепторного комплекса гликопротеина Ib/IX не происходит связывания с фактором Виллебранда (vWF), что характерно для болезни Бернара–Сулье. Тромбоцитодистрофия Бернара–Сулье проявляется в неспособности тромбоцитов связывать фактор Виллебранда и резком снижении их адгезии. Болезнь наследуется аутосомно-рецессивно, характерно выраженное нарушение гемостаза с тяжелыми рецидивирующими кровотечениями из слизистых.

Гликопротеин Ia/IIa относится к семейству интегринов, он обеспечивает адгезию тромбоцитов к волокнам коллагена в первые секунды после повреждения эндотелия сосудистой стенки. Стабилизация образовавшегося соединения фактором Виллебранда не позволяет току крови смывать тромбоциты. Фактор Виллебранда образует связь между субэндотелиальными волокнами коллагена и рецептором тромбоцитов – гликопротеином Ib/IX. В результате адгезии тромбоциты активируются и затем в ходе реакции освобождения выбрасывают ряд активных веществ, запасенных в их гранулах.

Комплекс GPIIb-IIIa является интегриновым рецептором тромбоцитов, который взаимодействует в первую очередь с фибриногеном (фибриногеновый рецептор). Это взаимодействие обеспечивает основной путь агрегации тромбоцитов друг с другом через «фибриновые мостики». При врожденном дефиците этого рецептора развивается *болезнь Гланцманна*, при которой резко нарушена или отсутствует агрегация тромбоцитов с большинством индукторов агрегации, в том числе коллагеном, тромбином, АДФ. Наличие в комплексе GPIIb-IIIa мест распознавания RGD объясняет способность этого интегрина соединяться с фактором Виллебранда, фибронектином, витронектином.

Ключевой особенностью комплекса GPIIb-IIIa является способность исполнять роль рецептора только на поверхности активированных тромбоцитов. Аффинность этого комплекса на поверхности неактивированных клеток низка и практически предотвращает связывание его с агонистами. Активация тромбоцитов, в том числе опосредованная взаимодействием фактора Виллебранда с GPIb-V-IX, немедленно повышает аффинность GPIIb-IIIa. Активированные тромбоциты могут связывать на своей поверхности более 40 000 молекул фибриногена посредством GPIIb-IIIa. Это взаимодействие происходит в присутствии двухвалентных катионов (Ca^{2+}) и поначалу является обратимым. Далее, по мере образования дополнительных контактов, происходит стабилизация агрегата.

При тромбофилиях делаются попытки использовать ингибиторы и антитела к рецепторным местам комплекса GPIIb-IIIa. У 25% жителей Северной Европы в связи с полиморфизмом аллелей в GPIIIa имеется ассоциация с развитием ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда в относительно молодом возрасте.

Пуриновые рецепторы в регуляции функции тромбоцитов

Нуклеотидные рецепторы тромбоцитов играют ведущую роль в гемостазе и тромбогенезе. Тромбоциты экспрессируют три подтипа нуклеотидных P2-рецепторов – P2X1, P2Y1 и P2Y12. Причем P2X1 являются регулируемым лигандом неселективными катионными каналами, тогда как P2Y-рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), включают различные внутриклеточные сигнальные пути.

P2X1-рецептор является лигандрегулируемым неселективным катионным каналом; активация P2X1-рецепторов сопровождается поступлением ионов Ca^{+2} и Na^{+} в цитоплазму тромбоцита. При дефиците экспрессии P2X1 имеет место нормальное, хотя и переменное время кровотечения и повышенная резистентность к тромбогенезу. При гиперэкспрессии P2X1-рецепторов тромбоцитов формируется склонность к тромбогенезу в ответ на инъекции коллагена и адреналина. Агонистом P2X1-рецепторов является АТФ, секретируемый из гранул стимулированных тромбоцитов, а также выделяемый из поврежденного эндотелия. АТФ может непосредственно связываться с P2X1-рецепторами и не активирует P2Y-

рецепторы в силу низкого уровня экспрессии последних на мембране тромбоцитов. Селективная активация P2X₁-рецепторов вызывает быстрое и обратимое изменение формы тромбоцитов, транзиторную централизацию гранул, слабую обратимую агрегацию и формирование малых микроагрегатов. Тем не менее P2X₁-рецепторы тромбоцитов играют важную роль в гемостазе при комплексной активации тромбоцитов, способствуя усилению сигнализации на ряд других стимулов, включая коллаген, так как через этот рецептор иммобилизуется внутриклеточный кальций.

P2Y₁-рецепторы представлены на тромбоцитах в очень малом количестве – на один тромбоцит экспрессируется около 150 P2Y₁-рецепторсвязывающих сайтов. АДФ является физиологическим агонистом P2Y₁-рецептора, тогда как АТФ взаимодействует с ним слабо. Эндогенным антагонистом P2Y₁-рецептора является пальмитоил-КоА, который ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и экспрессию Р-селектина.

P2Y₁₂-рецептор. Дефект этого рецептора выявляется у пациентов с избирательным нарушением активации тромбоцитов на АДФ. Полиморфизм гена рецептора P2Y₁₂ может внести значительный вклад в варибельность ответа тромбоцитов на антиагрегантные препараты. Выявлено изменение гена P2Y₁₂-рецептора после его блокады прямым антагонистом Кангрелором. Различная экспрессия P2Y₁₂-рецептора может лежать в основе гендерных различий в частоте сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку половые гормоны оказывают влияние на гены мегакариоцитов. Уровни мРНК белка P2Y₁₂-рецептора возрастали под влиянием тестостерона в зависимости от дозы, в то время как 17β-эстрадиол не влиял на экспрессию гена. АДФ является естественным агонистом этого рецептора, этот рецептор является молекулярной мишенью антитромбоцитарных препаратов, в частности, тиенопиридиновых соединений. P2Y₁₂-рецептор – сигнальный путь, контролирует такие биологические процессы, как АДФ-индуцированная секреция веществ из альфа- и плотных гранул, продукция тромбоксана A₂, рост тромба и его стабильность. P2Y₁₂-рецептор вносит вклад в формирование тромбоцит-лейкоцитарных агрегатов, опосредованных экспрессией Р-селектина на поверхности тромбоцитов, в результате чего тканевой фактор экспонируется на поверхности лейкоцитов.

Рецепторы, активируемые протеазами

Рецепторы, активируемые протеазами (англ. *Protease-activated receptors, PARs*) – класс трансмембранных белков, относящийся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками. Отличительной особенностью данной группы рецепторов является уникальный механизм активации, при котором происходит ограниченный протеолиз внеклеточного конца рецептора с образованием привязанного лиганда. Существует 4 типа рецепторов: PAR-1, PAR-2, PAR-3 и PAR-4, кооперированных с трансмембранным белком G. Все они широко представлены в организме. Экспрессируются тромбоцитами, клетками иммунной системы,

клетками эпителия, эндотелия, миоцитами, фибробластами. Рецепторы, активируемые протеазами, участвуют в регуляции гемостаза и процессов воспаления. Тромбин расщепляет рецептор PAR1 на тромбоцитах, тем самым активирует этот рецептор. В результате этого сигнального пути меняется форма клеток и их миграция. Тромбоциты из дискоидной формы трансформируются в сферическую и выпускают псевдоподии, при этом стимулируется их агрегация и дегрануляция, что активирует процесс гемостаза. Важна роль связанных с мембранами белков, как кофакторов протеолитической активации PARs, для сигнальной системы факторов свертывания крови, в том числе ф. VIIa и ф. Ха, которые являются ключевыми в активации протромбиназы и образовании тромбина. Известны сериновые протеазы, которые не только расщепляют белки, но и служат сигнальными молекулами, взаимодействующими с рецепторами клеток и регулирующими их функции. Идентифицированы рецепторы фактора Ха свертывания крови, протенина С и урокиназы, которые регулируют функции клеток, не расщепляя рецепторы. Участие связанных с клеточными мембранами белков в PARs-сигналах распространяется и на антикоагулянтный путь, осуществляемый активированным протенином С (APC). Тромбомодулин привязывает тромбин к поверхности клеток, где тромбин превращает протенин С в APC, который функционирует как циркуляторный антикоагулянтный фермент, деградируя ф. Va и ф. VIIa до неактивных ф. Vi и ф. VIIIi. Если же APC остается на поверхности клеток, то вызывает активацию PAR1.

Протеолитические события значимы для нормального физиологического контроля, но могут быть причиной развития болезней. Так, ф. VIIa передает сигнал клеткам только через PAR1 и PAR2, когда аллостерически связывается с ТФ. Показано, что ф. Ха передает сигнал эндотелиальным клеткам через PAR1 и PAR2, а фибробластам – через PAR1. Эти сигнальные пути, запускаемые ф. VIIa и ф. Ха, активно работают при септическом шоке, когда гемокоагулирующие протеиназы вносят существенный вклад в воспалительный ответ и когда экспрессия ТФ повышается на разных типах клеток.

В качестве потенциальных ингибиторов агрегации тромбоцитов человека разрабатываются пептиды, представляющие собой дериваты PAR1 и PAR4. Показано, что селективные агонисты PAR1 могут вызывать релаксацию крупных сосудов, таких как легочная и коронарные артерии, аорта, а также более мелких артерий. Имеются данные, свидетельствующие о накоплении в этих условиях оксида азота (NO) за счет активации NO-синтазы в клетках эндотелия и освобождения продуктов циклооксигеназы. PARs могут стимулировать сократительные свойства ряда сосудов, как зависимыми, так и независимыми от эндотелия механизмами. Все это дает основание полагать, что в физиологических условиях PARs регулируют скорость кровотока. Рецепторы, активируемые протеазами, могут использоваться для поисков эффективной терапии. Так, антагонисты PARs проходят клинические испытания с целью оценить возможность их применения для лечения тромбозов и воспалительных заболеваний.

Органеллы тромбоцитов

В цитоплазме тромбоцитов расположены митохондрии, пероксисомы (содержат каталазу), включения гликогена, лизосомы и гранулы, содержащие пулы хранения различных веществ. В тромбоцитах выделяют 3 вида органелл хранения: α -гранулы, электронноплотные тельца (δ -гранулы) и лизосомы (γ -гранулы) (см. рис. 1.19).

В α -гранулах хранится до 30 различных белков, большинство из которых были синтезированы еще в мегакариocyтах: β -тромбоглобулин, фактор 4 тромбоцитов, фактор V, фактор Виллебранда, фибриноген, тромбоспондин, фибронектин, витронектин, α_2 -макроглобулин, Р-селектин, фактор роста тромбоцитов (PDGF), ингибитор тканевого активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1), α_2 -антиплазмин, α_1 -антитрипсин, протеин S, лейкоцитарный хемотаксический фактор, высокомолекулярный кининоген и другие. Участие белков α -гранул в физиологических и патологических процессах многостороннее: а) митогенный и хемотаксический эффекты, б) адгезивное действие, участие в агрегации тромбоцитов, в) участие в плазменном гемостазе, г) вазоактивное действие, д) иммунные и другие эффекты.

В плотных тельцах (δ -гранулы) хранятся субстанции, вызывающие прежде всего сосудистые реакции и агрегацию тромбоцитов: адениловые нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ, цАМФ, ГДФ), серотонин, адреналин, норадреналин, ДОФАмин, гистамин, Ca^{2+} . Высвобождающиеся из пула хранения АТФ и АДФ быстро метаболизируются в плазме до АМФ и аденозина, которые обладают прямым коронарорасширяющим эффектом. АДФ является важнейшим физиологическим метаболитом, обеспечивающим первичный гемостаз, так как стимулирует агрегацию тромбоцитов.

В лизосомах (γ -гранулы) находятся гидролитические ферменты – пероксидаза, глюкозидазы, галактозидаза или β -глицерофосфатаза, кислая фосфатаза, неспецифическая эстераза. Лизосомы секретируют хранящийся в них секрет только при воздействии сильных стимуляторов, таких как коллаген и тромбин, что сопровождается необратимыми изменениями тромбоцитов.

Тромбоциты способны секретировать содержимое гранул как частично при обратимой агрегации и в процессе трофических взаимодействий с органной капиллярной сетью, так и полностью при реакции освобождения, связанной с необратимой адгезией на поврежденной сосудистой стенке. После секреции гранулы опустошены, наблюдается дегрануляция. Такая же картина имеет место при врожденном дефекте заполнения гранул в процессе мегакарио- и тромбоцитопоэза, приводящих к дефициту пула хранения. После секреции большинство гранулярных мембран деградирует, гранулы практически не восстанавливаются, тромбоциты во многом теряют свою физиологическую активность. По-видимому, схожие процессы происходят при резкой активации тромбоцитопоэза в результате потребления тромбоцитов в системе циркуляции (например, при ДВС), в этих случаях тромбоцитопения перерастает в тромбоцитопатию.

Тромбоцитарные факторы

Антигепариновый фактор тромбоцитов

Антигепариновый фактор тромбоцитов (фактор 4 тромбоцитов, ф4, PF4) является специфическим тромбоцитарным белком. Он синтезируется в мегакариоцитах, хранится в α -гранулах, высвобождается после стимуляции тромбоцитов во время второй волны агрегации. На С-конце PF4 находятся две пары лизиновых остатков, которые важны для соединения фактора с гепарином и нейтрализации последнего. Физиологическая роль PF4 сводится к нейтрализации гепарина и иммуномодулирующей активности, способности оказывать хемотаксическое действие на нейтрофилы, моноциты, фибробласты, влиять на агрегацию тромбоцитов. Связывая с высоким сродством гепарин, PF4 препятствует взаимодействию гепарина с антитромбином и способствует тем самым снижению активности последнего, усиливая процесс образования тромбина. Один тетрамер PF4 может соединяться с 1 молекулой гепарина низкой молекулярной массы (<10 кДа) и с 2 и более молекулами гепарансульфатов высокой молекулярной массы. Очевидно, что гепарансульфаты, находящиеся в слое гликокаликса на поверхности эндотелиальных клеток, потенцируя активность антитромбина, способствуют нейтрализации факторов коагуляции. PF4, выделяющийся из тромбоцитов в зоне повреждения, нейтрализует антикоагулянтное действие гепарансульфатов, тем самым способствует формированию гемостатической пробки. PF4 способен подавлять коллагеназу. При врожденной недостаточности α -гранул тромбоцитов и мегакариоцитов – *синдроме серых тромбоцитов* – закономерным является развитие фиброза на поздних стадиях этого заболевания.

β -тромбоглобулин

β -тромбоглобулин (β -ТГ, β -TG) – белок α -гранул тромбоцитов, обладает выраженной хемотаксической активностью для лейкоцитов. Его освобождение из тромбоцитов опосредовано циклооксигеназной реакцией и происходит до секреции других белков из α -гранул. Повышение плазменного уровня β -тромбоглобулина может служить лабораторным показателем активации тромбоцитов, их деструкции и возможной тромбоцитопении.

После активации тромбоцитов освобождение из них β -TG и PF4 происходит в эквивалентных концентрациях. Однако PF4 быстро элиминируется из плазмы, связываясь с гликозаминогликанами, а β -TG относительно долго циркулирует, выделяясь через почки. Поэтому уровень в плазме β -TG в 3–6 раз выше, чем PF4. Влияние быстрой элиминации PF4 сохраняется и в патологических ситуациях, когда наблюдается значительное повышение β -TG и увеличение отношения β -TG/ PF4 (табл. 2.3).

У больных с тромбоцитопенией и тромбоцитозом необходимо рассматривать уровень β -TG и PF4 с учетом количества циркулирующих тромбоцитов. По отношению к числу тромбоцитов концентрация тромбоцитарных факторов в плазме повышена при синдроме ДВС и при тромботической тромбоцитопенической пурпуре, хотя абсолютные значения этих показателей могут быть в пределах нормальных значений.

Таблица 2.3. Содержание β -тромбоглобулина и фактора 4 тромбоцитов в плазме при патологии

Группа исследованных	β -TG	PF4	β -TG/ PF4
Здоровые люди (референтные значения)	6–8 нг/мл	2 нг/мл	3–4
Повышенная внутрисосудистая активация тромбоцитов	$\uparrow\uparrow$	(T), N	$\uparrow\uparrow$
Почечная недостаточность	$\uparrow$	N	$\uparrow$
Введение гепарина	N	$\uparrow$	$\downarrow$
Погрешности при лабораторной работе, приводящие к активации тромбоцитов <i>in vitro</i>	$\uparrow$	$\uparrow$	N

Фактор роста тромбоцитов

PDGF синтезируется мегакариоцитами, в тромбоцитах содержится в α -гранулах. Каждая клетка содержит порядка 1000 молекул PDGF. Фактор является основным митогеном в местах повреждения сосудов, стимулируя репарацию поврежденных тканей. В сосудистой стенке рецепторы к PDGF экспрессированы на фибробластах и гладкомышечных клетках; PDGF стимулирует пролиферацию этих клеток, а также усиливает продукцию гликозаминогликанов, коллагена и других соединительнотканых элементов. Рецепторы к PDGF имеются в клетках лимфоидной (Т-лимфоциты) и миелоидной линии. Нарушение хранения PDGF в мегакариоцитах костного мозга может быть причиной развития фиброза, в том числе сопровождающего миелопролиферативные заболевания. Некоторые опухолевые клеточные линии могут продуцировать PDGF, в частности остеосаркома, гепатома, некоторые карциномы, опухоли костного мозга. β -цепь PDGF имеет характерные черты для основной структуры вируса саркомы. В связи с этим PDGF является важной составляющей сложных влияний тромбоцитов на онкогенез.

Фибриноген

Фибриноген α -гранул тромбоцитов составляет примерно 3% от плазменного пула, однако роль его в агрегации тромбоцитов, по-видимому, сопоставима со значением плазменного фибриногена. Тромбоциты получают фибриноген из мегакариоцитов, которые в свою очередь захватывают плазменный фибриноген, синтезированный гепатоцитами. Поэтому даже отмытые тромбоциты образуют агрегаты, включающие молекулы фибриногена.

Фактор V

Фактор V α -гранул тромбоцитов – коагуляционный белок, синтезируемый в мегакариоцитах. Иммунологически фактор V тромбоцитов схож с фактором V плазмы, входящим в протромбиназный комплекс. На долю фактора V тромбо-

цитов приходится 18–25% этого белка крови человека, однако его влияние на формирование протромбиназного комплекса весьма существенно. Описан врожденный геморрагический диатез, при котором единственным нарушением было наличие неактивной формы тромбоцитарного фактора V. Введение протромбиназного комплекса, сформированного из плазменных факторов, не корригировало геморрагических проявлений.

Функции тромбоцитов

Основными функциями тромбоцитов являются:

- формирование первичной тромбоцитарной пробки в зоне повреждения сосуда за счет адгезии и последующей агрегации;
- катализ гуморальных реакций гемостаза за счет предоставления фосфолипидной поверхности (*фактор 3 тромбоцитов, PF3*), необходимой для взаимодействия большинства плазменных белков гемостаза и выброса некоторых белков гемостаза из пулов хранения;
- ретракция сгустка крови;
- стимуляция локальной вазоконстрикции за счет выделения вазоконстрикторов из пула хранения;
- инициирование репарации тканей;
- регулирование местной воспалительной реакции.

Формирование первичной тромбоцитарной пробки в зоне повреждения сосудов возникает вследствие процесса, который можно условно разделить на 3 стадии:

- 1) адгезия тромбоцитов к субэндотелиальным структурам;
- 2) активация этих тромбоцитов с выбросом медиаторов из депо;
- 3) последующая активация, рекрутирование и фиксация в зоне повреждения дополнительных тромбоцитов – агрегация.

Адгезия тромбоцитов

Через несколько минут после повреждения сосудистой стенки формируется сплошной слой адгезированных и агрегированных тромбоцитов, которые являются основой тромбоцитарного тромба (рис. 2.10).

В процессе *адгезии* важную роль играют 2 механизма. Первый – непосредственная адгезия тромбоцитов через рецепторы GPIa-IIa и GPVI к коллагену субэндотелия. Однако это взаимодействие недостаточно для удержания тромбоцитов в местах воздействия высоких скоростей кровотока – артериях и артериолах. Другой механизм, эффективно удерживающий тромбоциты при высокой скорости кровотока, включает адгезию тромбоцитов, опосредованную молекулами *адгезии* – фактором Виллебранда, фибронектином, витронектином, ламинином, тромбоспондином. *In vivo* оба этих механизма работают параллельно. Возможно, что первичный контакт тромбоцитов с субэндотелием осуществляется благодаря



Рис. 2.10. Тромбоцитарный тромб, сформированный на поврежденной сосудистой стенке. Тромбоцитарный тромб является основой остановки кровотечения в артериальной системе

первому механизму, тогда как укрепление сгустка (агрегация тромбоцитов) возникает за счет формирования связей «субэндотелий–фактор Виллебранда–GPIIb–IX–V» и связей, опосредованных другими молекулами адгезии.

Вероятно, процесс адгезии не требует энергетических затрат и предварительной активации тромбоцитов. Агрегация, опосредованная фактором Виллебранда, в лабораторных условиях может быть выполнена с использованием фиксированных тромбоцитов, то есть она аналогична приклеиванию. Фактор Виллебранда выполняет функцию биологического клея, фиксируя тромбоциты на поврежденной сосудистой стенке (рис. 2.11).



Рис. 2.11. Фактор Виллебранда (vWF) выполняет роль биологического клея, прикрепляя к коллагену субэндотелия адгезированные тромбоциты через GPIIb–V–IX. Тромб увеличивается в размерах по мере адгезии и агрегации новых тромбоцитов, скрепление которых в агрегат обеспечивает фибриноген, имеющий дивалентную структуру и взаимодействующий с рецепторами GPIIb/IIIa

Молекулы адгезии

Фактор Виллебранда

Фактор Виллебранда (vWF) – один из самых больших гликопротеидов плазмы, имеет М. м. от 540 до нескольких тысяч кДа, содержит в цепочке более 2000 аминокислот. Ген фактора Виллебранда находится на коротком плече 12-й хромосомы и содержит 52 экзона. Экспрессия гена фактора Виллебранда локализована в эндотелиоцитах и мегакариоцитах. Фактор Виллебранда (vWF) содержится в альфа-гранулах тромбоцитов, тельцах Вайбеля–Паладе эндотелиоцитов (пулы хранения), в плазме и субэндотелиальном матриксе.

Первичный продукт синтеза, обозначаемый как пре-про-vWF, найден в эндотелии и тромбоцитах, он иммунологически отличается от зрелого фактора Виллебранда, его уровень снижен у пациентов с болезнью Виллебранда. Зрелый vWF идентифицируется как антиген II vWF (vWF:AgII). Процесс димеризации и полимеризации vWF:AgII происходит одновременно. Зрелая субъединица vWF:AgII содержит 2050 аминокислотных остатков. Конечный продукт накапливается в тельцах Вайбеля–Паладе в эндотелиоцитах и в α -гранулах тромбоцитов, поэтому увеличение vWF в системе циркуляции рассматривается как показатель активации первичного звена гемостаза и как показатель повреждения сосудистого эндотелия.

Фактор Виллебранда состоит из ряда полимеров прогрессивно увеличивающейся молекулярной массы: разделяют легкие, средние, тяжелые и сверхтяжелые мультимеры. Самые крупные мультимеры содержат от 50 до 100 субъединиц. Самым большим тромбогенным потенциалом обладают молекулы vWF с наибольшей молекулярной массой.

Фактор Виллебранда имеет два пути секреции: непосредственная секреция после синтеза и полимеризации, которая создает определенный уровень vWF в крови, и регуляторная секреция из пулов хранения, в ответ на стимуляцию. Активность vWF в крови у человека может меняться в значительных пределах. Реализация vWF из тромбоцитарных гранул возникает при активации тромбоцитов под воздействием разных физиологических и нефизиологических индукторов (АДФ, коллаген, адреналин, вазопрессин, серотонин, тромбин, простагландин E1, тромбоксан A2), и в том числе плазменного vWF. Уровень vWF в крови возрастает при воспалении различного генеза, повреждении эндотелия сосудов при васкулитах, стрессе, у женщин – во время беременности. Повышение активности vWF в патологических ситуациях может способствовать развитию тромбозов.

Молекулярная масса vWF, содержащегося в пулах хранения, и следовательно, тромбогенный потенциал, существенно выше, чем у vWF, содержащегося в плазме, и наиболее высок в α -гранулах тромбоцитов. Такое распределение позволяет создавать высокий тромбогенный потенциал в местах повреждения эндотелия при выбросе vWF из пулов хранения, в то же время сохраняя тромбогенный потенциал на «обычном» уровне в интактном сосудистом русле. Содержащийся в пулах хранения тромбоцитов очень высокомолекулярный vWF после поступления в плазму расщепляется специфическими ферментами до менее высокомолекуляр-

ных мультимеров. Этот механизм предотвращает неконтролируемое повышение активности vWF. Описаны заболевания (болезнь Виллебранда тип Виченца, врожденная тромбоцитическая тромбоцитопеническая пурпура), при которых дефект этих ферментов приводит к накоплению сверхвысокомолекулярных мультимеров vWF и преждевременной секвестрации тромбоцитов из кровотока. Кроме того, при массивном выбросе vWF из пулов хранения (например, под воздействием десмопрессина) в кровотоке также выявляется vWF с «аномально» высокой массой. Однако потом в сосудистом русле молекулярная масса vWF довольно быстро снижается до «нормальной». Снижение средней молекулярной массы vWF может быть следствием разрушения дисульфидных мостиков под воздействием тромбоспондина-1, выделяющегося из эндотелиальных клеток, и протеолитического расщепления мультимеров vWF присутствующими в плазме крови металлопротеазами.

Основными функциями фактора Виллебранда являются:

- обеспечение адгезии тромбоцитов к субэндотелиальным структурам, в первую очередь к коллагену, и последующей агрегации тромбоцитов; особенно эффективен этот механизм в условиях воздействия высоких скоростей кровотока;
- связывание свободного фактора VIII и защита его молекулы от преждевременной инактивации комплексом протеинов S и C.

Обеспечение взаимодействия тромбоцитов с субэндотелием сосудов – главная биологическая роль vWF при формировании гемостатической пробки (рис. 2.12). Молекулы vWF специфически связываются с рецепторами тромбоцитов GPIb и

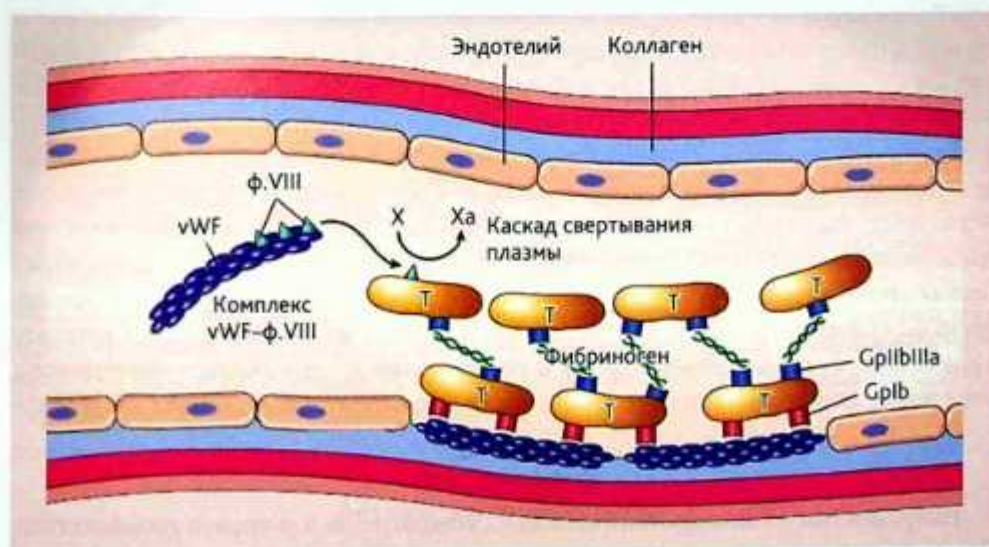


Рис. 2.12. Фактор Виллебранда обеспечивает взаимодействие тромбоцитов с субэндотелием, а при формировании тромба – освобождение из связанного состояния ф. VIII

GP1b/IIIa, фактором VIII свертывания крови (ф. VIIIС), коллагеном и некоторыми другими молекулами. Эта функция vWF особенно важна в местах сосудистого русла с высокой скоростью тока крови и высоким напряжением сдвига, где сила потока крови существенно мешает формированию гемостатической пробки и другие механизмы адгезии не могут обеспечить надежной фиксации тромбоцитов. В частности, известно, что vWF является ключевым при формировании тромба в мелких артериях, артериолах и артериальных капиллярах. В местах, где интенсивность кровотока невелика, роль vWF уменьшается, преобладающим становится взаимодействие, опосредованное другими молекулами, в том числе прямая адгезия тромбоцитов к коллагену посредством GP Ia–IIa.

Связывание ф. VIII предупреждает быструю деградацию ф. VIIIС в плазме под влиянием протеина С. Концентрация vWF в плазме составляет примерно 50 нмоль субъединиц/л, или 8 нг/л, что примерно в 50 раз выше, чем молярная концентрация фактора VIIIС. Поэтому ф. VIIIС практически весь связан с vWF. Связанный с vWF фактор VIII защищен от протеолитической инактивации в плазме, поскольку у него заблокированы сайты связывания с фосфолипидной матрицей, на которой происходит инактивация тромбином, и заблокированы сайты связывания с протеином С. В области повреждения сосуда, в процессе vWF-опосредованной адгезии тромбоцитов происходит контакт комплекса vWF–ф. VIII и тромбина, который активирует ф. VIII, освобождая его из комплекса с фактором Виллебранда.

Фибронектин

Фибронектин (плазматический, субэндотелиальный и тромбоцитарный) – гранулярный контактный белок, который способен образовывать комплексы с GP1c–IIa рецепторами тромбоцитов и коллагеном. Сродство фибронектина к коллагену и тромбоцитам меньше, чем у фактора Виллебранда, однако молекулярная концентрация его выше. Именно фибронектин является основной молекулой адгезии в венозной и капиллярной сети, образуя ось: тромбоцитарный рецептор GP1c–IIa – фибронектин – коллаген. Гликопротеиновый комплекс GP1c–IIa распознает в фибронектине RGD последовательность и осуществляет рецепторную функцию, как в интактных, так и в активированных тромбоцитах. Характерная аминокислотная последовательность RGD – трипептид Arg–Gly–Asp имеется во всех адгезивных белках крови, белках α -гранул тромбоцитов, фибриногене, факторе Виллебранда, фибронектине, витронектине. Именно RGD-последовательность, через которую взаимодействуют адгезивные белки с рецепторами клеток (класса интегринов), определяет зависимость процесса адгезии от двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Витронектин

Витронектин – гликопротеин плазмы, субэндотелия и α -гранул тромбоцитов. Имеет значение в гемостатических реакциях и в восстановлении поврежденных тканей сосудистой стенки. Витронектин, как и другие адгезивные белки, содержит трипептид RGD, распознающийся интегриновыми рецепторами эндотелиальных

клеток и тромбоцитов. Витронектиновый рецептор на тромбоцитах функционирует постоянно, что отличает его от рецептора фибриногена, который работает только на активированных клетках. У витронектинового рецептора β -цепь аналогична фибриногеновому рецептору (GPIIb/IIIa), но α -цепь специфична. При некоторых формах тромбостении Гланцманна на тромбоцитах экспонируется нормальное количество витронектиновых рецепторов, что доказывает, что у этих больных имеет место дефект синтеза α -цепи фибриногенового рецептора, т. е. GPIIb.

Тромбоспондин

Тромбоспондин – гликопротеин, принимающий участие в адгезии и агрегации тромбоцитов. Он широко распространен в тканях. Содержится в α -гранулах тромбоцитов и в небольшом количестве в плазме крови. На поверхности интактных тромбоцитов очень мало тромбоспондина, но после их активации количество экспонированного тромбоспондина на мембране тромбоцитов резко увеличивается. Очевидно, тромбоспондин стабилизирует при агрегации комплекс фибриногена с GPIIb/IIIa, увеличивая его прочность и переводя агрегацию тромбоцитов из обратимой в необратимую (рис. 2.13). Тромбоспондин связывается с рядом коагуляционных факторов (тромбином, факторами IXa, Xa), что повышает их локальную концентрацию, защищает от действия ингибиторов.

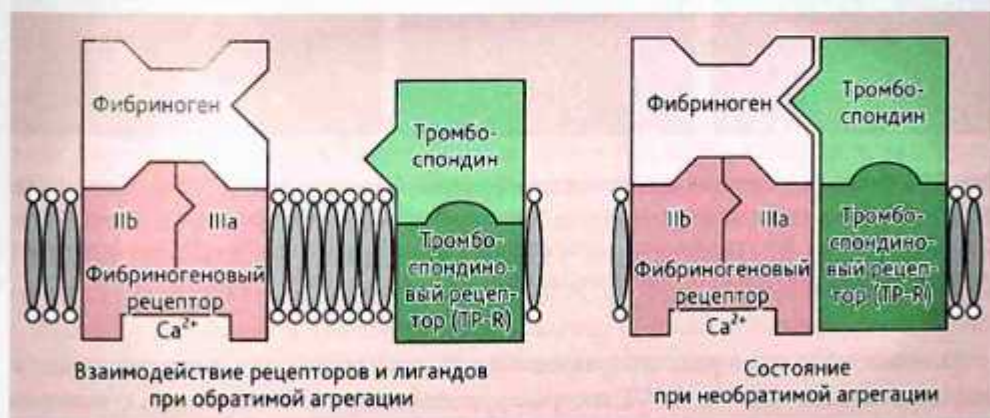


Рис. 2.13. Взаимодействие рецепторов к фибриногену и тромбоспондину с соответствующими лигандами. При взаимодействии тромбоцитов с фибриногеном на первой фазе происходит их обратимая активация. При стабилизации комплекса тромбоспондином процесс переходит в необратимую стадию агрегации

Активация тромбоцитов

После адгезии к субэндотелию немедленно начинается процесс активации тромбоцитов. Активация сопровождается изменением формы тромбоцитов, освобождением содержимого гранул (секреция), появлением на внешней поверхности

мембраны тромбоцитов положительно заряженных фосфолипидов – *фактора 3 тромбоцитов (PF3)*, изменением активности и концентрации регуляторных пептидов, повышением аффинности тромбоцитарных рецепторов. Выделяют обратимую и необратимую стадии активации (рис. 2.14). При обратимой стадии образуются единичные и непрочные связи рецепторов тромбоцитарной мембраны GP Ia–IIa с коллагеновыми структурами субэндотелия. При этом тромбоциты меняют форму, становясь шаровидными, выбрасывают псевдоподии. Если контакт прерывается, тромбоцит может вновь вернуться в систему циркуляции и приобрести неактивную дискоидную форму. Если контакт тромбоцита с поврежденной поверхностью продолжается более 5–10 с, то развивается необратимая стадия активации. За этот период тромбоцит успевает сформировать более прочные связи с компонентами сосудистой стенки с участием молекул адгезии и начинает расплываться по поверхности, растекаясь мембраной между псевдоподиями. В этот момент происходит реакция освобождения содержимого тромбоцита, включая тромбоцитарные факторы коагуляции.

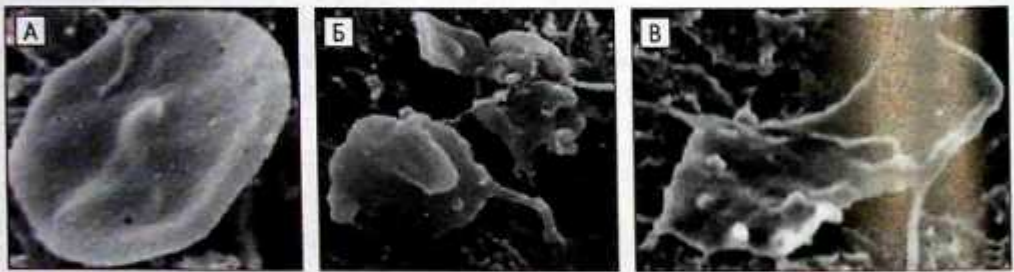


Рис. 2.14. Стадии контактной активации тромбоцитов: А – неактивный тромбоцит (дискоцит, пластинка); Б – тромбоциты в обратимой стадии контактной активации (шаровидные формы с псевдоподиями); В – тромбоцит в необратимой стадии адгезии (распластанная форма без внутреннего содержимого – «тень тромбоцита»)

Видимо, основную роль в первичной активации тромбоцитов играет сигнал с рецепторов GPIb–IX–V и GPVI, которые идентифицируют поверхность с характеристиками твердого тела, в первую очередь коллаген. Однако помимо коллагена свойством активировать тромбоциты обладает целый ряд субэндотелиальных структур, имеющих характеристики твердого тела.

Агрегация тромбоцитов

Процесс агрегации заключается в активации тромбоцитов из кровотока, присоединении к уже рекрутированным. Это приводит к образованию в зоне повреждения толстого слоя тромбоцитов, соединенных через рецепторы GPIIb–IIIa фибриновыми «мостиками» и фактором Виллебранда. Этот процесс, в первую очередь, является следствием высвобождения медиаторов из адгезированных, а позднее вторично рекрутированных в зону повреждения клеток. Также большую

роль играет наличие в зоне повреждения медиаторов активированных эндотелиоцитов, компонентов субэндотелия и тромбина. Последний является одним из самых сильных активаторов и стимуляторов агрегации тромбоцитов.

В табл. 2.4 представлены наиболее важные активаторы тромбоцитов, способные вызвать агрегацию тромбоцитов. Многие из этих компонентов присутствуют в норме в допороговых концентрациях и избирательно накапливаются в зоне повреждения сосудов или появляются в системе циркуляции при патологических состояниях. Некоторые факторы выделяются из самих тромбоцитов (АДФ, серотонин, адреналиноподобные субстанции, фактор Виллебранда).

Таблица 2.4. Метаболиты, способные стимулировать агрегацию тромбоцитов

Компоненты субэндотелия	Накапливающиеся в зоне повреждения сосуда	Появляющиеся в крови при патологических состояниях
Коллаген Микрофиламенты Эластин Фактор Виллебранда	Тромбин АДФ Адреналин Серотонин Вазопрессин Плазмин ПГН ₂ , ПГС ₂ Тромбоксан Фактор Виллебранда	Протеолитические ферменты Антитромбоцитарные антитела Иммунные комплексы Бактерии Вирусы Продукты распада тканей и клеток

Стимуляторы тромбоцитов имеют специфичность, которая обусловлена воздействием на разные рецепторы. Слабые агонисты (АДФ, адреналин, вазопрессин, серотонин) для индуцирования агрегации требуют дополнительного этапа образования продуктов тромбоксанового завершения и секреции хранимых в гранулах активных субстанций. В результате такие активаторы агрегации часто на агрегатограммах вызывают двухступенчатую фазу индуцированной агрегации. Сильные стимуляторы тромбоцитов (коллаген, тромбин, большие дозы АДФ) непосредственно после мембранной стимуляции приводят к необратимой агрегации.

По мере удаления от зоны повреждения концентрация агонистов активации и агрегации тромбоцитов снижается и соответственно уменьшается активация тромбоцитов. Дистально расположенные частично активированные тромбоциты отрываются от сгустка и возвращаются в кровоток. Таким образом, периферическая дезагрегация тромбоцитов предотвращает неограниченный рост сгустка.

Ретракция сгустка крови

Ретракцией сгустка крови называют уплотнение сгустка с выделением из него избытка сыворотки. Ретракция способствует улучшению механических характеристик сгустка и снижению активности фибринолиза внутри него. Ретракция

сгустка связана с сократительными свойствами тромбоцитов. Фибриллы миозина, расположенные в цитоплазме тромбоцитов, фиксированы к мембранному гликопротеину GPIIb-IIIa. В активированных тромбоцитах за счет миозина происходит процесс постепенного «сжатия» цитоплазмы.

При врожденной недостаточности GPIIb-IIIa – тромбоцитопении Гланцманна грубо нарушается не только агрегация тромбоцитов, но и ретракция сгустка крови.

Вопросы к главе 2

1. Какие механизмы индуцируют тромбообразование при повреждении сосудистой стенки?
2. Опишите механизм антикоагулянтного действия веществ эндотелиального происхождения.
3. Опишите механизм прокоагулянтного действия веществ эндотелиального происхождения.
4. Какие компоненты в системе циркуляции имеют эндотелиальное происхождение и какие могут быть маркерами повреждения сосудистой стенки?
5. Через какие механизмы поврежденный эндотелий может влиять на сосудистый тонус?
6. На каком основании говорят о сосудистом эндотелии как об органе?
7. В чем основное значение тромбоцитов в организме здорового человека?
8. Какова роль фактора 3 тромбоцитов в образовании пристеночного тромба?
9. На что направлены основные рецепторы тромбоцитов?
10. Каковы основные функции фактора Виллебранда?
11. Какова роль тканевого фактора в свертывании крови?
12. Какие тромбоцитарные факторы появляются в системе циркуляции после реакции освобождения?
13. Какова роль фибриногена в формировании тромбоцитарного тромба?
14. Что такое «молекулы адгезии» и какова их роль в гемостазе?
15. Повышение каких физиологических веществ в системе циркуляции может спровоцировать формирование тромбоцитарного тромба?

Тесты к главе 2

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

02.01. Тромбоцитарно-сосудистому гемостазу принадлежит функция:

- А) протеолиза
- Б) адгезивно-агрегационная
- В) гидролиза
- Г) лизиса эритроцитов
- Д) фибринолиза

02.02. В тромбоцитах синтезируется:

- А) простациклин
- Б) тромбоксан
- В) протеин С
- Г) фактор VII
- Д) протромбин

02.03. В эндотелии сосудов синтезируется:

- А) протромбин
- Б) простациклин
- В) тромбоксан
- Г) фактор IX
- Д) витамин К

02.04. Ретракция кровяного сгустка определяется функцией:

- А) плазменных факторов
- Б) тромбоцитов
- В) кининовой системы
- Г) системы комплемента
- Д) протеолитической системы

02.05. Прокоагулянт тромбоцитов, вызывающий агрегацию:

- А) простациклин
- Б) тромбоксан
- В) тканевой фактор
- Г) протеин С
- Д) простагландин E₂

02.06. Об активации тромбоцитов свидетельствует повышение в плазме:

- А) фибриногена
- Б) антитромбина
- В) бета-тромбоглобулина
- Г) комплемента
- Д) пламиногена

02.07. Для предтромботического состояния характерно:

- А) повышение фибринолитической активности
- Б) повышение агрегации и адгезии тромбоцитов
- В) гипофибриногенемия
- Г) гипокоагуляция
- Д) тромбоцитопатия

02.08. Укажите, какой гликопротеиновый комплекс является специализированным коллагеновым рецептором:

- А) GPIb-V-IX
- Б) GPIIb-IIIa
- В) GPIc-IIa
- Г) GPIV
- Д) GPIa-IIa

02.09. Ситуационная задача. Больной П., 12 лет. В анамнезе частые носовые кровотечения, экхимозы (синяки) на коже, появляющиеся самопроизвольно. При неглубоких порезах кровотечение длительное. Количество тромбоцитов нормальное, время кровотечения удлинено. Сделано исследование агрегации тромбоцитов. Агрегатограммы с адреналином, АДФ, коллагеном не изменены. Агрегатограмма с ристомидином представлена на рис. 2.15. Прокомментируйте.

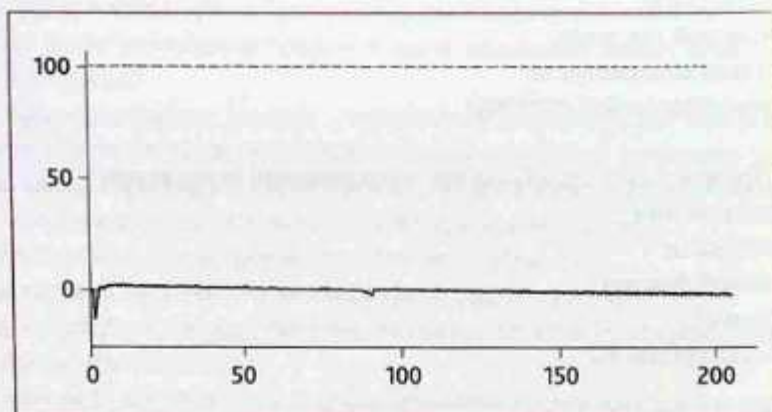


Рис. 2.15. Агрегатограмма. Индуктор агрегации ристомидин. Степень агрегации 0%

- А) у больного гемофилия А
- Б) у больного предположительно болезнь Виллебранда
- В) у больного нарушена ретракция тромбоцитов
- Г) острая фаза развития синдрома ДВС
- Д) у больного склонность к тромбозам

02.10. Ситуационная задача. Больному со стенозом митрального клапана планируется операция. Коагулограмма: количество тромбоцитов – $210 \times 10^9/\text{л}$ (референтный интервал $150-400 \times 10^9/\text{л}$), время кровотечения удлинено, ПВ, АЧТВ, концентрация фибриногена, фибринолитическая активность, антитромбин – в норме. Снижена ретракция кровяного сгустка. Предположительно в каком

звене гемостаза имеются нарушения? Какие дополнительные методы исследования необходимы?

- А) возможны нарушения в тромбоцитарном звене гемостаза: признаки тромбоцитопатии, рекомендуется исследовать функцию тромбоцитов (адгезия, агрегация)
- Б) нарушения во внутреннем каскаде активации протромбиназы, рекомендуется определить активность факторов VIII, IX
- В) нарушения во внешнем каскаде активации протромбиназы, рекомендуется определить активность фактора X
- Г) нарушения в антикоагулянтном звене, следует определить активность протеина С
- Д) нарушения фибринолиза, следует определить наличие ПДФ, D-димер

Глава 3. ПЛАЗМЕННАЯ СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА

Плазменные компоненты (факторы) свертывания

Система свертывания плазмы – ферментативная система, осуществляющая каскад протеолитических реакций, конечным этапом которой является формирование фибриновой пробки в месте повреждения сосуда. Белки свертывания плазмы, входящие в каскад свертывания крови, открывались в 20–40-х гг. прошлого столетия. В то время было принято давать именные названия, связанные с первооткрывателем белка или пациентом, у которого он впервые был зарегистрирован. По этой причине получилось, что факторы одновременно заявлялись в работах из разных стран, поэтому один и тот же фактор имел несколько названий. Для выхода из этого положения была принята международная номенклатура компонентов, принимающих участие в каскаде свертывания плазмы. Эти компоненты были обозначены как «факторы» и им придано обозначение римскими цифрами (табл. 3.1). Активные формы факторов обозначаются теми же римскими цифрами, но с добавлением аббревиатуры «а». При разработке первой номенклатуры были использованы римские символы факторов от I до XIII. Для обозначения участия в свертывании плазмы тканевого фактора и ионов кальция им были приданы символы соответственно III и IV. Однако в настоящее время римская нумерация для них не используется, так как они не относятся к плазменным факторам свертывания (тканевой фактор – это тканевой компонент вне сосудистой системы, ионы Ca не являются белком). Фактор VI в классификации не употребляется, так как этим символом ошибочно был назван фактор Va. Не закрепилось название фактор I для фибриногена. Название остальных факторов соответствует римским цифрам, но иногда используется и именное обозначение, которое приводим в табл. 3.1.

Практически все факторы системы свертывания крови циркулируют в кровотоке в форме неактивных проэнзимов или в форме неактивных кофакторов. Исключение составляет фактор VII, примерно 1–2% которого в норме циркулируют в активной форме. При запуске свертывания крови происходит каскадная активация проэнзимов и кофакторов. Процесс активации представляет собой ограниченный протеолиз неактивных предшественников до активных энзимов и кофакторов (рис. 1.8). Активированные энзимы являются сериновыми протеазами (за исключением фактора XIII). Активированные кофакторы, не обладая самостоятельной ферментативной активностью, играют роль коферментов.

Сериновыми протеазами являются активированные факторы IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, ПК. Каталитические домены сериновых протеиназ относятся к трипсиноподобным протеиназам, каталитический участок активного центра которых формируется триадой аминокислот, соответствующих Гис57, Сер195, Асп102 химотрипсина.

Трансглутаминаза – фактор XIII.

Кофакторы – факторы V, VIII, ВМК.

Таблица 3.1. Плазменные компоненты свертывания крови

Символ фактора	Название	Время полужизни в плазме (ч)	Концентрация в плазме, ммоль/л	Зависимость от витамина К
I	Фибриноген	64–96	8800 (2–4 г/л)	–
II	Протромбин	48	1400 (100–150 мг/л)	+
V	Фактор V (проакцелерин)	12	20 (7–10 мг/л)	–
VII	Фактор VII (проконвертин)	4–6	10 (0,4–0 мг/л)	+
VIII	Фактор VIII (антигемофильный глобулин A)	15–20	0,7 (зависит от группы крови)	–
IX	Фактор IX (фактор Кристмаса)	24	90 (3–5 мг/л)	+
X	Фактор X (фактор Стюарта-Прауэра)	32	170 (8–10 мг/л)	+
XI	Фактор XI (антигемофильный глобулин C, фактор Розенталя)	60–80	30 (3–6 мг/л)	–
XII	Фактор XII (фактор Хагемана)	50–70	400 (25–35 мг/л)	–
XIII	Фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор, трансглутаминаза)	40–50	50 (20–30 мг/л)	–
ПК	Прекалликреин (фактор Флетчера)		30–50 мг/л	–
ВМК	Высокомолекулярный кининоген (фактор Фитцджеральда)		60–80 мг/л	–

Содержание компонентов гемостаза, в том числе плазменных факторов свертывания, в системе циркуляции существенно больше, чем необходимо для формирования фибринового сгустка. Процесс свертывания происходит в условиях насыщения субстратами (рис. 1.23). Вследствие этого образование гемостатического тромба может быть достигнуто при значительном диапазоне концентрации и активности конкретного фактора свертывания. Клинические проявления недостаточности компонентов свертывания возникают при их существенном уменьшении. Наследственные генетически обусловленные дефициты факторов плазменного гемостаза встречаются редко и затрагивают, как правило, недостаток одного из факторов. Чаще всего это гемофилия А (дефицит фактора VIII) или гемофилия В (дефицит фактора IX).

Для эффективного взаимодействия и активации белков свертывания крови необходимо образование комплексов этих белков, их кофакторов и субстрата (рис. 1.17). Большинство процессов активации промежуточных факторов свертывания протекают на фосфолипидах клеточных мембран. В месте сборки

комплексов происходит концентрация факторов свертывания. Здесь же присутствуют кофакторы, которые существенно ускоряют процесс формирования сгустка. В создании активного комплекса участвуют:

- Фермент (активный плазменный фактор – протеолитический фермент).
- Субстрат (профермент).
- Активированный кофактор.
- Ионы Ca (Ca^{2+}).
- Кислые фосфолипиды и специфические рецепторы на поверхности клеток.

Витамин-К-зависимые белки

Важной характеристикой некоторых белков системы свертывания крови является зависимость их полноценного синтеза от наличия витамина К (К – от слова коагуляция).

Витамин-К-зависимыми белками являются ф. II, VII, IX, X, протеины С и S. Эти белки синтезируются в печени, характерной их особенностью является наличие уникальной аминокислоты – γ -карбоксиглутамина. Эта аминокислота образуется во время синтеза витамин-К-зависимых белков в печени путем γ -карбоксилирования глутамина ферментом γ -карбоксиглутаминпеptидазой, в работе которого принимают участие активированные формы витамина К (рис. 3.1).

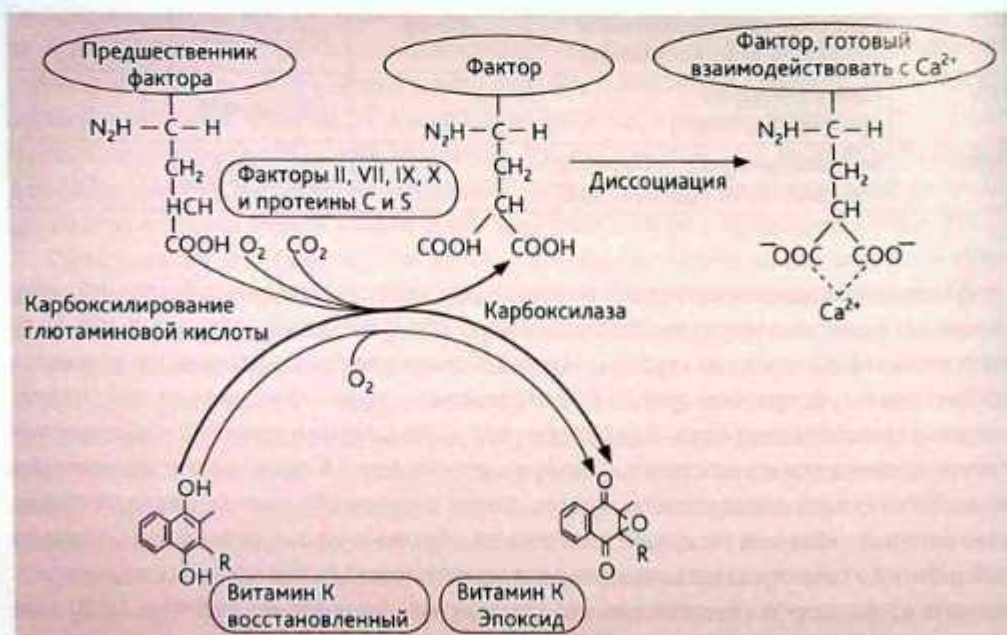


Рис. 3.1. Влияние витамина К на образование карбоксилированной глутаминовой кислоты при синтезе факторов в печени. В результате витамин-К-зависимые факторы становятся способными взаимодействовать с ионами Ca . Таким образом, все факторы, для проявления активности которых необходим Ca^{2+} , являются витамин-К-зависимыми

γ -карбоксиглутамин дает возможность витамин-К-зависимым белкам через ионы Ca^{2+} образовывать комплексы с кислыми фосфолипидами.

Неферментные активаторы свертывания крови

К неферментным активаторам свертывания крови (коферментам) относятся факторы V и VIII. Оба – высокомолекулярные белки, имеющие сходную структуру. Они циркулируют в плазме в неактивной форме и активируются тромбином. Ф. VIII в плазме связан с фактором Виллебранда (vWF), который защищает его от преждевременной инактивации. Диссоциация ф. VIII из комплекса с vWF происходит под воздействием тромбина. Именно диссоциация является физиологическим механизмом активации ф. VIII.

Физиологическая роль ф. V и ф. VIII заключается в выполнении роли кофакторных белков при образовании теназного и протромбиназного комплексов, которые обеспечивают активацию соответственно ф. X и протромбина во взаимодействии с ф. X и ф. IX (рис. 3.2). Основным ингибитором ф. Va и VIIIa является комплекс «протеин С – протеин S».

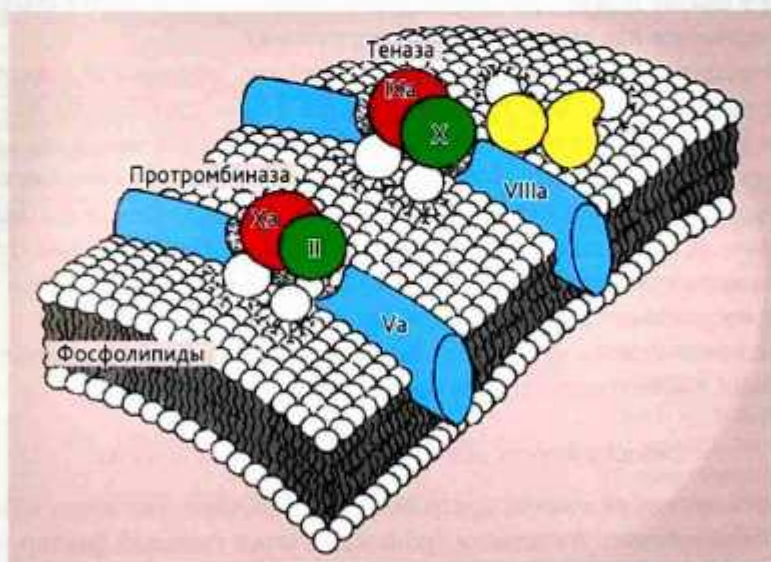


Рис. 3.2. Формирование теназного и протромбиназного комплексов. Теназа: фермент – ф. IXa, кофермент – ф. VIIIa, субстрат – ф. X. Происходит активация ф. X до ф. Xa. Ингибируется системой «протеин С – протеин S». Протромбиназа: фермент – ф. Xa, кофермент – ф. Va, субстрат – ф. II. Происходит активация ф. II до ф. IIa. Ингибиторами протромбиназного комплекса являются комплекс «протеин С – протеин S» и антитромбин

Коагуляционный каскад активации протромбиназы

Изучение процесса свертывания крови до настоящего времени происходит в основном *in vitro* в смоделированных условиях. Исследование взаимодействия плазменных белков гемостаза в отрыве от других компонентов привело к созданию теории коагуляционного каскада активации тромбина. Знание коагуляционного каскада свертывания плазмы необходимо для правильной интерпретации результатов коагулологических тестов.

Активация протромбина – многостадийный процесс, который происходит по механизму проферментного-ферментного преобразования. С одной стороны, это обеспечивает нарастание сигнала – активация одной молекулы предшествующего уровня в системе свертывания приводит к активации от нескольких десятков до нескольких сотен тысяч последующих молекул (рис. 1.14). С другой стороны, многостадийность позволяет более гибко регулировать процесс.

В классическом каскаде свертывания крови *in vitro* выделяют 2 пути активации процесса.

- Активация тканевым фактором (ТФ). Так как ТФ не относится к плазменным факторам, в обычных условиях не контактирует с кровью, но появляется в плазме только при повреждении тканей, то активация с его участием обозначается как **внешний путь** свертывания.
- Активация ф.ХІІ при контакте с отрицательно заряженной поверхностью твердого тела, или контактная активация. Поскольку фактор ХІІ в норме присутствует в плазме, активация с его участием обозначается как **внутренний путь** свертывания (все факторы присутствуют в плазме в норме).

Внешний и внутренний пути сходятся на факторе Х. Последний со своим кофактором – ф. Va участвует в образовании протромбиназы – ферментативного комплекса, который активирует протромбин с образованием тромбина. Дальше активация продолжается до выпадения фибрина (рис. 3.3).

Лабораторная оценка коагуляционного каскада активации протромбиназы (свертывания плазмы) оценивается тестами коагулограммы.

Внешний путь образования протромбиназы

Внешний путь образования протромбиназы короткий, что ведет к быстрому тромбинообразованию. Активация происходит через тканевой фактор. При контакте ТФ и ф. VIIa формируется комплекс, который активирует ф. X. Фактор Ха при участии фактора Va также в присутствии ионов Ca^{2+} на отрицательно заряженной фосфолипидной поверхности формируют протромбиназу. Внешний путь образования протромбиназы достаточно быстрый. В настоящее время признано, что внешний путь – основной физиологический путь запуска процесса свертывания крови; это быстро реагирующий на повреждение тканей механизм.

Активность внешнего пути поддерживается за счет положительной обратной связи, в которую включены несколько механизмов (рис. 3.4), из которых наиболее существенными являются активация тромбином факторов VII и V.

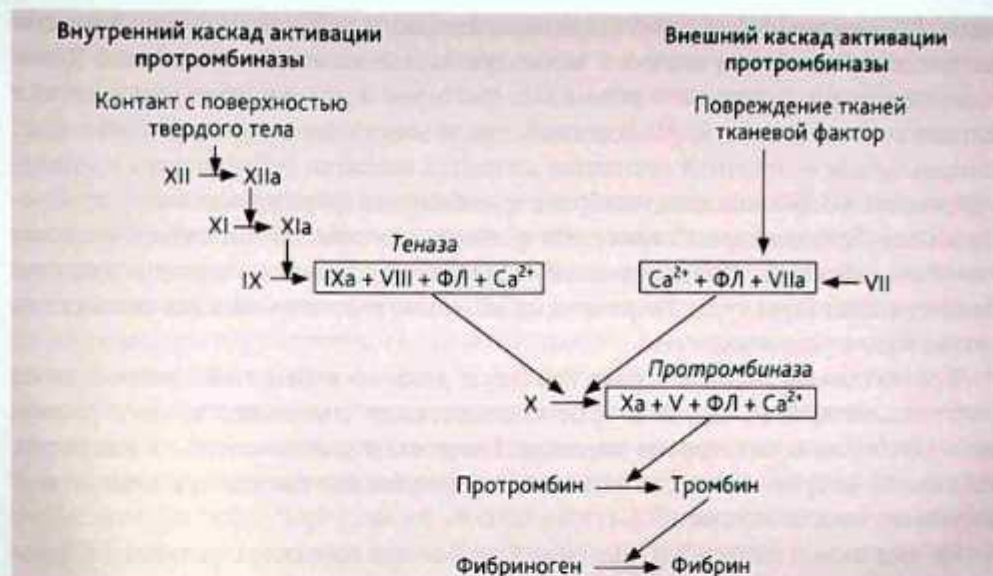


Рис. 3.3. Коагуляционный каскад активации тромбина. Выделяют внешний и внутренний пути активации протромбиназы

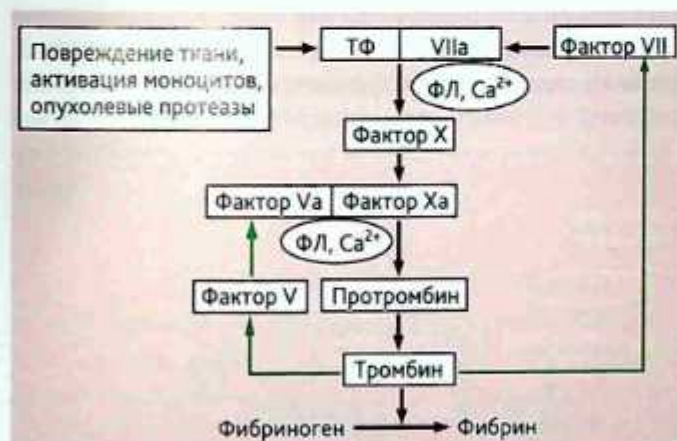


Рис. 3.4. Внешний путь свертывания плазмы. Внешний путь активируется травмированием тканей с выходом из поврежденного эндотелия в кровотоке тканевого фактора (ТФ), поддерживается активность внешнего пути положительными обратными связями

Внешний путь активации протромбиназы в коагулограмме оценивается протромбиновым временем (ПТВ).

Внутренний путь образования протромбиназы

Контактная активация плазменных факторов

Внутренний путь активации свертывания начинается с контактной активации факторов коагуляционного каскада – ф. XII, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена (ВМК); *in vivo* значение именно такого запуска реакций сни-

жено. К факторам контактной активации относят и ф.ХІ. Все сосуды покрыты эндотелием, мембраны которого характеризуются высокой текучестью. Появление «твердого тела» для плазменных факторов и для тромбоцитов – сигнал патологии и активации. В физиологических условиях, по-видимому, основными инициаторами контактной активации являются коллаген субэндотелия и инвертированная фосфолипидная мембрана тромбоцитов, формирующаяся после реакции освобождения тромбоцитарных факторов. Активации контактной системы могут способствовать внеклеточная РНК, амилоидные белки, гепарины и другие биологические структуры. Теоретически их можно рассматривать как контактные активаторы в условиях *in vivo*.

Контактная активация играет большую роль во взаимодействии системы свертывания крови с другими протеолитическими системами крови – ренин-ангиотензиновой, калликреин-кининовой, системой комплемента – и важна для активации фибринолиза. Схематично взаимодействие белков при контактной активации показано на рис. 3.5.

По-видимому, фактор XII, активирующийся при контакте с условиями, формирующимися при повреждении или патологии, можно рассматривать как «рецептор патологии». Его активная форма является инициатором фибринолиза, воспаления, аутолиза, иммунных реакций. Факторы контактной активации – XII, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген, C1-ингибитор – синтезируются в печени. Контактная фаза активации контролируется как положительной, так и отрицательной обратной связью. В результате активации калликреин-кининовой системы освобождается биологически активный брадикинин, который является

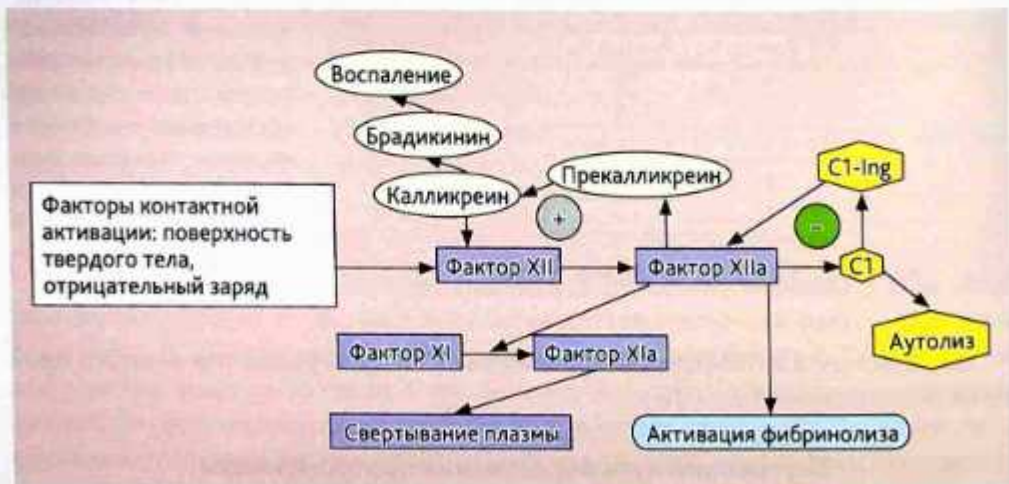


Рис. 3.5. Контактная фаза активации плазменных факторов. Контакт с поверхностью твердого тела вызывает активацию фактора XII, который запускает каскады свертывания плазмы, фибринолиза, калликреин-кининовой системы (положительная обратная связь), системы комплемента (отрицательная обратная связь)

мощным медиатором воспаления в участке повреждения. Активация C1-комплемента в конечном счете приводит к аутолизу поврежденных клеток и активации гуморального иммунитета. На C1 вырабатывается ингибитор (C1-Ing), который одновременно подавляет фактор XIIa (отрицательная обратная связь).

По-видимому, контактная активация играет важную роль в активации свертывания крови при взаимодействии крови с нефизиологическими поверхностями, в частности при установке искусственных протезов или искусственных клапанов сердца. *Ex vivo* активация контактного пути происходит во время гемодиализа, при процедуре искусственного кровообращения и экстракорпоральной мембранной оксигенации, при которых кровь вступает в контакт с искусственным покрытием. Антикоагулянтная терапия (цитрат натрия или гепарин), необходимая для поддержания потока крови через экстракорпоральный контур, не предотвращает контактную активацию, а скорее подавляет активность других ферментов системы свертывания. Эксперименты с блокирующими антителами к ф.XIIa показали предотвращение нежелательного свертывания крови во время этих процедур без обычного риска кровотечений, связанного с применением антикоагулянтов. Поэтому использование компонентов контактной системы в качестве потенциальных мишеней терапии представляется перспективной стратегией для профилактики и лечения тромбозов с минимальным или нулевым риском кровотечения.

Таким образом, белки контактной системы имеют ограниченное значение при коагуляции с целью остановки кровотечения, но необходимы для формирования фибрина в ходе воспалительной реакции, для инициации и усиления активности фибринолиза, кининогенеза, ренин-ангиотензиновой системы и системы комплемента.

Каскад внутреннего пути активации протромбиназы

Внутренний путь образования протромбиназы (рис. 3.6) включает активирующее действие ф.XIIa на ф.XI, который в свою очередь активирует ф.IX. В физиологических условиях ф.XI активируется не только ф. XIIa, но и в значительной степени тромбином по механизму положительной обратной связи. Ф. XI относительно устойчив к инактивации ингибиторами и имеет длительный период полувыведения. Образовавшись в достаточном количестве, ф. XI увеличивает количество активного ф.IX, за счет чего соответственно значительно возрастает концентрация тромбина, который, в свою очередь, активирует по механизму положительной обратной связи факторы VIII и V. В то же время избыток тромбина тормозит начало процесса фибринолиза за счет активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (TAFI).

Внутренний путь активации протромбиназы в коагулограмме оценивается тестом «активированное частичное тромбопластиновое время», иногда обозначаемое как АПТВ (активированное протромбиназное время).

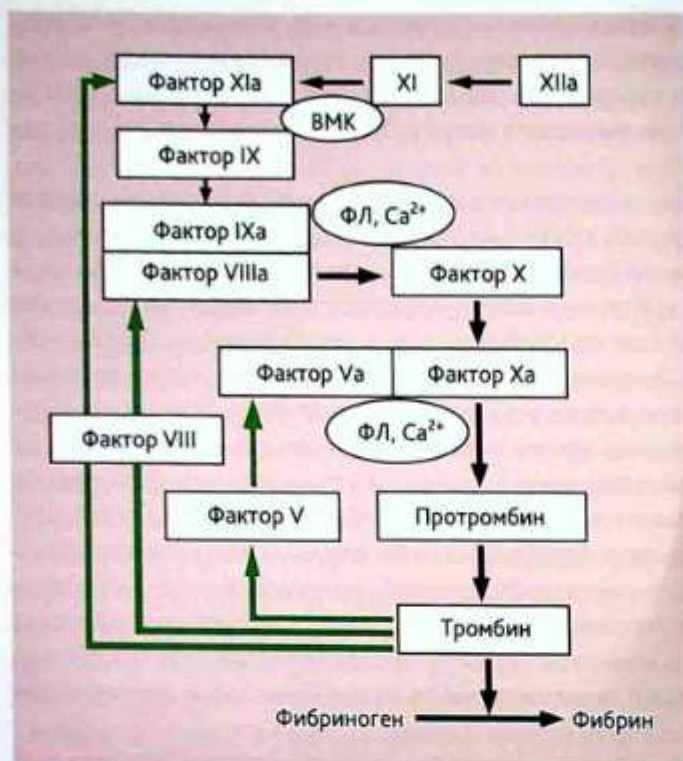


Рис. 3.6. Внутренний каскад активации протромбиназы начинается с контактной активации ф.XII. Ф.XIIa переводит ф.XI в ф.XIa, который активирует ф.IX. Последующие этапы активации по внутреннему пути требуют Ca^{2+} и зависят от присутствия фосфолипидов. Ф.IXa активирует фактор X, эта реакция не очень эффективная. Однако, как только сформируется тромбин, он активирует ф.VIII. Ф.VIIIa вместе с фактором IXa, ионами Ca^{2+} и фосфолипидами очень эффективно активируют ф.X. Обратная связь поддерживает развитие процесса за счет активации тромбином факторов XI, VIII и V

Конечный этап свертывания плазмы – образование фибринового сгустка

Конечная стадия каскада свертывания плазмы заключается в образовании из растворимого плазменного белка фибриногена нерастворимого фибрина под воздействием тромбина и ф.XIII (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Последовательность образования нерастворимого фибрина из растворимого фибриногена

Конечный этап свертывания плазмы в коагулограмме оценивается тестом «тромбиновое время». Так как тромбин является ключевым фактором свертывания и одновременно молекулой, на которую направлено влияние антикоагулянтов, в первую очередь антитромбина, то ТВ может существенно меняться под влиянием антитромбина и его кофактора гепарина. Для оценки полимеризации мономеров фибрина в присутствии гепарина используется тест «рептилазное

время». Рептилаза, или батроксбин – тромбиноподобная протеаза из яда щитомордника обыкновенного, способна вызывать переход фибриногена в фибрин, не подавляется антитромбином и высокомолекулярным и низкомолекулярными гепаринами.

Тромбин

Тромбин – ключевой фермент гемостаза, является сериновой протеазой. Тромбин образуется из протромбина – витамин-К-зависимого белка. Синтез протромбина происходит в печени, протромбин циркулирует в плазме в неактивной форме, так как его активный центр заблокирован собственным структурным компонентом. В комплексе ф.Ха–Va–II на фосфолипидной поверхности происходит ограниченный протеолиз протромбина. При расщеплении протромбина образуется несколько структур с уменьшающейся молекулярной массой – фрагменты 1–2, претромбин, тромбин (рис. 3.8). Наиболее значимым продуктом является сериновая протеаза – α -тромбин, на молекуле которой имеется, по крайней мере, 4 сайта связывания для субстратов, ингибиторов, кофакторов и иона кальция. Это, а также способность тромбина активно функционировать не только на твердой фазе, но и в токе крови, позволяет ему выполнять многочисленные функции.

Важнейшие функции тромбина в гемостазе:

- ограниченный протеолиз фибриногена до фибринмономеров (происходит в жидкой фазе – кровотоке);
- активация факторов V, VIII, VII, XI;
- активация тромбоцитов;
- в комплексе с тромбомодулином тромбин активирует протеин C;
- активация ф. XIII;
- ограниченный протеолиз плазматической карбоксипептидазы В до активной формы – активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (TAFI);

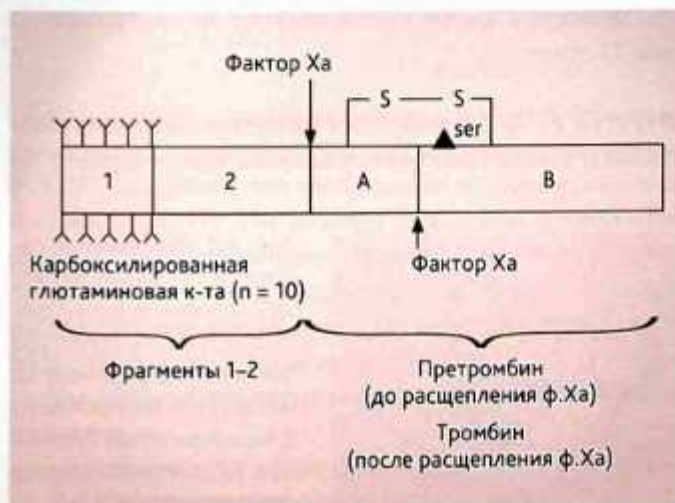


Рис. 3.8. Схематическое изображение протромбина. Фрагмент 1 содержит 10 остатков карбоксилированной глутаминовой кислоты (зависимость от витамина К), стрелками показаны места действия фактора Ха, ser – место с каталитически активным остатком серина. Об интенсивности формирования тромбина из протромбина можно судить по количеству фрагментов 1–2 (определяют методом ИФА или ИХА)

- стимуляция выброса из эндотелиоцитов тканевого активатора плазминогена (t-PA).

Косвенным подтверждением важности тромбина для организма может служить тот факт, что известны лишь единичные описания пациентов с гомозиготным дефектом молекулы тромбина, а пациенты с гипопротромбинемией встречаются чрезвычайно редко.

Важнейшим ингибитором тромбина является антитромбин. Несколько меньшую роль играет кофактор гепарина II.

В настоящее время для характеристики состояния плазменного гемостаза активно внедряется тест генерации тромбина – интегральный метод, который дает информацию о динамике образования тромбина в плазме крови.

Фибриноген

Фибриноген – уникальная молекула, обладающая свойством быстро полимеризоваться в токе крови и образовывать прочную объемную структуру, которая эффективно закрывает повреждение сосуда и предотвращает потерю крови. Фибриноген помимо формирования фибрина принимает участие в агрегации и адгезии тромбоцитов, определяет вязкость крови, влияет на взаимодействие форменных элементов крови с сосудистой стенкой. Концентрация фибриногена в крови здорового человека значительно выше, чем концентрация других белков гемостаза. Синтез фибриногена происходит в печени и не зависит от витамина К. Некоторое количество фибриногена синтезируется в мегакариоцитах и содержится в тромбоцитах. Этот фибриноген несколько отличается от фибриногена, синтезированного в печени. Фибриноген – большой многокомпонентный белок (М. м. 340 кДа), который состоит из трех пар полипептидных цепей – 2α , 2β , 2γ , связанных между собой 29 дисульфидными связями и переплетенных друг относительно друга (рис. 3.9).

Фибринопептиды А и В (FPA/FPB) отщепляются тромбином от фибриногена, инициируя процесс полимеризации и превращение фибриногена в фибрин. Пространственная структура молекулы фибриногена состоит из центрального Е-домена и 2 периферических D-доменов.

Фибринопептиды А и В (FPA и FPB) формируются глобулярными участками α - и β -цепей. FPA и FPB закрывают комплементарные участки в фибриногене и не

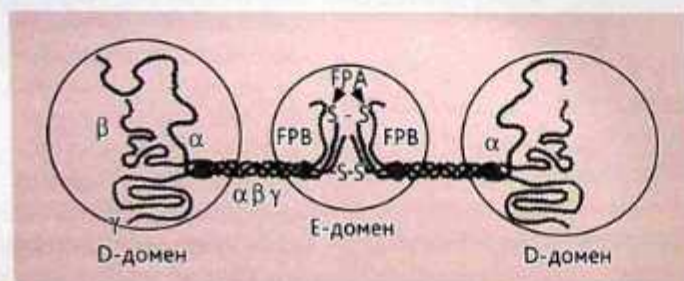


Рис. 3.9. Фибриноген состоит из 3 парных белковых молекул: α , β и γ . Пространственная структура фибриногена формируется из глобулярных Е-домена и 2 периферических D-доменов. В Е-домене находятся фибринопептиды А и В

позволяют этой молекуле полимеризоваться. Процесс взаимодействия фибриногена и тромбина происходит в жидкой фазе – кровотоке. Тромбин соединяется с фибриногеном и отщепляет конечные последовательности от α - и β -цепей – 2 FPA и 2 FPB (рис. 3.10). Образуются растворимые мономеры фибрина. В дальнейшем происходит спонтанное соединение комплиментарных участков фибринмономеров. Сначала образуются димеры, далее олигомеры и в конечном итоге собираются мононити полимеризованного фибрина. Таким образом, фибриновая цепь формируется спонтанной, конец в конец, полимеризацией фибрин-мономеров, при которой концевая часть одного мономера взаимодействует с центральной частью другого мономера в месте отщепления FPA. Результатом такой полимеризации является линейный олигомер шириной в 2 молекулы (рис. 3.10). На этом этапе фибрин легко растворим в 5-молярной мочеvine, поэтому он получил название *растворимого фибрина*.

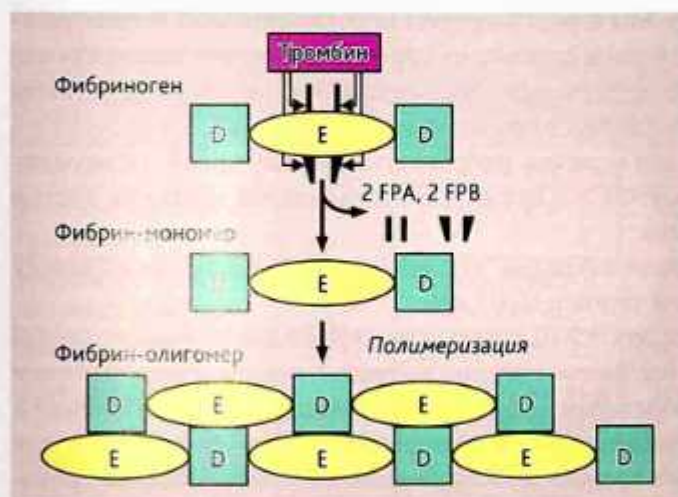


Рис. 3.10. Формирование фибрин-полимеров из фибриногена. Тромбин отщепляет FPA и FPB от молекулы фибриногена, тем самым образуются растворимые мономеры фибрина, которые способны полимеризоваться до линейного олигомера

Фактор XIII

Фактор XIII – транскляминаза. В плазме большая часть ф.XIII связана с фибриногеном. Активируется ф.XIII за счет ограниченного протеолиза неактивного ф.XIII тромбином, что происходит одновременно с отщеплением пептида А от фибриногена. Ф.XIIIa образует ковалентные связи между γ -цепями нитей растворимого олигомера фибрина (рис. 3.11), которые соединяются за счет образования пептидных мостиков между боковыми радикалами лизина и глутамина. Сшитые между собой мононити фибрина образуют прочную сеть. В такой форме фибрин не растворяется, плазма сворачивается.

Как и большинство других ферментов, ф.XIII выполняет несколько функций в гемостазе:

- стабилизирует фибриновый сгусток путем образования ковалентных связей между γ -цепями мономеров фибрина;

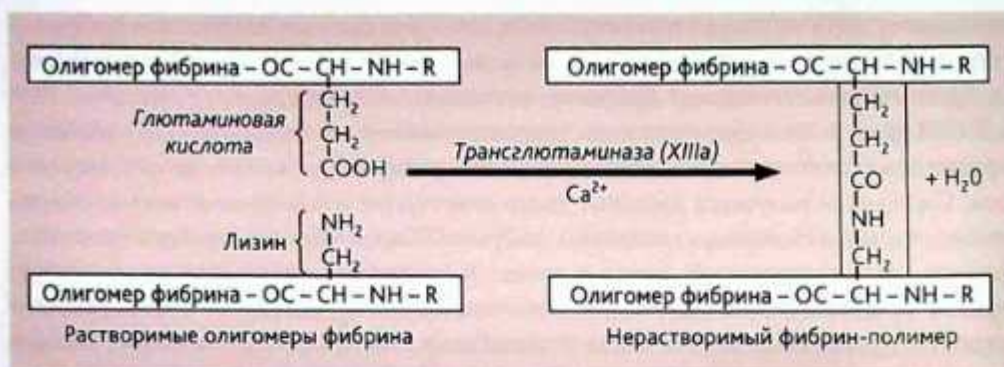


Рис. 3.11. Образование нерастворимого фибрина под влиянием фактора XIIIa

- значительную роль ф. XIII играет в процессах полимеризации актина, миозина и других компонентов цитоскелета тромбоцитов, что важно для активации тромбоцитов и ретракции образовавшегося фибринового сгустка; это объясняет наличие ф. XIII в цитоплазме тромбоцитов;
- участвует в связывании молекул фибронектина между собой и с молекулами фибрина – вероятно, это важно для направленной миграции клеток и процессов репарации;
- играет роль в биосинтезе коллагена, катализируя образование связей между молекулами коллагена типов I, II, III и V.

Первым признаком дефицита ф. XIII является медленное заживление пупочной ранки и кровотечение из нее на протяжении первых 3 недель жизни. Вторым по распространенности симптомом дефицита ф. XIII является кровоизлияние в мозг и его оболочки при рождении или в первый год жизни. В дальнейшем для дефицита ф. XIII характерна кровоточивость смешанного типа – мелкие кровоизлияния в кожу, синяки, подкожные и межмышечные гематомы, кровоизлияния в суставы. При дефиците ф. XIII все параметры коагулограммы остаются в пределах нормы. Исследование сосудисто-тромбоцитарного гемостаза также не выявляет существенных нарушений. В этих условиях геморрагический диатез требует определения ф. XIII, поскольку это единственный фактор свертывания, при дефиците которого все тесты, характеризующие разные фазы свертывания крови, имеют нормальные показатели.

Фибрин

Образовавшийся фибриновый сгусток – трехмерная молекулярная сеть, в которую включены тромбоциты, эритроциты и лейкоциты. Активированные тромбоциты, связанные с нитями фибрина через рецепторы GP IIb–IIIa, сокращаются под действием тромбоцитарного актомиозина. Происходит ретракция сгустка крови. Сгусток уплотняется, из него выдавливается часть сыворотки. Формирование окончательного тромба наступает на 10–15-й минуте после полимеризации фибрина.

Если тромбоциты отсутствуют или имеют дефект GP IIb-IIIa, то ретракции кровяного сгустка не происходит и он быстро лизируется в процессе фибринолиза. На этом основан тест лизиса эуглобулинов, который выполняется на плазме без тромбоцитов и используется для характеристики активности фибринолиза.

При отсутствии ретракции тромба в сосудистом русле возможен отрыв тромботических масс и развитие состояния тромбоэмболии.

Антикоагулянты

Антикоагулянты и ингибиторы системы свертывания крови представлены в табл. 3.2.

Таблица 3.2. Ингибиторы системы свертывания плазмы крови

Вещество	Аббре-виатура	Субстрат	Концентрация в плазме, нмоль/л	Активизация гепарином
Протеин С	РС	ф.VIII, ф.V	65 (4 мг/л)	
Протеин S (кофактор протеина C)	PS	ф.VIII, ф.V	300 (25 мг/л)	
Ингибитор пути тканевого фактора	TFPI	Комплекс ТФ-ф.VIIa-ф.X.	2,5 (0,1 мг/л)	+
Антитромбин	АТ	ф.IIa, IXa, Xa, XIa,	2400 (150 мг/л)	+
α_2 -макроглобулин		Неспецифический ингибитор протеаз	3500 (2,5 г/л)	
Гепарин кофактор II		ф.IIa	1200 (87 мг/л)	+
C1-ингибитор	C1-ing	ф.XIIa, ф.XIa	1700 (180 мг/л)	
α_1 -ингибитор протеаз		ф.XIa	3500 (2,5 г/л)	

Ингибиторы системы свертывания крови условно можно разделить на три группы – ингибиторы ферментов, ингибиторы коферментов и ингибиторы активных комплексов.

Ингибиторы ферментов системы гемостаза

Среди ингибиторов ферментов системы гемостаза, в свою очередь, можно условно выделить 2 группы – ингибиторы сериновых протеаз и неспецифические ингибиторы протеаз, к которым относится α_2 -макроглобулин.

Ингибиторы сериновых протеаз, или серпины. Большинство ферментов каскада свертывания крови составляют сериновые протеазы. Сериновыми протеазами также являются ферменты фибринолитической системы, некоторые ферменты системы комплемента, эластаза, трипсин, химотрипсин. Все они имеют гомоло-

гичную структуру. Существует группа ингибиторов, специфичных для группы сериновых протеаз – серпины. Серпины имеют строение, похожее на строение субстрата сериновых протеаз. Однако, охотно соединяясь с ферментами, серпины не подвергаются немедленному расщеплению. Это соединение блокирует ферментативную активность сериновой протеазы (рис. 3.12). Различные серпины несколько отличаются по строению, могут быть более или менее специфичными к ферментам. Кроме того, на активность и специфичность серпинов может влиять микроокружение.

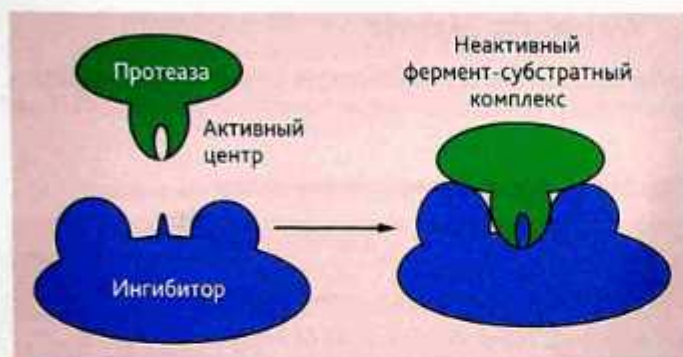


Рис. 3.12. Ингибирование активных сериновых протеаз серпинами за счет образования стабильного неактивного фермент-субстратного комплекса

Антитромбин и гепарин

Антитромбин (синоним – антитромбин III, АТ) – гликопротеин, состоит из 432 аминокислот и имеет 4 участка гликолизации с разным количеством сиаловых кислот. АТ связывается со специфическими сульфатными группами на пентасахаридных структурах гепарина. Этот ингибитор формирует стабильный 1 : 1 комплекс с сериновыми протеазами плазменного гемостаза.

АТ синтезируется в печени и является наиболее значимым ингибитором системы свертывания крови. Активности находящегося в крови здорового человека антитромбина достаточно, чтобы ингибировать в три раза больше тромбина, чем может образоваться из циркулирующего протромбина.

Помимо тромбина АТ ингибирует фактор Ха, а также факторы IXa, XIa, XIIa и калликреин. Антитромбин по структуре гомологичен α_1 -антитрипсину, в активном центре АТ присутствует специфическая связь Arg-Ser, которая и взаимодействует с сериновыми протеазами.

Активность АТ в десятки тысяч раз усиливается в присутствии отрицательно заряженных гликозаминогликанов, таких как гепарансульфат, входящих в структуру гликокаликса на поверхности эндотелиальных клеток. Аналогичное потенцирующее действие на АТ оказывает гепарин (рис. 3.13), вырабатываемый тучными клетками. Антикоагулянтное действие гепарина связано с его способностью вызывать конформационные изменения АТ. Функция гепарина каталитическая. После образования эквимольного 1 : 1 комплекса «тромбин–антитромбин» (ТАТ) гепарин может освобождаться для организации других комплексов.

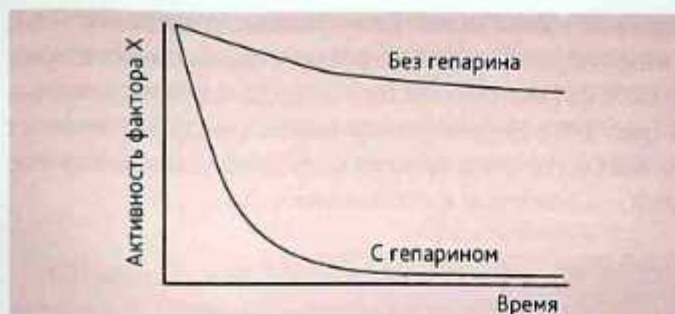


Рис. 3.13. Влияние гепарина на активность фактора Ха в плазме. Гепарин существенно усиливает ингибирующий эффект антитромбина на фактор Ха

Нефракционированный гепарин представляет собой смесь гепаринов различной молекулярной массы — от 3 до 30 кДа. Это сульфатированный глюкозамингликан, в состав которого входят повторяющиеся единицы D-глюкозамина, L-идуроновой или глюкуроновой кислоты (рис. 3.14), от 15 до 100 моносахаридных остатков с выраженным отрицательным зарядом. Он широко применяется в клинической практике как антикоагулянт.

Однако только около 30% исходной структуры гепарина обладает антикоагулянтной активностью, то есть способностью связываться с антитромбином, остальные 70% массы нефракционированного гепарина представляют собой структуру, не обладающую способностью связываться с антитромбином.

Низкомолекулярный гепарин (НМГ, английская аббревиатура LMWH) получают из нефракционированного гепарина химической или ферментативской обработкой. Уменьшение длины цепей гепарина снижает его способность связываться с белками крови, увеличивает время полувыведения из крови. Снижение массы гепарина до 5,4 кДа (18–19 моносахаридных остатков) после комплексообразования с антитромбином ингибирует фактор Ха, гепарины большей массы ингибируют и



Рис. 3.14. Структурный компонент гепарина представляет собой сульфатированный глюкозамингликан, в состав которого входят повторяющиеся единицы L-идуроновой или глюкуроновой кислоты и D-глюкозамина. Нефракционированный гепарин имеет от 15 до 100 моносахаридных остатков

тромбин, и фактор Ха. Гепарин не только значительно усиливает активность АТ, но и модулирует его ингибиторную активность. Нефракционированный гепарин связывается одновременно как с ферментом, так и с АТ, тогда как НМГ связывается только с молекулой АТ (рис. 3.15). Нефракционированный гепарин усиливает активность АТ в отношении всех сериновых протеаз каскада свертывания крови, тогда как низкомолекулярный – в основном в отношении ф.Ха.



Рис. 3.15. Эффект нефракционированного гепарина (М. м. до 30 кДа) по стабилизации комплекса «тромбин–антитромбин» и низкомолекулярного гепарина (М. м. 3 кДа), предпочтительно влияющего в качестве кофактора на образование комплекса «фактор Ха – антитромбин». TAT – тромбин-антитромбиновый комплекс

Наиболее эффективен АТ в токе крови. Если же сформировался протромбин-назый комплекс из фосфолипидов, Са, ф. Va, ф. Ха, то ингибирующий эффект АТ/гепарина на ф. Ха становится малоэффективным.

Гепарин и НМГ широко используются для профилактики и лечения тромбозно-болической болезни. Для реализации их антикоагулянтного эффекта в крови необходимо присутствие не менее 60% от обычной концентрации АТ. Антикоагулянтное действие гепарина можно быстро и обратимо снять внутривенным введением протамина сульфата – препарата белкового происхождения, который получают из спермы рыб; он имеет способность ковалентно связываться с гепарином. Гепарин помимо активации АТ обладает дополнительными антикоагулянтными эффектами. Очень важной функцией является нейтрализация гепарином тромбоцитарного фактора 4, который освобождается из α -гранул, а также стимуляция гепарином освобождения из сосудистой стенки ингибитора внешнего пути (TFPI) и кофактора гепарина II.

Серьезным осложнением гепаринотерапии может быть развитие гепарин-индуцированной тромбоцитопении (ГИТ) и рикошетных тромбозов (см. раздел в главе 6 «Тромбоцитопения, вызванная гепарином»).

Кофактор гепарина II

Другим серпином, инактивирующим тромбин, является кофактор гепарина II; это гликопротеин, одноцепочечный полипептид с молекулярной массой 65 000. Его концентрация в крови составляет около 90 мкг/мл. Это слабый антикоагулянт,

действие которого выявляется в присутствии гепарина после удаления из плазмы антитромбина. Кофактор гепарина II избирателен, он не ингибирует активность других сериновых протеаз системы свертывания крови. С тромбином кофактор гепарина II образует стехиометрический комплекс (1:1), тем самым инактивирует тромбин. Реакция значительно ускоряется в присутствии дерматансульфата.

C1-ингибитор

C1-ингибитор (C1-Ing) – наиболее важный ингибитор факторов контактной активации. C1-ингибитор – высокогликозилированный серпин, ингибирующий факторы XIIa, XIa, калликреин, плазмин и субкомпоненты C1r и C1s первого компонента системы комплемента. Вклад C1-ингибитора в систему гемостаза, вероятно, не очень велик, так как его дефицит не проявляется ни кровоточивостью, ни тромбозами. Основное проявление дефицита C1-ингибитора – рецидивирующие ангионевротические отеки.

α_2 -макроглобулин

α_2 -макроглобулин – гликопротеид, неспецифический ингибитор протеаз. Это крупный белок с молекулярной массой 725 000 Да. Механизм его действия отличается от такового у серпинов. Он действует по принципу мышеловки, у которой дверца захлопывается после попадания объекта внутрь (рис. 3.16). Образуя связи с внутренними пептидами α_2 -макроглобулина, протеазы не могут расщепить такой высокомолекулярный субстрат. α_2 -макроглобулин имеет большую емкость по связыванию протеиназ, но относительно низкое сродство. Он включается в физиологическую инактивацию протеиназ после истощения других ингибиторов, обладающих высоким сродством, но относительно низкой емкостью. Он инактивирует большинство протеаз, включая ферменты системы свертывания крови и фибринолиза. Потребление α_2 -макроглобулина обычно обнаруживают в состояниях повышенной протеолитической активности, в частности, при панкреатитах. У новорожденных содержание α_2 -макроглобулина примерно в 2 раза выше, чем у взрослых. Значение этого ингибитора в период новорожденности значительно выше, чем у взрослых, поскольку концентрация специфических ингибиторов ниже.



Рис. 3.16. Ингибирование активных протеаз за счет погружения фермента внутрь макромолекулы α_2 -макроглобулина

Ингибиторы коферментов

Наиболее значимым ингибитором в этой группе является система протеина С.

Система протеина С включает непосредственно сам протеин С (РС) и его кофактор протеин S (PS). Другими компонентами системы являются мембранный белок тромбомодулин (ТМ), рецептор протеина С на эндотелиальных клетках и С4-связывающий протеин. Система протеина С вместе с антитромбином и ингибитором внешнего пути – наиболее важные и эффективные компоненты, обеспечивающие функцию «мусорщиков», очищающих плазму от активированных компонентов плазменного гемостаза.

Протеин С

Протеин С – витамин-К-зависимый белок плазмы, синтезируется в печени в виде единой полипептидной цепи, содержащей легкую цепь с молекулярным весом 21 кДа и тяжелую цепь с молекулярным весом 41 кДа, соединенных дисульфидной связью. Аминокислотная последовательность и структура APC высокоомологична тромбину и другим витамин-К-зависимым коагуляционным факторам – ф. VII, ф. IX, ф. X. Минимальная его концентрация в плазме крови здоровых людей составляет примерно 3 мг/мл, что эквивалентно 60 нмоль/л. Активированный протеин С (APC) является специфической сериновой протеазой, сходной по структуре с другими витамин-К-зависимыми сериновыми протеазами. Основная функция APC в гемостазе – инактивация факторов Va и VIIIa. Помимо этого, он является основным компонентом Хагеман-независимого внутреннего пути активации фибринолиза.

Активация РС происходит на поверхности эндотелиальных клеток. РС связывается с его рецептором на эндотелиальной мембране и контактирует с комплексом «тромбин – тромбомодулин». Происходит ограниченный протеолиз неактивного РС с образованием активной сериновой протеазы.

APC способен инактивировать факторы Va и VIIIa, расположенные на фосфолипидной мембране активированных тромбоцитов или других клеток. Протеин S является кофактором этой реакции (рис. 3.17). Механизм инактивации факторов Va и VIIIa протеином С заключается в их лизисе. Время полувыведения APC из плазмы примерно 15 мин. Фактор Виллебранда (vWF) защищает ф. VIII от преждевременной инактивации, без него период полувыведения ф. VIII сокращается до 1–1,5 часов. При типе 2N болезни Виллебранда мутация затрагивает сайт vWF, связывающий ф. VIII, последний лишается защиты и подвергается ускоренному разрушению, что приводит к снижению его активности в крови.

Значение протеина С в системе гемостаза чрезвычайно велико. Пациенты с дефицитом протеина С страдают венозными и артериальными тромбозами. Выраженность тромбофилии коррелирует с тяжестью дефицита этого белка. Цитопротекторные свойства APC обусловлены его способностью ингибировать экспрессию провоспалительных цитокинов, адгезивных молекул, предотвращать адгезию лейкоцитов. APC ингибирует апоптоз и блокирует воспаление, из-

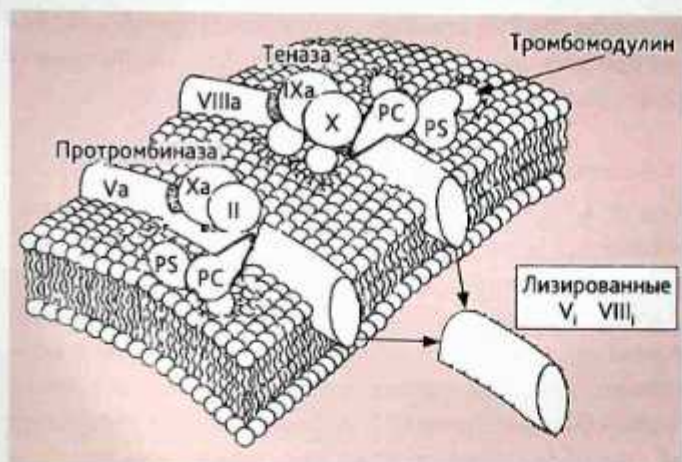


Рис. 3.17. Комплекс «протеин С и протеин S» после связывания на мембранном белке тромбомодулине способен лизировать ф. Va и ф. VIIIa до неактивных ф. Vi и ф. VIIIi. Это один из самых эффективных антикоагулянтных механизмов, разрушающий теназный и протромбиназный комплексы и препятствующий коагуляции

меня профиль экспрессии генов в эндотелиальных клетках, снижает образование провоспалительных цитокинов активированными моноцитами, осуществляет защиту эндотелиальной барьерной функции.

Тяжелая врожденная или приобретенная недостаточность PC или PS приводит к развитию фульминантной пурпуры. У новорожденных фульминантная пурпура развивается либо вследствие генетически обусловленной гетерозиготной или двойной гомозиготной недостаточности, либо как элемент приобретенной патологии, в более старшем возрасте, причиной фульминантной пурпуры является приобретенный дефицит этих белков. Помимо этого, дефицит PC или PS проявляется рецидивирующими артериальными и/или венозными тромбозами разной локализации. Недиагностированный ранее дефицит PC или PS может проявиться тромбозами или формированием острых некрозов кожных покровов различной локализации при терапии антагонистами витамина К, особенно на начальном этапе. Такое состояние получило название «кумариновые некрозы». Приобретенный дефицит PC наблюдается при печеночной недостаточности, инфекционных заболеваниях, иммунных заболеваниях, онкологических заболеваниях, врожденных пороках развития сердца и сосудов, острых синдромах ДВС, септических состояниях, терапии некоторыми лекарственными препаратами, что утяжеляет течение основного заболевания и, в свою очередь, требует медикаментозной и трансфузионной коррекции.

Протеин S

Протеин S (PS) – витамин-К-зависимый белок, синтезируемый в печени. Протеин S присутствует в плазме частично в свободном состоянии, частично в комплексе с C4-связывающим протеином (C4-bP), который доставляет протеин S на фосфолипидную мембрану. Только свободный протеин S является кофактором APC; комплекс «протеин S–C4-bP» не обладает кофакторной активностью по отношению к протеину С. Активность APC в кооперации со свободным протеином S значительно выше, чем без него.

Дефицит PS, так же как и дефицит PC, приводит к развитию тромбозов. Тяжесть течения тромбофилии при дефиците PS пропорциональна степени снижения его активности, а гомозиготные формы дефицита PS неизвестны.

C4-связывающий протеин

C4-связывающий протеин (C4-bP, C4-binding protein) – острофазный белок, синтезируется в печени. Сниженный уровень C4-bP имеет место у лиц, принимающих непрямые антикоагулянты. У новорожденных нормальный уровень C4-bP ниже, чем у детей 6 мес. – 1 года. Повышение C4-bP наблюдается при воспалении, активации аутоиммунных реакций, при беременности, у женщин, принимающих стероидные контрацептивы; при этом происходит избыточное связывание протеина S. Дефицит свободной формы протеина S рассматривается как фактор риска тромбофилий. C4-bP способен также регулировать активность системы комплемента, образовывать Ca-зависимые комплексы с амилоидным Р-белком сыворотки. Определение C4-bP возможно методом иммунотурбидиметрии или ELISA. Концентрация C4-bP в сыворотке составляет в норме около 200 мг/мл.

Тромбомодулин

Тромбомодулин (ТМ) – мембранный белок эндотелиальных клеток. На поверхности интактного эндотелия содержится значительное количество ТМ. Тромбомодулин с высокой аффинностью связывает тромбин, меняя «направленность» его действия. Комплекс «тромбин–тромбомодулин» активирует протеин С. Последний в комплексе с протеином S лизирует активные факторы Va и VIIIa. Кроме того, комплекс «тромбин–тромбомодулин» подвергается эндоцитозу эндотелиальными клетками с последующей деградацией тромбина в эндотелиоците и рециркуляцией тромбомодулина на клеточную поверхность. Другой функцией комплекса «тромбин–тромбомодулин» является активация TAFI – тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза, который замедляет фибринолиз.

В норме ТМ связан с мембраной эндотелиоцитов и практически отсутствует в циркуляции. Появление сколько-нибудь значимой концентрации ТМ в токе крови свидетельствует о повреждении эндотелиальных клеток. Повышение ТМ наблюдается при системной красной волчанке, синдроме ДВС, респираторном дистресс-синдроме взрослых, эмболии легочной артерии, инфаркте миокарда, после использования тромболитиков при инфаркте миокарда, при диабетической микроангиопатии, после транслюминальной ангиопластики коронарных артерий. Значение ТМ для регуляции гемостаза имеет клинические подтверждения. Некоторые мутации гена ТМ сопровождаются артериальными тромбозами, определенный полиморфизм ТМ ассоциирован с развитием инфаркта миокарда.

Нарушения в системе протеина С

Среди нарушений в системе протеина С, которые ассоциированы с тромбозами (рис. 3.18), выделяют дефицит протеина С, дефицит тромбомодулина,

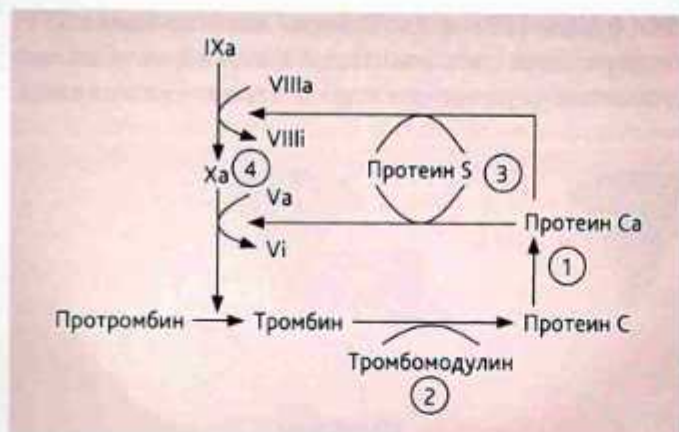


Рис. 3.18. Нарушения в системе протеина С: 1 – дефицит протеина С; 2 – дефицит тромбомодулина; 3 – дефицит протеина S; 4 – резистентность к активированному протеину С

дефицит протеина S и особенно резистентность к активированному протеину С (APCR).

Система протеина С активно реагирует на развитие воспаления в организме, особенно в условиях грамотрицательного сепсиса, который воздействует на гемостатический баланс, вызывая гиперкоагуляцию, вплоть до развития синдрома ДВС. Это связано с несколькими эффектами в системе протеина С. *Во-первых*, медиаторы воспаления подавляют синтез тромбомодулина, что ведет к уменьшению активации протеина С. *Во-вторых*, в крови повышается активность комплемента, следствием этого является относительное увеличение количества связанного и уменьшение активного несвязанного протеина S. *В-третьих*, фагоцитарные ферменты могут отщеплять тромбомодулин от эндотелиальной поверхности. Он появляется в свободной циркуляции, но его активность в этих условиях значительно ниже, чем у фиксированного на мембране. *В-четвертых*, стимуляция синтеза и экспрессия тканевого фактора на мембране клеток в зоне воспаления ведет к активации факторов VII и X и нарастанию дисбаланса в сторону гиперкоагуляции.

Ингибиторы активных комплексов

Ингибитор внешнего пути свертывания, или ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), синтезируется разными клетками, но основными местами синтеза и локализации его в организме являются эндотелий капилляров и мегакариоциты, в меньшей степени – мононуклеары и гепатоциты. На поверхности эндотелиоцитов он связан с протеогликанами и мобилизуется под влиянием гепарина. TFPI ограничивает образование тромбина, блокируя формирование комплекса «ТФ–ф.VIIa–ф.X». Один из ингибирующих доменов TFPI связывается с ф.Xa, после чего другой домен реагирует с активным центром ф.VIIa, когда последний связан с тканевым фактором. Афинность TFPI к ф.VIIa значительно повышается в присутствии гепарина (рис. 3.19). Образуется полностью неактивный тетра-

молекулярный комплекс «ТФ–ф. VIIa–TFPI–ф. X». Помимо ингибирования TFPI способствует поглощению и деградации этого комплекса. Таким образом, во внешнем каскаде плазменного гемостаза формируется отрицательная обратная связь.

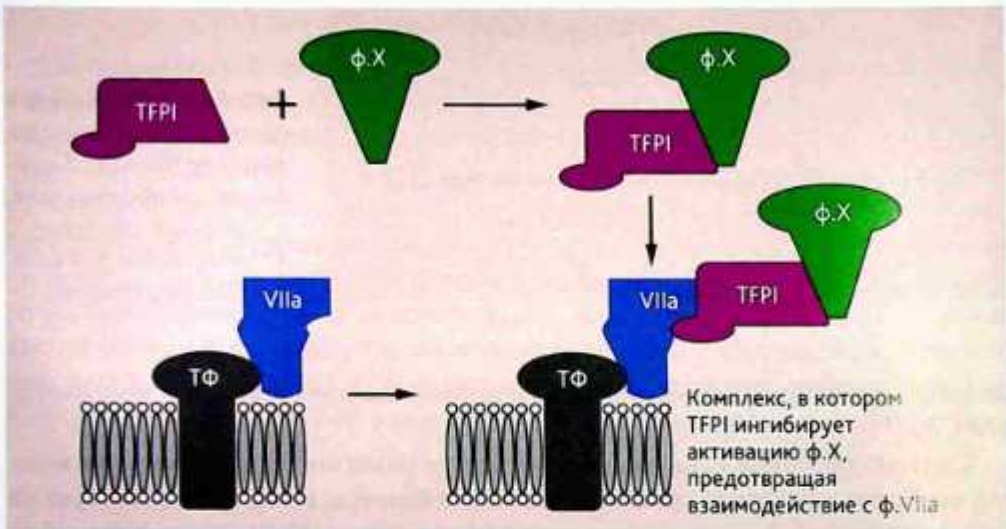


Рис. 3.19. Механизм действия TFPI за счет образования комплекса с фактором Ха и формирования четырехкомпонентного комплекса: фактор VIIa + тканевой фактор + TFPI + фактор X, в котором заблокировано действие ф. VIIa на ф. X

TFPI, по-видимому, ответственен при лечении гепарином за удлинение ряда тестов коагулограммы, в частности АЧТВ. TFPI в плазме частично связан с липопротеидами низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП). В таком комплексе TFPI более устойчив к инактивации.

Определение TFPI в плазме проводят методом ELISA или методом с образованием фактора Ха, который определяется в тесте с хромогенным субстратом. Определение TFPI в плазме выявляет не более 5–10% общего количества TFPI в сосудистой системе, так как основное его количество депонируется в сосудистой стенке. Повышение TFPI в плазме обнаружено после лечения нефракционированным или низкомолекулярным гепарином, при диабете и у больных с инфарктом миокарда. Имеются сообщения о снижении TFPI при тромботической тромбопенической пурпуре и ишемическом инсульте.

Система фибринолиза

Система фибринолиза – протеолитическая система плазмы крови, ответственная за лизис фибринового сгустка, а также вовлеченная в деградацию коллагена, ангиогенез, сопряженная с процессом апоптоза и связанная с другими протеолитическими системами.

Фибринолиз локализует образование фибрина в месте повреждения, сдерживает избыточное фибринообразование, препятствуя окклюзии просвета сосуда. Баланс между фибринообразованием и фибринолизом (рис. 3.20) способствует сохранению окончательного тромба на весь период восстановления целостности сосудистой стенки, после чего равновесие сдвигается в сторону фибринолиза, и, став ненужным, тромб растворяется. Центральным ферментом системы фибринолиза является плазмин, на регуляцию активации которого направлены все реакции системы фибринолиза.

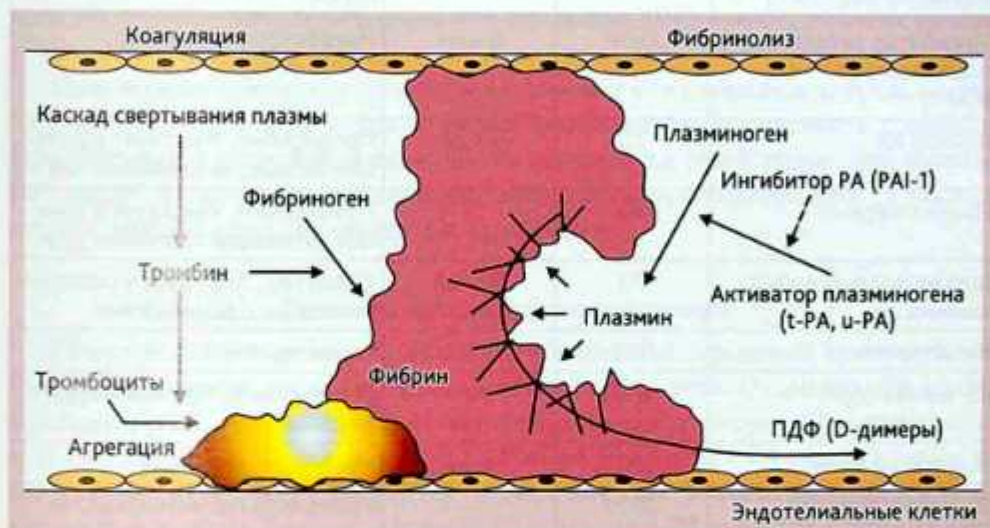


Рис. 3.20. Фибринолиз противодействует коагуляции, ограничивая рост фибринового сгустка, и в конечном итоге лизирует его. Центральным ферментом фибринолиза является фермент плазмин, разрушающий фибрин до продуктов деградации фибрина (ПДФ). На переход плазминогена в плазмин направлены эффекты активаторов фибринолиза

Компоненты фибринолиза

Фибринолиз, так же, как плазменный гемостаз, является многокомпонентной протеолитической системой с участием активаторов и ингибиторов. Основные компоненты системы фибринолиза представлены в табл. 3.3.

Плазминоген

Плазминоген – одноцепочечный гликопротеин. Концентрация его составляет примерно 2 микромоля в литре плазмы. Физиологическое повышение плазминогена наблюдается у женщин в последнем триместре беременности. Основное место синтеза плазминогена – печень, однако он обнаруживается и в эозинофилах, клетках почек, роговице. Возможно, в этих тканях он также синтезируется. В системе циркуляции плазминоген связан с богатым гистидином гликопротеином.

Таблица 3.3. Основные компоненты системы фибринолиза

Фактор	Концентрация (мг/л)	Период полувыведения	Функция
Плазминоген	200	2,2 дня	Профермент (предшественник пламина)
Активатор плазминогена тканевого типа (t-PA)	0,005	4 мин	Протеаза, активирует плазминоген
Урокиназный активатор плазминогена (u-PA)	0,002	7 мин	Протеаза, активирует плазминоген
Ингибитор активатора плазминогена I типа (PAI-1)	0,01	8 мин	Ингибитор t-PA и u-PA
Фактор XII	30	2–3 дня	Профермент. Участвует в реакции активации плазминогена
Прекалликреин	40	–	Профермент. Участвует в реакции активации плазминогена
Высокомолекулярный кининоген	70	5 дней	Кофактор. Участвует в реакции активации плазминогена
Витронектин	350	–	Кофактор PAI-1
C1-ингибитор	180	70 ч	Ингибитор ф. XIIa, калликреина, пламина
α_2 -антиплазмин	70	3 дня	Ингибитор пламина
α_2 -макрोगлобулин	2500	–	Ингибитор пламина, калликреина, урокиназы, t-PA
α_1 -антитрипсин	900–2000	4 дня	Основной ингибитор сериновых протеаз: трипсина, химотрипсина, пламина, калликреина, ренина, урокиназы
Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI)	5	10 мин	Предшественник ингибитора (зимоген)

Активация плазминогена осуществляется в основном 2 специфическими протеазами – активатором плазминогена тканевого типа и урокиназой. Кроме того, плазминоген может связываться с фибрином и активироваться в комплексе с ним. Активный центр пламина находится в легкой цепи, представляющей малоспецифичную протеазу, способную расщеплять практически все белки плазмы. Тем не менее в норме этот процесс всегда ограничен расщеплением фибрина, поскольку:

- тканевой активатор плазминогена лучше активирует плазминоген, если он адсорбирован на нитях фибрина; связанный с фибрином пламин относительно защищен от инактивации;

- в токе крови плазмин очень быстро (примерно за 0,1 с) инактивируется ингибиторами; при попадании плазмينا в кровоток он связывается и нейтрализуется α_2 -антиплазмином (при дефиците α_2 -антиплазмينا отмечается неконтролируемый фибринолиз и кровоточивость);
- эндотелиальные клетки выделяют антиактиватор плазминогена 1, который блокирует его действие.

Повышение активности плазминогена чаще всего наблюдаются при панкреатите, панкреонекрозе, метастазах, меланомах, раке предстательной железы или яичников, после хирургического лечения поджелудочной, легких, предстательной железы, при состояниях развивающего синдрома ДВС, при поражениях печени с метастазами.

Пониженная активность плазминогена может быть определена врожденным дефицитом, что, в свою очередь, может спровоцировать опасность тромбоза. Приобретенное снижение плазминогена встречается очень редко. Это явление наблюдается при гепатоцеллюлярных заболеваниях, синдроме ДВС, а также в период лечения стрептокиназой или урокиназой.

Тканевой активатор плазминогена

Тканевой активатор плазминогена (t-PA) является сериновой протеазой. Он высоко специфичен; его субстратом является плазминоген. Очевидно t-PA играет основную роль в активации фибринолиза в просвете сосуда. Основным местом синтеза t-PA является эндотелий. Помимо эндотелия t-PA синтезируется во многих других клетках: моноцитах, мегакариocyтах, мезотелиальных клетках, мышечных клетках сосудов, фибробластах сердца. t-PA является одним из ферментов, вовлекаемых в процессы деструкции базальной мембраны, внеклеточного матрикса и инвазии клеток. Большая часть плазменного t-PA связана с его основным ингибитором PAI-1. Как связанный, так и свободный активатор быстро удаляются из тока крови, связываясь с разными рецепторами на клетках печени.

Рецепторы t-PA делятся на 2 большие группы – активирующие и удаляющие. Активирующие t-PA-рецепторы располагаются на клеточных поверхностях и усиливают активацию плазминогена t-PA. Наиболее изученным активирующим t-PA-рецептором является **аннексин II**. Избыточная экспрессия аннексина II у пациентов с промиелоцитарным лейкозом ведет к гиперфибринолизу с геморрагическими проявлениями. Рецепторами, способствующими элиминации t-PA из кровотока, являются **маннозный рецептор и рецептор LRP**. Первый расположен на мембране эндотелиоцитов печени и купферовских клеток, второй работает на мембране гепатоцитов.

Урокиназный активатор плазминогена

Урокиназный активатор плазминогена (урокиназа, u-PA) – фермент, функционирующий как активатор фибринолитической ферментной системы. Способность лизировать фибриновые сгустки делает его эффективным тромболитическим

агентом при разных клинических состояниях, включая эмболию легких и локальный тромбоз. Предшественником u-PA является белок проурокиназа, или scu-PA. Проурокиназа синтезируется в разных клетках. Особенно активно scu-PA синтезируется эпителиальными клетками почечных протоков, поэтому найден в больших количествах в моче человека. u-PA синтезируется обкладочными клетками практически всех протоков, включая протоки потовых, слезных и других желез. В протоках урокиназа необходима для деградации белковых компонентов секретов. Основную работу урокиназа выполняет в тканях, способствуя деградации внеклеточного матрикса, что облегчает процессы миграции клеток. Роль урокиназы значительна во многих физиологических и патологических процессах – заживлении ран, воспалении, эмбриогенезе, метастазировании опухолевых клеток. Важную роль урокиназа играет в активации ростовых факторов, модуляция миграции и инвазии клеток, митогенном эффекте клеток меланомы. Некоторые злокачественные опухоли, особенно урогенитального и желудочно-кишечного трактов, продуцируют повышенные количества урокиназы.

Рецептор урокиназы (u-PAR) обнаружен на моноцитах. Он способствует активации плазминогена урокиназой, что необходимо для участия моноцитов в деградации фибринового тромба. Такой же рецептор найден на тромбоцитах.

Для терапевтических целей предпочитают использовать проурокиназу, так как ее не блокируют ингибиторы активатора плазминогена, при этом проурокиназа более фибрин-ориентированная, чем остальные формы u-PA. При проведении тромболитической терапии проурокиназа преобразуется в активную двухцепочечную урокиназу, восприимчивую к ингибированию. Определение u-PA для диагностики нарушений гемостаза практически не проводят. Однако u-PA является опухолевым маркером карциномы яичника, и вероятно, других опухолей, поэтому имеются коммерческие ELISA-наборы, которые используются для определения u-PA как опухолевого маркера.

Другие активаторы плазминогена

Помимо основных физиологических активаторов плазминогена описаны другие физиологические и нефизиологические активаторы.

Есть данные, что ф.XIIa может напрямую активировать плазминоген. Скорость активации плазминогена ф.XIIa в сравнении с эквимоллярным количеством t-PA в 10 раз ниже, однако его молярная концентрация в циркулирующей крови в 5000 раз выше. Таким образом, роль прямой активации плазминогена ф.XIIa может быть достаточно высока. Другими известными активаторами плазминогена являются стрептокиназа, стафилокиназа, активатор плазминогена, выделенный из слюны летучих мышей – вампиров.

Механизмы активации фибринолиза

Фибринолиз начинается с выхода из эндотелиальных клеток тканевого активатора плазминогена и проурокиназы. Эти вещества преимущественно активируют

плазминоген, связанный с фибрином. Благодаря этому фибринолиз в норме идет только в тромбах. В фибринолизе, так же, как в системе коагуляции, имеется 2 пути: внешний и внутренний путь активации плазминогена (рис. 3.21).



Рис. 3.21. Основные звенья фибринолиза. Образование плазмина происходит под влиянием внутреннего или внешнего механизмов активации. Накопление свободного плазмина в системном кровотоке предотвращается группой ингибиторов (действие ингибиторов показано пунктирной линией)

Внешний путь активации фибринолиза

Внешний путь активации плазминогена осуществляется при участии тканевого активатора (t-PA), который синтезируется главным образом в эндотелии. t-PA обладает высоким сродством к фибрину. Плазминоген также имеет высокое сродство к выпавшему фибрину за счет присутствия на фибрине специфических лизин-связывающих участков (сайтов). На фибрине формируется комплекс «фибрин – тканевой активатор – плазминоген» (рис. 3.22) – наиболее специфическое и эффективное действующее начало фибринолиза. Фибрин, особенно частично деградированный фибрин, служит кофактором t-PA-индуцированной протеолитической активации плазминогена. В результате образования этого комплекса плазминоген переходит в активный плазмин, который разрушает пептидные связи в фибрине.

Активатором плазминогена является урокиназа, образуемая в почках, а также фибробластами, эпителиальными клетками, пневмоцитами, децидуальными

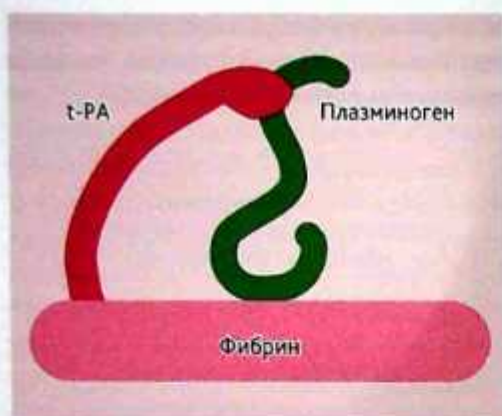


Рис. 3.22. Активация плазминогена при формировании комплекса «фибрин – тканевый активатор – плазминоген» на фибрине. Фибрин служит кофактором t-PA-индуцированной протеолитической активации плазминогена. На поверхности фибрина присутствует лизин-связывающий сайт, необходимый для активации плазминогена тканевым активатором

клетками плаценты и эндотелиоцитами. Многие клетки содержат рецепторы к урокиназе, что послужило основанием считать ее основным активатором фибринолиза в межклеточном пространстве, обеспечивающем протеолиз в процессе клеточного роста, деления и миграции клеток.

Внутренний путь активации фибринолиза

Внутренний путь активации фибринолиза начинается в комплексе реакций контактной активации свертывания крови. Это обеспечивается высокой степенью гомологии в структуре ф.ХII, плазминогена и тканевых активаторов плазминогена, способностью калликреина активировать плазминоген и проактиватор плазминогена урокиназного (про-и-РА) и тканевого (про-т-РА) типов.

Процесс активации факторов контактной фазы резко усиливается при остановке кровотока и образовании фибрина. Внутренний путь разделяется на Хагеман-зависимый и Хагеман-независимый. Первый из них протекает под влиянием факторов XIIa, калликреина и ВМК, которые переводят плазминоген в плазмин. Хагеман-зависимый фибринолиз осуществляется наиболее быстро и носит срочный характер. Его основное назначение сводится к очищению сосудистого русла от фибриновых сгустков, образующихся в процессе внутрисосудистого свертывания крови. В связи с этим у пациентов с дефицитом прекалликреина, ф.ХII (болезнь Хагемана) или высокомолекулярного кининогена (ВМК), у которых из-за недостатка плазменных факторов происходит снижение генерации тромбина и удлинение *in vitro* АЧТВ, не возникает кровоточивости. Наоборот, в результате неполноценной активации фибринолиза имеется тенденция к тромбозам.

Хагеман-независимый фибринолиз может осуществляться под влиянием протеинов С и S.

В процессе фибринолиза, как и в плазменном звене коагуляции, внешний и внутренний пути активации плазминогена взаимодействуют между собой. В частности, калликреин, формирующийся в результате активации контактной фазы, активирует проурокиназу с образованием урокиназы. Активация проурокина-

зы до активной двухцепочечной формы u-PA вызывается также ф.ХIIa и ф.ХIa. В процессе фибринолиза функционируют и обратные связи. Так, проурокиназа активируется до урокиназы под действием пламина (положительная обратная связь), эффект усиливается при связывании с урокиназным рецептором.

Ингибиторы фибринолиза

Основные ингибиторы фибринолиза представлены на рис. 3.23.

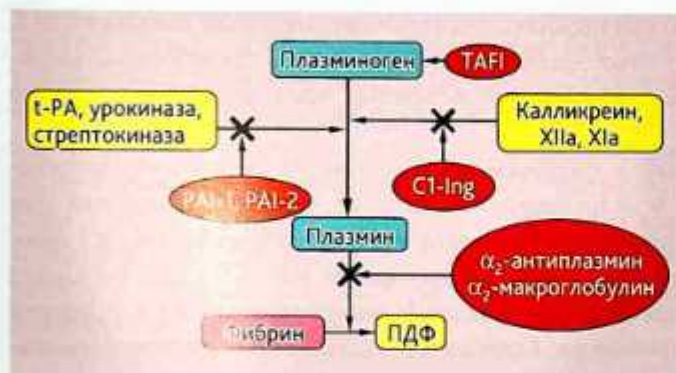


Рис. 3.23. Ингибиторы фибринолиза, показаны участки основного ингибирующего эффекта. Большинство ингибиторов фибринолиза являются белками острой фазы

Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза

TAFI (также известный как карбоксипептидаза U или плазменная карбоксипептидаза B) – один из наиболее важных ингибиторов фибринолиза, представляет собой белок. Он синтезируется в печени и циркулирует в крови в концентрации 220 нМ в виде зимогена. Его неактивная форма – прокарбоксипептидаза U активируется тромбином, связанным с тромбомодулином, и вероятно, трипсином, калликреином, плазмином до активной карбоксипептидазы U или TAFI. Он разрушает каталитическую поверхность фибрина (лизин-связывающий сайт), необходимую для активации плазминогена t-PA, отщепляет C-концевой лизин от фибрина и предотвращает лизис фибрина под действием пламина. Кроме того, в более высокой концентрации TAFI обладает прямой ингибирующей активностью по отношению к плазминогену.

TAFI играет большую роль в формировании гемостатического тромба, предотвращая преждевременный его лизис. Однако для активизации достаточного количества ингибитора необходим значительный избыток тромбина, превышающий количество, необходимое для образования фибринового сгустка. Видимо, этим объясняется повышение фибринолиза у лиц с гемофилией и дефицитом фактора XI.

Определение TAFI проводится методом ELISA. Повышение TAFI зарегистрировано при тромбозах и при применении тромболитических препаратов. Обнаружена корреляция между концентрацией и активностью TAFI, с одной стороны, и временем, в течение которого лизируется сгусток крови, – с другой. TAFI рассматривается как маркер сердечно-сосудистых заболеваний.

Ингибитор тканевого активатора плазминогена

Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1). Это специфический ингибитор тканевого активатора плазминогена (t-PA) и урокиназы (u-PA). Он относится к группе ингибиторов сериновых протеаз (серпинам) и называется также Серпин-1. Помимо этого, он может подавлять активацию фибринолиза стрептокиназой. Основная функция PAI-1 – ограничить фибринолитическую активность местом расположения гемостатической пробки за счет ингибирования t-PA. Это выполняется легко за счет большого содержания его в сосудистой стенке по сравнению с тканевым активатором плазминогена. Таким образом, на месте повреждения активированные тромбоциты выделяют избыточное количество PAI-1, предотвращая преждевременный лизис фибрина.

PAI-1 обнаружен в плазме и тромбоцитах. В плазме он связан с витронектином. PAI-1 синтезируется в эндотелиальных клетках. Синтез усиливается при их стимуляции липополисахаридами плазматических мембран бактерий (эндоксином), провоспалительными цитокинами, такими как ИЛ-1 или ФНО- α , а также тромбином. Наиболее значительная стимуляция происходит в условиях сепсиса и при обширных тромбозах. Если концентрация PAI-1 в крови повышается, уменьшается активность противосвертывающей системы, что приводит к повышению риска тромбозов.

Ингибитор тканевого активатора плазминогена 2-го типа (PAI-2) обнаружен в очень низких концентрациях в плазме, но может существенно повышаться при беременности, так как PAI-2 секретируется плацентой в значительных количествах. Он более активно ингибирует активность u-PA, чем t-PA.

Ингибитор тканевого активатора плазминогена 3-го типа (PAI-3). Это, по-видимому, относительно слабый ингибитор. Он подавляет активацию плазминогена протеином С. Диагностического значения определение PAI-2 и PAI-3 пока не имеют.

Генетический полиморфизм PAI. У гена PAI-1, который называется SERPINE1, выявлен полиморфизм в промоторной (регуляторной) области; он известен как полиморфизм 4G/5G. Аллель 5G сопровождается меньшей активностью, чем аллель 4G. Поэтому у носителей аллеля 4G концентрация PAI-1 выше, чем у носителей аллеля 5G, что приводит к повышению риска тромбообразования, а во время беременности – к повышению рисков нарушения функции плаценты и невынашивания беременности. В популяции возможны 3 варианта генотипа: 5G/5G, 5G/4G, 4G/4G. Оказалось, что в крови людей, имеющих вариант 4G/4G, концентрация PAI-1 значительно выше, чем у людей, имеющих варианты 5G/5G и 5G/4G. Оказалось также, что вариант 4G/4G предрасполагает не только к повышению риска тромбозов, но и к ожирению и повышению уровня холестерина. Торможение фибринолиза у таких людей приводит к значительному риску летальности в результате септических инфекций, в частности, менингококковой инфекции у детей. Риск гестоза у женщин,

являющихся носительницами варианта 5G/4G, примерно в 2 раза выше, чем у женщин – носительниц варианта 5G/5G, а у носительниц варианта 4G/4G риск гестоза был в 2 раза выше, чем при варианте 5G/4G. Несмотря на такую зависимость, высокая частота встречаемости генотипа 4G/5G (до 50% популяции) не позволяет рассматривать его как серьезный фактор риска тромбозов и осложнений беременности, в то время как генотип 4G/4G, особенно в ассоциации с другими неблагоприятными генетическими вариантами, может вносить определенный вклад в формирование такого рода осложнений. Тем не менее к клинически значимым наследственным тромбофилиям данный полиморфизм не относится. Исследование полиморфизма 5G/4G рекомендуется при наличии в анамнезе осложнений течения беременности (остановки развития на малых сроках, тяжелые гестозы, внутриутробная смерть плода, гипотрофия и задержка внутриутробного развития, хроническая внутриутробная гипоксия плода, преждевременное созревание плаценты). Исследование полиморфизма гена PAI-1 важно проводить и при подготовке к ЭКО, поскольку мощная гормональная терапия и огромные цифры эстрогенов, сопровождающие схемы ЭКО, являются фактором, повышающим риск тромбозов в месте имплантации и ранней плацентации.

α_2 -антиплазмин, α_2 -макроглобулин, α_1 -антитрипсин

α_2 -Антиплазмин (α_2 -АП) в физиологических условиях быстро инактивирует плазмин, образуя неактивные комплексы. α_2 -АП имеет высокое сродство к плазмину, взаимодействует с ним, удаляя свободный плазмин из системы циркуляции. В результате время полужизни свободного плазмينا составляет всего 0,1 секунды. Если же плазмин успевает соединиться с выпавшим фибрином, то взаимодействие «плазмин– α_2 -АП» резко снижается (примерно в 50 раз). Недостаточность α_2 -АП проявляется кровотечениями, так как накапливающийся активный плазмин ускоренно разрушает фибрин и фибриноген.

α_2 -АП – белок острой фазы, однако при массивной активации фибринолиза, в частности при синдроме ДВС, может наблюдаться истощение α_2 -АП. Приобретенная недостаточность α_2 -АП встречается значительно чаще, чем врожденная.

α_2 -макроглобулин. Этот ингибитор был описан в разделе «Ингибиторы системы свертывания крови». Это неспецифический ингибитор. При активации фибринолиза образующийся из плазминогена (концентрация в плазме свыше 1,5 мкмоль) плазмин в первую очередь связывается α_2 -антиплазмином (концентрация в плазме около 1 мкмоль). После полного насыщения α_2 -антиплазмينا дальнейшая нейтрализация плазмينا осуществляется за счет α_2 -макроглобулина. Кроме того, α_2 -макроглобулин инактивирует другие ферменты, активирующие фибринолиз: урокиназу (u-PA), тканевой активатор плазминогена (t-PA), плазменный калликреин, компоненты комплемента, бактериальные и лейкоцитарные протеазы, такие как эластаза и катепсины.

α_1 -антитрипсин. На его долю приходится более 80% антипротеазной активности крови. В сыворотке α_1 -антитрипсин содержится в концентрации 1,4–3,2 г/л или около 52 ммоль/л. Это основной ингибитор сериновых протеаз: трипсина, химотрипсина. Помимо этого, он принимает участие в инактивации плазмина, калликреина, ренина, урокиназы. Благодаря небольшим размерам он может проникать и функционировать в тканях (легкие, бронхи). α_1 -антитрипсин – белок острой фазы, его выработка увеличивается при реакциях, запускаемых через фактор некроза опухолей, интерлейкин-1, интерлейкин-6, а также при высокой концентрации эстрогена в сыворотке в последнем триместре беременности, при приеме эстроген-содержащих противозачаточных препаратов.

α_2 -антиплазмин, α_2 -макроглобулин, α_1 -антитрипсин совместно предупреждают появление плазмина в системе циркуляции в свободном виде, исключая его деградирующий эффект на фибриноген, а также на факторы свертывания VIII и V и другие плазменные белки. Деятельность этих ингибиторов является важным условием поддержания гемостатического баланса.

Продукты деградации фибрина/фибриногена и D-димеры

Плазмин является очень активной и в то же время относительно неспецифичной сериновой протеазой. Он лизирует в фибрине и фибриногене связи между фрагментами D и E. Поэтому плазмин способен активно разрушать как фибрин, так и фибриноген. При лизисе фибрина плазмин не лизирует сформировавшиеся в процессе полимеризации связи между фрагментами D. Поэтому при деградации фибрина образуются в основном комплексы DDE и DD или D-димеры (рис. 3.24).

Помимо фибрина плазмин способен активно деградировать фибриноген, особенно в тех случаях, когда вводятся активаторы фибринолиза (фибринолитики). В результате образуются продукты деградации фибриногена (ПДФ), при этом самыми малыми фрагментами являются X, Y, D и E (рис. 3.25), а D-димеры не образуются.

D-димеры являются одними из составляющих компонентов, объединенных под термином ПДФ. Однако D-димеры образуются при разрушении плазмином фибрина. ПДФ формируются как при фибринолизе тромба, так и после введения фибринолитиков при разрушении фибриногена. Определяя D-димеры – определяем продукты разрушения фибринового тромба; определяя ПДФ – выявляем результат протеолитического действия плазмина, который может быть связан как с разрушением тромба (фибринолиз), так и с активацией плазмина активаторами фибринолиза даже в отсутствие тромба. Поэтому считается, что определение D-димеров более специфично для характеристики тромболизиса, чем определение суммарных ПДФ.

Некоторые фрагменты ПДФ обладают выраженной физиологической активностью. Они снижают агрегацию тромбоцитов и нарушают полимеризацию

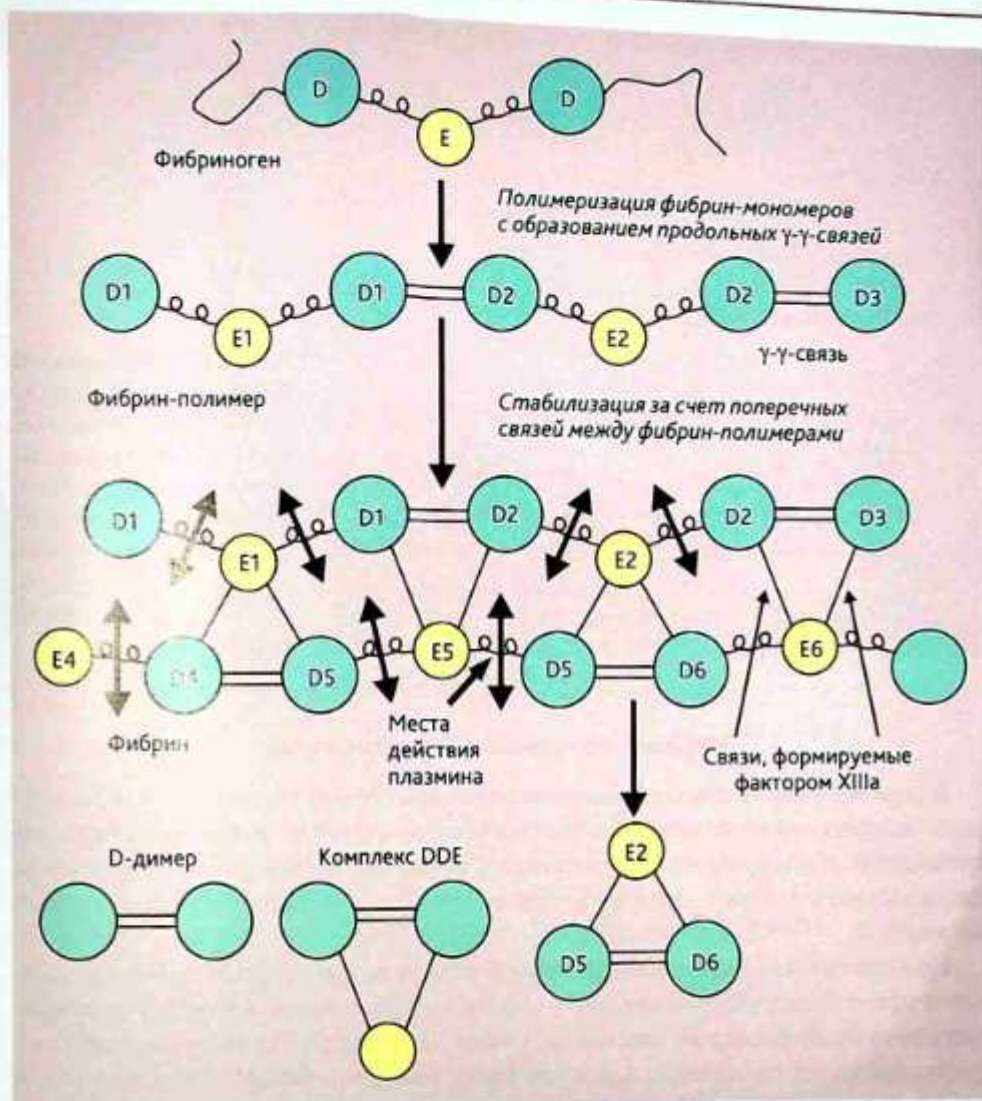


Рис. 3.24. Образование фибрина из фибриногена и формирование D-димеров при деградации фибрина плазмином. Плазмин лизирует предсуществующие в фибриногене связи между фрагментами D и E и не лизирует образовавшиеся при полимеризации связи между фрагментами D-D. В результате при лизисе фибрина формируются D-димеры

фибрин-мономеров, являясь, в сущности, антикоагулянтами. ПДФ способны нарушать целостность или повышать проницаемость сосудистой стенки. Поэтому при некоторых клинических ситуациях с низкой концентрацией фибриногена кровотечения могут быть вызваны не уменьшением концентрации фибриногена, а присутствием ПДФ, формирующихся при активном фибринолизе.

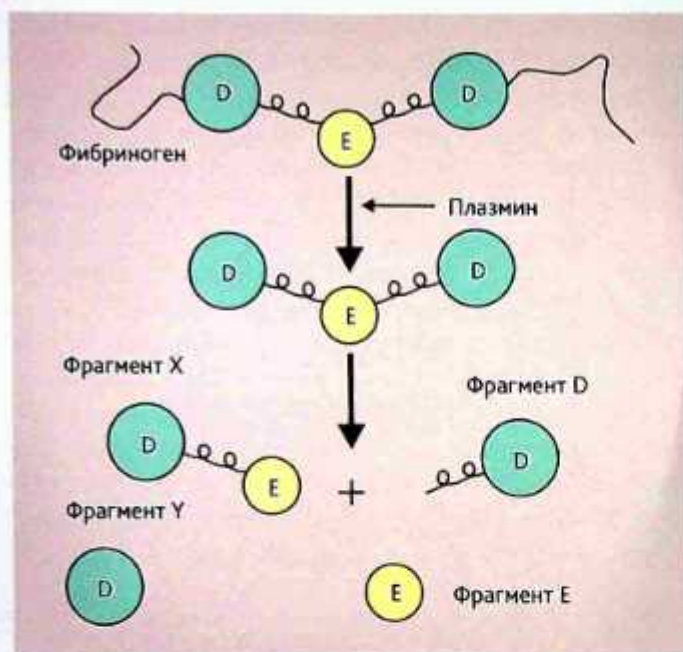


Рис. 3.25. Образование ДФ при деградации фибриногена плазмином. Свободный плазмин является неспецифической протеазой, он разрушает фибриноген до мелких продуктов деградации. При этом D-димеров не формируется

Плазмин-независимый фибринолиз

В сгустке фибрин связан с активированными тромбоцитами. Те, в свою очередь, экспрессируют на поверхности Р-селектин, CD154 и другие рецепторы для лейкоцитов. Лейкоциты могут освобождать несколько протеаз, которые способны деградировать фибрин: гранулоцитарная эластаза, катепсин G, моноцитарный катепсин D.

При протеолитическом расщеплении фибрина лейкоцитарными ферментами, как и при расщеплении плазмином, образуются D-димеры, которые идентифицируются коммерческими диагностическими наборами. Лейкоцитарная эластаза может модифицировать плазминоген, делая его более восприимчивым к активации u-PA и t-PA и менее чувствительным к α_2 -антиплазмину. Фибрин, который частично деградировал под влиянием эластазы, обладает меньшей кофакторной активностью для t-PA, чем в случае деградации фибрина плазмином. Очевидно, что эластаза имеет достаточно большое значение в регуляции фибринолиза, особенно при воспалении.

Вопросы к главе 3

1. Какова последовательность активации плазменных факторов при внутреннем и внешнем путях активации протромбиназы?
2. Какие процессы активируются за счет контактной фазы?

3. Каковы механизмы положительной и отрицательной обратной связи активации тромбина?
4. Охарактеризуйте важнейшие функции тромбина в гемостазе.
5. Какова связь витамин-К-зависимых факторов и Са-зависимых факторов коагуляции?
6. Что такое PIVKA и как они формируются?
7. Охарактеризуйте естественные антикоагулянты, присутствующие в системе циркуляции.
8. В чем сходство и в чем различие антикоагулянтного действия нефракционированного и фракционированного гепарина?
9. Какие компоненты относятся к системе протеина С и какова их роль?
10. По какой причине болезнь Виллебранда бывает клинически схожа с гемофилией А?
11. Почему при лейденовской мутации формируется тромбофилия?
12. С чего начинается процесс свертывания крови при ушибе ткани?
13. Какие компоненты фибринолитической системы являются белками острой фазы повреждения (воспаления)?
14. По какой причине при дефиците фактора XII могут возникать тромботические осложнения?
15. В чем суть диагностического значения D-димеров?

Тесты к главе 3

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

03.01. Свертывание крови инициируется появлением в крови:

- А) тканевого фактора
- Б) фактора X
- В) фактора XII
- Г) прекалликреина
- Д) протромбина

03.02. Начальным звеном внутреннего пути активации протромбиназы является:

- А) фактор I
- Б) фактор X
- В) фактор XII
- Г) прекалликреин
- Д) протромбин

03.03. Витамин К влияет на способность к активации:

- А) протромбина

- Б) фибриногена
- В) фактора XI
- Г) фактора XII
- Д) прекалликреина

03.04. Продукты деградации фибрина (ПДФ) вызывают:

- А) протеолиз
- Б) синтез тканевого фактора
- В) блокаду образования фибрина
- Г) активацию фактора XII
- Д) активацию фибринолиза

03.05. Активность фибринолитической системы контролируют:

- А) антитромбином
- Б) тромбиновым временем
- В) протромбиновым временем
- Г) образованием D-димеров
- Д) агрегацией тромбоцитов

03.06. Естественным антикоагулянтом является:

- А) плазминоген
- Б) тканевой фактор
- В) антитромбин
- Г) стрептокиназа
- Д) АДФ

03.07. Диагностическое значение определения протеина С:

- А) выявление риска тромбозов
- Б) критерий повышения или снижения дозы не прямых антикоагулянтов
- В) контроль гепаринотерапии
- Г) оценка фибринолиза
- Д) оценка внутреннего каскада активации протромбиназы

03.08. К витамин-К-зависимым факторам свертывания крови относятся:

- А) I, прекалликреин
- Б) V, VIII
- В) II, VII, IX, X
- Г) XI, XII
- Д) XIII, антитромбин

03.09. При гемофилии имеется дефицит факторов:

- А) плазменного гемостаза
- Б) тромбоцитов

- В) лейкоцитов
- Г) эндотелия сосудов
- Д) фибринолиза

03.10. Проба на продукты деградации фибрина (ПДФ) отрицательная:

- А) при кровотечении
- Б) гипофибринолизе
- В) лечении фибринолитическими средствами
- Г) гемофилии А
- Д) болезни Виллебранда

Глава 4. ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Применяемые для исследования гемостаза тесты должны быть информативными, то есть обладать высокой чувствительностью по выявлению патологии, и достаточной специфичностью. В любом случае лучше использовать несколько тестов, чем искать один даже самый специфичный тест, так как сама комбинация дает дополнительную и зачастую решающую информацию. Это объясняется тем, что практически все элементы системы гемостаза в той или иной степени связаны, изменение в одном элементе затрагивает и другие его звенья. Поэтому во всех случаях при назначении и проведении расширенной коагулограммы необходим тесный контакт с лечащим врачом, и может быть, совместное с ним назначение перечня дорогих и редких, но обоснованных исследований.

Так как лабораторное исследование гемостаза может быть достаточно дорогостоящим, то следует доказывать администрации, что лечение больных с тромбозами и патологическими кровотечениями значительно дороже, чем любые лабораторные исследования. А затраты на приобретение качественных реактивов и оборудования окупаются исключением повторных исследований и проведением адекватной, эффективной и контролируемой терапии.

Помимо коагулологических тестов при исследовании нарушений гемостаза большую помощь оказывают лабораторные тесты общего назначения. Они могут указать на заболевания печени или почек, которые имеют значение для синтеза и катаболизма факторов гемостаза. Опухолевый процесс может стать причиной тромбоза. Лекарственные препараты могут вызывать кровотечения, а в некоторых случаях, наоборот, приводить к гиперкоагуляции.

Важную информацию о причинах развивающихся тромбозов и кровотечений могут дать такие общелабораторные исследования, как общий анализ крови, определение гомоцистеина, витаминов, гормонов, наличие аутоантител. Для пациентов, леченных препаратами крови, необходимо проводить тесты на вирусоносительство.

Преаналитический этап

Подготовка пациента к исследованию свертывания крови

Перед проведением лабораторного исследования собирается анамнез. Эту задачу осуществляет лечащий врач, но врач лаборатории должен активно участвовать при необходимости или в клинически сложных случаях. Необходимо выяснить наличие клинических признаков геморрагического или тромботиче-

ского заболевания у пациента, а также наличие этих признаков у членов семьи, то есть индивидуальную и семейную историю кровотечений и тромботических эпизодов, включая тромбозы глубоких вен конечностей, брюшной полости, вен и артерий сетчатки, ТЭЛА, острый коронарный синдром, острое нарушение мозгового кровообращения. Расспрос о семейных заболеваниях – очень важный этап, так как многие нарушения гемостаза наследуются. При сборе анамнеза необходимо обращать внимание на то, имеются ли признаки врожденного нарушения гемостаза, или это приобретенное состояние. При наличии признаков приобретенного нарушения гемостаза необходимо обратить внимание на сопутствующие заболевания и симптомы, а также на применяемые пациентом медикаментозные препараты, которые могут повлиять на свертывание крови. Если пациент принимает антиагреганты (препараты ацетилсалициловой кислоты, блокаторы рецепторов P2Y₁₂), антикоагулянты, эстроген-содержащие препараты, антиконвульсанты, стероидные противовоспалительные препараты, обязательно зафиксируйте этот факт в направлении. Если же проводится диагностическое исследование, то при интерпретации результатов надо принять во внимание наличие антикоагулянтной терапии. В некоторых случаях проведение антикоагулянтной терапии не позволяет диагностировать фоновое нарушение гемостаза. Если эта диагностика принципиальна, надо ставить вопрос о краткосрочной отмене антикоагулянтов или замене на препараты, не мешающие диагностике. Например, если пациент получает антагонисты витамина К, диагностировать наследственный дефицит протеинов С или S невозможно. В этом случае пациента можно перевести на введение низкомолекулярного гепарина. Через 3–5 дней после отмены антагонистов витамина К выполнить коагулограмму, убедиться, что международное нормализованное отношение (МНО) снизилось примерно до 1,5, и выполнить анализ активности протеинов. Такая предосторожность связана с тем, что отмена антикоагулянтов, как правило, бывает более опасна, чем отсутствие соответствующих коагулологических данных.

Данные анамнеза являются субъективной информацией и не всегда помогают в установке правильного диагноза. Клиническое обследование пациента выявляет ряд признаков нарушения гемостаза – кожный геморрагический синдром разной степени выраженности, кровоизлияния в слизистые оболочки, признаки венозного застоя или артериальной недостаточности.

Большое значение имеет состояние пациента в момент взятия крови для исследования, принимаемые препараты, техника взятия крови. Некоторые влияющие факторы представлены в табл. 4.1.

Обращаем внимание на то, что не следует брать кровь на исследование гемостаза у пациентов сразу после физической активности. При активном движении меняется геометрия сосудов, это сопровождается выбросом из эндотелия тканевого активатора плазмина (t-РА). Это физиологическая реакция, она направлена на поддержание жидкого состояния крови, но может влиять на результаты лабораторного исследования.

Таблица 4.1. Влияние состояния пациента на результаты коагулологических исследований

Преаналитические факторы	Влияние
Время суток	Снижение содержания факторов свертывания и повышение уровня PAI-1 в ночное время
Прием пероральных контрацептивов	Повышение активности большинства факторов свертывания, агрегации тромбоцитов, снижение уровня естественных антикоагулянтов
Длительный стаз (более 3 мин)	Увеличение фибринолитической активности, укорочение АЧТВ, ПВ, ТВ, повышение уровня фибриногена, АТ
Стресс, физическая нагрузка	Повышение фибринолитической активности (уровня t-PA), укорочение АЧТВ, активация фактора VIII, увеличение vWF
Воспаление, инфекция, травма	Усиление или угнетение фибринолиза, повышение активности и антигена ф. VIII, vWF, фибриногена, тромбоцитоз, укорочение АЧТВ, может быть снижение активности протеина С
Положение тела	В положении стоя происходит относительное увеличение содержания факторов свертывания

Взятие крови

Получение пробы крови для лабораторных исследований, в том числе для коагулограммы или отдельных тестов на гемостаз, регламентируется международными и отечественными документами. Согласно п. 3.2.1 ГОСТ Р 53079.4 – 2008, большая часть клинических лабораторных исследований проводится в образцах крови: венозной, артериальной или капиллярной. Правила преаналитического этапа для исследований системы гемостаза описаны в рекомендациях Института стандартизации лабораторных исследований (CLSI) в документе H21-A5, 2008 г.

Взятие крови – критическая процедура для тестов на коагулограмму. Взятие крови должно быть приурочено ко времени исследования, чтобы свести до минимума время хранения проб. Исследование рекомендуется проводить у пациентов, отдохнувших не менее 15 мин после незначительной физической нагрузки. Кровь на большинство исследований берется натощак, до выполнения диагностических (эндоскопическое и лучевые исследования, биопсия, пункция, глубокая пальпация), функциональных (зондирование, введение контрастных веществ) и лечебных (инъекции, гемодиализ, гемосорбция, плазмаферез, общий массаж) процедур. Для взрослых последний прием пищи – за 8–12 ч до взятия крови. У детей младше 3 лет – за 6 ч. У грудных детей – от 3 до 6 ч. В ряде случаев это требование не является обязательным при выполнении тестов, не использующих оценку изменения оптических свойств плазмы: тромбоэластография (метрия), электрокоагулография, импедансное исследование функции тромбоцитов, исследование функции тромбоцитов в импедансном цитофлуориметре. Кроме того,

современные автоматические системы анализа коагулограммы менее чувствительны к хилезу; они имеют встроенную возможность коррекции результатов при тестировании хилезной плазмы.

Следует избегать интенсивной физической нагрузки. Перед взятием крови нельзя курить, за 24 часа не принимать алкоголь. При взятии крови важное значение имеет положение пациента (сидя, лежа). Так, у пациентов в критическом состоянии кровь берут в положении лежа, у больных в стационаре в основном и у пациентов амбулаторно-поликлинического звена – в положении сидя. Поэтому важно при повторных исследованиях забирать кровь у данного пациента в идентичном положении тела.

Исследование капиллярной крови для оценки системы гемостаза не рекомендуется. Показаниями для исследования крови из пальца, которая забирается в основном фельдшерами-лаборантами или медсестрами отделений (в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008), могут быть: младенческий возраст пациента, ожоги большой площади, труднодоступные или мелкие вены, выраженное ожирение. Во всех остальных случаях следует забирать венозную кровь. Это связано с лучшей воспроизводимостью результатов и стандартизует процесс исследования в лаборатории.

В некоторых клинических ситуациях (например, при шоке) извлечение крови из локтевой вены затруднительно из-за низкого давления. Попытки набирать кровь с помощью шприца часто заканчиваются неудачей – кровь сворачивается. В неотложных ситуациях, когда невозможно взятие крови из периферической вены, можно использовать кровь, полученную из центрального венозного катетера. При этом желательно удалить первые 1–2 мл крови, а затем забрать кровь на коагулологические исследования. Такой способ забора применим только в тех случаях, когда в катетер не вводился гепарин.

Клинический случай 4.1

В лабораторию доставлена на коагулограмму проба крови пациента, находящегося в терапевтическом отделении с диагнозом «тромбоз глубоких вен нижних конечностей; ТЭЛА; двусторонняя пневмония». Сведения о получаемом лечении отсутствуют. Результаты анализа: АЧТВ > 200 с, ПВ – 100 с, ТВ – нет коагуляции, фибриноген – 2,0 г/л.

Учитывая, что у пациента имеется удлинение ТВ при нормальном фибриногене, заподозрено присутствие в крови ингибиторов тромбина (гепарины или дабигатран). Для уточнения был выполнен тест анти-Ха-активности. Результат – 2,5 анти-Ха ед/мл. Исследование позволило установить наличие гепаринов в образце. При обсуждении с лечащим врачом выяснено, что пациент в момент исследования не получал антикоагулянты системно. Однако кровь была взята из подключичного катетера, который промывался гепарином.

Комментарий. Значительное удлинение ТВ при нормальном фибриногене, сопровождающееся значительным удлинением АЧТВ и удлинением ПВ, как пра-

вило, является результатом присутствия в образце крови ингибиторов тромбина (гепарин или дабигатран). Для уточнения можно использовать тест анти-Ха-активности с применением соответствующих реагентов для определения нефракционированного или низкомолекулярного гепарина (гепарин обладает анти-Ха-активностью, а дабигатран – нет). Присутствие гепарина в образце может быть как следствием проводимой системной терапии, так и нарушением преаналитического этапа, при котором кровь отбирается из катетера, промытого гепарином. Подчеркиваем, что предварительное промывание катетера и удаление 1–2 мл крови перед отбором образца в коагулологическую пробирку не исключает попадания гепарина. Для получения сопоставимых результатов исследования помимо промывания катетера необходимо предварительно отобрать 25–30 мл крови. После этого отобранный образец может показать относительно точные результаты.

Капиллярная кровь

Капиллярная кровь и гемостаз совместимы только при наличии специального оборудования, предназначенного для работы с капиллярной кровью. Основным ограничением для анализа капиллярной крови является неконтролируемое поступление в пробу тканевого фактора, который может составлять относительно большую часть при малом объеме крови. В венозной крови тканевой фактор, попадающий из поврежденных тканей при пункции, разводится в большем объеме и не влияет существенным образом на результаты исследования. Исследование гемостаза в капиллярной крови – устаревший подход, от него следует отказываться. Несмотря на наличие методик, реагентов, рекомендаций, эта процедура сопряжена с большим количеством ошибок. Лучше взять кровь правильно из внешнего контура, чем капиллярную. В критических состояниях всегда есть катетер. Для детей маленькие пробирки решают большую часть проблем.

Если все-таки выполняется исследование капиллярной крови, то желательно пользоваться стандартным ланцетом с круглой иглой, минимально травмирующей ткани при проколе. Представляется важным использование автоматических скарификаторов, гарантирующих низкую травматичность и соблюдение нужной глубины прокола. Во избежание искажения результатов нельзя «выдавливать» кровь из пальца.

Капиллярная кровь как диагностический материал для коагулологических исследований имеет ограниченное значение. Тем не менее у больных, принимающих антивитамины К препараты (варфарин и другие), использование капиллярной крови из пальца позволяет избежать повторного травмирования вен, но может быть использовано только в системах прикроватной диагностики, специально адаптированных для определения МНО в пробе крови, заведомо богатой собственным тканевым фактором.

В настоящее время несколькими компаниями предлагаются портативные приборы для определения ПВ из капли капиллярной крови, в них используются



Рис. 4.1. Портативный прибор CoaguCheck для определения ПВ. В упаковку включены тест-полоски, на которые наносится капля капиллярной крови, скарификатор с одноразовыми стерильными иглами, инструкция. Капля капиллярной крови наносится на тест-полоску, помещенную в прибор. Результат готов через несколько секунд, данные представляются в виде протромбинового времени (с), протромбина по Квику (%) и МНО

специальные мембранные фильтры для отделения бестромбоцитарной плазмы. Приборы предназначены для использования в амбулаторных условиях или самостоятельно пациентами для контроля терапии антивитаминов К препаратами (рис. 4.1). В портативных коагулометрах время образования сгустка выражается в пересчете на эквивалент венозной крови и используются картриджи с реагентами, сводящими к минимуму влияние «собственного» тканевого фактора. Кровь из пальца берут непосредственно перед анализом, избегая давления на мягкие ткани; первую каплю удаляют ватным тампоном.

Основные проблемы и рекомендации при работе с капиллярной кровью

- При прохождении крови через поврежденную ткань активируется свертывание, длительность взятия крови является критическим показателем.
- Кровь, вытекающая *самостоятельно*, должна быть помещена на тест-полоску в течение 10 с. Чистое и сухое место кончика пальца или ушной мочки пунктируется стерильным скарификатором. Прокол должен быть достаточно глубоким, чтобы кровь выступала крупной каплей.

Венозная кровь

Венозная кровь считается лучшим материалом для клинического исследования. Кровь берется из кубитальной вены. Важным моментом является длительность наложения манжеты, так как стаз вызывает освобождение белков из сосудистой стенки (в том числе t-PA и vWF) и активацию тромбоцитов. Во время венепункции длительность венозного стоаза рекомендуется не более 1 мин, а сила



Рис. 4.2. Закрытый способ взятия крови с использованием одноразовых вакуумных систем

сжатия – ниже диастолического давления крови. После получения первых капель крови расслабляют жгут.

Одноразовые вакуумные системы (рис. 4.2) состоят из трех основных элементов, соединяющихся между собой в процессе взятия крови: стерильной одноразовой пробирки с крышкой и дозированным значением вакуума; стерильной одноразовой двусторонней иглы или иглы-бабочки, закрытой с обеих сторон защитными колпачками; одно- или многоразового иглодержателя. Под действием вакуума кровь втягивается через иглу и безопасный клапан напрямую из вены в пробирку и сразу же смешивается со специально добавленным веществом, находящимся в виде жидкого содержимого или нанесенного на внутренние стенки пробирок. Закрытый способ имеет ряд преимуществ.

- **Безопасность пациента и персонала.** При взятии кровь поступает в небьющуюся вакуумную пробирку с реагентами. В этой пробирке кровь находится при транспортировке и подготовке к анализу, что исключает контакт медицинского персонала с кровью, тем самым снижается риск заражения гемотрансмиссивными инфекциями.
- **Стандартизация процесса.** Четко рассчитанное вакуумное разрежение и количество нанесенного реагента обеспечивают точное соотношение крови/реагент. Активация гемостаза в них предотвращается за счет моментального смешивания поступающей крови с раствором цитрата натрия. Кроме того, пробирки могут использоваться в качестве первичных в разных анализаторах.
- **Комфорт и удобство в использовании.** Имеется возможность взять кровь в несколько пробирок при одной венепункции, болевые ощущения у пациентов снижаются за счет V-образной заточки и уменьшенной толщины стенки иглы.
- **Экономия рабочего времени и средств** достигается за счет снижения временных затрат на взятие пробы, маркировку и подготовку к исследованию. Финансовые затраты соизмеримы с иными методами при значительно большей безопасности процедуры.

Несмотря на очевидные преимущества закрытого способа взятия крови, в отдельных случаях его использование может быть причиной получения неточных данных. Так, при исследовании агрегации тромбоцитов забор в вакутейнеры может приводить к трудностям в интерпретации результатов из-за активации тромбоцитов за счет больших скоростей сдвига в игле, вызванных вакуумом пробирки.

Однако в случае если все остальные звенья преаналитического этапа стандартизованы, кровь забирается в одних и тех же условиях тем же персоналом, не транспортируется и поступает в работу в течение 30–60 мин, использование вакутейнеров вносит единообразную систематическую ошибку, которой пренебрегают.

Подбор антикоагулянтов

Материалом для коагулологических исследований является плазма (рис. 4.3).

Для получения плазмы или цельной крови для лабораторных исследований используют противосвертывающие вещества (табл. 4.2).

Цитрат натрия обладает специфической способностью стабилизировать лабильные факторы свертывания (ф. V и ф. VIII). Цитратная плазма, богатая тромбоцитами, используется для изучения их агрегации. В связи с этим цитрат натрия является антикоагулянтом выбора для коагулологических исследований. В соответствии с рекомендацией ВОЗ концентрация цитрата должна быть 109 ммоль/л (3,2%). Кровь смешивают с раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1. В то же время Национальный комитет клинических лабораторных стандартов (NCCLS) рекомендует применение двухводного трехзамещенного цитрата натрия в концентрациях как 0,109, так и 0,129 моль/л (3,2% и 3,8% соответственно). Вре-

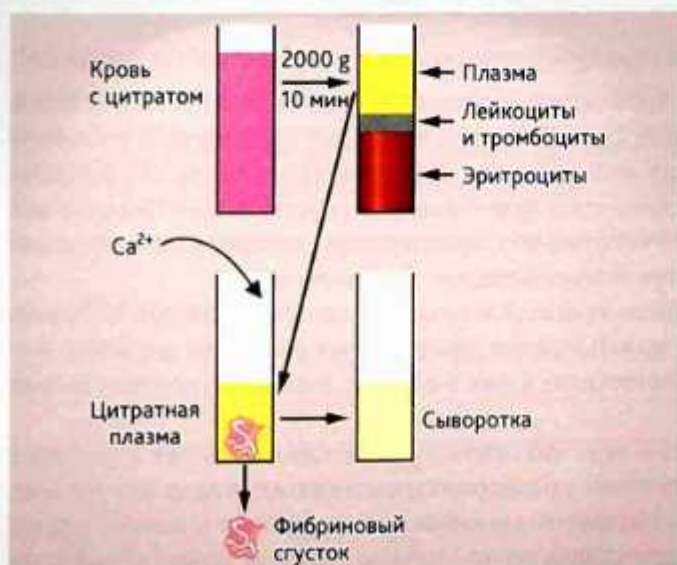


Рис. 4.3. Получение фракций крови для проведения коагулологических исследований

Таблица 4.2. Применение и механизм действия антикоагулянтов (стабилизаторов крови *in vitro*)

Антикоагулянт	Механизм действия	Применение
Цитрат натрия (3,2%)	Обратимое связывание ионов Ca^{2+}	Исследование системы свертывания (объем крови/объем антикоагулянта – 9 : 1)
Оксалат натрия или калия	Обратимое связывание ионов Ca^{2+}	В настоящее время практически не используется, так как по сравнению с цитратом хуже связывает Ca^{2+} и влияет на стабильность фактора V
Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)	Необратимое связывание ионов Ca^{2+}	Морфологическое исследование крови, инактивирует факторы V и VIII
CTAD – пробирка, содержит цитрат натрия (0,105 M), теофиллин, аденозин и дипиридамо́л	Теофиллин, аденозин и дипиридамо́л предотвращают активацию тромбоцитов за счет ингибирования фосфодиэстеразы, повышения содержания цАМФ в тромбоцитах, снижения внутриклеточного кальция, что приводит к торможению их агрегации	Скрининговые тесты и исследования отдельных факторов свертывания могут выполняться из CTAD так же, как из цитратной плазмы
Гепарин	Стимуляция связывания тромбина с антитромбином и ингибирование свертывания крови	Биохимические и гормональные исследования, маркеры опухолей. Вызывает такие комплексные изменения, которые в последующем не позволяют оценить состояние гемостаза

мья свертывания в пробах с 3,8% цитратом натрия продолжительнее, так как более высокое содержание цитрата способствует усиленному связыванию добавленного в клотинговых методах кальция, снижая его доступность для обеспечения свертывания плазмы. Рекомендуется формирование собственных лабораторных референтных диапазонов, учитывающих применяемую концентрацию антикоагулянта. На этом этапе могут быть допущены три ошибки.

Первая ошибка – неточность приготовления раствора стабилизатора. Избежать данной ошибки позволяет использование официальных стандартизованных систем для взятия крови с помещенным в них 2-водным раствором цитрата натрия в концентрации 3,2%.

Вторая ошибка связана с тем, что принятое соотношение крови и раствора цитрата (9 : 1) приемлемо лишь при нормальном гематокритном показателе, поскольку раствор цитрата остается в плазме и не проникает в клетки крови. Большее количество антикоагулянта по отношению к плазме может вызвать уд-



Рис. 4.4. Недостаточное количество крови взято в антикоагулянт – типичная преаналитическая ошибка. Большое количество антикоагулянта по отношению к плазме может вызвать значительное изменение показателей коагулограммы

ливание ПВ и АЧТВ. Такая ситуация может возникнуть, когда в приготовленную заранее пробирку с цитратом набрано слишком мало крови (рис. 4.4). Аналогичная ситуация возникает при высоком гематокрите, при котором создается избыточная концентрация цитрата в плазме, приводящая к ложной гипокоагуляции (см. клинический пример 4.2). Напротив, при снижении гематокрита (ниже 35%) обнаруживается ложная гиперкоагуляция, кровь при смешивании с цитратом в отношении 9 : 1 может свернуться в пробирке еще до исследования.

Перерасчет объема стабилизатора в соответствии с гематокритным показателем позволяет избежать этой ошибки (табл. 4.3). Если же у больного нет значительного сгущения крови или, наоборот, анемизации, приемлемо стандартное соотношение крови и цитрата (9 : 1). Рекомендация перерасчета объема стабилизатора сложна для выполнения, особенно в тех случаях, когда используются

Таблица 4.3. Соотношение объема антикоагулянта и венозной крови для постановки коагулограммы

Гематокрит, %	Объем антикоагулянта, мл (3,8% цитрат Na)	Объем крови вместе с антикоагулянтом, мл
20–21	1,4	10,0
22–27	1,3	10,0
28–33	1,2	10,0
34–39	1,1	10,0
40–45	1,0	10,0
46–51	0,9	10,0
52–57	0,8	10,0
58–61	0,7	10,0
62–65	0,6	10,0

вакутейнеры для взятия крови. Однако следует иметь в виду, что эта методическая погрешность может сказаться на результатах тестов. Необходимо предварительное знание гематокрита (например, взятие крови проводится не в первый раз в процессе данной госпитализации), и следует провести соответствующие расчеты, а далее нанести на пробирку метку, до которой нужно набрать кровь, и строго следить за процессом заполнения пробирки. *Нельзя брать кровь шприцем с последующим переливанием ее в вакуумную систему.* Единственный вариант, при котором такое допустимо, — ситуация, когда лучше взять так, чем не брать вообще или пытаться выдавить или ждать, пока кровь капля за каплей в течение нескольких минут накапает в консервант. Такое отступление от общего правила «не переливать кровь до смешивания с антикоагулянтом» связано с тем, что очень важно минимизировать время от момента пункции вены до момента смешивания крови с цитратом.

Третья ошибка. Наиболее частой погрешностью при взятии крови является плохое или недостаточное перемешивание ее со стабилизатором. Для предотвращения этого требуется немедленно после заполнения пробирки кровью до требуемого объема 3–4 раза медленно ее перевернуть (не встряхивая).

Для некоторых тестов рекомендуются специальные антикоагулянты. При исследовании функции тромбоцитов практически любой антикоагулянт может быть источником ошибок. Принято, что в этом случае концентрация цитрата должна быть 109 ммоль/л – 3,2%. ЭДТА и гепарин не используются при проведении традиционных тестов коагулограммы.

Клинический случай 4.2

Пациент А., возраст – 2 суток. Пациенту планируется хирургическое вмешательство по поводу врожденной непроходимости кишечника. Перед операцией взят образец крови на коагулограмму в стандартную вакуумную пробирку. При визуальном осмотре пробирки перед центрифугированием сгустков не выявлено, кровь заполняет пробирку строго до контрольной черты. Проведено исследование коагулограммы: сгустков не получено ни в одном из клоттинговых тестов (плазма не сворачивается). Лечащий врач ребенка сказал, что никаких геморрагических проявлений у пациента не было, в том числе в связи с проведением инвазивных манипуляций. При дальнейшем разборе ситуации выявлено, что гематокрит пациента на момент отбора образца составил 58%. В течение последующих суток проведена инфузионная терапия. Гематокрит снизился до 49%. Повторное тестирование патологии в коагулограмме не выявило.

Комментарий. При соблюдении соотношения крови и цитрата 9 : 1 и гематокрите 58% количество цитрата, приходящегося на единицу объема плазмы, было больше допустимого. Внесение в систему стандартного количества кальция не привело к рекальцификации, свертывания крови не произошло. При изменении соотношения в сторону относительного увеличения количества плазмы были получены нормальные результаты.

Исследование крови на автоматических гематологических анализаторах

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА – K_2 ЭДТА или K_3 ЭДТА) – предпочтительный антикоагулянт при подсчете форменных элементов крови с использованием автоматических гематологических анализаторов. Использование Na_2 ЭДТА не рекомендовано вследствие его плохой растворимости. Концентрация ЭДТА во взятой крови должна быть постоянной и составлять 1,5–2,2 мг/мл крови.

Применение в качестве антикоагулянтов гепарина или цитрата натрия сопровождается структурными изменениями клеток, поэтому эти антикоагулянты не рекомендованы для использования как при автоматизированном, так и при морфологическом исследовании крови, кроме случаев ЭДТА-индуцированной тромбоцитопении (см. клинический случай 4.3).

Необходимо строго следить за количеством взятой крови, объем которой должен соответствовать указанной отметке на пробирке. Несоблюдение этого условия, а также недостаточно тщательное перемешивание крови приводит к изменению конечной концентрации антикоагулянта, что может повлечь за собой появление микросгустков, неточное определение концентрации клеточных элементов, искажение морфологической структуры клеток. Пробирки должны заполняться полностью, в пределах $\pm 10\%$ от указанного объема. Сразу после заполнения и извлечения пробирки из держателя ее нужно аккуратно перевернуть несколько раз на 180° для смешивания пробы с наполнителем. При транспортировке в лабораторию пробирки должны быть поставлены вертикально в штатив. В плохо перемешанной пробе образуются микросгустки, ведущие к искажению результатов тестов, а также к поломкам лабораторных анализаторов вследствие закупорки пробозабирающих зондов. Пробу нельзя трясти, ее надо плавно перемешать. При слишком энергичном перемешивании возможны пенообразование и гемолиз. В случае выполнения большого количества лабораторных исследований, особенно у детей и при динамическом наблюдении за пациентом, необходимо минимизировать объем проб крови для лабораторных исследований. Несмотря на небольшое количество крови в каждой пробирке, общая необоснованная кровопотеря может быть существенной.

При выполнении гематологических исследований на значительном удалении от места взятия крови неизбежно возникают проблемы, связанные с условиями транспортировки. При перевозках пробирок с кровью рекомендовано использовать герметично закрытые пластиковые пробирки и специальные транспортные изотермические контейнеры.

При исследовании крови с помощью гематологических анализаторов возможно получение ложных результатов, в отношении тромбоцитов – это псевдотромбоцитопения, возникающая в результате:

- агрегации тромбоцитов, индуцированной ЭДТА, используемым в качестве антикоагулянта (рис. 4.5);
- тромбоцитарного сателлитизма – розетки тромбоцитов вокруг лейкоцитов (рис. 4.6);

- холодовой агглютинации тромбоцитов;
- гигантских тромбоцитов;
- артефактов, связанных с образованием сгустков крови или нарушением соотношения кровь/антикоагулянт.

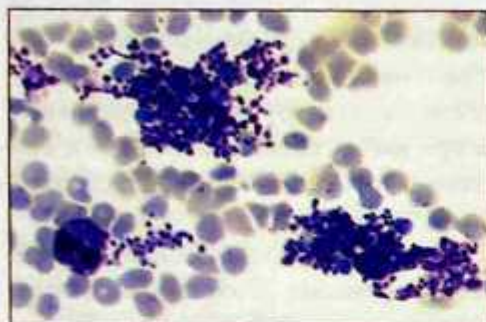


Рис. 4.5. ЭДТА-индуцированная агрегация тромбоцитов в венозной крови

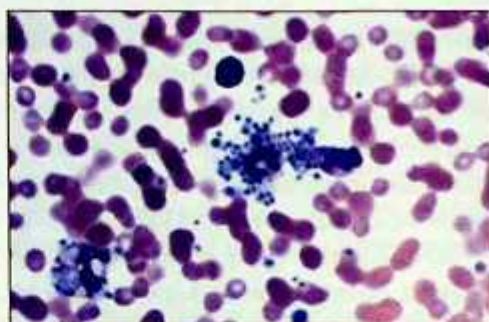


Рис. 4.6. Клеточный сателлитизм – тромбоцитарные розетки вокруг нейтрофилов

Клинический случай 4.3

Больной С., 59 лет, перенес повторно травму коленного сустава с повреждением надколенника. Перед предстоящей ортопедической операцией в анализе крови, проведенном с использованием гематологического анализатора, выявлена бессимптомная тромбоцитопения со снижением количества тромбоцитов до $20 \times 10^9/\text{л}$, других изменений не наблюдалось. Геморрагических проявлений не было.

При обследовании: состояние удовлетворительное, ожирение. Кожные покровы обычной окраски. Имеются варикозно расширенные вены обеих ног с трофическими изменениями на коже (пигментация). В мазке венозной крови с антикоагулянтом ЭДТА обнаружены массивные агрегаты тромбоцитов (рис. 4.7). В мазке периферической крови (сделан сразу из капиллярной крови) агрегатов тромбоцитов не обнаружено, подсчет тромбоцитов по Фонию составил $159 \times 10^9/\text{л}$.

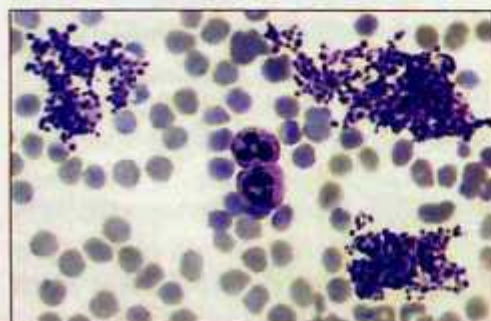


Рис. 4.7. Мазок венозной крови пациента С., стабилизированный антикоагулянтом ЭДТА с массивными агрегатами тромбоцитов. При подсчете на гематологическом анализаторе получены результаты, свидетельствующие о тромбоцитопении. Подсчет крови с цитратом натрия в качестве антикоагулянта доказал псевдоцитопению

Заключение: диагностирована ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения. В данном случае причин отказа от ортопедической операции не имеется.

Комментарий. ЭДТА-ассоциированная псевдоцитопения является лабораторным феноменом, связанным с внедрением в лабораторную практику гематологических анализаторов. Псевдоцитопения может быть причиной лабораторных и диагностических ошибок. Данных о клиническом значении псевдоцитопении не выявлено. Выявление ЭДТА-ассоциированной псевдоцитопении основано на сопоставлении данных автоматизированного гематологического анализа с результатами микроскопического подсчета количества тромбоцитов или автоматизированных исследований с применением альтернативных антикоагулянтов. Феномен агрегации тромбоцитов обнаруживается уже через 5 минут после помещения пробы крови в пробирку с ЭДТА, со временем количество и размер агрегатов увеличивается. С псевдоагрегацией ассоциирован полиморфизм в гене тромбоцитарного рецептора к фибриногену (полиморфизм гена интегрина *ITGB3-b:1565 T > C*), однако клинических данных о важности этого генетического полиморфизма пока недостаточно. При выявлении ЭДТА-индуцированной агрегации тромбоцитов рекомендуется использовать в качестве антикоагулянта цитрат натрия. Альтернативным антикоагулянтом является сульфат магния. Механизм антикоагулянтного действия магния основан на природном антагонизме с ионами кальция, который препятствует стимулированному тромбином накоплению кальция в тромбоцитах, а также уменьшению высвобождения из тромбоцитов тромбоксана. Изменение в присутствии магния физических свойств, проницаемости мембран тромбоцитов затрудняет связывание с тромбоцитами фибриногена. Фабричные пробирки с сульфатом магния коммерчески доступны.

При использовании современных автоматизированных лабораторных анализаторов в 95% случаев для выполнения назначенных коагулологических анализов может быть достаточно 2–3 мл цитратной крови. При централизации лабораторных исследований должны использоваться вакуумные пробирки унифицированного объема (например, объемом 3–4 мл для исследования гемостаза).

Обработка крови перед исследованием

Хранение

Согласно стандарту CLSI H21-A4, хранение цельной крови допускается в течение не более 45 мин, в течение которых должна быть отделена плазма. Все тесты должны быть выполнены в течение 4 ч при хранении при 18–24 °С.

В пробе крови, хранящейся при комнатной температуре и с закрытой пробкой, не происходит заметных изменений в результатах ПВ и АЧТВ. Эффект физиологического забуферивания за счет эритроцитов исчезает в открытой пробирке при попадании в нее атмосферного воздуха. Результаты теста ПВ остаются стабильными до 24 ч при хранении венозной крови с цитратом при комнатной температуре.

Хранение в холодильнике или в контейнере с хладогеном категорически запрещено! Охлаждение до 4 °С или хранение во льду может привести к холодовой активации фактора VII и уменьшению ПВ, а также к холодовой активации фактора XII (процесс запускается через контактную фазу и развивается достаточно часто) и может вызвать значительные изменения функции тромбоцитов.

CLSI H21-A5 рекомендует хранить пробы до 4 часов исключительно при комнатной температуре. Допускается однократное замораживание бедной тромбоцитами плазмы при температуре не выше –30 °С на срок до двух недель, при температуре не выше –70 °С – от 6 месяцев до 2 лет без значительной потери активности факторов свертывания. Размораживание плазмы следует осуществлять при температуре +37 °С с немедленным тестированием или в течение 2 ч при хранении при 2–4 °С, повторная заморозка недопустима. Вместе с образцами плазмы пациентов необходимо замораживать контрольные образцы для сохранения сопоставимости результатов, полученных и сохраненных в одинаковых условиях.

Центрифугирование

Общее правило получения проб крови – как можно быстрее отцентрифугировать доставленный материал. Пробирки с цитратной кровью центрифугируют при 2000 g в течение по меньшей мере 10 мин при 18–25 °С (это обеспечивает осаждение тромбоцитов). Пробирки, содержащие комплексный наполнитель CTAD, центрифугируют при 1500 g 15 мин.

Если исследование проводится без этапа хранения, то используется плазма из первичной пробирки. В случае необходимости транспортировки и хранения плазмы рекомендуется осторожно отобрать супернатант – бедную тромбоцитами плазму. Для получения бестромбоцитной плазмы требуется повторное центрифугирование в режиме 2500 g в течение 10 мин. Хранить плазму до исследования лучше в пластиковых пробирках и непосредственно перед анализом перемешать. Для получения плазмы, богатой тромбоцитами, нужно центрифугировать кровь при 200–250 g.

Транспортировка

Кровь необходимо сохранять в закрытой пробирке, вертикально в штативе. Цельная кровь должна быть доставлена в лабораторию (к месту центрифугирования) в течение не более 45 мин с момента взятия (ГОСТ 53079.4). Материал для исследования параметров гемостаза (цитратная плазма) можно транспортировать в замороженном виде, при соблюдении холодовой цепи. Режимы заморозки аналогичны режимам хранения. До следующего дня хранить кровь нельзя! Транспортировка крови на большие расстояния и ее частое встряхивание искажает результаты анализов.

Одной из главных проблем при исследовании коагулограммы является игнорирование влияния сроков постановки лабораторных тестов и правил транспортировки проб в лабораторию. Стандартизация сроков доставки и жесткое соблюдение стандартов позволит избежать ошибочных результатов.

Транспортировка биологического материала в лабораторные подразделения должна осуществляться в специальных закрытых от внешнего воздействия пластиковых контейнерах-укладках с крышками, которые подвергаются дезинфекции. Недопустимо доставлять биоматериал в карманах, бумажных пакетах или сумках. В зимнее время транспортировка биоматериала по улице при минусовых температурах должна быть максимально сокращена и проводиться в защищенных от внешних температур контейнерах.

Использование вакуумных систем создает стандартные условия транспортировки и хранения биологических проб пациента. Плотны закрытые пробирки предотвращают контакт биологического материала с воздухом, испарение пробы, повышение концентрации всех нелетучих компонентов. Строго дозированные в заводских условиях наполнители обеспечивают необходимое соотношение крови и реагента. Проба находится в одной пробирке при взятии, транспортировке, анализе, хранении, что исключает необходимость переливания, уменьшает возможность возникновения гемолиза и вспенивания образца.

Для транспортировки крови для исследования гемостаза созданы специальные пробирки СТAD (рис. 4.8). Для исследования показателей гемостаза в вакуумных пробирках используются комплексные наполнители (цитрат натрия/теофиллин/аденозин/дипиридамо). Пробирки с этим наполнителем используют для обычных рутинных тестов, мониторинга терапии гепарином, анализа антигепаринового фактора тромбоцитов 4, β -тромбомодулина. Пробирки с комплексным наполнителем нельзя использовать для исследования агрегации тромбоцитов. Соотношение антикоагулянт/кровь в этих пробирках 1 : 9 при концентрации цитрата натрия 0,109 моль/л (3,2%). Вакуумные пробирки с комплексным наполнителем рекомендуются при централизации исследований системы гемостаза.



Рис. 4.8. Пробирка СТAD специально создана для транспортировки крови на исследование гемостаза, содержит цитрат натрия (0,105 М), теофиллин, аденозин и дипиридамо

В связи с развитием в стране технологии централизации лабораторных исследований остро встал вопрос о сроках стабильности лабораторных показателей, и в первую очередь параметров гемостаза. В табл. 4.4 приведены максимально допустимое время хранения и условия хранения проб крови для исследования показателей гемостаза.

Таблица 4.4. Максимально допустимое время хранения и условия хранения проб крови для исследования показателей гемостаза (Кишкун А.А., Гильманов А.Ж. и др. Рекомендации «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований». М., 2013)

Аналит	Исследование		Стабильность			Примечание
	Сыворотка	Цитратная плазма	-20 °С	4-8 °С	25 °С	
АЧТВ		+	1 мес.	2-8 ч	2-8 ч	
α_1 -антитрипсин	+		2 мес.	5 мес.	3 мес.	
Антитромбин		+	1 мес.	2 нед.	Использовать свежую плазму	
Антифосфолипидные антитела	+		3 мес.	3 дня	1 день	
Волчаночный антикоагулянт		+	6 мес.		4 ч	ВА определяется в плазме после двойного центрифугирования
Гепарин (анти-Ха)		+			4 ч	
Гомоцистеин	+			4 нед.	4 дня	В ЭДТА-плазме или сыворотке использовать стабилизатор NaF, 4 г/л
D-димер		+	6 мес.	4 дня	8 ч	
ПВ (по Квику)		+	1 мес.	8-24 ч	4-24 ч	В зависимости от реагентов
ПДФ		+	1 мес.	1 день	3 ч	Стабилизатор аprotенин или соевый ингибитор трипсина
Протеин С		+	3 мес.	7 дней	7 дней	Избегать повторного замораживания
Протеин С резистентность		+		3 ч	3 ч	Центрифугировать в течение 30 минут
Протеин S		+	4 мес.		8 ч	Отделить плазму сразу после центрифугирования
Тромбиновое время		+	1 мес.	1 ч - 2 дня	1-4 ч	Стабильность зависит от реагентов

Окончание табл. 4.4

Аналит	Исследование		Стабильность			Примечание
	Сыворотка	Цитратная плазма	-20 °С	4-8 °С	25 °С	
Тромбоциты количество				7 дней	4 дня	Избегать псевдоцитопении при ЭДТА
Фактор II		+	1 мес.		6 ч	
V		+	1 мес.	2 дня	6 ч	Центрифугировать при 4 °С
VII		+		Нестабилен	6 ч	
VIII		+	2 нед.	4 ч	3 ч	
IX		+			6 ч	
X		+	1 мес.		6 ч	
XI		+		Нестабилен	6 ч	
XII		+		Нестабилен	6 ч	
XIII		+	1 мес.		4 ч	
Фактор Виллебранда (vWF)					48 ч	
Функция тромбоцитов					3 ч	Не менее 15 мин при использовании анализатора PFA, специальный стабилизатор
Фибрин мономеры		+	3 мес.	1 день	2 ч	
Фибриноген (по Клауссу)		+	1 мес.	1-7 дней	1-7 дней	Стабильность зависит от метода

Проверка исследуемых образцов перед выполнением тестов

Проверка образцов крови или плазмы перед проведением коагуляционных тестов позволяет избежать многих ошибок, связанных с преаналитическими погрешностями. На этапе получения, хранения и транспортировки биоматериала в рамках оценки качества контролю подлежат: время взятия материала, правильный выбор типа пробирки (антикоагулянт, стабилизатор), время отделения форменных элементов, длительность и условия хранения образца, время доставки материала в лабораторию, целостность контейнера с образцом, соблюдение соотношения крови и антикоагулянта. После взятия материала пробирки маркируются и передаются курьеру вместе с направлениями. Номера на пробирках должны соответствовать номерам на направлениях.

Неправильное соотношение кровь/цитрат можно определить, если объем крови в пробирке меньше или больше, чем требуемый. При малом объеме крови будет зарегистрировано ложное удлинение коагуляционных тестов.

Пробы с видимыми сгустками фибрина (микросгустками или явно определяемыми сгустками) не должны быть использованы для исследования показателей свертывания крови. В этих случаях коагуляционные тесты могут быть укорочены, нормальны или удлинены.

Гемолиз может произойти при травматичном взятии, при использовании иглы маленького диаметра, при слишком быстром взятии крови (высокий уровень вакуума в пробирке) и при хранении неотцентрифугированной крови или после центрифугирования. Гемолиз существенно влияет на показатели коагулограммы, так как активные вещества, попадающие в плазму при разрушении эритроцитов, существенно меняют как функцию тромбоцитов, так и показатели плазменного гемостаза. В таких тестах результаты варьируют в зависимости от степени гемолиза. Если гемолиз присущ *in vivo* (внутрисосудистый гемолиз), что подтверждается взятием нового образца, а также дополнительными исследованиями – повышением количества ретикулоцитов, ЛДГ, определением свободного гемоглобина (при возможности) и снижением гаптоглобина, то тесты могут выполняться для оценки гемостатической ситуации. Если гемолиз произошел после взятия крови, то такие образцы следует отбросить, чтобы не получить ложных результатов. Перед исследованием также фиксируется наличие липемии и иктеричности плазмы. Данные компоненты являются аналитическими интерферентами для анализаторов с оптическим способом детекции реакции коагуляции.

После проведения исследования перед валидацией проходят контроль на наличие микросгустка все пробы, имеющие низкую концентрацию фибриногена, короткое АЧТВ, ПВ или их сочетание.

В современных анализаторах (с блоком преаналитики) появилась возможность анализировать кривые коагуляции для оценки влияния преаналитических факторов.

Правила работы с оборудованием для проведения коагулологических исследований идентичны таковым для любых лабораторных работ. Оборудование, подвергающееся метрологической поверке, в первую очередь дозаторы, должны быть поверены не менее чем за 12 месяцев до применения. Проведение плановых поверок и профилактики оборудования должно быть указано в соответствующих журналах.

Обобщенные рекомендации по взятию, транспортировке, пробоподготовке и хранению крови для исследований системы гемостаза

Взятие крови

1. Проведение асептической, максимально щадящей венепункции с минимальным венозным застоем.
2. Использование иглы или «бабочки» 21-го калибра (иглы 19-го калибра могут использоваться у взрослых с хорошими венами, 23-го калибра могут потребоваться для детей).

CS-2100i/CS-2000i

3 в 1: Коагулометр, Агрегометр и
Модуль преаналитической оценки образцов

Технология мультиволнового анализа
Определение оптимальной длины волны
для измерения в зависимости от уровня
интерферирующих веществ

Расширенные возможности калибровок

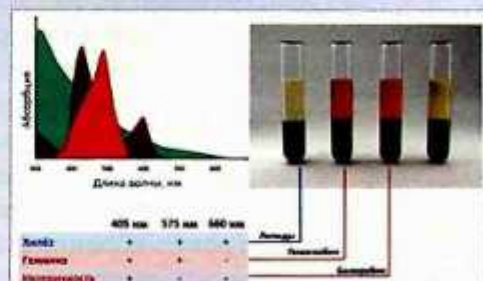
- Сравнение калибровочных кривых
- Перенос калибровочных данных между анализаторами
- Перерасчет ранее полученных результатов по новой калибровке

Легкое обслуживание анализатора
Напоминание о необходимости проведения
обслуживания

Срочный анализ (STAT)

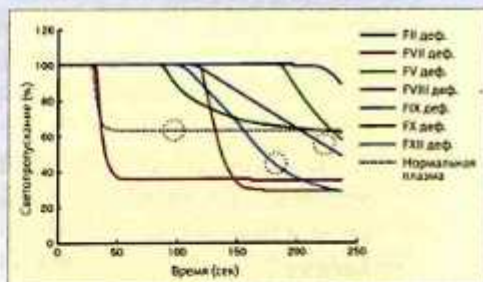
Возможность загрузки срочных образцов в любую
позицию на борту анализатора

Легкая загрузка штативов с образцами

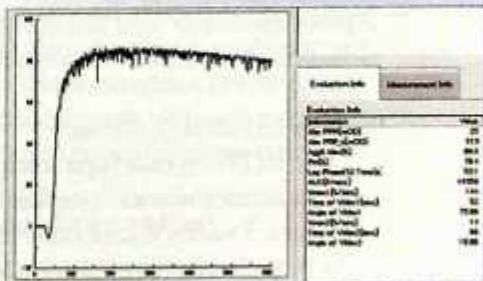


Встроенный преаналитический модуль

- Проверка уровня наполнения пробирки
- Определение концентрации интерферирующих веществ (Гемолиз, Иктеричность и Липемия)



Оптический метод позволяет анализировать
реакционную кривую и определять причину
патологического результата.



Встроенный автоматический агрегометр
на 24 образца (Золотой стандарт:
светопропускание по методу Борна)



3. Последовательность использования пробирок при взятии пробы: кровь для бактериологических исследований (если не назначены – кровь для биохимических исследований) – кровь для исследований гемостаза – кровь для биохимических исследований (если не взята первой пробиркой) – другие пробирки с добавлением стабилизаторов.
4. Не использовать гепарин-контаминированные венозные линии. Если это неизбежно из-за плохого венозного доступа, необходимо брать кровь из катетера, в который вводились кристаллоиды, и отбросить первые несколько миллилитров крови.
5. Использовать 0,109 М тринатрий цитрат двухводный (9 объемов крови к 1 объему антикоагулянта).
6. Немедленно перемешать пробу после ее получения путем мягкой инверсии 3–4 раза.
7. Если гематокрит высокий, необходимо отрегулировать объем антикоагулянта.

Транспортировка и пробоподготовка

1. Транспортировать образцы крови необходимо быстро (оптимально – в течение 45 минут) при комнатной температуре или центрифугировать пробу, отделять плазму, замораживать и транспортировать на сухом льду. Необходимо следовать локальным инструкциям по безопасности обращения с биологическим материалом и сухим льдом).
2. Центрифугирование выполнять при 2000 g в течение по меньшей мере 10 мин при 18–25 °C (обеспечить осаждение тромбоцитов) Для получения бестромбоцитной плазмы – повторное центрифугирование. Всегда следовать инструкциям производителя реагентов для определения режима центрифугирования.
3. Необходимо оценить образец после центрифугирования на сгустки, билирубинемия, гемолиз и липемию (образцы со сгустками или гемолизированные отклонять).

Хранение

1. Избегать длительного хранения, выполнять исследование на цельной крови в течение 4 часов. Это правило распространяется и на образцы, которые подверглись центрифугированию в течение 1 часа после получения пробы.
2. Время хранения при комнатной температуре 15–25°C до момента исследования при условии быстрого центрифугирования различно для разных тестов:
 - для ПВ/МНО – 24 часа;
 - для АЧТВ – 4 часа (при контроле нефракционированного гепарина – 1 час);
 - для исследования тромбоцитарной функции – не менее 15 минут, но не более 3 часов после получения пробы;
 - для фибриногена – не более 7 дней;
 - всегда следовать инструкциям производителя реагентов для определения срока хранения, в том числе в замороженном виде;
 - vWF – до 48 часов.

3. Если плазма должна храниться в замороженном состоянии, использовать плотно закрытые полипропиленовые пробирки с винтовыми крышками или типа Epindorf. Плазму для исследования ПВ, АЧТВ и фактора VIII замораживать нежелательно.
4. Замораживать нужно быстро (жидкий азот).
5. Хранение при температуре -40 – -70 °C рекомендуется и необходимо для длительного периода времени до 6–18 месяцев.
6. Хранение при температуре -20 °C допустимо до 2 недель (см. рекомендации производителя реагентов). Морозильные камеры с циклами авторазмораживания не должны использоваться для хранения коагулологических образцов.
7. Непосредственно перед исследованием образец быстро разморозить при 37 °C на водяной бане (обычно это занимает 3–5 минут для образца 1–2 мл) и аккуратно перемешать для ресуспендирования криопреципитата.
8. Размораживание при комнатной температуре и повторное замораживание недопустимо.

Приборное и методическое обеспечение исследований гемостаза

Агрегометры

Проблемой в этой области считается отсутствие общепринятой стандартизации методов исследования. В 2008 г. американская стандартообразующая организация CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) выпустила документ «Исследования тромбоцитарной функции методом агрегатометрии; рекомендуемые принципы». В документе CLSI рассматриваются четыре основных клинически апробированных метода: а) оптическая агрегатометрия на плазме; б) импедансная агрегатометрия на цельной крови; в) люминесцентное измерение реакций секреции и высвобождения; г) агрегатометрия в условиях физиологических сдвиговых усилий. Важным условием исследования агрегации является взятие крови, которую необходимо брать традиционным методом (по крайней мере для работы с оптическими агрегометрами). Кровь, взятая в вакутейнеры, не всегда годится для исследования агрегации. Это связано с тем, что при взятии крови в вакутейнеры происходит активация тромбоцитов за счет высоких скоростей сдвига в игле и турбулентности при изливании в пробирку. Тем не менее во многих лабораториях используется кровь, взятая в вакуум. При этом необходимо стандартизовать условия получения проб крови и относиться с осторожностью к полученным результатам агрегатометрии.

Оптическая агрегатометрия на плазме

«Золотым стандартом» для оценки функции агрегации тромбоцитов остается наиболее распространенный тест для исследования функции тромбоцитов – оптическая агрегатометрия, в основе которой лежит турбидиметрический метод, предложенный в начале 1960-х годов. Ученые из Великобритании Борн и О’Брайен разработали

простой оптический метод измерения агрегации тромбоцитов. В процессе анализа регистрируются изменения светопропускания плазмы, содержащей тромбоциты в стандартизованном количестве, в результате образования агрегатов тромбоцитов в ответ на стимуляцию индуктором. Требования к пробам критично. Исследование агрегации проводят на плазме, богатой тромбоцитами (английская аббревиатура PRP). Желательно использовать PRP, содержащую примерно 200 клеток/нл. Это требование затрудняет оценку агрегации тромбоцитов при тромбоцитопении.

Пробы помещаются в кювету агрегометра, который представляет собой оптический прибор с регистрацией проходящего света. Проба в кювете постоянно перемешивается специальной мешалкой. При формировании агрегатов повышается прозрачность плазмы, и следовательно, увеличивается поток проходящего через кювету света (рис. 4.9).

Агрегометр регистрирует изменение светопропускания во времени, что графически отображается в виде агрегатограммы (рис. 4.10). После добавления индуктора агрегации к тромбоцитарной плазме появляется lag-фаза. В период lag-фазы может регистрироваться инвертированность кривой как результат набухания тромбоцитов и снижения светопропускания. Первичная волна на агрегатограмме обусловлена появлением тромбоцитарных агрегатов, образующихся при воздействии индуктора



Рис. 4.9. Принцип оценки индуцированной агрегации. После добавления индуктора агрегации и формирования агрегатов тромбоцитов происходит просветление суспензии

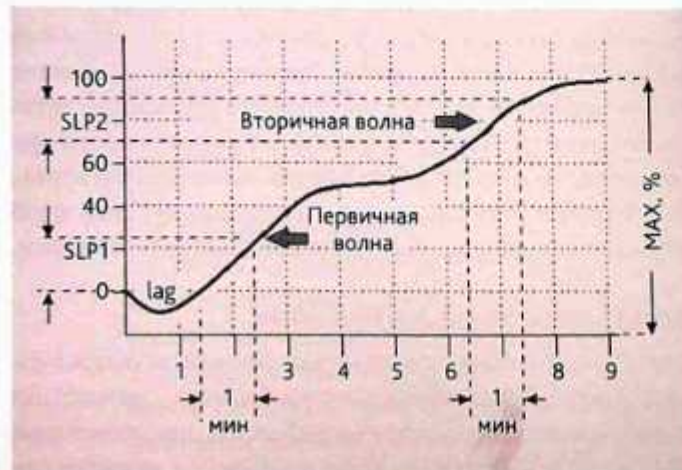


Рис. 4.10. Агрегатограмма. Оцениваются: степень агрегации (MAX %) – максимальный процент агрегации после внесения индуктора; время агрегации (MAX TIME) – время достижения максимальной агрегации; скорость агрегации – увеличение светопропускания за 1 мин. Измеряется у первичной (SLP1) и вторичной (SLP2) агрегационных волн на линейном участке их подъема

агрегации. После окончания первичной (обратимой) агрегации крутизна агрегационной кривой понижается – за этот период из плотных гранул тромбоцитов освобождаются биологически активные вещества (АДФ, серотонин, тромбоксан A_2), вызывающие вторичную агрегационную волну (необратимую агрегацию).

На результаты исследования влияют тип агрегометра и качество используемых реактивов. Поэтому каждой лаборатории следует установить собственные нормальные показатели, учитывая рекомендации, изложенные в инструкции к агрегометру, и контролировать их значения при смене реактивов.

Гиперагрегация при исследовании на агрегометре характеризуется: увеличением степени и скорости агрегации, появлением монофазной кривой – слияние первичной и вторичной волн (при субмаксимальной АДФ- и адреналин-индукции). На снижение агрегационной функции тромбоцитов указывают: уменьшение степени и скорости агрегации, появление обратимой агрегации, отсутствие вторичной агрегационной волны (при АДФ- и адреналин-индукции), увеличение lag-фазы (при коллаген-индукции).

Интерпретация результатов изменения агрегации при агрегатометрии по параметрам кривой агрегации и клиническая интерпретация не во всем совпадают. Следует заметить, что с клинической точки зрения наибольшее значение имеет достаточная степень агрегации при использовании более низких концентраций индукторов. При этом степень агрегации зависит от размеров агрегатов тромбоцитов и используемой длины волны, а скорость агрегации отнюдь не свидетельствует о том, что в организме будет избыточная склонность к тромбообразованию.

Известно много соединений, вызывающих агрегацию тромбоцитов: адреналин, норадреналин, АДФ, коллаген, арахидоновая кислота, серотонин, тромбин, ристомидин (ристоцетин). Для ответа на диагностический вопрос о типе нарушения функции тромбоцитов достаточно применения 2–3 выбранных индукторов агрегации, чаще всего это растворы АДФ, адреналина, коллагена, ристомидина.

В последнее время агрегацию стали использовать для оценки эффективности терапии с применением антиагрегантов. В этом случае в качестве индукторов агрегации используется арахидоновая кислота и/или коллаген – для оценки действия аспирина, АДФ – для тиенопиридинов, пептид-активатор рецепторов к тромбину (TRAP) – для ингибиторов гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов $Pb/IIIa$. Использование индукторов специфических путей активации тромбоцитов в различных концентрациях способствует выявлению дозозависимого эффекта терапии.

Отечественными исследователями (Габбасов З.А., Попов Е.Г. и др.) был предложен модифицированный высокочувствительный метод оценки среднего размера агрегатов в реальном времени путем анализа флуктуаций интенсивности светового потока, проходящего через образец плазмы. Это позволяет фиксировать образование микроагрегатов, начиная с двух тромбоцитов в агрегате, и избежать влияния светопоглощающей активности плазмы на точность измерения. Последнее имеет большое значение для исследования спонтанной агрегации, агрегации под действием низких концентраций индукторов. Данный метод применяется в лазерном анализаторе агрегации НПФ «Биола» (рис. 4.11).

Анализатор агрегации БИОЛА АЛАТ-2



Область применения

- Диагностика состояния тромбоцитарного звена гемостаза.
- Диагностика врожденных и приобретенных нарушений гемостаза.
- Оценка эффективности терапии и степень воздействия на агрегацию.
- Оценка жизнеспособности тромбоцитарной массы при переливании крови.
- Скрининг новых лекарственных препаратов.
- Токсикология.
- Оценка формы и числа тромбоцитов.
- Количественное определение фактора фон Виллебранда.

Модель	ЛА-220	ЛА-230	ЛА-230-2	ЛА-430-2
Число измерений	2	2	2	4
Измерение по светопропусканию	✓	✓	✓	✓
Измерение по среднему радиусу	✓	✓	✓	✓
Счетчик тромбоцитов	✗	✓	✓	✓
Измерение фактора фон Виллебранда	✗	✗	✓	✓

Агрегация регистрируется как традиционным турбидиметрическим методом, так и способом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени.

Турбидиметрический метод, предложенный Борном и О'Брайеном, наиболее распространенный при исследовании агрегации. Он основан на регистрации изменений светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы. Это позволяет исследовать не только агрегацию, но и изменение формы клеток.

Метод ФСП основан на анализе флуктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале. Относительная дисперсия таких флуктуаций пропорциональна среднему размеру агрегатов и используется для исследования кинетики агрегации. Метод отличается высокой чувствительностью, что делает его пригодным для исследования спонтанной агрегации, агрегации под действием низких концентраций индукторов, а также агрегации субмикронных частиц и макромолекул.

Программное обеспечение



Разработано специально для лазерных анализаторов агрегации нашего производства. Программа работает в среде Windows, проста и удобна.

Программа AGGR отображает кривые агрегации в ходе эксперимента, сохраняет их вместе с временными метками и сопроводительной информацией на диск и позволяет в дальнейшем просматривать и обрабатывать данные.



Рис. 4.11. Лазерный анализатор агрегации АЛАТ-2 НПФ БИОЛА. Предназначен для исследования агрегации тромбоцитов, определения концентрации клеток в суспензии, а также оценки их формы. Агрегация регистрируется как традиционным турбидиметрическим методом, так и методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов

Недостатками метода оптической агрегометрии являются длительный период выполнения теста, трудоемкость и влияние «человеческого фактора» (необходима высокая квалификация персонала). Кроме того, метод не стандартизован, воспроизводимость его проверить трудно, отсутствуют контрольные материалы.

Импедансная агрегометрия на цельной крови

Метод основан на регистрации изменения сопротивления (импеданса) между двумя металлическими электродами при образовании агрегатов на их поверхности под действием индуктора в крови. Данный тест может использоваться для определения агрегации тромбоцитов, подготовленных разными способами, однако наиболее приближенным к физиологическим условиям является определение агрегации тромбоцитов в цельной крови. Одни приборы (Multiplate, VerifyNow) специализированы для исследований по месту лечения, другие (Chronolog) устанавливаются и используются в клинической лаборатории.

Агрегометр Multiplate – импедансный 5-канальный агрегометр на цельной крови работает на принципе «МЕА» – Multiple Electrode Aggregometry (рис. 4.12). Агрегометр использует для исследования одноразовый картридж с двумя парами плоских медных электродов, покрытых серебром. Использование импедансного метода позволяет проводить исследования в гемолитичных, иктеричных и липемичных образцах, так как данный метод нечувствителен к цветовым показателям образца. Импедансная агрегометрия может быть использована с успехом при исследовании пациентов с синдромом гигантских тромбоцитов, где оптическая агрегометрия приводит к неправильным результатам. Специальное покрытие предотвращает спонтанную активацию тромбоцитов. При инкубировании с цельной кровью на поверхности электродов при активации тромбоцитов начинается их



Рис. 4.12. Агрегометр Multiplate – импедансный 5-канальный агрегометр на цельной крови

адгезия, что сопровождается изменением электрического сопротивления (импеданса) между электродами. Изменение импеданса является мерой агрегации тромбоцитов в образце. При этом прибор автоматически регистрирует скорость агрегации, ее максимум и проводит все вычисления. Анализатор позволяет выполнять одновременно до 5 тестов с разными индукторами. Для выполнения методики требуется небольшое количество цельной крови (4 мл). Технология выполнения теста требует пипетирования, что не позволяет в полной мере отнести данный метод к «прикроватным», однако при этом метод является достаточно простым и удобным в исполнении, результат исследования можно получить в течение 10 мин.

Для удобства сравнения данных и унификации результатов введены условные единицы AUC (площадь под агрегационной кривой, рис. 4.13). Все результаты, нормы и клинические рекомендации выдаются в этих единицах. Все картриджи калиброваны на заводе. Одновременно в каждом картридже проводится параллельно два измерения для каждого теста, для внутреннего контроля измерения и повышения точности. Весь процесс проведения теста происходит под управлением программы, что обеспечивает стандартизацию процесса и воспроизводимость результатов. Для реализации диагностического алгоритма предложены тесты: TRAP-тест, ASPI-тест (для контроля аспирина), ADP-тест и APD-HS-тест (для контроля клопидогрел-подобных препаратов), COL-тест (с коллагеном), RISTO-тест (исследование GpIb-зависимой агрегации и фактора Виллебранда). Уникален TRAP-тест, который проводится с агонистом TRAP6 (тромбин-активирующий пептид). По своим свойствам активировать тромбоциты TRAP-6 сравним с тромбином, но при этом он не приводит к образованию сгустка. Использование этого теста позволяет измерить максимальную способность к агрегации у пациента (так как его действие не блокируется ни аспирином, ни клопидогрелем) и на этом фоне наблюдать снижение агрегации для пациентов, получающих эти

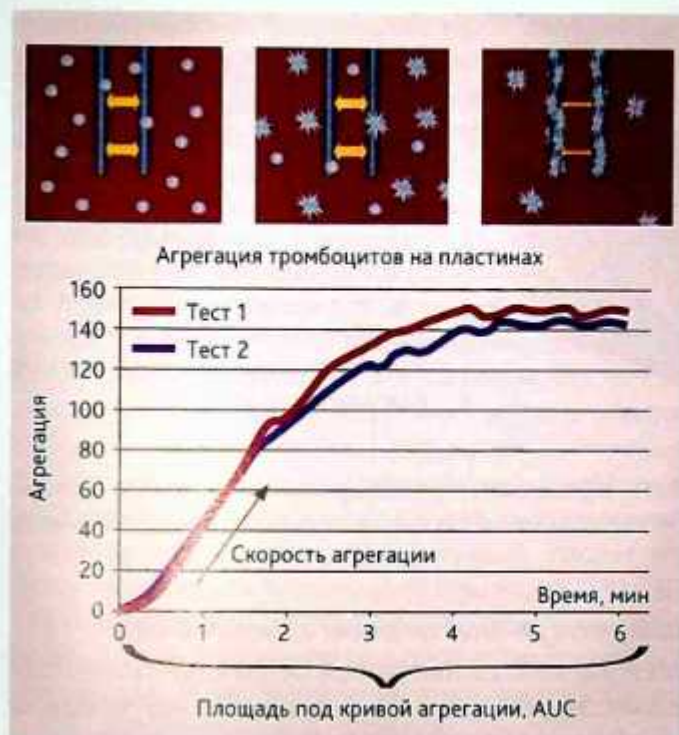


Рис. 4.13. Агрегация тромбоцитов на пластинах под влиянием индукторов и регистрируемая кривая агрегации в двух параллельных каналах

препараты (на тестах ASPI, ADP, ADP-HS). При этом отсутствие такого снижения будет указывать на возможность резистентности пациента к данному препарату. Анализатор Multiplate может быть использован в режиме РОС-анализа. Он подходит для круглосуточной работы, есть положительный опыт использования его в операционных.

Агрегаметр VerifyNow (рис. 4.14) использует цельную кровь. Принцип анализа основан на турбидиметрическом методе определения изменения светопропускания в результате агглютинации покрытых фибриногеном микрочастиц полистирола в образце цельной крови в присутствии индуктора. Анализ проводится в стандартных картриджах. В кювете прибора кроме крови присутствуют покрытые фибриногеном пластиковые шарики, агглютинирующие вместе с активированными тромбоцитами, содержащими рецептор фибриногена. С помощью данного анализатора выполняются два вида тестов: тест на аспирин с использованием арахидоновой кислоты, P2Y₁₂-тест с использованием АДФ и простагландина E₁. Преимуществами данного метода являются небольшой объем крови, необходимой для анализа (2–4 мл), простота выполнения теста, отсутствие пипетирования и необходимости в приобретении специфических навыков перед выполнением теста, поэтому данный метод является «прикроватным». Весь процесс – от взятия крови до получения результатов – может быть проведен в течение 10–15 минут. Валидированы значения cut-off для определения допустимой остаточной реак-



Рис. 4.14. Система VerifyNow основана на методе оптической трансмиссионной агрегометрии (LTA – Light Transmittance Aggregometry), определяет величину прохождения света в зависимости от агрегации тромбоцитов. Результаты, полученные на системе VerifyNow, коррелируют с клиническими исходами при оценке ответа на аспирин, клопидогрел, а также при совместном использовании клопидогреля и аспирина

тивности тромбоцитов (то есть определения эффективности лечения) при использовании антиагрегантов. Ограничивает метод относительно высокая стоимость одноразовых кювет.

Люминесцентное измерение реакций секреции и высвобождения

Метод измерения реакций высвобождения на основе люмидетекции АТФ реализован в комбинированном оптико-импедансном люмиагрегометре фирмы «Chronolog», работающем на образцах цельной цитратной крови и использующем электронно-импедансный метод и люминесцентный метод детекции (рис. 4.15). Прибор регистрирует микротоки, протекающие в специальном электродном блоке, при погружении его в различные образцы – цельную кровь, плазму, богатую тромбоцитами (PRP), разведенную кровь или во взвесь отмытых тромбоцитов. Исследование агрегации на агрегометрах «Хронолог» проводится очень быстро: для исследования агрегации в 5 мл цельной крови необходимо времени меньше, чем требуется для приготовления плазмы для коагулограммы. При этом методика



Рис. 4.15. Оптико-импедансный люмиагрегометр Chronolog 700 – предназначен для выполнения исследований на цельной крови, не требующих дополнительной пробоподготовки. Люминесцентный канал предназначен для диагностики нарушений накопления и секреции у тромбоцитов, в том числе для диагностики гепарин-индуцированной тромбоцитопении (ГИТ)

позволяет выявить большинство видов дисфункции тромбоцитов. Наличие на агрегометре люминесцентного датчика позволяет одновременно с агрегацией тромбоцитов исследовать и другие процессы, например, секрецию гранул. В то же время практически все агрегометры «Хронолог» как дополнение к импедансным и люминесцентным каналам имеют оптические каналы для проведения классической (турбидиметрической) агрегометрии. При выполнении исследования оцениваются параметры lag-фазы, максимальной амплитуды и площади под кривой при стандартном времени регистрации.

Процессы агрегации в цельной крови наиболее приближены к физиологическим условиям *in vivo*. Именно поэтому достигается высокая достоверность и специфичность результатов исследования, что дает возможность не только быстро провести необходимую диагностику, но и обеспечить надежную программу мониторинга проводимой терапии в реальном времени. Поскольку импедансная агрегометрия на цельной крови является наиболее адекватным средством для определения гиперагрегации, метод рекомендуется для исследования пациентов с риском тромбоэмболических осложнений. Этот метод более чувствителен и адекватен по сравнению с оптической агрегацией, поскольку измерения происходят в присутствии всех элементов цельной крови, включая эритроциты и лейкоциты. Тем не менее он не лишен недостатков оптической агрегометрии: слабая стандартизация, отсутствие контрольных материалов, необходимость определения локальных референтных значений.

Агрегометрия в условиях физиологических сдвиговых усилий

Анализатор функции тромбоцитов PFA-100 и PFA-200 (рис. 4.16) – агрегометр проточного типа, прибор, в котором образование первичного сгустка происходит динамически на микромембране из коллагена при прохождении через нее цельной крови под давлением, т. е. в условиях физиологических сдвиговых усилий. Кровь пропускается через апертуру с достаточно высокой скоростью сдвига, что симулирует условия, в которых находятся тромбоциты при повреждении сосудистой стенки. Это сопровождается образованием тромбоцитарной пробки, что определяется по перфузионному давлению в картридже (рис. 4.17). Метод является стандартизованным аналогом теста на время кровотечения; функциональный тест первичного гемостаза. Это глобальный тест, так как затрагивает практически все аспекты агрегации/адгезии тромбоцитов, межклеточные взаимодействия и плазменные факторы; имеется два вида картриджей – коллаген/АДФ и коллаген/эпинефрин, которые позволяют определять функциональные нарушения тромбоцитов, вызванные аспирином. С применением 2 агонистов (индукторов агрегации) возможно селективное выделение аспириновых тромбоцитопатий. Метод позволяет эффективно с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять ранние признаки нарушений первичного гемостаза, дефицит фактора Виллебранда, наследственные и приобретенные нарушения адгезии и агрегации тромбоцитов. Есть свидетельства, что тест на этом приборе имеет прогностиче-



Рис. 4.16. Анализатор функции тромбоцитов PFA-200. Позволяет наблюдать *in vitro* в динамике за процессом формирования тромбоцитарной пробки при моделировании этого процесса в специально созданном картридже

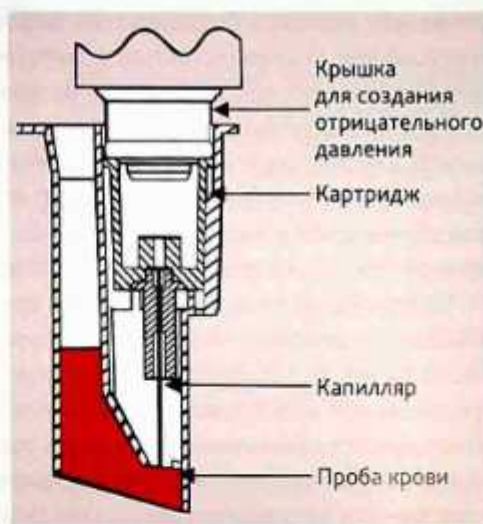


Рис. 4.17. Картридж анализатора PFA. В крови, проходящей по капилляру, активируется образование сгустка. На стенках капилляра нанесена пленка коллаген/адреналин или коллаген/АДФ. Образование тромбоцитарной пробки оценивается по перфузионному давлению

ское значение для выявления возможных осложнений после сердечно-сосудистых вмешательств. Разработан новый картридж коллаген/P2Y₁₂, который позволяет определять чувствительность к клопидогрел-подобным препаратам. Основные недостатки: дорогое оборудование и высокая цена за тест. Прибор перспективен для внедрения в коагулологические лаборатории и лаборатории экспресс-диагностики, «у постели больного» (режим РОС-анализа).

Производители лабораторного оборудования продолжают поиски оптимального метода оценки функции тромбоцитов с максимальным приближением к физиологическим условиям, в первую очередь к условиям движения крови вдоль сосудистой стенки (измерения в потоке). Примером является разработка технологии T-TAS[®] (Total Thrombus-Formation Analysis System) – интегрального анализа тромбообразования в потоке, который представляет собой автоматическую систему количественной оценки процесса тромбообразования на микрочипе проточной камеры с активирующим веществом в условиях движения крови. Анализ может подвергаться как тромбоцитарная активность, так и плазменная составляющая, для чего используются разные микрочипы.

Коагулометры

Коагулометры – автоматические и полуавтоматические приборы, используемые в лабораторной диагностике для исследования нарушений плазменного

гемостаза на основе определения промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания плазмы, до момента образования сгустка. Коагуляционные (клоттинговые) тесты – наиболее распространенный методический подход для оценки плазменного гемостаза в клинико-диагностических лабораториях. Коагулометры позволяют определять параметры свертывания с высокой точностью и воспроизводимостью результатов, характеризуются относительно низкими затратами на реактивы и расходные материалы, простотой обслуживания, удобным представлением результатов.

Ограничения коагуляционных (клоттинговых) методов

- Далеко не все компоненты гемостаза можно исследовать по времени образования сгустка. Компоненты системы фибринолиза, ингибиторы не оказывают прямого влияния на время свертывания, и их количественная оценка не поддается исследованию с помощью клоттинговых тестов.
- Зависимость результатов тестов от комплекса факторов и чувствительности к разным неспецифическим внешним воздействиям. Например, высокие дозы гепарина, угнетающие гемостатические реакции, мешают оценивать активность факторов свертывания клоттинговым методом, а тест на волчаночный антикоагулянт нельзя выполнять при использовании пероральных антикоагулянтов.
- Клоттинговый метод, реализуемый на коагулометрах, малочувствителен для определения повышенной активности компонентов системы свертывания крови скрининговыми тестами.
- Для ряда тестов сложно создать устойчивые реактивы, удобные для применения в диагностических лабораториях. Существенной проблемой на этом пути является использование активаторов плазменных факторов, в частности использование на первом этапе активаторов протеолитических реакций. Активаторы могут быть нефизиологическими, они только имитируют твердую фазу поверхности (каолин, целит), или физиологическими (экстракты тканей, очищенные или рекомбинантные активаторы факторов свертывания). Несколько этапов свертывания требует не только активаторов, но и кофакторов свертывания, фосфолипидов и ионов Ca^{2+} . Для практических целей применяются смеси этих веществ, часто с нестабильными белками, которые иногда трудно очистить и стабилизировать (например, тромбин).

В основе регистрации момента выпадения сгустка в коагулометрах используются несколько принципов и методов детекции: механический, оптико-механический, турбидиметрический. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки, которые важно учитывать при интерпретации результатов исследований.

Механические коагулометры

Принцип работы механических коагулометров представлен на рис. 4.18. В одном из вариантов кювета с плазмой вращается в наклонном положении.

Аналитические системы Tcoag Destiny / DT для гемостазиологии



30
ЛЕТ
АНАЛИТИКА



Коагуляционные,
иммунотурбидиметрические
и хромогенные тесты



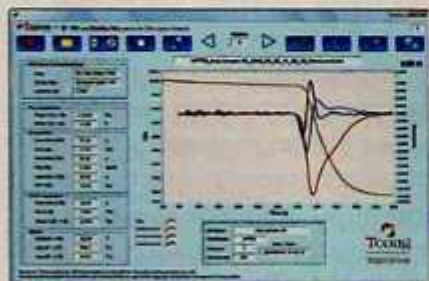
Анализ иктеричных,
гемолизированных
и липемичных проб



Прекалиброванные системные
реагенты, аттестованные
калибраторы и контрольные
материалы



Углубленный анализ динамики
и формы кривых оптической
плотности (Tcurve)



**Единственная в мире серия автоматических
систем, позволяющих определять время
свертывания оптическим и механическим
методами одновременно**

Для лабораторий в стационарах многопрофильных
ЛПУ и поликлиниках, научных исследований
До 350 тестов ПВ в час • до 100 проб • до 50 реагентов



Определяемые параметры

- АЧТВ, ТВ, ПВ, фибриноген
- Факторы свертывания II, V, VII, X (внешний путь) и VIII, IX, XI, XII (внутренний путь)
- Волчаночный антикоагулянт
- Антитромбин III, протеин С, протеин S, антиплазмин, гепарин, плазминоген
- D-димер и другие тесты

Дистанционный сервисный мониторинг



Контроль достоверности результатов
в режиме реального времени



ЗАО «АНАЛИТИКА» в лабораторной диагностике с 1988 года,
авторизованный поставщик продукции Tcoag Ireland Limited (Ирландия) в РФ с 2010 года

ЗАО «АНАЛИТИКА»
Москва
+7 495 737 0363
+7 800 200 1989
info@analytica.ru
www.analytica.ru

Металлический шарик в кювете начнет вращаться при свертывании плазмы. Момент захвата шарика выпавшим сгустком и начало его вращения вместе с кюветой фиксируется магнитным датчиком. При других вариантах регистрируется прекращение вращения внутри кюветы магнитной мешалки, захват сгустка опускающимся в кювету крючком или иные схемы, основанные на переходе жидкой плазмы в сгусток. Механические коагулометры характеризуются высокой надежностью и простотой в обслуживании. Принципиально: механические коагулометры могут работать на крови. Основные проблемы возникают в ситуациях, когда формируется неплотный сгусток, например при использовании гепарина. В этих случаях выпадающий фибрин часто не может сразу увлечь за собой механическое устройство, результаты получаются плохо воспроизводимыми.

Примером механического коагулометра является отечественный анализатор показателей гемостаза «ЭМКО» (рис. 4.19), который может быть выполнен в разных вариантах, включая 2 или 4 канала, сочетание механического и оптического методов регистрации.

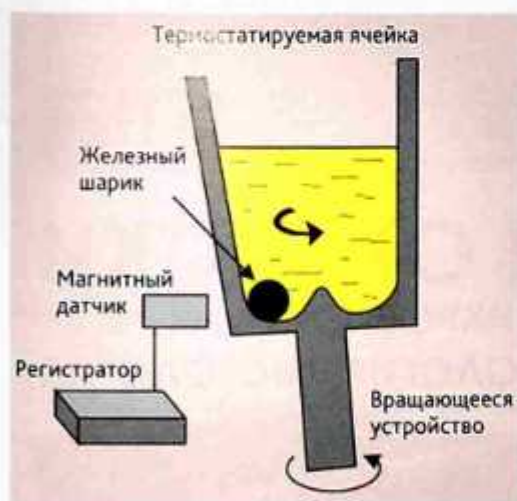


Рис. 4.18. Принцип работы механического коагулометра. Кювета с плазмой расположена под наклоном и вращается, шарик стоит на месте, не вращается. В момент свертывания шарик захватывается сгустком, как только шарик уходит от датчика, меняется магнитное поле, прибор регистрирует момент свертывания плазмы



Рис. 4.19. Анализатор показателей гемостаза «ЭМКО» – полуавтоматический программируемый коагулометр, предназначенный для определения в лабораторных условиях параметров свертывающей системы крови механическим методом

КОАГУЛОМЕТРЫ ЭМКО



7 моделей полуавтоматических анализаторов показателей гемостаза 2- и 4-канальных:
АПГ2-02, АПГ2-02-П, АПГ4-02-П, АПГ2-03-П, АПГ4-03-П, АПГ2-03-Пх, АПГ4-03-Пх,
в том числе 4 модели - со встроенным контролем качества (по приказу МЗ РФ №220),
2 модели - с возможностью выполнения хромогенных тестов (включая Д-Димер)
Открытая система (любые реагенты)
Определение 16-22 параметров гемостаза
Автоматический пересчет показателей с выводом на печать
Экономичность эксплуатации (дешевые расходные принадлежности и материалы)
Высокая надежность (4 года гарантии)

АКЦИЯ замены старого неисправного коагулометра
на новый с 4-летней гарантией по специальным ценам



129301, г. Москва, ул. Касаткина, д. 11, стр.1;
тел. / факс: +7 (495) 287-81-00, 287-84-00;
www.emco.ru, www.stainer.ru, emco@bk.ru



АВТОМАТЫ ОКРАСКИ

ГЕМАТОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ,
ПАРАЗИТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ

- Открытая система (любые реагенты и методики)
- Высококачественная однотипная окраска
- Высокая производительность
- Реализация сложных методик (ПАП-тест, гистология)
- Безопасные условия труда
- Низкая себестоимость окраски
- Шесть приборов, 6-8-13-16 станций:
АФОМК-6, АФОМКВ-Г-01, АФОМКВ-В-01,
АФОМК-13-ПАП, АФОМК-16, АФОМК-16-25



**НАБОР РЕАГЕНТОВ МЛТ-ПАП-ДИФФ
ДЛЯ ОКРАСКИ ПО ПАПАНИКОЛАУ**

Вискозиметрические коагулометры

Вискозиметрическая система детекции сгустка относится к механическим системам детекции. Принцип работы вискозиметрической системы представлен на рис. 4.20 и заключается в определении амплитуды колебаний стального шарика в реакционной кювете под влиянием электромагнитных импульсов. Важным отличием вискозиметрической системы детекции от базового механического метода является определение времени формирования сгустка по снижению амплитуды колебаний стального шарика, но не по времени полной его остановки или связывания со сформировавшимся фибриновым сгустком. Эта особенность является существенным преимуществом вискозиметрической системы детекции перед базовым механическим методом, так как позволяет с высокой чувствительностью определять «слабые» сгустки, формирующиеся при патологических состояниях, в том числе при выраженной гипофибриногемии.

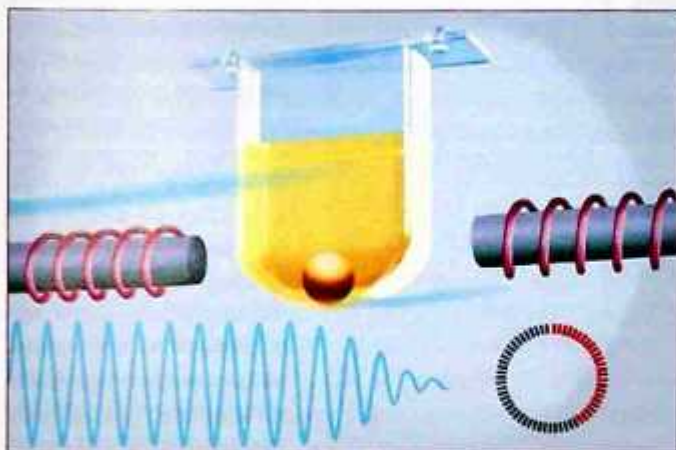


Рис. 4.20. Вискозиметрическая система детекции сгустка. Две электромагнитные катушки попеременно воздействуют на стальной шарик, вызывая его маятникообразные колебания. Регистрация образования сгустка происходит по увеличению вязкости реакционной смеси в процессе свертывания и прогрессирующему снижению амплитуды колебаний шарика

Основным преимуществом механических систем детекции перед оптически-ми и оптико-механическими является нечувствительность механических систем детекции к интерференции, вызванной наличием в исследуемой плазме высоких концентраций липидов, билирубина и/или гемоглобина (липемичных, иктеричных и/или гемолизированных образцов). Данный факт подтверждается, в том числе, рекомендациями CLSI, указывающих на необходимость использования механического или электромеханического метода детекции при исследовании иктеричных, липемичных образцов плазмы или образцов плазмы, содержащих вещества, которые могут вызвать интерференцию при использовании оптических систем детекции.

Оптико-механические коагулометры

Принцип работы оптико-механического коагулометра представлен на рис. 4.21. За счет использования следящей схемы регистрируется изменение подаваемого на

лампу напряжения, чтобы обеспечивался заданный световой поток, проходящий через кювету с образцом. В этом случае резко уменьшается влияние исходной плотности плазмы, ее иктеричности и липемичности, возможно исследовать свертывание плазмы с тромбоцитами. Коагулометры этого класса характеризуются способностью регистрировать выпадающие хлопья фибрина даже без формирования плотного сгустка, что бывает при приеме пациентами антикоагулянтов, а также в случаях коагулопатий.

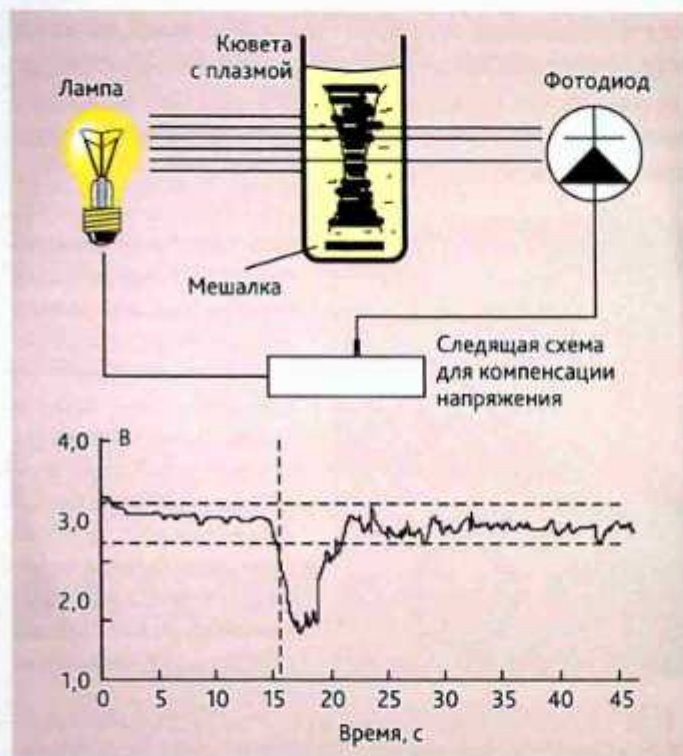


Рис. 4.21. Принцип регистрации выпадающего фибрина опто-механическим коагулометром. Выпавшие в кювете нити фибрина меняют световой поток, падающий на фотодиод. Фотодиод связан через следящую схему компенсации с напряжением на лампе. В результате на лампу подается такое напряжение, которое меняет яркость свечения лампы, чтобы световой поток, падающий на светодиод, поддерживался в заданном диапазоне. По изменению напряжения на лампе регистрируется начало выпадения фибринового сгустка

Турбидиметрические и нефелометрические коагулометры

Коагулометры регистрируют момент свертывания крови по резкому изменению светопропускания (турбидиметрические) или рассеивания (нефелометрические). В некоторых коагулометрах программируется, при каком приросте оптической плотности по отношению к исходному уровню (ΔA) регистрируется момент свертывания. Время от внесения в оптическую кювету индуктора свертывания до момента достижения заданного ΔA определяется как время свертывания плазмы в исследуемом тесте. Турбидиметрический принцип используется при определении показателей свертывания плазмы на многофункциональных фотометрах и биохимических анализаторах. Фотометрический канал при этом программируется по методу «время достижения фиксированной величины абсорбции».

Нефелометрические коагулометры определяют момент образования сгустка по изменению рассеяния света, в частности, используется принцип определения сгустка по боковому рассеиванию.

Автоматизированные системы исследования гемостаза

В настоящее время на лабораторном рынке предлагается широкий ассортимент автоматизированных систем для исследования гемостаза разной производительности. Эти системы предусматривают несколько методов, включая клоттинговый (выпадение сгустка), турбидиметрический, или нефелометрический, метод с использованием хромогенных субстратов, иммунологический. Широкое меню анализаторов гемостаза позволяет проводить любые необходимые для лаборатории исследования. Сканирование волнами различной частоты и различные технологии исследования жидкости в образцах позволяют обнаружить нежелательные примеси, интерферирующие компоненты: гемолиз, иктеричность, липемию. Проверка уровня образца в первичной пробирке помогает выявить потенциальные неточности, вызванные ошибками при отборе образца, которые могут повлечь за собой вычисление неверного соотношения антикоагулянта к плазме пациента. В качестве примера приведем линию автоматических анализаторов компании Stago: STA Satellite, STA Compact Max, STA R Max (рис. 4.22), оснащенных вискозиметрической системой детекции и возможностью использования прекалиброванных методик (калибровка реагентов для определения ПВ, фибриногена, D-димера и свободного протеина S уже выполнена на производстве и вводится в анализатор путем считывания штрихкода), что позволяет сократить расходы на выполнение тестов, стандартизовать проведение исследований (так как используется единая калибровочная кривая) и удовлетворить потребности лабораторий любой производительности.



Рис. 4.22. Автоматизированный анализатор гемостаза STA R Max – выполняет клоттинговые (оснащен вискозиметрической системой детекции), хромогенные, иммунологические методики, предназначен для крупных лабораторий с потоком исследований гемостаза более 100 образцов в день

«ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ»

в исследовании гемостаза. Уверенность в результате.

STAGO: поколение Max

- Новый автоматический высокоскоростной анализатор гемостаза.
- Идеальное решение для централизованных и специализированных лабораторий (более 100 пробирок в день)
- Экономичность исследований: определение ПВ, фибриногена, D-димера и свободного протеина S не требует выполнения калибровки.
- Программное обеспечение на русском языке

STA R Max



STA Compact Max



- Новый автоматический высокопроизводительный анализатор гемостаза
- Идеальное решение для крупных, средних, специализированных и экспресс-лабораторий (50-100 пробирок в день)
- Экономичность исследований: определение ПВ, фибриногена, D-димера и свободного протеина S не требует выполнения калибровки
- Программное обеспечение на русском языке

- Новый полуавтоматический анализатор гемостаза.
- Самый маленький анализатор в линии STAGO, простой и удобный в работе, выполняет все существующие клоттинговые тесты.
- Предназначен для лабораторий небольшой производительности (менее 50 образцов в день), выполняющих рутинные и специальные тесты для исследования системы гемостаза
- Программное обеспечение на русском языке

STartMax



Узнайте больше на www.hemostatica.ru


Stago
В самом сердце гемостаза

ГЕМОСТАТИКА

Россия, 125167, Москва,
ул. Векторная, д. 4, корп. 1
Тел.: 8 800 770 01 02
e-mail: info@hemostatica.ru
www.hemostatica.ru

Следует подчеркнуть, что технические возможности современных анализаторов гемостаза зачастую значительно превышают диагностическую востребованность как клиницистов, так и сотрудников лаборатории. Поэтому часто multifunctional приборы используются по минимальному перечню тестов, что, как правило, объясняется финансовыми трудностями, но может быть обусловлено недостаточной грамотностью и подготовленностью медицинского персонала.

Методы оценки состояния компонентов гемостаза

Для оценки плазменного гемостаза, включая исследование свертывания, фибринолиза и антикоагулянтов, в современных анализаторах гемостаза используются клоттинговые, амидолитические, иммунохимические методы.

Клоттинговые методы

Клоттинговые (от англ. clot – сгусток), или коагуляционные, методы – самые используемые методы при диагностике свертывающей системы крови. Клоттинговые методы основаны на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания плазмы, до момента образования сгустка (выпадения фибрина). Методы позволяют регистрировать время образования фибринового сгустка в зависимости от присутствия в реакционной пробе тех или иных активаторов или ингибиторов, добавляемых при проведении исследования. Клоттинговые методы наиболее распространены, поскольку характеризуются простотой и легкостью выполнения, определенной стандартистностью, коротким временем выполнения, доступностью специализированных наборов реагентов, низкими затратами на исследование, моделированием физиологических механизмов образования тромба. Основные клоттинговые тесты – протромбиновый тест, концентрация фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время – являются скрининговыми. Однако на их основе сконструированы тесты расширенного исследования: активность факторов II, V, VII, VIII, IX, X, активность антитромбина, активность системы протеина C. Клоттинговые методы позволяют оценивать активность отдельных звеньев или путей плазменного гемостаза, определение отдельных факторов свертывающей системы, волчаночного антикоагулянта, контролировать эффективность лечебного действия прямых и непрямых антикоагулянтов и другие тесты. Принципиальными недостатками клоттинговых методов являются:

- ограничение спектра тестов (возможно исследовать ограниченное число тестов);
- низкая стойкость реактивов (максимальный срок использования большинства реактивов ограничивается 4 часами);
- высокая чувствительность к воздействию различных факторов, таких как лекарства, сопутствующие нарушения гемостаза и др.;

- низкая точность при исследовании низкой активности факторов свертывания крови (что принципиально при оценке, в частности, тяжести гемофилии);
- при применении одностадийного клоттингового метода в ряде случаев не удается диагностировать легкую форму гемофилии А.

Наиболее частые и распространенные технические ошибки, возникающие при выполнении клоттинговых методов:

- неправильное взятие проб крови, при котором уже произошла активация процесса свертывания;
- неправильное соотношение объемов крови и антикоагулянта;
- неправильный выбор антикоагулянта;
- попадание в пробу гепарина;
- неправильная температура термостатирования;
- отказ от использования стандартизованных вакуумных систем забора крови, использование несиликонизированной стеклянной посуды или многократное использование пластиковой одноразовой посуды (активация свертывания);
- использование для мытья посуды детергентов, влияющих на свертывание плазмы.

Амидолитические методы с использованием хромогенных и флуорогенных субстратов

Принцип тестов с хромогенными субстратами представлен на рис. 1.9. Протеаза (фактор системы свертывания) расщепляет короткоцепочечный пептид (из 3–10 аминокислот), к которому через эфирную связь пришит хромоген, например пара-нитроанилин – pNA. Комплекс пептид-pNA имеет максимум поглощения в области короткого ультрафиолета, свободный pNA – при 380 нм. Об активности протеазы судят по скорости нарастания концентрации pNA, которая измеряется по увеличению поглощения светового пучка на длине волны 405 нм.

В амидолитических методах (также в методах клинической биохимии) используют прямые и сопряженные (многостадийные) реакции. В качестве примера приведем методы определения фактора X (прямое определение, рис. 4.23) и фактора VIII (сопряженные реакции, рис. 4.24).

Для оценки активности факторов гемостаза в анализаторах часто используются флуорогенные субстраты, в частности 7-амино-4-метилкумарин (АМК),

Активация	ф.Х $\xrightarrow{\text{яд гадюки Рассела}}$ ф.Ха
Измерение	ф.Ха + хромогенный субстрат $\longrightarrow$ pNA

Рис. 4.23. Принцип определения содержания фактора X с использованием хромогенного субстрата. pNA – паранитроанилин. Измерение проводится при длине волны 405 нм фотометрическим методом. В тесте используют фермент яда гадюки Рассела, активирующий ф.Х



Рис. 4.24. Принцип определения содержания фактора VIII в сопряженных реакциях с использованием хромогенного субстрата. ФЛ – фосфолипиды. Определение основано на том, что количество образующегося ф. Xa в реакциях активации пропорционально содержанию ф. VIII в пробе

который имеет максимум эмиссии при 440 нм. Флуорогенные субстраты обладают большей аналитической чувствительностью и позволяют измерить специфическую активность компонентов гемостаза в большем диапазоне, чем хромогенные субстраты. Они могут использоваться для определения компонентов гемостаза, присутствующих в плазме в следовых концентрациях или обладающих относительно низкой активностью.

Преимущества использования хромогенных и флуорогенных субстратов:

- высокая чувствительность метода – рNA или АМК обладают фотометрическими характеристиками, позволяющими использовать кинетические методы измерения;
- высокая специфичность – для каждой отдельной сериновой протеазы системы гемостаза известна структура участка гидролиза; моделирование в короткоцепочечном пептиде специфической для конкретной протеазы последовательности из нескольких аминокислот позволяет исключить влияние других протеаз на результаты исследования;
- при синтезе хромогенных субстратов для повышения специфичности используются L- или D-стереоизомеры аминокислот, а также различные блокирующие группировки, чтобы предупредить деградацию их неспецифическими аминопептидазами;
- в тестах используется концентрация хромогенных субстратов в несколько сотен мкмоль/л, что существенно выше, чем константа Михаэлиса (K_M) соответствующих ферментов, поэтому скорость реакции не зависит от концентрации субстратов.

Факторы, которые необходимо учитывать при использовании хромогенных субстратов в практической клинико-диагностической лаборатории:

- амидолитические методы определяют активность факторов свертывания, а не их количество, что в некоторых случаях более значимо, чем измерение массы;
- при сопоставлении результатов клоттингового и амидолитического методов предпочтительными являются результаты клоттингового исследования, как более физиологического;

- реакция должна быстро достигать линейности, чтобы использовать соответствующий набор на биохимических анализаторах, в которых часто бывает ограниченным время проведения измерения;
- в пробе не должно быть мутности, которую часто привносит фибрин или денатурированные белки.

Недостатки метода с использованием хромогенных субстратов:

- высокая стоимость реактивов;
- возможное завышение результатов при исследовании активности витамин-К-зависимых факторов у лиц, получающих непрямые антикоагулянты, либо имеющих дефицит витамина К;
- отсутствие субстратов для определения всех факторов свертывания; выполнение таких исследований ручными методами без соответствующего оборудования невозможно.

Наиболее распространенными тестами с применением хромогенных субстратов являются определение активности антитромбина, плазминогена, протейна C, активности гепарина. Существуют диагностические наборы для определения ингибитора активатора плазминогена, ингибитора плазмина, растворимого фибрина, фактора X, фактора XIIIa, хемотрипсина, гранулоцитарной эластазы, активности ингибитора калликреина, калликреина плазмы и его активатора, трипсина, урокиназы.

Иммунохимические методы

Иммунохимические методы позволяют количественно определять концентрацию конкретного белка, что отличает их от коагуляционных методов и методов с хромогенными субстратами, в которых определяется функциональная активность компонентов, а не их концентрация. Первые тест-системы не позволяли различить активные и неактивные (профакторы) компоненты системы гемостаза. В последнее время предлагается все больше тест-систем для определения концентрации активных компонентов свертывания, их кофакторов, активаторов, ингибиторов, продуктов протеолитического гидролиза, а также сформировавшихся субстрат-ферментных комплексов. Эти тесты основаны на использовании специфических антител. Для улучшения аналитических характеристик применяются иммунохимические методы для ручного и автоматизированного использования, основанные на латекс-агглютинации (рис. 4.25). Метод твердофазного анализа ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), как правило, используют в варианте «сэндвич» (рис. 4.26). Методы позволяют оценить содержание факторов количественно в концентрации < 1 нг/мл, что достаточно для многих компонентов свертывающей системы.

В настоящее время значительное развитие получают быстрые качественные и полуколичественные иммунохимические иммунодиффузионные методы, основанные на визуальном определении реакции антиген-антитело.

При фундаментальном подходе к исследованиям компонентов гемостаза применение флуоресцентной или люминесцентной меток повышает чувствительность иммунохимических методов и расширяет спектр определяемых компонентов гемостаза.

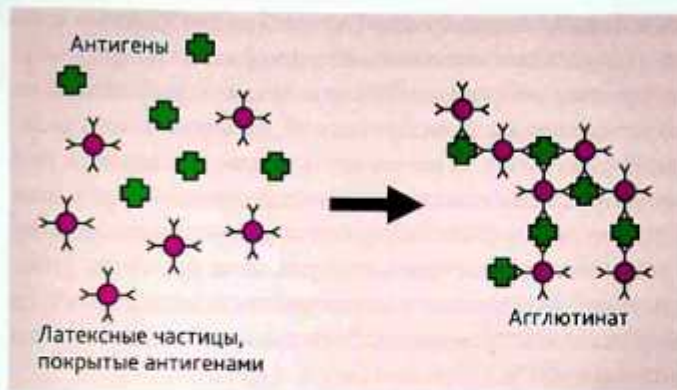


Рис. 4.25. Принцип латекс-агглютинации. Латексные частицы, покрытые антителами против фактора гемостаза, при взаимодействии с этим фактором (антигеном) образуют агрегаты, видимые визуально или регистрируемые на соответствующих приборах



Рис. 4.26. Принцип ELISA. На плашке, покрытой антителами против фактора гемостаза, связывается антиген. Проявляющие антитела, конъюгированные с ферментом, связываются с антигеном

Молекулярно-биологические методы

Проточная цитометрия

Проточная цитометрия является высокоинформативным методом, сочетающим иммунохимические технологии с исследованием клеточных популяций. Метод позволяет охарактеризовать клеточные популяции, их размеры, стадию дифференцировки. Этим методом определяют наличие или отсутствие на клеточной поверхности специфических рецепторов или продуктов клеточной активации, субпопуляции тромбоцитов и даже циркулирующие эндотелиальные клетки. Метод возможен при наличии проточного цитометра и специфических реактивов, в первую очередь моноклональных антител. Основным достоинством этой технологии является возможность разделить клеточные популяции на активированные и неактивные. С помощью проточной цитометрии регистрируются изменения экспрессии Р-селектина, гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa на поверхности активированных тромбоцитов, а также определяются тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты. Для данного исследования используется небольшой по объему образец цельной крови.

Технология поточной цитометрии требует высококвалифицированного персонала, подготовленного в области проточной цитометрии и гемостазиологии. Тем не менее задачи, решаемые данным методом, приносят значительный, часто решающий эффект при лечении пациентов.

Высокая стоимость исследований вполне компенсируется долгосрочным клиническим эффектом – предупреждением осложнений и сохранением результатов еще более затратной хирургической (эндоваскулярной) помощи. Расходы на выполнение данной методики связаны с приобретением дорогого оборудования – проточного цитометра. В том случае, если в медицинском учреждении уже существует данный прибор, который используется для задач фенотипирования клеток (например, в гематологии), внедрение дополнительного метода – оценки активности тромбоцитов – не несет существенных затрат. В этом случае стоимость анализа не отличается существенно от исследований на агрегометрах или от использования тестирования по месту лечения. Затраты необходимы только на закупку соответствующих антител.

На основе проточной цитометрии может быть выполнено два вида исследований.

1. Технология VASP основана на том, что вазодилатация обеспечивается через внутриклеточный белок – стимулируемый вазодилатором фосфопротеин (VASP – vasodilator-stimulated phosphoprotein), регулирующий актин. Его фосфорилирование происходит под действием вазодилаторных простагландинов (рис. 4.27). Известно, что на VASP влияет и рецептор к АДФ (P2Y₁₂), при стимуляции которого фосфорилирование уменьша-

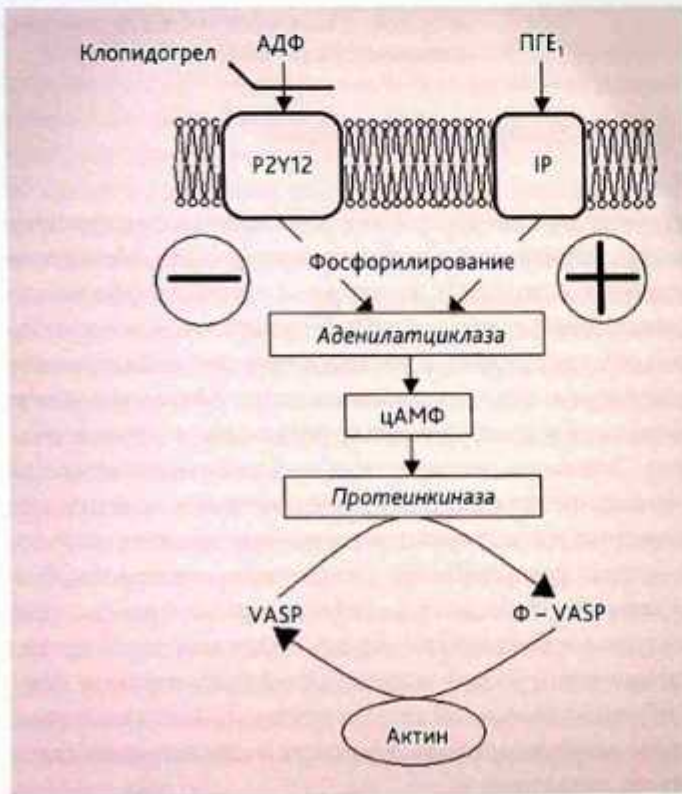


Рис. 4.27. Регуляция фосфорилирования VASP. После фосфорилирования VASP через актин возникает расслабление (дилатация) сосудистой стенки. Этот эффект возникает и в тромбоцитах. Внеклеточным вазодилатором является простагландин E (ПГЕ₁), который через рецептор (IP) стимулирует аденилатциклазу, синтезирующую циклическую АМФ (цАМФ), и соответственно, фосфорилирование VASP. В то же время АДФ через свой рецептор P2Y₁₂ угнетает аденилатциклазу, что сопровождается дефосфорилированием VASP и констрикцией. Клопидогрел является блокатором рецептора P2Y₁₂ и используется как вазодилатор

ется, происходит дефосфорилирование. Блокада P2Y₁₂ клопидогрелом приводит к фосфорилированию VASP, и соответственно, к вазодилатации. Фосфорилирование VASP может быть измерено количественно проточной цитометрией. Для этого используются тромбоциты – как объект, отражающий реакцию на лечение клопидогрелом. Мониторирование VASP позволяет снизить количество неблагоприятных исходов стентирования коронарных артерий у больных, получающих клопидогрел, путем оптимизации дозы препарата или его замены (Bonello L. et al., 2009).

2. Измерение количества тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин на своей поверхности (как маркер активации), и количества активированных рецепторов к фибриногену GP IIb/IIIa на поверхности каждой клетки. Технология использует проточный цитометр, запатентована отечественными учеными (Сироткина О.В. и соавт., 2012. Патент на изобретение № 2442167) и апробирована для клинико-лабораторной оценки эффективности антиагрегантной терапии у больных ишемической болезнью сердца.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР используется при исследовании наследственных нарушений свертывания крови. Обширные молекулярно-генетические исследования проводятся при диагностике гемофилии А и В, а также болезни Виллебранда. ПЦР используется для выявления наследственной тромбофилии – мутаций фактора V Лейден, мутаций G20210A в гене протромбина, а также полиморфизма иных генов для определения предрасположенности к разным формам нарушения свертывания крови: генов фактора VII (полиморфизм – Arg353Gln), фактора XIII, интегрина бета-3 (тромбоцитарный рецептор фибриногена), тромбоцитарного гликопротеина Ib (α -субъединицы, ген GPIBA, полиморфизм – Thr145Met), АДФ-рецептора тромбоцитов (ген P2RY12, полиморфизм H1/H2), ингибитора активатора плазминогена (ген PAI-1, полиморфизм –675 5G/4G) и в других случаях. В научных целях были проведены исследования генов антипротромбина, протеинов С и S у лиц с их дефицитом. Количество вариантов молекулярных дефектов оказалось так велико, что в практической работе генетическое типирование не проводится, значение имеет только функциональная недостаточность этих естественных антикоагулянтов.

Определение нуклеотидной последовательности соответствующих генетических локусов методом пиросеквенирования проводится для наиболее значимых наследственных дефектов в системе гемостаза, приводящих к тромбозам и эмболиям. Это мутации в генах, кодирующих ф. V (Лейденовская мутация) и протромбин (20210 G > A). Наличие одновременно двух мутаций повышает риск тромбоза почти в 100 раз. Носительство данных мутаций увеличивает вероятность развития гестоза, фетоплацентарной недостаточности, отставания развития плода, мертворождения. Существуют данные о повышении частоты встречаемости этих мутаций у женщин с привычными выкидышами, особен-

но во II и III триместрах беременности. Мутации достоверно ассоциированы с ранним и поздним привычным невынашиванием. Триггерным фактором тромбоэмболических осложнений у носителей мутаций факторов V и II является прием эстрогенов.

Обеспечение качества лабораторной оценки системы гемостаза

Обеспечение качества в коагулологии является центральным элементом эффективности диагностических исследований. Помимо непосредственного контроля за самой аналитической процедурой необходимо стандартизовать и контролировать взятие и подготовку образцов на преаналитическом этапе. Оценка полученных данных должна проводиться с учетом состояния пациента, используемых им лекарственных препаратов, особенностей пробоподготовки, методики выполнения анализа, используемых инструментов и реактивов. О высокой степени качества и диагностической эффективности лабораторных исследований можно говорить лишь тогда, когда под контролем находится весь процесс — от назначения исследования и взятия биологического материала до получения достоверного результата и его интерпретации в совокупности с клиническими данными. Решающим фактором правильности выполнения исследования является проведение всеобъемлющего внутрилабораторного контроля качества всех выполняемых тестов. Оптимальная система контроля предполагает проведение оценки качества лабораторных исследований на внутрилабораторном, федеральном и международном уровнях. Принципиальным положением в исследовании гемостаза является стандартизация.

Стандартизация коагулологических исследований

Стандартизация рассматривается как спектр приемов исследования гемостаза, обеспечивающий воспроизводимые в разных лабораториях результаты за счет применения разовых систем взятия крови, аттестованных методов, реактивов, приборной базы, международных стандартов при калибровке, проведения внутрилабораторного контроля качества, участия во внешней оценке качества и др. Наиболее ярким примером такого подхода является переход от определения нестандартизованного протромбинового теста к определению международного нормализованного отношения (МНО) при использовании аттестованного по международным стандартам тромбопластина.

Общие требования к стандартизации в КДЛ

Качество диагностического анализа по коагулологическим показателям должно соответствовать общим требованиям к стандартизации клиничко-лабораторных исследований, разработанным Международной организацией стандартизации (ISO), Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), приказами МЗ РФ.

На территории России действуют национальные стандарты под характерным обозначением – ГОСТ Р ИСО (или номер). Интерпретировать эту аббревиатуру нужно следующим образом: «ГОСТ» – государственный стандарт; «Р» – действует на территории России; «ИСО» – согласован (сделан авторизованный перевод) Международного стандарта (ISO) соответствующего номера. Для клинико-диагностических исследований разработана и введена в действие целая серия национальных стандартов, основные из которых представлены в табл. 4.5.

Таблица 4.5. Национальные стандарты Российской Федерации для лабораторной медицины и медицинских изделий для диагностики *in vitro*

№ пп	Обозначение и наименование национального стандарта
1	ГОСТ Р ИСО 15189-2009. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности
2	ГОСТ Р ИСО 15195-2006. Лабораторная медицина. Требования к лабораториям референтных измерений
3	ГОСТ Р ИСО 17511-2006. Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам
4	ГОСТ Р ИСО 18153-2006. Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений каталитической концентрации ферментов, приписанных калибраторам и контрольным материалам
5	ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003). Лаборатории медицинские. Требования безопасности
6	ГОСТ Р ИСО 15194-2007. Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Измерение величин в пробах биологического происхождения. Описание стандартных образцов
7	ГОСТ Р ИСО 15193-2007. Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Измерение величин в пробах биологического происхождения. Описание референтных методик выполнения измерений
8	ГОСТ Р 53022.1-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 1. Правила менеджмента качества клинических лабораторных исследований
9	ГОСТ Р 53022.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования
10	ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.
11	ГОСТ Р 53022.4-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований». Часть 4. Правила разработки требований к своевременности предоставления лабораторной информации

№ пп	Обозначение и наименование национального стандарта
12	ГОСТ Р 53079.1-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Описание методов исследования
13	ГОСТ Р 53079.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Руководство по качеству исследований в клинико-диагностической лаборатории. Типовая модель
14	ГОСТ Р 53079.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила взаимодействия персонала клинических подразделений и клинико-диагностических лабораторий медицинских организаций при выполнении клинических лабораторных исследований
15	ГОСТ Р 53079.4-2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа
16	ГОСТ Р 53133.1-2008. Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях
17	ГОСТ Р 53133.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов
18	ГОСТ Р 53133.3-2008. Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 3. Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований
19	ГОСТ Р 53133.4-2008. Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила проведения клинического аудита эффективности лабораторного обеспечения деятельности медицинских организаций
20	ГОСТ Р ИСО 6710-2009. Контейнеры для сбора образцов венозной крови одноразовые. Технические требования и методы испытаний
21	ГОСТ Р ИСО 22870-2009. Исследования по месту лечения. Требования к качеству и компетентности
22	ГОСТ Р ИСО 17593-2009. Исследования лабораторные клинические и изделия медицинские <i>in vitro</i> . Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> , применяемые для самотестирования пероральной терапии антикоагулянтами

За счет автоматизации, введения многофункциональных анализаторов, системы регистрации реагентов после технических и клинических испытаний, фактического запрета работы с «собственной» реагентной базой, введения системы внутрилабораторного контроля качества, подготовки лабораторных специа-

листов удалось практически повсеместно свести до минимума аналитические ошибки. Основные погрешности при лабораторных исследованиях, в том числе и при коагулологических, происходят на долабораторном преаналитическом этапе.

Сложность организации преаналитической стадии во многом обусловлена тем, что здесь преобладает ручной труд, и тем, что многочисленный персонал, обслуживающий пациента на этом этапе, имеет разное подчинение и разный уровень квалификации. Если курьеры, санитарки, медицинские сестры (палатные и процедурные), лечащие врачи работают вне лаборатории, то регистраторы, лаборанты, технологи, специалисты клинической лабораторной диагностики обслуживают внутрилабораторный преаналитический этап. Так как значительная часть преаналитического этапа проходит вне лаборатории, то один из самых эффективных способов устранения ошибок – хороший контакт и совместная работа с клиническим персоналом, т. е. работа в команде. Единого стандарта по проведению преаналитической фазы нет, и видимо, быть не может. Слишком велика специфика отдельных медицинских организаций, и соответственно, медицинских лабораторий, их обслуживающих. Есть серьезные различия в организации работы централизованной лаборатории и лаборатории, обслуживающей стационар.

Опираясь на признанные национальные и международные стандарты и рекомендации, каждой медицинской организации начинать стандартизацию этого этапа надо с описания конкретных процессов (например, доставка проб в лабораторию; взятие крови из вены; формирование заявки на лабораторное исследование). В дальнейшем, компоная отдельные документы, легко сформировать инструкцию по качеству проведения этой стадии лабораторного исследования. В свою очередь, этот внутренний стандарт будет основой и для обеспечения качества и для контроля качества проведения преаналитической стадии во время внутренних и внешних проверок лаборатории.

В России общие требования к условиям и процедурам преаналитического этапа установлены положениями ГОСТ Р 53079.4-2008. Национальный стандарт РФ. «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». В стандарте устанавливается общее требование к величине максимально допускаемого уровня нестабильности содержания аналитов в биопробах, однако приведенные в этом стандарте данные не содержат конкретной информации об ожидаемых величинах нестабильности содержания аналитов в пробах в зависимости от разных условий их хранения и транспортировки. Поэтому этот стандарт сложно использовать в условиях централизации лабораторных исследований, которая, в частности, подразумевает увеличение времени транспортировки биологических проб от места взятия до основной лаборатории.

**Стандартные операционные процедуры
как элемент обеспечения качества лабораторного исследования**

Наличие стандартных операционных процедур (СОП) – один из показателей высокого уровня организации внутренних процессов в лаборатории. СОП – это не инструкция производителя. Так, для методов исследования – это документированные процедуры, в которых как минимум прописаны: ответственные и допущенные к работе сотрудники, сокращения и нумерация анализа в информационной системе и приборах, метод исследования, референтные значения, единицы измерения и коэффициенты пересчета, материал для исследования, минимальное количество образца, требования к преаналитике (правила подготовки, сбора биоматериала, транспортировки в лабораторию), частота проведения внутреннего и внешнего контроля и внешней оценки качества, подготовка пробы перед исследованием, используемые реагенты с каталожными номерами для их заказа, контактные данные поставщика, выполнение методики, влияющие и повреждающие факторы, медицинская обоснованность исследования, требования к входным демографическим данным, критерии валидации полученных результатов, обработка данных и необходимая для заполнения документация (формы), хранение проб после исследования, а также рекомендации, в каких случаях возможно выполнение метода на другом приборе. Близкие по перечисленным параметрам анализы могут быть описаны в одном СОП.

Существуют свои СОП и для приборов, которые как минимум включают: название, тип прибора, производителя, серийный номер, средства контроля, место нахождения прибора, год производства, дату поставки, данные о протоколе ввода прибора в эксплуатацию и обучения работы на нем сотрудников, данные сервисной службы, договоры технического обслуживания, ответственных сотрудников, принцип и диапазон измерений, точность, калибровку и порядок работы, обслуживания прибора, необходимые для заполнения документы (формы). Если какой-либо процесс необходимо описать в виде инструкции, то создают СОП – рабочую инструкцию. Общелабораторные процессы описывают в стандартных общелабораторных процессах (тоже СОП).

Задачи, решаемые при создании СОП в лаборатории:

- жесткая регламентация по выполнению, оценке и мониторингу всех рабочих процедур для конкретного вида исследования или по группе исследований;
- четкое распределение ответственности и полномочий между персоналом;
- обоснование процедур верификации и, если требуется, валидации методик;
- определение стратегии внутрилабораторного контроля и выбор системы внешней оценки качества;
- определение требований к качеству.

Применение в лаборатории СОП может стать гарантией четкой работы, логической последовательности действий, повышения качества выполняемых процедур и одним из действенных элементов системы управления качеством.

Требования к направлениям на гемостазиологическое исследование

В направлении лечащего врача должны быть указаны следующие позиции:

1. Ф. И. О. пациента, № истории болезни, пол, возраст.
2. Краткий диагноз с указанием гемостазиологических нарушений (кровоточивость, желательно с указанием типа, тромбозы).
3. Используемые препараты, особенно направленные на изменение состояния свертывания крови (антикоагулянты, фибринолитики, антиагреганты), и протокол их применения.
4. Время и место взятия пробы для анализа.

Физиологический статус пациента

У новорожденных содержание витамин-К-зависимых факторов свертывания крови существенно снижено и достигает уровня взрослых только к 6-му месяцу жизни. Вследствие дефицита витамина К возникает геморрагическая болезнь новорожденных.

У беременных характерно повышение факторов VIII, Виллебранда, фибриногена, снижение числа тромбоцитов. На уровень фактора Виллебранда оказывает влияние группа крови – он снижен примерно на 25% у лиц с нулевой группой.

При наличии у пациента криоглобулинов при охлаждении крови в условиях *in vitro* даже при комнатной температуре может начаться агрегация тромбоцитов.

Существенные изменения показателей гемостаза возникают, если кровь брали в стрессовом состоянии пациента, например у ребенка или подростка.

Курение, прием пищи, алкоголя, физическая нагрузка могут влиять на показатели гемостаза, поэтому пациента необходимо проинструктировать об этих ограничениях. Перед взятием крови желательно спокойно посидеть по крайней мере в течение 15–20 мин.

Прием внутрь антибиотиков, синдром мальабсорбции вызывают дефицит витамина К, удлиняют протромбиновое время; овощной рацион, обогащенный витамином К, может осложнить подбор дозы антивитамина К препаратов.

Калибраторы и контрольные материалы

Любое измерение требует эталона, с которым сопоставляются результаты. Спецификой многих гемостазиологических тестов является комплексный характер исследования, когда оценивается не отдельный компонент, а моделируется процесс свертывания крови *in vitro*. Так измеряются такие тесты, как протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время. Изготовить калибраторы в таких случаях сложно и дорого.

Пулированная плазма

Традиционным решением в гемостазиологии является использование пулированной плазмы (пул-плазма) в качестве эталонного образца (образца сравне-

ния). Это основано на представлении о том, что факторы свертывания в норме (у здоровых пациентов) присутствуют в значительном избытке по отношению к количеству, при котором от их содержания будет зависеть скорость процесса активации системы свертывания и выпадения фибрина (см. рис. 1.23). В случае использования не менее 5 (желательно более 20) плазм здоровых доноров в пулированной плазме обеспечивается достаточное количество факторов. Таким образом, пул-плазма является смешанной плазмой значительного количества здоровых доноров (в импортных пулах смешивается плазма десятков и сотен здоровых доноров), активность практически всех факторов гемостаза в которой становится средней для данной популяции и принимается за 100%, или 1 Ед/мл.

Тем не менее возможны колебания активности различных факторов в пул-плазмах, собранных в разных регионах. Это связано с несколькими аспектами:

- имеются генетически детерминированные особенности активности различных факторов в данной популяции людей;
- при использовании пула плазмы, набранной от ограниченного количества доноров (20 и менее), однонаправленные изменения активности фактора у нескольких из них могут влиять на результирующую активность фактора в пуле.

Эти аспекты обуславливают необходимость федерального и международного контроля активности различных факторов в пуле. Приготовление пулированной плазмы для коагулологической диагностики требует соблюдения некоторых условий:

- необходимо собрать плазму от достаточного количества доноров в течение ограниченного времени;
- пул-плазму необходимо тщательно перемешать для обеспечения однородности;
- рационально хранить ее небольшими порциями;
- температура хранения должна быть не выше – 40 °С.

Все это часто делает невозможным приготовление пул-плазмы в КДЛ. Однако у приготовленной на месте плазмы есть одно преимущество – активность факторов в ней соответствует средней для популяции, проживающей в данном регионе.

Коммерческие контрольные плазмы и калибраторы

Коммерческие контрольные плазмы являются альтернативой пул-плазме. Они изготавливаются на биологической матрице (лучше из плазмы человека) путем добавления определенных количеств факторов от тестированных доноров. Такие плазмы, как правило, проходят строгий международный контроль. Производятся не только нормальные контрольные плазмы (рис. 4.28), но и плазмы, дефицитные по отдельным факторам, а также плазмы с патологическим уровнем содержания компонентов гемостаза.



Рис. 4.28. Коммерческая контрольная плазма предназначена для контроля правильности определения параметров свертывающей, антикоагулянтной, фибринолитической систем. Плазма готовится с нормальным и патологически сниженным уровнем факторов системы гемостаза



Рис. 4.29. Коммерческая референтная плазма – это централизованно приготовленная нормальная плазма, критерии и процедура приготовления которой определены в стандарте DIN58939-1. Используется для построения калибровочной кривой по каждому из аттестованных параметров

Коммерческие референтные плазмы (рис. 4.29) используются для построения калибровочных кривых. Как правило, для построения калибровочной кривой бывает достаточно 4 разведений. При нелинейной калибровке используют 6 разведений калибратора. Оптимальным является использование плазм того же производителя, оборудование которого представлено в лаборатории.

Для контроля качества чаще используют свежеразведенную референтную нормальную пулированную плазму (РНП-плазма), срок годности после разведения лиофилизированного препарата 2–4 ч. Смешанная бедная тромбоцитами плазма от нескольких здоровых лиц (годна в течение 4–6 ч с момента получения) может быть использована для оценки сходимости и воспроизводимости или как вторичный стандарт. Разброс результатов при исследовании одного образца плазмы и использовании реактивов одной серии не должен превышать 10%.

Стандарты ВОЗ

Исходя из того, что люди стали активно перемещаться не только внутри стран, но и между странами, а препараты для коррекции гемостаза необходимо принимать постоянно (искусственные клапаны сердца, сосудистые протезы и замещающие препараты), возникла настоятельная необходимость использования единого международного лабораторного стандарта, хотя бы для контроля препаратов, назначаемых амбулаторно. Таковую функцию взяла на себя Всемирная организация здравоохранения, которая с участием своих экспертов разработала международные стандарты (прописи) для некоторых показателей гемостаза. На основе этих стандартов аттестованным производителям доверено выпускать первичные стандартные образцы, которые закупают компании – производители реагентов. Они готовят вторичные стандартные образцы, которые аттестованы по первичным.

Вторичные стандарты фасуются вместе с выпускаемыми коммерческими наборами реактивов. Таким образом, прослеживается вся цепь до первичного стандарта, и аттестованные наборы реагентов калибруются от единого стандартного образца.

Среди стандартов ВОЗ для системы гемостаза широко известен стандарт тромбопластина, используемый в тесте «протромбиновое время». Фирмами-изготовителями стандартизация по индексу чувствительности (ISI или МИЧ) проводится по первичному международному эталону, которому присвоен МИЧ, равный 1,0. МИЧ вторичного стандарта, который устанавливается компаниями – производителями реактивов, указывается на упаковке реагента и в инструкции к выпускаемому тромбопластину.

В настоящее время существуют международные стандарты, рекомендуемые к использованию: тромбопластина, тромбина, альфа-тромбина, плазмينا; концентратов фактора VIIa, факторов II+IX+X, фактора VIII, фактора IX; международные стандарты для определения активности в плазме факторов VIII и Виллебранда, антитромбина, протеина С и протеина S, плазминогена; международные эталонные препараты нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов.

В то же время отсутствует стандартный контрольный материал ВОЗ для теста АЧТВ, поэтому при определении АЧТВ используют различные реагенты и приборы разной чувствительности.

Внутрилабораторный контроль качества

К тестам на исследование гемостаза предъявляются такие же требования по контролю качества, как и к другим лабораторным исследованиям. Законодательные основы проведения внутрилабораторного контроля качества изложены в ГОСТ Р 53133.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».

Все тесты в лаборатории должны быть обеспечены внутрилабораторным контролем качества, лаборатории должны участвовать в программах межлабораторного контроля качества.

Внутрилабораторный контроль качества в КДЛ – это прежде всего статистический процесс, используемый для наблюдения и оценки аналитического этапа лабораторного исследования. Статистический процесс требует регулярного исследования контрольных материалов и сравнения результатов измерения контрольных материалов с рассчитанными статистическими пределами. При проведении внутрилабораторного контроля контрольные пробы необходимо включать в каждую серию измерений. Исследования на контрольной плазме необходимо проводить ежедневно, обязательно при постановке новой серии с новым реактивом, после профилактики прибора, при введении нового метода или его модификации.

Если проводится лекарственный мониторинг, то желательно использовать контрольные материалы с показателями в терапевтическом диапазоне. При ис-

пользовании автоматических коагулометров часто реактивная база закрыта, в этом случае необходимо использовать контрольные материалы для данной технологии, предоставляемые поставщиками такой продукции.

В случае отсутствия контрольных материалов с установленными показателями для коагулянтных тестов следует применять аликвотированные сливные плазмы, но только для контроля воспроизводимости.

Требования к аналитическому качеству

Требования к аналитическому качеству определяются в ГОСТ Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях» следующими характеристиками.

- Предельно допустимые значения (ПДЗ) смещения (B) и коэффициента аналитической вариации (CV) в установочных сериях из 10 (B_{10} и CV_{10}), и 20 (B_{20} и CV_{20}) последовательных измерений контрольного образца. В табл. 4.6 приведены эти данные для показателей гемостаза, установленные путем экспертной оценки на основе сведений о биологической вариации и данных об аналитической вариации в лабораториях России.
- Биологически обоснованные нормы аналитической точности клинических лабораторных исследований. Данные взяты из международной базы данных и получены, исходя из следующих предположений.
- Целевое значение коэффициента общей аналитической вариации не должно превышать половины коэффициента внутрииндивидуальной вариации:

$$CV < 0,5 CV_I,$$

где CV – целевое значение коэффициента общей аналитической вариации, %; CV_I – коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации, %.

- Требования к целевому значению смещения формулируются в виде неравенства:

$$B < 0,25 \cdot \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2},$$

где B – целевое значение смещения средней арифметической от установленного значения, %; CV_I – коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации, %; CV_G – коэффициент межиндивидуальной биологической вариации, %.

Наиболее уязвимой в отношении внутрилабораторного контроля качества, основанного на использовании контрольных материалов, является оценка функции тромбоцитов. Для этих исследований контрольных материалов не существует и не может быть произведено, поскольку исследуются живые клетки с моделированием динамических биологических процессов *in vitro*.

Таблица 4.6. Биологически обоснованные нормы аналитической точности показателей гемостаза (из ГОСТ Р 53133.1-2008)

Исследуемые аналиты	Биологическая вариация, %		ПДЗ погрешностей, %		Оперативные ПДЗ погрешностей для установочной серии внутрилабораторного контроля качества, %			
	CV _I	CV _G	B	CV	B ₁₀	CV ₁₀	B ₂₀	CV ₂₀
Активированное частичное тромбопластиновое время	2,7	8,6	±2,3	1,4	±3,1	1,9	±2,8	1,7
α ₂ -антиплазмин, концентрация в плазме	6,2	–	±3,5	3,1	±5,4	4,3	±4,8	3,9
α ₁ -антитрипсин, концентрация в сыворотке	5,9	16,3	±4,3	3,0	±6,2	4,0	±5,6	3,7
Антитромбин, концентрация в плазме	5,2	15,3	±4,0	2,6	±5,7	3,6	±5,2	3,3
α ₂ -макроглобулин, концентрация в сыворотке	3,4	18,7	±4,8	1,7	±5,8	2,3	±5,5	2,1
Плазминоген, концентрация в плазме	7,7	–	±4,3	3,9	±6,7	5,3	±6,0	4,8
Протеин С, концентрация в сыворотке	5,8	55,2	±13,9	2,9	±15,7	4,0	±15,1	3,7
Протеин S, концентрация в плазме	5,8	63,2	±15,9	2,9	±17,7	4,0	±17,1	3,7
Протромбиновое время	4,0	6,8	±2,0	2,0	±3,2	2,7	±2,8	2,5
Тромбоциты, подсчет в крови	9,1	21,9	±5,9	4,6	±8,7	6,2	±7,9	5,7
Тромбоциты, распределение	2,8	–	±1,6	1,4	±2,4	1,9	±2,2	1,8
Фактор свертываемости V	3,6	–	±2,0	1,8	±3,1	2,5	±2,8	2,3
Фактор свертываемости VII	6,8	19,4	±5,1	3,4	±7,2	4,7	±6,6	4,3
Фактор свертываемости VIII	4,8	19,1	±4,9	2,4	±6,4	3,3	±6,0	3,0
Фактор свертываемости X	5,9	–	±3,3	3,0	±5,1	4,0	±4,6	3,7
Фибриноген, концентрация в плазме	10,7	15,8	±4,8	5,4	±8,1	7,3	±7,1	6,7

Примечания. ПДЗ – предельно допустимые значения; В – целевое значение смещения (Bias); CV – коэффициент вариации (coefficient variation); CV_I – коэффициент внутрииндивидуальной биологической вариации; CV_G – коэффициент межиндивидуальной биологической вариации; В₁₀ и CV₁₀ – В и CV в установочных сериях из 10 измерений; В₂₀ и CV₂₀ – В и CV в установочных сериях из 20 измерений.

Принятие решений при централизации лабораторных исследований

В России активно внедряется технология централизации лабораторных исследований с передачей проб на исследование, взятых во внешних медицинских организациях или пунктах взятия/сбора проб, в основную лабораторию. Специалистами предложен оригинальный алгоритм принятия решения, подключать или нет конкретную медицинскую организацию или удаленный пункт сбора биоматериалов к централизованному лабораторному обслуживанию. Предложенный подход базируется на представлениях о максимально допускаемых величинах нестабильности содержания аналитов в биопробах пациентов. Национальный стандарт РФ определяет, что максимально допускаемая нестабильность, выраженная в процентном отклонении результата после хранения от исходного уровня, не должна превышать половины размера общей ошибки определения, рассчитываемой из суммы биологической и аналитической вариаций данного аналита. Если максимальное значение нестабильности будет превышено, то в таком случае централизация не имеет смысла. Методика работает на стадии принятия решения и сводится к сравнению результатов внутрилабораторного контроля с использованием коммерческих контролей и проб пациентов в лаборатории медицинской организации и в централизованной лаборатории. Фактически оценивают, насколько серьезно время и условия транспортировки влияют на результаты исследования.

Внешняя оценка качества

Целью участия КДЛ в программах внешней оценки качества (ВОК) является эффективное слежение за состоянием внешних и внутренних постоянных факторов, таких как правильность калибровки, выбранная аналитическая система, качество закупаемых реагентов, соблюдение времени и температуры реакции, точность подачи реагентов и проб. ВОК – проверка результатов лаборатории, осуществляемая периодически внешней организацией, в том числе путем сравнения результатов лаборатории с интервалом результатов других лабораторий, преимущественно с целью оценить их правильность (систематическую погрешность). Любая хорошо организованная система ВОК способствует гармонизации результатов лабораторных исследований, объективно описывает уровень развития лабораторной медицины в стране или регионе и стимулирует ее развитие. Правильно используемые результаты исследований ВОК не только способствуют повышению качества лабораторных исследований, но и совершенствуют организацию внутрилабораторного контроля качества.

В России на федеральном уровне межлабораторный контроль качества показателей гемостаза организован в рамках Федеральной системы внешней оценки качества лабораторных исследований (ФСВОК), осуществляет эту работу Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований. Для КДЛ, занимающихся исследованием гемостаза, предлагаются следующие программы ФСВОК.

Коагулология. Три цикла оценки качества определения 6 показателей: анти-тромбин, АЧТВ, МНО, % протромбин по Квику, тромбиновое время, фибриноген.

Предлагается 3 варианта программы в зависимости от количества контрольной плазмы (3 набора по 2×1, 4×1 или 6×1 мл контрольной плазмы).

Факторы гемостаза. Два цикла оценки качества определения 6 показателей: активность протенинов С и S, плазминоген, факторы VIII, IX и Виллебранда. Предлагается 3 варианта программы в зависимости от количества контрольной плазмы (2 набора по 2×1, 4×1 или 6×1 мл контрольной плазмы)

Волчаночный антикоагулянт. Два цикла оценки качества выявления волчаночного антикоагулянта. Предлагается 2 набора по 4×1 мл контрольной плазмы.

D-димеры. Два цикла оценки качества количественного определения D-димеров. Предлагается 2 набора по 2×1 мл контрольной плазмы.

Количество тромбоцитов и их характеристики контролируются в нескольких программах по гематологическим исследованиям.

Практически во всех международных системах внешней оценки качества лабораторных исследований – EQAS (External Quality Assurance Services), RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme), Labquality и других имеются специальные разделы по контролю качества коагулологических исследований.

Вопросы к главе 4

1. Какие рекомендации следует дать пациенту перед сдачей крови на анализ коагулограммы?
2. Какие требования взятия крови на коагулограмму должна соблюдать процедурная сестра?
3. Каковы показания и условия для взятия капиллярной крови на исследование показателей гемостаза?
4. Каковы современные тенденции в развитии технологий исследования системы гемостаза?
5. Почему не рекомендуется исследовать коагулограмму из плазмы с ЭДТА в качестве антикоагулянта?
6. Почему надо избегать взятия крови на исследование гемостаза из установленного венозного катетера?
7. Почему нельзя пересылать кровь с хладогеном для исследования протромбинового времени?
8. Какие методы используются для оценки функций тромбоцитов?
9. Чем объясняется двухволновой характер агрегатограмм тромбоцитов?
10. В чем заключается принцип оптической и импедансной агрегатометрии?
11. При лечении больных гепарином какой тип коагулометра лучше использовать и по какой причине?
12. Как составляется протокол стандартной операционной процедуры (СОП) при исследовании гемостаза?
13. По какой причине амидолитические тесты не заменяют клоттинговых исследований?

RIQAS – Ваш международный провайдер внешней оценки качества



- Крупнейшая международная система внешней оценки качества - более 45000 участников в 133 странах
- Две программы для внешней оценки коагулологических исследований со стандартным (5) и расширенным (17) перечнем анализов
- 40 программ для внешней оценки качества по другим разделам лабораторной диагностики



Преимущества участия в RIQAS

- Аккредитация по ISO17043 - уверенность в организации и статистическом дизайне системы
- Больше число участников в группах сравнения - надежная оценка результатов
- Контрольный материал наивысшего качества - оценка Ваших результатов, а не качества контрольного материала
- Удобство использования - отправка данных и получение отчетов через веб-интерфейс и по e-mail

- Быстрая обработка данных - возможность оперативного получения отчетов и мониторинга качества работы лаборатории
- Различные виды отчетов - возможность расширенного анализа данных
- Сертификаты участия и сертификаты о достижении целевого уровня качества - подтверждение качества Вашей работы авторитетной международной организацией

Доверьте оценку Вашего качества провайдеру, признанному во всем мире



Эко • мед • с М

официальный представитель Randox в России

ООО "Эко-мед-с М" - официальный представитель Randox в России.
127287, Москва, Петровско-Разумовский пр-д, 29, стр. 2.

Тел.: +7(495)748-43-50 Факс: +7(495)748-43-51. E-mail: info@ecomeds.ru Web: www.ecomeds.ru

14. Что такое первичный и вторичные стандартные образцы для определения международного нормализованного отношения?
15. Чем отличаются калибраторы от контрольных материалов?

Тесты к главе 4

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

04.01. Механизм антикоагулянтного действия цитрата натрия:

- А) ингибирует образование фибрина
- Б) инактивирует факторы V и VIII
- В) обратимо связывает ионы кальция
- Г) необратимо связывает ионы кальция
- Д) активирует взаимодействие тромбин-антитромбин

04.02. Механизм антикоагулянтного действия ЭДТА:

- А) ингибирует образование фибрина
- Б) инактивирует факторы V и VIII
- В) обратимо связывает ионы кальция
- Г) необратимо связывает ионы кальция
- Д) активирует взаимодействие тромбин-антитромбин

04.03. Индуктором агрегации тромбоцитов является:

- А) аспирин
- Б) АМФ
- В) АДФ
- Г) мочевины
- Д) протромбин

04.04. Активатором фибринолиза является:

- А) коллаген
- Б) антитромбин
- В) липопроотеиды
- Г) стрептокиназа
- Д) кининоген

04.05. Богатая тромбоцитами плазма предназначена для исследования:

- А) количества тромбоцитов в крови
- Б) времени свертывания
- В) ретракции кровяного сгустка
- Г) агрегации тромбоцитов
- Д) тромбокрит

04.06. На рис. 4.30 изображена схема устройства анализатора гемостаза, относящегося к группе:

- А) механический коагулометр
- Б) оптический коагулометр
- В) агрегометр
- Г) тромбозластограф
- Д) нефелометр

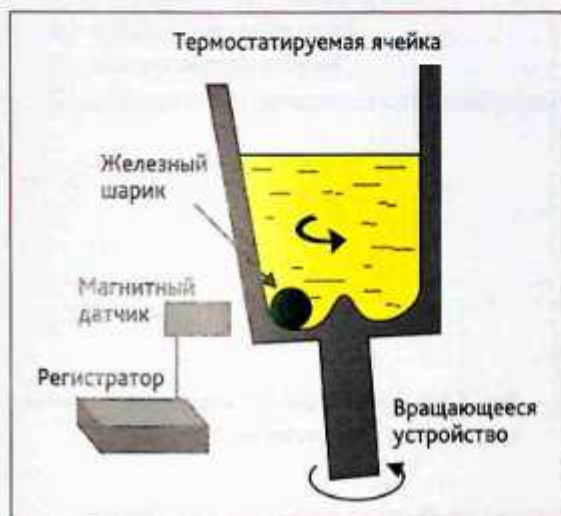


Рис. 4.30. Анализатор гемостаза

04.07. На рис. 4.31 изображена схема устройства анализатора гемостаза, относящегося к группе:

- А) механический коагулометр
- Б) оптико-механический коагулометр
- В) агрегометр
- Г) тромбозластограф
- Д) нефелометр



Рис. 4.31. Анализатор гемостаза со следящей системой свертывания крови

04.08. На рис. 4.32 изображена схема устройства анализатора гемостаза, относящегося к группе:

- А) механический коагулометр
- Б) оптический коагулометр
- В) агрегометр
- Г) тромбозластограф
- Д) нефелометр

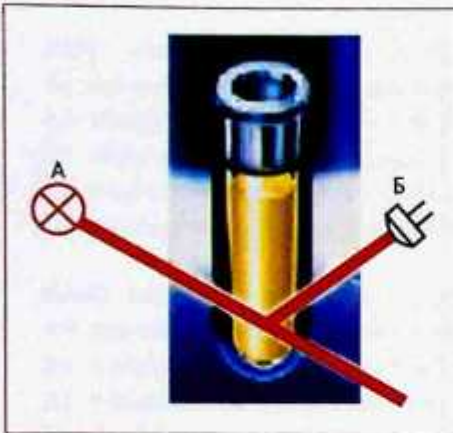


Рис. 4.32. Принцип работы коагулометра: А – источник света; Б – приемник света

04.09. На рис. 4.33 приведены спектры свободной и связанной с белком молекулы паранитроанилина. При каком типе методов исследования гемостаза измеряется абсорбция паранитроанилина?

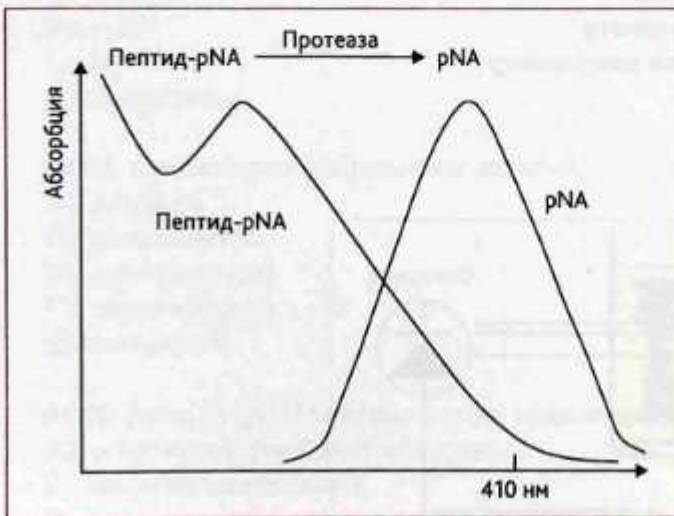


Рис. 4.33. Спектры свободной и связанной с белком молекулы паранитроанилина (pNA)

- А) клоттинговые методы
- Б) нефелометрия

- В) методы с использованием хромогенных субстратов
- Г) турбидиметрия
- Д) амперометрические

04.10. В основе регистрации момента выпадения сгустка в коагулометрах используется метод измерения:

- А) импедансный
- Б) зонального электрофореза
- В) турбидиметрический
- Г) амперометрический
- Д) определение эластичности мембраны эритроцитов

Глава 5. ТЕСТЫ ОЦЕНКИ ГЕМОСТАЗА

Методы оценки тромбоцитарного гемостаза

Лабораторные тесты, выполняемые в соответствии с патогенетическим принципом (сосудисто-тромбоцитарный или коагуляционный гемостаз) и на основании клинических проявлений (кровотечения или тромбозы), представлены в табл. 5.1. Кроме того, могут быть выполнены и другие дополнительные исследования в рамках диагностических процедур или научных исследований. Общие принципы выбора панели лабораторных тестов – от простого к сложному, от одиночных исследований к группе тестов.

Таблица 5.1. Лабораторные тесты для диагностики врожденных и приобретенных нарушений тромбоцитарного звена

Скрининговые тесты
Время кровотечения. Количество тромбоцитов в периферической крови и их параметры.
Уточняющие тесты
Исследование агрегации тромбоцитов (функциональная активность) Фактор Виллебранда, активность и антиген.

Время кровотечения

Время кровотечения – это время от момента нанесения микроразреза кожи до момента прекращения вытекания крови. Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов и их взаимодействие с сосудистой стенкой. Это скрининговый тест, который позволяет заподозрить общие нарушения в тромбоцитарно-сосудистом звене гемостаза (в основном недостаточную функцию тромбоцитов), но не дает возможности определить конкретную патологию. У метода есть серьезные недостатки: он плохо стандартизуется (сложно сделать стандартные надрезы кожи глубиной 1 мм и длиной 5 мм), имеет низкую чувствительность: при легких формах тромбоцитопатии или болезни Виллебранда может не удлиняться; и низкую специфичность – удлиняется при некоторых коагулопатиях: дефицит ф. II, X, VII, при витамин-К-дефицитных состояниях. Поэтому при удлинении времени кровотечения для дифференциальной диагностики нарушений нужно использовать более чувствительные и специфичные методы. Нормальное время кровотечения не всегда позволяет исключить нарушения тромбоцитарного или сосудистого звеньев гемостаза, однако это наиболее доступный метод для выявления дефекта первичного гемостаза – нарушений взаимодействия тромбоцитов с сосудистой стенкой.

После выявления конкретной тромбоцитарной или сосудистой патологии повторять это исследование нет необходимости.

В основном используются два метода для определения времени кровотечения – метод Дьюка (прокол мочки уха или подушечки безымянного пальца) и метод Айви.

Время кровотечения по Айви

Делают надрез на предплечье длиной 9 мм и глубиной 1 мм с помощью специального шаблона или пружинного скальпеля на фоне венозного полнокровия, которое обеспечивается наложением манжеты с поддерживаемым давлением 40 мм рт. ст. Выполняются 3 скарификации: на внутренней стороне предплечья, продольно оси, на неповрежденной коже без признаков воспаления, не над крупными сосудами, не над невусами. Регистрируется время остановки из всех трех. Норма – до 8 мин.

Удлинение времени кровотечения до 10 и более минут свидетельствует о патологии тромбоцитарно-сосудистого гемостаза. Серьезное нарушение подозревается при удлинении кровотечения до 15–20 минут.

Укорочение времени кровотечения не показательно ни для какой патологии, поэтому не интерпретируется.

Тромбоцитарные показатели на гематологических анализаторах

Количество тромбоцитов (PLT, platelet)

В отличие от ручного подсчета тромбоцитов, где проводится предварительный лизис эритроцитов, автоматические счетчики крови анализируют тромбоциты и эритроциты без предварительной обработки. При подсчете на автоматических анализаторах тромбоциты распознаются как частицы с объемом от 1,8 до 30,0 фл (рис. 5.1). Референсное значение, принятое ВОЗ и производителями гематологических анализаторов, колеблется в интервале $150\text{--}400 \times 10^9/\text{л}$. Автоматические счетчики позволяют получать достаточно надежные результаты определения количества тромбоцитов. Для большинства современных гематологических анализаторов коэффициент вариации подсчета PLT не превышает 2–4%, в то время как при подсчете тромбоцитов в камере Горяева коэффициент вариации достигает 7–15% и более. Анализаторы сигнализируют «флагами» на бланке о выходе количества тромбоци-



Рис. 5.1. Гистограмма тромбоцитов при подсчете клеток крови на гематологических анализаторах. Кроме гистограммы анализаторы показывают результаты подсчета количества тромбоцитов (PLT), определения среднего объема тромбоцитов (MPV), дисперсии распределения тромбоцитов по объему (PDW), тромбоцитокрита (PCT)

тов за референтные пределы, наличии агрегатов тромбоцитов, макротромбоцитов или других элементов, сравнимых по объему с тромбоцитами (микроэритроциты).

При подсчете клеток на гематологических анализаторах в качестве антикоагулянта используется ЭДТА. У некоторых пациентов калиевая соль ЭДТА может инициировать агглютинацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией. Кроме агглютинации клеток, ложное занижение числа тромбоцитов может наблюдаться при их агглютинации под действием белков – тромбоцитарных агглютининов, или при адгезии тромбоцитов к лейкоцитам (тромбоцитарный «сателлитизм»), или при значительном изменении их размеров (гигантские или очень мелкие тромбоциты).

Имеется проблема дифференцирования больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов), их фрагментов (шизоцитов), а также фрагментов цитоплазмы лейкоцитов (клеточный дебрис). Существует несколько механизмов, предупреждающих подсчет одних элементов вместо других. Например, в приборах, использующих кондуктометрический метод, анализируется не только высота электрического импульса, но и его форма. Если доля частиц с объемами в области 30 фл превышает запрограммированный порог, то выводится на экран сообщение «Micro RBC» либо «Macro PLT». При этом достоверность определения количества тромбоцитов снижена.

Средний объем тромбоцитов (MPV, mean platelet volume)

MPV выражается в фемтолитрах (фл) или мкм³. В норме этот показатель варьирует от 7,4 до 10,4 фл и имеет тенденцию к увеличению с возрастом: с 8,6–8,9 фл у детей 1–5 лет до 9,5–10,6 фл у людей старше 70 лет. «Молодые» кровяные пластинки имеют больший объем, поэтому при ускорении тромбоцитопоэза средний объем тромбоцитов возрастает. В течение первых двух часов после взятия крови с ЭДТА происходит набухание тромбоцитов с изменением их объема, и соответственно, увеличение MPV.

Увеличение MPV наблюдается при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, гипертиреозе, атеросклерозе, сахарном диабете, у курильщиков и лиц, страдающих алкоголизмом. Крупные тромбоциты с аномальной морфологией появляются при миелопролиферативных заболеваниях. Уменьшение этого показателя отмечается после спленэктомии и при синдроме Вискотта–Олдрича. Следует обратить внимание на размеры тромбоцитов: увеличение доли крупных тромбоцитов позволяет думать о компенсированном увеличении образования тромбоцитов. Исследование пунктата костного мозга позволяет оценить число и внешний вид мегакариоцитов и подтвердить наличие заболевания, нарушающего функцию костного мозга (лейкоз).

Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (PDW, platelet distribution width)

PDW – показатель, являющийся мерой гетерогенности размеров (анизотомии) тромбоцитов. Величина PDW в среднем составляет 10–20%. Этот параметр

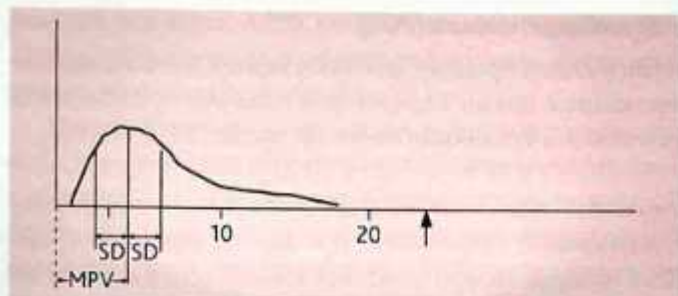


Рис. 5.2. Схематическое изображение распределения тромбоцитов по объему (MPV), на основании которого рассчитывается показатель анизоцитоза тромбоцитов (PDW)

определяется на основании гистограммы распределения тромбоцитов (рис. 5.2). PDW количественно отражает гетерогенность популяции этих клеток по размерам (степень анизоцитоза тромбоцитов).

Как артефакт, ложнозавышенное увеличение PDW может быть связано с присутствием микроцитов, шизоцитов, микроагрегатов тромбоцитов, фрагментов цитоплазмы лейкоцитов.

Этот показатель находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов и их периода жизни. В каждом конкретном случае важна не только величина PDW, но и его динамика во времени, а также связь с другими тромбоцитарными показателями. Так, увеличение PDW с одновременным снижением MPV свидетельствует о преобладании микротромбоцитов среди общей популяции тромбоцитов (указывает на угнетение тромбоцитопоза), а сочетание повышенного PDW с увеличением MPV отражает нарастание числа макротромбоцитов (усиление продукции тромбоцитов). Одновременное присутствие фракций макротромбоцитов и микротромбоцитов ведет к увеличению PDW, но MPV может оставаться в пределах нормы. В современных гематологических анализаторах отдельными показателями указывается процентное содержание микротромбоцитов (MicroPLT) и макротромбоцитов (MacroPLT).

Фракция незрелых тромбоцитов (IPF, immature platelet fraction)

В норме IPF составляет 1,0–10,3%. Фракция незрелых тромбоцитов отражает состояние костномозгового тромбоцитопоза. IPF повышается при синдроме ДВС, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, регенерации костномозгового гемопоэза после химиотерапии.

Средний тромбоцитарный компонент (MPC, mean platelet component)

Новый параметр, который определяется на некоторых гематологических анализаторах, характеризует плотность и гранулярность тромбоцитов. Норма – $259 \pm 6,6$. MPC коррелирует с активностью тромбоцитарного звена и может использоваться среди других показателей в качестве предвестника острых ишемических осложнений, а также риска развития тромбоза.

Тромбоцитокрит (PCT)

PCT – показатель, характеризующий процент тромбоцитарной массы в объеме крови: вычисляется суммированием прямо измеренных объемов тромбоцитов или произведением среднего объема тромбоцитов на их число: $PCT = \Sigma V_{PLT} = MPV \times PLT$.

У здорового человека показатель стремится остаться стабильным: при уменьшении числа тромбоцитов усиливается тромбопоэз, и в циркулирующую кровь выбрасывается большее число молодых макротромбоцитов, что ведет к увеличению MPV. При увеличении количества циркулирующих тромбоцитов снижается продукция их в костном мозге, тем самым уменьшается процент макротромбоцитов, и MPV уменьшается. Однако при нарушении этого равновесия происходит или уменьшение PCT, что в конечном счете приводит к патологии первичного гемостаза и риску возникновения кровотечений, или повышение PCT, увеличивающее активность тромбоцитов и их способность к агрегации. Это повышает риск тромбозов.

Нормальные значения PCT варьируют в пределах 0,15–0,35%. Было обнаружено, что снижение PCT менее 0,1% обусловило возникновение послеоперационных кровотечений у пациентов с развившейся тромбоцитопенией. Этот показатель оказался более чувствительным для оценки риска возникновения кровотечения, чем число тромбоцитов.

Если скрининговые методы указывают на нарушение функции тромбоцитов, необходимо выполнить специальные тесты с учетом диеты и лекарственных препаратов, принимаемых пациентом (отмена за 7–10 суток перед исследованием глюкокортикостероидов, аспирина и других нестероидных противовоспалительных средств, адреноблокаторов, блокаторов кальциевых каналов, антиагрегантов: пентоксифиллина, папаверина, теофиллина, дипиридамола, тиклопидина, антибиотиков – пенициллина, карбенициллина).

Показатели функциональной активности тромбоцитов

Стандартизованное исследование функции тромбоцитов бывает затруднено вследствие низкой стабильности клеток и значительного изменения их свойств в зависимости от условий получения (пробоподготовки), а также из-за отсутствия контрольных материалов. За последнее время к традиционным тестам по исследованию агрегации тромбоцитов в плазме, богатой тромбоцитами, прибавились тесты исследования агрегации в цельной крови, исследование активности рецепторов и определение в сыворотке содержимого тромбоцитарных гранул, освобождающихся при их активации.

Агрегация тромбоцитов

Индукцированная агрегация в ответ на внесение активаторов является одним из основных лабораторных тестов для выявления наследственных нарушений функции тромбоцитов. Исследования проводятся путем регистрации агрегации тромбоцитов в ответ на добавление соответствующего индуктора агрегации (ад-

реналин, коллаген, АДФ, ристомин, значительно реже – арахидоновая кислота). Для предотвращения разброса результатов метод требует строгого выполнения преаналитических условий.

Исследование проводят в плазме, богатой тромбоцитами (PRP, Platelet Rich Plasma). Для получения корректных результатов важно, чтобы количество тромбоцитов в образце было стандартным. Желательно использовать PRP с содержанием тромбоцитов $150\text{--}250 \times 10^9/\text{л}$, что не всегда возможно при тромбоцитопении. При слишком большом количестве тромбоцитов PRP плазму предварительно доводят до стандартных значений путем разбавления бедной тромбоцитами плазмой того же пациента.

PRP помещается в кювету агрегометра – для регистрации проходящего через пробу света (оптическая агрегатометрия) либо электрического тока (импедансная агрегатометрия). Проба в кювете термостатируется и постоянно перемешивается мешалкой. При формировании агрегатов тромбоцитов плазма становится более прозрачной и возрастает поток проходящего через кювету света, либо изменяется ток из-за оседания агрегатов тромбоцитов на электродах; изменения светопропускания или тока регистрируются. Наиболее информативна оценка агрегатограмм по степени, скорости и времени агрегации; примеры кривых показаны на рис. 5.3 и 5.4.

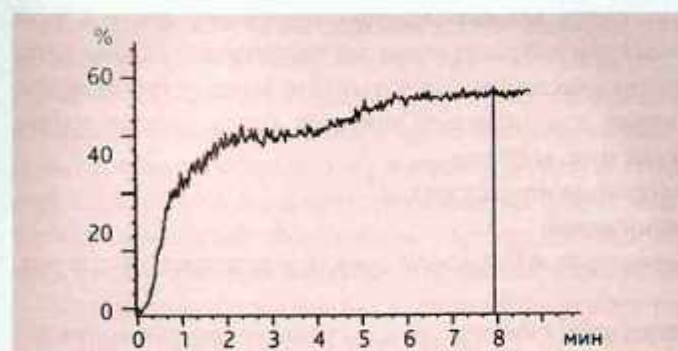


Рис. 5.3. Оптическая агрегатометрия с измерением светопропускания по методу Born при исследовании PRP; индуктор – АДФ 5 мкМ, двухволновая агрегация

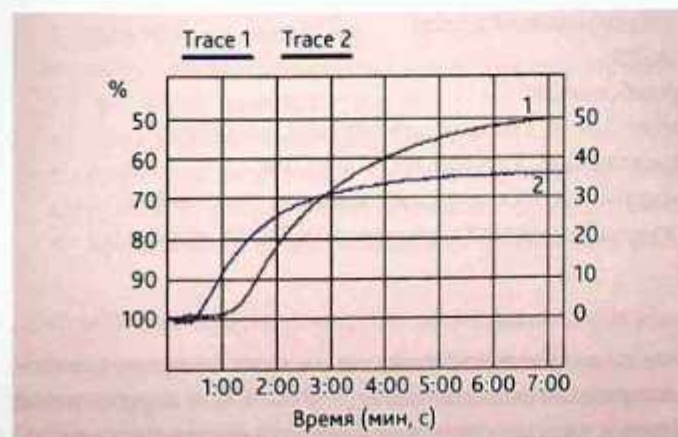


Рис. 5.4. Импедансная агрегатометрия в цельной крови. Одиночные кривые: 1 – индуктор коллаген, 2 – индуктор АДФ

АДФ-индуцированная агрегация

Агрегация с АДФ является дозозависимой: как правило, при добавлении 0,5–1 мкмоль/л АДФ развивается обратимая агрегация, при внесении 5 мкмоль/л – двухфазная агрегация, при большей дозе (до 10 мкмоль/л) – необратимая однофазная агрегация. Однако агрегатограммы очень вариабельны даже у здоровых людей.

Механизм АДФ-агрегации: при связывании АДФ с рецептором на поверхности тромбоцитов происходит изменение формы клеток с экспозицией на мембране комплекса GP IIb/IIIa (рецептор фибриногена), и развивается Ca^{2+} -зависимая агрегация тромбоцитов. Если первичный ответ не будет поддержан вторичной реакцией, то в отсутствие фибриногена происходит потеря чувствительности (десенситизация) рецепторов и дезагрегация тромбоцитов. Вторичная агрегация опосредована внутриклеточной передачей сигнала с повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . При этом активируется простагландин-тромбоксановая система, происходит секреция из α -гранул активных компонентов, и развивается вторая волна агрегации клеток.

Исследование АДФ-активации тромбоцитов позволило объяснить механизм действия используемых в клинике антиагрегантных препаратов. Так, клопидогрел, тикагрелор и прасутрел селективно ингибируют АДФ-агрегацию и активность аденилатциклазы, блокируя рецепторы к АДФ. В связи с этим АДФ-индуцированная агрегация используется для определения чувствительности к этой группе препаратов. Иной механизм действия имеет ацетилсалициловая кислота; она необратимо ингибирует циклооксигеназу, препятствуя синтезу тромбоксана в тромбоцитах. Соответственно, для оценки ее действия используются другие индукторы – арахидоновая кислота, коллаген.

АДФ-индуцированная агрегация отсутствует:

- при тромбостении Гланцманна;
- при передозировке блокаторов АДФ-рецепторов (клопидогрел, прасутрел, тикагрелор).

АДФ-индуцированная агрегация снижена, или отсутствует вторая волна агрегации:

- при использовании аспирина, особенно если он принимается в высоких дозах, как противовоспалительный агент;
- дефекте рецепторов АДФ;
- синдроме «серых» тромбоцитов;
- использовании антиагрегантов, средств для наркоза, алкоголя;
- нарушении в системе сигнальных путей тромбоцитов;
- приобретенных тромбоцитопатиях при соматической патологии;
- нарушении реакции высвобождения (аспириноподобный эффект).

Адреналин-индуцированная агрегация

Агрегация с адреналином в значительной степени зависит от уровня ионов Ca^{2+} в среде. При их физиологической концентрации (1–2 ммоль/л) адреналин не ведет к активации тромбоцитов и их агрегации, при значительном снижении Ca^{2+}

в цитратной плазме (до 20–40 мкмоль/л) адреналин вызывает дозозависимую агрегацию с экспрессией комплекса GP IIb/IIIa (первичная волна) и TXA₂-опосредованной вторичной волной.

По-видимому, в физиологических условиях в организме прямая адреналиновая агрегация отсутствует, но адреналин потенцирует действие других агонистов. Поэтому при курении, стрессе и особенно кардиогенном шоке, когда уровень адреналина в крови повышается до 0,6 мкмоль/л и более, он становится существенным фактором внутрисосудистой агрегации тромбоцитов.

Адреналин-индуцированная агрегация отсутствует при тромбостении Гланцманна.

Адреналин-индуцированная агрегация снижена:

- при использовании аспирина;
- нарушении секреции;
- дефекте рецепторов адреналина;
- Квебекской аномалии тромбоцитов;
- дефиците плотных гранул.

Коллаген-индуцированная агрегация

Коллаген, как естественный агент, стимулирующий тромбоциты, широко используется в лабораторной практике (обычно в конечной концентрации 10–20 мг/л). Активные тромбоциты легко связываются с коллагеном (имитируя адгезию к сосудистой стенке), затем наступает вторичная активация с синтезом и выбросом тромбоксана A₂ и последующей агрегацией клеток. На коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов влияет аспирин, снижая ее вследствие блокады продукции тромбоксана, поэтому коллаген считается простым и доступным индуктором для выявления аспиринорезистентности.

Коллаген-индуцированная агрегация отсутствует:

- при тромбостении Гланцманна;
- тромбоцитопатии с отсутствием рецепторов коллагена.

Коллаген-индуцированная агрегация снижена:

- при приеме аспирина;
- нарушении метаболизма арахидоновой кислоты;
- дефиците плотных гранул;
- синдроме «серых» тромбоцитов;
- дефиците рецепторов коллагена, рецепторов АДФ.

Отсутствует вторая волна агрегации под действием коллагена:

- при использовании аспирина, блокаторов кальциевых каналов.

Арахидонат-индуцированная агрегация

Арахидоновая кислота активирует тромбоциты, вызывая дозозависимое изменение формы, первичную и затем вторичную агрегацию. Арахидонат без участия специфических рецепторов проникает внутрь клетки и превращается в актив-

ные метаболиты – ПГГ₂, ПГН₂ и тромбоксан А₂. Эту особенность используют для дифференциации патологических состояний, связанных с дефицитом пулов хранения и нарушениями в циклооксигеназном пути активации тромбоцитов (включая действие аспирина); исследование высокоспецифично.

Арахидонат-индуцированная агрегация отсутствует при тромбоцитопении Гланцманна.

Арахидонат-индуцированная агрегация снижена:

- при использовании аспирина (вплоть до 0);
- нарушении метаболизма арахидоновой кислоты;
- дефиците плотных гранул.

Ристоцетин-индуцированная агрегация (агрегация с ристомидином)

Определение агрегации тромбоцитов с ристоцетином применяют для количественной оценки фактора Виллебранда (vWF). Установлена линейная зависимость между степенью ристоцетиновой агрегации и количеством vWF. В основе метода лежит способность антибиотика ристоцетина стимулировать *in vitro* взаимодействие vWF с тромбоцитарным гликопротеином Ib. В большинстве случаев болезни Виллебранда (кроме типа 2В) отмечается нарушение ристоцетин-агрегации при нормальной агрегации на АДФ, коллаген и адреналин. Нарушение ристоцетин-агрегации выявляют и при макроцитарной тромбоцитопении Бернара–Сулье (отсутствие на мембране тромбоцитов рецепторов ристоцетиновой агрегации). Для дифференциации применяют тест с добавлением нормальной плазмы: при болезни Виллебранда после добавления нормальной плазмы ристоцетин-агрегация нормализуется, в то время как при синдроме Бернара–Сулье этого не происходит.

Ристоцетин-индуцированная агрегация отсутствует:

- при синдроме Бернара–Сулье;
- болезни Виллебранда.

Ристоцетин-индуцированная агрегация снижена:

- при болезни Виллебранда (кроме 2N-типа)
- нарушении секреции;
- дефиците плотных гранул.

Агрегация при стимуляции низкими дозами ристоцетина повышена в 1,5–2 раза:

- при болезни Виллебранда тромбоцитарного типа (псевдобольной Виллебранда);
- болезни Виллебранда 2В-типа.

Тромбин-индуцированная агрегация

Тромбин – наиболее сильный естественный индуктор агрегации. Это связано с комплексным эффектом тромбина через собственный рецептор и через комплекс GPIIb. Из-за очень выраженного эффекта тромбин-индуцированная агрегация на практике используется редко. Стимуляция через тромбиновый рецептор сопровождается активацией фосфолипазы С и включением фосфоинозитольного

механизма активации; этот путь сопровождается быстрым подъемом цитозольного Ca^{2+} и секрецией как α -гранул, так и электронноплотных δ -гранул. Секретируемый из плотных телец АДФ существенен для образования агрегатов, а выделяемые α -гранулами фибриноген, vWF, тромбоспондин – для их стабилизации. Оккупация молекулами тромбина высокоаффинных рецепторных мест в GPIIb приводит к перестройке фосфолипидной мембраны, стимуляции ее прокоагулянтной активности и доступности мест связывания GP IIb/IIIa. В результате комплексной стимуляции тромбином практически не наблюдается двухволновой агрегации.

Тромбин-индуцированная агрегация отсутствует при тромбостении Гланцманна.

Тромбин-индуцированная агрегация снижена:

- при синдроме «серых» тромбоцитов;
- нарушении секреции;
- синдроме Бернара–Сулье.

Причиной нарушений агрегации тромбоцитов могут быть лекарственные средства (аспирин и другие нестероидные противовоспалительные препараты, блокаторы АДФ-рецепторов тромбоцитов, антибиотики β -лактамного ряда, некоторые витамины), а также пряности и алкоголь. Поэтому для адекватной оценки результатов теста требуется тщательная стандартизованная подготовка больных, информирование лаборатории о приеме пациентом лекарств (особенно аспирина, блокаторов АДФ-рецепторов и нестероидных противовоспалительных препаратов в предшествующие 7–9 дней), четкая стандартизация преаналитических (взятие и обработка крови) и аналитических процедур.

С помощью агрегатометрии производится диагностика врожденных нарушений функции тромбоцитов (табл. 5.2). Из-за сложности диагностики и относитель-

Таблица 5.2. Изменения агрегатограмм при врожденных нарушениях функции тромбоцитов

Индуктор агрегации / болезнь	АДФ		Адреналин		Арахидоновая кислота	Тромбин	Коллаген	Ристоцетин
	Первая волна	Вторая волна	Первая волна	Вторая волна				
Болезнь Виллебранда	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	↓ (кроме субтипов 2N и 2B)
Синдром Бернара–Сулье	Н	Н	Н	Н	Н	Н/↓	Н	↓
Тромбастения Гланцманна	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	Н
Синдром серых тромбоцитов	↓	↓/↓↓	↓	↓	Н/↓	+/-	↓	+/-

Примечание. Н – нормальная агрегатограмма, ↓ – сниженная реакция на индуктор агрегации.

но редкой частоты их встречаемости пациенты наблюдаются в специализированных центрах вместе с больными наследственными коагулопатиями (гемофилия, болезнь Виллебранда). Коррекция нарушений функциональной активности тромбоцитов сложна, лечение симптоматическое. Тем не менее предварительный диагноз необходимо ставить уже на этапе первичной медицинской помощи, а далее направлять пациента в специализированный центр.

В целом снижение функциональной активности тромбоцитов выявляется проще, чем их гиперактивность. Гиперагрегация распространена значительно шире, в той или иной мере присутствует при всех сердечно-сосудистых заболеваниях, многих эндокринных нарушениях и другой соматической патологии. Клиническая потребность в определении функции тромбоцитов велика, она значима для определения патогенетических механизмов возникающих нарушений, прогнозирования осложнений и оценки эффективности антиагрегантной терапии в группах больных с сердечно-сосудистыми, эндокринными, онкологическими заболеваниями.

Тесты оценки плазменного гемостаза

Скрининговые методы оценки плазменного гемостаза

Выполнение всех возможных тестов для уточнения характера нарушений свертывания крови – практически недоступная задача. Поэтому важно соблюдать этапность проведения тестов, исходя при этом из клинических данных и анамнеза пациента.

На первом этапе для уточнения направленности нарушений необходимо провести тесты, отражающие состояние целых звеньев системы гемостаза. Поскольку в разных лабораториях при анализе гемостаза преследуются разные цели, перечень тестов, входящих в гемостатический скрининг, может отличаться от такого в других лабораториях. Однако существует набор тестов, традиционно называемых (и рекомендуемых) скрининговыми для диагностики состояния системы гемостаза. Обычно к ним относят определение времени кровотечения, количество тромбоцитов и несколько тестов, оценивающих состояние плазменного звена гемостаза, которые входят как основной компонент в понятие коагулограммы. В перечень скрининговых тестов плазменного гемостаза традиционно включают:

- протромбиновое время (ПВ) или протромбиновый тест (ПТ);
- активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ);
- тромбиновое время (ТВ);
- фибриноген.

Скрининговые тесты на состояние внешнего и внутреннего путей активации протромбиназы позволяют выявлять нарушения со стороны факторов-субстратов, кофакторов, ингибиторов каскада свертывания, а также действие некоторых лекарственных препаратов или аутоантител. Основным тестом на состояние внешнего каскада свертывания плазмы является ПВ, внутреннего каскада – АЧТВ. Их диагностическое значение представлено в табл. 5.3.

Таблица 5.3. Клинико-диагностическое значение ПВ и АЧТВ

Протромбиновое время (ПВ)	Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) или АПТВ
Выявление врожденного и приобретенного дефицита факторов VII, X, V, протромбина и в некоторой степени оценка содержания фибриногена*	Выявление врожденного и приобретенного дефицита факторов XII, XI, IX, VIII, X и в некоторой степени оценка содержания фибриногена*
Контроль за лечением антагонистами витамина К	Контроль за лечением нефракционированным гепарином
	Определение волчаночных антикоагулянтов

Примечание. * Концентрация фибриногена начинает влиять на результаты тестов при снижении ее ниже определенного порога. Как правило, эти тесты не позволяют заподозрить умеренное снижение его концентрации.

Протромбиновое время

Протромбиновое время (ПВ), или протромбиновый тест (ПТ) – широко используемый скрининговый тест для оценки внешнего каскада свертывания плазмы, контроля за лечением антивитаминов К препаратами и для оценки белково-синтетической функции печени. В тесте ПВ определяется время образования фибринового сгустка в бедной тромбоцитами цитратной плазме (или в цельной капиллярной крови) при активации внешнего пути гемостаза *тромбопластином* – тканевым экстрактом, содержащим тканевый фактор и фосфолипиды, в присутствии ионов Ca^{2+} при температуре 37 °С. Для снижения влияния интерферирующих факторов одновременно определяют ПВ исследуемой пробы и референтной нормальной пулированной плазмы (РНП), а оценку результата проводят в виде индексов ПВ. Экспертный комитет ВОЗ в качестве эталона рекомендует использовать среднее значение из протромбинового времени плазм, взятых от 20 здоровых людей.

В отличие от других тестов гемостаза ПВ остается достаточно стабильным при хранении цитратной крови в закрытой вакуумной пробирке при комнатной температуре до 24 час. После центрифугирования образцы плазмы до исследования хранят также при +18–25 °С; охлаждение ниже +14 °С может привести к холодной активации фактора VII и занижению ПВ. Для длительного хранения (>24 ч) требуется замораживание полученной плазмы.

Несколько типов реагентов для постановки ПВ используется в КДЛ:

- рекомбинантные ПВ реактивы – используются рекомбинантный тканевый фактор, Ca^{2+} , фосфолипиды, буфер, стабилизаторы;
- тканевые тромбопластины – это экстракты тканей, богатые тканевым тромбопластином (печень, мозг кролика, быка, свиньи, плацента человека);
- комбинированные тромбопластины – тканевый тромбопластин, разведенный в растворе фибриногена быка; его целесообразно использовать при контроле за лечением антивитаминов К препаратами.

Российское стандартизованное
производство полного цикла



Использование
в странах
Евросоюза!

НПО РЕНАМ

г. Москва

МБООИ "Общество больных гемофилией"



UK NEQAS

ОСВОИ

ЖИДКИЕ и Лиофилизированные реагенты!

Компания РЕНАМ производит весь спектр реагентов для проведения коагулологических исследований, как в крупных централизованных лабораториях, так и в небольших лабораториях государственной и частной формы собственности.

Автоматические и ручные методики!

Реагенты готовы к использованию на полностью автоматизированных системах, на полуавтоматических коагулометрах и ручными методиками!

Калибраторы и Контрольные материалы мирового уровня - от МНО до D-dimer!

Практически все выпускаемые в мире анализаторы-коагулометры могут четко работать с применением наших тест-систем, калибраторов и контролей.

Баркодированные наборы для современных систем исследования гемостаза!

Безусловная поддержка пользователей!

Возможность обеспечения лаборатории гемостаза любого уровня всем необходимым: расходными материалами (кюветы, промывка), оборудованием (высокопроизводительные анализаторы и полуавтоматические коагулометры).

Всегда гарантия качества от 1 до 2 лет!

www.renam.ru



(звонок по России бесплатный)

8(804) 333-22-61

Реактивы могут отличаться по нескольким показателям: чувствительность, реактивность к гепарину, разная активность по свертыванию контрольной плазмы, характеризоваться межсерийными колебаниями. На результат протромбинового теста (ПТ) могут влиять патологические ингибиторы фосфолипид-зависимых реакций и ингибиторы полимеризации фибрина – продукты его деградации (ПДФ) или миеломные белки (парапротеины), прием антивитаминов К препаратов и прямых ингибиторов фактора Ха, а также введение активированного фактора VII.

Для представления результатов ПТ используется несколько способов:

- 1) время свертывания в секундах;
- 2) ПТ по Квику – % от нормы, определяется по калибровочному графику;
- 3) протромбиновое отношение: $ПО = ПВ \text{ пациента} / ПВ \text{ референтной нормальной плазмы}$;
- 4) международное нормализованное отношение (МНО), которое представляет собой $ПО$ (отношение ПВ пациента к ПВ контрольной плазмы, аттестованной по международному эталону), возведенное в степень международного индекса чувствительности (МИЧ).

Протромбиновое время в секундах

Протромбиновое время в секундах – это непосредственно измеряемый параметр, который показывает время от момента добавления реагентов в плазму до момента образования сгустка, детектируемого выбранным методом. ПВ представляется в цифровой форме, однако из-за отсутствия калибровки является, по сути, качественным показателем с неопределенным масштабом. Его существенный недостаток – низкая воспроизводимость, несопоставимость результатов исследований в разных лабораториях, на разных приборах или с тест-наборами разных серий из-за нестандартизованности тромбопластинового реагента и довольно быстрого снижения его активности в растворе при хранении. Поэтому нельзя сопоставлять результаты у одного пациента, полученные в разных лабораториях, на разных приборах или с тест-наборами разных серий. Тем не менее протромбиновое время в секундах часто используется в качестве быстрого простого теста, в бланках, как правило, указывается верхнее пограничное ПВ, установленное в КДЛ или указанное в аннотации к набору, превышение которого указывает на дефицит факторов внешнего пути активации протромбиназы.

Протромбиновый тест (ПТ) по Квику

Протромбиновый тест основан на использовании протромбинового времени как первичного значения, является расчетной величиной и отражает попытку стандартизованного подхода к результатам исследования. В протромбиновом тесте по Квику для перевода времени свертывания в % активности факторов протромбинового комплекса строится калибровочный график с использованием разведений стандартной плазмы. График имеет форму логарифмической зави-

симости. Для вычислений можно использовать линелизацию графика (рис. 5.5) в координатах «1/% протромбина» (т. е. 100% – 0,01; 75% – 0,0133; 50% – 0,02; 25% – 0,04; дальнейшее разведение нежелательно, так как возможно отклонение калибровки из-за значительного снижения концентрации фибриногена). В тесте Квика фактически определяется *активность* факторов протромбинового комплекса (ф. VII + ф. X + ф. V + ф. II) в процентах от референтной нормальной пулированной плазмы (РНП), результат обозначается как «протромбиновое время в %». В норме ПТ составляет >70%; верхняя референтная граница по ряду причин не указывается. Построение калибровочного графика на основании ПВ в ручном режиме существенно затруднено из-за короткого времени свертывания и возможного отклонения в результатах его детекции с помощью секундомера.



Рис. 5.5. Линелизация калибровочного графика – протромбиновое время по Квику в координатах «1/% протромбина» – время. Исходная точка неразведенного тромбопластина соответствует на графике нижней точке с самым коротким временем свертывания. Удлинение ПВ – свидетельство дефицита факторов внешнего каскада свертывания крови

Недостатком этого метода калибровки ПВ является то, что разведение плазмы моделирует только снижение концентрации факторов, которое может наблюдаться, например, при нарушении синтеза белков в печени или развитии коагулопатии потребления. При дефиците витамина К или приеме его антагонистов концентрация факторов может быть близкой к норме, но их функциональные свойства существенно изменены.

Наклон калибровочной кривой может зависеть от того, какой буфер или физиологический раствор были использованы для разведений. Разведенная плазма нестабильна, поэтому растворы разведенной контрольной плазмы хранить не рекомендуется, необходимо использовать столько исходной плазмы, сколько требуется для серии разведений, и не больше.

При очевидной простоте выполнения самого теста оценка его результатов представляет серьезную проблему. Две основные причины обуславливают сложность проблемы. Во-первых, в тесте активируется ряд последовательных и взаимовлияющих реакций; суммарная скорость зависит от многих параметров (рис. 5.6). Во-вторых, время свертывания нормальной и, что исключительно важно, патологической плазмы значительно варьирует в зависимости от источника и метода получения тромбопластина.

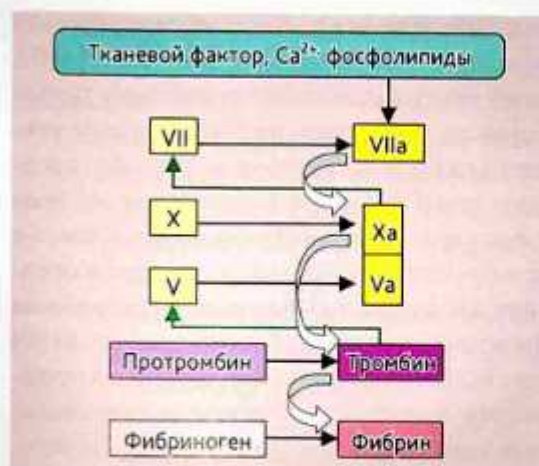


Рис. 5.6. Последовательные и взаимовлияющие реакции, определяющие суммарную активность протромбинового теста (ПТ)

Протромбиновое отношение (ПО)

Протромбиновое отношение определяется как $ПО = \text{ПВ пациента} / \text{ПВ референтной нормальной плазмы}$. ПО имеет прямую логическую связь с изменениями ПВ плазмы пациента – удлинение ПВ сопровождается возрастанием ПО; его вычисление позволяет исключить фактор нестабильности тромбопластинового реагента, поскольку он в равной степени отразится на пробе пациента и на референтной плазме. Из-за нестандартизованности и сильной нелинейной связи между результатом ПО и выраженностью патологических изменений медицинское сообщество постепенно отказывается от этого теста.

В течение многих десятилетий в России использовался расчетный показатель «протромбиновый индекс», который представлял собой дробь, обратную ПО с выражением результатов в %. Одинаковая с протромбином по Квику размерность, но разная чувствительность к снижению активности факторов вносила большую путаницу и непонимание в интерпретацию результатов исследований. В настоящее время индекс не рекомендуется к использованию, все коагулометры строят калибровочную кривую и представляют результаты измерения ПВ в % по Квику.

Протромбиновое время, выраженное через Международное нормализованное отношение

Единство измерений для протромбинового теста реализуется за счет наличия первичного стандартного образца тромбопластина, до которого прослеживаются измерения ПВ в КДЛ. На основе отнесения к первичному стандартному образцу Международным комитетом по стандартизации в гематологии и Международным комитетом по тромбозу и гемостазу был разработан стандартизованный протромбиновый тест. В его основе лежит наличие линейной зависимости между логарифмами протромбинового времени и разными кон-

центрациями разведенного тромбопластина и присвоение каждому реагенту характеристики в виде международного индекса чувствительности – МИЧ. На практике это означает, что значения протромбинового отношения (отношение ПВ пациента к ПВ аттестованной по международному стандарту контрольной плазмы) могут быть приведены путем возведения в степень (представляющую собой МИЧ используемого тромбопластина) к величине, которая была бы получена при определении факторов протромбинового комплекса с первичным стандартным образцом тромбопластина. Эту величину было предложено называть **МНО** – **международным нормализованным отношением** (INR – английская аббревиатура). По рекомендации ВОЗ определение МИЧ (ISI – английская аббревиатура) является обязанностью производителей тромбопластина, которые должны определять относительную чувствительность каждой серии выпускаемых ими тромбопластинов для модели коагулометра, на которой планируется использовать реагент, сравнивая ее с эталоном тромбопластина, чувствительность которого принята за единицу.

МНО рассчитывают по формуле:

$$\text{МНО} = \text{ПО}^{\text{МИЧ}}$$

Для каждой серии тромбопластинового реагента МИЧ обозначается на его упаковке и обычно составляет от 1,0 до 1,2 (предпочтительны низкие значения МИЧ).

Комментарии по разным способам выражения ПТ представлены в табл. 5.4.

Таблица 5.4. Способы выражения протромбинового теста и рекомендации

Выражение, единицы	Расчет	Комментарий
Протромбиновое время, секунды	Первично измеряемая величина	Зависит от реагентов, приборов, способа регистрации. Может быть использовано в динамическом наблюдении за пациентом при подозрении на ДВС при условии сохранения пары реагенты/оборудование
ПТ по Квику – % активности факторов внешнего пути от нормы	Определяется по калибровочному графику, который строится путем разведения стандартной плазмы (100% активности факторов), в соотношении 1 : 1 (50%), 1 : 3 (25% активности факторов)	Тест не стандартизован, однако рекомендуется для оценки состояния факторов внешнего пути активации плазменного гемостаза в скрининговом режиме
Международное нормализованное отношение (МНО)		Рекомендуется использовать при контроле лечения антивитамином К препаратами

Интерпретация результатов

Удлинение ПВ (снижение % протромбина по Квику, повышение МНО) наблюдается:

- при заболеваниях печени с нарушением белково-синтетической функции;
- лечении антагонистами витамина К;
- дефиците витамина К (холестаз, мальабсорбция, дисбактериоз);
- присутствии ингибиторов свертывания (гепарин в высокой дозе, иногда ПДФ);
- врожденном дефиците факторов протромбинового комплекса II, V, VII, X;
- гипофибриногенемии (менее 1,0 г/л), дисфибриногенемии и нарушении полимеризации фибрина;
- синдроме ДВС;
- применении препаратов, ингибирующих фактор Ха.

Важно отметить, что для предотвращения эффектов гепарина на результаты ПТ производители добавляют в реагенты для определения ПВ гепариназу или полибрен, которые нейтрализуют гепарин в пробе и делают тест ПВ не чувствительным к профилактическим и терапевтическим дозам гепарина. Благодаря такой особенности результат теста ПВ в единицах МНО может использоваться для подбора дозы варфарина на фоне гепаринотерапии. Как показывает практика, большое число врачей КЛД не знают о такой особенности, и вопрос о том, почему ПВ не является чувствительным к гепарину, ставит их в тупик.

Укорочение ПВ (повышение % протромбина по Квику, снижение МНО) может иметь место при гиперкоагуляционном синдроме или при применении гемостатических препаратов, например, фактора VIIa при лечении ингибиторной формы гемофилии. Однако из-за нестандартности измерений и сильного влияния техники взятия крови, детектирования образования сгустка только на начальном этапе, когда не развернулась в полной мере генерация тромбина, делать заключение об активации свертывания или риске тромбозмболии только на основании укороченного ПВ нельзя.

Активированное частичное тромбопластиновое время

АЧТВ (или АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время; англ. – aPTT, Activated Partial Thromboplastin Time) – скрининговый тест для оценки внутреннего каскада свертывания плазмы, наличия ингибиторов свертывания, контроля гепаринотерапии, выявления дефицита факторов XII, XI, VIII и IX (гемофилия А и В). Слова «частичное» или «парциальное» в названии теста указывают на то, что в нем используется не экстракт тканей («полный тканевой тромбопластин»), а только активатор контактной фазы и фосфолипиды. В тесте АЧТВ под действием каолина или эллаговой кислоты активируется контактный фактор Хагемана и далее внутренний путь плазменного гемостаза, а фосфолипиды служат поверхностью для сборки ферментных комплексов. Факторы и взаимные влияния некоторых из них на АЧТВ представлены на **рис. 5.7**.

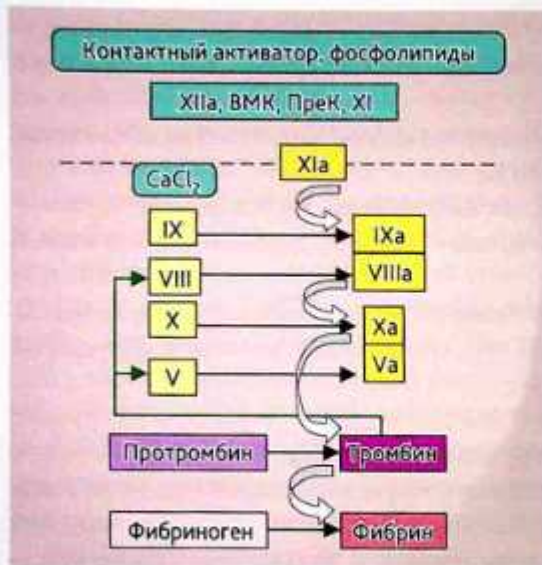


Рис. 5.7. Последовательные и взаимовлияющие реакции, определяющие значение АЧТВ. Компоненты контактной активации ф.XII, высокомолекулярный кининоген (ВМК), прекалликреин (ПреК), а также ф.XI не требуют Ca^{2+} для активации. Чтобы уменьшить вариабельность Са-независимого начального этапа внутреннего каскада активации протромбиназы, сначала инкубируют плазму с каолином и кефалином (достигается максимальная активация ф.XIa), а затем тест стартуют добавлением CaCl_2 и фиксируют время свертывания плазмы

При выполнении теста АЧТВ определяется время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы при физиологической температуре (37°C), в условиях стандартной активации контактной фазы. Благодаря отсутствию тромбоцитов в плазме и добавлению их заменителя – фосфолипидов – на результаты теста АЧТВ практически не влияют тромбоцитарные факторы.

Преаналитический этап имеет большое значение для получения корректных результатов теста: учет принимаемых пациентом лекарственных препаратов, правильность взятия крови, использованный антикоагулянт и его соотношение с кровью, условия хранения и транспортировки пробы. Результаты теста сильно зависят от правильного отношения «кровь : антикоагулянт» (9 : 1), поэтому требуется обязательный входной контроль полноты заполнения кровью вакуумных пробирок с цитратом натрия при их поступлении в лабораторию. При недозаполнении пробирки более чем на 10% пробу не принимают, поскольку значения АЧТВ и других тестов будут искажены. Охлаждение пробы ведет к активации контактной фазы *in vitro*. АЧТВ стабильно до 4 часов при комнатной температуре; при лечении гепарином исследование необходимо провести в течение 1 часа после взятия материала. Возможно хранение замороженной бедной тромбоцитами плазмы, но допустимо лишь однократное размораживание.

Системы межлабораторной стандартизации теста АЧТВ до настоящего времени практически нет, приборная и реагентная база этого теста пока не поддаются стандартизации. Поэтому свойства реактивов должны быть известными, лучше пользоваться реактивами от одного производителя и в соответствии с используемым оборудованием. АЧТВ-реагент должен отвечать следующим требованиям: иметь одинаковые диапазоны нормальных значений для разных серий реактивов одного производителя, быть чувствительным к клинически значимому дефициту

факторов свертывания крови и чувствительным к эффектам нефракционированного гепарина (НФГ). Набор реактивов для АЧТВ содержит активатор контактной фазы и фосфолипиды. CaCl_2 добавляется в пробу отдельно, как стартовый реактив. Контактный активатор – это высокодисперсионная суспензия отрицательно заряженных частиц каолина (белая глина) или эллаговая кислота, полифенол или сульфатиды (отрицательно заряженные сульфатированные липиды) в смеси с каолином. Фосфолипиды используют синтетические или выделенные из тканей животных (мозг кролика) или из сои. В случае использования синтетических фосфолипидов их состав и концентрация должны быть стандартизованы. В результате достигается воспроизводимость результатов при использовании разных серий реагента одного производителя, а также постоянство физико-химических параметров: оптимальная ионная сила раствора и свойства буферной системы, которые определяют чувствительность АЧТВ-реагента к дефициту факторов свертывания и действию нефракционированного гепарина. Вид и концентрация фосфолипидов – более важный компонент для характеристики набора АЧТВ, чем компоненты контактной фазы активации. Стабилизация реактива обеспечивается ионной силой раствора и свойствами буферной системы, это во многом обеспечивает коагуляционные свойства АЧТВ-реагента. Отдельные реагенты обладают лучшей чувствительностью к эффектам волчаночного антикоагулянта, что особо отмечается производителем как «АЧТВ-реагент, чувствительный к волчаночному антикоагулянту». Этот вид реагентов рекомендуется выбирать в случае клинической задачи установления диагноза антифосфолипидного синдрома. Использование реагентов, чувствительных к волчаночному антикоагулянту, для оценки активности факторов свертывания может вносить существенную и клинически значимую ошибку в результаты измерения. Кроме того, рекомендуется корректировать нормы для каждой серии реактивов. Опытным путем следует удостовериться в качестве АЧТВ-реактивов, которые должны отвечать следующим критериям:

- иметь одинаковые диапазоны нормальных значений для разных серий реактивов от одного производителя;
- выявлять клинически значимое снижение факторов свертывания удлинением времени образования сгустка (т. е. результаты должны соответствовать клиническим проявлениям гипокоагуляции);
- быть чувствительными к антикоагулянтному эффекту гепарина, при этом не проявлять слишком высокой чувствительности при использовании гепарина в терапевтической концентрации.

Нормальные значения АЧТВ зависят от используемых реактивов и приборов и наиболее часто составляют 25–40 сек. Границы нормы уточняются в каждой лаборатории и могут изменяться при замене прибора и/или использовании других реагентов.

Для снижения влияния интерферирующих факторов возможна оценка результата в виде индекса АЧТВ: $\text{ИАЧТВ} = (\text{АЧТВ пациента} / \text{АЧТВ контрольной нормальной плазмы})$; диапазон нормы 0,8–1,2. Если $\text{ИАЧТВ} > 1,2$, удлинение АЧТВ считается клинически значимым.

Удлинение АЧТВ наблюдается:

- при врожденном или приобретенном дефиците факторов II, V, VIII, IX, X, XI, XII, прекалликреина, ВМК (см. клинический случай 5.1);
- лечении гепарином и прямыми ингибиторами тромбина;
- наличии в крови волчаночного антикоагулянта и высоких концентраций ПДФ;
- дефиците фактора Виллебранда, который часто ведет к снижению активности ф. VIII (болезнь или приобретенный синдром Виллебранда);
- коагулопатии потребления (синдром ДВС);
- гипофибриногенемии (концентрация фибриногена менее 1 г/л).

Укорочение АЧТВ напрямую не говорит об ускорении свертывания, поскольку часто бывает связано с нарушением преаналитических технологий (травматичное взятие крови), поэтому большого клинического значения не имеет, но в больших популяционных исследованиях ассоциировано с развитием острых сосудистых событий. Тем не менее оно может быть поводом для дальнейшего определения маркеров активации гемостаза и тромбообразования.

Чувствительность теста АЧТВ к разным изменениям гемостаза в значительной мере связана со свойствами используемых в тесте реактивов. Большинство тест-наборов АЧТВ (но не все) чувствительны к снижению активности ф. VIII или ф. IX. Однако умеренное снижение активности ф. IX может не вызывать удлинения АЧТВ при высокой активности ф. VIII, несмотря на наличие геморрагических проявлений у пациента. К дефициту других факторов чувствительность теста значительно варьирует, однако при остатке фактора <10% нормы АЧТВ во всех случаях удлиняется.

Фактор VIII является острофазным белком, повышается при воспалительных реакциях, травмах. Этот факт необходимо учитывать при интерпретации укорочения АЧТВ в этих случаях. АЧТВ – менее чувствительный тест на выявление патологии на общем этапе коагуляции и недостаточности фибриногена, чем ПВ. Чувствительность АЧТВ к волчаночному антикоагулянту варьирует в зависимости от реактива (от полного отсутствия удлинения АЧТВ до значительного удлинения).

Клинический случай 5.1

Пациент Д., возраст 2 дня. Переведен в отделение патологии новорожденных в связи с постинъекционной гематомой ягодицы.

Выполнен коагулологический скрининг: АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, ВК, количество тромбоцитов. Единственное изменение: удлинение АЧТВ. Остальные тесты – в пределах нормы.

Заподозрено, что у пациента – гемофилия. После анализа активности ф. VIII и ф. IX установлен диагноз «гемофилия В тяжелая» (выявлено снижение активности ф. IX).

Тромбиновое время

Тромбиновое время (ТВ, англ. – TT, Thrombin Time) показывает нарушения на этапе превращения фибриногена в фибрин. В тесте ТВ определяется время

образования фибринового сгустка в исследуемой цитратной плазме после добавления стандартного раствора тромбина низкой или средней активности при 37 °С. Время реакции зависит в основном от концентрации и свойств фибриногена, а также от наличия антикоагулянтов – ингибиторов фибринообразования (гепарина, прямых ингибиторов тромбина, патологических белков). Антивитамин К препараты (варфарин) не влияют на результаты теста.

Нормальное значение ТВ зависит от активности тромбина; чаще составляет 12–17 сек. Тест не стандартизован, при определении ТВ могут использоваться растворы тромбина разной активности, которые нестабильны, активность постепенно снижается после приготовления. Пределы нормальных значений ТВ рекомендуется устанавливать в каждой лаборатории самостоятельно. Тест может выполняться в модификациях, в частности после нейтрализации гепарина протаминсульфатом. Тест практически не пригоден для мониторинга за лечением гепарином или гирудином, так как результаты зависят от состояния системы фибриноген/фибрин, кроме того, ТВ характеризуется очень малым временным интервалом.

Удлинение ТВ наблюдается:

- при действии медикаментозных ингибиторов тромбина (дабигатран, гепарины) и патологических (ПДФ, парапротеины) ингибиторов тромбино- и фибринообразования;
- снижении концентрации фибриногена (гипофибриногенемия) с высоким риском развития кровотечений;
- качественных изменениях молекул фибриногена (дисфибриногенемия);
- уремии.

Укорочение ТВ имеет небольшое диагностическое значение и чаще наблюдается при гиперфибриногенемии.

Рептилазное время (батроксобиновое время)

Батроксобин (или Рептилаза®) – тромбиноподобная протеаза из яда щитомордника обыкновенного, которая способна вызывать переход фибриногена в фибрин. Рептилаза отщепляет от фибриногена только фибринопептид А, что отличает ее от действия тромбина, который кроме фибринопептида А отщепляет от фибриногена еще и фибринопептид В (рис. 5.8) и активирует факторы V, VIII, XIII.

Рептилаза не подавляется антитромбином, поэтому этот тест может использоваться для оценки полимеризации мономеров фибрина в присутствии гепарина. Рептилазное время не относится к скрининговым тестам, но может определяться одновременно с ТВ (табл. 5.5).

Нормальные значения рептилазного времени устанавливаются в каждой лаборатории, так как показатель зависит от реагентной и приборной базы. Рептилазное время удлиняется часто не параллельно ТВ, в том числе этот эффект наблюдается при афибриногенемии, при некоторых формах дисфибриногенемии, в присутствии относительно высоких концентраций ПДФ (при гиперфибринолизе).

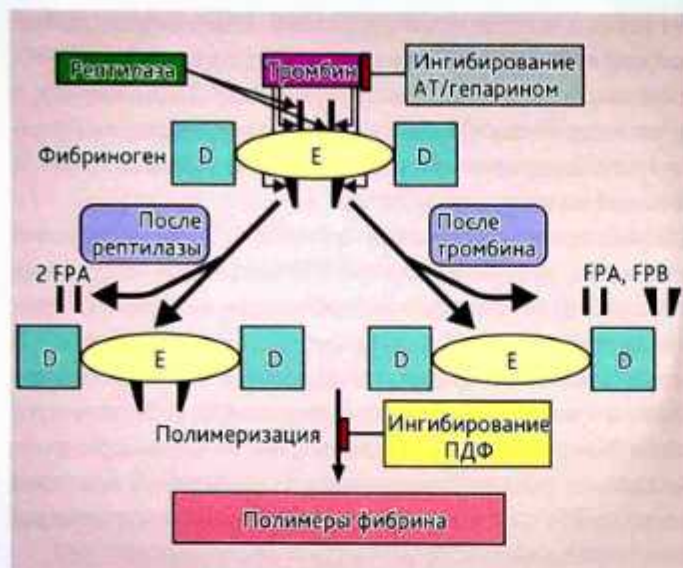


Рис. 5.8. Принцип и влияние факторов при постановке тестов «тромбиновое время» (ТВ) и «рептилазное время». Тромбин оказывает комплексный эффект, рептилаза отщепляет от фибриногена только фибринопептид А (FPA). На ТВ активно влияет АТ/гепарин, на рептилазное время гепарин не влияет. ПДФ за счет ингибирования полимеризации фибрин-мономеров удлиняют как ТВ, так и рептилазное время

Таблица 5.5. Тромбиновое и рептилазное время при различных состояниях

Состояние	Тромбиновое время	Рептилазное время
Гепаринотерапия	↑	N
Наличие иммунных антитромбинов	↑	N
Гипофибриногенемия	↑	↑
Дисфибриногенемия	↑	↑↑
Наличие ПДФ	↑↑	↑

Примечание. N – норма, ↑ – увеличено, ↑↑ – значительно увеличено.

Определение фибриногена

Определение фибриногена по Клауссу считается наиболее адекватным тестом, он основан на определении времени свертывания при добавлении избытка тромбина. В этих условиях критическим для свертывания становится концентрация фибриногена. Калибровочная кривая показывает укорочение времени свертывания при увеличении концентрации фибриногена. Если время свертывания очень короткое (<5 сек), то тест проводится на разведенной плазме. Из-за очень высокой активности тромбина присутствующие в плазме антитромбин и гепарин на результаты определения фибриногена практически не влияют.

Продукты распада фибриногена/фибрина (ПДФ) влияют на процесс полимеризации фибрин-мономеров, поэтому могут при определении фибриногена по Клауссу быть причиной ложно низких результатов.

В одной из модификаций метода Клаусса используется химическая добавка к тромбину, снижающая скорость образования сгустка и «растягивающая» время его выпадения до 5–100 с при различной концентрации фибриногена. Использование модифицированного метода позволяет обойтись без дополнительных разведений образцов плазмы и препарата тромбина, что снижает вероятность ошибок и делает определение более удобным.

Турбидиметрический метод определения фибриногена по изменению мутности плазмы с использованием препаратов змеиного яда (батроксибина) широко используется для определения фибриногена на автоматических коагулометрах и клинических анализаторах. Результаты менее подвержены влиянию ПДФ и дисфибриногенемии.

Иммунохимические методы основаны на использовании поликлональных антител с турбидиметрическим или нефелометрическим способами регистрации, предназначены для автоматических иммунохимических анализаторов (как правило, «закрытых систем» со специфическими тест-наборами для каждого типа анализатора). Недостатком использования поликлональных антител является то, что они не различают исходный фибриноген и продукты его деградации. Это особенно существенно при воспалении, обширных тромбозах и синдроме ДВС, когда происходит значительное увеличение концентрации ПДФ в плазме. *ELISA-метод* основан на применении специфических моноклональных антител. Однако этот метод очень дорог и пока не нашел широкого применения в лабораторной практике для определения фибриногена.

Референтный диапазон плазменной концентрации фибриногена составляет 1,8–3,5 г/л (часто приводят значения 2–4 г/л) и практически не зависит от возраста и пола. В печени синтезируется 2–5 г фибриногена в сутки, время полувыведения его из крови составляет около 4 дней.

Фибриноген – острофазный белок. Его концентрация в плазме крови может возрастать до 10 г/л при бактериальных инфекциях и тяжелых травмах, при этом повышение уровня фибриногена в острой фазе воспаления имеет транзиторный характер. К значительному росту его концентрации приводят заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром), коллагенозы (ревматоидный артрит, узелковый периартериит), ночная пароксизмальная гемоглобинурия, новообразования. Самый высокий уровень фибриногена наблюдается при раке легкого – до 12–17 г/л. При атеросклерозе наблюдается устойчивое увеличение уровня фибриногена, с трудом поддающееся коррекции лекарственными препаратами. Как следствие, риск сердечно-сосудистых заболеваний постепенно увеличивается по мере повышения уровня фибриногена в интервале 1,8–4,5 г/л; корреляция между уровнем фибриногена и развитием инфаркта миокарда и инсульта особенно четко прослеживается у пациентов молодого и среднего возраста. У курящих людей концентрация фибриногена несколько выше, чем у некурящих. Характерно повышение фибриногена для беременных женщин; его возрастание до 5–8 г/л не рассматривается как патологическое.

Дисфибриногенемия – редко диагностируемое состояние с изменением первичной структуры и свойств фибриногена. Оно развивается вследствие несколь-

ких мутаций, из которых некоторые могут сопровождаться кровотечениями, а другие – тромбозами.

Снижение концентрации фибриногена в плазме наблюдается при врожденном его дефиците, печеночно-клеточной недостаточности, синдроме ДВС, острых фибринолитических состояниях, поражениях костного мозга (лейкоз, опухолевые метастазы), при инфекционном мононуклеозе. Гипофибриногенемии могут вызвать такие лекарственные препараты, как вальпроат натрия, фибраты, фенобарбитал, стрептокиназа, урокиназа, L-аспарагиназа. Значительная физическая перегрузка также ведет к снижению уровня фибриногена. Лекарственной дефибринизации способствуют ферменты змеиного яда (рептилаза, анкрод), которые применяются для уменьшения вязкости крови.

Дополнительные тесты для оценки плазменного гемостаза

Несмотря на то что в тестах АЧТВ и ПВ участвуют большинство плазменных факторов, далеко не во всех случаях при патологии того или иного звена или действии лекарственных препаратов меняются эти показатели (табл. 5.6). Однако при выявлении удлинения скрининговых тестов нужно определить, с дефицитом какого фактора или действием какого ингибирующего (подавляющего коагуляцию) агента имеем дело. Для этого выполняются коррекционные пробы.

Коррекционные пробы

Если АЧТВ исследуемой плазмы оказалось удлиненным, то для выявления дефицита факторов могут проводиться *коррекционные пробы (микс-тесты)* с применением нормальной плазмы или *контрольных плазм*. Если имеется подозрение на изолированный дефицит фактора, в коррекционных пробах могут использоваться плазмы, дефицитные по отдельным факторам (рис. 5.9). Например, при гемофилии А (дефицит ф. VIII) АЧТВ с плазмой пациента будет удлинено. При добавлении к такой плазме референтной нормальной плазмы или плазмы, дефицитной по другому фактору (например, по ф. IX), время свертывания в тесте АЧТВ восстановится до нормальных значений, поскольку с добавленной плазмой был внесен ф. VIII, отсутствовавший в плазме больного гемофилией А. Если же к плазме больного добавить контрольную плазму, дефицитную по ф. VIII, то время коагуляции в тесте АЧТВ останется увеличенным. Это доказывает, что как в плазме больного, так и в контрольной, дефицитной только по ф. VIII, отсутствует один и тот же компонент (в данном случае – ф. VIII).

При удлинении ПВ коррекционную пробу для выявления дефицита ф. VII проводят клоттинговым методом с плазмой, лишенной ф. VII. Метод аналогичен определению активности факторов в тесте АЧТВ, однако при анализе активности ф. VII используется тест ПВ. В настоящее время с помощью модифицированных тестов АЧТВ и ПВ клоттинговым методом проводят не только качественное, но и количественное определение активности дефицитных факторов.

Таблица 5.6. Изменение АЧТВ и ПВ при патологии отдельных компонентов плазменного звена гемостаза и влиянии некоторых лекарственных средств

Дефицит фактора/терапия	ПВ	АЧТВ	Комментарий
Дефицит фактора XII, ВМК или ПК	Норма	Удлинено	При использовании некоторых реактивов АЧТВ не меняется
Дефицит факторов XI, VIII или IX	Норма	Удлинено	Степень удлинения АЧТВ зависит от реактивов
Дефицит факторов X, V или II	Удлинено	Удлинено умеренно или не изменено	ПВ более чувствительно
Дефицит фактора VII	Удлинено	Норма	Подтип фактора VII Padova определяется только с тромбопластином из мозга кролика
Дефицит фибриногена, дисфибриногенемия	Норма/ удлинено	Норма/ удлинено	Зависит от реагентов и использованного прибора, при фибриногене >1 г/л обычно норма
Гепарин в терапевтических концентрациях	Норма/ удлинено редко (зависит от реактивов)	Удлинено / не определяется	Влияние гепарина на АЧТВ зависит от использованных реактивов
Низкомолекулярный гепарин	Норма/граничные изменения	Норма / удлинено редко	Изменения АЧТВ зависят от использованных реактивов
Лечение антивитамином К препаратами	Удлинено	Тенденция к удлинению за счет витамин-К-зависимого фактора IX	АЧТВ менее чувствительный показатель, чем ПВ
Прямой ингибитор тромбина – дабигатран	Удлинено незначительно, чаще нормальное	Удлинено не более чем в 2 раза	АЧТВ более чувствительный показатель, чем ПВ
Прямые ингибиторы фактора X	Удлинено на фоне приема ривароксана, реже – аликсана	Норма	ПВ более чувствительно, но нет зависимости от дозы; меняется на разных реагентах
Синдром ДВС	Удлинено / норма	Удлинено / норма	Зависит от тяжести и стадии ДВС
Волчаночный антикоагулянт	Норма / очень редко удлинение	Удлинено / норма	При наличии волчаночного антикоагулянта ПВ, как правило, нормально. Удлинение АЧТВ зависит от реактивов
Тяжелая патология печени	Удлинено	Удлинено	Зависит от реактивов и приборов
Дефицит фактора XIII	Норма	Норма	Не влияет на АЧТВ и ПВ

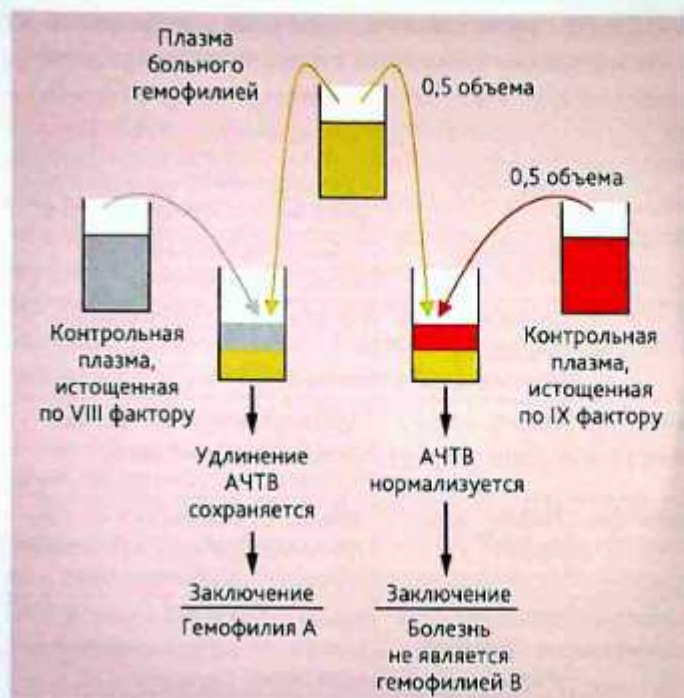


Рис. 5.9. Принцип проведения коррекционной пробы. К плазме больного гемофилией добавляются дефицитные по одному из факторов плазменного гемостаза (в отношении 1:1). Если АЧТВ после добавления коррекционной плазмы не восстанавливается, то в плазме больного и в фактор-дефицитной плазме отсутствует один и тот же фактор. Если же АЧТВ восстановилось до нормы, значит, с коррекционной плазмой был внесен недостающий фактор, и подбор фактор-дефицитных плазм следует продолжать

Определение факторов с использованием хромогенных субстратов

При исследовании отдельных факторов, обладающих ферментной активностью, или ингибиторов, которые не определяются в простых коагуляционных тестах, могут применяться *синтетические хромогенные и флуорогенные субстраты*. Их использование во многих случаях позволяет оценить протеолитическую активность отдельных факторов плазменного гемостаза, поскольку почти для каждого фактора-фермента можно подобрать свой специфический хромогенный субстрат. Принципы методик одинаковы с тестами клинической химии (кинетическое определение активности ферментов), поэтому методы могут выполняться на биохимических анализаторах.

Принцип дифференцирования истинного дефицита факторов и действия ингибиторов

Удлинение АЧТВ и/или ПВ может быть вызвано дефицитом факторов свертывания или присутствием ингибиторов, в частности аутоантител, волчаночного антикоагулянта. Для дифференцирования дефицита факторов свертывания от присутствия специфического ингибитора или от волчаночного антикоагулянта необходимо провести скрининговое исследование (количество тромбоцитов, АЧТВ, ПТ), исследование коррекции активности факторов или скрининговых тестов при смешивании тестируемой плазмы с нормальной контрольной плазмой и тест разведения. Принцип проведения теста в этом случае представлен на рис. 5.10. Если

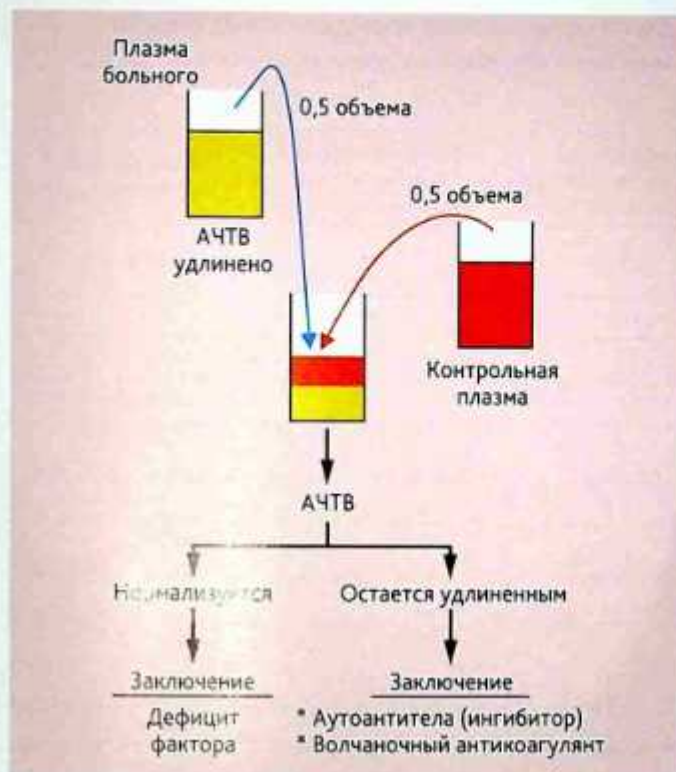


Рис. 5.10. Способ на основе АЧТВ для дифференциальной диагностики между дефицитом фактора или присутствием ингибитора (волчаночного антикоагулянта). Если при добавлении к плазме больного с удлинением АЧТВ контрольной плазмы АЧТВ восстанавливается, то в плазме больного был дефицит фактора. Если АЧТВ не восстанавливается в полной мере, то в плазме больного присутствует ингибитор, в частности, им может быть волчаночный антикоагулянт

при добавлении к плазме больного с удлинением АЧТВ контрольной плазмы, содержащей все факторы, АЧТВ восстанавливается, то в плазме больного был дефицит фактора. Если АЧТВ не восстанавливается в полной мере, то в плазме больного присутствует ингибитор, в частности, им может быть волчаночный антикоагулянт, который блокирует фосфолипидную матрицу.

Соотношения компонентов могут быть разными. Чаще применяется смешивание 1 : 1 (1 часть исследуемой плазмы и 1 часть контрольной), это соотношение удобно для подсчета и обладает неплохой чувствительностью. При низкой активности ингибитора можно использовать 2 части исследуемой плазмы и 1 часть контрольной. При высокой активности можно использовать соотношение 1 : 4 и более и по степени коррекции косвенно судить об активности ингибитора.

После смешивания необходимо проводить тесты немедленно и через 1 час инкубации, что позволяет судить о характере ингибитора (табл. 5.7). Коррекционная проба должна инициироваться врачом лаборатории при наличии изолированного и необъяснимого удлинения одного из скрининговых тестов – АЧТВ или ПВ.

Для дифференциальной диагностики между истинным и вторичным дефицитом можно провести пробу с разведением, по крайней мере, до 3 разных концен-

Таблица 5.7. Дифференциальная диагностика врожденного дефицита факторов VIII и IX, специфического ингибитора и волчаночного антикоагулянта

Тесты	Врожденный дефицит факторов внутреннего пути	Специфический ингибитор факторов внутреннего пути	Волчаночный антикоагулянт
Количество тромбоцитов	Н	Н	Н или ↓
Время кровотечения	Н	Н	Н
АЧТВ	↑	↑	↑
ПТ	Н	Н	Н или ↑
Тест смешивания. Исследование сразу после смешивания	Коррекция	Обычно коррекция	Нет коррекции
Тест смешивания. Исследование после часовой инкубации	Коррекция	Нет коррекции	Нет коррекции

траций. Пробы с дефицитом показывают при разведении одинаковый расчетный процент фактора в цельной плазме. Пробы, в которых присутствует ингибитор, при разведении показывают относительное увеличение фактора, что связано с диссоциацией комплекса «фактор–ингибитор» и освобождением фактора из блокированного состояния (рис. 5.11).

В случаях нечувствительности АЧТВ к волчаночному антикоагулянту (ВА) или при незначительной гипокоагуляции по АЧТВ коррекция может произойти при наличии ВА как причины удлинения АЧТВ. Алгоритм срабатывает только для АЧТВ, чувствительного к ВА. В связи с этим рекомендуется в качестве критерия коррекции использовать индекс циркулирующего антикоагулянт-

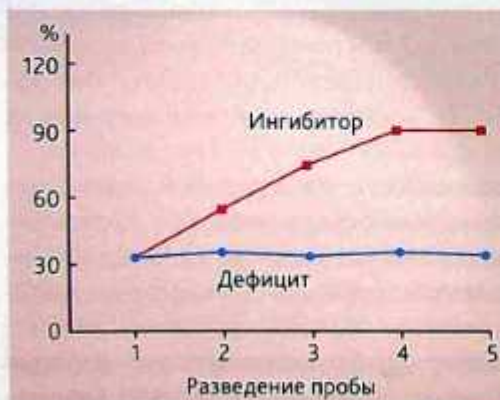


Рис. 5.11. Метод разведения пробы позволяет различить истинный дефицит фактора и его ингибирование. При истинном дефиците разведение не меняет относительной активности фактора, а при подавлении активности фактора ингибитором разведение сопровождается относительным повышением активности фактора

та (ИЦА, индекс Рознера). Коррекцию АЧТВ или ее отсутствие определяют по уравнению:

$$\text{ИЦА} = \left[\frac{b-c}{a} \right] \times 100,$$

где a , b , c являются значениями времени свертывания плазмы пациента, смеси и нормальной плазмы соответственно.

АЧТВ считается скорректированным, если ИЦА меньше 12%; отсутствие коррекции – при ИЦА больше 15%. Между 12 и 15% зона считается «серой» (исследование нужно повторить). Нормализация АЧТВ при проведении теста смешивания подтверждает дефицит фактора свертывания и указывает на необходимость его исследования. Отсутствие коррекции указывает на присутствие антикоагулянта. Хотя присутствие циркулирующего ВА обычно не вызывает повышенного риска кровотечений, а, наоборот, сопряжено с тромбозами, наличие этого антикоагулянта может сочетаться с дефицитом фактора свертывания, маскируя его. Следовательно, отсутствие коррекции АЧТВ при проведении теста смешивания указывает на необходимость исследования дефицита факторов свертывания при наличии клинической картины кровоточивости.

При удлинении только ПВ необходимо выполнить определение активности фактора VII. Это исследование может быть выполнено с использованием только одного разведения плазмы из-за низкой вероятности интерференции на результаты исследования, вызванной ВА, так как тромбопластины малочувствительны к ВА. Обнаружение дефицита фактора VII зависит от используемого тромбопластина, некоторые тромбопластины нечувствительны к дефициту фактора VII.

При удлинении только АЧТВ необходимо выполнить исследования факторов VIII, IX, XI, XII. Исследование нескольких разведений плазмы может использоваться для исключения интерференции, вызванной волчаночным антикоагулянтом, вследствие того что исследование в одном разведении плазмы может привести к ошибочной интерпретации результатов теста.

При удлинении АЧТВ и ПВ необходимо исследовать факторы общего пути свертывания: фибриногена, протромбина, факторов V и X. Исследование факторов II, V и X может быть выполнено как для одного, так и для нескольких разведений плазмы пациента. Нередко дефицит группы витамин-К-зависимых факторов или одного из них ведет к удлинению только ПВ. При этом АЧТВ остается интактным.

Определение антикоагулянтов

Определение показателей системы протеина С

Определение протеина С

Для определения протеина С разработано несколько методов: коагуляционный вариант, метод с хромогенным субстратом, иммунохимический метод. Для функциональных методов используется специфический активатор протеина С из

яда змеи щитомордника, обозначаемый как «протак». Определение протеина С рекомендуется проводить:

- при комплексном обследовании для выявления причин тромбозов (определение антитромбина, протеина S и др.);
- клинических проявлениях артериальных и венозных тромбозов: инфаркт миокарда, инсульт, тромбоэмболия легочной артерии, тромбозы глубоких вен нижних конечностей, развившихся в молодом возрасте до 45–50 лет без провоцирующего фактора;
- симптомах врожденных тромбозов, предположительно связанных с дефицитом протеина С;
- патологии беременности: преэклампсия, эклампсия, внутриутробная задержка развития плода, спонтанные аборт, повторные выкидыши;
- терапии антивитаминов К препаратами в случае развития варфариновых некрозов кожи;
- диагностике неявного синдрома ДВС, особенно в случае сепсиса.

Определение протеина С коагуляционным методом

Пробы пациентов сопоставляются с дефицитной по протеину С плазмой, которую получают методом иммуносорбции. Протеин С в образцах исследуемой плазмы активируется протаксом. Активированный протеин С вызывает протеолиз, и соответственно, инактивацию факторов Va и VIIIa в плазме (рис. 5.12). Последнее сопровождается удлинением времени свертывания в тесте АЧТВ, по которому оценивается активность протеина С в плазме пациента. Если фактор Va не чувствителен к активному протеину С, то АЧТВ не удлинится в присутствии активатора протеина С. Рассчитывают отношение АЧТВ с Protac®/АЧТВ без Protac®, величина которого определяется в конкретной лаборатории, так как тест зависит от использованных приборов и реактивов. Тем не менее этот коэффициент близок к 1 практически у всех больных с фактором Лейден и с дефицитом протеина С и существенно выше 1 в случаях без дефицита активности протеина С и при дисфункции протеина S. Метод легко автоматизируется.

Методика определения протеина С коагуляционным методом достаточно трудоемка, требует существенных затрат времени. Может отмечаться ложное занижение результатов на фоне приема варфарина, а также искаженные результаты

Стадия активации/ инактивации	А: факторы контакта + АЧТВ-реактивы → ф.XIa Б: протеин С _(проба) + протак → APC В: APC + ф.VIII/ф.V _(проба) → ф.VIII _{неакт.} + ф.V _{неакт.}
Измерение	ф.XI, другие факторы свертывания + ФЛ + Ca ²⁺ → Сгусток

Рис. 5.12. Принцип определения протеина С коагуляционным методом: APC – активированный протеин С, ФЛ – фосфолипиды

в присутствии фактора V Лейден, волчаночного антикоагулянта и высоких доз гепарина. У некоторых пациентов, принимающих антивитамины К препараты, выявляются чрезвычайно низкие цифры содержания протеина С; эти результаты могут быть связаны не только с истинным дефицитом протеина С, но и с развитием резистентности фактора Va к APC. Для получения достоверных результатов очень важно качество используемой протейн-С-дефицитной плазмы.

Определение протеина С с использованием хромогенного субстрата

Определение основано на активации протеина С активатором «Протак» с последующим определением изменения оптической плотности пробы из-за образования паранитроанилина (рис. 5.13). Этот метод прост, специфичен, легко автоматизируется. Так как протеин С – витамин-К-зависимый гликопротеин, то при лечении антагонистами витамина К появляются PIVKA (Proteins Induced in Vitamin K Absence) – формы протеина С, которые не обладают антикоагулянтной активностью, но определяются методами с хромогенными субстратами. Поэтому у больных, принимающих антивитамины К препараты, могут быть завышенными результаты определения протеина С хромогенными методами.



Рис. 5.13. Принцип определения протеина С с использованием хромогенного субстрата. APC – активированный протеин С

Определение протеина С иммунохимическим методом

Иммунохимическое определение протеина С применяется реже, чем функциональные методы. Это объясняется тем, что данный способ выявляет только классическое снижение концентрации протеина С и не определяет его функциональную неполноценность. Методическим обеспечением этого определения чаще всего служат автоматизированный турбидиметрический метод или ELISA-тест.

Оценка результатов определения протеина С

В норме активность протеина С у взрослых составляет 70–140% от уровня референтной нормальной плазмы (РНП).

Небольшое повышение протеина С отмечается во время беременности, а уменьшение – в послеродовом и послеоперационном периодах.

Снижение содержания (активности) протеина С наблюдается:

- при врожденном (наследственном) дефиците или аномалиях протеина С с повышенным риском венозных тромбозов (встречается редко);
- геморрагической болезни новорожденных;

- заболеваниях печени с нарушением функции;
- синдроме острой дыхательной недостаточности;
- менингококковом сепсисе;
- синдроме ДВС;
- гемодиализе;
- лечении L-аспарагиназой;
- лечении антивитамином К препаратами.

Отдельные результаты могут колебаться в зависимости от используемых методов и тест-наборов. Повышение протеина С клинического значения не имеет.

Резистентность к протеину С

Резистентность (устойчивость) ф. Va к ингибирующему воздействию активированным протеином С (APCR) – один из серьезных факторов риска патологических тромбозов. APCR – нарушение функционирования системы протеина С. Если в норме при добавлении APC к плазме происходит удлинение АЧТВ, при APCR добавление APC может не сопровождаться удлинением, либо АЧТВ удлиняется существенно меньше (рис. 5.14).



Рис. 5.14. Резистентность к активированному протеину С (APCR) при мутации в гене, контролирующем синтез фактора V, и приводящей к образованию фактора Лейден. Тест основан на определении АЧТВ

Факторы, которые влияют на APCR, представлены в табл. 5.8. APCR может быть как врожденной, так и приобретенной. Врожденная APCR в 95% случаев обусловлена мутацией гена фактора V (Leiden), в результате которой меняется аминокислотная последовательность в белковой структуре фактора V, закрывается сайт связывания с PC, и активированная форма ф. V становится не чувствительной к APC. В случае наследования APCR гетерозиготы имеют риск развития тромбозов примерно в 7 раз, а гомозиготы – в 80 раз выше, чем в среднем по популяции. APCR была обнаружена среди 20% больных с первичным тромбозом глубоких вен бедра. По некоторым данным, до 60% больных с тромбозом глубоких вен бедра имеют APCR.

Скрининговые тесты на APCR разработаны на основе модифицированного теста АЧТВ, который проводится с и без APC, или на основе ПВ со змеиным ядом.

Таблица 5.8. Факторы, влияющие на резистентность к APC

Наследственные факторы: фактор V Лейден (Arg 506 → Гли); фактор V Кембридж (Arg 306 → Тир), редкая мутация; гомозиготность по HR2 гаплотипу в гене фактора V, редкая мутация.
Приобретенная патология: волчаночные антикоагулянты; беременность; использование антивитамина К препаратов; увеличение активности фактора VIII.

*Тест резистентности фактора Va к APC
на основе модифицированного АЧТВ*

Добавление APC в норму вызывает удлинение АЧТВ за счет инактивации факторов Va и VIIIa в плазме. Поэтому в тесте сравнивается время выпадения сгустка в тесте АЧТВ с добавлением и без добавления APC и рассчитывается отношение (рис 5.15). Референтные значения теста зависят от используемых реактивов и приборов. Тем не менее, несмотря на разные методы и приборную базу, обычно добавление APC к плазме приводит, по крайней мере, к двукратному удлинению АЧТВ. Недостаточное удлинение АЧТВ (патологический результат) свидетельствует об APCR.

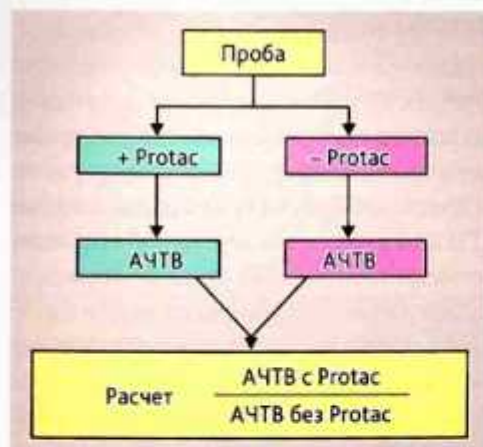


Рис. 5.15. Принцип скрининга на резистентность к активированному протеину С (APCR). Активатор протеина С из змеиного яда (Protac®), добавленный к пробе, в норме удлиняет АЧТВ по крайней мере в 2 раза. Если же имеет место APCR, то удлинения АЧТВ в присутствии Protac® не происходит

Этот тест имеет специфичность для выявления фактора V Лейден примерно 80%, неполная специфичность связана с влиянием на результат других факторов, в частности с подавлением активности фактора VIIIa. На результаты теста оказывают влияние прием антивитамина К препаратов и введение гепарина. Тест полезен для выявления пациентов с высоким риском тромбозомболической болезни.

Тест для диагностики фактора V Лейден

Мутация гена фактора V (фактор Лейден) оценивается как наиболее распространенная причина APCR. Эту патологию можно выявить при проведении теста на APCR с плазмой пациента, сравнивая результат с плазмой с дефицитом ф. V. Этот тест обладает высокой специфичностью и чувствительностью на выявление фактора V Лейден. При внесении активатора протеина C (очищенный фермент из яда щитомордника) вместе с фактором контакта в смесь нормальной и дефицитной по ф. V плазмы время свертывания в тесте АЧТВ удлинится примерно в 2 раза. Если имеется APCR, удлинение АЧТВ составляет менее 80% удлинения АЧТВ, характерного для плазмы, в которой APC проявляет нормальное ингибирующее действие на ф. Va. Окончательная диагностика наличия фактора V Лейден проводится по молекулярно-генетическому исследованию на выявление соответствующей мутации.

Определение протеина S

Протеин S – витамин-K-зависимый белок, служит кофактором активированного протеина C. В норме концентрация протеина S составляет 20–25 мкг/мл. 60–70% протеина S представлено свободной формой, 30–40% – формой, связанной с белком C4-bP. Врожденное снижение уровня / активности протеина S в плазме относится к тромбофилическим состояниям. Приобретенный дефицит также может приводить к тромбозам. Исследование протеина S нельзя выполнять на фоне антикоагулянтной терапии любыми пероральными препаратами из-за риска получения ложно сниженных результатов.

Определение протеина S коагуляционным методом

Для определения протеина S необходимо использовать тест-систему, содержащую очищенный активный протеин C, его субстрат – фактор Va и дефицитную по протеину S плазму. После инкубации исследуемой плазмы с тест-системой определяют время свертывания, выполняя тест АЧТВ или индуцируя активацию змеиным ядом, фосфолипидами и Ca^{2+} . Удлинение времени свертывания пропорционально активности протеина S. Специфичность метода относительная, так как фактор V Лейден, высокий уровень ф. VIII и волчаночный антикоагулянт могут существенно влиять на результаты теста, а именно с этими факторами часто проводят дифференциальную диагностику, определяя протеин S. На результаты влияют качество дефицитной плазмы и препаратов APC, а также состав фосфолипидов, поэтому значения теста зависят от конкретного производителя. Так как коагуляционный метод подвержен действию многих интерферирующих факторов и не стандартизован, то предпочитают использовать иммунохимический метод для определения протеина S.

Определение протеина S иммунохимическим методом

Иммунохимический метод достаточно широко распространен. Первая генерация тест-наборов определяла «общий протеин S», включая свободную форму и форму протеина S, связанную с белком C4-bP. Наборы последних генераций

позволяют определять «свободный протеин S» прямо без предварительной обработки. Чаще всего используют турбидиметрический метод с полистироловыми частицами или метод ELISA. Недостатком иммунохимического метода является то, что он выявляет протеолитически не активные формы протеина S, которые иногда появляются в плазме.

Оценка результатов

Основной причиной снижения активности протеина S является его врожденный дефицит, связанный со снижением как количества (антигена), так и активности его общей и свободной формы. Это состояние относится к наследственным тромбофилиям; встречаемость в популяции невелика – до 1%. Симптоматические формы дефицита протеина S характерны для недостаточности витамина K и приема антивитаминов K, тяжелых поражений печени, острого синдрома ДВС, приема эстрогенов (пероральных контрацептивов).

Относительный дефицит протеина S наблюдается при повышении C4-bP. C4-bP – белок острой фазы, его количество повышается в плазме крови при воспалении, аутоиммунных реакциях, при беременности, у женщин, принимающих стероидные контрацептивы. C4-bP определяют методом иммунотурбидиметрии или ELISA.

Определение плазменного антитромбина

Антитромбин определяют по активности – тестами с хромогенными субстратами, либо по количеству – иммунохимическими методами (ELISA, турбидиметрия, нефелометрия). Методом с хромогенным субстратом определяется активность антитромбина (активированного гепарином) в отношении блокирования тромбина или фактора Ха; принцип представлен на рис. 5.16. Нормальной считается активность АТ в пределах 75–125% от уровня контрольной нормальной плазмы.

Ингибирование	$\text{Ф.Ха}_{(\text{активный})} + \text{АТ} \xrightarrow{\text{Гепарин}} \text{Ф.Ха-АТ}_{(\text{невет})} + \text{Ф.Ха}_{(\text{остаточный})}$
Измерение	$\text{Ф.Ха}_{(\text{остаточный})} + \text{хромогенный субстрат} \longrightarrow \text{pNA}$

Рис. 5.16. Определение активности антитромбина хромогенным методом (по ингибированию Ф.Ха)

У новорожденных уровень АТ составляет около 50% и достигает уровня взрослых к 6 месяцам. Небольшое снижение АТ наблюдается в середине менструального цикла, в пред- и послеродовом и послеоперационном периодах. Эти сдвиги более выражены у пациентов с А (II) группой крови, а также у пожилых.

Снижение содержания и/или активности АТ отмечается:

- при врожденных (наследственных) дефицитах АТ с высоким риском венозных тромбозов (встречается редко);
- заболеваниях печени (опухоли, цирроз, алкогольный гепатит);
- нефротическом синдроме (протеинурия свыше 5 г/л);
- множественных травмах, синдроме ДВС, сепсисе (гиперпотребление);
- поздних гестозах, тяжелых родах;
- приеме эстрогенов (оральных контрацептивов), глюкокортикоидов, частом длительном введении гепарина.

Тест может применяться в ходе терапии гепарином при подозрении на отсутствие чувствительности к препарату. Длительная гепаринотерапия может приводить к снижению активности АТ в плазме. Лечение высокими дозами гепарина, особенно нефракционированным гепарином, приводит к транзиторному снижению АТ по механизму потребления (рис. 5.17), особенно у больных с тяжелой патологией, в критических случаях, при синдроме ДВС, сепсисе, злокачественных опухолях. Уровень антитромбина ниже 70% считается критичным, при котором начинает падать эффективность гепаринотерапии.

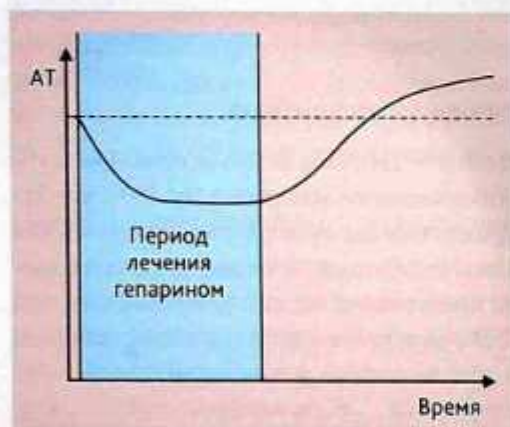


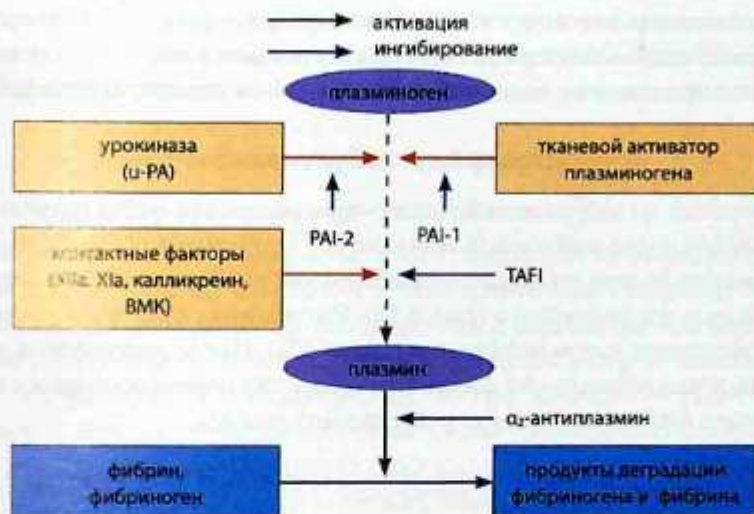
Рис. 5.17. Снижение уровня антитромбина (АТ) в плазме в период активного лечения нефракционированным гепарином. Критичным является уменьшение антитромбина больше чем на 30%, в этом случае гепарин перестает оказывать гипокоагуляционный эффект

Увеличение содержания (активности) АТ может быть связано с действием гормонов (эстрогенов), клинического значения не имеет.

Тесты для исследования фибринолитической системы

Основным функциональным ферментом фибринолиза является плазмин, который лизирует фибрин до продуктов деградации фибрина (ПДФ), включая образующиеся D-димеры. На образование плазмина влияют как активаторы, так и ингибиторы. В настоящее время разработаны тесты на основе ИФА, ИХА, хромогенных субстратов, которые позволяют определять как количество, так и активность активаторов, ингибиторов, компонентов фибринолитической системы.

МОНИТОРИНГ ПЛАЗМИНОВОЙ СИСТЕМЫ И ПЛАЗМЕННОГО ЗВЕНА ГЕМОСТАЗА



Мониторинг гемостаза. Точность. – 2019. – №5 (122) – с. 21-28.

Кат. номер	Производитель	Наименование
2599006	Technoclone	D-димер 96
TC12075	Technoclone	Ингибитор активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), 96
TC16075	Technoclone	Ингибитор активатора плазминогена 1 типа (PAI-1 Actibind) количественное определение активного PAI-1, 96
TC12007	Technoclone	Тканевой активатор плазминогена (t-PA), 96
TC16000	Technoclone	Тканевой активатор плазминогена (t-PA Combi Actibind, определение антигена и активности), 96
TC16010	Technoclone	Урокиназный активатор плазминогена (u-PA Combi Actibind, определение антигена и активности), 96
5345003	Technoclone	C1-ингибитор, определение активности в плазме, (хромогенный тест, 405 нм)
TC12040	Technoclone	Плазминоген (Glu-плазминоген), 96
TC12080	Technoclone	Комплекс t-PA/PAI-1, 96
TC12060	Technoclone	Комплекс плазмин/ 2-антиплазмин (PAP), 96
SEA531Hu	Cloud-Clone Corp.	Ингибитор активатора плазминогена типа 2 (PAI-2), 96
ELH-CARBX82-1	RayBiotech	Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI, карбоксипептидаза B2), 96
5006013	Technoclone	Тест генерации тромбина (TGA) — интегральный показатель состояния системы гемостаза. Три модификации. Technothrombin TGA (Ceveron TGA KIT [Thrombophilia/Haemophilia]), 120
5006015		
5006011		



ЗАО БиоХимМак / 119991 Москва, Ленинские Горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, д.1, строение 11 / телефон (495) 647-27-40, 939-10-50 / факс (495) 939-09-97 / e-mail: info@biochemmack.ru / www.biochemmack.ru

В частности, для тканевого (t-PA) и урокиназного (u-PA) активаторов плазминогена существуют ИФА тест-системы для определения как по белку (концентрация), так и комбинированные тест-системы (ИФА + хромогенный методы), позволяющие определять в одной лунке и активность фермента с помощью хромогенного субстрата, и белок классическим методом ИФА. В данном разделе рассмотрим тесты, характеризующие процесс лизирования фибрина, определение плазмينا, его активаторов и ингибиторов. Тесты определения ПДФ и D-димеров, которые могут быть использованы для оценки активности фибринолиза, будут представлены в следующем разделе «Маркеры активации свертывания крови», так как их клинико-диагностическое значение более широкое, чем только характеристика фибринолиза.

Спонтанный эуглобулиновый лизис

Спонтанный эуглобулиновый лизис – традиционный метод оценки фибринолиза. В кислой среде при низкой температуре происходит осаждение эуглобулиновой фракции белков плазмы, содержащей фибриноген, факторы свертывания, плазминоген и его активаторы (рис. 5.18). Ингибиторы фибринолиза выпадают в осадок в незначительном количестве (около 2%). После растворения эуглобулиновой фракции и образования фибринового сгустка определяют время его лизиса, что отражает фибринолитическую активность плазмы.



Рис. 5.18. Компоненты фибринолитической системы, которые определяют результаты метода «спонтанный эуглобулиновый лизис». Эуглобулины, выпавшие в осадок, растворяются фибринолитической системой. Чем активнее фибринолиз, тем быстрее происходит лизис эуглобулинов

Укорочение времени лизиса эуглобулинов (активация фибринолиза) отмечается:

- при уменьшении концентрации фибриногена – гипо-/дисфибриногемия;
- увеличении содержания плазминогена и его активаторов – панкреатит, панкреонекроз, метастазирующий рак предстательной железы, легкого, яичников, метастазы меланомы, операции на легких, предстательной, поджелудочной железе, гиперкатехоламинемия (стресс, тиреотоксикоз, гипертонический криз, введение адреналина), шок, патология беременности, терминальные и другие состояния, сопровождающиеся развитием синдрома ДВС, цирроз, рак, метастатическое поражение печени (снижение антиплазминовой и антиактиваторной функции).

Увеличение времени лизиса эуглобулинов (угнетение фибринолиза) отмечается:

- при гиперфибриногемии;
- дефиците плазминогена и его активаторов – рецидивирующие венозные тромбозы, системные васкулиты, сепсис, нефротический синдром, гипо-

коагуляционная стадия синдрома ДВС, цирроз печени (нарушение синтеза плазминогена).

Метод недостаточно специфичен, он требует учета исходного содержания в плазме фибриногена. В методе идет лизис фибрина, образовавшегося в конкретной пробе пациента, а не какого-то стандартного количества. Метод очень трудоемок и исключительно ручного исполнения. При снижении фибриногена время лизиса укорачивается, что трактуется ошибочно как гиперфибринолиз. При гиперфибриногенемии время лизиса удлиняется. Поэтому при отклонениях содержания фибриногена в плазме, а также неполноценной полимеризации фибрина и гепаринемии, возможно получение ошибочных результатов.

Определение компонентов фибринолиза

Определение плазминогена и плазмина

Дефицит плазминогена – один из потенциальных факторов риска тромбоза, хотя клинически это подтверждается не всегда. Клиническое значение определения уровня плазминогена до конца не определено, а нормальная концентрация не обеспечивает достаточной функции протеолиза, так как в ее реализацию вмешиваются другие факторы. В методе определения при добавлении стрептокиназы (бактериальный препарат, который используется как тромболитик) к разведенному образцу исследуемой плазмы образуется плазминоген-стрептокиназный комплекс, который обладает ферментативной активностью и способен расщеплять хромогенный субстрат (рис. 5.19). Ферментативная активность комплекса «плазминоген-стрептокиназа» не подавляется α_2 -макроглобулином и α_2 -антиплазмином.

Активация	Плазминоген + стрептокиназа → Плазминоген-СК-комплекс
Измерение	Плазминоген-СК-комплекс + хромогенный субстрат → pNA

Рис. 5.19. Принцип определения плазминогена хромогенным методом. СК – стрептокиназа

Определение продуктов деградации фибриногена и фибрина

Метод основан на взаимодействии поликлональных антител с эпитопами, присутствующими на молекулах фибриногена и на продуктах его превращения и распада. Перед выполнением теста требуется предварительное полное удаление фибриногена из реакционной среды, которое достигается путем добавления к крови активного тромбина или змеиного яда с тромбиноподобным эффектом и быстрого отделения от образовавшегося сгустка. В методе ELISA для определения ПДФ используются моноклональные антитела к эпитопам, которые образуются только при деградации фибрина или фибриногена под влиянием плазмина (соответственно, можно исследовать плазму крови). Тем не менее трудно отдиф-

ференцировать продукты, образующиеся при деградации фибрина, от веществ, сформировавшихся при распаде фибриногена, особенно при назначении активаторов фибринолиза в качестве лекарственных препаратов.

Для определения ПДФ широко применяется метод латекс-агглютинации, который хорошо автоматизируется, но обладает относительно низкой специфичностью.

Положительная качественная проба (содержание ПДФ в плазме/сыворотке выше 0,5 мг/л) может указывать:

- на синдром ДВС (используются и другие значения cut-off, см. раздел по ДВС);
- тромбоз глубоких вен, тромбоэмболию легочной артерии;
- метастазы злокачественных новообразований в легкие, рак яичников;
- проводившуюся фибринолитическую терапию.

Глобальные тесты исследования гемостаза

Коагулологические тесты, представленные выше, измеряют и дают характеристику только отдельных факторов или цепочек реакций из всего каскада свертывания, описывая лишь малую часть процесса свертывания крови. Их относят к локальным тестам. Глобальные тесты представляют собой попытку интегрального подхода к характеристике работы свертывающей системы. Не анализируя отдельные факторы свертывающей системы, они характеризуют конечный этап всего каскада – процесс превращения фибриногена в фибрин и образование фибринового сгустка. На данный момент таких подходов три: тест генерации тромбина, тромбоэластография (тромбоэластометрия) и тромбодинамика. Каждый из этих тестов обладает особенностями, наделяющими его индивидуальными способностями к регистрации различных состояний свертывающей системы крови.

Тромбоэластометрия

Тромбоэластометрия (ТЭМ) – метод глобальной оценки гемостаза, который качественно и количественно позволяет охарактеризовать процесс образования сгустка, его механические характеристики, плотность, стабильность и процесс фибринолиза. В 1948 г. Н. Hartert для оценки системы гемостаза разработал метод исследования – тромбоэластографию (ТЭГ). Проводился анализ с помощью прибора тромбоэластографа, который измерял физические свойства сгустка – конечный результат всех процессов системы гемостаза. Можно было определить, находится ли система гемостаза пациента в пределах нормы или существует риск развития кровотечения или возникновения тромбоза по физическим свойствам сгустка (скорость его образования и роста, прочность, стабильность). Однако первоначально тромбоэластограф обладал недостатками: низкой воспроизводимостью результатов из-за технологических особенностей аппаратного обеспечения (был громоздок, чувствителен к сотрясениям, использовался с применением многогоразовых кювет). В настоящее время усовершенствованный метод представлен двумя видами приборов – тромбоэластометры и тромбоэластографы. Принципы

работы анализаторов схожи. Анализ выполняется на стабилизированной цитратом натрия крови. Принцип тромбоэластометрии: исследуемый образец помещается между двумя поверхностями, на одну из которых подаются вращательно-колебательные движения, а другая соединена с устройством, принимающим и фиксирующим колебания. После добавления в образец активатора свертывания крови начинается образование сгустка. По мере полимеризации фибрина в кювету, в которую помещен вращающийся стержень, специальный механизм анализирует усилие, которое прикладывается к стержню, чтобы заставить его вращаться. Получающаяся кривая зависимости прикладываемых к стержню усилий от времени характеризует процесс свертывания крови, а позже фибринолиза (рис. 5.20).

ТЭМ можно использовать для исследования цельной крови, цельной крови с антикоагулянтами, богатой и бедной тромбоцитами плазмы с цитратом в качестве антикоагулянта.

Наиболее важной информацией, которую можно извлечь из кривой тромбоэластограммы (рис. 5.21), является:

- время до начала образования фибрина (г-время);
- время формирования сгустка (к-время);
- максимальная амплитуда (зависит от концентрации фибриногена, количества и качества тромбоцитов, взаимодействия фибрина и тромбоцитов в сгустке);
- время лизиса тромба.

Метод позволяет исследовать как спонтанную коагуляцию, так и индуцированную активаторами. Применение разных активаторов и реактивов позволяет достичь разнообразных диагностических целей. Метод можно использовать для оценки действия гепарина, фибринолитиков или их ингибиторов. Изменения ТЭМ, которые отражают наиболее распространенные изменения гемостаза, представлены на рис. 5.22. Наряду с изменениями, вызываемыми лекарственными препаратами, ТЭМ позволяет идентифицировать тромбоцитопатии, гиперкоагуляцию и другие нарушения.

Разработаны достаточно компактные тромбоэластометры, которые можно размещать на каталке около постели больного и оценивать процесс гемостаза немедленно после взятия крови, что существенно уменьшает влияние преаналитических факторов. Так как приборы ТЭГ и ТЭМ относят к группе прикроватных методов (диагностика по месту лечения), исследования могут проводить врачи-реаниматологи, анестезиологи вне стен лаборатории. Основными показаниями к использованию ТЭМ/ТЭГ являются urgentные ситуации, при которых важна именно интегральная оценка, то есть понимание того, как работает система гемостаза в целом, и нет времени на проведение последовательных единичных тестов. Ввиду простоты работы с прибором исследование проводит лечащий врач, он же оценивает параметры и полученную кривую, принимая последующие решения. ТЭГ/ТЭМ предоставляет возможность стандартизованного динамического наблюдения за состоянием гемостаза в реанимационных отделениях, операционной и родильном зале. В то же время метод не оправдывает себя при плановых исследованиях по соотношению затраты/информативность. Один из наиболее адаптированных к клиническим исследованиям тромбоэластометр ROTEM показан на рис. 5.23.

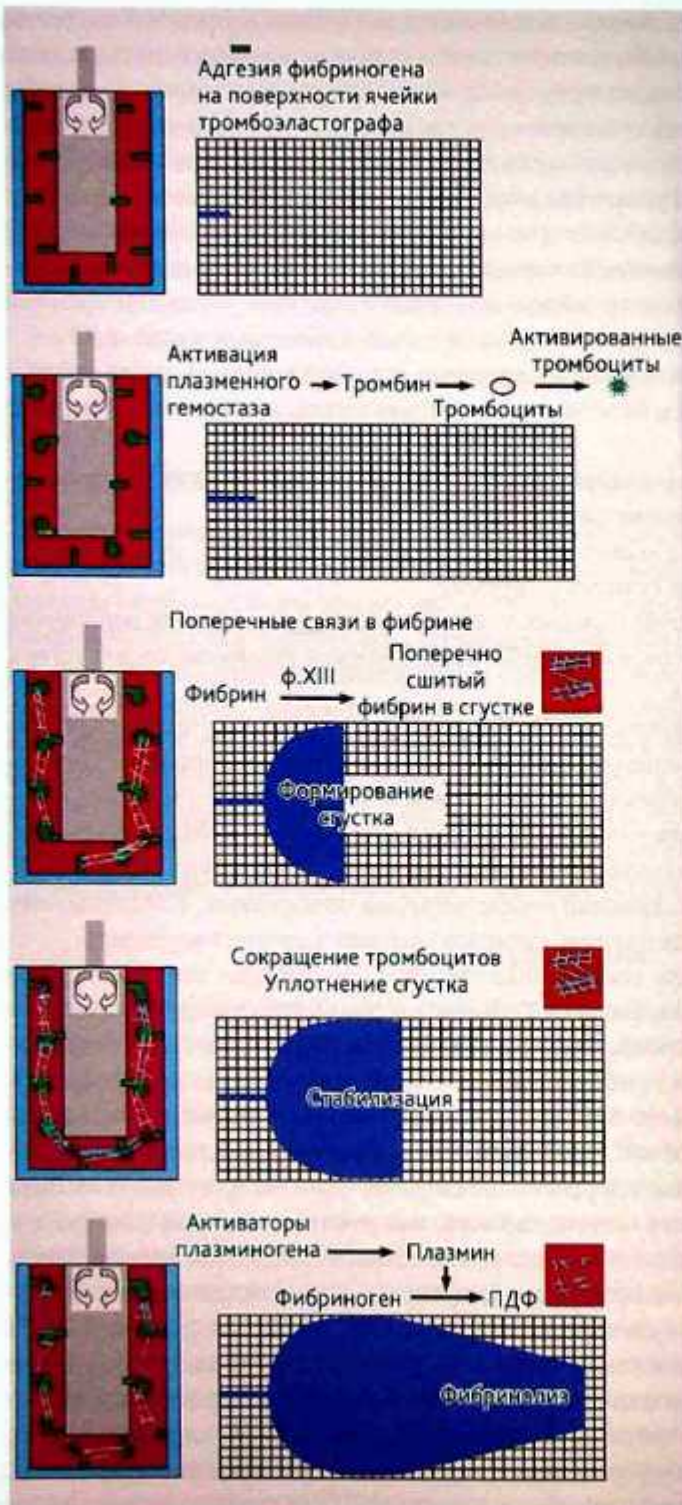


Рис. 5.20. Последовательные этапы формирования сгустка крови и соответствующие изменения на тромбоэластограмме

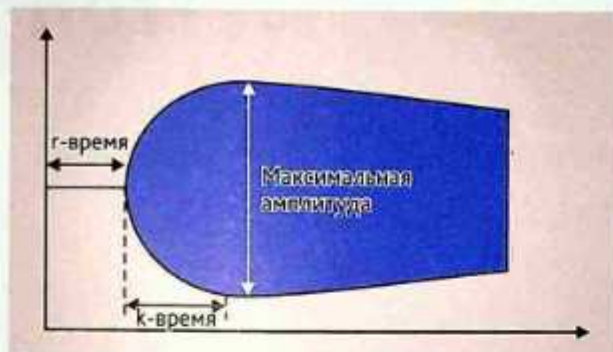


Рис. 5.21. Тромбоэластограмма

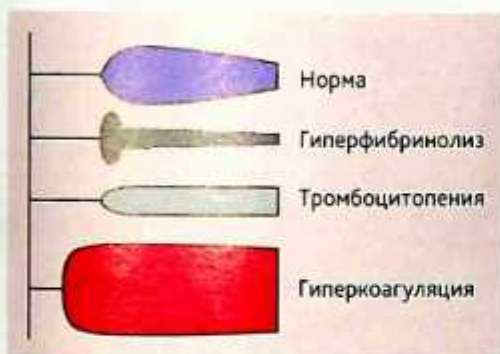
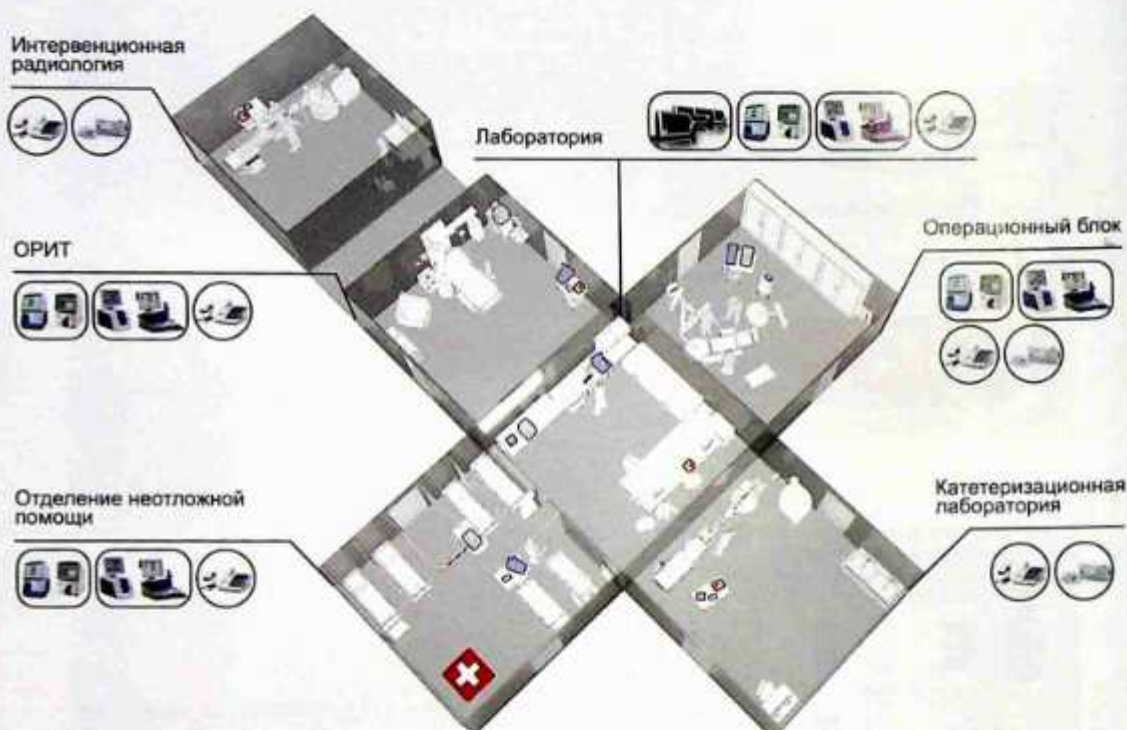


Рис. 5.22. Типичные примеры измененных тромбоэластограм



Рис. 5.23. Тромбоэластометр четырехканальный ROTEM DELTA. Оценивает функциональное состояние всего гемостаза в течение 10–15 мин, взаимодействие факторов и модуляторов гемостаза в цельной крови, механическую стабильность и упругость сгустка, кинетику стабилизации сгустка и его растворения, гиперфибринолиз (практически не определяемый классическими тестами). Все параметры рассчитываются автоматически по полученному графику

Оптимальное решение задач диагностики состояния системы гемостаза



Кроме классического варианта ТЭМ/ТЭГ существуют и другие технологии, решающие аналогичные задачи. Так, для комплексного исследования процессов свертывания цельной крови был разработан метод низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) с помощью специализированного аппаратно-программного комплекса (Тютрин И.И., Удут В.В., Шписман М.Н. и др. Патенты №№ 2282855, 86317, 98251, 2413953, 40110, 107929, 106518, 2184967). Комплекс позволяет оценивать изменения вязко-упругих свойств сгустка в ходе полимеризации фибрина и образования поперечных межмолекулярных связей, его ретракцию и последующий лизис. Принцип действия аппарата основан на регистрации изменения сопротивления исследуемой среды резонансным колебаниям иглы-резонатора, которая закреплена на пьезоэлектрическом элементе и опущена в кювету с кровью пациента (исследуемой жидкостью). Динамика изменений агрегатного состояния крови регистрируется в виде кривой, визуально схожей с тромбоцитарной агрегатограммой (или $\frac{1}{2}$ ТЭГ). Основным преимуществом НПТЭГ является возможность интегральной оценки системы гемостаза при низкой стоимости исследования. Клиническое значение метода продолжает изучаться.

Тест генерации тромбина

Тест генерации тромбина (ТГТ) – интегральный метод, который дает информацию о динамике образования и ингибирования тромбина после активации коагуляции в образце крови. Для проведения ТГТ используют микропланшетные флуориметры для проведения анализа в ручном формате или коагулометры с флуориметрическим блоком для проведения анализа в автоматическом режиме. Методика определения ТГТ основана на том, что тромбин, образующийся в ходе реакции тромбообразования, расщепляет пептидную связь флуорогенного субстрата. В качестве активатора выступают рекомбинантный человеческий тканевый фактор и отрицательно заряженные фосфолипиды. В лунку с активатором добавляется тестируемый образец. После инкубации смеси при температуре 37 °С для запуска каскада системы свертывания в лунки флуориметра вносится буфер, содержащий Ca^{2+} и флуорогенный субстрат. Полное время проведения одного анализа: 25–40 мин. Образующийся тромбин расщепляет субстрат, в результате чего высвобождается молекула флуорофора, излучение которого автоматически регистрируется флуориметром. Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации тромбина, образовавшегося в данный момент времени. На основании измерений флуоресценции посредством программного обеспечения строится кривая генерации тромбина (рис. 5.24). Оценивают площадь под кривой образования тромбина (восходящая часть), достигаемый максимум и нисходящую часть, которая характеризует инактивацию тромбина и соответствующие временные показатели.

С помощью теста генерации тромбина можно определить состояние гипо- и гиперкоагуляции (рис. 5.25), оценить действие лекарственных препаратов, выявить нарушения в системе естественных антикоагулянтов. Дополнительное



Рис. 5.24. Тест генерации тромбина. Определяют время инициации свертывания, мин (Lag time/ LT); пиковую концентрацию тромбина, нмоль/л (Peak thrombin); время достижения пиковой концентрации тромбина, мин (Time to peak); эндогенный тромбиновый потенциал — площадь под кривой генерации тромбина (ETP)

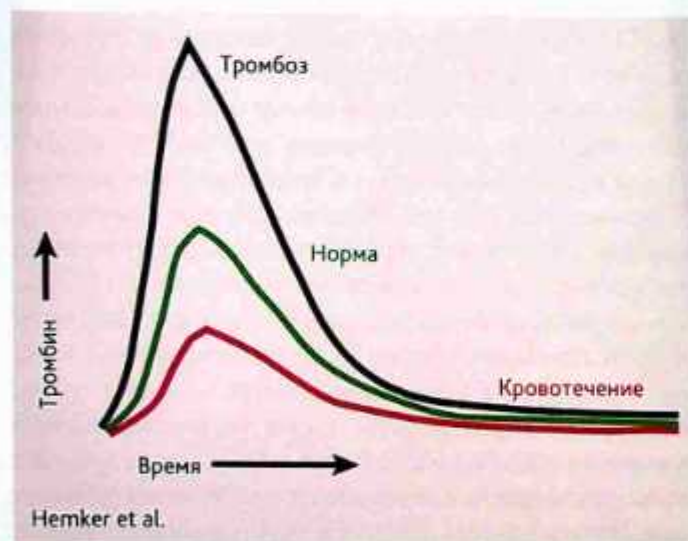


Рис. 5.25. Общая схема образования и инактивации эндогенного тромбина. ТГТ может быть использован для диагностики тромбофилии, выявления гемофилии, мониторинга терапии гемофилии при наличии ингибитора фактора VIII, контроля эффективности антикоагулянтов, в том числе новых; оценки активности гемостаза при беременности; контроля состояния гемостаза при синдроме ДВС

использование в реагентной смеси тромбомодулина позволяет запустить действие и оценить работу системы протеина С.

Важность применения ТГТ состоит в том, что показатели клоттинговых тестов часто остаются неизменными, плохо оценивают гиперкоагуляцию даже при возникновении тромба. При определении отдельных маркеров коагуляции могут выявляться отклонения от референтного интервала, однако это не позволяет судить о наличии гиперкоагуляции в целом, так как изменения отдельных компонентов

CEVERON-ALPHA TGA

(производства Technoclone, Австрия)



АВТОМАТИЧЕСКИЙ КОАГУЛОМЕТР С ФУНКЦИЕЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА

ceveron[®]
alpha



Автоматический коагулометр Ceveron Alpha TGA для широкого спектра исследований системы гемостаза с возможностью адаптации редких методик. Ceveron Alpha TGA включает два измерительных блока:

- **фотометрический блок**
4 независимых измерительных канала, 4 длины волны: 405, 540, 630 и 740 нм для проведения рутинных клоттинговых исследований (АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, ВА, дефицит факторов свёртывания, мутация Лейдена), хромогенных тестов (С1-ингибитор, FVIII, протеин С, АТ-III), определение D-димера турбидиметрическим методом
- **флуориметрический блок**
4 независимых измерительных канала, 360/430 нм для проведения уникальной методики Тест генерации тромбина (TGA) в автоматическом режиме на коагулометре Ceveron Alpha TGA.

Тест генерации тромбина (TGA)

- Интегральный показатель состояния системы гемостаза.
- Универсальный метод для мониторинга антикоагулянтной терапии, тромбофилических и геморрагических состояний.
- Единственный автоматизированный метод для диагностики *In Vitro*.

Мониторинг действия антикоагулянтов



Исследование кинетики образования тромбина флуориметрическим методом позволяет оценить тромбогенный потенциал системы свёртывания, показать действие антикоагулянтов в динамике, что невозможно определить рутинными лабораторными методами.

Хемилюминесцентный
анализатор гемостаза
ACL AcuStar
(IL-Werfen, США)
АФС ГИТ, тромбоз,
болезнь Виллебранда

ОПТИМАЛЬНОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ ЛЮБОЙ ЛАБОРАТОРИИ
МОНИТОРИНГ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Компания БиоХимМак

Диагностика аутоиммунных
заболеваний, включая АФС,
на автоматах:
Alegria (Orgentec, Германия),
BlueDiver (D-tek, Бельгия)

ИФА-наборы
более 200 наименований наборов для
мониторинга системы
свёртывания крови
и диагностики АФС

Автоматические коагулометры
ACL ELITE и ACL TOP
(IL-Werfen, США)
мощность от 130 до 360 ПВ/час
полный скрининг
системы свёртывания
(клоттинговые, хромогенные,
турбидиметрические методики)

Автоматический коагулометр
Ceveron Alpha TGA
(Technoclone, Австрия)
мощность 100 ПВ/час
скрининг системы свёртывания + уникальный
TGA-метод



ЗАО БиоХимМак / 119991 Москва, Ленинские Горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, д.1, строение 11 /
телефон (495) 647-27-40, 939-10-60 / факс (495) 939-09-97 / e-mail: info@biochemmack.ru /
www.biochemmack.ru

свертывающей системы могут быть нивелированы в организме включением компенсаторных механизмов.

Обратная ситуация может наблюдаться в случае, когда изменение отдельных показателей коагулограммы не сопровождается изменением ТГТ. Так, у пациента могут быть повышены фактор VIII, фактор Виллебранда и D-димеры; при этом увеличение активности отдельных прокоагулянтных факторов может быть минимизировано повышением активности антикоагулянтных факторов, показатели ТГТ будут в таком случае в норме. При мониторинге антикоагулянтной терапии у больных, получающих варфарин, руководствуются правилом достижения целевого значения МНО, при котором терапия считается адекватной, однако у пациентов с одинаковыми значениями МНО показатели ТГТ могут значительно отличаться.

ТГТ является универсальным методом оценки тромбогенного потенциала гемостаза и может быть использован для диагностики гиперкоагуляционного синдрома, в т. ч. в педиатрии; выявления гемофилии; мониторинга терапии гемофилии при наличии ингибитора фактора VIII; в качестве дополнительного теста при оценке эффективности антикоагулянтной терапии; оценки активности гемостаза при беременности; контроля состояния гемостаза при рецидивирующих тромбозах (см. клинический случай 5.2), синдроме ДВС. Оценивая результаты исследования ТГТ, необходимо помнить, что в настоящее время тест используется в качестве научного, не включен в клинические рекомендации и не может рассматриваться самостоятельно как основание для принятия клинических решений.

Клинический случай 5.2

Пациентка К., 40 лет, перенесла несколько эпизодов транзиторных ишемических атак (ТИА) в течение последних 6 лет. Сосудистой патологии не выявлено.

Около года назад обследована на наличие гематологических рисков тромбозов. Основные тромбофилические мутации не обнаружены. Имеется гетерозиготное носительство второстепенных полиморфизмов, клинически не значимых. Естественные антикоагулянты (антитромбин, протеин С, протеин S) в норме, в тесте генерации тромбина отмечено снижение эффективности работы системы протеина С. Волчаночный антикоагулянт не обнаружен, антитела к бета-2-гликопротеину-1 и кардиолипину не повышены. Однократное повышение уровня гомоцистеина до 19 мкмоль/л.

В настоящее время помимо определения причин ТИА стоит задача решить вопрос о назначении заместительной гормональной терапии по поводу раннего снижения концентрации эстрогенов. При повторном измерении гомоцистеин – 15,3 мкмоль/л (норма 5–16 мкмоль/л), маркеры активации свертывания – фибриноген, фактор Виллебранда (антиген), активность фактора VIII, D-димер (количественно) – не повышены. Функциональная активность тромбоцитов не повышена. Тест генерации тромбина повторно – показатели в пределах нормы.

Заключение. Данных за патологическую латентную активацию свертывающей системы нет. Необходимо корректировать уровень гомоцистеина приемом

витамина группы В с последующим контролем. Противопоказаний к назначению заместительной гормональной терапии нет, доза препаратов – минимально достаточная. Целесообразна оценка маркеров активации свертывания 1 раз в 6 месяцев.

Комментарий. Причина ТИА остается невыясненной. Возможны сосудистые отклонения (патологическая извитость, варианты развития, васкулит), но в состоянии системы гемостаза патологических нарушений не обнаружено. Интегральный тест генерации тромбина в данном случае продемонстрировал неустойчивый результат, отражая функциональные девиации в момент исследования, либо влияние преаналитического этапа. Учитывая тяжелые клинические проявления раннего климакса, риски тромбоэмболических осложнений представляются менее значимыми по сравнению с предполагаемой пользой приема заместительной гормональной терапии.

Тромбодинамика

Тест тромбодинамики – глобальный тест свертывающей системы крови. С высокой чувствительностью он позволяет выявлять как гипо-, так и гиперкоагуляцию. Подходит для ранней диагностики склонности к тромбообразованию.

Тест тромбодинамики – исследование *in vitro* пространственно-временной динамики свертывания крови, инициированной локализованным активатором свертывания в условиях, близких к условиям свертывания крови *in vivo*. Тест учитывает пространственную неоднородность процессов, происходящих при свертывании крови. Образцы плазмы крови помещаются в каналы прозрачной измерительной кюветы, которая находится в водяном термостате. Затем в каналы кюветы вводится специальная вставка (активатор), на торце которой нанесено нанопокрyтие с активатором свертывания – тканевым фактором (рис. 5.26).

Таким образом, активатор моделирует поврежденную стенку сосyда. Как только плазма крови соприкасается с активатором, начинается процесс свертывания: от локализованного на торце вставки тканевого фактора в объем плазмы начинает расти фибриновый сгусток, в точности как на поврежденной стенке сосyда *in vivo*. Процесс возникновения и роста фибринового сгустка регистрируется цифровой видеокамерой в рассеянном свете. Полученная серия кадров дает детальную информацию о динамике свертывания крови во времени и пространстве. На основе этих данных рассчитываются численные параметры пространственно-временной динамики роста фибринового сгустка: время задержки роста сгустка, скорость роста сгустка, наличие спонтанного тромбообразования (вдали от активатора).

Достоинства метода

- Метод диагностики гемостаза, который учитывает пространственно-неоднородные процессы, происходящие при свертывании крови.
- Тромбодинамика позволяет выявить склонность к гиперкоагуляционным состояниям на ранней стадии, когда другие методы еще недостаточно чувствительны.

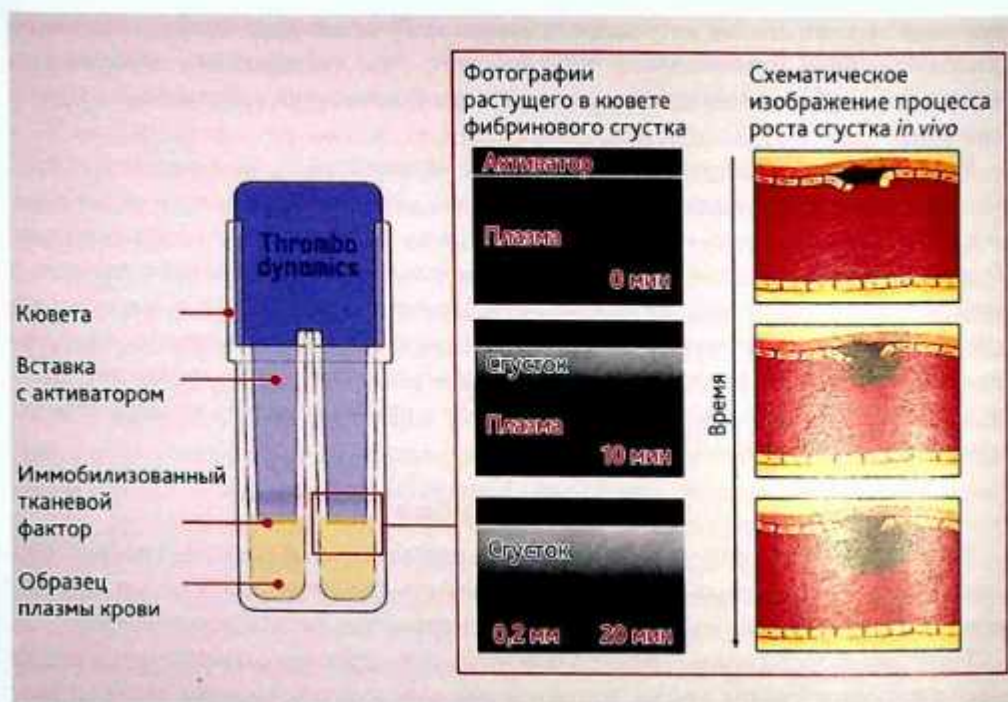


Рис. 5.26. Схема теста тромбодинамики

Тест тромбодинамики зарегистрирован для лабораторной практики в диагностических лабораториях, но при его использовании, интерпретации результатов и принятии клинических решений на их основе необходимо помнить, что доказательная база клинической информативности данного теста продолжает формироваться, результаты необходимо оценивать с осторожностью и обязательно в совокупности с клиническими данными пациента. Исследования проводятся на диагностической системе регистрации тромбодинамики T-2 (рис. 5.27).



Рис. 5.27. Регистратор тромбодинамики T-2

Сравнительная характеристика глобальных тестов

Глобальные тесты дают интегральную характеристику работы свертывающей системы и позволяют сделать результирующее заключение или обобщить данные других коагулологических тестов, обладают большим потенциалом в диагностике эффекта антикоагулянтов, особенно при одновременном воздействии на гемостаз большого нескольких факторов. Каждый из глобальных тестов обладает своими уникальными характеристиками. Сравнение возможностей этих методов представлено в табл. 5.9.

Таблица 5.9. Характеристика глобальных тестов исследования гемостаза

Тест	Материал	Субстрат измерения	Измеряемый параметр	Диагностика гиперкоагуляционного состояния	Диагностика гипокоагуляционного состояния
Тест генерации тромбина	Плазма/плазма, богатая тромбоцитами	Тромбин	Количество	Да	Да
Тромбоэластометрия	Цельная кровь/плазма	Фибрин/тромбоциты	Эластичность сгустка	Да (+/-)	Да
Тромбодинамика	Плазма	Фибрин	Размер сгустка, оптическая плотность	Да	Да

Глобальные тесты активно внедряются в прикроватной диагностике, так как позволяют наглядно и за короткий период оценить процесс свертывания крови, могут быть использованы в предоперационных или непосредственно в операционном зале. В ежедневной практике перед хирургом стоит весьма недвусмысленный вопрос – присутствует ли у конкретного больного повышенное тромбообразование, или, наоборот, недостаточное образование фибрина определяет склонность к кровоточивости? Коагулологические тесты, которые измеряют только отдельные факторы или цепочки реакций из всего каскада свертывания, описывая лишь малую часть процесса образования фибринового сгустка, обладают ограниченной способностью отвечать на этот вопрос. Глобальные тесты позволяют сделать обобщенное заключение о состоянии системы свертывания в организме пациента.

Тесты научного поиска патологии плазменного гемостаза

Определение фактора XIII

Исследование фактора XIII следует проводить в тех случаях, когда у больного имеются проявления кровоточивости, но при этом ПВ, АЧТВ и тесты на

первичный гемостаз нормальные. Среди ориентировочных и скрининговых тестов на недостаточность ф. XIII может указать только тромбозластограмма, на другие тесты дефицит ф. XIII практически не влияет. В то же время дефицит ф. XIII имеет выраженные клинические проявления и может быть причиной кровотечений неясной этиологии у человека на фоне полного здоровья, геморрагического синдрома при ДВС, при гиперфибринолизе, после удаления миндалин, при патологии печени и костномозгового кроветворения. Дефицит ф. XIII может быть врожденным, может быть приобретенным, в том числе в результате появления аутоантител. Определение дефицита ф. XIII и его причины необходимы для назначения адекватного лечения, в частности использования концентратов фактора XIII. Для определения врожденного дефицита ф. XIII используются иммунохимические методы, в том числе ELISA, применяется ПЦР-диагностика для генотипирования врожденных мутаций. Однако ф. XIII – это высоко полиморфный белок, определение его структурных компонентов часто бывает недостаточным, поэтому требуются функциональные тесты с определением активности ф. XIII.

Фотометрический метод

Определение активности ф. XIII основано на измерении аммония, высвобождающегося в процессе трансглутаминазной реакции (рис. 5.28). Фактор XIII, присутствующий в образцах исследуемой плазмы, активируется тромбином и Ca^{2+} . Фибрин, образующийся из фибриногена под действием тромбина, ускоряет эту реакцию. Полимеризация фибрина предотвращается тетрапептидом. Образующийся ф. XIIIa затем образует перекрестные сшивки аминокислотной группы субстрата глицинэтилового эфира с глутаминовым остатком специфического пептидного субстрата и высвобождает аммоний. Количество высвобождаемого аммония определяется по НАДФН-зависимой реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой. Расход НАДФН измеряется спектрофотометрически по уменьшению абсорбции при 340 нм. Снижение абсорбции во времени прямо пропорционально активности ф. XIII. Измерение проводится фотометрически при длине 340 нм, метод может выполняться на биохимических анализаторах.

Активация	$\text{ф. XIII}_{(\text{проба})} \xrightarrow{\text{Протромбин/Ca}^{2+}} \text{ф. XIIIa}$	
Ферментная реакция образования NH_3	$\text{Пептид} + \text{Глицинэтиловый эфир} \xrightarrow{\text{ф. XIIIa}} \text{Поперечные сшивки пептида} + \text{NH}_3$	
Индикаторная реакция	$\text{NH}_3 + \alpha\text{-кетоглутарат} + \text{НАДФ} \xrightarrow{\text{ГлДГ}} \text{Глутамат} + \text{НАДФ} + \text{H}^+$	

Рис. 5.28. Принцип определения фактора XIII фотометрическим методом

Инкорпорирующий метод

Инкорпорирующий метод определения фактора XIII основан на введении субстрата в иммобилизированный белок, которое обеспечивается фактором XIIIa. Фактор XIIIa инкорпорирует субстрат 5-(биотинамидо)-пентиламин (БАПА) в фибрин, который определяется количественно с конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза (рис. 5.29). Инкорпорирующий метод позволяет оценивать физиологическую роль мутации Val34Leu фактора XIII, которая сочетается с риском внутрисерпных кровоизлияний и кровотечений из внутренних органов. В то же время больные с этой мутацией фактора XIII практически не страдают инфарктом миокарда и венозными тромбозами. Мутацию Val34Leu фактора XIII не выявляет фотометрический метод. Инкорпорирующий метод может с успехом использоваться для мониторингирования больных с очень низким уровнем ф.XIII, что бывает при наследственных дефицитах.

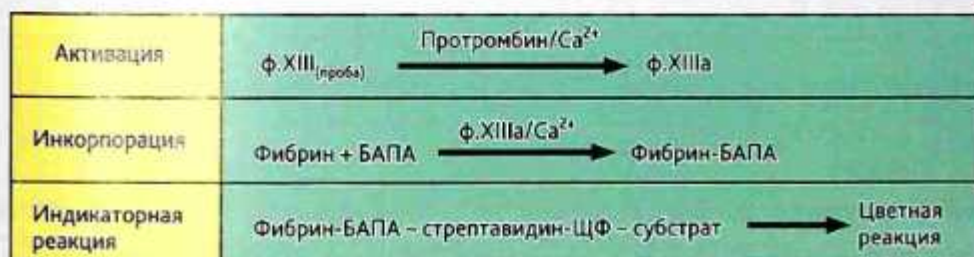


Рис. 5.29. Принцип определения фактора XIII инкорпорирующим методом: БАПА – 5-(биотинамидо)-пентиламин, ЩФ – щелочная фосфатаза

Определение α_2 -антиплазмина

α_2 -антиплазмин – одноцепочечный гликопротеин (70 кДа), относится к семейству серпиновых ингибиторов, синтезируется в печени (время полужизни – 3,3 дня), способен образовывать неактивные комплексы с плазмином. α_2 -антиплазмин – самый быстрый «реактивный» ингибитор плазмина, он не позволяет присутствовать плазмину в крови в свободном виде. Содержание α_2 -антиплазмина в норме – 70 мкг/мл (или 1 мкмоль/л). При свертывании крови около 20% α_2 -антиплазмина переходит в связанную с плазмином форму. α_2 -антиплазмин расходуется при тромболитической терапии. Помимо плазмина он ингибирует активаторы плазминогена – урокиназу (u-PA) и тканевой активатор (t-PA). Дефицит α_2 -антиплазмина встречается относительно редко, но если возникает, то это сопровождается тяжелым геморрагическим синдромом, проявляющимся диссеминированными кровотечениями. Основной причиной кровотечений является присутствие свободного плазмина, который разрушает все тромбы и деградирует фибриноген.

Уменьшение содержания (активности) α_2 -антиплазмина наблюдается:

- при врожденном (наследственном) дефиците;
- заболеваниях печени (нарушается синтез α_2 -антиплазмина);

- синдроме ДВС;
- лейкозах;
- нефротическом синдроме;
- интенсивной тромболитической терапии, которая может вызвать потребление α_2 -антиплазмина.

После экстракорпорального кровообращения с использованием АИК может наблюдаться истощение α_2 -антиплазмина, что приводит к гиперфибринолизу, сочетающемуся с истощением фибриногена, деградацией плазмином плазменных белков (в том числе факторов гемостаза), разрушением тромбоцитов и кровотечениями.

Принцип определения α_2 -антиплазмина подобен технологиям определения других ингибиторов (рис. 5.30). Так как происходит быстрая инактивация плазмина α_2 -антиплазмином, то стадия ингибирования и стадия измерения стартуют практически одновременно (что позволяет повысить специфичность метода при сниженной активности ингибитора в плазме).

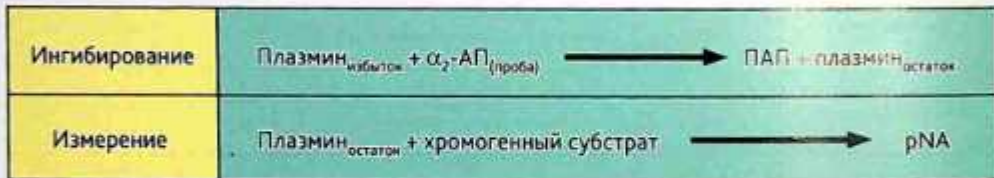


Рис. 5.30. Принцип определения α_2 -антиплазмина хромогенным методом: ПАП – комплекс «плазмин–антиплазмин»

Определение ингибитора активатора плазминогена I типа

PAI-1 выступает в качестве основного ингибитора урокиназы (u-PA) и тканевого активатора (t-PA), играет важную роль в контроле за активностью фибринолиза. Он продуцируется эндотелиальными клетками, клетками гладких мышц, мегакариоцитами и накапливается в тромбоцитах, которые на месте повреждения сосуда активируются и выделяют избыточное количество PAI-1, предотвращая этим преждевременный лизис фибрина. У больных с кровотечениями неясного генеза с нормальными скрининговыми тестами дефицит PAI-1 может быть причиной патологии. Истинный дефицит выявляется относительно редко, но сопровождается тяжелыми кровотечениями.

Повышение PAI-1 встречается достаточно часто, так как PAI-1 – белок острой фазы. Его выработку стимулируют тромбин, трансформирующий фактор роста бета, тромбоцитарный фактор роста, интерлейкин-1, фактор некроза опухоли альфа, инсулиноподобный фактор роста, глюкокортикоиды и эндотоксины. Активированный протеин C ингибирует выделенный из эндотелиальных клеток PAI-1 и тем самым стимулирует лизис сгустка. Повышение PAI-1 может быть причиной рецидивирующего венозного тромбоза, отмечается часто у мужчин в преклонном возрасте. У больных с инфарктом миокарда персистирующий подъем PAI-1 рас-

считается как неблагоприятный прогностический признак. PAI-1 повышается при инфекционных и воспалительных процессах, в послеоперационном периоде, при злокачественных опухолях, ожирении, лечении дексаметазоном.

Определение PAI-1 состоит из нескольких этапов. На первом этапе необходимо инактивировать ингибиторы плазмина – α_2 -антиплазмин и α_2 -макроглобулин. Затем используется общий принцип определения остаточной активности добавленного в избытке фактора, который должен подавляться исследуемым ингибитором (рис. 5.31). При использовании u-PA метод в техническом исполнении несколько проще, чем при использовании избытка t-PA, и может быть автоматизирован на современных анализаторах.

Инактивация интерферирующих ингибиторов	Обработка пробы кислотой и змеиным ядом → инактивация α_2 -антиплазмина и α_2 -макроглобулина
Ингибирование	u-PA или t-PA + PAI-1 → Неактивный комплекс с ингибитором + остаточная активность u-PA или t-PA
Индикаторная реакция	Остаток u-PA или t-PA + плазминоген → плазмин + + хромогенный субстрат → pNA

Рис. 5.31. Принцип определения ингибитора тканевого активатора плазминогена, тип I (PAI-1) хромогенным методом: u-PA – урокиназа; t-PA – тканевой активатор

Содержание PAI-1 в системе циркуляции подвержено суточным ритмам, поэтому пробы при системном анализе необходимо брать в одно время, лучше по утрам. Кроме того, PAI-1 – один из самых неустойчивых белков плазмы, поэтому определение необходимо проводить сразу после взятия крови, транспортировка может привести к потере активности PAI-1 в пробе. При попытках поиска генетических маркеров предрасположенности к тромбозам иногда указывают на значимость полиморфизма гена SERPINE1, который проявляется в количестве повторов гуанина (G) в позиции 675: 5G и 4G. Однако высокая частота носительства неблагоприятного варианта 4G в популяции – до 40–50% – делает его мало значимым в диагностическом и прогностическом плане.

Завышенные результаты теста можно получить при повышении активности PAI-2. Этот ингибитор повышается при беременности, поэтому при беременности исследование PAI-1 описанным выше методом может дать ложные результаты. В последнее время активно используется определение PAI-1 методом ELISA или комбинацией иммунохимических и функциональных методов.

Определение тканевого активатора плазминогена

Тканевой активатор плазминогена (t-PA) освобождается в кровоток из эндотелиальных клеток сосудистой стенки, где он синтезируется. Поэтому диагностика дефицита t-PA основывается не только на определении концентрации

t-PA в крови, но и на способности освобождаться из сосудистой стенки при стрессовых воздействиях, в частности при манжеточной пробе (дозированном пережатии вен). Сначала определяют базовый уровень t-PA, потом на 10–15 минут на предплечье накладывают жгут или раздувают манжетку, вызывающую венозный стаз, затем берут вторую порцию крови, в которой повторно определяют t-PA. Сравнивают результаты обеих проб. Из-за быстрой инактивации тканевого активатора плазминогена PAI-1 и другими ингибиторами пробы крови необходимо немедленно закислить, чтобы предупредить инактивацию t-PA *in vitro*. В настоящее время выпускаются специальные пробирки с кислым антикоагулянтом. t-PA имеет суточный ритм, поэтому его необходимо определять также, как PAI-1.

t-PA обладает высокой амидазной активностью, позволяющей эффективно использовать для его определения метод хромогенных субстратов. Однако при низких концентрациях t-PA в плазме требуется проведение дополнительных процедур непрямого определения активности фермента через плазминоген и использование растворимого фибрина (рис. 5.32).

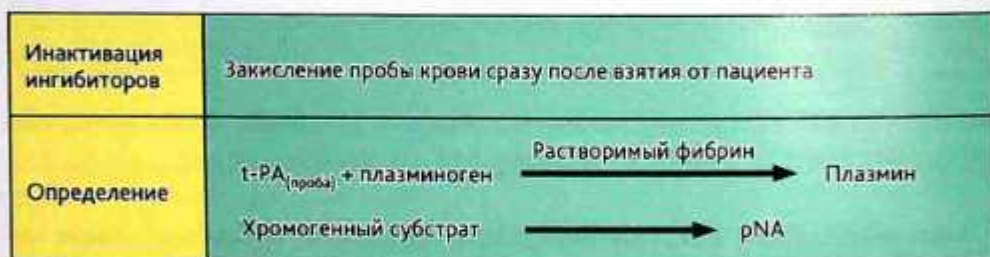


Рис. 5.32. Принцип определения тканевого активатора плазминогена (t-PA) хромогенным методом

Нарушение освобождения t-PA после венозного стаза описано у больных с тромбозами и с патологией почек.

Маркеры активации свертывания крови

Для пациентов с тромботическими заболеваниями адекватного скрининга для диагностики нарушений системы гемостаза и прогнозирования тромбозов не разработано. Как правило, активность процесса патологического тромбообразования оценивают, анализируя концентрацию маркеров активации свертывания крови. К основным доступным маркерам активации относятся D-димер, антиген фактора Виллебранда (как маркер повреждения эндотелия), активность фактора VIII и фибриноген. Остальные приведенные ниже компоненты, несомненно, играют существенную роль в физиологических и патологических реакциях, но на практике не используются, в основном представлены в научных исследованиях.

D-димеры

D-димеры – специфические продукты деградации фибрина, входившего в состав тромба. Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием пламина и некоторых неспецифических фибринолитиков (см. рис. 3.24). Концентрация D-димеров в сыворотке пропорциональна активности фибринолиза и количеству лизируемого фибрина. Этот тест позволяет судить об интенсивности процессов образования и разрушения фибриновых сгустков.

Определение D-димеров проводится методами с использованием моноклональных антител (табл. 5.10) к эпитопам на D-димерах, которые образуются при расщеплении нерастворимого фибрина плазином. Этих эпитопов нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономеров, поэтому D-димеры – показатель того,

Таблица 5.10. Характеристика методов определения D-димеров

Метод	Чувствительность	Специфичность	Скорость	Примечание
Агглютинация (качественная)	Высокая, средняя	Высокая, средняя	Быстрая	В цельной крови быстрый тест, результат зависит от исполнителя
Агглютинация (полуколичественная)	Средняя	Средняя	Быстрая	Быстрый, но недостаточно чувствительный тест для исключения ВТЭ
Иммунометрический анализ типа «сэндвич»	Высокая, менее чувствительный, чем ИФА	Высокая	Быстрая (2 мин)	Быстрый тест, подходит для исследования в режиме реального времени
Латексная агглютинация второго поколения (иммунотурбидиметрия)	Высокая, сопоставима с ИФА	Средняя, выше, чем у ИФА (75–91%)	Быстрая (15 мин)	Быстрый тест, подходит для исследования в режиме реального времени; не требует специального оборудования (возможен на б/х анализаторах, коагулометрах)
ИФА-микропланшеты (ELISA)	Высокая (95–98%)	Низкая (38–48%)	Медленная (2 часа)	«Золотой стандарт», не используется для исследования в режиме реального времени
ИФА + флуоресценция	Высокая, сопоставима с ИФА	Низкая	Средняя (35 мин)	Подходит для исследования в режиме реального времени
Иммунохемилюминесценция	Высокая, сопоставима с ИФА	Низкая	Быстрая (15 мин)	Подходит для исследования в режиме реального времени

что в процессе фибринолиза расщепляется именно фибрин, а не фибриноген или фибрин-мономеры. Поскольку эти антитела не взаимодействуют с фибриногеном, исследования могут проводиться как в плазме, так и в сыворотке.

Достоинства визуальных тестов:

- быстры, удобны и дешевы;
- не требуют сложного оборудования.

Недостатки визуальных тестов:

- субъективная интерпретация результата;
- меньшая чувствительность по сравнению с автоматизированными методами;
- рекомендуются для определения повышенных концентраций D-димера, но не для исключения диагноза ВТЭ осложнений.

Польза количественного измерения концентрации D-димеров утверждена международными клиническими рекомендациями по диагностике тромбоза глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) и определению длительности антикоагулянтной терапии после первого эпизода тромбоза. Высокая чувствительность при низкой специфичности определяет *высокую отрицательную предсказательную ценность метода для диагностики тромбозов*. Полуколичественные методы (латексная агглютинация и иммунодиффузия) не представлены в международных рекомендациях, они существенно проигрывают количественному определению D-димера по своей информативности.

Принцип теста, основанный на методе ELISA на твердой фазе (стрипированные планшеты) с нанесенными на поверхность пластика первичными антителами, показан на рис. 5.33. D-димеры – нестандартизованный аналит, они имеют разную величину молекул и не обладают четко определенной структурой, поэтому антитела в тест-системах разных производителей также могут различаться по специфичности. В связи с этим разные методы могут показывать разные результаты, несмотря на использование специфических антител и калибраторов. При количественном измерении D-димера у одного и того же пациента различными тест-системами получаются разные результаты, сравнивать которые некорректно. Кроме того, источником D-димеров в плазме может быть не только внутрисосудистое тромбообразование, но и внесосудистые отложения фибрина, что объясняет низкую специфичность исследования при тромбозах.

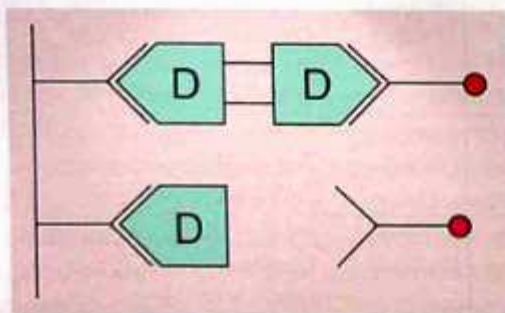


Рис. 5.33. Твердофазный ELISA для определения D-димеров. Со специфическими антителами, нанесенными на твердую фазу, взаимодействует субъединица D из пробы и остается иммобилизованной. Добавляются проявляющие антитела, конъюгированные с ферментом, которые могут взаимодействовать только с D-димерами. D-мономеры, входящие в состав ПДФ, отмываются и не определяются тестом на D-димеры

На определение D-димеров практически не оказывает влияния техника взятия крови, примесь тромбоцитов, не требуется использования ингибиторов для подавления других факторов.

Повышение уровня D-димеров в крови определяется при возникновении венозных тромбозов, атеротромбозе, ТЭЛА, синдроме ДВС, после операций, особенно при большом операционном поле, инфекционно-воспалительных процессах и других состояниях с повышенным образованием фибрина. D-димеры достаточно долго циркулируют в крови, время их полувыведения составляет более 24 ч, повышение D-димеров может персистировать в течение нескольких недель после острого тромбоза.

На значение D-димеров влияют такие факторы, как величина тромба, время от начала клинических проявлений до назначения антикоагулянтной терапии, прием антикоагулянтов, на фоне которых уровень D-димеров постоянно снижается. Поэтому более значимой для исключения диагноза тромбоза является отрицательная диагностическая значимость теста. Причем для разных тестов отрицательная диагностическая значимость колеблется от 78 до 100%, она выше у более чувствительных методов, что характерно для ИФА-диагностики.

Результаты определения могут выражаться как в единицах D-димера (D-Dimers Unit – DDU), так и в фибриноген-эквивалентных единицах (Fibrinogen Equivalent Unit – FEU). Приблизительно $1 \text{ нг/мл FEU} = 2 \text{ нг/мл DDU}$. Однако математический пересчет единиц D-димера в FEU путем умножения на фактор 2 неприемлем. Размерность единиц указывается производителем тест-системы (нг/мл, мкг/мл, мкг/л). Пороговые значения (cut-off) D-димера для исключения ВТЭ также устанавливаются производителем тест-системы. Универсальных пороговых значений для всех методов измерения D-димера не существует. Лаборатория должна сообщать клиницисту единицы измерения и пороговую величину, установленные производителем для конкретного теста. Если концентрация D-димера в плазме меньше указанных пороговых значений, то наличие тромбоза у больного можно исключить. У лиц старше 50 лет концентрация D-димеров нарастает; условная верхняя граница референтного интервала может быть определена по формуле: $\text{FEU (мкг/мл)} = (\text{возраст в годах}) \times 0,01$.

Фактор Виллебранда

Повышение уровня и активности фактора Виллебранда происходит при стимуляции или повреждении сосудистого эндотелия, индукции адгезии и агрегации тромбоцитов. Основным фактором стимуляции эндотелия *in vivo* является тромбин. Факторами повреждения эндотелия служат модифицированные липопротеиды, эндотелиотропные вирусы, иммунные комплексы, токсические воздействия, гемодинамические перегрузки, ишемия. В соответствии с этими механизмами повышение уровня и активности фактора Виллебранда наблюдается при тромбозах, повреждениях эндотелия сосудистой стенки и активации тромбоцитов, возникающих при канцерогенезе, гемобластозах, миелопролиферативных забо-

леваниях, иммунных и иммунокомплексных заболеваниях (системные васкулиты, системная красная волчанка, ревматоидный артрит), диабетических ангиопатиях, атеросклерозе, гипертонической болезни. Высвобождение фактора Виллебранда при этих состояниях пропорционально интенсивности повреждающего воздействия на сосудистый эндотелий. Это обстоятельство существенно повышает диагностическую значимость выявления повышенного уровня активности фактора Виллебранда у больных с синдромом эндотелиопатии разной этиологии.

Концентрация vWF определяется методами иммунотурбидиметрии, ELISA, ракетным электрофорезом. Связывающая способность фактора Виллебранда с коллагеном определяется в микроплашках, покрытых коллагеном, методом ELISA. Результат выражается как % от нормы. Состав субъединиц определяется электрофорезом в геле агарозы или иммуноблотом. Функциональная активность определяется методом агглютинации фиксированных или отмытых тромбоцитов или агрегации в богатой тромбоцитами плазме при индукции ристомидином (Ристоцитин®). Метод с хромогенными субстратами в настоящее время рекомендуется использовать только как ориентировочный.

Использование антигена фактора Виллебранда в качестве маркера дисфункции эндотелия, и соответственно, показателя вероятного гиперкоагуляционного синдрома может быть полезно в динамической оценке больных, перенесших острое тромботическое событие или находящихся в состоянии высокого риска.

Фактор VIII

Фактор VIII – сиалогликопротеин, играющий решающую роль в каскаде свертывания в качестве кофактора сериновой протеазы – фактора IXa. Ф. VIII относится к группе острофазных белков. Установлена причинно-следственная связь между повышением ф. VIII и венозным тромбозом, рекуррентным венозным тромбозом, а также с тромбозом сосудов головного мозга. Имеются доказательства связи активности ф. VIII с артериальным тромбозом, инфарктом миокарда, инсультом, окклюзией крупных артерий, а также роли ф. VIII как независимого фактора риска тромбоза легочной артерии.

Механизмы таких ассоциаций не вполне понятны. Рассматриваются две основные версии – наследственная и приобретенная. Некоторые исследователи относят гиперактивность фактора VIII к генетически детерминированной тромбофилии, доказательством чего служит изолированное повышение активности фактора без видимой или определяемой причины. Однако генетического полиморфизма, ответственного за повышение активности фактора и локализованного в гене F8 на Xq24, до настоящего времени не выявлено. Другое объяснение лежит в плоскости взаимодействий воспалительных и гемостатических реакций. В этом случае повышение активности ф. VIII рассматривается как проявление воспалительного процесса, степень которого не влечет за собой значимых изменений картины крови, но отражается в повышении некоторых белков острой фазы, например, С-реактивного белка, измеренного высокочувствительным

методом, фибриногена. В качестве примера выраженной активации системы свертывания с повышением соответствующих маркеров приводим клинический случай 5.3.

Клинический случай 5.3

Пациентка К., 35 лет, страдает синдромом Марфана. Оперирована 6 лет назад по поводу комбинированного аортального порока сердца, выполнено протезирование аортального клапана механическим протезом, получает постоянную антикоагулянтную терапию варфарином с хорошим эффектом. МНО стабильно поддерживается в терапевтическом диапазоне. Консультирована в связи с осложненным течением послеродового периода.

В анамнезе 4 беременности. Первые 2 беременности имели место до протезирования клапана, протекали без осложнений, закончились самостоятельным родоразрешением. Предыдущие роды 2 года назад (кесарево сечение) осложнились кровотечением в послеродовом периоде, потребовавшим релапаротомии. Настоящие роды срочные, плановые, также через кесарево сечение. За 2 недели до предполагаемого срока родов больная переведена на инъекции низкомолекулярного гепарина (НМГ), МНО перед операцией 1,2. Вмешательство выполнено через 12 часов после последней инъекции НМГ; возобновление инъекций через 24 часа после операции. Дальнейшее течение осложнилось кровотечениями с формированием подапоневротической гематомы, признаками внутреннего кровотечения, падением гемоглобина до 60 г/л. В течение 7 дней пациентку трижды пришлось брать в операционную, в том числе для выполнения релапаротомии, общая кровопотеря составила около 5 литров с возмещением компонентами крови и поддержанием гемоглобина на уровне 80–90 г/л. Явного источника кровотечений не выявлено, выполнена санация раны, удаление матки. В коагулограмме: скрининговые тесты в пределах нормы в течение всего периода наблюдения, за исключением фибриногена – от 5,2 до 8,4 г/л. Тромбоциты $218-184 \times 10^9/\text{л}$. D-димер 3,4 – 2,6 – 4,8 мкг/мл (N 0–0,5 мкг/мл). Антитромбин 104% (N 70–130%). На 8-е сутки после операции антиген фактора Виллебранда составил 402,8% (N 55–165%), его активность – 353,8% (N 55–165%); активность фактора VIII – 364,7% (N 58–160%); активность фактора IX – 171,9% (N 60–160%). Исследования выполнены неоднократно в разных лабораториях. Тромбозластограмма демонстрирует гипер-/нормокоагуляцию без признаков повышения фибринолиза. В течение этого времени пациентка находилась на инфузионном введении нефракционированного гепарина с поддержанием АЧТВ в 1,5–1,8 раза выше референтного значения. На вторые сутки после последней реоперации возобновлен прием варфарина. Введение гепарина сохранялось до достижения МНО 2,5. Кровотечения не повторялись, однако на 5-е и 12-е сутки после последнего вмешательства развилась клиника транзиторной ишемической атаки (ТИА), явления купированы. Пациентка выписана на 21-е сутки после родов в удовлетворительном состоянии, доза варфарина подобрана, МНО 3,4.

Комментарий: данный случай демонстрирует тяжелую ситуацию сочетания гемостазиологических нарушений и клинически разнонаправленных проявлений патологии гемостаза. С одной стороны, очень высокий риск тромбозмимических осложнений, наличие механического искусственного клапана сердца, необходимость постоянной антитромботической защиты, с другой – явная несостоятельность системы гемостаза (при тщательном сборе анамнеза выяснено, что явления кровоточивости беспокоили с подросткового возраста, без семейной истории – возможен вклад синдрома Марфана), послеродовое кровотечение. Правомочно подозрение на синдром ДВС на фоне массивной кровопотери, но данных за ДВС нет – отсутствует потребление тромбоцитов, факторов свертывания, антикоагулянтов (антитромбина), повышение D-димера умеренное, не нарастающее в динамике, «спокойная» тромбоэластограмма. В то же время другие маркеры активации свертывания (не свидетели формирования фибрина, в отличие от D-димера!) беспрецедентно повышены.

Таким образом, несмотря на геморрагические осложнения, при условии отсутствия активного кровотечения пациентке приходится поддерживать фармакологическую гипокоагуляцию для защиты клапана сердца. Маркеры активации и последующие непредотвращенные ТИА демонстрируют правомочность такого подхода.

Тесты научного поиска тромботических заболеваний

Металлопротеиназа ADAMTS-13

ADAMTS-13 – металлопротеиназа, принадлежащая к семейству пептидазных белков «ADAM» (A Disintegrin And Metalloproteinase). Биологическая роль протеиназ этого семейства – расщепление экстрацеллюлярного домена трансмембранных белков. Металлопротеиназа ADAMTS-13 отщепляет фрагменты от мультимерной молекулы vWF. Отщепленные фрагменты мультимера vWF обладают адгезивными свойствами, причем активность vWF тем выше, чем больше мономеров содержит. ADAMTS-13 необходима для ограничения размеров мультимеров vWF и тем самым предупреждения чрезмерной их активности. Недостаток активности ADAMTS-13 приводит к развитию локальных тромбов в основном в капиллярах и тяжелому заболеванию – тромботической тромбоцитопенической пурпуре (ТТП). Недостаток активности протеиназы может быть обусловлен либо уменьшением ее содержания, либо наличием ингибитора.

Определение концентрации ADAMTS13 в сыворотке проводится методом ИФА. Однако по результатам ИФА диагностика проблематична, поскольку даже в группах здоровых и в группе пациентов с верифицированным диагнозом ТТП получены небольшие различия статистически достоверных результатов. Значительно повышает достоверность диагностики определение функциональной активности ADAMTS-13 иммунофлуоресцентным методом. В образцах с низкой активностью ADAMTS-13 имеет смысл определить антитела к этой протеиназе, чтобы выявить причину данной патологии (врожденная или приобретенная

Наборы для дифференциальной диагностики тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП) и атипичного гемолитико-уремического синдрома (аГУС)



1. Уильямс ГВ и соавт. Тромботический гемолитико-уремический синдром у взрослых. Обзор литературы. 2013; 1130-51. 68
2. JIM Caprioli et al. An update for clinical hemolytic uremic syndrome. Diagnosis and treatment. A consensus document. Nephrology (English version). 2013; 20: 421-47.



Кат. номер	Производитель	Наименование
5450701	Technoclone	ADAMTS-13 (определение активности), 96
5450601	Technoclone	ADAMTS-13 (определение антигена), 96
5450501	Technoclone	ADAMTS-13 (определение антигена и активности, 360/460 нм) (иммунофлуоресцентный метод), 96
5700100	Technoclone	Technoscreen ADAMTS-13 (экспресс-тест на активность ADAMTS-13), 10
5450401/5450451	Technoclone	Ингибитор ADAMTS-13 (антитела к ADAMTS-13), 96/48
ODZ-166	VIDIA	Антитела к фактору комплемента H, 48
HK353	HBT	Фактор комплемента H, 96
HK342-01	HBT	Фактор комплемента H (изоформы: H402/Y402), 96



ЗАО БиоХимМак / 119991 Москва, Ленинские Горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, д.1, строение 11 /
телефон (495) 647-27-40, 939-10-60 / факс (495) 939-09-97 / e-mail: info@biochemmack.ru /
www.biochemmack.ru

форма). В настоящее время существует прямой ИФА-метод для определения аутоантител (IgG) к ADAMTS-13; более того, разработаны методы, которые дают возможность дифференциальной диагностики врожденной (полиморфизм генов) и приобретенной (аутоантитела) ТТП. Определение активности ADAMTS-13 может быть использовано для контроля эффективности терапии при обменном переливании плазмы.

Тромбомодулин

На поверхности интактного эндотелия содержится значительное количество тромбомодулина. Тромбомодулин с высокой аффинностью связывает тромбин, меняя «направленность» его действия. Комплекс «тромбин–тромбомодулин» активирует протеин С. Последний в комплексе с протеином S ингибирует активные факторы каскада коагуляции Va и VIIIa. Кроме того, комплекс «тромбин–тромбомодулин» подвергается эндоцитозу эндотелиальными клетками с последующей деградацией тромбина в эндотелиоците и рециркуляцией тромбомодулина на клеточную поверхность. Еще одной функцией комплекса «тромбин–тромбомодулин» является активация прокарбоксипептидазы Y до активного ингибитора – карбоксипептидазы Y или тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза (TAFI), который замедляет фибринолиз.

В норме тромбомодулин связан с мембраной эндотелиоцитов и практически отсутствует в системе циркуляции. Появление сколько-нибудь значимой концентрации тромбомодулина в токе крови свидетельствует о повреждении эндотелиальных клеток.

Повышение тромбомодулина наблюдается при системной красной волчанке, синдроме ДВС, респираторном дистресс-синдроме взрослых, ТЭЛА, инфаркте миокарда, после использования тромболитиков при инфаркте миокарда, при диабетической микроангиопатии, после транслюминальной ангиопластики коронарных артерий. Значение тромбомодулина для регуляции гемостаза имеет клинические подтверждения. Некоторые мутации гена ТМ ассоциированы с артериальными тромбозами.

Фибринопептид А

FPA отщепляется от молекулы фибриногена тромбином (см. рис. 3.10), поэтому при тромбинемии количество FPA в плазме увеличивается. Определение FPA достаточно давно используется как маркер активации гемостаза. В современных наборах используется метод ELISA с моноклональными антителами. FPA – очень чувствительный тест на потребление фибриногена, его концентрация повышается при разных заболеваниях с тромбоэмболией. Результаты теста существенно зависят от процедуры взятия крови, даже небольшие отступления от прописанной схемы могут вызвать значительные сдвиги в уровне FPA в пробе.

Тромбин-антитромбиновый комплекс

Тромбин-антитромбиновый комплекс (ТАТ) – стойкое соединение тромбина и антитромбина, может быть показателем тромбинемии на ранней стадии активации. Клиренс ТАТ из системы циркуляции достаточно быстрый, он удаляется в течение нескольких минут. Поэтому присутствие ТАТ в плазме свидетельствует об образовании тромбина *in vivo* непосредственно в момент взятия крови на исследование и о возможности истощения антикоагулянтов.

В методе ELISA на твердую фазу нанесены антитела к тромбину. После отмывки проявляющие антитела связываются с антитромбином, присутствующим в ТАТ, оценка количества ТАТ проводится цветной реакцией. Определение ТАТ очень информативно в острой ситуации, непосредственно при тромбообразовании. В этом плане определение ТАТ по диагностическому значению схоже с определением FPA, однако для ТАТ менее критичными являются требования к процедуре взятия крови. Иногда тест с некоторыми модификациями используется для определения антитромбина (АТ).

Плазмин-антиплазминовый комплекс

Образование плазмин-антиплазминового комплекса (РАР) – это быстрый механизм ингибирования активности плазмина. В процессе ингибирования выделяют две стадии. На первой образуется обратимый комплекс между лизин-связывающим участком плазмина и комплементарным фрагментом α_2 -антиплазмина, расположенным в COOH-концевом регионе. На второй стадии (при расщеплении пептидной связи ингибитора) формируется необратимый комплекс. Плазмин, связавшись с α_2 -антиплазмином, теряет способность разрушать фибрин.

Комплекс «плазмин– α_2 -антиплазмин» в образцах человеческой цитратной плазмы (с аprotинином 2000 КМЕ/мл) определяют количественно методом ELISA. Нормальный уровень РАР-комплекса в плазме составляет 0–514 нг/мл. При заболеваниях, связанных с повышенным образованием фибрина, происходит реактивное увеличение уровня плазмина, одновременно повышается концентрация комплекса РАР. В определенных ситуациях наблюдается корреляция между текущей концентрацией комплекса и скоростью образования продуктов расщепления фибрина. Уровень РАР-комплекса в плазме выше 120 нг/мл в течение литической терапии указывает на расход α_2 -антиплазмина, что может привести к распространенной плазминемии. Повышенный уровень комплекса наблюдается при тромбозах, в случаях эндогенного гиперфибринолиза и при тромболитической терапии.

Фрагменты протромбина F1+2

F1+2 – тест, который отражает активность превращения протромбина в тромбин с участием протромбиназного комплекса (фактор Ха, фактор Va, фосфолипиды и Ca^{2+}), формирующийся при активации системы плазменного гемостаза (рис. 1.10). Сам тромбин крайне сложно измерить количественно, поэтому

используют суррогатные маркеры. Измерение F1+2 будет отличным маркером образования тромбина.

Определение F1+2, также как ТАТ, проводится с целью диагностики состояния гиперкоагуляции, которое может быть значимым при остром и хроническом ДВС, тромбозе глубоких вен бедра, ТЭЛА, злокачественных опухолях и острых миелоидных лейкозах (протекающих с активацией системы свертывания), наличии факторов риска тромбозов, остром инфаркте миокарда и последующей тромболитической терапии. Протромбин и фрагмент F1+2 были обнаружены в опухолевой строме на раковых клетках и на мелких кровеносных сосудах в области неоваскуляризации на границе ткани хозяина и ткани опухоли. F1+2 является индикатором локальной активации свертывания крови в опухолевой ткани.

Определение ТАТ и F1+2 характеризуется высокой аналитической чувствительностью. F1+2 в отличие от ТАТ имеет более продолжительный период полураспада – около 1 часа, поэтому характеризует более длительную активацию системы гемостаза. Фрагмент F1+2 удаляется из крови печенью. Состояние гиперкоагуляции можно зарегистрировать с помощью как ТАТ, так и F1+2, тогда как состояние гипокоагуляции можно выявить только по уменьшению F1+2.

Растворимые фибрин-мономерные комплексы и фибрин-мономер

При патологических состояниях, характеризующихся активацией свертывания крови, происходит расширение пула фибриногена. В норме в крови из пула фибриногена присутствует практически только сам фибриноген в количестве 2–4 г/л. Все остальные продукты находятся в минимальном количестве, которое практически не определяется лабораторными тестами (рис. 5.34).

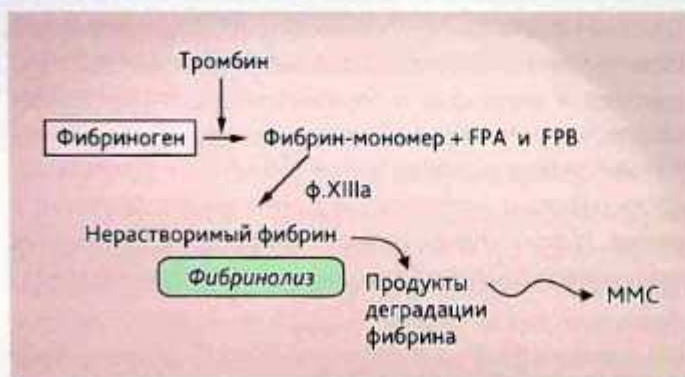


Рис. 5.34. Пул метаболитов фибриногена в норме. Из обозначенных продуктов в крови присутствует только сам фибриноген. Все остальные метаболиты находятся в исчезающе малых количествах. FPA, FPB – фибринопептиды А и В, ММС – макрофагально-моноцитарная система

При активации тромбообразования происходит постоянный процесс трансформации фибриногена в фибрин с появлением в крови фибринопептидов А и В, накоплением мономеров фибрина. Активация фибринолиза сопровождается

повышенным образованием ПДФ. ПДФ взаимодействуют с фибрин-мономерами, увеличивая количество растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК). РФМК – это фибрин-мономеры и олигомеры, а также их комплексы с ПДФ (рис. 5.35).

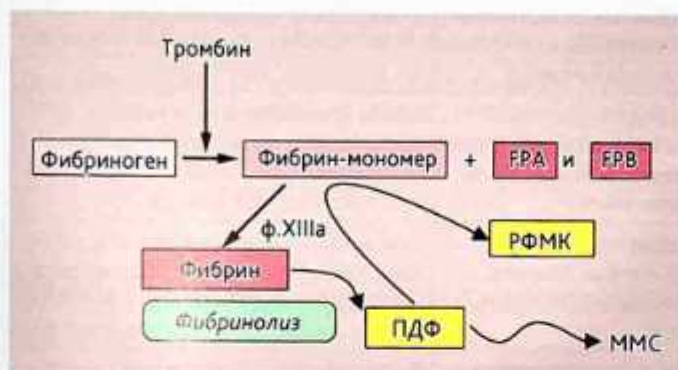


Рис. 5.35. Пул метаболитов фибриногена при активации тромбообразования. Количество фибриногена снижается, появляются продукты деградации фибрина (ПДФ), фибринопептиды (FPA и FPB), растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК)

Орто-фенантролиновый тест

Для выявления растворимых фибрин-мономерных комплексов в КДЛ длительное время использовались так называемые паракоагуляционные («гелеобразующие») тесты. Из многочисленных тестов в настоящее время в некоторых лабораториях сохраняется орто-фенантролиновый тест. Принцип метода состоит в регистрации времени появления видимых на глаз хлопьев или зерен паракоагулята после добавления к исследуемой плазме раствора орто-фенантролина. Поскольку скорость образования хлопьев зависит от количества РФМК, оценку их концентрации в пробе проводят по специальной таблице, исходя из времени (если оно менее 120 с). Результаты теста субъективны, данные получаются полуколичественными, их использование в клинической практике на современном этапе развития лабораторной диагностики становится нецелесообразным.

Тест на фибрин-мономер

С диагностической точки зрения целесообразным является определение именно растворимого фибрин-мономера как раннего маркера активации процессов фибринообразования. В настоящее время такая технология, основанная на имунотурбидиметрии с латексным усилением с использованием моноклональных антител, стала доступна в лабораториях. Продолжает накапливаться доказательная база клинической значимости данного теста.

Краткая характеристика и диагностическое значение представленных выше и дополнительных тестов активации системы гемостаза даны в табл. 5.11.

В табл. 5.12 суммированы наиболее вероятные изменения лабораторных тестов при некоторых патологических состояниях.

Таблица 5.11. Маркеры активации гемостаза

Показатель	Характеристика	Диагностическое значение
D-димеры	Продукты, образующиеся при лизисе фибрина под влиянием пламина. Накапливаются при активации гемокоагуляции и фибринолиза	Исключение тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, диагностика синдрома ДВС
Фибриноген	Белок – предшественник фибрина, основной субстрат свертывания. Белок острой фазы воспаления	Вне острого воспалительного процесса ассоциирован с сосудистыми событиями. Неблагоприятный прогностический фактор
vWF – фактор Виллебранда	Освобождается из эндотелиальных клеток. Маркер повреждения эндотелиальных клеток	Диагностика поражения сосудистой стенки, фактор риска инфаркта миокарда и инсульта
Фактор VIII	Отражает активацию коагуляционного каскада, ассоциирован с тромботическими событиями, белок острой фазы воспаления	Прогностический фактор риска повторных сосудистых событий. Вероятно, изолированный показатель наследственной предрасположенности к тромбозам. Исследовать вне острой фазы воспаления
F1+2 – фрагменты протромбина	Указывают на активацию протромбина фактором Ха и на образование тромбина <i>in vivo</i> . Отражают количество образующегося тромбина в системе циркуляции за длительный период	Маркер активации свертывания в научных исследованиях
Растворимый фибрин-мономер (FM)	Отражает активность тромбина <i>in vivo</i>	Повышен при всех ситуациях активации плазменного гемостаза. Перспективен для оценки гемостаза при беременности, дифференциальной диагностики ДВС
FPA	Продукт протеолиза фибриногена. Отражает активность тромбина <i>in vivo</i>	Самый ранний маркер активации свертывания в цепочке коагуляционного каскада. Используется в научных исследованиях
ПДФ	Продукты деградации фибрина/фибриногена под влиянием пламина	Определяют состояние гиперфибринолиза, повышаются у больных с тромбозами (реактивный фибринолиз) и ДВС, включен в диагностические шкалы синдрома ДВС
РАР плазмин- α_2 -антиплазмин	Отражают образование пламина <i>in vivo</i>	Маркер гиперфибринолиза или реактивного фибринолиза. Используется в научных исследованиях

Показатель	Характеристика	Диагностическое значение
PF4 – фактор 4 тромбоцитов, β -TG – β -тромбоглобулин	Метаболиты, освобождаемые из тромбоцитов в плазму. Отражают активацию тромбоцитов <i>in vivo</i>	Диагностика гиперактивного состояния тромбоцитов, артериального тромбоза, повреждения сосудов, инсульта
Тромбомодулин (TM)	Мембранный белок в эндотелиальных клетках, в плазме – маркер повреждения эндотелия	Диагностика повреждения сосудистой стенки, используется в научных исследованиях

Таблица 5.12. Изменение некоторых показателей активации свертывания при патологии

Заболевание	D-димеры	Фибриноген	vWF	Фактор VIII	TAT	F1+2	FPA	PF4	TM	PAP
Синдром ДВС	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Активация фибринолиза	↑	↑	↑	↑	–	–	–	–	–	↑
Состояние гиперкоагуляции	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	–	–
Инфаркт миокарда	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Малигнизация	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–	–/↑
Антифосфолипидный синдром	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	↑	–/↑	–
Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, ТМА – тромботическая микроангиопатия	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	–	–

Вопросы к главе 5

1. Какие методы используются для оценки функций тромбоцитов?
2. Какие тромбоцитарные показатели определяются на гематологическом анализаторе?
3. В чем суть теста «агрегация по Борну»?
4. Чем объясняется двухволновой характер агрегатограмм тромбоцитов?
5. С какой целью определяют агрегацию тромбоцитов с ристоцетином?

6. Какие тесты оценки плазменного гемостаза относятся к скрининговым?
7. Каков порядок выполнения теста «протромбиновое время по Квику»?
8. Каков порядок выполнения теста «активированное частичное тромбопластиновое время»?
9. Какие лабораторные тесты могут указать на повреждение сосудистого эндотелия?
10. Что такое международный индекс чувствительности?
11. В чем сущность коррекционных проб при определении дефицита отдельных факторов гемостаза?
12. Каким образом на основе теста АЧТВ выявить наличие специфического ингибитора в плазме?
13. Что такое продукты паракоагуляции и в чем заключается их диагностическое значение?
14. Какие уточняющие тесты применяются при нормальных скрининговых тестах, но систематических кровотечениях у пациента?
15. Какие используют дополнительные маркеры для оценки патологической активации свертывания крови или тромбообразования?

Тесты для главы 5

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

05.01. Для выявления тромбоцитопатии необходимо исследовать:

- А) агрегационно-адгезивную функцию тромбоцитов
- Б) количество тромбоцитов
- В) деформируемость тромбоцитов
- Г) тромбиновое время
- Д) протромбиновое время

05.02. Об активации тромбоцитов свидетельствует повышение в плазме:

- А) фибриногена
- Б) антитромбина
- В) бета-тромбоглобулина
- Г) комплемента
- Д) плазминогена

05.03. Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) отражает:

- А) состояние тромбоцитарного звена гемостаза
- Б) состояние фибринолитической системы
- В) внутренний путь активации протромбиназы
- Г) состояние антикоагулянтного звена
- Д) реологические свойства крови

05.04. Внешний путь протромбиназообразования следует контролировать:

- А) тромбиновым временем
- Б) фактором XIII
- В) толерантностью плазмы к гепарину
- Г) протромбиновым временем
- Д) антитромбином

05.05. Общую активность фибринолитической системы можно оценивать:

- А) определением антитромбина
- Б) определением тромбинового времени
- В) определением протромбинового времени
- Г) определением времени лизиса эуглобулинов
- Д) определением агрегации тромбоцитов

05.06. У больного с геморрагическим синдромом при удлинённом АЧТВ и нормальном ПВ следует проводить:

- А) исследование факторов внутреннего пути тромбообразования
- Б) определение антитромбина
- В) определение XIIIa-зависимого фибринолиза
- Г) исследование агрегации тромбоцитов
- Д) определение волчаночного антикоагулянта

05.07. У больного гемофилией проведена коррекционная проба с плазмой, истощённой по фактору VIII (показана на рис. 5.36). В результате АЧТВ осталось удлинённым. Подберите правильное заключение:

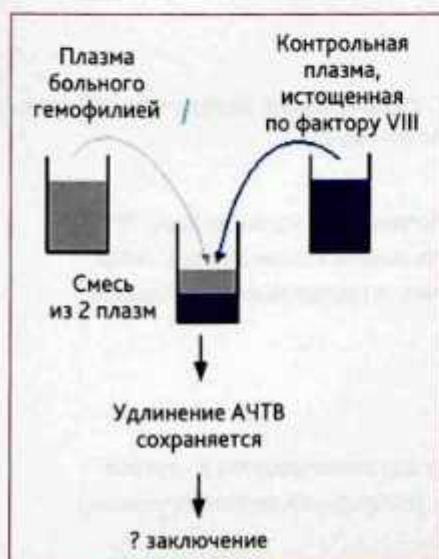


Рис. 5.36. Коррекционная проба

- А) гемофилия А
- Б) гемофилия В
- В) болезнь Виллебранда
- Г) болезнь не является гемофилией А
- Д) болезнь не является гемофилией В

05.08. У больного гемофилией проведена коррекционная проба с плазмой, истощенной по фактору IX (показана на рис. 5.37). В результате АЧТВ нормализовалось. Подберите правильное заключение:

- А) гемофилия А
- Б) гемофилия В
- В) болезнь Виллебранда
- Г) болезнь не является гемофилией А
- Д) болезнь не является гемофилией В



Рис. 5.37. Коррекционная проба с плазмой, истощенной по фактору IX

05.09. У пациента со склонностью к тромбозам, но с удлинённым АЧТВ, проведена коррекционная проба с контрольной плазмой (показана на рис. 5.38). В результате АЧТВ осталось удлинённым. Подберите правильное заключение:

- А) гемофилия А
- Б) гемофилия В
- В) болезнь Виллебранда
- Г) присутствие ингибитора (волчаночного антикоагулянта) в плазме
- Д) передозировка ингибитора витамина К (непрямого антикоагулянта)

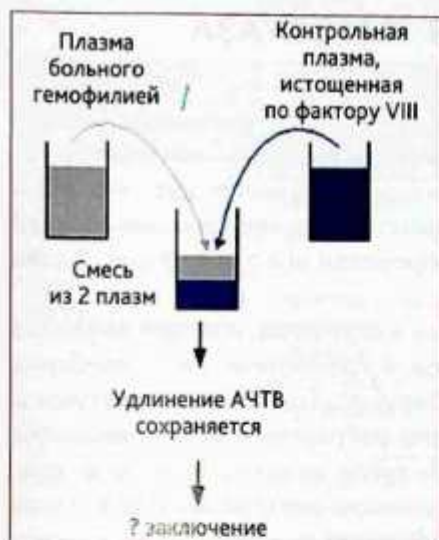


Рис. 5.38. Коррекционная проба с контрольной плазмой

05.10. Тромбоэластограмма – это:

- А) метод определения агрегации тромбоцитов
- Б) метод определения адгезии тромбоцитов
- В) графическая регистрация процесса свертывания крови
- Г) система методов для характеристики тромбоцитарного звена гемостаза
- Д) определение эластичности мембраны эритроцитов

Глава 6. ПАТОЛОГИЯ ГЕМОСТАЗА

В норме в организме гемостатический баланс сохраняется при широком диапазоне активности разных компонентов. Однако в случае возникновения дисбаланса про- и антикоагулянтных составляющих развиваются нарушения с повышенной кровоточивостью, либо тромбозы, либо одновременно оба эти явления. В этих случаях говорится о патологии гемостаза.

Теоретически геморрагические проявления могут возникать при дефиците прокоагулянтов или избытке антикоагулянтов, а тромботические – наоборот. Однако в действительности, как правило, формируются более сложные ситуации. Например, патологическое снижение активности фибринолиза или значительное повышение активности факторов свертывания крови на практике часто приводят к развитию тромбозов, а снижение активности фактора XII или высокая активность антитромбина не имеют клинических проявлений в виде кровоточивости. В общем виде петехии, пурпура, кровотечения из слизистых и носовые кровотечения характерны для нарушений сосудистой стенки и тромбоцитов (патология сосудисто-тромбоцитарного гемостаза). Обширные кровотечения в мышцы, полости, суставы характерны для нарушений плазменного гемостаза, включая патологию фибринолиза и антикоагулянтов.

В рамках настоящего издания нет возможности представить все клинические формы нарушений гемостаза, здесь будут охарактеризованы только наиболее распространенные, клинически значимые и диагностически выявляемые формы патологии свертывания крови (табл. 6.1).

Таблица 6.1. Генетически детерминированные изменения некоторых факторов свертывания

Белок	Изменения	Патологическое состояние (нозология)	Проявления	Частота встречаемости	Характер наследования	Диагностически значимые тесты
Фибриноген (фактор I)	Снижение содержания в крови	Афибриногенемия, гипофибриногенемия	Часто умеренное кровотечение	1×10^6		АЧТВ, ПВ, ТВ, количество фибриногена
	Снижение активности	Дисфибриногенемия	Кровотечения			АЧТВ, ПВ, ТВ, рептилазное время
	Повышение резистентности к плазмину	Дисфибриногенемия	Тромбозы			Время лизиса зуглобулинового сгустка? Исследование генетических маркеров

Продолжение табл. 6.1

Белок	Изменения	Патологическое состояние (нозология)	Проявления	Частота встречаемости	Характер наследования	Диагностически значимые тесты
Протромбин (фактор II)	Снижение активности	Гипопротромбинемия	Кровотечения	$0,5 \times 10^{-6}$		АЧТВ, ПВ, определение активности ф. II
	Повышение продукции фактора	Носительство протромботической мутации ф. II (мутация A 20210)	Склонность к тромбозам	1–4% популяции – гетерозиготное носительство		Исследование генетических маркеров
Фактор V	Снижение активности	Дефицит ф. V (гипопротромбинемия)	Кровотечения	1×10^{-6}		АЧТВ, ПВ, определение активности ф. V
	Повышение устойчивости к ингибиторам	Носительство протромботической мутации ф. V (фактор V Лейден и др.)	Склонность к тромбозам	2–7% популяции – гетерозиготное носительство		Исследование резистентности к APC, анализ генетических маркеров
Фактор VII	Снижение активности	Дефицит фактора VII. Гипопротромбинемия	Умеренные кровотечения	2×10^{-6}	Аутосомно-рецессивное	ПВ, определение активности ф. VII
Фактор VIII	Снижение активности	Гемофилия A	Кровотечения	$3-20 \times 10^{-6}$	Связанное с полом	АЧТВ, определение активности ф. VIII
	Повышение активности	Рассматривается в группе наследственной тромбофилии, статус окончательно не определен	Склонность к тромбозам	Не определена		Устойчивое изолированное повышение активности
Фактор IX	Снижение активности	Гемофилия B (болезнь Кристмаса)	Кровотечения	$3-5 \times 10^{-6}$	Связанное с полом	АЧТВ, исследование активности ф. IX
Фактор X	Снижение активности	Дефицит ф. X (болезнь Стюарта-Прауэра)	Кровотечения	1×10^{-6}	Аутосомно-рецессивное	АЧТВ, ПВ, определение активности ф. X
Фактор XI	Снижение активности	Дефицит ф. XI (гемофилия C)	Кровотечения			АЧТВ, определение активности ф. XI

Белок	Изменения	Патологическое состояние (нозология)	Проявления	Частота встречаемости	Характер наследования	Диагностически значимые тесты
Фактор XII	Снижение активности	Дефицит ф.XII (болезнь Хагемана)	Тромбозы?, кровотечения?			АЧТВ
Фактор XIII	Снижение активности	Дефицит ф.XIII, дефицит фибринстабилизирующего фактора	Кровотечения, плохое заживление ран	$1-2 \times 10^{-6}$	Ауто-сомно-рецессивное	Исследование активности ф.XIII
Анти-тромбин	Снижение активности	Дефицит антитромбина	Тромбозы			Определение активности антитромбина
Протеин С	Снижение активности	Дефицит протеина С	Тромбозы			Определение активности протеина С
Протеин S	Снижение активности	Дефицит протеина S	Тромбозы			Определение свободного протеина S

Помимо изменения активности разных компонентов гемостаза у пациентов с тромботическими проявлениями возможны так называемые «протективные» нарушения, то есть нарушения субстрата, защищающие его от воздействия ингибитора или системы элиминации. При этом активность субстрата может оставаться в пределах нормы.

Задачи лабораторной службы при ведении пациентов с подозрением на нарушения системы гемостаза

Диагностика нарушений свертывания крови базируется на трех составляющих: клинические проявления, индивидуальный и семейный анамнез. Результаты лабораторных исследований, которые следует рассматривать совместно, представлены на рис. 6.1 в виде диагностического алгоритма. В диагностически неясных случаях основой выбора правильного пути ведения и лечения пациента может быть тесный контакт клинициста и врача клинической лабораторной диагностики. При ведении пациентов с подозрением на нарушения системы гемостаза важны результаты лабораторных исследований. Многие геморрагические заболевания имеют сходную клиническую картину, однако требуют разных

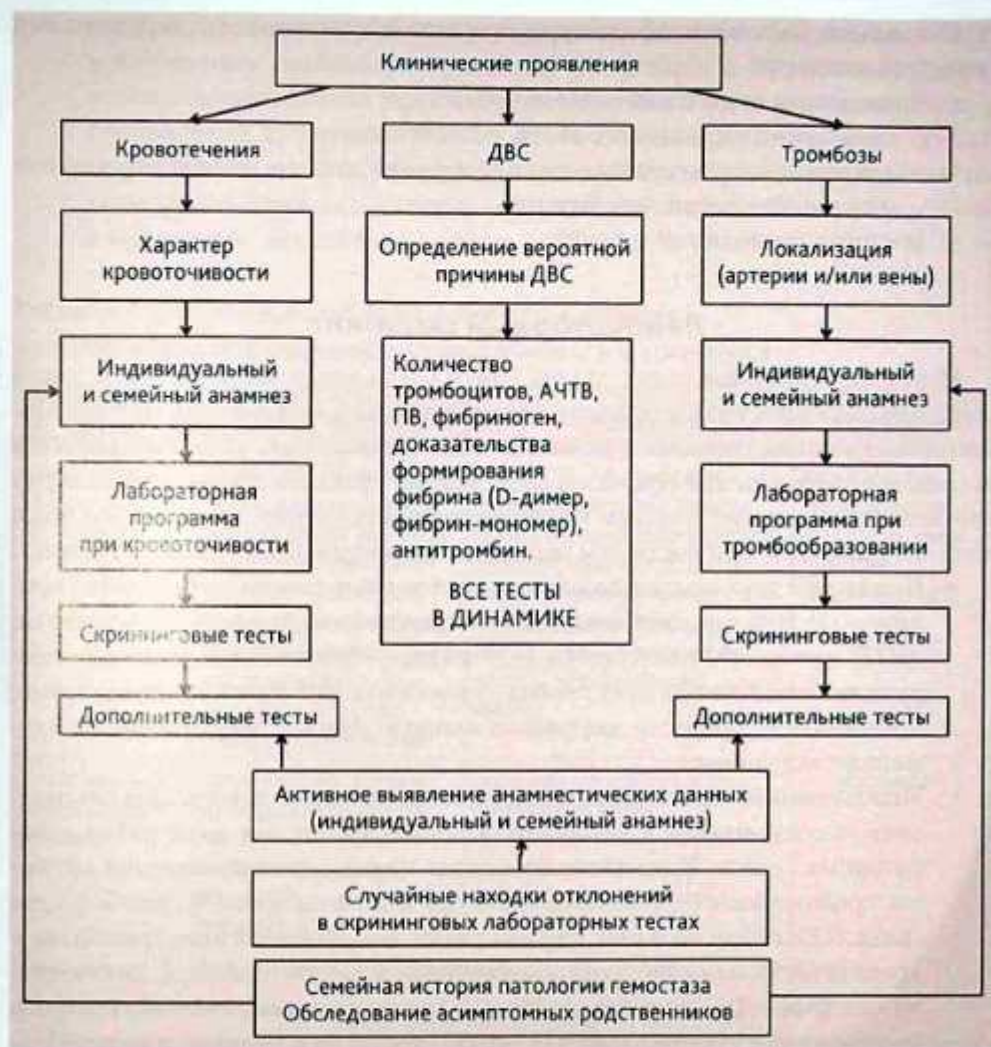


Рис. 6.1. Последовательность действий в клинко-лабораторной диагностике нарушений и оценке состояния системы гемостаза

терапевтических подходов. Только лабораторная диагностика позволяет поставить точный диагноз и назначить современную адекватную гемокомпонентную терапию. Тромботические проявления, как правило, возникают при сочетании разных протромботических факторов, как врожденных, так и приобретенных. Лабораторные исследования позволяют выявить эти факторы и провести не только лечение развившегося тромбоза, но и коррекцию фоновых изменений и предупредить рецидивы тромбозов, контролируя терапию. Без правильных современных лабораторных исследований невозможно лечение и профилактика нарушений гемостаза.

Основными задачами лаборатории при ведении пациентов с нарушениями гемостаза являются:

- диагностика нарушений системы гемостаза:
 - выявление нарушенного звена, или звеньев;
 - уточнение характера нарушения (дефицит синтеза, специфический или неспецифический ингибитор);
- контроль проводимой терапии.

Лабораторный скрининг

Перед лабораторией стоит задача найти с помощью минимального числа тестов кратчайший путь к диагнозу, отказавшись от малополезного однотипного обследования больных с разными видами патологии. Для оптимального исследования нарушений гемостаза современная практика сформулировала ряд принципов, следование которым может увеличить доступность и качество этого вида лабораторной диагностики в медицинских организациях разного уровня.

- Выделение двух последовательных этапов диагностики: первичного скрининга с использованием ориентировочных тестов (времени кровотечения, АЧТВ, протромбинового теста, количества фибриногена) и, в случае обнаружения изменений в этих пробах, проведение уточняющих определений, позволяющих провести дифференциальную диагностику причин обнаруженных нарушений.
- Использование на основе клинических предпосылок алгоритмов диагностики, в соответствии с которыми выполняется тот или иной набор лабораторных тестов. К их числу относятся методы для определения причины кровоточивости, распознавания причин склонности к тромбофилии (табл. 6.2); отбор больных группы риска для профилактики тромбозов и кровотечений в послеоперационном (послеродовом) периоде, диагностики синдрома ДВС при неотложных и критических состояниях, контроля за лечением антикоагулянтами, антиагрегантами, а также препаратами заместительной терапии (компонентами крови).
- Определение динамики выявленных изменений параметров гемостаза, позволяющее дифференцировать патологию от варианта нормы и проводить контроль за эффективностью целенаправленной терапии.
- Повторное обследование для подтверждения диагноза в случае выявления серьезных нарушений в системе гемостаза, таких как снижение уровня фактора Виллебранда, факторов свертывания, тромбоцитопении, дефицита или аномалии действия физиологических антикоагулянтов, выраженной тромбинемии и др. Известно, что некоторые виды патологии проявляются в определенных «нестандартных» условиях, например, персистенция волчаночного антикоагулянта во время беременности.
- Интерпретация показателей коагулограммы с учетом возможного влияния медикаментов. Чаще всего на результатах анализов сказывается гепарино-

терапия, прежде всего обычным гепарином, лечение пероральными антикоагулянтами, прием антиагрегантов, активаторов и ингибиторов фибринолиза, заместительная терапия компонентами крови и кровезаменителями (приводящая к гиперцитратемии и/или гемодилюции). На фоне приема пероральных антикоагулянтов при лечении тромбозов не представляется возможным правильный контроль за уровнем витамин-К-зависимых антикоагулянтов – протенинов С и S.

Таблица 6.2. Основные лабораторные исследования при клинических проявлениях кровоточивости и тромбозов

Схема обследования	Кровоточивость	Тромбозы	Синдром ДВС*
Ориентировочная коагулограмма	АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, клинический анализ крови на гематологическом анализаторе с подсчетом количества тромбоцитов, морфологическое исследование периферической крови (микроскопия мазка)	АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, клинический анализ крови на гематологическом анализаторе с подсчетом количества тромбоцитов, морфологическое исследование периферической крови (микроскопия мазка)	Количество тромбоцитов, АЧТВ, ПВ, фибриноген, D-димер, ПДФ
Дополнительные исследования	Время кровотечения стандартизованным методом или с помощью анализатора функции тромбоцитов PFA	D-димер по соответствующему алгоритму при низкой или умеренной клинической вероятности тромбоза или эмболии	Антитромбин

Примечание. * – все показатели в динамике.

Еще раз подчеркиваем, что изменение и выход за референтные значения отдельных показателей коагулограммы не доказывает патологии гемостаза. Чаще всего кровоточивость проявляется при сочетании или комбинации отдельных нарушений, которые, усиливая друг друга, способствуют развитию геморрагического синдрома. Например, нетяжелая гипофибриногенемия может не иметь клинических проявлений, но в сочетании с тромбоцитопенией/тромбоцитопатией провоцирует развитие геморрагического синдрома. То же самое касается и оценки значимости тромбоцитопений различной степени выраженности. Тем не менее приводим критические показатели тестов скрининговой коагулограммы при клинических проявлениях кровоточивости (табл. 6.3) и при тромбозах (табл. 6.4).

Критические значения, приведенные в табл. 6.3, являются условными и больше отражают мнение экспертов. В настоящее время в регламентирующих документах они не представлены. Так, в ГОСТ Р ИСО 15189-2015 прописано: «Лаборатория должна разработать документированную процедуру выдачи результатов

Таблица 6.3. Ориентировочные критические показатели при определении причин кровоточивости при скрининговых исследованиях

Метод исследования	Ориентировочные критические значения*
Время кровотечения	>10 мин
Количество тромбоцитов	<50 × 10 ⁹ /л
Оценка агрегационной функции тромбоцитов с АДФ, адреналином, коллагеном и ристомидином	Гипоагрегация
АЧТВ	Удлинение более чем в 2,5 раза
Протромбин по Квику	<50%
МНО	>4,0
Концентрация фибриногена	<1,0 г/л

Примечание. * – каждое учреждение должно установить свои дискриминационные значения патологии в зависимости от контингента больных (дети, взрослые, беременные, пожилые и т. д.), методов диагностики и применяемого лечения.

Таблица 6.4. Ориентировочные критические показатели при определении причин артериальных и венозных тромбозов

Основной метод	Патология
Количество тромбоцитов	>500 × 10 ⁹ /л
Оценка агрегационной функции тромбоцитов	Активация и гиперагрегация
Концентрация фибриногена	>5,0 г/л
Активность антитромбина	Ниже референсного интервала лаборатории
Активность протеина С	
Активность протеина S	
Волчаночный антикоагулянт	Наличие в плазме

исследований. В случае, когда результаты исследования оказались в интервалах «тревожный» или «критический»:

- немедленно извещается врач (или другой уполномоченный медицинский работник);
- ведутся записи о предпринятых действиях, дате документа, времени, ответственном сотруднике лаборатории, лице, которому передано сообщение, переданных результатах исследования и любых затруднениях, перечисленных в уведомлении».

Что представляют интервалы «тревожный» или «критический», в ГОСТ Р ИСО 15189-2015 не указано, хотя в версии ГОСТ Р 53079.3-2008 приведена таблица «Лабораторные исследования, выполняемые по жизненным показаниям, и

критические значения результатов лабораторных анализов, требующие немедленных действий», в которой для тромбоцитов даны значения $<20 \times 10^9/\text{л}$ и $>1000 \times 10^9/\text{л}$; для ПВ >40 сек; для D-димера >500 мкг/мл.

Таким образом, критические значения (или условно-критические значения) результатов исследований коагулограммы должны быть определены локально в соответствии с контингентом больных, возможностями лаборатории и прописаны в стандартных операционных процедурах (СОП), в том числе в части необходимости срочного оповещения врачей клинических подразделений – передачи критических значений лабораторных исследований.

Для детей, беременных, пожилых людей критические значения смещены в соответствии с референтными популяционными значениями и частотой встречаемости патологии. В этих группах выбирается индивидуальная тактика диагностики с целью своевременного назначения заместительной терапии и коррекции лечения. В частности, у детей тромбозы возникают реже, но зато они чаще связаны с наследственной тромбофилией и с ее более тяжелыми формами.

Клинический случай 6.1

Больной Б., 68 лет, страдает коксартрозом, показано хирургическое лечение – протезирование тазобедренного сустава. Сопутствующие заболевания: язвенная болезнь желудка (резекция 12 лет назад), желудочные кровотечения в анамнезе, мигренеподобные головные боли без явной неврологической патологии.

При плановом обследовании в период подготовки к операции выявлено повышение АЛТ в 2,5 раза и гипокоагуляционные изменения в скрининговых тестах коагулограммы: удлинение АЧТВ до 51–47 сек. В связи с болевым синдромом пациент длительно принимал анальгетики и в последнее время – диклофенак. Количество тромбоцитов в норме. Алкоголем не злоупотребляет. Гепатитом не болел, HCV, HBsAg не обнаружены. Клинически кровоточивости или семейной истории тромбозов нет.

Заключение. У больного, вероятно, имеет место гепатотоксический эффект нестероидных противовоспалительных средств (диклофенак) с повышением печеночной трансаминазы. Эти изменения могут объяснять удлинение АЧТВ. Противопоказаний к операции нет. Рекомендуются дообследование для дифференциальной диагностики с коагулопатией или наличием антифосфолипидных антител:

- 1. Активность фактора VIII.*
- 2. Антиген фактора Виллебранда.*
- 3. Функциональная активность тромбоцитов (индукция АДФ, коллагеном, ристомисином).*
- 4. Антитела к $\beta 2$ -гликопротеину 1 (IgG/IgM), антикардиолипиновые антитела (IgG/IgM).*
- 5. Волчаночный антикоагулянт (тест с ядом гадюки Рассела, скрининговый и подтверждающий при необходимости).*

Комментарий. Пациент готовится к операции с высоким риском тромбозм-болических осложнений. При обнаружении антифосфолипидных антител диагноз «антифосфолипидный синдром» будет неправомерен (не было клинических эпизодов тромбозов), но их носительство, вероятно, внесет дополнительный вклад в тромботические риски. В случае гипокоагуляции из-за коагулопатии или болезни Виллебранда нельзя предполагать снижение риска послеоперационных тромбозов, так как эти состояния не защищают от патологического тромбообразования, но увеличивают риски кровотечения. Антикоагулянтная профилактика потребует, но проводить ее нужно с осторожностью, применяя минимально достаточные дозы антикоагулянтов.

Клинический случай 6.2

Пациент К., 1 месяц, поступил в детское хирургическое отделение с клиникой кишечного кровотечения. Предварительный диагноз: «инвагинация кишечника». Коагулограмма заказана для выяснения причины геморрагического синдрома, по результатам которой дано следующее заключение: витамин-К-зависимая коагулопатия (геморрагическая болезнь новорожденных).

Коагулограмма пациента К.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	Более 300 сек	25–40 с
АЧТВ после коррекции нормальной донорской плазмой	32,2	
ПВ	Более 300 сек	15–18 с
ПВ после коррекции нормальной донорской плазмой	16 сек	
Тромбиновое время	23	16–25 с
Концентрация фибриногена	4,9	2,8–4,7 г/л
Фактор VII активность	0,5	55–165%
Фактор VIII активность	192	50–160%
Фактор XI активность	71	65–150%
Фактор IX активность	0,9	65–150%
Антиген фактора Виллебранда	65	Группа крови I 42–141%
Ристомицин-кофакторная активность фактора Виллебранда	65	Группа крови I 48–202%
Активность антитромбина	116	83–123%
Активность протеина С	10	70–140%
D-димеры	0,05	0–0,24 мкг/мл
Количество тромбоцитов	348	150–450 × 10 ⁹ /л

Комментарий. Геморрагическая болезнь новорожденных является одним из проявлений витамин-К-дефицитных состояний. При участии витамина К активируются факторы свертывания крови (II, VII, IX, X) и антикоагулянты – протеины С и S. В скрининговых тестах дефицит витамина К проявляется гипокоагуляцией по АЧТВ и протромбиновому времени при нормокоагуляции по тромбиновому времени. Активность антитромбина при этом сохранна на фоне дефицита активности протеинов С и S. Такая специфичность показателей коагулограммы позволяет исключить патологию печени и синдром ДВС.

Алгоритмы развернутой оценки критических звеньев нарушения свертывания крови

Как подчеркивалось выше, в случае обнаружения изменений в скрининговых тестах следует провести уточняющие определения, позволяющие выполнить дифференциальную диагностику причин обнаруженных нарушений. При этом дополнительные тесты также проводят на основе клинических предпосылок и алгоритмов диагностики, в соответствии с которыми выполняется тот или иной набор лабораторных исследований. Следует запросить у клиницистов информацию о типе кровоточивости (табл. 6.5), что может указать направление исследования при постановке коагулограммы.

Таблица 6.5. Характеристика основных типов кровоточивости и наиболее вероятный тип патологии гемостаза

Тип кровоточивости	Основные виды патологии
Микроциркуляторный (петехиально-пятнистый, синячковый)	Тромбоцитопении, тромбоцитопатии, болезнь Виллебранда
Гематомный	Гемофилии А и В
Смешанный (микроциркуляторно-гематомный)	Синдром ДВС (в стадии клинической манифестации), тяжелая степень болезни Виллебранда, передозировка прямых или непрямых антикоагулянтов, антиагрегантов, избыточная тромболитическая терапия
Васкулитно-пурпурный	Микротромбоваскулиты
Ангиоматозный	Телеангиэктазия, микроангиоматоз

В табл. 6.6 приведены некоторые примеры расширенных коагулограмм.

Поиск причин идиопатических тромбозов должен выполняться по показаниям в сроки не ранее 3 месяцев после острого эпизода тромбоза. Только генетический анализ может быть выполнен в любое время, независимо от клинической ситуации и сроков.

На результаты лабораторных исследований существенным образом может влиять любая антикоагулянтная терапия. Рекомендации по лечению тромбозов обозначают срок антикоагулянтной терапии – не менее 3 месяцев, с дальнейшим

Таблица 6.6. Дополнительные лабораторные исследования для определения причин кровоточивости и тромбозов (основные тесты см. в табл. 6.2)

Клиническая задача	Рекомендуемый перечень исследований
Диагностика причин кровоточивости	Агрегация тромбоцитов с соответствующими индукторами Фактор Виллебранда – антиген, активность, коллаген-связывающая способность Тест коррекции (АЧТВ при смешивании плазмы пациента с нормальной плазмой): • определение активности отдельных факторов свертывания (VIII, IX, XI, VII, XII, X); • определение ингибиторов факторов свертывания
Определение причин идиопатического тромбоза (гематологических рисков)	Естественные антикоагулянты – антитромбин, протеин С, протеин S Гомоцистеин Определение резистентности фактора V к активированному протеину С Генетический анализ на носительство мутаций гена фактора V (Лейденская мутация) и гена протромбина G20210A
Диагностика антифосфолипидного синдрома*	Волчаночный антикоагулянт Антитела к кардиолипину IgG/IgM Антитела к $\beta 2$ -гликопротеину 1 IgG/IgM
Выявление гиперкоагуляционного синдрома	Маркеры активации свертывания крови: D-димер, фибриноген, активность фактора VIII, антиген фактора Виллебранда

Примечание * – выполнение исследования по соответствующему алгоритму с повторением через 12 недель при получении положительного результата.

принятием решения о продлении в зависимости от соотношения польза/риск (потенциальная польза от использования антикоагулянтов и риск геморрагических осложнений). При этом характер лечения не меняется существенным образом при выявлении какого-либо дефекта, поэтому исследования нужно отложить до того момента, когда достаточно безопасно будет прервать терапию на 2–3 дня (в случае применения прямых ингибиторов свертывания) или перевести больного на профилактические дозы низкомолекулярного гепарина (в случае приема варфарина) и дождаться снижения МНО $<1,2$. Тогда можно получить надежные результаты исследований. Исключением является антифосфолипидный синдром (особенно с артериальными тромбозами), при котором препаратом выбора остается варфарин (хотя активно используются и прямые ингибиторы факторов), требуется дополнительное назначение аспирина и гидроксихлорохина. При обоснованном подозрении на антифосфолипидный синдром (АФС), который встречается нечасто, решение вопроса о прерывании терапии, замене препарата решается индивидуально, исходя из «золотого правила» – соотношение польза/риск.

Это далеко не полный подбор расширенных коагулограмм, в каждой медицинской организации могут быть собственные предпочтения. Следует учи-

тивать также клинические рекомендации и стандарты ведения пациентов с конкретной патологией. В последующих разделах будут приведены примеры расширенных коагулограмм для отбора больных группы риска для профилактики тромбозов и кровотечений в послеоперационном (послеродовом) периоде, диагностики синдрома ДВС при неотложных и критических состояниях, предназначенные для контроля за лечением антикоагулянтами, антиагрегантами, фибринолитиками. Коагулограммы на все случаи нарушений свертывания крови не существует.

Наследственные геморрагические заболевания

Наследственные геморрагические заболевания, как правило, связаны с генетически детерминированным дефицитом активности факторов свертывания крови. В подавляющем большинстве случаев имеется изолированный дефект одного из факторов, однако возможны комбинированные дефекты. В редчайших случаях геморрагические проявления могут быть связаны со значительным усилением активности антикоагулянтов, например плазминогена, это, как правило, является следствием генетически детерминированного дефицита ингибиторов.

Наследственная недостаточность факторов свертывания встречается в популяции относительно редко. Болезнь чаще всего имеет семейный характер, проявляется в детстве, больные концентрируются в гематологических центрах. Среди наследственных геморрагических заболеваний наиболее частой является болезнь Виллебранда. Распространенность клинически значимых форм составляет 1 на 5000–10000 населения. Среди наследственных геморрагических коагулопатий наиболее распространены гемофилия А и В, гораздо реже встречается дефицит ф. VII (гипопротромбинемия). Дефицит других факторов свертывания встречается еще реже, а их распространенность сильно зависит от особенностей популяции. Например, дефицит ф. XI широко распространен в популяции евреев ашкенази, а в других популяциях встречается лишь спорадически. Гомозиготный дефицит ф. X, приводящий к тяжелым геморрагическим проявлениям, встречается чаще в популяциях, где распространены родственные браки.

Лечение заболеваний, связанных с наследственным дефицитом факторов свертывания, в основном заключается в коррекции дефицита препаратами, содержащими отсутствующий фактор. Такие препараты производят из донорской плазмы или получают генно-инженерным путем (рекомбинантные препараты). Также для лечения может применяться свежемороженая или лиофилизированная плазма или ее первичные производные – криопреципитат или супернатант.

Гемофилия А

Гемофилия А – геморрагическое заболевание, возникающее вследствие генетически обусловленного снижения активности ф. VIII. Приобретенный дефицит ф. VIII в настоящее время не классифицируют как гемофилию.

Гемофилия А – заболевание, сцепленное с полом, ген фактора VIII расположен в X-хромосоме. Тяжелый врожденный дефицит ф. VIII встречается, за редким исключением, у лиц мужского пола. Женщины являются носителями гена и могут даже иметь легкие геморрагические проявления; тяжелая форма гемофилии у них встречается чрезвычайно редко. Связано это со следующими ситуациями: (рис. 6.2): если девочка имеет обе X-хромосомы с дефектным геном ф. VIII (отец болен гемофилией, а мать является носителем гена гемофилии и передала ей дефектную хромосому); если у девочки активна только одна X-хромосома с дефектным геном ф. VIII (например, при синдроме Шерешевского–Тернера) либо когда у девочки заблокирован здоровый ген на одной из хромосом, а активный ген имеет мутацию. Основное проявление гемофилии – кровотечения и кровоизлияния, возникающие спонтанно или вследствие травмы. Чаще всего присутствует семейный анамнез заболевания, однако в 1/3 случаев встречаются спорадические мутации гена ф. VIII. Гемофилию следует подозревать при появлении у людей:

- легко развивающихся экхимозов и гематом в раннем детстве;
- спонтанных кровотечений (причина кровотечения неясна), особенно в суставах, мышцы и мягкие ткани;
- длительных кровотечений после травмы или хирургического вмешательства.

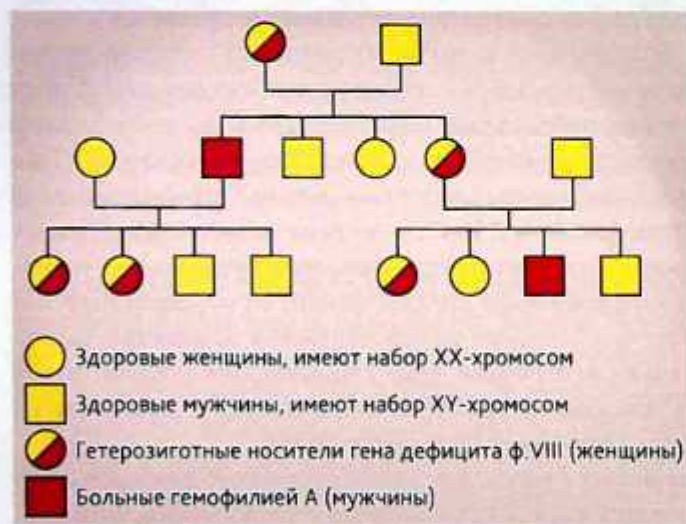


Рис. 6.2. Генетическое древо наследственной гемофилии. Поскольку ген ф. VIII и ф. IX находится в X-хромосоме и отсутствует в Y-хромосоме, риск передачи его от матери составляет 50%, а риск рождения мальчика, больного гемофилией – 25%

Распространенность гемофилии в большинстве стран составляет около 1 : 10 000 мужчин. Примерно в половине случаев диагностируется тяжелая форма заболевания. Существует несколько классификаций гемофилии по тяжести. Все они основаны на определении активности ф. VIII в крови. В табл. 6.7 приведена классификация гемофилии А, рекомендованная Всемирной федерацией гемофилии и Национальным гематологическим обществом России.

Помимо приведенной предложены другие классификации, в которых тяжелая форма диагностируется при уровне фактора до 2 или до 3%.

Таблица 6.7. Клиническая классификация гемофилии А

Тяжесть течения	Активность ф. VIII	Возраст появления геморрагических симптомов	Клинические проявления
Тяжелая	<1%	До 1 года	Выраженный кожный гемосиндром по гематомному типу, кровоизлияния в мягкие ткани, мышцы, рецидивирующие гемартрозы с поражением 3 и более суставов, тяжелые кровотечения из слизистых, почечные кровотечения, тяжелые послеоперационные кровотечения
Средняя	1–5%	Как правило, между 1 и 3 годами	Кожный гемосиндром по гематомному типу, но выражен меньше, кровоизлияния в мягкие ткани и мышцы после значительной травмы, рецидивирующие гемартрозы с поражением 1–2 суставов, реже большего количества, кровотечения из слизистых, тяжелые послеоперационные кровотечения
Легкая	>5% – <30%	В любом возрасте	Аномально длительные кровотечения после хирургических вмешательств и травм. Другие геморрагические проявления бывают редко

При тяжелой форме гемофилии А активность ф. VIII в крови практически не меняется в течение жизни, при среднетяжелой возможны колебания в незначительных пределах, а при легкой форме активность фактора может изменяться, в том числе повышаться, особенно при применении синтетических аналогов вазопрессина.

Семейный анамнез. По данным Всемирной федерации гемофилии, 2/3 больных гемофилией имеют в семейном анамнезе данные за геморрагическую коагулопатию, а у трети пациентов нарушения выявляются впервые. Анализ, проведенный в гематологическом центре Измайловской ДГКБ г. Москвы, показал другие результаты: среди семей, в которых есть дети, больные гемофилией, лишь около 1/3 до момента рождения больного ребенка знали о наличии геморрагических проявлений у членов семьи.

Анализ гена фактора VIII в настоящее время является важной частью обследования семьи больного гемофилией. Генетический анализ больных и их семей имеет большое практическое значение. Это позволяет проводить семейную консультацию с оценкой риска рождения детей с гемофилией у родственников больного и провести диагностику гемофилии у плода на ранних сроках беременности. Выяснение характера мутации позволяет предсказать риск развития ингибитора к вводимому с лечебными целями фактору VIII.

Клинические проявления гемофилии А

Для гемофилии А характерны отсроченные кровотечения и кровоизлияния, возникающие после травмы. Поскольку при гемофилии не страдает первичный

тромбоцитарный гемостаз, при травмах сосудов небольшого калибра кровотечения останавливаются. Однако аномально длительный процесс свертывания крови не позволяет создать своевременно плотный тромб, что приводит к рецидиву кровотечения. В зависимости от тяжести гемофилии без адекватного лечения вторичное кровотечение может остановиться через некоторое время, но может длиться очень долго, приводя к тяжелой анемии. Очень характерным для гемофилии является кровоизлияние в элементы опорно-двигательного аппарата. Гематомы мышц (клинический случай 6.3) и рецидивирующие кровоизлияния в суставы приводят этих больных к нарастающему остеопорозу, мышечной дистрофии, артрозам крупных суставов. Значительное поражение опорно-двигательного аппарата у неправильно леченных пациентов с тяжелой гемофилией А формируется к младшему школьному возрасту.

Клинический случай 6.3

Пациент М., 6 дней, поступил в детское хирургическое отделение с клиникой гигантской гемангиомы/гематомы ягодичной области. Семейный анамнез без особенностей.

Расширенная коагулограмма ребенка с мышечной гематомой

Тест	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	143	25,4–39,9 с
Протромбиновая активность по Квику	118	>70%
Тромбиновое время	25	15,8–24,9 с
Концентрация фибриногена	4,09	2,8–4,7 г/л
Фактор VIII, активность	0,5	50–160%
Фактор XI, активность	121	65–150%
Антиген фактора Виллебранда	123	Группа крови I – 42–141% Группа крови II, III, IV – 66–176%
Ристомин-кофакторная активность фактора Виллебранда	118	Группа крови I – 48–202% Группа крови II, III, IV – 61–240%

Заключение. Лабораторные признаки истинного дефицита фактора VIII. Гемофилия А.

Лабораторное исследование при гемофилии

Коагулологическое обследование проводится поэтапно.

Первый этап. Коагулологический скрининг при подозрении на геморрагические состояния включает АЧТВ, ПВ, ТВ, концентрацию фибриногена (по Клауссу), время кровотечения стандартизованным методом (например, по Айви или с

помощью анализаторов функции тромбоцитов PFA-100 или PFA-200) и подсчет количества тромбоцитов. На основе этих тестов можно определить тип нарушения свертываемости крови. Для гемофилии характерно увеличение АЧТВ, удлинение времени свертывания крови при сохранении других показателей в пределах нормальных значений. Необходимо иметь в виду, что эти скрининг-тесты могут не обнаружить аномалий у пациентов с легкой формой гемофилии.

Второй этап. Выполняется при изолированном удлинении АЧТВ либо при отсутствии изменения в скрининге и наличии клинических признаков легкой формы гемофилии. Проводят тест-коррекции (коррекция АЧТВ при смешивании плазмы пациента с нормальной плазмой), определение активности ф. VIII, ф. IX, фактора Виллебранда, ф. XI и ф. XII.

Тест смешивания. Плазма пациента смешивается с нормальной контрольной плазмой (100% активности факторов) в соотношении 1:1. АЧТВ и активность ф. VIII определяются немедленно и после инкубации в течение часа при 37 °С. Если активность ф. VIII в обоих тестах равна 50%, данных за ингибитор нет. Если активность достоверно ниже 50% только в инкубированной пробе, имеются данные за наличие специфического ингибитора к ф. VIII. Если активность снижается в обеих пробах (при исследовании сразу после смешивания и после часовой инкубации), можно заподозрить наличие волчаночного антикоагулянта.

Третий этап. При выявленном снижении активности ф. VIII или ф. IX выполняется определение специфического ингибитора к сниженному фактору. При снижении активности нескольких факторов свертывания крови и/или удлинении фосфолипидзависимых тестов (АЧТВ с чувствительными реактивами) проводится определение неспецифического ингибитора (волчаночного антикоагулянта). Диагноз и тяжесть гемофилии устанавливаются после выявления снижения активности ф. VIII или ф. IX, если подтверждено отсутствие данных за приобретенное геморрагическое состояние, в том числе связанное с появлением первичного ингибитора.

Периодичность лабораторного исследования

1. Клинический анализ крови с подсчетом тромбоцитов и ретикулоцитов – не реже 1 раза в год.
2. Биохимический анализ крови с определением маркеров поражения печени и обмена железа – не реже 1 раза в год.
3. Анализ маркеров гемотрансмиссивных инфекций: гепатита В, С, ВИЧ, возможно, других и гепатита А – не реже 1 раза в год.
4. Анализ активности vWF и ф. VIII, ф. IX, ингибитора ф. VIII или ф. IX:
 - после первых 10 и 20 дней введения или не реже 1 раза в год после начала заместительной терапии на протяжении 3 лет;
 - далее 1 раз в 1–3 года;
 - перед плановым оперативным лечением или инвазивными манипуляциями.
5. Анализ показателей фармакокинетики vWF и ф. VIII, ф. IX:
 - при назначении постоянной профилактики 1 раз в 1–3 года;

- перед плановым оперативным лечением;
- в случае недостаточной эффективности применения стандартных схем заместительной терапии и при подозрении на развитие ингибитора.

Лечение гемофилии

Основным патогенетическим методом лечения гемофилии А является введение препаратов фактора VIII. В настоящее время разработан высокоочищенный препарат ф. VIII с высокой активностью в малом объеме. Это решило проблему создания любой необходимой концентрации ф. VIII в крови реципиента. Разработанные методы удаления вирусов позволили свести на нет риск заражения наиболее значимыми инфекциями, передающимися через кровь – ВИЧ, гепатиты В и С. Современные препараты концентратов ф. VIII представляют собой лиофилизированный порошок с точно определенной активностью ф. VIII. Препарат может храниться при комнатной температуре до 6 месяцев, а при $+2...+8^{\circ}\text{C}$ до 2 лет, что позволяет легко использовать его в домашних условиях. Однако препарат стоит дорого. Разработка концентратов ф. VIII сделала возможным профилактическое введение для предотвращения кровоизлияний в суставы. В настоящее время разработаны генно-инженерные (рекомбинантные) концентраты ф. VIII. При производстве рекомбинантного препарата вообще не применяются компоненты крови человека, что теоретически полностью исключает риск инфицирования гемотрансмиссивными человеческими вирусами. Современные подходы к лечению гемофилии, с учетом стоимости гемостатических препаратов, требуют регулярного контроля состояния гемостаза с обязательным определением активности дефицитного фактора.

Контроль терапии. Поскольку специфическая терапия гемофилии предусматривает введение препаратов фактора VIII, важно знать, какой уровень фактически достигается после их введения. Эта необходимость возникает при использовании препаратов с определенной активностью фактора, поскольку каждый пациент имеет индивидуальные особенности распределения и метаболизма факторов свертывания. Необходимость контроля может быть связана с недостаточной эффективностью препарата в период оперативного лечения или после травмы, поскольку при активной кровопотере или большой раневой поверхности потребление факторов свертывания существенно усиливается.

Лечение гемофилии (А и В) контролируется тестами:

- остаточная активность ф. VIII или ф. IX;
- тест восстановления (см. ниже);
- построение фармакокинетической кривой препарата с определением периода полувыведения и клиренса – проводится путем многократного отбора образцов с определением активности ф. VIII или ф. IX на протяжении 1–5 дней; конкретная схема зависит от задач анализа; для некоторых препаратов разработаны программы, позволяющие оценить необходимые фармакокинетические параметры по 2–3 точкам.

Ингибиторная форма гемофилии А

Наиболее значимым специфическим осложнением терапии препаратами ф. VIII является развитие ингибиторной формы гемофилии. Примерно у 5–20% пациентов с тяжелой формой гемофилии А, получавших препараты ф. VIII, в крови появляются антитела к нему. При высоком титре антител весь вводимый препарат немедленно связывается и выводится из кровотока. Это создает значительные трудности при оказании гемостатической помощи. С практической точки зрения необходимо знать активность развившегося ингибитора. Активность измеряется методом Бетезда (см. ниже) в Бетезда единицах (БЕ). 1 БЕ соответствует такому количеству антител, которые связывают 50% активности фактора VIII в крови. При титре ингибитора до 5 БЕ возможно лечение высокими дозами концентрата ф. VIII. При титре более 5 БЕ необходимы другие пути решения проблемы.

Для оказания гемостатической помощи пациентам с ингибиторной формой гемофилии применяются препараты, позволяющие запустить коагуляционный каскад «ниже» факторов VIII и IX. Наиболее часто применяются препараты «FEIBA» и «Эптаког альфа». «FEIBA» – активированный концентрат факторов протромбинового комплекса. В его состав входят факторы IX, X, VIIa. Его внутривенное введение активирует образование протромбиназного комплекса.

«Эптаког альфа» – концентрат рекомбинантного активированного фактора VII. В основе механизма гемостатического действия этого препарата лежит значительная активация первого этапа внешнего каскада, происходящая при контакте ТФ и ф. VIIa. Кроме того, этот препарат в терапевтических концентрациях способен активировать ф. IX и ф. X на мембране активированных тромбоцитов без участия ТФ.

Для лечения и профилактики кровотечений при ингибиторной форме гемофилии А разработано несколько новых молекул: ингибитор антитромбина, ингибитор ингибитора пути тканевого фактора и бивалентное антитело, имеющее сродство к факторам IX и X, «протезирующее» активность ф. VIII. Эти новые препараты существенно расширяют возможности лечения ингибиторной гемофилии, разрабатываются подходы к контролю эффективности и безопасности терапии этими препаратами.

Исследование активности ингибитора по Бетезда методу

За 1 единицу Бетезда (БЕ) принято такое количество антител, которое блокирует 50% активности фактора в контрольной плазме. Метод основан на тесте смешивания. Плазма пациента последовательно разводится до концентрации, которая блокирует 50% или менее активности фактора в контрольной плазме, после чего, зная степень разведения плазмы пациента, можно вычислить активность ингибитора. Для большей точности желательно учитывать результаты двух-трех последовательных разведений и вычислять среднее арифметическое.

Клинический пример

У пациента с подозрением на ингибиторную форму гемофилии активность ф. VIII в результатах тестов смешивания представлена в табл. 6.8.

Таблица 6.8. Данные для определения активности ингибитора фактора VIII по методу Бетезда

Разведение плазмы пациента	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Активность ф. VIII в контрольной плазме	100	100	100	100	100	100
Ожидаемая активность ф. VIII в тесте разведения контрольной плазмы и плазмы пациента (соотношение 1 : 1)	50	50	50	50	50	50
Активность ф. VIII в тесте смешивания 1 : 1 контрольной плазмы и разведенной плазмы пациента	0	0	3	9	30	42

Вычисляем по данным табл. 6.8. Разведение плазмы пациента 1/16 блокирует 20% активности ф. VIII в контрольной плазме (50 – 30). Вычисляем, что разведение, которое блокирует 50%, составит 1/6,4. Разведение 1/8 блокирует 41% активности фактора VIII (50 – 9), разведение, которое блокирует 50%, будет равно 1/6,6. Также для разведения 1/32 разведение, блокирующее 50%, составит 1/5,1. Среднее арифметическое из полученных 3 результатов будет примерно равно 1/6. Таким образом, 50% активности ф. VIII блокируется плазмой пациента в разведении 1 : 6, т. е. активность ингибитора в плазме больного составляет 6 БЕ.

Данный метод применим для исследования активности специфического ингибитора к любому фактору свертывания.

Исследование восстановления фактора VIII в крови

Известно, что активность ф. VIII в крови после введения концентратов в дозе 1 МЕ/кг веса повышается в 1,5–2 раза, а период полувыведения составляет около 12 часов. Однако возможны значительные индивидуальные колебания этих показателей. Проведение теста восстановления активности ф. VIII включает определение его активности в плазме, собранной непосредственно перед введением известной дозы фактора и через определенные интервалы. Имеются разные методики проведения теста. Если есть возможность, необходимо определить активность через 15–30 мин, через 6, 12, 24 и 48 часов после введения препарата. Доза вводимого препарата должна быть не менее 25 МЕ/кг, но желательно не более 50 МЕ/кг.

Тест восстановления показывает, на сколько поднимается активность фактора после введения известной дозы из расчета на килограмм массы тела пациента. Для этого образцы отбирают до введения и через 15–30 мин после введения фактора. Результат рассчитывается по формуле:

$$\text{Восстановление} = \frac{\text{масса} \times (\text{активность после введения} - \text{активность до введения})}{\text{Доза препарата}},$$

где масса тела выражается в кг, активность – в % или МЕ, доза – в МЕ/кг.

На основании полученных результатов можно построить график, по которому в дальнейшем удобно вычислять ожидаемую активность препарата. Тест восстановления необходимо проводить неоднократно на протяжении жизни пациента, поскольку активность метаболизма факторов и соотношение объема плазмы и веса тела меняется по мере роста и взросления ребенка. Важно помнить, что тест восстановления необходимо проводить в период, когда нет значимых геморрагических проявлений, чтобы на его результаты не оказывало влияния потребление фактора в месте кровотечения.

Некоторые молекулы рекомбинантного ф. VIII имеют значительные особенности при определении активности, и соответственно, оценке фармакокинетики (например, необходимо использовать хромогенный метод оценки активности). Эта информация имеется в инструкции к препарату и должна учитываться при лабораторном тестировании.

Клинический случай 6.4

Больной П., 2,5 года. Страдает гемофилией А тяжелой формы, ф. VIII: C 0,8%, получал гемостатическую терапию концентратом фактора VIII в дозе 250 МЕ на введение. В возрасте одного года после травмы слизистой полости рта началось кровотечение. После двукратного введения 500 МЕ концентрата фактора VIII с интервалом в 3 часа кровотечение не прекратилось. Проведено исследование коагулограммы. ПТ – 120%, АЧТВ – 120 с (норма 28–43 с), ф. VIII < 0,5%, ф. IX – 95%, ф. XI – 105%, ф. XII – 73%. АЧТВ после смешивания 1 : 1 с нормальной плазмой (активность ф. VIII – 100%) 89 сек. Предположили наличие специфического ингибитора к ф. VIII. Исследование ингибитора по методу Бетезда показало, что его титр равен 2,5 БЕ. Проведено лечение концентратом фактора VIII в дозе 200 МЕ/кг ежедневно в течение 4 дней. Кровотечение остановилось после первого введения. В дальнейшем начата профилактика концентратом ф. VIII в дозе 2000 МЕ 1 раз в 2 дня. Исследование ингибитора через 6 месяцев показало его следовую активность, пациент был переведен на профилактическое лечение концентратом ф. VIII в дозе 500 МЕ 1 раз в 2 дня. Исследование коагулограммы через год показало отсутствие ингибитора к ф. VIII.

Гемофилия В

Гемофилия В – геморрагическое заболевание, возникающее вследствие генетически обусловленного снижения активности ф. IX. Частота встречаемости приблизительно 1 на 30 000 мальчиков. Заболевание сцеплено с полом, клинически сходно с гемофилией А. Классификация по тяжести аналогична классификации гемофилии А, основана на определении активности фактора IX в крови: тяжелая форма IXa < 1%, среднетяжелая 1–5%, легкая форма > 5–30%.

Лабораторные исследования при подозрении на геморрагическое состояние проводятся этапно.

Первый этап. Коагулологический скрининг проводится, как для гемофилии А. В табл. 6.9 представлены изменения основных коагулологических тестов у больных гемофилией В. При легких формах гемофилии В может не быть удлинения АЧТВ. При тяжелой и умеренной степени дефицита ф. IX имеет место удлинение АЧТВ, однако результат во многом зависит от коммерческого набора реактивов.

Таблица 6.9. Изменения скрининговых тестов при гемофилии В

Время кровотечения	Норма
ПВ	Норма
АЧТВ	Удлинено
Тромбиновое время	Норма
Количество фибриногена	Норма
Кол-во тромбоцитов	Норма

Второй этап. Выполняется при изолированном удлинении АЧТВ либо при отсутствии изменения в скрининге и наличии клинических признаков легкой формы гемофилии. Проводят тест коррекции (коррекция АЧТВ при смешивании плазмы пациента с нормальной плазмой), определение активности ф. VIII, ф. IX, фактора Виллебранда, ф. XI и ф. XII. Исследование активности ингибитора и теста восстановления проводится по схеме, аналогичной схеме у больных гемофилией А. Однако при проведении теста восстановления необходимо учитывать более длительный период полувыведения. Соответственно, взятие материала будет проводиться по схеме: до введения, через 15–30 минут после введения, через 12, 24, 48 и 72 часа.

Третий этап. Выполняется при выявленном снижении активности ф. IX.

- Определение специфического ингибитора к ф. IX выполняется по схеме, аналогичной исследованию специфического ингибитора ф. VIII, однако инкубация смеси плазмы пациента и нормальной плазмы не требуется.
- Определение неспецифического ингибитора (волчаночного антикоагулянта) выполняется при снижении активности нескольких факторов свертывания крови, удлинении липид-зависимых тестов (АЧТВ с чувствительными реактивами).

Диагноз и тяжесть гемофилии устанавливаются после выявления снижения активности фактора IX и при отсутствии данных за приобретенное геморрагическое состояние, связанное с появлением ингибитора.

Контрольные коагулологические обследования. Проводятся для уточнения формы заболевания, контроля развития осложнений и контроля эффективности фармакотерапии.

- Плановый контроль: АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, активность ф. IX, ингибитор ф. IX. Выполняется не реже 1 раза в 3 года.

- Контроль ингибитора: АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, активность ф. IX, ингибитор ф. IX. Выполняется:
 - пациентам с тяжелой и среднетяжелой гемофилией В каждые 5–10 дней введения концентрата ф. IX на протяжении первых 20–50 дней введения;
 - пациентам независимо от тяжести гемофилии перед плановым хирургическим лечением;
 - при появлении клинических или лабораторных данных за развитие ингибитора.
- Контроль эффективности фармакотерапии: активность ф. IX, ингибитор ф. IX (если не выполнялся ранее или есть подозрение на его развитие), тест восстановления, построение фармакокинетической кривой. Выполняется при недостаточной эффективности адекватных доз препарата, для подбора оптимальной схемы профилактической заместительной терапии.

Дополнительные лабораторные обследования направлены на диагностику осложнений и сопутствующих состояний.

- Биохимический анализ крови для оценки состояния печени выполняется 1 раз в год планово и при подозрении на развитие гепатита.
- Биохимический анализ крови для оценки обмена железа показан при развитии анемии, детям первых трех лет жизни (не реже 1 раза в год), пациентам, страдающим повторными или массивными кровотечениями.

Клинический случай 6.5

Пациент Н., 3,5 года, поступил в отоларингологическое отделение на плановую аденоэктомию. Сведения о наличии геморрагического синдрома в его семейном анамнезе отсутствуют.

Коагулограмма пациента Н.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	54	25–40 с
Протромбиновая активность по Квику	96	<70%
Тромбиновое время	23	16–25 с
Концентрация фибриногена	3,67	2–4 г/л
Фактор VIII активность	67	50–160%
Фактор XI активность	97	65–150%
Фактор IX активность	6	65–150%
Антиген фактора Виллебранда	65	Группа крови I – 42–141% Группа крови II, III, IV – 66–176%
Ристомицин-кофакторная активность фактора Виллебранда	65	Группа крови I – 48–202% Группа крови II, III, IV – 61–240%

Заключение. Лабораторные признаки истинного дефицита фактора IX. Гемофилия В.

Редкие наследственные геморрагические заболевания

Дефицит фактора XI

Дефицит фактора XI (ранее определялся как гемофилия С) – геморрагическое заболевание, возникающее из-за дефекта гена фактора XI. Дефицит фактора XI передается как аутосомный рецессивный признак. Это заболевание достаточно часто встречается в популяции евреев ашкенази, среди которых гомозиготное носительство составляет от 0,1 до 0,3%, а гетерозиготное – от 5,5 до 11%. В других группах людей описаны лишь спорадические случаи. Клинически дефицит ф. XI значительно отличается от гемофилии А и В, в частности расстройство не приводит к кровотечению в суставы, вследствие этого термин «гемофилия С» исключен из классификации. У больных с гомозиготной формой заболевания активность ф. XI в крови составляет от 0 до 15%, у гетерозиготных носителей – от 25 до 70%.

При дефиците ф. XI имеется умеренно выраженный геморрагический синдром в виде большого количества кожных геморрагических элементов, носовых, маточных кровотечений, длительных кровотечений после хирургических вмешательств, кровотечений после удаления зуба или тонзиллэктомии. В каждом конкретном случае трудно предсказать, как больной среагирует на хирургическое вмешательство. Известно много мутаций, влияющих на протекание заболевания, частота и риск возникновения кровотечения не всегда зависят от степени недостаточности фактора XI, тяжесть геморрагического синдрома может не коррелировать с активностью ф. XI в крови. Клинические проявления возникают при остаточной активности ф. XI менее 30%, однако возможны минимальные проявления у гетерозиготных носителей с активностью ф. XI между 50 и 70%.

Лечение. Показана заместительная терапия препаратами, содержащими ф. XI, с целью профилактики или остановки кровотечения. Используется свежезамороженная плазма. Разработаны концентрированные очищенные препараты ф. XI, но концентраты ф. XI в нашей стране пока не зарегистрированы.

Лабораторная диагностика дефицита ф. XI основана на проведении стандартных тестов коагулограммы и на определении активности ф. XI в плазме (табл. 6.10).

Таблица 6.10. Изменения скрининговых тестов при дефиците ф. XI

Время кровотечения	Норма
ПВ	Норма
АЧТВ	↑
Тромбиновое время (фибриноген)	Норма
Кол-во тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф. XI	Снижена

Дефицит фактора X (болезнь Стюарта–Прауэра)

Болезнь Стюарта–Прауэра – редкое геморрагическое заболевание, вызванное дефицитом активности ф.Х. Болезнь Стюарта–Прауэра передается как аутосомно-рецессивный признак. Наследственный дефицит ф.Х встречается в популяциях с частыми родственными браками. Клинические проявления имеются в основном у гомозиготных носителей, у которых активность ф.Х составляет около 1%. Реже у гомозигот может быть активность до 25%. Тяжесть заболевания коррелирует с активностью ф.Х в крови. При тяжелой форме заболевания проявления сходны с проявлениями при тяжелой гемофилии – гемартрозы, гематомы мягких тканей, кровотечения из ран слизистых, тяжелые послеоперационные кровотечения. Очень характерны для тяжелого врожденного дефицита ф.Х внутричерепные кровоизлияния, которые могут развиваться с первых дней жизни пациента. Такие эпизоды приводят к инвалидизации и даже гибели ребенка.

Лечение: профилактическое лечение высокоэффективно. Введение концентрата факторов протромбинового комплекса, содержащих ф.Х в дозе 30–50–70 МЕ/кг, 1 раз в неделю, эффективно предотвращает значимые геморрагические проявления. Для остановки кровотечений при отсутствии концентрата факторов протромбинового комплекса может использоваться свежезамороженная плазма.

Лабораторная диагностика дефицита ф.Х основана на изменении стандартных тестов коагулограммы и на определении активности ф.Х (табл. 6.11).

Таблица 6.11. Изменения скрининговых тестов при дефиците ф.Х

Время кровотечения	Норма или удлинено
ПВ	Удлинено
АЧТВ	Удлинено
Тромбиновое время (фибриноген)	Норма
Кол-во тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф.Х	Снижена

Клинический случай 6.6

Пациент В., 3 мес. Родители обратились с жалобами на кожный геморрагический синдром в виде синяков в области груди и спины, кровотечения из слизистой рта в течение 3 суток. Кровотечения из мест инъекции после прививок не было. Проявлений кровоточивости в семейном анамнезе не было. Родители состоят в родственном браке (троюродные брат и сестра). У ребенка есть старшая сестра, не страдающая кровоточивостью.

При осмотре – состояние средней тяжести за счет геморрагических проявлений. Изменений со стороны внутренних органов не выявили.

Проведен коагулологический скрининг: время кровотечения нормальное, количество тромбоцитов $399 \times 10^9/\text{л}$, АЧТВ – 101 с (норма 28–43 с), ПВ значительно удлинено (не определяется), агрегация тромбоцитов с АДФ, коллагеном, адреналином и агрегстином нормальная. У ребенка была заподозрена поздняя форма геморрагической болезни новорожденных, проведено лечение концентратом факторов протромбинового комплекса и витамином К. Кровотечение было остановлено. Однако для уточнения диагноза была исследована активность факторов свертывания крови. Выявили: ф.VIII – 120%, ф.IX – 91%, ф.VII – 71,8%, ф.II – 102%, ф.V – 113%, ф.X < 0,5%, фибриноген – 4,3 г/л, фактор Виллебранда – 85%.

Ребенку поставлен диагноз «врожденный дефицит ф.X», в дальнейшем подтвержденный генетическим анализом. Профилактическое введение концентрата протромбинового комплекса 1 раз в неделю позволило избежать тяжелых геморрагических проявлений.

Дефицит фактора VII

Частота наследственного дефицита ф.VII в большинстве популяций составляет около 1 : 500 000 человек. Наследование аутосомно-рецессивное. Ген ф.VII расположен на 13-й хромосоме. Активность ф.VII может значительно варьировать в зависимости от характера мутации. При активности ф.VII выше 10% геморрагические проявления бывают редко. В наиболее тяжелых случаях, при активности ф.VII менее 1%, геморрагические проявления развиваются с первых дней жизни. Характерны носовые, маточные, послеоперационные, послеродовые кровотечения, реже встречаются гематомы мягких тканей, гемартрозы, кровоизлияния в ЦНС, кровотечения из пуповинного остатка, желудочно-кишечные и почечные кровотечения, кожный геморрагический синдром.

Характерные изменения коагулограммы представлены в табл. 6.12.

Таблица 6.12. Изменения лабораторных тестов при дефиците ф.VII

Время кровотечения	Норма или удлинено
ПВ	Удлинено
АЧТВ	Норма
Кол-во тромбоцитов	Норма
Тромбиновое время	Норма
Фибриноген	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф.VII	Снижена

Лечение: заместительная терапия препаратами, содержащими ф.VII: концентраты ф.VII неактивированные и активированные, концентраты факторов протромбинового комплекса. Эффективность свежезамороженной плазмы, как правило, недостаточная из-за короткого периода полувыведения ф.VII, который составляет около 4 часов.

Клинический случай 6.7

Пациент П., 3 года. С возраста 1 год страдает рецидивирующими носовыми кровотечениями: длительность эпизодов – до 30–40 минут; частота – до 5 раз в месяц. Дважды госпитализировался в ЛОР-отделение. Кровотечение останавливалось после тампонады и терапии дициноном. С трех лет присоединился умеренный кожный геморрагический синдром в виде легко возникающих экхимозов после травм. Других геморрагических проявлений, в том числе после инъекций, не было. Хирургического лечения не получал. Семейный анамнез по геморрагическим проявлениям не уточнен. Выполнен гемостазиологический скрининг: АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, количество тромбоцитов, время кровотечения. Выявлены: значительное удлинение ПВ, умеренное удлинение времени кровотечения. Установлен предположительный диагноз: «наследственный дефицит ф. VII». Диагноз подтвержден после анализа активности факторов свертывания крови. Выявлено изолированное снижение активности ф. VII = 1%. Активность ф. II, ф. V, ф. X – в пределах нормы.

Дефицит протромбина (фактора II)

Дефицит протромбина – одна из наиболее редких геморрагических коагулопатий. Ген ф. II расположен на 11-й хромосоме. Наследование дефицита – аутосомно-рецессивное. Ожидаемая распространенность в общей популяции примерно 1 : 2 000 000 человек. Основываясь на измерении активности и антигена ф. II, выделяют гипопротромбинемию и диспротромбинемию.

Гетерозиготные варианты дефицита ф. II, как правило, протекают бессимптомно. При гомозиготной форме дефицита и активности ф. II менее 10% у пациента развиваются тяжелые геморрагические проявления. Характерны: выраженный кожный геморрагический синдром в виде гематом и экхимозов, длительные кровотечения из ран кожи и слизистых, гемартрозы, гематомы мягких тканей, внутричерепные кровоизлияния, кровотечения из желудочно-кишечного тракта, маточные кровотечения.

Пациенты с активностью ф. II менее 4% не описаны. Вероятно, такая активность не совместима с жизнью, плоды гибнут внутриутробно.

Изменения скрининговых тестов при дефиците ф. II представлены в табл. 6.13.

Таблица 6.13. Изменения лабораторных тестов при дефиците ф. II

Время кровотечения	Норма или удлинено
ПВ	Удлинено
АЧТВ	Удлинено
Кол-во тромбоцитов	Норма
Тромбиновое время	Норма
Фибриноген	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф. II	Снижена

Лечение: заместительная терапия препаратами, содержащими ф. II: концентраты факторов протромбинового комплекса. Эффективна профилактическая заместительная терапия: 25–40 МЕ/кг $\times$ 1 раз в неделю.

Дефицит ф. V

Редкая геморрагическая коагулопатия. Ожидаемая распространенность в общей популяции составляет 1 : 1–2 000 000. Ген ф. V расположен на 1-й хромосоме. Наследование аутосомно-рецессивное. Основываясь на измерении активности и антигена ф. V, выделяют тип 1, при котором снижены и активность, и антиген (примерно 75%), и тип 2, при котором антиген остается нормальным (25%).

Наиболее частые проявления дефицита ф. V – рецидивирующие носовые кровотечения и маточные кровотечения, характерные для 50% пациентов. Остальные проявления встречаются реже: гемартрозы, гематомы мягких тканей, кровотечения из желудочно-кишечного тракта, кожный геморрагический синдром, интратерепные кровоизлияния.

Изменения скрининговых тестов при дефиците ф. V представлены в табл. 14.

Таблица 6.14. Изменения скрининговых тестов при дефиците ф. V

Время кровотечения	Норма
ПВ	Удлинено
АЧТВ	Удлинено
Кол-во тромбоцитов	Норма
Тромбиновое время	Норма
Фибриноген	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф. V	Снижена

Лечение: заместительная терапия свежезамороженной плазмой. Концентратов ф. V не создано. Показана эффективность препаратов шунтирующего действия. Данных об эффективности постоянного профилактического лечения нет.

Дефицит ф. XIII

Редкое заболевание. Ожидаемая распространенность составляет примерно 1 : 2 000 000.

Молекула ф. XIII состоит из субъединицы A и двух субъединиц B. Гены расположены соответственно на 6-й и 1-й хромосомах. Наследование аутосомно-рецессивное. Иммунологическое исследование позволяет выделить тип 1 дефицита, при котором снижается концентрация субъединиц B, и тип 2 со снижением субъединицы A. По-видимому, есть сочетанный дефицит субъединиц A и B.

Клинические проявления дефицита ф. XIII: длительные кровотечения из пуповинного остатка, кровотечения из ран кожи и слизистых, маточные кровотечения, внутрибрюшинные кровотечения при овуляции, внутричерепные кровоизлияния. Помимо геморрагического синдрома для пациентов характерно плохое заживление ран и нарушение вынашивания у беременных (потеря плода). В ряде случаев это может быть единственным симптомом дефицита ф. XIII.

Лабораторные скрининговые тесты при дефиците ф. XIII представлены в табл. 6.15.

Таблица 6.15. Изменения скрининговых тестов при дефиците ф. XIII

Время кровотечения	Норма
ПВ	Норма
АЧТВ	Норма
Кол-во тромбоцитов	Норма
Тромбиновое время	Норма
Фибриноген	Норма
Специфический скрининг	
Расширимость сгустка крови в 5М растворе мочевины или монохлоридной кислоты	Повышена
Уточняющие тесты	
Активность ф. XIII	Снижена

Лечение: заместительная терапия препаратами, содержащими ф. XIII: свежемороженая плазма, криопреципитат. Поскольку период полувыведения ф. XIII очень длительный (11–14 дней), профилактическая терапия эффективна и требует введения препарата 1 раз в 20–30 дней.

Наследственный дефицит витамин-К-зависимых факторов

Сочетанный дефицит факторов II, VII, IX, X (протеинов C и S) встречается чрезвычайно редко. Связан с мутациями генов ферментов цикла гамма карбоксилирования (GGCX или VKOR). Гены расположены на 2-й и 16-й хромосомах соответственно. При данной патологии в разной степени снижается активность всех перечисленных белков.

Клинические проявления: кровотечения из ран кожи и слизистых, из пуповинного остатка, послеоперационные кровотечения, внутричерепные кровоизлияния. Пациенты с тяжелой формой недостаточности могут иметь нарушения развития скелета: гипоплазия костей носа, дистальных отделов конечностей, эпифизарный стипплинг, умеренная кондуктивная тугоухость.

Лабораторные скрининговые тесты при дефиците витамин-К-зависимых факторов представлены в табл. 6.16.

Лечение: некоторые пациенты чувствительны к высоким дозам витамина К. В большинстве случаев проводится заместительная терапия концентратами фак-

Таблица 6.16. Изменения скрининговых тестов при сочетанном дефиците факторов протромбинового комплекса

Время кровотечения	Норма или удлинено
ПВ	Удлинено
АЧТВ	Удлинено
Кол-во тромбоцитов	Норма
Тромбиновое время	Норма
Фибриноген	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф. II	Снижена
Активность ф. VII	Снижена
Активность ф. IX	Снижена
Активность ф. X	Снижена
Активность ф. V	Норма
Активность ф. VIII	Норма
Активность ф. XI	Норма
Активность ф. XII	Норма
Активность протеина С	Снижена
Активность протеина S	Снижена
Активность антитромбина	Норма

торов протромбинового комплекса. Свежесамороженная плазма часто недостаточно эффективна. Частота и дозы введения зависят от тяжести течения заболевания. Профилактическая терапия возможна.

Следует обратить внимание на тот факт, что применение активированных препаратов («Эптаког альфа» или «Фейба») может привести к тяжелым тромбозам и потребует проведения дополнительной антикоагулянтной терапии.

Сочетанный дефицит ф. V и ф. VIII

Геморрагическая коагулопатия, которая встречается с частотой примерно 1 : 1 000 000.

Данная патология обусловлена мутацией гена трансмембранных белков-шаперонов, обеспечивающих внутриклеточный транспорт ф. V и ф. VIII. Мутация приводит к задержке и накоплению ф. V и ф. VIII в эндоплазматическом ретикулуме клеток и снижению их активности в плазме. При этом их активность сохраняется на относительно высоком уровне – от 5 до 20%.

Клинически проявляется умеренными или легкими геморрагическими симптомами: экхимозы, носовые кровотечения, кровотечения после экстракции зубов

или хирургических вмешательств. Реже описывают маточные кровотечения и невынашивание беременности. Крайне редко могут быть более тяжелые проявления: массивные гематомы мягких тканей, гемартрозы, внутричерепные кровоизлияния, кровотечения из пуповинного остатка, желудочно-кишечные кровотечения.

Лабораторные скрининговые тесты при сочетанном дефиците ф.V и ф.VIII представлены в табл. 6.17.

Таблица 6.17. Изменения скрининговых тестов при сочетанном дефиците факторов V и VIII

Время кровотечения	Норма
ПВ	Удлинено
АЧТВ	Удлинено
Кол-во тромбоцитов	Норма
Тромбиновое время	Норма
Фибриноген	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф.V	Норма
Активность ф.VIII	Норма
Активность ф.IX	Норма
Активность ф.X	Норма
Активность ф.V	Снижена
Активность ф.VIII	Снижена
Активность ф.XI	Норма
Активность ф.XII	Норма

Лечение: для заместительной терапии используют концентраты ф.VIII, при необходимости – в сочетании со свежемороженой плазмой. Во многих случаях могут быть эффективны ингибиторы фибринолиза и десмопрессин.

Афибриногенемия, гипофибриногенемия и дисфибриногенемии

Наследственные количественные и качественные нарушения фибриногена, приводящие к развитию геморрагических или протромботических состояний, встречаются достаточно часто. *Афибриногенемия* – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, которое проявляется частыми клинически значимыми кровотечениями, в том числе кровотечениями из пуповинного остатка, гемартрозами, кровоизлияниями в мозг, формированием гематом мягких тканей, выраженным кожным гемосиндромом, кровотечениями из слизистых. Несмотря на то что фибриноген плазмы может отсутствовать, тем не менее сохранен фибриноген α -гранул тромбоцитов, поэтому тромбоцитарный тромб формируется.

О состоянии *гипофибриногенемии* говорят в том случае, если содержание фибриногена в плазме менее 1 г/л. Клинические проявления аналогичны проявлениям при афибриногенемии, однако менее выражены.

Диагноз *дисфибриногенемия* соответствует состоянию, при котором изменена нормальная структура фибриногена, однако содержание самого белка в крови (антигена) нормальное или снижено непропорционально функции. Дисфибриногенемии могут проявляться кровотечениями, тромбозами или не иметь никаких проявлений. Клинические проявления геморрагических дисфибриногенемий сходны с проявлениями гипофибриногенемий.

Лабораторная диагностика количественных и качественных нарушений фибриногена основана на изменении стандартных тестов коагулограммы (табл. 6.18).

Таблица 6.18. Изменения скрининговых тестов при количественных и качественных нарушениях фибриногена

Афибриногенемия	
Время кровотечения	Чаще удлинено
ПВ	Значительно удлинено (не определяется)
АЧТВ	Значительно удлинено (не определяется)
Тромбиновое время	Значительно удлинено (не определяется)
Кол-во тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Количество фибриногена	Не определяется
Гипофибриногенемия	
Время кровотечения	Как правило, нормальное
ПВ	Нормальное или удлинено
АЧТВ	Нормальное или удлинено
Тромбиновое время	Удлинено
Кол-во тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Количество фибриногена	Определяется, но <1,5 г/л
Дисфибриногенемия	
Время кровотечения	Как правило, нормальное
ПВ	Нормальное или удлинено
АЧТВ	Нормальное или удлинено
Тромбиновое время	Удлинено
Кол-во тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Соотношение антиген фибриногена / количество фибриногена, определенное коагулологическим методом, значительно больше единицы	

Дефицит факторов контактной активации

Дефицит ф.ХІІ, прекалликреина (ПК) и высокомолекулярного кининогена (ВМК) нельзя в полной мере отнести к геморрагическим заболеваниям. Дефицит активности ВМК или ПК клинически никак не проявляется.

У пациентов с дефицитом ф.ХІІ (болезнь Хагемана) имеются разнонаправленные тенденции. У большинства пациентов даже при глубоком дефиците нет геморрагических проявлений, однако у некоторых пациентов этой группы имеет место повышенная кровоточивость. Некоторые пациенты с дефицитом ф.ХІІ имеют тенденцию к тромботическим проявлениям.

Распространенность дефицита ф.ХІІ в популяции довольно высока. Большинство случаев удлинения АЧТВ у пациентов без клинических проявлений связано с этой патологией (клинический случай 6.8). По некоторым данным, частота гетеро- и гомозиготных форм дефицита ф.ХІІ в популяции достигает 1,5–3%.

Лабораторные данные при дефиците ф.ХІІ, ПК, ВМК представлены в табл. 6.19.

Таблица 6.19. Изменения скрининговых тестов при дефиците факторов контактной активации

Тест	ф.ХІІ	ПК	ВМК
Время кровотечения	Нормальное	Нормальное	Нормальное
ПВ	Нормальное	Нормальное	Нормальное
АЧТВ	Удлинено	Удлинено	Удлинено
Тромбиновое время	Нормальное	Нормальное	Нормальное
Кол-во тромбоцитов	Нормальное	Нормальное	Нормальное
Уточняющие тесты			
Активность ф.ХІІ	Снижена	Нормальная	Нормальная
Активность ПК	Нормальная	Снижена	Нормальная
Активность ВМК	Нормальная	Нормальная	Снижена

Клинический случай 6.8

Пациент М., 14 лет, поступил в травматологическое отделение с переломом таранной кости. Готовится к операции. Сведений о наличии геморрагического синдрома в его и семейном анамнезе нет.

Проведен коагулологический скрининг (см. коагулограмму).

Заключение. Лабораторные признаки истинного дефицита фактора ХІІ (болезнь Хагемана). Отсутствие геморрагического синдрома закономерно, так как *in vivo* запуск гемостатического каскада происходит за счет связи тканевого фактора с фактором VIIa без участия фактора ХІІ. Факторы контактной активации (ф.ХІІ, прекалликреин, высокомолекулярный кининоген) рассматриваются в большей степени как факторы активации фибринолиза, нежели каскада свертывания. Поэтому в данном случае нужно опасаться скорее тромбоза, чем кровотечения.

Коагулограмма пациента М.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	300	25–40 с
Протромбиновая активность по Квику	90	>70%
Тромбиновое время	22	16–25 с
Концентрация фибриногена	4,2	2,8–4,7 г/л
Фактор VIII, активность	159	50–160%
Фактор XI, активность	92	65–150%
Фактор IX, активность	90	65–150%
Фактор XII, активность	0,1	50–150%

Врожденные нарушения тромбоцитов

Врожденные нарушения тромбоцитов – достаточно гетерогенная группа состояний, при которых происходит снижение количества и/или нарушение функции тромбоцитов. Часто тромбоцитопатии сопровождаются снижением количества тромбоцитов (тромбоцитопатии с тромбоцитопениями). Врожденные нарушения тромбоцитов описаны давно, но в последние 15–20 лет появилась возможность расшифровывать молекулярные механизмы патогенеза и генетические дефекты, приводящие к их развитию. Описываются новые формы, уточняются особенности известных. Многие нарушения диагностированы у единичных пациентов. Все это приводит к тому, что классификация и список нарушений постоянно пересматриваются. Существует несколько классификаций наследственных тромбоцитопатий, одна из которых, учитывающая наиболее разработанные представления о метаболизме и регуляции тромбоцитарных функций, представлена в табл. 6.20.

Клинические проявления врожденных нарушений функции тромбоцитов для большинства заболеваний сходны. Отмечается разной степени выраженности геморрагический синдром, который может варьировать от минимального до тяжелого при таких заболеваниях, как тромбастения Гланцманна, синдром Бернара–Сулье, амегакариоцитарная тромбоцитопения, синдром Вискотта–Олдрича и др. Наиболее характерны петехии, экхимозы, длительные первичные кровотечения после травм слизистых, первичные послеоперационные кровотечения, носовые кровотечения, маточные кровотечения. При тромбастении Гланцманна описаны гемартрозы с развитием артропатии, сходной с гемофилической.

Изменения лабораторных тестов при врожденных нарушениях функции тромбоцитов представлены в табл. 6.21.

Индукцированная агрегация на разные активаторы является одним из наиболее показательных лабораторных тестов для выявления наследственных нарушений функции тромбоцитов (рис. 6.3).

Таблица 6.20. Классификация врожденных нарушений функции тромбоцитов

Дефекты взаимодействия тромбоцит – сосудистая стенка (дефекты адгезии): – болезнь Виллебранда (нарушение фактора Виллебранда); – псевдобольная Виллебранда; – синдром Бернара–Сулье (дефект GPIb). Дефекты межтромбоцитарного взаимодействия (дефекты агрегации): – врожденная афибриногенемия (отсутствие плазменного фибриногена); – тромбастения Гланцманна (дефект GPIIb-IIIa). Нарушения функции секреции и передачи сигнала: – аномалии гранул; – дефицит пула хранения; – Квебекская аномалия тромбоцитов; – дефекты передачи сигнала (первичные дефекты секреции). Дефекты тромбоцитарных рецепторов: рецептора тромбоксана A₂, коллагена, АДФ, эпинефрина (адреналина): – дефекты активации протеина C, дефицит Gα_q; – дефекты метаболизма фосфатидилинозитола, дефицит фосфолипазы C; – дефекты мобилизации кальция. Аномалии обмена арахидоновой кислоты и синтеза тромбоксана A₂: – снижение высвобождения арахидоновой кислоты; – дефицит циклооксигеназы; – дефицит тромбоксансинтазы. Дефекты регуляции цитоскелета: – синдром Вискотта–Олдрича. Нарушения взаимодействия тромбоцитов с белками гемостаза: – дефект фиксации факторов Va–Ха на поверхности тромбоцитов (Синдром Скотта).

Диагностически значимые лабораторные тесты, используемые для диагностики врожденных нарушений функций тромбоцитов, суммированы в табл. 6.22.

Клинический случай 6.9

Пациент А., 11 лет. Поступил в больницу в связи с длительным носовым кровотечением (более 1 часа). Пациент приехал из-за рубежа. Из анамнеза, со слов родителей, ребенок наблюдается по месту жительства с диагнозом «гемофилия». Форма не известна. Геморрагические проявления отмечаются с раннего возраста. Страдает носовыми кровотечениями и кровотечениями из ран кожи. Несколько раз болели суставы. Для остановки кровотечений применяется цельная кровь.

При осмотре: у пациента выражен кожный геморрагический синдром: петехии, экхимозы, гематомы. Из полости носа отмечается геморрагическое отделяемое.

Поскольку диагноз «гемофилия», по клиническим данным, вызвал сомнения, выполнен гемостазиологический скрининг: АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, количество тромбоцитов, время кровотечения по Айви.

Результаты: АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, количество тромбоцитов – в пределах нормальных значений. ВК удлинено (в пределах времени наблюдения кровотечения не остановилось).

Заподозрена тяжелая тромбоцитопатия. Выполнено исследование функции тромбоцитов: агрегатограмма с индукторами АДФ, коллаген, адреналин, ристоцетин. Выявлено отсутствие агрегации тромбоцитов с АДФ, коллагеном, адреналином и нормальная агрегация с ристоцетином. Данная находка позволила установить диагноз: «тромбастения Гланцманна». Назначенная с учетом диагноза гемостатическая терапия позволила остановить кровотечение. В дальнейшем диагноз подтвердился после выполнения исследования концентрации мембранных рецепторов тромбоцитов GPIIb-IIIa: их концентрация составила 1% от нормы (тип 1 тромбастении Гланцманна).

Таблица 6.21. Врожденные нарушения функции тромбоцитов

	Тип на-следо-вания	Коли-чество тром-боци-тов	Размер тром-боци-тов	Агрегация тромбоцитов				
				Адре-налин	АДФ	Кол-ла-ген	Уксусная кислота	Агглю-тинация
Нарушения адгезии								
Псевдобольная Виллебранда	А-Д	Низкое	Норма	+	+	+	Условно	+
Синдром Бернара-Сулье	А-Р	Низкое	Круп-ные	+	+	+	-	+
Первичные нарушения агрегации								
Тромбастения Глацманна	А-Р	Норма	Норма	-	-	-	+	-
Вторичные нарушения адгезии								
Дефекты пулов хранения								
Дефицит плотных гранул	А-Р	Норма	Норма	-	±	-	±	±
Дефицит α-гранул (синдром серых тромбоцитов)	А-Р	Низкое	Круп-ные	+	±	±	+	+
Смешанный дефицит α- и плотных гранул	А-Д			±	±	-	±	±
Квебекская анома-лия тромбоцитов	А-Д	Низкое	Норма	-	+	+	+	+
Нарушения секреции	Различ-ный	Норма	Норма	-	±	-	±	-
Нарушения проко-агулянтной актив-ности тромбоцитов. Синдром Скотта	А-Р	Норма	Норма	+	+	+	+	+

Примечание. А-Р – аутосомно-рецессивный; А-Д – аутосомно-доминантный; «+» – присутствует, нормальный; «-» – отсутствует или снижен; «±» – переменный либо слегка снижен.

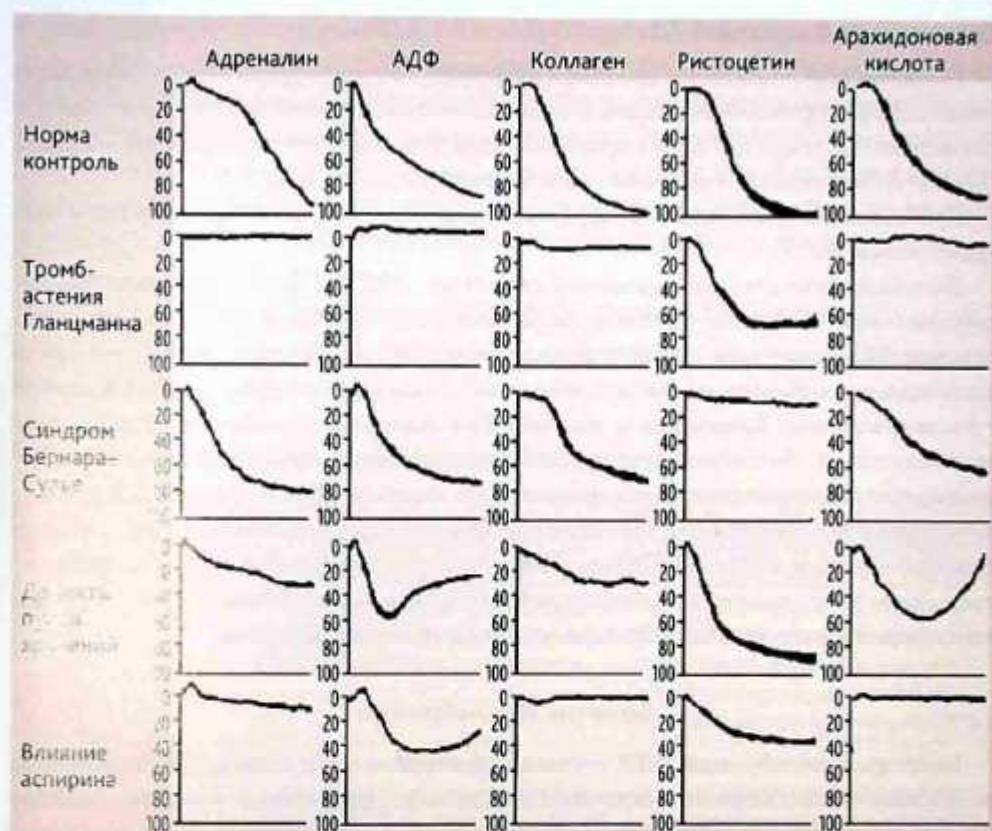


Рис. 6.3. Агрегация тромбоцитов с разными индукторами у здоровых людей и при врожденных нарушениях функции тромбоцитов

Таблица 6.22. Диагностически значимые лабораторные тесты, используемые для диагностики врожденных нарушений функций тромбоцитов

Скрининг АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, время кровотечения (анализ на PFA 200), количество тромбоцитов и их характеристики на гематологическом анализаторе, оценка тромбоцитов в световом микроскопе
Уточняющие тесты Анализ функции тромбоцитов: агрегация тромбоцитов с разными индукторами, анализ мембранных рецепторов, анализ гранул тромбоцитов и реакции высвобождения (проточная цитофлуометрия), анализ ферментов тромбоцитов, анализ прокоагулянтной активности тромбоцитов (определение формирования протромбиназного комплекса) Миелограмма
Дополнительные тесты Генетическое исследование

Клинический случай 6.10

Пациентка В., 3 года. Из анамнеза известно, что геморрагические проявления отмечались с первых дней жизни в виде длительных кровотечений из ран кожи и слизистых оболочек. С 1 года страдает длительными носовыми кровотечениями. Однако до настоящего времени обследования не проходила.

При осмотре: у пациентки умеренно выражен кожный геморрагический синдром: экхимозы.

Выполнен гемостазиологический скрининг: АЧТВ, ПВ, ТВ, фибриноген, количество тромбоцитов, время кровотечения по Айви. Выявлено умеренное удлинение ВК, умеренное снижение количества тромбоцитов. Выполнен тест агрегации тромбоцитов: диагностировано снижение агрегации тромбоцитов с ристомисином. Заподозрили болезнь Виллебранда. Выполнено определение активности ф. Виллебранда и определение агрегации тромбоцитов с низкими концентрациями ристомисина. Активность фактора Виллебранда нормальная. Агрегация тромбоцитов – в пределах ожидаемых значений (низкая). Установлен диагноз: «болезнь Бернара–Сулье». Диагноз был подтвержден тромбоцитометрией (выявлены гигантские формы тромбоцитов) и снижением концентрации рецепторов фактора Виллебранда на мембране тромбоцитов.

Болезнь Виллебранда

Болезнь Виллебранда (БВ) – геморрагическое заболевание, возникающее вследствие качественного и/или количественного нарушения функции фактора Виллебранда; наследуется аутосомно-доминантно с неполной пенетрантностью или аутосомно-рецессивно. Ген фактора Виллебранда расположен на 12-й хромосоме.

Фактор Виллебранда выполняет несколько функций в гемостазе. Лучшее всего изучены две: фактор Виллебранда обуславливает адгезию и агрегацию тромбоцитов и защищает ф. VIII от преждевременного выведения из крови. Недавно описана роль фактора Виллебранда в ангиогенезе и формировании соединительной ткани.

Основные клинические проявления болезни – кровотечения из слизистых оболочек, посттравматические кровотечения, кожный геморрагический синдром в виде экхимозов, послеоперационные и послеродовые кровотечения. В наиболее тяжелых случаях могут быть рецидивирующие гемартрозы, гематомы мягких тканей, внутричерепные кровоизлияния. Описаны пациенты с проявлениями в виде образования рубцов после разных, даже минимальных травм кожи. Нарушение ангиогенеза может проявляться в виде упорных, анемизирующих, рецидивирующих кровотечений из желудочно-кишечного тракта, трудно поддающихся терапии. Возможно, рецидивирующие носовые кровотечения также являются следствием этого процесса.

Описано значительное количество мутаций в разных сайтах молекулы, приводящих к развитию клинической картины. Это обуславливает разнообразие не

только клинических проявлений, но и лабораторных показателей. Большинство пациентов с болезнью Виллебранда имеют легкое течение заболевания. Компенсаторные возможности системы гемостаза могут нивелировать изменения активности фактора Виллебранда в широких пределах. Это приводит к тому, что даже члены одной семьи с одной и той же мутацией гена фактора Виллебранда могут иметь разную выраженность геморрагических проявлений, вплоть до полного отсутствия у одних и достаточно выраженных проявлений у других.

Классификация и патогенез болезни Виллебранда

Болезнь Виллебранда подразделяется на 3 типа, а тип 2 подразделяется на 4 подтипа (табл. 6.23).

Таблица 6.23. Классификация болезни Виллебранда

Тип	Относительная частота (общих форм)	Характеристика	Клинические особенности
1	40–75%	Частичный количественный дефицит vWF; пропорционально снижены все мультимеры	Геморрагические проявления разной степени выраженности; аутосомно-доминантный тип наследования с неполной пенетрантностью (примерно 60%)
2A	6–10%	Снижение тяжелых или тяжелых и среднетяжелых мультимеров vWF за счет нарушения сборки или ускоренного расщепления	Легкие и умеренные признаки кровоточивости; чаще аутосомно-доминантное, но возможно и аутосомно-рецессивное наследование с большей пенетрантностью, чем при 1-м типе
2B	2–5%	Повышение аффинности vWF к рецепторам GPIIb тромбоцитов за счет мутации молекулы vWF; избыточное связывание vWF с неактивированными тромбоцитами; ускоренная элиминация тяжелых мультимеров и тромбоцитов	Легкие и умеренные признаки кровоточивости; чаще аутосомно-доминантное наследование с большей пенетрантностью, чем при 1-м типе
2M	2–9%	Изолированная мутация сайта связывания с рецептором GPIIb; снижение vWF:RCo при нормальном содержании антигена vWF; нормальная мультимерная структура vWF	Тяжесть геморрагических расстройств различна; аутосомно-доминантный тип наследования
2N	1–2%	Снижение аффинности к ф. VIII; нарушение связывания и снижение протективной функции vWF по отношению к ф. VIII; ускоренная элиминация ф. VIII	Клинические проявления сходны с нетяжелой формой гемофилии А; наследование аутосомное

Тип	Относительная частота (от всех форм)	Характеристика	Клинические особенности
3	1,5–3,5%	Отсутствие в крови белка, идентифицируемого как vWF; резкое снижение активности ф. VIII	Наиболее тяжелая форма болезни, выраженные геморрагические нарушения по смешанному типу (микроциркуляторный + гематомный); аутосомно-рецессивное наследование
Особые формы			
Форма Виченца		Снижение всех мультимеров и присутствие в крови сверхтяжелых мультимеров vWF	
Форма с изолированным нарушением vWF:CB		Снижена коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда	
Псевдобольная Виллебранда (тромбоцитарный тип)		Возникает вследствие повышенного связывания vWF с GPIb-IX-V за счет мутации последнего. Это приводит к ускоренной элиминации из плазмы, в первую очередь, наиболее высокомолекулярных комплексов vWF и диспропорциональному снижению его активности по сравнению с антигеном. Клинически и лабораторно напоминает тип 2B	

Примечание. vWF:RCo – ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда; vWF:CB – коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда.

Клиническая характеристика болезни Виллебранда

Основное проявление болезни Виллебранда – геморрагический синдром микроциркуляторного/смешанного типов спонтанного или посттравматического характера. При первом и втором типах преобладает микроциркуляторный тип кровоточивости: экхимозы, кровотечения из слизистых (десневые, носовые, луночковые), меноррагии, кровотечения при проведении хирургических вмешательств и инвазивных диагностических процедур (клинический случай 6.11). При типах болезни Виллебранда, характеризующихся выраженным снижением уровня ф. VIII (2A, 2N, 3), часто наблюдается смешанный (микроциркуляторно-гематомный) тип геморрагического синдрома. Болезнь Виллебранда 3-го типа по проявлениям схожа с тяжелой формой гемофилии А из-за практически полного отсутствия vWF, и как следствие, ф. VIII. При данном типе заболевания в клинической картине преобладают нарушения опорно-двигательного аппарата в результате рецидивирующих кровоизлияний в суставы (гемартрозов), гематомы мягких тканей различной локализации спонтанного характера, забрюшинные гематомы. Несмотря на идентичность клинических проявлений, у пациентов с болезнью Виллебранда симптоматика менее выражена, чем у больных гемофилией, и всегда сочетается с кровотечениями по микроциркуляторному типу.

Клинический случай 6.11

Пациентка С., 30 лет, готовится к операции. Пришла на прием к гематологу для обследования. В анамнезе длительные тепл кровотечения. В семейном анамнезе по линии отца «какая-то болезнь крови с частыми носовыми кровотечениями и у мужчин, и у женщин».

Коагулограмма пациентки С.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	42	25–40 с
Протромбиновая активность по Квику	91	<70%
Тромбиновое время	20	16–25 с
Концентрация фибриногена	2,9	2–4 г/л
Фактор VII активность	37	50–160%
Антиген фактора Виллебранда	22	Группа крови I – 42–141% Группа крови II, III, IV – 66–176%
Ристомин-кофакторная активность фактора Виллебранда	9,4	Группа крови I – 48–202% Группа крови II, III, IV – 61–240%
Агрегация тромбоцитов: – АДФ-индуцированная (5,0 мкМ) – ристомин-индуцированная	53 3,8	25–68% 56–80%

Заключение. Лабораторные признаки болезни Виллебранда, предположительно тип 2. Снижение активности фактора VIII ассоциировано со снижением количества vWF (утрачивается протекторная способность vWF по отношению к фактору VIII). Это сказывается и на результатах АЧТВ.

Лабораторная диагностика болезни Виллебранда

Диагностика болезни Виллебранда основана на анализе анамнестических, клинических и лабораторных данных.

Критериями установления диагноза «болезнь Виллебранда» являются следующие показатели:

- анамнез заболевания, который должен включать 2 геморрагических эпизода, требующих терапии, или 3 геморрагических эпизода одной и той же локализации;
- отягощенная наследственность – повышенная кровоточивость у родственников 1-й степени родства;
- лабораторные данные (табл. 6.24).

Таблица 6.24. Лабораторные критерии дифференциальной диагностики типов болезни Виллебранда

Исследование	Тип болезни Виллебранда					
	1	2A	2B	2M	2N	3
Количество тромбоцитов	Н	Н	↓/Н	Н	Н	Н
Время кровотечения	↑/Н	↑	↑	↑	Н	↑
АЧТВ	↑/Н	↑/Н	↑/Н	Н	↑	↑
ф. VIII:C	↓/Н	↓/Н	↓/Н	↓/Н	↓	<10%
vWF:RCo	↓	<20%	↓	↓	↓/Н	<5%
vWF:Ag	↓	↓/Н	↓/Н	↓/Н	↓/Н	<5%
vWF:CB	↓/Н	↓↓	↓	↓/Н	↓/Н	<5%
Отношение vWF:RCo / vWF:Ag	>0,7	<0,7	<0,7	↑/Н	~0,7	Вариативно
RIPA – стандартная концентрация	↓/Н	↓/Н	Н	↓/Н	Н	Отсутствует
RIPA – низкая концентрация	↓	↓	↑	↓	↓	Отсутствует
Мультимеры vWF	Пропорционально снижены все	Снижены тяжелые или тяжелые и среднетяжелые	Снижены тяжелые или тяжелые и среднетяжелые	Н	Н	Отсутствуют

Примечание. vWF:Ag – антиген фактора Виллебранда; ф. VIII:C – прокоагулянтная активность фактора VIII; vWF:CB – коллаген-связывающая активность vWF; vWF:RCo – ристоцетин-кофакторная активность vWF; ф. VIII:св – активности фактора Виллебранда по связыванию фактора VIII; RIPA – ристоцетин-индуцированная агрегация; Н – норма; ↑ – удлинено; Н/↑ – норма или удлинено; ↓ – снижено; ↓/Н – снижено или норма.

Основные диагностические критерии болезни Виллебранда:

- типичный геморрагический синдром;
- снижение активности vWF (vWF:RCo, vWF:CB, vWF:FVIIIb).

Остальные тесты необходимы для уточнения формы заболевания.

Для уточнения диагноза у пациентов с клинической картиной, возможной при болезни Виллебранда, рекомендуется проведение поэтапного лабораторного коагулологического исследования.

Первым этапом лабораторной диагностики рекомендуется проведение коагулологического скрининга, включающего следующие показатели:

- общий анализ крови с подсчетом количества тромбоцитов;
- время кровотечения;
- определение АЧТВ, ПВ, ТВ и фибриногена.

Получив результаты, характерные для болезни Виллебранда (время кровотечения удлинено или норма, АЧТВ удлинено или норма, количество тромбоцитов умеренно снижено или норма), выполняется второй этап:

- соотношение $vWF:RCo/vWF:Ag$ (обязательно);
- FVIII:C (обязательно);
- агрегация тромбоцитов, индуцированная ристоцетином (RIPA), в двух концентрациях (для уточнения типа БВ).

Полученные результаты позволяют установить или исключить диагноз «болезнь Виллебранда» и часто установить тип болезни.

В случае если полученных данных недостаточно, выполняют дополнительные тесты:

- $vWF:CB$;
- $vWF:FVIIIb$;
- анализ мультимеров vWF (в неясных случаях).

Специфические тесты могут быть выполнены в специализированных центрах по лечению коагулопатий.

Сложность диагностики болезни Виллебранда заключается в том, что vWF может выбрасываться из депо вследствие целого ряда воздействий (стресс, травма, воспаление); кроме того, уровень может изменяться в зависимости от стадии менструального цикла, беременности, уровня физической активности, наличия инфекции, заместительной гормональной терапии. Поэтому при подозрении на болезнь Виллебранда необходимо строгое соблюдение правил преаналитического этапа; обследуемые пациенты должны быть здоровыми, нельзя обследовать пациентов после активных физических нагрузок, стрессов. При обследовании женщин и девушек необходимо учитывать стадию менструального цикла, оптимально обследовать на 2-й день цикла. При наличии клинических оснований, даже если при первом исследовании результаты нормальные, обследование должно проводиться неоднократно, на протяжении жизни. Динамическое наблюдение особенно актуально для детей младшего возраста. Для дифференциальной диагностики в некоторых случаях требуется исследование функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии. Для исключения приобретенного дефицита vWF и с целью пренатальной диагностики и уточнения типа рекомендуется исследование мутаций vWF . Дифференциальный диагноз болезни Виллебранда проводят у взрослых со следующими заболеваниями (табл. 6.25): наследственные тромбоцитопатии; гемофилия; болезнь Рандю–Ослера; геморрагические мезенхимальные дисплазии; тромбоцитопении; дефицит других факторов свертывания крови (VII, X, XI, XII, XIII). Если нет возможности провести полноценное двухэтапное коагулологическое исследование, а также в некоторых случаях для контроля проводимой терапии целесообразно выполнение интегральных тестов гемостаза: исследование свойств сгустка крови (тромбодинамика), тромбозластография, тест генерации тромбина.

Таблица 6.25. Дифференциальный диагноз болезни Виллебранда с другими заболеваниями

Тесты, клинические проявления, анамнестические данные	БВ, типы 1, 3, 2A, 2M	БВ, тип 2B	БВ, тип 2N	Тромбоцитопатия Бернарди-Сулье	Тромбастения Гланцманна	Гемофилия А	Волчаночный антикоагулянт	Приобретенный синдром Виллебранда
Время свертывания	H/↑	H/↑	Чаще H	Чаще ↑	↑	H	H	H/↑
AЧТВ	H/↑	H/↑	↑/H	H	H	↑	H/↑	H/↑
ПВ	H	H	H	H	H	H	H/↑	H
Количество тромбоцитов	H	↓, может повышаться до нормы	H	↓	H	H	↓/H	H/↓
vWF:RCO	↓	↓, реже H	H/↓	H	H	H	Как правило H	↓
vWF:Ag	↓ кроме типа 2M	H/↓	H/↓	H	H	H	Как правило H	↓
Ф. VIII	H/↓ (кроме типа 2M)	H/↓ (кроме типа 2M)	↓	H	H	↓	Часто ↓	H/↓
Агрегация с АДФ, коллагеном, адреналином	H	H	H	H	↓/H	H	Может быть ↓	H
Агрегация с ристоцетином	↓/H	↓/H	Как правило H	↓/H	H	H	Как правило, H	↓/H
Кровоточивость	По микроциркуляторному или смешанному типу	По микроциркуляторному типу	По гематомному типу	По микроциркуляторному типу	По микроциркуляторному типу	По гематомному типу	Нет признаков кровоточивости	По микроциркуляторному типу
Наследование	A-D с неполной пенетрантностью, (для 3-го типа A-P)	A-D с неполной пенетрантностью	A-D с неполной пенетрантностью	A-P	A-P	Сцепленное с полом	Нет	Нет

Клинический случай 6.12

Пациент Р., возраст 1 год. Родители обратились по поводу геморрагических проявлений. В анамнезе: с рождения кровотечения из мест инъекции в течение многих часов, останавливались самостоятельно; кровотечения при прорезывании зубов продолжались до нескольких дней, также останавливались самостоятельно; кровотечение из травмированной уздечки верхней губы – в течение суток, остановилось после введения свежесзамороженной плазмы. Со слов матери, у ее отца были геморрагические проявления, однако он не обследовался. Анамнез и клиническая картина не позволяли сделать однозначного предположения о диагнозе. Было проведено обследование.

Время кровотечения не определяли. ПТ – 99%, АЧТВ – 83 с (норма до 43), активность ф. VIII – 1,5%, активность ф. IX – 55%, ристоцетин-кофакторная активность <3%, агрегация тромбоцитов с адристином отсутствует; агрегация с АДФ, коллагеном и адреналином – нормальная.

Ребенку был выставлен диагноз «болезнь Виллебранда, тип 3». В дальнейшем гемостатическая терапия препаратами, содержащими фактор Виллебранда, позволяла останавливать кровотечения.

Болезнь Виллебранда часто сопровождается изменениями гемостаза, клинически схожими с проявлениями гемофилии А, это связано с тем, что vWF является в плазме носителем фактора VIII. При БВ часто снижены как vWF, так и ф. VIII. При гемофилии А уровень ф. VIII снижен, а vWF нормальный (рис. 6.4).



Рис. 6.4. Комплекс ф. VIII / vWF определяется синтезом фактора VIIIc на основе информации в X-хромосоме и синтезом vWF, программированным в 12-й хромосоме. Гемофилия А зависит от мутации в X-хромосоме, болезнь Виллебранда – от мутации в 12-й хромосоме

В табл. 6.26 представлены изменения основных коагулологических тестов у больных БВ (тип 1) по сравнению больными гемофилией А с геморрагическими проявлениями и при передозировке непрямыми антикоагулянтами (дефиците витамина К).

Таблица 6.26. Изменения коагулограммы при заболеваниях, сопровождающихся геморрагиями

	Болезнь Виллебранда	Гемофилия А	Дефицит витамина К
Время кровотечения	↑	Норма	Норма / ↑
ПВ	Норма	Норма	↑
АЧТВ	↑±	↑+	↑
ф.VIII	↓	↓↓↓	Норма
vWF	↓	Норма	Норма

Фактор Виллебранда, болезнь Виллебранда и группы крови

Активность фактора Виллебранда связана с АВ0-групповой принадлежностью крови. У лиц с I группой имеет место более низкое содержание фактора Виллебранда. Ниже приведены нормы vWF:Ag в зависимости от группы крови, принятые Всемирной ассоциацией тромбоза и гемостаза.

Группа крови	нормальное содержание vWF:Ag (в %)
I (O)	36–157
II (A)	49–234
III (B)	57–241
IV (AB0)	64–238

У 80% лиц с диагностированной лабораторно болезнью Виллебранда имеется 0-я группа крови. У людей с перервой группой крови риск венозного тромбоза и ИБС примерно в 2 раза выше по сравнению с лицами с I-й группой крови. Среди лиц с постоянно увеличенным содержанием ф.VIII более чем 150% по сравнению со средним показателем по популяции риск этих осложнений в 5 раз выше.

Лечение болезни Виллебранда

Цель лечения – повышение концентрации или замещение функционально не полноценных факторов свертывания крови. Лечение может быть профилактическим или по требованию – при кровотечении. При рецидивирующих кровоизлияниях в суставы, желудочно-кишечных и маточных кровотечениях профилактический режим может стать оптимальным методом лечения. Не все пациенты с болезнью Виллебранда нуждаются в назначении терапии. Критерием начала лечения при наличии верифицированного диагноза «болезнь Виллебранда» являются следующие показатели: возникновение умеренных/тяжелых, спонтанных/посттравматических кровотечений; хирургическое вмешательство; рецидивирующие кровотечения любой степени тяжести, снижающие качество жизни. Поскольку болезнь Виллебранда является комплексным заболеванием, возникающим в результате разных генетических дефектов и различающимся по степени тяжести, в терапии может использоваться широкий спектр лекарственных препаратов. Помимо заместительной терапии концентратами фактора Виллебранда лечение включа-

ет использование гормонов, антифибринолитических средств и десмопрессина (ДДАВП [1-диамино-8-D-аргинин вазопрессин] – синтетический аналог антидиуретического гормона вазопрессина, стимулирует высвобождение vWF из депо).

Лабораторный контроль за лечением болезни Виллебранда очень важен. Необходимо контролировать состояние гемостаза, особенно у больных тяжелыми формами болезни Виллебранда перед операционным лечением, при недостаточном эффекте применения специфических гемостатических препаратов. При использовании ДДАВП необходимо знать, до какого уровня повышается активность vWF. Для этого определяют базальную активность vWF и повторяют исследование через 30–60 мин после введения ДДАВП. Если препарат планируется вводить повторно через день, рекомендуется исследовать ответ на все повторные введения. Это связано с тем, что скорость восстановления vWF в депо у разных людей отличается, поэтому эта информация будет необходима для прогноза эффективности терапии.

Клинический случай 6.13

Пациент 3 12 лет. Обследовался и наблюдался с диагнозом «гемофилия А». В анамнезе – ~~важный~~ гемосиндром в виде гематом и экхимозов, гемартрозы локтевых, коленных и голеностопных суставов. Получал лечение криопреципитатом с удовлетворительным эффектом. В 12 лет проведена экстракция зуба на фоне введения концентрата фактора VIII в дозе 30 МЕ/кг, при этом был использован моноклонально очищенный концентрат фактора VIII, не содержащий других факторов. Через 3 часа после экстракции началось профузное кровотечение из лунки удаленного зуба. Кровотечение остановлено повторным введением того же препарата концентрата фактора VIII в общей дозе 200 МЕ/кг в течение 6 часов и 10 доз криопреципитата. Было заподозрено формирование ингибитора к ф. VIII.

Первичное обследование по месту жительства: время кровотечения незначительно удлинено, ПТ – 90%, АЧТВ не определяется (более 180 с), ф. VIII – 1,5%, фибриноген – 3,5 г/л, агрегация тромбоцитов с АДФ на стекле нормальная, количество тромбоцитов – $180 \times 10^9/\text{л}$.

Повторное обследование в гематологическом центре: время кровотечения значительно удлинено, количество тромбоцитов – $250 \times 10^9/\text{л}$, ПТ – 100%, АЧТВ – 105 с (норма 28–43), тромбиновое время – 17 с (норма 15–20), фибриноген – 2,5 г/л, ф. VIII – 1,8%, ф. IX – 89%, ристоцетин-кофакторная активность <3%, ингибитор к ф. VIII не выявлен. Агрегация тромбоцитов с АДФ, коллагеном, адреналином нормальная, агрегация тромбоцитов с ристоцетином практически отсутствует.

Данные обследования позволили поставить диагноз «болезнь Виллебранда, тип 3».

Недостаточная эффективность остановки кровотечения моноклонально очищенным концентратом фактора VIII объяснялась отсутствием в этом препарате фактора Виллебранда. Применение криопреципитата позволило остановить кровотечение, так как он содержит фактор Виллебранда.

Приобретенные нарушения гемостаза

Наиболее распространенными приобретенными патологическими состояниями тромбоцитарного звена являются тромбоцитопении со снижением числа тромбоцитов ниже $150 \times 10^9/\text{л}$. Тромбоцитопениям, независимо от патогенеза, свойственны паренхиматозные кровотечения из мелких сосудов капиллярного и прекапиллярного типов, которые обусловлены низким числом тромбоцитов, изменением их структуры, и как следствие, проницаемости стенки сосудов. Тромбоцитопения может быть латентной и сопровождаться кровоточивостью только при довольно низких количествах тромбоцитов ($50 \times 10^9/\text{л}$ и ниже). Геморрагический синдром при умеренной тромбоцитопении предполагает наличие сопутствующих наследственных или приобретенных нарушений функциональной активности тромбоцитов. Нередко снижение количества тромбоцитов ниже $150 \times 10^9/\text{л}$, но более $90 \times 10^9/\text{л}$ встречается при соматической патологии и на фоне приема антиагрегантов, например, у больных ИБС, перенесших стентирование коронарных артерий. Такое снижение количества тромбоцитов не сопровождается геморрагическими проявлениями и не является противопоказанием к назначению антиагрегантов.

Количество тромбоцитов ниже $50\text{--}30 \times 10^9/\text{л}$ приводит к нарушению свертывания крови, ретракции кровяного сгустка и проницаемости сосудистой стенки. Тромбоцитопения может быть обусловлена недостаточным образованием тромбоцитов, повышенным их разрушением или потреблением (табл. 6.27). Тяжелая тромбоцитопения проявляется множественными петехиями на коже, кровотечениями из слизистых оболочек.

Таблица 6.27. Характеристика тромбоцитопенических состояний

Причины тромбоцитопении	Состояния, при которых возникает тромбоцитопения
Нарушение образования тромбоцитов Уменьшение числа или отсутствие мегакариоцитов в костном мозге Недостаточное образование тромбоцитов – неэффективный тромбоцитопоз	Лейкозы, апластическая анемия, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (иногда) Алкогольная тромбоцитопения, тромбоцитопения при мегалобластной анемии, некоторые миелодиспластические синдромы Инфекции: ЦМВ, ВИЧ, гепатит С Ятрогенные нарушения: химиотерапевтические препараты, ангрелид
Усиленное потребление тромбоцитов	Синдром ДВС, выраженный ангиоматоз, гигантская кавернозная гемангиома (синдром Казабаха–Мерита), массивная венозная дисплазия, инфекции и васкулиты с развитием синдрома потребления
Усиленное разрушение и утилизация тромбоцитов Секвестрация тромбоцитов в селезенке и поглощение покрытых антителами тромбоцитов макрофагами	Гиперспленизм различной этиологии, остеомиелофиброз с миелоидной метаплазией, болезнь Гоше Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, системная красная волчанка, лимфома, ВИЧ

Причины тромбоцитопении	Состояния, при которых возникает тромбоцитопения
Смешанный патогенез	Заболевания печени, почек, щитовидной железы, массивная трансфузия, заменная трансфузия, экстракорпоральная гемоциркуляция, аллогенная трансплантация костного мозга, реакция «трансплантат против хозяина», термическая или холодовая травма

Подсчет форменных элементов периферической крови – важнейшее исследование не только для выявления тромбоцитопении, но и для выяснения ее причины (табл. 6.28).

Таблица 6.28. Периферическая кровь при тромбоцитопениях

Нормальные показатели эритроцитов и лейкоцитов	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, тромбоцитопеническая пурпура при ВИЧ-инфекции, лекарственная (гангеновая) тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура
Фрагментация эритроцитов	Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитико-уремические синдромы, эмболия опухолевыми метастазами, синдром ДВС
Патологические изменения лейкоцитов	Лейкоз, апластическая анемия, мегалобластная анемия Миелопролиферативный синдром, особенно при наследственной эссенциальной тромбоцитемии, характеризуется увеличенным количеством тромбоцитов с резко нарушенной функцией. При этом прослеживается предрасположенность к геморрагиям, но может быть повышенным риск тромбозов

Тромбоцитопении часто делят на 2 большие группы – иммунные и неиммунные. Иммунные развиваются в результате выработки антитромбоцитарных антител, неиммунные – вследствие нарушения образования или повышенной элиминации (потребление или разрушение).

Иммунные тромбоцитопении

Иммунная тромбоцитопеническая пурпура

Иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) – геморрагическое заболевание, обусловленное выработкой антител к структурам мембраны тромбоцитов и мегакариоцитов и их массивной элиминацией из крови. При этом развивается изолированная тромбоцитопения ниже $100 \times 10^9/\text{л}$, сопровождающаяся геморрагическим синдромом разной степени выраженности.

При ИТП вырабатываются антитела подкласса IgG1 к гликопротеинам мембраны тромбоцитов и мегакариоцитов, в основном к GPIIb/IIIa, реже к GPIb-IX-V,

GP1a/IIa, IV или GPVI. В результате формирования комплекса «антиген–антитело» происходит фагоцитоз тромбоцитов макрофагами. Другой путь элиминации тромбоцитов – цитотоксический лизис Т-клетками.

Клинически ИТП проявляется геморрагическим синдромом: спонтанным или посттравматическим кожным (единичная или генерализованная петехиальная сыпь и экхимозы), петехиями и экхимозами на слизистых; носовыми и десневыми кровотечениями, мено- и метроррагиями, реже гематурией.

Лабораторная диагностика. Специфических диагностических маркеров ИТП в настоящее время не существует, диагноз ИТП является диагнозом исключения, для установления которого требуется проведение комплексного обследования, исключающего заболевания и состояния иммунной и неиммунной природы, протекающие с тромбоцитопенией.

Обязательные лабораторные тесты: общий анализ крови с ретикулоцитами, мазок периферической крови, биохимический анализ крови, прямая проба Кумбса, коагулограмма с агрегацией тромбоцитов с АДФ, коллагеном, тромбинном, адреналином, количественный иммунохимический анализ крови на ВИЧ, вирусы гепатитов В и С, исследование костного мозга (цитологическое и гистологическое) и маркеры тромбофилии.

В мазке необходимо обращать внимание на наличие агрегатов тромбоцитов для исключения «ложной» тромбоцитопении при использовании в качестве антикоагулянта ЭДТА.

При ИТП имеется только изолированная тромбоцитопения, возможны признаки постгеморрагической железодефицитной анемии и ретикулоцитоз после массивной кровопотери.

Вторичные тромбоцитопении возможны при ВИЧ-инфекции и гепатитах В и С. При подозрении на рецидив, латентную инфекцию или персистенцию вируса выполняется полимеразная цепная реакция (ПЦР), в том числе на герпес-вирус.

Миелограмма обязательна всем больным для исключения острых лейкозов, лимфопролиферативных заболеваний, миелодиспластического синдрома и апластической анемии, метастазов опухолей в костный мозг. Для ИТП характерно повышенное или нормальное количество мегакариоцитов, их нормальные или гигантские формы без морфологических аномалий. Проведение трепанобиопсии показано при рецидивирующих и резистентных формах ИТП, у пациентов старше 60 лет, при малом числе мегакариоцитов в миелограмме, подозрении на вторичный генез тромбоцитопении.

Рекомендуется определение маркеров тромбофилии при отягощенном тромбогическом анамнезе, наличии агрегатов тромбоцитов в мазке крови, нормальной агрегации тромбоцитов при глубокой тромбоцитопении и подозрении на тромбоцитопению потребления.

Потенциально информативные методы лабораторного обследования проводятся для уточнения диагноза и проведения дифференциальной диагностики вторичных иммунных тромбоцитопений. К ним относятся: определение уровня тромбоцитассоциированных антител, волчаночного антикоагулянта, антител к

кардиолипинам (IgM и IgG), антител к бета-2-гликопротеину 1 (IgM и IgG), антинуклеарных антител, антител к нативной (двухспиральной) ДНК, антител к тироидной пероксидазе, тест на беременность у женщин детородного возраста. Методы серологических исследований не являются абсолютно информативными и обязательными, однако имеют значение при оценке результатов комплексного обследования, необходимого для установления диагноза ИТП.

Дополнительное и повторное обследование при ИТП рекомендуется повторять при потере ответа на лечение, резистентности к терапии, сомнениях в диагнозе или при появлении признаков, не характерных для первичной иммунной тромбоцитопении (например, лейкопении). Повторное и дополнительное обследование должно включать исследование костно-мозгового кроветворения (цитологическое и гистологическое), а также тесты для исключения вторичной ИТП. Периодичность серологических тестов на заболевания соединительной ткани (системная красная волчанка – СКВ, АФС, ревматоидный артрит – РА, склеродермия) – 1 раз в 12 недель.

Дифференциальная диагностика ИТП проводится как с приобретенными, так и наследственными тромбоцитопениями, характеристика которых представлена в табл. 6.29.

Таблица 6.29 Характеристика приобретенных и наследственных тромбоцитопений, с которыми проводится дифференциальная диагностика ИТП

Приобретенные тромбоцитопении	
Вследствие повышенной деструкции тромбоцитов	Вследствие нарушения продукции тромбоцитов
Вторичная иммунная тромбоцитопения при следующих заболеваниях: – аутоиммунный тиреоидит, – СКВ и другие коллагенозы, АФС, – лимфопролиферативные заболевания, – лекарственно-опосредованная, – вирусного генеза (герпес-вирусы, хронические вирусные гепатиты, ВИЧ) Посттрансфузионная пурпура Гестационная тромбоцитопения Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура Гемолитико-уремический синдром Тромботическая микроангиопатия	Лекарственно-опосредованная тромбоцитопения Инфекционные заболевания Токсическая (алкоголь и др.) Метастатическое поражение костного мозга при неоплазмах Заболевания системы кроветворения: – острый лейкоз, – апластическая анемия, – миелодиспластический синдром, – лимфопролиферативные заболевания
Наследственные тромбоцитопении	
Тромбастения Гланцманна, синдром Бернара–Сулье, синдром серых тромбоцитов, синдром Вискотта–Олдрича, врожденная амегакариоцитемия, анемия Фанкони	
Ложная тромбоцитопения	
Псевдотромбоцитопения (при использовании консерванта ЭДТА; не регистрируется при использовании цитрата в качестве антикоагулянта)	

Критерии диагностики ИТП. Диагноз ИТП устанавливается на основании следующих критериев:

- изолированная тромбоцитопения менее $100 \times 10^9/\text{л}$ как минимум в двух анализах крови;
- отсутствие морфологических и функциональных аномалий тромбоцитов;
- отсутствие патологии лимфоцитов, гранулоцитов и эритроцитов;
- нормальные показатели гемоглобина, эритроцитов и ретикулоцитов, если не было существенной кровопотери;
- повышенное или нормальное количество мегакариоцитов в миелограмме;
- нормальные размеры селезенки;
- отсутствие других патологических состояний, вызывающих тромбоцитопению;
- наличие антитромбоцитарных антител в высоком титре.

Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения

Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения – антитела вырабатываются в результате иммунизации матери аллоантигенными детерминантами, содержащимися на тромбоцитах отца и ребенка. Тромбоцитопения в этом случае сохраняется у новорожденного в течение 2–3 недель. Дети с выраженной тромбоцитопенией рождаются у 10% матерей с ИТП.

Гаптеновые (гетероиммунные) тромбоцитопении

Гаптеновые тромбоцитопении сопровождаются выработкой антител против измененных или чужеродных структур на поверхности тромбоцитов, появляющихся в результате воздействия некоторых лекарственных препаратов (табл. 6.30).

Таблица 6.30. Препараты, способные вызвать лекарственную тромбоцитопению

Антибактериальные препараты: цефалоспорины, хлорамфеникол (левомицетин), ко-тримоксазол, эритромицин, изониазид, (окси)тетрациклин, ПАСК, пенициллин, рифампицин, стрептомицин, сульфаниламиды
Противосудорожные препараты: карбамазепин, мефенитоин (метоин), метосуксимид, фенсуксимид, параметадион, фенитоин (дифенин), триметадион
Анальгетики, противоревматические средства: ацетилсалициловая кислота, колхицин, индометацин, оксифенбутазон, парацетамол (ацетаминофен), фенацетин, фенилбутазон (бутадион)
Мочегонные препараты: диакарб (фонурит), фуросемид, ртутные диуретики, спиронолактон, тиазидные диуретики
Гипогликемические средства: карбутамид, хлорпропамид, инсулин, толтамид
Противомалярийные препараты: хлорохин, акрихин, хинин, гидроксихлорин
Психотропные препараты: апронал, карбонал, барбитураты, аминазин, диазепам, мепробамат, фенотиазин, промазин
Прочие: α-метилдопа, антигистаминные, хинидин, карбимазол, дигитоксин, гепарин, гидралазин, мерказолил, преднизолон, стибофен, витамин К (водные растворы)

Хинин и препараты хининового ряда способны стимулировать образование гепатиновых антител, так как они связываются с тромбоцитарными рецепторами с образованием комплексов.

Подчеркиваем: какой бы ни была причина нарушения функции тромбоцитов, при тромбоцитопении следует избегать лекарственных средств, способных нарушать эти функции, в частности, следует отказаться от аспирина и других нестероидных противовоспалительных средств.

Тромбоцитопения, вызванная гепарином

Гепарин-индуцированная тромбоцитопения (ГИТ) развивается примерно у 5% больных, получавших длительное время бычий гепарин, и 1% больных, получавших свиной гепарин. Тромбоцитарный фактор 4 является гепарин-связывающим белком. На поверхности тромбоцитов формируется мультимолекулярный комплекс между гепаринзависимыми IgG и тромбоцитарным фактором 4 (PF4). Гепарин связывается с PF4. У образующихся в результате комплексов PF4-гепарин становятся доступными новые эпитопы, которые индуцируют образование специфических анти-PF4-гепарин антител. Такие антитела класса IgG способны связываться с FcγRIIa-рецепторами тромбоцитов, активируя последние (рис. 6.5). Гепарин может без предрасположенности к его эффектам вызывать умеренную тромбоцитопению с частичной активацией тромбоцитов. Предрасположенность к развитию ГИТ связана с мутацией в FcγRIIA-гене. В результате в молекуле FcγRIIA-рецептора происходит замена Arg131 на His131, и пациенты с такой мутацией становятся склонны к развитию гепарин-индуцированных рикошетных

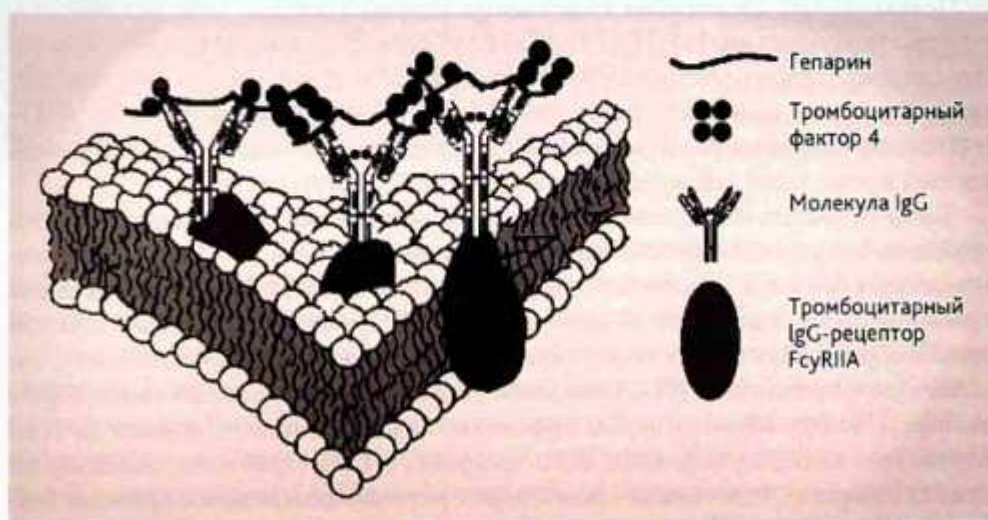


Рис. 6.5. Активация тромбоцитов гепарином за счет образования на поверхности мембран мультимолекулярного комплекса между гепарин-зависимыми IgG-антителами и тромбоцитарным фактором 4

тромбозов. Молекулярно-генетическая диагностика позволяет идентифицировать пациентов с повышенным риском развития гепариновой тромбоцитопении и рикошетных гепариновых тромбозов.

ГИТ бывают двух типов. ГИТ I типа наблюдается у 10–20% пациентов в первые 1–4 дня гепаринотерапии и характеризуется доброкачественным течением. При этом происходит незначительное снижение количества тромбоцитов – до уровня не менее $100 \times 10^9/\text{л}$. Уменьшение количества тромбоцитов является результатом прямого (неиммунного) взаимодействия молекул гепарина с мембраной тромбоцита, активации и агрегации тромбоцитов. Тромбоцитопения при ГИТ I типа носит транзиторный, обратимый характер и при продолжении гепаринотерапии может самостоятельно исчезать.

ГИТ II типа – это иммунно-опосредованное осложнение терапии гепарином, которое наблюдается у 0,3–3% пациентов, получающих нефракционированный гепарин более 4 дней. При этом отмечается значительное снижение числа тромбоцитов – до $30\text{--}60 \times 10^9/\text{л}$, или более чем на 50% от исходного уровня. В этом случае, несмотря на то что терапия гепарином проводится для того, чтобы предотвратить тромботическое событие, образующиеся в ответ на гепарин антитела класса IgG (значительно реже классов IgM и IgA) вызывают активацию тромбоцитов и последующее образование тромбина, что приводит к противоположному парадоксальному результату: увеличению риска венозного и/или артериального тромбоза. Следует отметить, что низкомолекулярные гепарины (фраксипарин, фрагмин, ловенокс, клексан) крайне редко вызывают тромбоцитопению, вероятно, из-за меньших, чем требуется для образования иммунного комплекса, размеров молекул этих препаратов.

Покрытые IgG-антителами тромбоциты активно удаляются из системы циркуляции макрофагами. ГИТ-IgG способны повреждать эндотелиальные клетки. Это связано с тем, что гепарансульфат гликокаликса эндотелия, как структурный аналог гепарина, может вступать в качестве антигена во взаимодействие с ГИТ-IgG. Затем возможно развитие иммунных реакций на поверхности эндотелия, адгезия в этих зонах макрофагов и развитие пристеночного тромба.

Такие основные симптомы ГИТ, как тромбоцитопения и тромбообразование, крайне неспецифичны, что осложняет постановку диагноза, особенно для реанимационных больных, у значительной доли которых наблюдается снижение числа тромбоцитов, но оно никак не связано с ГИТ. С другой стороны, сам симптом тромбообразования ставит перед клиницистами диагностическую дилемму, называемую «парадоксом ГИТ». Появление новых тромбов заставляет клиницистов выбирать между недостаточной эффективностью терапии гепарином (в этом случае необходимо увеличение дозы гепарина) и ГИТ (требуется немедленная отмена гепарина). Реактивный тромбоцитоз, развивающийся после крупных операций, – частое явление, что затрудняет диагностику ГИТ. Для обнаружения 50% падения числа тромбоцитов, являющегося одним из основных симптомов ГИТ, необходимо сравнение текущего количества тромбоцитов с их количеством с 5-го по 14-й дни после операции. Нельзя ориентироваться на исходное значение

до введения гепарина, поскольку в этом случае не будет учтен реактивный послеоперационный тромбоцитоз, может произойти недооценка уменьшения числа тромбоцитов. Так как в основе ГИТ лежат иммунные механизмы, а антитела к комплексу PF4-гепарин не достигают клинически значимых концентраций до 5-го дня, достаточно начать мониторинг количества тромбоцитов на 5-й день терапии гепарином. Симптомы ГИТ начинают проявляться у большей части пациентов на 12–14-й дни, а количество тромбоцитов достигает минимальных значений на 10–12-й дни. В связи с этим определения количества тромбоцитов на 5, 7 и 9-й дни достаточно для своевременного обнаружения ГИТ (рис. 6.6). Возникновение ГИТ II типа может сопровождаться грозными осложнениями, вплоть до летального исхода. Своевременная диагностика и переход на альтернативные антикоагулянты негепариновой природы – единственный ключ к предотвращению развития грозных осложнений ГИТ II типа.

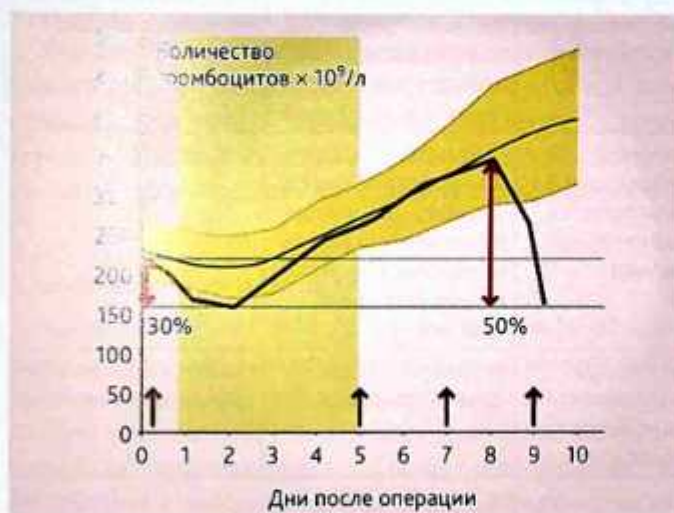


Рис. 6.6. Характерная динамика количества тромбоцитов после травматологической операции. Гепарин-индуцированная тромбоцитопения (ГИТ)

Диагностика ГИТ. Диагностический алгоритм начинается с оценки вероятности ГИТ, которая выполняется с использованием шкалы 4Т (табл. 6.31), составленной на основании обобщения типичных характеристик ГИТ, описанных выше.

С помощью балльной системы врач-клиницист может оценить риск ГИТ как низкий (0–3 балла), умеренный (4–6 баллов) или высокий (7–8 баллов). У пациентов с низким баллом (<4) вероятность иммуноопосредованной ГИТ <5%, и тестирования на антитела к PF4-гепарин не требуется. У пациентов с умеренной (4–6 баллов) и высокой (7–8 баллов) клинической вероятностью ГИТ необходимо выполнить лабораторный анализ на наличие антител к PF4-гепарин. Далее лечащий врач по своему усмотрению может подтвердить диагноз ГИТ с помощью функционального теста или переключиться на альтернативный антикоагулянт. Во всех случаях балльную систему следует использовать, проявляя осмотритель-

Таблица 6.31. Шкала 4Т для оценки вероятности гепарин-индуцированной тромбоцитопении (Lo с соавт, 2006)

БАЛЛЫ	2	1	0
Тромбоцитопения (Thrombocytopenia)	>50% падение количества тромбоцитов в двух последовательных измерениях или минимальное количество тромбоцитов $20-100 \times 10^9/\text{л}$	30–50% падение количества тромбоцитов в двух последовательных измерениях или минимальное количество тромбоцитов $10-19 \times 10^9/\text{л}$	<30% падение количества тромбоцитов в двух последовательных измерениях или минимальное количество тромбоцитов $<10 \times 10^9/\text{л}$
Сроки (Timing) падения количества тромбоцитов или других осложнений	Четкое начало на 5–10-й день или <1 дня (если был контакт с гепарином в течение последних 100 дней)	Согласуется с иммунизацией, но не четко (например, отсутствуют данные о числе тромбоцитов), или начало тромбоцитопении после 10 дней	Количество тромбоцитов падает слишком рано (я отсутствует недавнего контакта с гепарином)
Тромбообразование (Thrombosis) или другие осложнения (например, повреждение кожи)	Новые тромбы; некроз кожи; острая системная реакция на болюсное введение гепарина	Прогрессирующий или повторяющийся тромбоз; эритемные повреждения кожи; предполагаемый, но недоказанный, тромбоз	Отсутствует
Отсутствие других причин (other) тромбоцитопении	Нет других выраженных причин падения количества тромбоцитов	Есть вероятность другой причины	Имеется конкретная другая причина

ность, при этом может потребоваться более внимательное изучение клинических и анамнестических данных.

Для лабораторной диагностики ГИТ используют две группы тестов – антигенные (с использованием PF4-гепарин в качестве антигена) и функциональные (тесты с активацией тромбоцитов).

В основе первой группы иммунологических тестов лежит обнаружение в крови антител к комплексу PF4-гепарин с помощью методов латекс-агглютинации, твердофазного ИФА, агглютинации в геле или иммунофилтрации. Разработаны автоматизированные тест-системы на основе латекс-агглютинации с конкурентным торможением (иммунотурбидиметрия) или на основе иммунохемилюминесценции. Основным недостатком антигенных методик является низкая специфичность: отсутствие в крови пациента антител к комплексу PF4-гепарин позволяет исключить ГИТ II типа с достаточно высокой вероятностью,

но присутствие антител к комплексу PF4-гепарин в крови еще не подтверждает данный диагноз.

Вторая группа включает функциональные тесты (или тесты «с отмытыми тромбоцитами»). В основе этих методов лежит выявление гепарин-зависимой активации донорских тромбоцитов сывороткой пациента. Эти тесты обладают большей положительной прогностической значимостью. При ручном исполнении основными недостатками функциональных методов являются отсутствие стандартизации и длительное время исполнения (до нескольких суток), что делает их неприменимыми в рутинной клинической практике. Тем не менее, если у больного, получавшего гепарин, развивается тромбоцитопения, возможно проведение исследования гепарин-ассоциированной агрегации тромбоцитов и гепарин-индуцированной тромбоцитопении с использованием импедансного люминесцентного агрегометра «Хронолог» (см. рис. 4.15), который одновременно с агрегацией тромбоцитов в цельной крови позволяет определять высвобождение из гранул АТФ, как конечную точку активации тромбоцитов, вызванной антителами. Методика позволяет в течение 5 мин поставить диагноз нарушения функции тромбоцитов и дефектов неагрегации. Кроме того, имеется экспресс-тест для диагностики по месту лечения (специализированная тест-система Stick-expert®), позволяющий с высокой долей вероятности исключить ГИТ – имеет высокое отрицательное прогностическое значение. Длительность выполнения исследования составляет 5 минут.

Клинический случай 6.14

Пациентка Е., 43 года. ГБ III стадии. Атеросклероз. Сахарный диабет. Ожирение III степени. За несколько дней до поступления в клинику на фоне нарушений ритма сердца были эпизоды нарушения сознания.

При поступлении развивается угнетение сознания до уровня сопора. Пациентка госпитализирована в клиническую больницу города Москвы, выполнена КТ головного мозга. Диагноз: «острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу». Проведена экстренная операция – декомпрессивная трепанация черепа слева. Состояние после операции оставалось тяжелым. Произведена попытка тромболиза – без эффекта (в комплексе терапии использован нефракционированный гепарин). Ввиду возникшего носового кровотечения выполнена задняя тампонада, кровотечение остановлено. Уровень тромбоцитов $258 \times 10^9/\text{л}$.

Через 2–6 дней на фоне проводимого консервативного лечения – положительная динамика, пациентка пришла в сознание, появилась речепродукция, сохраняется глубокий правосторонний гемипарез. Однако отмечается снижение количества тромбоцитов: $187 \times 10^9/\text{л}$ (3-й день), $135 \times 10^9/\text{л}$ (5-й день), $59 \times 10^9/\text{л}$ (6-й день).

7-й день. Уровень тромбоцитов достиг уровня $32 \times 10^9/\text{л}$ – $31 \times 10^9/\text{л}$. По данным ультразвукового исследования определяется неокклюзионный тромбоз венозной системы правой ноги. По этому поводу назначается терапия клексаном.

8-й день. На фоне терапии эноксапарином уровень тромбоцитов снижается до $18 \times 10^9/\text{л}$ – $14 \times 10^9/\text{л}$. Потребовалось исследование на антитела к комплексу PF4-гепарин с целью исключения развития ГИТ II типа. Уровень антител к комплексу PF4-гепарин составил 6,25 Ед/мл (референсные значения менее 1,00 Ед/мл). Учитывая положительный результат антигенного теста в сочетании с клиническим течением, пациентке был поставлен диагноз «ГИТ II типа», и в этот же день она была переведена на альтернативный антикоагулянт. Динамика уровня тромбоцитов и уровня антител к комплексу PF4-гепарин после отмены гепарина представлена на рис. 6.7. После восстановления уровня тромбоцитов пациентка Е. была переведена на варфарин, затем выписана для реабилитации по месту жительства. Исследование на наличие антител к комплексу PF4-гепарин, выполненное в срок и по показаниям, позволило вовремя изменить тактику лечения для предотвращения развития потенциально фатальных осложнений.



Рис. 6.7. Уровень тромбоцитов и антител к комплексу PF4-гепарин у пациентки Е. на фоне терапии гепарином и после отмены гепарина

Неиммунные тромбоцитопении

Среди неиммунных тромбоцитопений особое место занимает группа заболеваний, объединенных под названием «тромботические микроангиопатии» (ТМА). В течение долгого времени ТМА была гетерогенной группой плохо диагностируемых заболеваний с неясной патофизиологией. Как следствие – лечение ТМА основывалось на эмпирических предположениях и обладало низкой эффективностью; заболевания сопровождалась высокой смертностью. Современное представление о ТМА рассматривает ее как клинический синдром, для которого характерны:

- тромбоцитопения;

- микроангиопатическая гемолитическая анемия (неиммунная гемолитическая анемия с появлением в периферической крови шистоцитов (фрагментированные эритроциты);
- микроваскулярный тромбоз концевых артериол и капилляров с множественной дисфункцией органов.

В группе ТМА выделяют тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), гемолитико-уремический синдром (ГУС), HELLP-синдром (название от 3 основных характеристик синдрома: гемолиза (Hemolysis), повышения активности ферментов печени (Elevated Liver enzymes) и тромбоцитопении (Low Platelet count)).

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (болезнь Мошковица)

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Мошковица – неиммунная, тяжелая окклюзивная тромботическая микроангиопатия, характеризующаяся повышенной агрегацией тромбоцитов, ишемией разных органов, выраженной тромбоцитопенией, потреблением и микроангиопатической гемолитической анемией с фрагментацией эритроцитов. Заболеваемость ТТП составляет 4–5 случаев на 1 млн, 70% из которых – женщины. Летальность без лечения составляет до 90%, даже при своевременной и правильной терапии смертность 8–18% в течение месяца. Основа заболевания – недостаточность плазменной металлопротеиназы ADAMTS-13, расщепляющей мультимеры фактора Виллебранда. ADAMTS-13, также известная как протеаза, расщепляющая фактор Виллебранда, представляет собой цинкосодежащий фермент металлопротеазы. Фермент деградирует большие мультимеры vWF, уменьшая их активность.

Мультимер vWF синтезируется эндотелиальными клетками и высвобождается N-концом во внеклеточное пространство, оставаясь C-концом связанным с мембраной эндотелиальной клетки. Отщепленные фрагменты мультимера vWF обладают адгезивными свойствами, причем активность vWF тем выше, чем больше мономеров включено в его состав. ADAMTS-13 способна отщеплять фрагменты vWF как от трансмембранной, так и от плазменной формы мультимера. Поэтому ADAMTS-13 необходима, во-первых, для высвобождения vWF в плазму, а во-вторых – для регулирования чрезмерной его активности. При недостатке активности ADAMTS-13 мультимеры vWF остаются заякоренными на мембране эндотелиальной клетки, а концентрация vWF в плазме остается низкой. В свою очередь тромбоциты адгезируются на этих «заякоренных» мультимерах vWF, в результате в неповрежденном сосуде развивается локальный тромб. Недостаток активности протеиназы может быть обусловлен либо мутацией в активном центре, либо наличием аутоантител, эти антитела называют ингибитором ADAMTS-13. Ингибитор снижает активность ADAMTS-13, поэтому функциональный дефект этого фермента ведет к присутствию высокомолекулярных форм vWF в плазме и на поверхности эндотелиоцитов. В результате развивается повышенная адгезия и агрегация тромбоцитов, в основном в

капиллярах. Клинические симптомы обычно возникают после инфекции или беременности.

Диагноз болезни устанавливается на основании характерной клинической картины: сочетания острой гемолитической анемии и острой тромбоцитопенической пурпуры с геморрагиями, сопровождающимися мозговыми и почечными нарушениями. Диагноз подтверждается при обнаружении на биопсии пораженных лимфатических узлов, кожи или слизистой оболочки десен характерных гиалиновых тромбов в мелких сосудах.

Лабораторная диагностика

Общий анализ периферической крови: нормоцитарная анемия, эритробласты и шизоциты в мазке, увеличенное число ретикулоцитов, значительная тромбоцитопения. Осмотическая резистентность эритроцитов в норме. Международный совет стандартизации в гематологии (MCCG – ICSH) рекомендует для стандартизации идентификации и подсчета считать шизоцитами эритроциты в виде шлема, маленькие, неправильной треугольной формы или в форме полумесяца, с заостренными выступами, а также с отсутствием прорывления в центре (рис. 6.8). Количество шизоцитов имеет определяющее клиническое значение для диагностики тромботической микроангиопатической анемии, позволяя поставить диагноз при 1% шизоцитов в отсутствие дополнительных тяжелых аномалий формы эритроцитов.

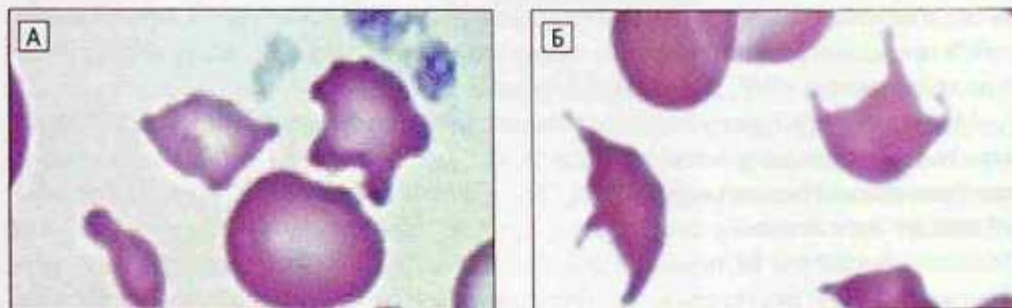


Рис. 6.8. Фрагменты разрушенных эритроцитов, наблюдаются при анемиях с внутрисосудистым гемолизом, микроангиопатической гемолитической анемии: А – шизоциты; Б – шлемовидные эритроциты

Костномозговой пунктат характеризуется выраженной эритробластической реакцией, свойственной гемолитическому процессу. Количество мегакариоцитов увеличено, и они выявляют признаки резкой дегенерации с выраженным нарушением продукции тромбоцитов.

Исследование системы свертывания крови: выраженная тромбоцитопения, явления геморрагического синдрома – нарушение ретракции кровяного сгустка, удлинение времени кровотечения, признаки синдрома ДВС.

Биохимическое исследование: в сыворотке – повышенный уровень свободного билирубина и активности ЛДГ, сниженная концентрация гаптоглобина; в моче – протеинурия, гематурия и цилиндры в осадке (у некоторых больных).

Дополнительные исследования: значительно снижены уровень и активность ADAMTS-13 (<10%), определяются антитела к ADAMTS-13; отрицательные пробы Кумбса.

Гемолитико-уремический синдром

Гемолитико-уремический синдром является одной из ведущих причин развития острого повреждения почек (ОПП) у детей. Он характеризуется триадой признаков: Кумбс-негативной гемолитической анемией с наличием фрагментированных эритроцитов (шизоцитов), тромбоцитопенией и ОПП. При ГУС, так же как при болезни Мошковича, в крови увеличено содержание мультимеров vWF, однако активность ADAMTS-13 не изменена. Распространенная окклюзия сосудов мелкого калибра тромбами возникает из-за повреждения эндотелия. В результате поражения эндотелиальных клеток происходит активация выпадения фибрина в микрососудах, агрегации тромбоцитов с образованием тромбов в микроциркуляторном русле, механическое повреждение эритроцитов. Эти нарушения особенно выражены в почках. Различают типичный ГУС и атипичный ГУС (аГУС).

Типичный ГУС развивается в результате повреждения эндотелия шига-токсином кишечной палочки (STEC – шига-токсин-продуцирующая *E. coli*). STEC-инфекция обнаруживается приблизительно в 85% случаев ГУС с помощью посева стула. Другими вариантами диагностики STEC-инфекции являются выявление гена шига-токсина в стуле методом ПЦР, или, реже, определение IgM антител к липополисахариду наиболее часто встречающихся серогрупп микроорганизма в сыворотке крови.

Атипичный ГУС (аГУС) чаще всего имеет в основе генные мутации, приводящие к дисфункции каскада комплемента с неконтролируемой активацией альтернативного пути. Эти мутации приводят к утрате защиты эндотелиальных клеток от конечных продуктов активации комплемента, повреждению эндотелия комплементом и развитию тромбоза мелких артерий и тромбоцитопении.

Для подтверждения типичного ГУС рекомендуется проведение исследований:

- общий анализ крови – анемия, тромбоцитопения, обнаружение шизоцитов в мазке;
- биохимический анализ крови – креатинин, мочевины, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), билирубин, трансаминазы, электролиты;
- реакция Кумбса (прямая);
- C3- и C4-компоненты комплемента для исключения аГУС;
- активность ADAMTS-13 и мультимеры фактора Виллебранда могут быть использованы для дифференциальной диагностики с ТТП;

- рекомендуется бактериологическое и/или серологическое исследование кала для выявления STEC-инфекции.

Единственным отличием, позволяющим заподозрить аГУС, является отсутствие гемоколита в продроме заболевания, поэтому всем пациентам показан комплекс исследований, рекомендованных при STEC-ГУС. При подозрении на атипичный ГУС рекомендовано выполнение молекулярно-генетического исследования для выявления мутаций генов белков – регуляторов комплемента.

Приобретенный дефицит факторов свертывания крови

Приобретенный дефицит факторов развивается в результате появления ингибиторов, которые представляют собой антитела к определенному фактору или группе факторов гемостаза (клинический случай 6.15). Чаще всего встречается развитие ингибитора к фактору VIII у пациентов, страдающих гемофилией А и получающих специфическую заместительную терапию. Описаны приобретенные формы дефицита ф. VIII, болезни Виллебранда, реже приобретенный дефицит других факторов свертывания у лиц, не страдавших врожденными нарушениями.

- Приобретенный ингибитор к ф. IX – чрезвычайно редкое заболевание.
- Специфические антитела к ф. II, VI, X встречаются очень редко (исключение – антитела к протромбину, ассоциированные с волчаночным антикоагулянтном).
- Описаны единичные случаи развития ингибитора к ф. XI, XII и другим факторам контактной активации, за исключением пациентов, имеющих ингибитор к ф. XI; никто из них не страдал значительными геморрагическими проявлениями, их диагностика была исключительно лабораторной находкой.
- Имеются немногочисленные описания развития ингибитора к фибриногену, фибрину, ф. XIII и промежуточным продуктам процесса полимеризации и стабилизации фибрина. Большинство из больных страдали тяжелыми геморрагическими проявлениями с угрозой для жизни, сходными с проявлениями афибриногенемии или дефицита ф. XIII.

Основными предрасполагающими факторами развития специфического ингибитора являются:

- аутоиммунные заболевания;
- онкологические заболевания;
- перенесенная инфекция;
- прием некоторых лекарственных препаратов.

Возможно возникновение антител без явных провоцирующих воздействий.

Клинический случай 6.15

Пациентка Р., 55 лет. На фоне начатого лечения сиофором сахарного диабета появились болезненные гематомы на верхних и нижних конечностях. Анемия (гемоглобин 55 г/л). Тромбоцитоз ($559 \times 10^9/\text{л}$).

Коагулограмма пациентки Р.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	88	25–40 с
АЧТВ (после коррекции нормальной донорской плазмой)	80	
Индекс циркулирующего антикоагулянта (ИЦА)	58	<15% – истинный дефицит факторов >15% – наличие ингибитора
Протромбиновая активность по Квику	116	>70%
Тромбиновое время	21	16–25 с
Концентрация фибриногена	4,02	2,8–4,7 г/л
Фактор VIII активность	5	50–160%
Фактор IX активность	8	65–150%
Фактор X активность	8	65–150%
Фактор XI активность	9	50–150%
Антиген фактора Виллебранда	103	Группа крови I – 42–141% Группа крови II, III, IV – 66–176%
Ристомин-кофакторная активность фактора Виллебранда	169	Группа крови I – 48–202% Группа крови II, III, IV – 61–240%

Заключение. Лабораторные признаки ингибиторной (приобретенной) формы гемофилии. Рекомендуется дообследование в условиях специализированной лаборатории гемостаза методом Бетезда с целью подтверждения наличия специфического ингибитора к факторам внутреннего пути гемокоагуляции.

Приобретенный ингибитор к фактору VIII

Возникает вследствие образования антител к собственному ф. VIII. Чаще развивается у лиц старше 50 лет, однако описаны случаи заболевания детей. Мужчины и женщины страдают одинаково часто. Расчетная частота развития ингибитора к ф. VIII у пациентов, не болевших гемофилией, составляет 1 случай на миллион человек в год. У половины пациентов ингибитор развился спонтанно. В качестве фоновых заболеваний могут быть: системные заболевания соединительной ткани, ревматоидный артрит, многоформная эритема, герпетиформный дерматит, аллергические реакции на пенициллин, бронхиальная астма, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, терапия α -интерфероном, моноклональные гаммапатии, беременность и послеродовый период. У части пациентов ингибитор спонтанно исчез через 12–18 месяцев после развития, однако остальным потребовалось специальное лечение.

Диагностика основана на клинических данных (признаки развившегося геморрагического заболевания с кровоточивостью по гематомному типу) и лабораторных данных (снижение активности ф. VIII, наличие специфического ингибитора к ф. VIII).

Ингибитор к фактору Виллебранда (синдром Виллебранда)

Приобретенная болезнь Виллебранда (приобретенный синдром) лабораторно подобен нарушениям, характерным для врожденной болезни Виллебранда. Редкое заболевание. Возникает как спонтанно, так и на фоне ряда заболеваний: патология сердца и сосудов, онкологические заболевания, системные заболевания соединительной ткани, гипотиреоз, прием ципрофлоксацина. Патогенетические механизмы формирования приобретенного синдрома Виллебранда:

- специфические антитела к ф. VIII/vWF;
- неспецифические антитела, которые формируют иммунные комплексы и приводят к более активному клиренсу vWF;
- абсорбция vWF клетками злокачественных опухолей;
- повышение протеолитической деградации vWF;
- потеря тяжелых молекул vWF в условиях стресса, связанного с высоким напряжением сдвига в условиях активного кровотока;
- снижение синтеза или высвобождения vWF.

Диагностика – выявление развившихся признаков приобретенного геморрагического заболевания, сходных с наследственной болезнью Виллебранда. Лабораторная диагностика аналогична диагностике врожденной болезни Виллебранда. При этом помимо состояния гемостаза необходимо выявить фоновые заболевания.

Приобретенный ингибитор к фактору V

Редкое заболевание, возникающее у пожилых людей, не имевших предшествующего дефицита ф. V. Развитие ингибитора чаще всего связано с предшествующим хирургическим лечением, часто после операций по поводу злокачественных заболеваний. В ряде случаев при проведении операции с последующим развитием дефицита ф. V использовались фибриновый клей из бычьей плазмы, содержащий незначительные количества ф. V, или после операции применялись антибиотики с бета-лактамым кольцом, либо проводилось переливание крови. Диагностика основывается на появлении признаков геморрагического заболевания, сходного с врожденным дефицитом ф. V, и наличии лабораторных данных за ингибитор к ф. V.

Нарушения гемостаза, связанные с заболеваниями печени

Патология печени проявляется при исследовании гемостаза в первую очередь удлинением АЧТВ, связанным с недостаточностью факторов, синтезируемых печенью – прокоагулянтов и антикоагулянтов (см. клинический случай 6.16). Кровотечения часто сопутствуют хроническим или острым заболеваниям печени. Геморрагический синдром при заболеваниях печени носит смешанный характер (по гематомному и микроциркуляторному типу). Наиболее опасны кровотечения из пищеварительного тракта, которые нередко становятся причиной гибели этих пациентов. Углубление знаний о состоянии системы гемостаза при заболеваниях печени привело к смене парадигмы. Одновременное снижение прокоагулянтной и антикоагулянтной активности выводит пациента на новый уровень гемостатического баланса (часто такие пациенты не имеют клинических проявлений патологии гемостаза), но баланс этот,

в отличие от здорового человека, крайне неустойчив, он не имеет запаса прочности и легко смещается как в сторону кровотечений, так и тромбозов. То есть имеющаяся гипокоагуляция не защищает больного от тромбоэмболических осложнений, но значительно затрудняет необходимую антикоагулянтную терапию и профилактику.

В табл. 6.32 перечислены основные дефекты системы гемостаза, связанные с поражением печени.

В табл. 6.33 представлены особенности результатов лабораторного анализа гемостаза при различных заболеваниях печени.

Таблица 6.32. Гемостаз при заболеваниях печени

Риск кровотечения	Компоненты гемостаза	Риск тромбоза
Тромбоцитопения, нарушение функции тромбоцитов, повышение продукции NO и простациклина	Первичный гемостаз	
Низкий уровень коагуляционных факторов II, V, VII, IX, X и XI; дефицит плазмина K, дисфибриногенемия	Вторичный гемостаз	Повышение уровня ф. VIII, снижение уровней протеинов C, S, антитромбина, α_2 -макроглобулина и кофактора II гепарина
Низкий уровень α_2 -антиплазмина, ф. XIII и TAFI, повышение уровня tPA	Фибринолиз	Низкий уровень плазминогена

Таблица 6.33. Возможные изменения показателей гемостаза при заболеваниях печени

Патология	ПВ*	AЧТВ	ТВ	Фибриноген	ПДФ/ D-димер	АТ	PC	PS	ф. V	ф. VIII	ф. VII	Тромбоциты
Острый тяжелый гепатит	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↓↓↓	↑↑	↓↓	↓↓ / некарбоксированные молекулы	↓↓ / некарбоксированные молекулы	↓↓	↑↑↑	↓↓	Н-↓
Билиарный цирроз	↑↑↑	↑	Н-↑	Н-↑	Н-↑	↓	Н-↓	Н-↓	Н-↓	↑	↓↓↓	Н-↓
Билиарная обструкция	↑↑↑	Н-↑	Н	Н-↑	Н	↓↓	↓↓	↓↓	Н	Н-↑	↓↓↓	Н
Цирроз печени	↑↑↑	Н-↑	Н-↑	Н-↓	Н-↑	↓↓↓	↓↓	↓↓	Н-↓	Н-↑↑	↓↓↓	↓

Примечание. * – удлинение протромбинового времени проявляется снижением активности протромбина по Квику менее 70%.

Клинический случай 6.16

Пациентка Д., 44 года, направлена гематологом на диагностическое коагулологическое исследование с диагнозом «кожный геморрагический синдром; тромбоцитопения ($58 \times 10^9/\text{л}$)». В анамнезе тромбоз воротной вены.

Коагулограмма пациентки Д.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	42	25–40 с
Протромбиновая активность по Квику	54	<70%
Тромбиновое время	35	16–25 с
Концентрация фибриногена	1,5	2,0–4,0 г/л
Фактор XIII активность	62	75–150%
Активность антитромбина	39	85–123%
Активность протеина С	21	75–140%
Активность плазминогена	39	85–141%
D-димеры	0,14	0–0,24 мкг/мл

Заключение. Лабораторные признаки вторичной коагулопатии, связанной со снижением белок-синтезирующей функции печени.

Комментарий. Геморрагический синдром, связанный со снижением белок-синтезирующей функции печени, проявляется системным удлинением времени клоттинговых тестов и уменьшением активности компонентов гемостаза, синтезируемых печенью (концентрация фибриногена, активность фактора XIII). Одновременно сформировались предпосылки к тромбозам (снижение антитромбина, протеина С, плазминогена) с клинической реализацией в виде тромбоза воротной вены. В то же время нормальны показатели, в которых используются факторы иного происхождения. Показательным является уровень D-димера, который сохраняется в пределах референтных значений. Это может быть дифференциальным признаком между вторичной коагулопатией, связанной со снижением белок-синтезирующей функции печени, и синдромом ДВС в хронической форме, при котором обязательным компонентом является активация фибринолиза, приводящая к повышению уровня D-димера.

Гиперактивация фибринолиза

Значительная активизация системного фибринолиза – редкая причина геморрагического синдрома. Однако развитие системного гиперфибринолиза может повлечь за собой опасные геморрагические проявления, а при истощении плазминогена – тромбозы (табл. 6.34). Системный фибринолиз может быть причиной массивных кровотечений из желудочно-кишечного тракта у пациентов с печеночной

недостаточностью. Из-за относительно невысокой специфичности плазмин может деградировать многие белки крови. Кроме того, плазмин может активировать металлопротеазы, которые, в свою очередь, способны индуцировать деструкцию тканей и апоптоз. Высока вероятность развития гиперфибринолиза при множественных травмах, сепсисе, синдроме ДВС, выпадении функции органов, обширном метастазировании с деструкцией тканей. Врожденный или приобретенный недостаток одного или нескольких ингибиторов фибринолиза (особенно α_2 -антиплазмина или PAI-1) сопровождается проявлениями гиперфибринолиза. Гиперфибринолиз клинически проявляется склонностью к кровотечениям, а при истощении факторов – тромбозами. Состояние гиперфибринолиза необходимо диагностировать и лечить.

Таблица 6.34. Гиперфибринолиз и его осложнения

Проявление	Следствие
Деструкция фибриногена, образование продуктов деградации фибриногена	Нарушение полимеризации фибрин-мономеров и агрегации тромбоцитов Уменьшение субстратов для образования фибрина
Активация и деградация плазменных факторов, в том числе ф.VIII, V и XIII	Увеличение с последующим снижением образования тромбина и агрегации тромбоцитов
Потребление ингибиторов (α_2 -антиплазмина, PAI-1 и других)	Избыточный фибринолиз, разрушение фибриногена
Деградация тромбоцитарных рецепторов GPIb/IX (vWF-рецепторов)	Снижение адгезии тромбоцитов к участкам повреждения сосудистой стенки
Потребление плазминогена	Снижение фибринолитической активности

Большинство лабораторных тестов не выявляют состояние гиперфибринолиза, включая тесты с определением свободного плазмина и образующихся ПДФ. Только тромбоэластограмма способна наглядно продемонстрировать развитие гиперфибринолиза.

Кровотечения, связанные с патологией сосудов

Сосудистые аномалии

Сосудистые аномалии представляют собой гетерогенную группу врожденной патологии сосудов. Они подразделяются на сосудистые опухоли и мальформации. Гемангиома представляет собой эндотелиальную гиперплазию и является доброкачественной опухолью. Мальформация – это дефект строения сосудов, который возникает в процессе эмбрио- и васкулогенеза.

Гемангиома является наиболее частой сосудистой опухолью.

Инфантильная гемангиома наблюдается примерно у 10% населения, встречается у детей, чаще у девочек с низким весом, родившихся до 37 недель беременности, преимущественно в результате экстракорпорального оплодотворения.

Гигантские кавернозные гемангиомы Казабаха–Мерита приводят к активации и секвестрации тромбоцитов, потреблению плазменных факторов гемостаза. Помимо кровотечений вследствие травмы патологически измененных сосудов изменения гемостаза вносят свой вклад в развитие геморрагического синдрома у этих пациентов. Одним из серьезных осложнений больших гемангиом является синдром ДВС, приводящий к потреблению прокоагулянтов и активации фибринолиза. При этих явлениях нарушения гемостаза характеризуются тромбоцитопенией, снижением концентрации фибриногена, повышением количества ПДФ, D-димеров. На фоне этого часто развивается анемия.

Мальформации составляют большую часть пороков развития сосудов, они подразделяются на лимфатические, капиллярные, венозные и артериовенозные мальформации. Сосудистые мальформации сравнительно редки и представляют собой нарушение строения сосудистой стенки. Чаще всего встречаются лимфатические мальформации, капиллярно-венулярные, венозные и артерио-венозные. В отличие от гемангиом сосудистые мальформации никогда не регрессируют.

Врожденная геморрагическая телеангиэктазия (болезнь Рэнду–Ослера–Вебера)

Врожденная геморрагическая телеангиэктазия, геморрагический ангиоматоз – наследственное заболевание, в основе которого лежит неполноценность сосудистого эндотелия, в результате чего на разных участках кожи и слизистых оболочках губ, рта, на внутренних органах образуются множественные ангиомы и телеангиэктазии. Области телеангиэктазий легко ранимы, вследствие чего у пациентов возникают носовые и желудочно-кишечные кровотечения. Причиной заболевания является мутация расположенного в 9-й хромосоме гена эндоглина, белка, участвующего в ангиогенезе и репарации тканей. Распространенность заболевания составляет 1 : 2500 – 40000 человек.

Специфических изменений при исследовании свертывающей системы крови нет, однако болезнь Рэнду–Ослера–Вебера может сопровождаться активацией внутрисосудистого свертывания крови и сочетаться с болезнью Виллебранда.

Нарушения свертывания крови, связанные с массивной кровопотерей

Быстрая массивная кровопотеря – нередкое осложнение тяжелых травм, патологических родов, она может осложнять операции трансплантации органов, оперативное лечение сердечно-сосудистой патологии и рака. Это состояние может требовать массивных гемотрансфузий – более чем один объем циркулирующей крови (ОЦК) в сутки. При кровопотере интенсивностью 1 ОЦК менее чем за 2 часа могут возникать серьезные нарушения гемостаза. Имеется несколько патогенетических факторов этих нарушений.

Разведение и потребление. Наиболее распространенная клиническая проблема – разведение плазменных компонентов гемостаза и тромбоцитов вводимыми

плазмозаменителями. Использование коллоидных и кристаллоидных растворов, эритроцитарной массы, разведенной изотоническим солевым раствором до гематокрита 60%, при массивной гемотрансфузии приводит к значительному снижению активности компонентов гемостаза.

Одним из следствий массивной кровопотери и массивной заместительной терапии являются тромбоцитопения и тромбоцитопатия, возникающие вследствие быстрой внутрисосудистой активации тромбоцитов продуктами деградации фибрина/фибриногена, разведением и секвестрацией тромбоцитов в сосудистом русле на фибриновых депозитах. В случаях массивной кровопотери при тяжелой травме, особенно головы и мозга, гипотонии с гипоксией и ацидозом, бактериальном сепсисе, преждевременной отслойке плаценты может развиваться синдром ДВС.

Рекомендуемые лабораторные тесты для контроля состояния гемостаза при массивной кровопотере и массивных гемотрансфузиях: ПВ, АЧТВ, фибриноген, гематокрит, количество тромбоцитов, ПДФ, D-димеры.

Нарушения гемостаза, связанные с патологией почек

У пациентов с хроническим поражением почек кровотечения являются серьезным осложнением. Даже при систематическом проведении гемодиализа примерно у половины пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) развиваются меноррагии, носовые кровотечения, реже кровотечения из желудочно-кишечного тракта. Тяжелые кровотечения, как правило, связаны с травмой или оперативным лечением этих больных, геморрагический синдром осложняет ведение этих пациентов.

Патофизиологические механизмы, приводящие к геморрагиям у пациентов с ХБП, в основном связаны с явлениями уремии. У этих пациентов выявляются значительные нарушения тромбоцитарно-сосудистого взаимодействия. Одним из возможных механизмов является повышение синтеза и экспрессии оксида азота эндотелием. Определенный вклад вносит анемия. После трансфузии эритроцитарной массы уменьшаются время кровотечения и геморрагический синдром.

Еще одним патогенетическим фактором повышенной кровоточивости при ХБП является тромбоцитопения, которая довольно часто развивается у таких пациентов.

Процедура гемодиализа сопровождается применением гепарина. Остаточное его количество может вносить вклад в геморрагические проявления.

Лабораторные данные

Время кровотечения часто удлинено у пациентов с уремией. Степень удлинения может варьировать от незначительной до очень большой. Агрегация тромбоцитов может быть снижена, однако снижение не коррелирует с тяжестью геморрагических проявлений. Другие скрининговые тесты (ПВ, АЧТВ, тромбиновое время, фибриноген) могут быть нормальными или немного удлинены.

У пациентов, особенно у детей с нефротическим синдромом, изменение скрининговых тестов возникает даже без уремии за счет потери ф. IX и ф. XII через почки. Тромботические проявления у пациентов с поражением почек ассоциируются с нефротическим синдромом, гипергомоцистеинемией и гепарин-индуцированной тромбоцитопенией.

Амилоидоз

Около 10% пациентов с системным амилоидозом имеют выраженный геморрагический синдром. Кожный гемосиндром у этих пациентов может быть связан с повышением хрупкости сосудов в связи с отложением амилоида в виде периваскулярного инфильтрата. У этих пациентов имеются также системные дефекты гемостаза. В первую очередь это снижение активности ф. X. Вероятной причиной этого является адсорбция ф. X на амилоиде. Активность ф. X в плазме этих пациентов может составлять 2–4% от нормальных значений.

Как правило, происходит усиление системного фибринолиза за счет снижения α_2 -антиплазмина, который адсорбируется на амилоиде. Описано повышение в плазме активаторов пламиногена и снижение PAI-1.

Лабораторная диагностика включает стандартные тесты скрининга (ПВ, АЧТВ, ТВ, фибриноген, время кровотечения, количество тромбоцитов), помимо этого рекомендуется проводить исследование рептилазного времени, активность фактора X.

Тромботические заболевания

Тромбозы глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии

Тромбозы глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей – распространенные заболевания, они могут приводить к одному из наиболее опасных для жизни больного осложнений – тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) или значительно ухудшать качество жизни при развитии посттромбофлебитического синдрома. ТГВ и ТЭЛА имеют общие патогенетические механизмы, склонность к рецидивированию, общие принципы диагностики и подходы к лечению, поэтому объединяются термином «венозный тромбоэмболизм» (ВТЭ) или «венозные тромбоэмболические осложнения» (ВТЭО). Своевременная диагностика ТЭЛА до настоящего времени представляет значительные трудности в связи с вариабельностью развивающихся клинических синдромов, внезапностью развития и катастрофической быстротой течения заболевания. При своевременно начатой терапии антикоагулянтами летальность не превышает 10%.

Характеристика венозных тромбоэмболических осложнений

Факторы риска венозного тромбоэмболизма и ТЭЛА многообразны: пожилой возраст, длительная обездвиженность (вследствие паралича конечностей, после

травм, в послеоперационном периоде, при частых и продолжительных перелетах в самолетах или поездках в автомобилях), онкологические заболевания, травмы (особенно переломы крупных костей), хирургические вмешательства (оперативные вмешательства на паренхиматозных органах), особенно при гнойно-септических осложнениях и внутрисосудистых инвазивных манипуляциях (подключичный катетер), прием некоторых лекарственных препаратов (менопаузальная гормональная терапия, использование оральных контрацептивов, химиотерапия), хроническая сердечная или дыхательная недостаточность, беременность и послеродовой период (риск венозного тромбоза повышается в 5 раз), тромбофилия, гепарин-индуцированная тромбоцитопения, лечение диуретиками, нефротический синдром, системная красная волчанка, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, варикозное расширение вен нижних конечностей, ожирение, сепсис. Частота тромбофилии у больных с тромбозом глубоких вен составляет, по данным разных авторов, от 8 до 12%.

Патогенез венозного тромбоза определяется триадой Вирхова: 1) повреждение эндотелия; 2) замедление венозного кровотока; 3) повышение свертываемости крови. Тяжесть ТЭЛА в основном определяется двумя факторами: механической обструкцией легочного сосудистого русла и гуморальными нарушениями. Важное значение имеют реакции легких и системы кровообращения на сам тромб и продуцированные им и агрегатами клеток крови биологически активные вещества (БАВ) – серотонин, гистамин, простагландины, эйкозаноиды. Эти БАВ способствуют развитию генерализованного артериолоспазма в малом круге кровообращения и коллапсу сосудов большого круга.

Лабораторные исследования в диагностике венозных тромбозных осложнений

Основным исследованием, которое назначается больному при подозрении на наличие венозных тромбозных осложнений, является тест на D-димеры. Появление в плазме крови D-димеров свидетельствует о том, что внутри сосудистого русла идут процессы фибринообразования. Метод характеризуется высокой чувствительностью (96–99%), но низкой специфичностью (50%). Метод имеет высокую отрицательную диагностическую ценность, то есть позволяет достоверно исключить у пациента ТГВ/ТЭЛА при нормальном содержании D-димеров (см. клинический случай 6.17). Повышенный уровень D-димеров неспецифичен для ВТЭО. Он может быть обусловлен сепсисом, острым инфарктом миокарда, злокачественными новообразованиями, воспалением, оперативными вмешательствами, некоторыми системными заболеваниями, беременностью. Поэтому положительная диагностическая ценность этого метода невысока, в этом случае больному требуется дообследование для подтверждения наличия тромба в легочных сосудах или глубоких венах. Несмотря на это, тест на D-димеры у трети больных позволяет исключить ВТЭО без дальнейшего обследования и определение D-димеров имеет большое значение для сортировки пациентов с подозрением на ТГВ/ТЭЛА. У мно-

Экспресс-анализатор D-димера и кардиомаркеров RAMP 200 System



30 ЛЕТ
АНАЛИТИКА

*Отличное решение для отделений кардиореанимации
и интенсивной терапии, скорой кардиологической
помощи, приемных отделений и лабораторий*

- ▶ Индивидуальный анализ каждого маркера
- ▶ Высокоточные результаты благодаря расчету концентрации по соотношению сигналов флуоресценции связавшейся и несвязавшейся фракции анализата
- ▶ Готовые к использованию контрольные материалы RAMP 3 уровней
- ▶ Минимум подготовительных операций
- ▶ Простая процедура анализа
- ▶ Легкая и компактная система с модульной структурой: на 2, 4 или 6 тестов одновременно
- ▶ Удобный сенсорный дисплей



Основные характеристики

- Иммунохроматография с флуоресцентной детекцией
- Количественный анализ за 15 минут
- Проба - 70 мкл цельной крови (ЭДТА)
- Диапазон чувствительности тестов:

D-димер	100 - 5000 нг/мл FEU
тропонин I	0,03 - 32 нг/мл
миоглобин	2,4 - 400 нг/мл
креатинкиназа MB	0,32 - 80 нг/мл
NT-proBNP	0,018 - 35 нг/мл
- В составе набора тестов все необходимое для анализа (тест-кассеты, пробирки с буфером, пипетка, наконечники)
- Система подключается к ЛИС



Анализатор, расходные и контрольные материалы
зарегистрированы в Росздравнадзоре

ЗАО «АНАЛИТИКА» - в лабораторной диагностике с 1988 года,
авторизованный поставщик продукции Resonance Biomedical Corp. (Канада) в РФ с 2004 года.

ЗАО «АНАЛИТИКА»
Москва
+7 495 737 0363
+7 (800) 200 1089
info@analitika.ru
www.analitika.ru

гих пациентов после перенесенной ВТЭО уровень D-димеров остается повышенным в течение нескольких месяцев, несмотря на антикоагулянтную терапию. Поэтому при рецидивирующих ВТЭО повышение уровня D-димеров не является маркером повторного тромбообразования, хотя нормальные значения показателя позволяют практически со 100% уверенностью исключить рецидив заболевания.

В результате анализа количественных изменений при использовании разных методов было определено отсекающее значение D-димера для диагностики ТГВ и ТЭЛА, которое разделяет лиц, не имеющих тромбоза, и больных с высокой вероятностью тромбоэмболических осложнений. Для разных методов и реагентов это значение составляет 0,25–0,5 мкг/мл и определяется производителем тест-систем и оборудования. Наиболее информативно количественное определение D-димера с указанием точной концентрации в плазме; меньшее клиническое значение имеют полуквантитетные методы (чаще латекс-агглютинация) с представлением результата в определенном диапазоне.

Согласно рекомендации Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), тест на D-димер для исключения ВТЭО должен обладать следующими характеристиками:

- отрицательное предиктивное значение при установленной пороговой величине для исключения ВТЭО $\geq 98\%$;
- чувствительность $\geq 97\%$;
- коэффициент вариации $\leq 7,5\%$.

Исходя из этого, количественные высокочувствительные тесты на D-димер являются более предпочтительными для исключения ВТЭ, что позволяет минимизировать количество ложноотрицательных результатов. В международные рекомендации по диагностике ТГВ/ТЭЛА включены только количественные методы.

Измерение D-димера включено в основные диагностические стратегии при ВТЭО с учетом предварительной оценки клинической вероятности (рис. 6.9) или диагностики рецидива ВТЭО после первого перенесенного эпизода (табл. 6.35).

Таблица 6.35. Шкала DASH для оценки вероятности тромбоза глубоких вен нижних конечностей или ТЭЛА после первого перенесенного эпизода

Признак	Баллы
Повышенный уровень D-димера (определяемый через 1 месяц после прекращения приема антикоагулянтов)	+2
Возраст ≤ 50 лет	+1
Мужской пол	+1
Прием препаратов половых гормонов во время развития тромбоза глубоких вен (у женщин)	-2
Вероятность ТГВ нижних конечностей: низкая высокая	Сумма баллов ≤ 1 > 1

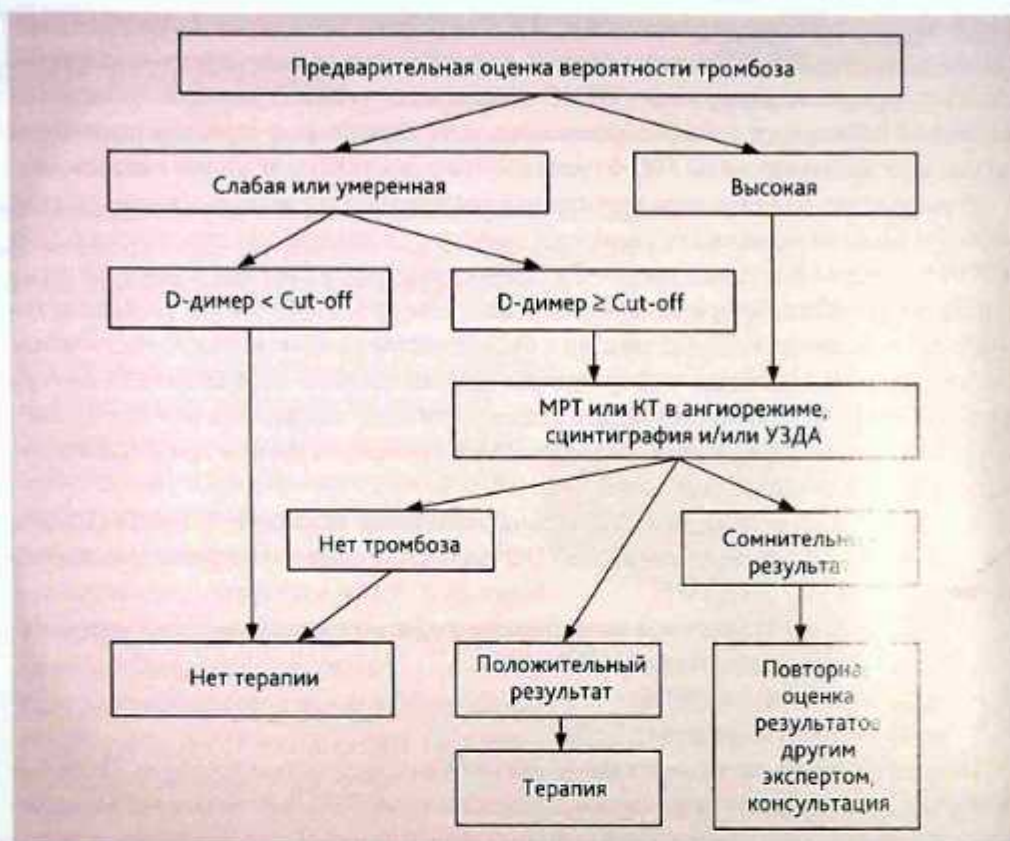


Рис. 6.9. Алгоритм принятия клинических решений при подозрении на ТГВ / ТЭЛА с использованием предварительной оценки вероятности тромбоза и измерения D-димера (cut-off – значение концентрации маркера, которое разделяет здоровых лиц и лиц с высокой вероятностью тромбоза)

По результатам измерения D-димера при использовании его в качестве теста «второй линии» можно с высокой вероятностью исключить тромбоз и не проводить дорогостоящих, затратных по времени и не всегда доступных дополнительных инструментальных исследований и не лечить больного потенциально опасными антикоагулянтами. В том случае, если вероятность тромбоза и/или эмболии велика, измерять уровень D-димера нецелесообразно; необходимо сразу переходить к подтверждающим процедурам и к антикоагулянтной терапии.

Клинический случай 6.17

Больной Т., 27 лет, перенес ТЭЛА 2 года назад. С этого времени получает антикоагулянтную терапию варфарином с удовлетворительным клиническим и антикоагулянтным эффектом. Определенной причины для развития ТЭЛА выявлено не было, за исключением интенсивной физической нагрузки (футбол).

При обследовании: основные тромбофилические мутации (генов фактора V и фактора II) не обнаружены. Гомоцистеин в норме. Данных за антифосфолипидный синдром нет. Протеин S, C, антитромбин в норме.

Больной отменил варфарин месяц назад. Измерен D-димер, значения его в пределах референтных значений.

Заключение: больной перенес непровоцированную ТЭЛА. Срок и характер антикоагулянтной терапии адекватный. Варфарин может быть отменен. Рекомендована неспецифическая профилактика тромбоэмболических осложнений. Медикаментозная терапия не требуется.

Комментарий: не во всех случаях тромбоэмболических осложнений можно выявить изменения, связанные с нарушениями в системе свертывания крови. При отсутствии семейной истории тромбозов обнаружение генетических дефектов не меняет тактики лечения, так как эти нарушения не определяют риски повторных тромбоэмболических событий. Исключение составляет дефицит антитромбина, который встречается редко и тянет за собой цепь семейных тромбозов или смертей в молодом возрасте, связанных с сосудистыми событиями. Значительно более существенным является сам факт перенесенного тромбоза. Длительность терапии в данном случае была чрезмерна. Прием антикоагулянтов влечет за собой не только пользу лечения или вторичной профилактики тромбозов, но и риски кровотечений. Поэтому длительность терапии должна соответствовать характеру тромбоэмболического эпизода: в данном случае не менее 3 месяцев, оптимально – полгода.

Тромбоцитоз

Тромбоцитоз – увеличение содержания тромбоцитов в сыворотке свыше $450 \times 10^9/\text{л}$.

Реактивные тромбоцитозы носят временный характер и вызваны активацией кроветворения. Они могут наблюдаться после спленэктомии в течение 3–6 месяцев, редко более продолжительное время, особенно в тех случаях, когда показанием к удалению селезенки не была тромбоцитопения. Состояние после спленэктомии объясняется удалением основного места разрушения тромбоцитов. Возможно повышение количества тромбоцитов после кровопотери и острого гемолиза, при ревматоидном артрите, туберкулезе, язвенном колите, остеомиелите, иных воспалительных заболеваниях; у детей – после вирусной инфекции. Тромбоцитоз – компонент острофазной реакции.

Опухолевый тромбоцитоз возникает при хронических миелопролиферативных заболеваниях. Наиболее часто тромбоцитоз наблюдается при миелофиброзе, иногда при эритремии, редко и непродолжительное время бывает в начальном периоде хронического миелолейкоза. Увеличение числа тромбоцитов может быть более $1000 \times 10^9/\text{л}$ (гипертромбоцитоз) при остром и хроническом мегариоцитарных лейкозах. Большая масса клеток приводит к микроциркуляторным нарушениям в результате свертывания крови с последующим развитием геморрагического синдрома.

Эссенциальный тромбоцитоз

Эссенциальный тромбоцитоз – миелопролиферативное заболевание, характеризуется повышением уровня тромбоцитов, гиперплазией мегакариоцитов и склонностью к кровотечениям или тромбозам. Эссенциальная тромбоцитемия диагностируется методом исключения, ее следует рассматривать у пациентов, у которых исключены реактивные причины. При подозрении на эссенциальную тромбоцитемию необходимо выполнить общий анализ крови, исследовать мазок периферической крови, провести цитогенетические исследования, включая исследование на филадельфийскую хромосому и мутацию *BCR-ABL*. Исследование костного мозга рекомендуется пациентам с анемией, макроцитозом, лейкопенией или при наличии признаков экстрамедуллярного гемопоэза (увеличение печени и/или селезенки).

В периферическом мазке могут обнаруживаться агрегаты тромбоцитов, гигантские тромбоциты и фрагменты мегакариоцитов. Для костного мозга характерна мегакариоцитарная гиперплазия с обилием высвобождающихся тромбоцитов. Диагноз основывается на количестве тромбоцитов, нормальной эритроцитарной массе или нормальном значении гематокрита в присутствии соответствующих запасов железа, а также на отсутствии филадельфийской хромосомы, транслокации *BCR-ABL*, каплевидных эритроцитов, миелофиброза или других заболеваний, которые могут вызывать тромбоцитоз. Мутация *JAK2V617F* встречается примерно у 50% пациентов, и если она присутствует, помогает отличить эссенциальную тромбоцитемию от других причин тромбоцитемии.

Синдром геморрагической тромбоцитемии

Гипертромбоцитоз, который сопровождается геморрагическим синдромом, носит название «геморрагическая тромбоцитемия». Синдром геморрагической тромбоцитемии (СГТ) развивается при лейкозах миелоидной ткани, чаще при миелофиброзе (сублейкемический миелоз), гипертромбоцитоз может достигать 1–3 млн в 1 мкл крови, редко больше. Отмечается анизоцитоз, гигантские, атипичные и незрелые формы тромбоцитов. Возможен и панцитоз. Клиническая и гемостатическая картина при СГТ разнообразна: заболевание может протекать без кровотечений и тромбозов или только с тромботическими или геморрагическими проявлениями. Наклонность к тромбозу при СГТ обусловлена гипертромбоцитозом, который сопровождается гибелью тромбоцитов в кровотоке, освобождением тромбоцитарных факторов и активацией протромбиназообразования. Повышение активности протромбиназы способствует выпадению фибрина. Одновременно усиливается антикоагулянтная активность и фибринолиз. От взаимодействия этих систем зависит развитие как тромбоза, так и кровоточивости, а также клиническая картина заболевания. Кровоточивость при СГТ проявляется обширными кровоизлияниями и кровотечениями из слизистых оболочек, и по-видимому, имеет различный генез: в результате разрыва затромбированного сосуда, действия ингибиторов тромбина, наличия коагулопатии потребления и чрезмерного неадекватного фибринолиза. При чрезмерном тромбоцитозе (>1,5 млн в 1 мкл

крови) кровотечение, вероятно, является следствием приобретенного дефицита фактора Виллебранда.

Тромбофилии

Тромбофилия – патологическое состояние, характеризующееся нарушением системы свертывания крови, при котором увеличивается риск развития тромбоза. В настоящее время международный консенсус в терминологии обозначает тромбофилию как наследственную или приобретенную склонность к тромбозам относительно высокого риска (увеличение риска не менее чем в 2–3 раза). Термин «наследственная тромбофилия» обычно используется для обозначения ситуаций, при которых генетические мутации меняют количество или функциональную способность белков коагуляционной системы: мутации с потерей функции – дефицит АТ, РС, PS; мутации с увеличением функции – фактора II (G20210A) и фактора V Лейден (G1691A). Наиболее тяжелой приобретенной тромбофилией является антифосфолипидный синдром. Кроме того, к тромбофилии причисляют гипергомоцистенемия с повышением гомоцистемии на 50% и более (смешанный вариант). Все остальные состояния с факторами риска тромбозов, описанные выше, целесообразно называть гиперкоагуляционным синдромом, предтромботическим состоянием или тромботической готовностью. Именно такой подход к терминологии используется и в настоящем издании.

Основные регулирующие гены представлены на рис. 6.10. Нарушения только некоторых из них рассматриваются как наследственная тромбофилия. Доказательная база для остальных слабая, увеличение риска тромбозов незначительное, и клиническое значение их выявления окончательно не определено.

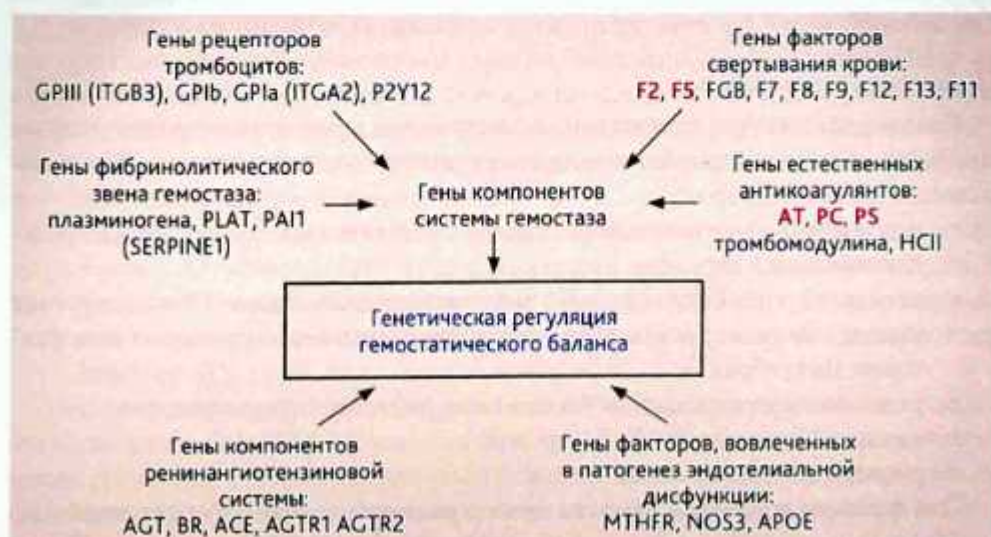


Рис. 6.10. Основные генетические позиции, регулирующие гемостатический баланс. Гены, формирующие наследственную тромбофилию, выделены красным цветом

Общее представление

Проблема патологического тромбообразования – одна из важнейших терапевтических проблем. Тромбообразование в артериальной и венозной системах имеет специфику.

Артериальные тромбы, образуясь в условиях высокой скорости кровотока, состоят преимущественно из тромбоцитов, соединенных фибриновыми мостиками – белые тромбы. Артериальные тромбы преимущественно пристеночные. Важнейшими факторами патогенеза формирования артериального тромба являются врожденная или приобретенная аномалия сосудистой стенки и патологическая активация тромбоцитов. Наиболее частая аномалия – атеросклероз. Другие состояния – это врожденные нарушения развития сосудов, ангиоматозные образования, инфекционное поражение эндотелия, ятрогенные нарушения. Закупорка просвета артериального сосуда может наступить при увеличении тромба на фоне нарастания патологического процесса (атеросклероз) или при эмболии нижележащих более мелких сосудов оторвавшимися элементами тромба.

Венозные и внутрисердечные тромбы образуются в условиях относительно медленного кровотока, низкого напряжения сдвига и патологической аритмичности сердечного ритма при фибрилляции/трепетании предсердий; включают в себя значительное количество эритроцитов и большое количество фибрина. Венозные тромбы часто полностью obturirуют просвет сосуда. Основной механизм образования венозного тромба связан с повышением свертываемости крови и стазом. Если тромбоз возникает в магистральной вене, нарушение венозного оттока может привести к венозному полнокровию, повышению внутриорганного давления, снижению притока крови, ишемии и дистрофическим изменениям органа. При сохраняющемся кровотоке по тромбированной вене возможен отрыв части тромба и эмболия.

Патогенез тромбозов

Как правило, гиперкоагуляционный синдром или тромботическая готовность – комбинированное состояние, возникающее вследствие действия нескольких патогенетических факторов:

- повреждение эндотелиальных клеток с обнажением тромбогенных субэндотелиальных структур;
- активация тромбоцитов циркулирующими агонистами либо вследствие взаимодействия тромбоцитов с субэндотелиальными структурами или фактором Виллебранда;
- резистентность к антикоагулянтам или дефицит антикоагулянтов;
- снижение активности фибринолиза;
- реологические нарушения и стаз.

Эти факторы возникают на фоне целого ряда патологических состояний.

Наследственные факторы риска тромбообразования (генетические дефекты выявляются примерно у 20% пациентов с ВТЭО):

- мутация гена фактора V (фактор V Лейден);

- дефицит антитромбина;
- дефицит протеина С;
- дефицит протеина S;
- мутация гена протромбина;
- гипергомоцистеинемия (у детей, как правило, носит наследственный характер).

Приобретенные факторы патологического тромбообразования:

- возраст;
- пороки сердца и сосудов;
- атеросклероз;
- катетеризация вен, особенно длительное нахождение катетера в вене;
- повышение вязкости крови (полицитемия, потеря жидкости);
- длительная иммобилизация;
- инфекционно-воспалительный процесс;
- аутоиммунные заболевания (волчаночный антикоагулянт, антифосфолипидный синдром, сахарный диабет);
- онкологические заболевания;
- химиотерапия (L-аспарагиназа, преднизолон);
- заболевания печени;
- препараты эстроген-содержащих препаратов.

Дефицит антитромбина

Наследование дефицита антитромбина – аутосомно-доминантное заболевание с неполной пенетрантностью. Этот дефект является наиболее тяжелым среди наследственных тромбофилий. Риск первого эпизода тромбоза при дефиците АТ увеличен в 10–30 раз с сохранением риска рецидивов в 2,7 раза. Данный вид наследственной тромбофилии был первым, описанным в 1965 году Egberg на основании анализа истории одной семьи, и положил основу для изучения этого направления среди причин развития тромбозов. Выделяют два типа дефицита АТ:

- тип I – количественный дефект, приводящий к пропорциональному снижению активности и антигена АТ;
- тип II – качественный тип со снижением активности при нормальном антигене АТ; имеет место функциональный дефицит АТ, возникающий в результате разных мутаций; при 2-м типе дефицита АТ требуются дополнительные исследования, в частности, определение гепарин-связывающих свойств АТ.

Гомозиготных носителей гена дефицита АТ не описано, предположительно эта мутация не совместима с жизнью, дети погибают внутриутробно или вскоре после рождения. Гетерозиготное носительство встречается в 0,02% здоровых лиц в популяции, у 1% лиц с первым в семье случаем венозного тромбоза и в 4% семей с наследственной тромбофилией.

Вторичное снижение АТ может иметь место при лечении нефракционированным гепарином, реже низкомолекулярными гепаринами, заболеваниях печени,

нефротическом синдроме, лечении L-аспарагиназой; потребление – при синдроме ДВС. Уменьшение активности АТ на 25–30% сопровождается развитием гепаринорезистентности, что может вызвать появление рикошетных тромбозов. На неэффективность антикоагулянтного действия гепарина указывает отсутствующее удлинение АЧТВ или персистенция и даже повышение маркеров активного фибринообразования. Если же имеет место дефицит или врожденная аномалия АТ, то антикоагулянтный эффект гепарина будет изначально ослаблен. Во всех этих случаях патологии и лекарственных воздействиях необходим контроль за активностью АТ в плазме. При значительном дефиците АТ и высоком риске тромбозов показано введение больным концентратов АТ.

АТ иногда рассматривается как отрицательный реактант острой фазы воспаления, уровень его снижается при инфекциях. Активность АТ, но не его концентрация, существенно уменьшается при инсулин-зависимом сахарном диабете 1-го типа, причем снижение активности АТ коррелирует с уровнем гликирования плазменных белков.

Сроки начала первых проявлений и тяжесть течения заболевания во многом зависят от остаточной активности АТ и сочетания этого дефекта с другими факторами тромбофилии. Тромбозы при дефиците АТ локализуются как в венозной, так и в артериальной системе. Клинические проявления наследственного дефицита антитромбина:

- тромбозы глубоких вен ног, илеофemorальные тромбозы (клинический случай 6.18);
- привычное невынашивание беременности;
- антенатальная гибель плода;
- тромбофилические осложнения после приема оральных контрацептивов.

Лабораторная диагностика: определение активности АТ хромогенным методом и антигена АТ.

Клинический случай 6.18

Больная Р., 32 года, обратилась к гематологу по поводу рецидивирующего илеофemorального тромбоза слева. Получает терапию варфарином 5 мг/сут, МНО 2,45–2,77. Для проведения диагностического исследования и исключения интерферирующего действия варфарины пациентка переведена на низкомолекулярный гепарин (НМГ) сроком 5 дней с последующим лабораторным тестированием.

Коагулограмма пациентки Р.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	30,3	25–40 с
Протромбиновая активность по Квику	101	>70%

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
МНО	1,01	0,9–1,2, при терапии варфарин-ом индивидуальные уровни
Тромбиновое время	20,2	16–25 с
Концентрация фибриногена	3,6	2–4 г/л
Фактор VIII, активность	72	50–160%
Антитромбин, активность	30	83–123%
D-димер	0,08	0–0,24 мкг/мл
Волчаночный антикоагулянт	Не обнаружен	НО < 1,2
аФА-скрининг Ig G	6,1	0–10 Ед/мл
аФА-скрининг Ig M	13,3	0–10 Ед/мл
ДНК-диагностика	Гетерозигота по ITGA2, ф.VII, ф.XIII, MTHFR, гомозигота по MCP	Нормальный тип
Концентрация гомоцистеина	32,7	4,3–11,1 мкмоль/л

Заключение. Лабораторные признаки комбинированной тромбофилии, связанной с дефицитом активности антитромбина и гипергомоцистеинемией. Данных за гиперкоагуляционное состояние на фоне проводимой терапии не получено. Носительство полиморфизма генов ITGA2, ф.VII, ф.XIII, MTHFR, MCP клинически не значимо. Концентрация антител, исследованных как аФА-скрининг IgM, требует уточнения с исследованием отдельных классов антифосфолипидных антител и антител к $\beta 2$ -ГП1, волчаночного антикоагулянта. Настоящий результат находится в «серой» зоне и не может служить основанием для клинического заключения.

Предполагаемая тактика: коррекция уровня гомоцистеина витаминами группы В, смена антикоагулянта на прямые ингибиторы факторов свертывания, так как варфарин, не влияя напрямую на антитромбин, снижает активность протеинов С и S, тем самым снижая общий потенциал антитромботической защиты.

Дефицит протеина С

Наследование дефицита протеина С осуществляется по аутосомно-рецессивному типу. Одна и та же мутация гена РС может встречаться у лиц с тромботическими эпизодами из семей с наследственной тромбофилией и у родственников, не имеющих клинических проявлений, но являющихся гомозиготными носителями мутации. Гетерозиготное носительство гена дефицита РС повышает риск венозного тромбоза в 7 раз. Выделяют 2 типа дефицита РС:

- количественный дефицит с примерно 50% снижением антигена и активности РС;

- качественный дефицит, при котором на фоне сниженной активности антиген РС нормальный.

Значение дефицита РС как изолированного дефекта в патологическом тромбообразовании дискутируется. У детей тромбозы развиваются при сочетании с другими дефектами. Сочетания с дефектом ф. V Лейден имеют до 20% семей с наследственной тромбофилией и дефицитом РС. Дефицит РС встречается как при артериальных, так и при венозных тромбозах. Тромботические проявления у пациентов с изолированным гетерозиготным дефицитом РС, как правило, начинаются после 15 лет. Для пациентов с глубоким дефицитом РС при гомозиготном носительстве характерны тяжелые ранние тромботические проявления в виде неонатальной фульминантной пурпуры или синдрома ДВС в первые дни жизни при активности РС $\leq 1\%$. Это состояние практически несовместимо с жизнью. Если активность РС составляет 5–25%, то рецидивирующие эпизоды тромбоэмболии проявляются позже.

Приобретенный дефицит протеина С (а позднее и протеина S) развивается при генерализованном диссеминированном внутрисосудистом свертывании, при интенсивном лечении варфарином, во время беременности, при приеме оральных контрацептивов, при заболеваниях печени, сахарном диабете, послеоперационных осложнениях, септицемии и воспалительных синдромах. Транзиторное снижение может быть у новорожденных (уровень на 20–35% ниже, чем у взрослых).

Лабораторная диагностика: определение активности и антигена протеина С.

Клинический случай 6.19

Больная, 34 года, обратилась в гематологический центр 10 лет назад по поводу привычного невынашивания беременности и возникновения на ее фоне тромбозов вен нижних конечностей. Из анамнеза заболевания установлено, что во время первой беременности на сроке 12–14 недель развился острый илеофemorальный флeботромбоз слева, по поводу которого проведена тромбэктомия, назначено лечение гепарином, непрямыми антикоагулянтами. На сроке 16–17 недель возникли схваткообразные боли внизу живота с самопроизвольным выкидышем. Две последующие беременности закончились выкидышами при сроке 6–8 недель. Во время четвертой беременности развился тромбоз глубоких вен бедра и голени справа, осложнившийся ТЭЛА. Беременность прервалась на сроке 12–13 недель после проведения пункции нижней полой вены. При исследовании гемостаза обнаружены: АЧТВ – 35 с (контроль 39 с), ПВ – 16 с (норма 16 с), тромбиновое время – 15 с (контроль 15 с), фибриноген – 3,5 г/л. При повторных исследованиях отмечались: замедление XII-зависимого фибринолиза – от 12 до 20 минут (контроль 6 минут), высокий уровень спонтанной агрегации тромбоцитов – от 30 до 38% (контроль до 20%). Активность антитромбина – 120%, протеина S – 105%, активность протеина С при повторном определении клоттинговым методом составила от 30 до 43%, при использовании хромогенных субстратов активность протеина С составила 30%. После проведенного обследования у больной

вновь наступила беременность, в течение всего срока которой она получала антитромботическую терапию надропарином. Беременность закончилась в 39–40 недель родами здорового ребенка.

Дефицит протеина S

Наследование дефекта протеина S происходит по аутосомно-доминантному пути с неполной пенетрантностью. PS в плазме присутствует в двух видах – свободный, примерно 40% от общего, и связанный с С4-связывающим протеином, 60% соответственно. Свободный PS является активным антикоагулянтом, его уровень коррелирует с клиническими симптомами тромбоза. Выделяют три типа дефицита PS:

- I тип – количественное снижение PS (пропорциональное снижение активности и антигена PS);
- II тип – качественный дефицит (сниженная активность при нормальном или непропорционально сниженном антигене);
- III тип – снижение свободного PS при нормальном общем.

Частота дефицита PS у больных с венозными тромбозами составляет 1–2%, в семьях с наследственной тромбофилией – 6%. Тромбозы у пациентов с изолированным гетерозиготным носительством, как правило, впервые проявляются у взрослых. Однако сочетание дефицита PS с другими факторами, предрасполагающими к тромбозам, приводит к более ранним эпизодам патологического тромбообразования. Гомозиготное носительство встречается чрезвычайно редко с проявлениями, аналогичными проявлениям при гомозиготном носительстве дефицита PC. Гетерозиготное носительство дефицита PS увеличивает риск тромбоза в 1,5; 6; 10 раз. При этом основную роль играет уровень свободного PS.

Лабораторная диагностика: исследование активности свободного PS, антигена PS.

Мутация гена фактора V (ф. V Leiden, Лейден)

Мутация в гене *F5* с заменой в положении 1691 аденина на гуанин приводит к замещению в молекуле ф. V в положении 506-й аминокислоты аргинина на глутамин G1691A (Arg506Gln). Это один из трех участков ф. V, в которых он расщепляется активированным протеином C (APC). Скорость инактивации фактора V Лейден протеином C в 10 раз медленнее, чем у нормального фактора V. Снижение скорости деградации активированного фактора V приводит к повышению образования тромбина, что проявляется гиперкоагуляционным состоянием и при определенных условиях может способствовать развитию тромбоза. Мутация в гене *F5* (локализация гена на хромосоме – 1q24.2) наследуется по аутосомно-доминантному типу, поэтому патологический эффект реализуется даже при наличии одной копии поврежденного гена. Фактор V Лейден – наиболее распространенный в европейской популяции протромботический дефект. Частота гетерозиготного наследования у европейцев колеблется от 2 до 7%. Гомозиготы

по этой мутации встречаются примерно в 0,1%. В отличие от европейской в африканской, американской, австралийской (аборигены) и азиатской популяции эта мутация практически отсутствует. Гетерозиготное носительство мутации гена F5 увеличивает риск развития тромбоза в 4–5 раз, а гомозиготы по этой мутации имеют риск развития первого тромбоза в 80 раз больше, чем лица без этой мутации. Тромботические проявления у лиц с ф.V Лейден нередко впервые возникают в пубертатном возрасте, но могут и не проявиться вовсе в течение жизни. Тромбозы, ассоциированные с ф.V Лейден, в первую очередь затрагивают венозную систему. Наиболее характерная локализация тромбозов, ассоциированных с этой мутацией, – поверхностные и глубокие вены конечностей, тромбозы церебральных вен.

Риск тромбозов повышается на фоне дополнительного триггерного фактора (например, минимальная травма или прием эстроген-содержащих препаратов, беременность). Фактор V Лейден часто обнаруживается среди женщин с хроническим невынашиванием беременности. Спонтанные аборт у них возникают на поздних сроках и связаны с характерным для этих сроков повышением С4-бР и функциональным гипофибринолизом, что в сочетании с резистентностью к активированному протеину С (APCR) приводит к тромбозу сосудов плаценты. Мутация Лейден может быть выгодной с эволюционной точки зрения. Это объясняется тем, что у носительниц этой мутации имеется такое преимущество, как сниженный риск кровотечений при родах, поэтому высокая распространенность потенциально вредной мутации среди населения в целом может быть результатом эволюционного отбора.

Своевременная диагностика генетической предрасположенности к повышенной свертываемости крови и ранние профилактические и/или лечебные мероприятия помогают избежать серьезных последствий для сердечно-сосудистой системы, профилактика тромбозмболических осложнений важна для безопасного течения беременности при наличии наследственной тромбофилии.

Лабораторная диагностика: определение повышения резистентности к протеину С, молекулярный анализ гена ф.V. Мутация Лейден адекватно выявляется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Показаниями для назначения выявления мутации G1691A гена ф.V (Arg506Gln) являются тромбозмболии в молодом возрасте, повторяющиеся тромбозмболии, преэклампсии, осложнения во время беременности, хроническое невынашивание и тромбозмболические осложнения беременности, ишемический инсульт. Выявление мутации имеет прогностическое значение при приеме оральных контрацептивов и гормональной заместительной терапии.

Клинический случай 6.20

Пациент Л., 15 лет. Заболел остро, появились боли в поясничной области, дизурические проявления. Предъявлял жалобы на частые головные боли и подъем артериального давления.

Клиническое обследование. Проведена аортография, селективная ангиография культи правой почечной артерии (правая почка значительно уменьшена в размерах). Правая почечная артерия окклюзирована в средней трети, уменьшена в диаметре. На экскреторной урографии – отсутствие функции правой почки. На ангиосцинтиграфии почек выявлен двусторонний нефроптоз. При эхокардиоскопии выявлено пролабирование митрального клапана II степени и аневризматическое выпячивание в области овального окна.

При исследовании общего анализа крови выявлена умеренная полиглобулия (гемоглобин – 159 г/л), в анализе мочи – протеинурия. При исследовании системы гемостаза обнаружена резистентность фактора Va к активированному протейну C (АЧТВ не удлинялось при добавлении APC, норма – удлинение > 2 раз). Спонтанная агрегация тромбоцитов – 22% (контроль до 20%), АДФ-агрегация – 86% (контроль 60–71%), адреналин-агрегация – 94% (контроль 69–75%), коллаген-агрегация – 76% (контроль 60–70%). Волчаночный антикоагулянт не обнаружен. При генетическом анализе – гетерозиготное носительство фактора V Лейден. Другие показатели гемостаза нарушены не были.

Таким образом, у больного выявлено: посттромботическая окклюзия правой почечной артерии; вторично сморщенная почка; вазоренальная гипертония, наследственная тромбофилия (ф. V Лейден, гетерозигота) с фенотипическим проявлением в виде резистентности фактора Va к протейну C тяжелой формы, гиперагрегационный синдром, вторичная ренальная полиглобулия. В данном случае имеет место нетипичное клиническое проявление носительства Лейденской мутации в виде артериального тромбоза.

Выявленные изменения позволили составить план профилактики рецидивов тромбозов в течение жизни. Препаратами первой линии при артериальных тромбозах являются антиагреганты. В данном случае, возможно, полезным будет проведение дополнительных исследований маркеров активации свертывания, вплоть до теста генерации тромбина, с последующим рассмотрением вопроса о комбинированной терапии – антиагреганты + антикоагулянты.

Гипергомоцистеинемия

Гомоцистеин – аминокислота, производное метионина. В плазме гомоцистеин окисляется в дисульфиды и смешанные дисульфиды и находится как в свободной форме, так и связанным с белком (общий гомоцистеин). Нормальная концентрация в плазме составляет 5–16 мкмоль/л. Внутри клеток имеет два пути метаболизма:

1. Реметилирование в метионин с участием ферментов метионинсинтазы, кофактором которой является кобаламин (витамин B₁₂), метилентетрагидрофолатредуктазы и бетанинметионинметилтрансферазы. При мутации гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) наблюдается стойкая гипергомоцистеинемия, высок риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и склонность к тромбообразованию.

2. Транссульфирование в цистеин с участием цистатионинсинтазы, кофактором которой является пиридоксин (одна из форм витамина B_6). При недостаточности фермента цистатионинсинтазы происходит нарушение превращения гомоцистеина в цистеин. У таких больных при выраженной гомоцистеинемии и гомоцистеинурии развиваются тромботические нарушения с тромбозами в верхнем сагиттальном синусе, нижней полой вене, портальной вене, а также окклюзия почечных, мозговых и коронарных артерий. Морфологические изменения сосудистой стенки сходны с атеросклеротическими.

У взрослых гипергомоцистеинемия может быть как врожденным, так и приобретенным дефектом. У детей, как правило, является следствием дефицита ферментов, метаболизирующих гомоцистеин. Наиболее тяжелые формы связаны с дефектом цистатионинсинтазы. Частота ее гомозиготного носительства среди населения составляет от 1 : 200 000 до 1 : 335 000, гетерозиготное носительство встречается в 0,3–1,4%. Полиморфизм метилентетрагидрофолатредуктазы широко распространен в европейской популяции. Гетерозиготное носительство, по некоторым данным, встречается у 60% лиц европеоидной расы. Гомозиготный полиморфизм, по разным данным, у 5–15%. Гораздо реже встречаются дефекты других ферментов, метаболизирующих гомоцистеин.

Умеренное повышение гомоцистеина в крови выявляется примерно в 10% случаев всех венозных тромбозов. Расчетное повышение риска тромбообразования составляет 2,5 раза. Тяжелая гипергомоцистеинемия (с уровнем гомоцистеина более 100 мкмоль/л) ассоциируется с рецидивирующими артериальными и венозными тромбозами, появляющимися с детства.

Приобретенная гипергомоцистеинемия связана с недостаточным поступлением с пищей кобаламина, фолиевой кислоты или пиридоксина, применением лекарственных препаратов, нарушающих функции ферментов или обмен витаминов. В развитии гипергомоцистеинемии большое значение отводится пищевым факторам. Так, недостаточное потребление фолиевой кислоты, витаминов B_6 и B_{12} может привести к повышению его уровня. Гипергомоцистеинемия наблюдается при разной патологии – анемиях, онкологических заболеваниях, хронической почечной недостаточности, гипотиреозе, псориазе, является независимым фактором риска атеросклероза, деменции, болезни Альцгеймера. Повышение гомоцистеина может возникнуть при приеме лекарственных препаратов, снижающих в крови концентрацию витаминов группы В – цитостатиков, противосудорожных средств, оральных контрацептивов. На уровень гомоцистеина оказывает влияние возраст (повышение у пожилых и стариков), пол (более высокий уровень гомоцистеина у мужчин), гормональные сдвиги (в постменопаузальном периоде у женщин уровень гомоцистеина выше), беременность (снижение уровня по мере развития).

Для гипергомоцистеинемии характерно возникновение как артериальных, так и венозных тромбозов, патогенез которых связан с нарушением антикоагулянтных свойств эндотелия за счет десквамации эндотелиальных клеток, снижения

экспрессии тромбомодулина и гепарансульфатов, ПГ₂, ингибирования тканевого активатора плазминогена. Кроме того, вторичные производные гомоцистеина (например, гомоцистеин-тиолактон), уровень которых в крови возрастает при гипергомоцистеинемии, вызывают активацию тромбоцитов и выделение ТХА₂. Активно обсуждается повреждающий механизм оксидативного стресса, возникающего при гипергомоцистеинемии и приводящего к неферментативным окислительно-восстановительным реакциям. В процессе окисления сульфгидрильных групп гомоцистеина и гомоцистеин-тиолактона образуются перекисные анионы (O_2^- , OH^-) и H_2O_2 , которые инициируют перекисное окисление липидов. Это сопровождается повреждением мембран эндотелиальных клеток и образованием окисленных липопротеидов. Перекисные радикалы могут переводить вазодилатор NO в форму пероксинитритов $OONO^-$, не обладающих вазодилаторными свойствами.

Лабораторная диагностика: исследование содержания гомоцистеина в плазме имеет первостепенное значение; молекулярный анализ генов, участвующих в метаболизме гомоцистеина, в том числе метилентетрагидрофолатредуктазы, рассматривается как дополнительная информация и не играет существенной роли без фенотипических (биохимических) проявлений.

Клинический случай 6.21

Больной 3., 20 лет. Заболел остро. На фоне удовлетворительного самочувствия после незначительной физической нагрузки появились боли в левой голени, через сутки – отек голени, через 4 дня отек распространился на бедро, боли усилились.

В семейном анамнезе: у бабушки по отцу – тромбозы глубоких вен нижних конечностей, у прадедушки – острый инфаркт миокарда, у дедушки – ишемический инсульт, у отца – тромбоз глубоких вен нижних конечностей.

Обследование: на ретроградной илеокаваграфии определялся тромбоз илеофemorального сегмента слева с пристеночным тромбозом нижней полой вены. Дальнейшее обследование выявило правосторонний нефроптоз II ст., системную ангиодисплазию – увеличенный диаметр вен, дисплазия органных протоков (печени, поджелудочной железы). Была начата антикоагулянтная терапия.

При исследовании системы гемостаза был выявлен гиперагрегационный синдром (спонтанная агрегация тромбоцитов составила 32%, при контрольном показателе до 20%, стимулированная агрегация на АДФ – 90%, адреналин – 94%, коллаген – 92%). Дополнительно обнаружен повышенный уровень гомоцистеина в сыворотке – 72,6 мкмоль/л.

Таким образом, у больного выявлена тяжелая гипергомоцистеинемия с гиперагрегационным синдромом. Из анамнеза можно сделать вывод о семейном (наследственном) характере тромбофилии. Назначена специфическая антикоагулянтная терапия, даны рекомендации по долгосрочной профилактике тромбозов путем снижения уровня гомоцистеина, назначены витамины группы В и фолиевая кислота. До начала приема витаминов целесообразно исследование

витамина B_{12} и фолатов в крови. Дополнительной коррекции агрегации тромбоцитов не требуется.

Мутация протромбина 20210А

Точечная мутация (G→A) в позиции 20210 3' нетранслируемого региона гена протромбина приводит к повышению уровня протромбина в крови и ассоциируется с повышенным риском тромбообразования. Каких-либо других изменений со стороны протромбина при этой мутации не выявлено. Частота гетерозиготного носительства этой мутации в европейской популяции составляет 2–3%, гомозиготы встречаются крайне редко, статистических данных по гомозиготному носительству нет. У лиц с эпизодами венозных тромбозов, особенно тромбофлебитов нижних конечностей, протромбин 20210А встречается в 6–10% случаев. От 4 до 8% пациентов с впервые выявленным тромбозом глубоких вен имеют эту мутацию. Гетерозиготное носительство по расчетам повышает риск венозного тромбообразования в 2–3 раза. Как правило, первые эпизоды тромбозов возникают у взрослых и связаны с присоединением возрастных факторов риска — курением молодых женщин, ожирением, гипертонией, сахарным диабетом. При приеме оральных контрацептивов риск тромбозов повышается более чем в три раза.

Лабораторная диагностика: молекулярный анализ гена протромбина — полиморфизм G20210А. Пациенты, являющиеся одновременно носителями мутации G20210А гена протромбина и мутации Лейден, наиболее подвержены риску заболевания. Риск тромбозов в этом случае увеличивается до 5-кратного, возрастает риск рецидивов в 2,7 раза.

Генетическая диагностика тромбофилий и тромбозов

Разработка стандартных протоколов молекулярных исследований и автоматизация используемых методов позволили создать законченный комплекс диагностических подходов и превратить геномный анализ в рутинную процедуру в клинических лабораториях. Быстрое развитие исследований в области расшифровки генома человека и определение ДНК-последовательности генов предоставило возможность диагностики разных наследственных заболеваний, в том числе генетической диагностики тромбофилий. В настоящее время для выявления наследственных заболеваний используются два основных подхода — прямая и косвенная ДНК-диагностика. Прямая ДНК-диагностика представляет собой исследование первичной структуры поврежденного гена и выделение мутаций, ведущих к заболеванию. Для детекции молекулярных повреждений в генах, обуславливающих наследственные болезни, используется стандартный арсенал методов молекулярной биологии. В зависимости от характера и типов мутаций, частоты их встречаемости при наследственных заболеваниях те или иные методы являются наиболее предпочтительными. В случаях, когда биохимический дефект точно не известен, биохимическая диагностика затруднена, недостаточно достоверна или требует инвазивных исследований, ДНК-диагностика — единственный и незаменимый подход для точной постановки диагноза.

Для диагностики патологических состояний в тех случаях, когда биохимический дефект точно известен и легко и достоверно определяется с использованием маркеров патологии, ДНК-методы не являются приоритетными в диагностике.

При генетической диагностике тромбофилий часто используются термины «мутация» и «полиморфизм» генов. **Мутация** – это изменение структуры гена, расположенного в хромосоме, что неизбежно приводит к изменению структуры и функции метаболита, который определяется этим геном. Мутации, определяющие наследственную тромбофилию, встречаются редко – в гомозиготном состоянии до 1% популяции, но существенно повышают риск развития тромбозов. Однако в кариотипе каждая хромосома дублируется, поэтому и геномный участок хромосом дублируется, формируются доминантные и рецессивные мутации. Проявление (пенетрация) каждого гена зависит от геномного окружения, условий функционирования, нагрузки на геном. Под **полиморфизмом** понимают широко распространенное изменение в структуре генома, которое приводит лишь к появлению белков с измененными физико-химическими свойствами и не приводит к существенному и обязательному повышению риска тромбозов. Такие изменения проявляют себя при воздействии на организм разных факторов внешней среды или при изменении функционального состояния организма человека. И только в таких ситуациях функционирование белков со структурными особенностями может либо способствовать ускорению развития заболевания, либо, напротив, тормозить формирование патологических процессов.

Строгие генетические факторы риска тромбозов

К тромбофилиям с детерминированной зависимостью от генетических факторов относятся *дефициты естественных антикоагулянтов – антитромбина, протеина С и S*. Частота встречаемости этих нарушений в популяции очень мала. Выявлено большое количество генетических нарушений, которые приводят к функциональному состоянию дефицита. Спектр мутаций, вызывающих дефицит антитромбина, протеина С или протеина S, очень широк, только для протеина С их найдено более 160. Поскольку значимые мутации встречаются среди здорового населения очень редко, а количество возможных вариантов велико, генетический анализ в данном случае нецелесообразен. Ориентироваться нужно на функциональное состояние антикоагулянтной системы – клоттинговое, иммуноферментное или хромогенное определение активности антитромбина, протеина С и свободного протеина S.

Умеренные генетические факторы риска тромбозов

Умеренные генетические факторы риска не приводят в обязательном порядке к развитию тромбозов. Носитель такого дефекта в гетерозиготном состоянии может прожить жизнь, не подозревая о его наличии. Более того, данные дефекты не увеличивают риск развития рецидива. Значительно более важным является сам факт перенесенного тромбоза, что должно обязательно быть выяснено при сборе анамнеза и учтено при назначении гормональной терапии, проведении операции или полученной травме. Специфическая профилактика в этих случаях должна

быть выполнена с особой тщательностью, а вопрос о назначении эстроген-содержащих препаратов решаться на междисциплинарном консилиуме при наличии строгих показаний. Профилактика носителям мутаций (случайная находка у родственников) не показана, но может рассматриваться в случае строгой семейной истории тромбозов в качестве существенного дополнительного фактора риска. Для женщин важно учитывать наличие умеренных генетических факторов риска при планировании беременности и выборе способа контрацепции.

Мутация гена протромбина G20210A

Данная мутация относится к генетическим факторам умеренного риска, встречается реже, чем мутация гена фактора V, не ведет к существенному увеличению риска развития повторных эпизодов, но вносит значительный вклад при сочетании с другими наследственными дефектами. У пациентов – носителей данного полиморфизма повышен риск развития тромбозов после хирургических вмешательств. Прием оральных контрацептивов у данной группы лиц также увеличивает риск тромбозов.

Мутация гена фактора V – фактор V Лейден

Мутация в гене фактора V G1691A (Arg506Gln) («мутация Лейден») вносит вклад в формирование наследственной предрасположенности к тромбозам за счет развития резистентности к активированному протеину C.

Группы крови

Лица с не-0(I) группой крови имеют риск тромбоза в 2–4 раза выше, чем обладатели группы крови 0(I). При этом риск увеличен для всех не-00 генотипов: A1A1, A1A2, A101/A102, BB/B01/B02, A1B/A2B, за исключением A201/A202/A2A2. Учитывая распространенность в популяции людей с не-0(I) группой крови и риск венозных тромбозов и осложнений у этой части населения, групповая принадлежность выходит на одно из первых мест среди генетических факторов риска венозных тромбозов. Механизм этого феномена не вполне ясен. Основная причина, вероятно, лежит в снижении активности комплекса фактор VIII/vWF у лиц с группой крови 0(I) (примерно на 20%), которые клинически имеют склонность к кровоточивости и более частому развитию болезни Виллебранда. Наибольшая активность vWF и уровень антигена выявляются у лиц с группой крови AB(IV) с соответствующей предрасположенностью к тромбозам.

Слабые генетические факторы риска тромбозов, смешанные варианты и гены предрасположенности

Слабые генетические факторы риска, которые входят в панель определения предрасположенности к формированию патологии гемостаза, относятся не к классическому понятию мутаций, а к генетическому полиморфизму. Последний характеризуется широкой распространенностью в популяции и малой клинической значимостью. Несмотря на то что в крупных исследованиях с включением

больших групп пациентов и здоровых лиц найдена ассоциация таких нарушений с артериальными и венозными тромбозами или кровоточивостью, у отдельного индивидуума эта ассоциация может не проявляться. Существенно большее значение имеет наличие клинических и анамнестических данных и так называемых триггерных факторов – операция, травма, обезвоживание, иммобилизация, прием эстрогенов. Ниже рассмотрим только некоторые из указанных генетических факторов. Перечень необходимых для исследования генетических полиморфизмов до настоящего времени не определен, варьирует в разных лабораториях, а мнения экспертов относительно их клинической значимости расходятся.

Ген *FGB*

Ген *FGB* кодирует β -цепь фибриногена. Концентрация фибриногена является фактором риска сердечно-сосудистых событий. Наиболее изучен промоторный полиморфизм –455G/A гена β -фибриногена, который влияет на уровень белка в крови. Самая высокая концентрация фибриногена наблюдается у лиц с AA генотипом, наименьшая – у нормальных гомозигот GG, гетерозиготы имеют промежуточный уровень. В то же время наличие самого –455G/A полиморфизма на риск развития сосудистых заболеваний отмечают не все исследователи. Частота встречаемости A-аллеля гена β -фибриногена у пациентов с инфарктом миокарда и в контрольной группе – 22,3 и 21,7% примерно одинакова. Аналогичные результаты получены при изучении –455G/A полиморфизма гена β -фибриногена у лиц с цереброваскулярными заболеваниями, но пациенты, у которых в патологический процесс вовлечены крупные сосуды головного мозга, чаще оказывались AA-гомозиготами.

Ген гликопротеина *GP1a*

Ген гликопротеина *GP1a* кодирует синтез альфа-2-субъединицы интегрина-вых рецепторов тромбоцитов. Аллельный вариант 807C/T вызывает изменение первичной структуры субъединицы и свойств рецепторов. При гетерозиготном носительстве отмечается увеличение скорости адгезии тромбоцитов к коллагену I типа, что может приводить к повышенному риску инфаркта миокарда и других сердечно-сосудистых заболеваний. Аллельный вариант 807C/T связывают со случаями резистентности к аспирину. Помимо этого, при гомозиготном генотипе 807T/T значительно увеличивается количество рецепторов на поверхности тромбоцитов. В совокупности при гомозиготном варианте данного полиморфизма значительно повышен риск сердечно-сосудистых событий в возрасте до 50 лет, даже по сравнению с гетерозиготным вариантом.

Ген гликопротеина *GP1Ia*

Ген гликопротеина *GP1Ia* (интегрин $\alpha IIb\beta 3$) кодирует синтез β -3 цепи интегрина-вого комплекса *GP1Ib-IIIa*, участвующего в межклеточных взаимодействиях (адгезии). Точечная замена C/T в 1565-й позиции 2-го экзона гена *GP1Ia* ведет к замене лейцина на пролин в 33 аминокислотном положении (Leu33Pro). Дикий аллель

получил название PlA1, а мутантный – PlA2. Наличие аллельного варианта PlA2 определяет повышенную адгезию тромбоцитов и может приводить к увеличению риска развития острого коронарного синдрома, а также связано с синдромом привычного невынашивания беременности. Гомозиготный вариант обуславливает повышенную адгезию тромбоцитов и может приводить к значительному увеличению риска развития острого коронарного синдрома в возрасте до 50 лет. У лиц с полиморфными аллельными вариантами часто отмечается пониженная эффективность аспирина.

Ген *SERPINE1*

Ген *SERPINE1* кодирует синтез ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) – ингибитора тканевого и урокиназного активатора плазминогена. Полиморфизм гена *SERPINE1* проявляется в изменении количества повторов гуанина (G) в промоторной (регуляторной) области гена. Существует два варианта гена с разным количеством повторов гуанина в позиции -675:

- 5G обозначает наличие последовательности из пяти оснований гуанина;
- 4G обозначает наличие последовательности из четырех оснований гуанина – это неблагоприятный вариант, приводящий к ослаблению фибринолитической активности крови.

Преобладающим в популяции вариантом исследуемого полиморфизма является гетерозиготный вариант 675 5G/4G. В связи с этим данный полиморфизм самостоятельного диагностического значения не имеет. Рассматривается влияние гомозиготного носительства 4G/4G в сочетании с полиморфными генотипами других генов системы гемостаза, предрасполагающими к развитию патологии.

Аллельный вариант 675 4G сопровождается большей активностью гена, чем 675 5G, что обуславливает более высокую концентрацию PAI-1 и уменьшение активности антикоагулянтной системы. Гомозигота 675 4G/4G ассоциирована с повышением риска тромбообразования, преэклампсии, нарушением функции плаценты и самопроизвольного прерывания беременности, но степень ассоциации слабая.

Гены ферментов фолатного цикла

Одной из важных причин формирования риска сосудистых тромбозов и атеросклеротического поражения является повышенное содержание гомоцистеина в крови. Гомоцистеин, являясь промежуточным метаболитом обмена метионина, зависит от генотипов тех ферментов, которые участвуют в этом обмене. Наиболее частой и изученной причиной является полиморфизм *C677T* метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR), которая регулирует уровень гомоцистеина в плазме. Ген *MTHFR* кодирует аминокислотную последовательность фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, играющего ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Полиморфизм *C677T* гена *MTHFR* связан с заменой нуклеотида цитозина (C) на тимин (T), что приводит к аминокислотной замене аланина на валин в позиции 222. Вариант *C677T* связан с четырьмя группами мультифакториальных заболеваний: сердечно-сосудистыми, дефектами развития плода, колоректальной

Наборы для выявления однонуклеотидных полиморфизмов генов системы свёртывания крови и фолатного цикла

«РеалБест-Генетика Гемостаз»

Принцип выявления однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов (дуплексов) продуктов ПЦР и специфических зондов.



- **D-3801 РеалБест-Генетика Гемостаз (12)**
(F2:20210G/A; F5:1691G/A; F7:10976G/A; F13A1:c.103G/T;
FGB:-455G/A; ITGA2:807C/T; ITGB3:1565T/C; PAI-1:-6755G/4G,
MTR:2756 A/G; MTRR:66 A/G; MTHFR:677C/T и MTHFR:1298A/C)
- **D-3802 РеалБест-Генетика Гемостаз (F2/F5)**
- **D-3831 РеалБест-Генетика Гемостаз FGB/F13A1**
- **D-3832 РеалБест-Генетика Гемостаз ITGA2/F7**
- **D-3833 РеалБест-Генетика Гемостаз PAI-1/ITGB3**
- **D-3803 РеалБест-Генетика Гемостаз**
(MTR/MTRR/MTHFR)

- Возможность проведения мультиплексного анализа
- Готовые реакционные смеси
- Каждый набор рассчитан на 48 определений
- Продолжительность анализа составляет 80-90 минут
- Оборудование: CFX96™ (Bio-Rad, США)

**«РеалБест-Генетика Гемостаз» – минимум усилий для
максимального результата!**

аденомой и раком молочной железы и яичников. У женщин с генотипом *C677T* дефицит фолиевой кислоты во время беременности может приводить к порокам развития плода, в том числе незаращению нервной трубки. Неблагоприятное воздействие варианта *C677T* зависит от внешних факторов: низкого содержания в пище фолатов, курения, приема алкоголя. Сочетание генотипа *C677T* и папилломавирусной инфекции увеличивает риск цервикальной дисплазии. Назначение препаратов фолиевой кислоты может значительно снизить негативное влияние данного варианта полиморфизма. Гомозиготное носительство *677T*-аллеля гена *MTHFR* повышает риск венозных тромбозов примерно на 20%. В различных этнических группах ее встречаемость составляет от 5% (Африка) до 40% (Евразия); в российской популяции – около 25%.

Клинический случай 6.22

Больной К., 28 лет, перенес непровоцированный тромбоз поверхностных вен левого плеча, через месяц – тромбоз глубоких вен правой ноги на фоне длительного переезда на машине, смены климата. Дополнительные предрасполагающие факторы — курение, анемия (Hb – 106 г/л). Получает антикоагулянтную терапию ривароксабаном 20 мг/сут. Наследственность не отягощена.

Генетический анализ: MTHFR 677TT, характеризующий предрасположенность к повышению уровня гомоцистеина, PAI-1 4G/4G – возможное снижение фибринолитической активности, GP IIIa CT – возможна гиперактивация тромбоцитов. Основные тромбофилические мутации (FV Leiden, F II G20210A) не обнаружены. Сопутствующие заболевания: хронический гастрит, грыжа пищеводного отверстия диафрагмы, рефлюкс-эзофагит. Анемия (нормоцитарная нормохромная) имеет смешанный характер — железodefицитная и анемия хронических заболеваний на фоне патологии желудочно-кишечного тракта с микрокровопотерями и выраженным воспалительным компонентом.

Заключение. Перенесенные тромбозы можно рассматривать в рамках одного эпизода и считать срок антикоагулянтной терапии достаточным. Необходимо дообследование для исключения гематологических факторов риска.

Рекомендовано:

- 1. Ривароксабан отменить с контролем D-димера через 1 месяц.*
- 2. Определение антитромбина, протеинов C, S не ранее чем через 4 дня после отмены ривароксабана.*
- 3. Гомоцистеин.*
- 4. Для исключения антифосфолипидного синдрома: волчаночный антикоагулянт (тест с ядом гадюки Рассела, скрининговый и подтверждающий при необходимости, не ранее чем через 4 дня после отмены ривароксабана), антитела к $\beta 2$ -гликопротеину 1 (IgG/IgM), антикардиолипидные антитела (IgG/IgM). При повышенном титре антител и/или обнаружении волчаночного антикоагулянта – повторное исследование через 12 недель.*
- 5. ОТКАЗ ОТ КУРЕНИЯ!*

6. *Определение ферритина, трансферрина, растворимых рецепторов к трансферрину, С-реактивного белка. По результатам исследования – лечение анемии.*

Повторная консультация через 1 месяц:

1. *D-димер – 0,46 мкг/мл (N 0–0,5 мкг/мл).*
2. *Антитромбин – 108%, протеин С – 96%, S – 111% – все показатели в пределах референтных интервалов.*
3. *Гомоцистеин – 46 мкмоль/л (референтные значения 5–16 мкмоль/л).*
4. *Волчаночный антикоагулянт не обнаружен, антитела к β 2-гликопротеину I (IgG/IgM), антикардиолипидные антитела (IgG/IgM) – в пределах референтных интервалов.*

Комментарий. У пациента имеет место гипергомоцистеинемия за счет нарушения функции ферментов фолатного цикла – метилентетрагидрофолат редуктазы. На этом фоне существенный вклад в патологическое тромбообразование вносит курение. Антифосфолипидный синдром исключен. Наследственные тромбофилии не выявлены. Рекомендуются настоятельно отказ от курения, терапия препаратами витаминов группы В и фолиевой кислоты, диета с высоким содержанием фолатов, снижение потребления кофе (увеличивает гомоцистеин). Контроль гомоцистеина через 1–2 месяца и далее – каждые 3 месяца.

По сравнению с обнаружением мутаций гена *MTHFR* более информативно непосредственное определение уровня гомоцистеина в плазме крови, повышение которого в связи с токсическим воздействием на эндотелий способствует прогрессированию атеросклероза. Кроме того, гомоцистеин активирует плазменные факторы XII и V, усиливает экспрессию тканевого фактора, подавляет экспрессию тромбомодулина и ингибирует расщепление фактора Va активированным протеином С. Все это способствует усиленному формированию тромбина и приводит к риску тромбозов разной локализации. Кроме варианта С677Т *MTHFR* в качестве регуляторов ферментов фолатного цикла рассматриваются еще некоторые генетические полиморфизмы: *MTRR*, *MTR*, дополнительные локусы *MTHFR*. Наличие этих полиморфизмов не влияет существенно на клинические проявления, в любом случае ведущим является фенотип, то есть концентрация гомоцистеина в плазме крови.

Антифосфолипидный синдром

Антифосфолипидный синдром является приобретенным тромбофилическим заболеванием, при котором продуцируются аутоантитела к фосфолипидно-белковым детерминантам мембран клеток (антифосфолипидные антитела, АФА) или фосфолипидсвязывающим белкам крови. АФС – это терапевтическое заболевание, диагностика которого требует обязательного лабораторного подтверждения. Клинические проявления, связанные с АФА в крови, разнообразны и представлены вариантами сосудистой патологии. При этом синдроме возникает лаборатор-

Диагностика антифосфолипидного синдрома



Определение маркеров АФС (ИФА-наборы EUROIMMUN)

- ▶ Антикардиолипин (IgG*, IgM*, IgA, суммарные Ig)
- ▶ Анти- β 2-гликопротеин 1 (IgG*, IgM*, IgA, суммарные Ig)
- ▶ Антифосфатидилсерин (IgG*, IgM*, IgA, суммарные Ig)



- Количественное определение
- Готовые к применению взаимозаменяемые реагенты
- Цветовая кодировка реагентов и флаконов
- Возможность одновременной постановки разных тестов на одном планшете
- Простая унифицированная методика

Определение волчаночного антикоагулянта (наборы Tcoag)

- ▶ Наборы для скрининга и подтверждения*
- ▶ Коагуляционные тесты с ядом гадюки Рассела
- ▶ Наличие положительного контрольного материала
- ▶ Удобные фасовки в наборах (10x2 мл, 10x1 мл)



На правах рекламы

* Рекомендовано Международной консенсусной группой, Сидней, 2006
Включены в Федеральные клинические рекомендации по лечению АФС, 2013
Все диагностикумы в наличии на складе

ЗАО «АНАЛИТИКА» в лабораторной диагностике с 1989 года,
авторизованный поставщик продукции EUROIMMUN AG (Германия) в РФ с 2004 года
и Tcoag Ireland Limited (Ирландия) в РФ с 2010 года

ЗАО «АНАЛИТИКА»
Москва
+7 495 737 0363
+7 800 200 1999
info@analytica.ru
www.analytica.ru

ный феномен, при котором происходит удлинение времени свертывания крови в тестах, выполняемых на фосфолипидах (АЧТВ). Этот феномен впервые был описан у пациентов с системной красной волчанкой, у них были обнаружены аутоантитела (IgG) против фосфолипидов, которые были названы «волчаночный антикоагулянт» (ВА). Клинически при АФС и ВА нет геморрагических проявлений, но есть выраженная тенденция к патологически усиленному тромбообразованию. Антифосфолипидные антитела представляют собой гетерогенную группу аутоантител, влияющих на все клеточные элементы крови и сосудистой стенки и запускающих реакции первичного и плазменного гемостаза. В клинической практике наиболее часто определяются антитела к кардиолипину (аКЛ), антитела к бета 2 гликопротеину 1 (анти-β2-ГП1) и волчаночный антикоагулянт (ВА). При определении аКЛ и анти-β2-ГП1 используется твердофазный иммуноферментный метод, при определении ВА – коагуляционные тесты. Результаты выявления аКЛ и ВА часто не совпадают, при этом именно с ВА ассоциируется развитие тромбозов. Самая тяжелая клиническая ситуация развивается при наличии тройной позитивности (аКЛ + анти-β2-ГП1 + ВА). Нельзя ставить знак равенства между ВА и АФС. В некоторых случаях при коагулологических признаках ВА не находят иммунологических признаков АФС, в свою очередь АФС не всегда сопровождается коагулологическими признаками ВА. Если же есть лабораторные признаки, но нет клинических, диагноз АФС не выставляется.

Диагностические критерии антифосфолипидного синдрома

Международные диагностические критерии АФС включают клинические и серологические признаки. К клиническим проявлениям относятся тромбоз сосуда любого калибра и локализации (венозный и/или артериальный, или микроциркуляторного русла) и акушерская патология.

Сосудистый тромбоз

Один или более клинических эпизодов артериального, венозного тромбоза или тромбоза мелких сосудов в любой ткани или органе. Тромбоз должен быть подтвержден воспроизведением изображения, доплеровским исследованием или морфологически, за исключением поверхностных венозных тромбозов. Морфологическое подтверждение должно быть представлено без наличия значительного воспаления сосудистой стенки.

Патология беременности

А. Один или более случаев внутриутробной гибели морфологически нормального плода после 10 недель гестации (нормальные морфологические признаки плода документированы на УЗИ или непосредственным осмотром плода).

Б. Один или более случаев преждевременных родов морфологически нормального плода до 34 недель гестации из-за выраженной преэклампсии, или эклампсии, или выраженной плацентарной недостаточности.

В. Три или более последовательных случаев спонтанных абортс до 10-й недели гестации (исключение – анатомические дефекты матки, гормональные нарушения, материнские или отцовские хромосомные нарушения).

Лабораторные критерии

А. Антитела к кардиолипину IgG- или IgM-изотипа, выявляемые в сыворотке в средних или высоких концентрациях по крайней мере 2 раза с промежутком не менее чем 12 недель стандартизованным иммуноферментным методом.

Б. Антитела к β_2 -ГП1 (анти- β_2 -ГП1) IgG- и/или IgM-изотипа, выявляемые в сыворотке в средних или высоких концентрациях по крайней мере 2 раза с промежутком не менее чем 12 недель стандартизованным иммуноферментным методом.

В. Волчаночные антитела (ВА) в плазме в двух или более случаях исследования с промежутком не менее 12 недель.

АФС диагностируется при наличии одного клинического и по крайней мере одного серологического критерия. АФС исключается, если более 5 лет выявляются АФА без клинических проявлений или клинические проявления без АФА. Наличие врожденных или приобретенных факторов риска тромбозов не исключает АФС.

Антифосфолипидные антитела

Антифосфолипидные антитела не только серологические маркеры, но и важные патогенетические медиаторы, вызывающие развитие основных клинических проявлений АФС: тромбоза, акушерской патологии, цитопений (клинический случай 6.23). АФА обладают способностью воздействовать на большинство процессов, приводящих к гиперкоагуляции.

К серологическим маркерам АФС, согласно международным диагностическим критериям, отнесены: антикардиолипидные антитела (аКЛ), и/или волчаночный антикоагулянт (ВА), и/или антитела к β_2 -гликопротеину 1 (анти- β_2 -ГП1). В зависимости от позитивности по АФА рекомендовано стратифицировать больных АФС по следующим категориям: I – выявление более чем одного лабораторного маркера (в любой комбинации); IIa – только ВА; IIb – только аКЛ; IIc – только анти- β_2 -ГП1.

Многие исследователи рассматривают β_2 -гликопротеин 1 (β_2 -ГП1) как кофактор взаимодействия АФА с фосфолипидами клеточных мембран, в частности с кардиолипином. В качестве кофакторов (или аутоантигенов) указываются и другие белки, причем многие из них принимают непосредственное участие в регуляции свертывания крови: протромбин, протеин С, протеин S, тромбомодулин, факторы V, VII/VIIIa и XII, высокомолекулярный кининоген, гепарин. Однако эти антитела не включены в серологические маркеры АФС, так как пока не получено убедительных доказательств их диагностической значимости. Это относится в том числе к IgA-аКЛ, IgA-анти- β_2 -ГП1.

Профиль АФА может указывать на высокий или низкий риск последующих тромбозов. Высокий риск тромбоза определяется при позитивности по ВА и по трем типам АФА (ВА + аКЛ + анти- β_2 -ГП1), а также для СКВ при изолированной

постоянной позитивности по АКЛ в высоких и средних уровнях. Низкий риск тромбоза ассоциируется с изолированным периодическим выявлением АФА в средних и низких уровнях.

Определению АФА может мешать ревматоидный фактор, поэтому, если на фоне клинических признаков заболевания иммунохимические тесты на АФА дают отрицательный результат, то необходимо провести коагулянтные тесты на наличие волчаночного антикоагулянта.

Клинический случай 6.23

Больная Ч., 35 лет. Проходит обследование по поводу невынашивания беременности. Всего было 5 беременностей: антенатальная гибель плода – 2, замершие беременности – 3. Антитела к $\beta 2$ -ГП1 – 199 (норма 0–5 Ед/мл).

Коагулограмма пациентки Ч.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	101	25–40 с
Протромбиновая активность по Квику	115	<70%
Тромбиновое время	21,7	16–25 с
Концентрация фибриногена	4,59	2,8–4,7 г/л
Фактор VIII, активность	108	50–160%
Антитромбин, активность	108	83–123%
Протеин С, активность	106	70–140%
Свободный протеин S, активность	92	54–124%
D-димер	0,06	0–0,5 мкг/мл
Волчаночный антикоагулянт (нормализованное отношение – НО)	Тест с разведенным ядом гадюки Рассела 2,13 (скрининг) и 2,04 (подтверждение); АЧТВ, чувствительное к ВА 1,72	НО < 1,2
Концентрация гомоцистеина	5,6	4,3–11,1 мкмоль/л
Антиген фактора Виллебранда	160	Группа крови II, III, IV – 66–176%
Агрегация тромбоцитов: – спонтанная – АДФ-индуцированная (5,0 мкМ р-р)	1,0 50	1–1,6 отн. ед. 25–68%

Заключение. Лабораторные признаки наличия волчаночного антикоагулянта – антител, обладающих ингибиторной активностью факторов свертывания *in vitro*.

Клинические и лабораторные данные позволяют заподозрить антифосфолипидный синдром.

Рекомендуется:

- повторное определение ВА, антикардиолипидных антител IgG и IgM, антител к β_2 -гликопротеину I IgG и IgM не ранее чем через 12 недель;
- в момент обследования пациентка не должна получать антикоагулянтную терапию и находиться вне обострения заболеваний;
- консультация ревматолога, гематолога.

Волчаночный антикоагулянт

Волчаночный антикоагулянт (ВА) – это антитела, эффект которых выявляется в клоттинговых тестах, тогда как антитела к кардиолипину и к β_2 -GP I выявляются серологическими методами (табл. 6.36).

Таблица 6.36. Спектр антифосфолипидных антител, присутствующих в сыворотке больных АФС

Антифосфолипидные антитела, выявляемые твердофазным ИФА, в котором в качестве антигена используется кардиолипин	Кардиолипидные антитела
	Антитела к β_2 -гликопротеину I (β_2 -GP I)
	Антитела к другим фосфолипидсвязывающим белкам
Антифосфолипидные антитела, выявляемые с помощью фосфолипидзависимых коагуляционных тестов (волчаночный антикоагулянт)	Антитела к протромбину
	Антитела к β_2 -гликопротеину I (β_2 -GP I)
	Антитела к фактору V
	Антитела к фактору X
	Антитела к ФЛ

ВА является неспецифическим ингибитором. Выявление ВА проводят последовательно: сначала в скрининговых методах, а затем в подтверждающих.

Условия, которые необходимо выполнять при проведении тестов на наличие волчаночного антикоагулянта:

- в исследование берется бестромбоцитная цитратная плазма (удаление тромбоцитарных фосфолипидов);
- нормальное значение ПВ и ТВ в тестируемой плазме (исключение факторов, которые могут влиять на интерпретацию тестов, например, прием оральных антикоагулянтов или гепарина);
- волчаночный антикоагулянт нельзя определять у больных, получающих антикоагулянтную терапию (любую) из-за высокой вероятности ложноположительного результата;
- исключение иных расстройств гемостаза.

Диагностические шаги:

- скрининговые тесты на ВА;

- выявление или исключение наличия ингибитора;
- подтверждающие тесты на ВА.

Алгоритм лабораторного выявления волчаночного антикоагулянта представлен на рис. 6.11.

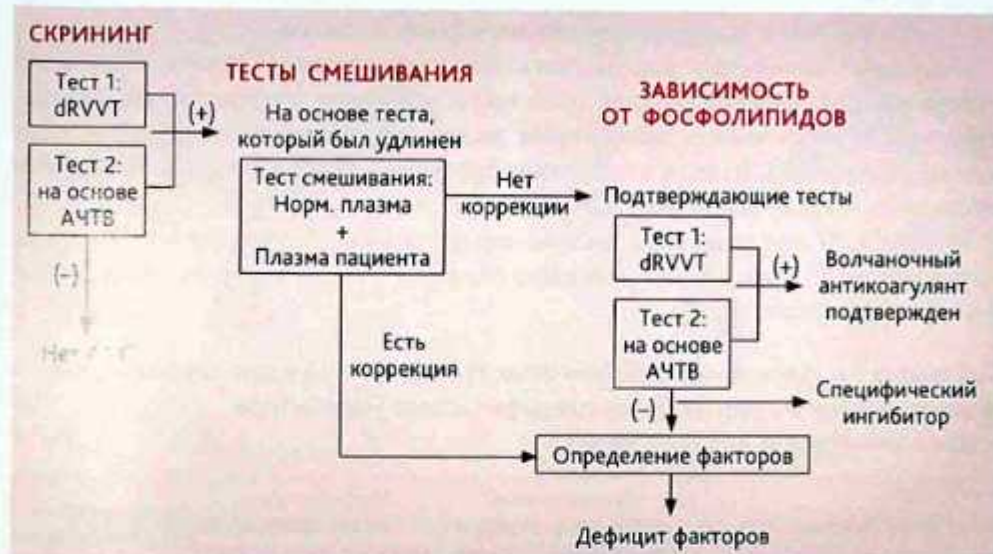


Рис. 6.11. Алгоритм лабораторного выявления волчаночного антикоагулянта. АФС – антифосфолипидный синдром, dRVVT (dilute Russell's Viper venom time) – тест с разведенным (разбавленным) ядом гадюки Рассела

Скрининговые тесты на ВА – удлинение измеряемого времени коагуляции вследствие влияния ВА на фосфолипиды реагентов, что приводит к положительному результату в соответствующем скрининговом тесте. Часто используемые тесты:

- АЧТВ;
- dRVVT (dilute Russell's Viper venom time) – время в пробе с разведенным (разбавленным) ядом гадюки Рассела.

Реже используется тест «каолиновое время свертывания».

В наиболее часто используемых тестах АЧТВ и dRVVT имеется высокая степень вариабельности чувствительности к ВА разных коммерческих реагентов, что проявляется разной степенью удлинения АЧТВ и dRVVT. Это особенно заметно в тесте АЧТВ при использовании чувствительных и не чувствительных к ВА реагентов.

Выявление или исключение наличия ингибитора

- Выявление ингибитора, влияющего на АЧТВ, проводится микс-тестированием после получения положительного скринингового результата АЧТВ.
- Поиск причин удлинения АЧТВ в случае отрицательного микст-теста (снижение активности факторов, гепарин, ПДФ).

Подтверждающие тесты на ВА. Подтверждение фосфолипид-зависимости удлинения скрининговых тестов путем добавления фосфолипидов в различных концентрациях или модифицированных фосфолипидов. Часто используемые тесты:

- АЧТВ с высокой и низкой концентрацией фосфолипидов;
- dRVVT-тест с высоким содержанием фосфолипидов.

Результаты измерения должны быть представлены в виде нормализованного отношения (отношение в скрининговом тесте: отношение в подтверждающем тесте) с четким заключением лаборатории: волчаночный антикоагулянт обнаружен или не обнаружен. Данных о строгой корреляции величины нормализованного отношения и тяжести течения АФС нет.

В табл. 6.37 представлены данные скрининговых тестов при волчаночном антикоагулянте, врожденном дефиците факторов VIII и IX, при наличии специфического ингибитора.

Таблица 6.37. Изменения скрининговых тестов при врожденном дефиците факторов VIII и IX, при наличии специфического ингибитора и при волчаночном антикоагулянте

Тесты	Врожденный дефицит факторов внутреннего пути	Ингибитор факторов внутреннего пути	Волчаночный антикоагулянт
Количество тромбоцитов	Н	Н	Н или ↓
Время кровотечения	Н	Н	Н
АЧТВ	↑	↑	↑
ПТ	Н	Н	Н или ↑
Тест смешивания. Исследование сразу после смешивания	Коррекция	Обычно коррекция	Нет коррекции
Тест смешивания. Исследование после часовой инкубации	Коррекция	Нет коррекции	Нет коррекции

Синдром ДВС

Синдром ДВС (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания) – приобретенная, вторичная коагулопатия, сопутствующая критическому состоянию, при которой потребляются компоненты свертывающей и противосвертывающей систем крови, которая может сопровождаться как кровотечениями, так и микротромбозами. Синдром ДВС – это комплекс в первую очередь клинических, а затем функциональных и лабораторных показателей, которые предоставляют клиницисту объективные данные о состоянии системы гемостаза. В первом приближении можно сказать следующее: если система гемостаза и организм в целом способны компенсировать действие инициаторов свертыва-

ния, то имеет место гиперкоагуляция и ограниченное тромбообразование. Если развивается декомпенсация, то это состояние можно трактовать как синдром ДВС (рис. 6.12).

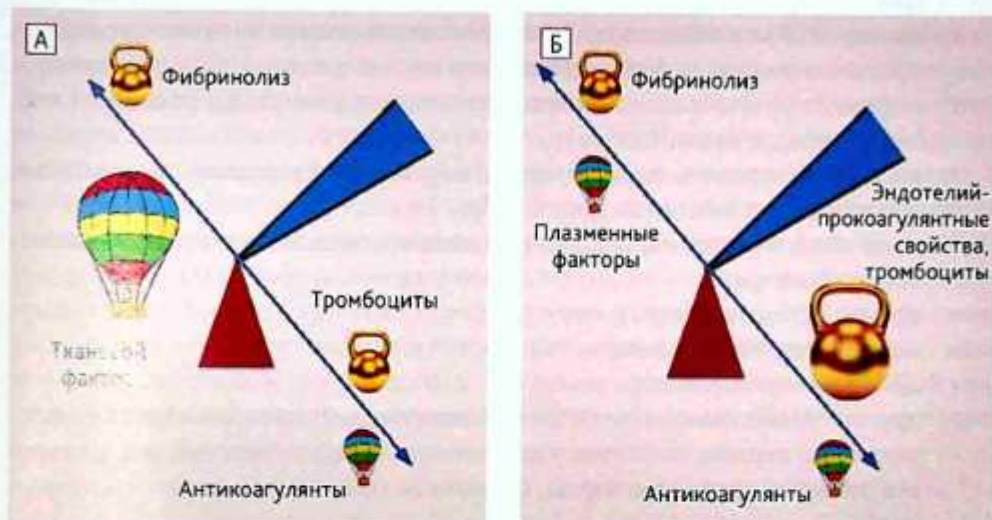


Рис. 6.12 Синдром ДВС – состояние, при котором развивается декомпенсация, не достигается динамическое равновесие между прокоагулянтными и антикоагулянтными воздействиями из-за чрезмерной активации факторов, вызывающих гиперкоагуляцию. А – макет синдрома ДВС при повреждении тканей с массивным контактом крови с тканевым фактором; Б – макет при патологии сосудов и циркуляторных нарушениях с повреждением эндотелия и активацией тромбоцитов

Под ДВС понимают процесс усиленной внутрисосудистой коагуляции, при которой:

- в крови присутствует значительное количество тромбина, вызывающего системную активацию и последующее потребление «факторов-субстратов» (фибриногена, протромбина, факторов V и VIII и других), антикоагулянтов и тромбоцитов;
- имеется частичная обструкция мелких сосудов с ишемическими нарушениями в органах;
- обнаруживается реактивный фибринолиз.

Этиология и патогенез ДВС

Синдром ДВС – не самостоятельное заболевание. Он возникает обычно в результате поступления в кровь или образования в ней веществ, инициирующих свертывание крови. Основопологающее событие в генезе острого синдрома ДВС – чрезмерная активация свертывающей системы крови с образованием избытка тромбина, сопровождающаяся падением уровня тромбоцитов и факторов

свертывания крови. К этому синдрому чаще всего могут приводить следующие состояния:

- повреждение тканей и массивный контакт крови с тканевым фактором (рис. 6.12А);
- онкологические заболевания (контакт с онкологическими прокоагулянтами, тканевым фактором, фактором некроза опухоли, клеточными протеазами);
- инфекции (воздействие эндотоксинов, повреждение эндотелиальных клеток, активация тромбоцитов);
- патология сосудов и циркуляторные нарушения с поражением эндотелия, активацией тромбоцитов (рис. 6.12Б);
- иммунологические нарушения (активация комплемента, экспозиция тканевого фактора);
- прямая активация ферментов;
- осложнения беременности;
- ДВС у новорожденных;
- другие патологические воздействия, повреждающие ткани и органы (шок, остановка сердца, гипоксия, утопление (особенно в пресной воде), жировая эмболия, аневризма аорты, гигантские гемангиомы, укусы некоторых змей).

Основные патогенетические механизмы запуска ДВС

- Нарушение или повреждение эндотелия, сопровождающееся высвобождением прокоагулянтов и контактом крови с тканевым фактором.
- Активация моноцитов с экспрессией тканевого фактора и прокоагулянтов моноцитов. Именно чрезмерная активация и дегрануляция моноцитов-макрофагов, обладающих полноценным тканевым фактором, часто рассматривается как центральное звено синдрома ДВС при сепсисе.
- Контакт с тканевым фактором клеток злокачественных опухолей. ДВС особенно часто возникает при аденокарциноме поджелудочной и предстательной желез, продуцирующих муцин, при остром промиелоцитарном лейкозе, при котором гипергранулярные лейкозные клетки высвобождают из гранул материал, подобный тканевому фактору.
- Массивное поступление в кровь физиологических прокоагулянтов при различных повреждениях, массивных травмах, эмболии. Травмы головы с нарушением гематоэнцефалического барьера и контактом крови с тканью мозга – мощный источник тканевого фактора. Осложнения беременности, при которых материал, обладающий активностью тканевого фактора, попадает из полости матки в кровь матери (преждевременная отслойка плаценты, аборт, длительное внутриутробное пребывание погибшего плода или эмболия околоплодной жидкостью).
- Шок с выпадением функции органов и развитием полиорганной недостаточности.
- Введение факторов протромбинового комплекса, особенно активированных (переливание несовместимой крови).

- Массивное поступление в кровь бактериальных прокоагулянтов. В капсиде бактерий присутствует большое количество липополисахаридов (эндотоксин), способных резко активировать моноциты-макрофаги системы циркуляции.
- Прямая активация ферментами змеиных ядов.

Ведущую роль в запуске патологических процессов при ДВС, как правило, играет внешний путь активации протромбина. Активизация контактных факторов при синдроме ДВС приводит к гипотонии и вазодилатации. Еще одним звеном развития патологического свертывания крови и особенно синдрома потребления является повреждение тромбоцитов и эритроцитов. Кислые фосфолипиды, в норме находящиеся на внутренней поверхности клеточной мембраны, являются важным фактором активации процессов свертывания крови. Их появление в циркулирующей крови в большом количестве приводит к значительному усилению процесса свертывания крови и потреблению прокоагулянтов. Имеются данные, что у пациентов с коагулопатией потребления снижена функция тканевых макрофагов и содержание фибронектина. Это приводит к снижению активности удаления макрофагами-моноцитами микроагрегатов фибрина, обломков коллагена, и микроорганизмов, бактерий и продуктов их жизнедеятельности.

Виды синдрома ДВС

Лабораторные показатели, характеризующие состояние гиперкоагуляции и внутрисосудистого свертывания, меняются в зависимости от течения и стадии процесса. В англоязычной литературе используется термин overt DIC – явный, неприкрытый синдром ДВС, и non-overt DIC – неявный, неочевидный синдром ДВС. Некоторые исследователи выделяют подострые и даже хронические формы синдрома ДВС. Эта точка зрения продолжает дискутироваться.

Острый синдром ДВС, включая молниеносную (катастрофическую) форму, проявляется комплексом аномалий, включающим нарушение микроциркуляции, повреждение сосудистой стенки, тромбоцитопению и тромбоцитопатию, анизоцитоз и гемолиз эритроцитов, нейтрофильную реакцию, гиперкоагуляцию и геморрагический синдром на фоне коагулопатии и тромбоцитопатии потребления, нарушения в системах фибринолиза, антикоагулянтов, калликреин-кининовой и других протеолитических систем. Фазы острого синдрома ДВС:

- гиперкоагуляция и гиперагрегация;
- коагулопатия и тромбоцитопатия потребления с активацией фибринолитической системы;
- генерализация фибринолиза, восстановление.

Подострые формы синдрома ДВС встречаются при некоторой акушерской патологии (в частности, при пузырном заносе, синдроме мертвого плода), при острых лейкозах (особенно промиелоцитарном), в ходе реакции отторжения трансплантата, при некоторых инфекциях и интоксикациях, отморожениях. Типично постепенное развитие нарушений коагуляции в течение дней и даже недель, предшествующих тромбгеморрагическим клиническим проявлениям.

В отличие от острого синдрома ДВС подострые его формы характеризуются более длительной начальной фазой гиперкоагуляции, могут течь волнообразно. Они часто проявляются тромбозами и эмболиями мелких органических сосудов за счет нарушения микроциркуляции с развитием дистрофических изменений внутренних органов. Позже присоединяются тромбозы крупных вен (почечных, печеночных, полых) с нарушением функционального состояния органов. Часто первым симптомом бывает патологический мочевой осадок (протеинурия, цилиндрурия, гематурия) как результат нарастающей блокады микроциркуляции в почках, позже присоединяется геморрагический синдром.

Хронические формы синдрома ДВС многими исследователями рассматриваются как гиперкоагуляционный синдром. Эти состояния встречаются при злокачественных опухолях, болезнях системы крови (чаще при миелопролиферативных заболеваниях), множественных гигантских ангиомах, иммунокомплексных системных заболеваниях, при тяжелой сердечной недостаточности, циррозе печени, после операций с применением аппаратного искусственного кровообращения, у больных, находящихся на хроническом гемодиализе, при некоторых инфекционных заболеваниях. Клиническая картина зависит во многом от исходного заболевания. Встречаются тромбозы, чаще мелких органических сосудов, с развитием дистрофических изменений соответствующих органов. Возможны инфаркты легких. Диагностика этого состояния крайне затруднена, поскольку у таких больных не отмечается геморрагических проявлений из-за потребления факторов свертывания крови и тромбоцитов. Специфическими лабораторными признаками гиперкоагуляционного синдрома являются повышенный уровень маркеров тромбинемии – активности фактора VII, фактора Виллебранда, количества фибриногена, D-димера. Маркеры тромбинемии позволяют оценить клинические проявления – органическую и полиорганную недостаточность.

Выделение подострых и хронических форм ДВС подвергается критике. Описываемые при этих формах проявления не отличимы от гиперкоагуляционного синдрома, присущего факторам риска тромбозов, а лабораторные исследования не несут дополнительной информации и оснований для принятия клинических решений. Назначение фармакологической тромбопрофилактики основывается на выявлении и понимании именно факторов риска; 40–50% пациентов, госпитализированных в хирургические и терапевтические стационары, имеют показания к такого рода профилактике. Если у пациентов оценить маркеры активации свертывания, то они окажутся повышенными у подавляющего большинства – все или часть из них. Но это не будет означать, что у больных развивается ДВС. А вот знание тех клинических ситуаций, для которых ДВС наиболее вероятно, необходимо клиницисту. Именно на этих больных должно быть обращено пристальное внимание для купирования нарушений гемостаза и профилактики возможных осложнений. Такая концепция вполне согласуется с принципами лечения синдрома ДВС, в основе которого лежит лечение основного заболевания, приведшего к развитию тяжелых нарушений системы гемостаза и формированию ДВС.

Тромбоцитарно-сосудистый гемостаз при синдроме ДВС

Ведущим механизмом патологических изменений при ДВС являются нарушения в системе микроциркуляции. Выпадение фибрина в мелких сосудах сопровождается замедлением кровотока, агрегацией тромбоцитов, травматизацией с изменением формы эритроцитов, увеличением анизоцитоза и появлением клеточного дебриса (рис. 6.13). Количественной характеристикой анизоцитоза эритроцитов является увеличение показателя RDW, определяемого гематологическими анализаторами и рассчитываемого как коэффициент вариации объема клеток. Травматизация эритроцитов сопровождается внутрисосудистым гемолизом. Симптомом комплекс внутрисосудистого гемолиза: повышение свободного Нб, неконъюгированного билирубина, ретикулоцитоз, повышение ЛДГ, снижение гаптоглобина. ДВС с внутрисосудистым гемолизом характеризуется более тяжелым течением, чем без гемолиза, так как гемолиз усиливает свертывание из-за освобождения из эритроцитов АДФ, который дополнительно активирует тромбоциты. Кроме того, поврежденные эритроциты являются источником эритрофосфатидов.

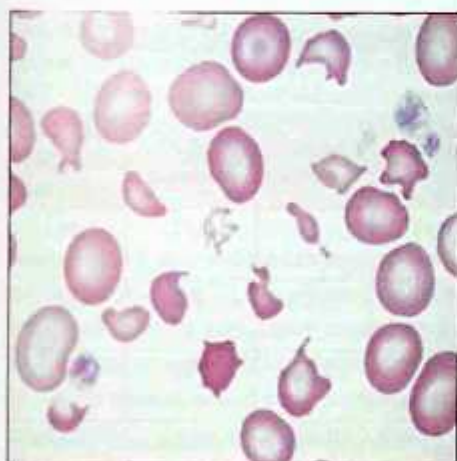


Рис. 6.13. Анизоцитоз эритроцитов и клеточный дебрис при ДВС

Тромбоциты при ДВС всегда вовлечены в развитие патологических реакций. При ряде форм ДВС тромбоциты являются основным субстратом действия патологического фактора. ДВС развивается через активацию тромбоцитарно-сосудистого гемостаза при эндотоксиновых формах поражения; сепсисе, вызванном грамотрицательными бактериями. Системные васкулиты перерастают в ДВС через тромбоцитарные нарушения.

Тромбоцитопения возникает в результате потребления тромбоцитов. Тромбоцитопатия развивается в результате реактивного выброса в кровоток незрелых тромбоцитов и потребления наиболее полноценного пула тромбоцитов.

Основным лабораторным показателем нарушения тромбоцитарно-сосудистого гемостаза при синдроме ДВС является острое снижение в крови тромбоцитов при одновременном повышении спонтанной агрегации. Однако при значительной тромбоцитопатии агрегация – как спонтанная, так и индуцированная – бу-

дет сниженной. В этих случаях для диагностики тромбоцитопатии потребления желательно определить в плазме тромбоцитарные факторы, которые могли быть освобождены из активированных тромбоцитов: β -тромбоглобулин (β -TG) и фактор 4 тромбоцитов (PF4). Диагностически значимым признаком ДВС будет в этом случае снижение количества тромбоцитов с существенным увеличением в плазме β -TG и PF4. К сожалению, в клинической практике определение этих метаболитов тромбоцитов затруднено и не является рутинной процедурой.

Исследование активности тромбоцитов не включено в международные диагностические алгоритмы для синдрома ДВС. Повышение агрегационной активности является вторичным и не определяет ни диагноза, ни лечебной тактики. Оно важно для понимания патогенетических механизмов синдрома.

Плазменный гемостаз при синдроме ДВС

Комплекс лабораторных показателей, характеризующих состояние плазменного гемостаза при синдроме ДВС, представлен в табл. 6.38.

Таблица 6.38. Лабораторные показатели, характеризующие состояние гиперкоагуляции и фазы синдрома ДВС

	Кол-во тромбоцитов	ПВ	АЧТВ	Фибриноген	Анти-тромбин	ПДФ/Д-димеры	Факторы плазмы
Фаза гиперкоагуляции	Н	Н	Н	Н/↑	↓	Н/↑	Н
Фаза потребления	↓/↓↓	Удл	Удл	↓/↓↓	↓/↓↓	↑↑	↓↓
Фаза генерализации	↓↓↓	Удл/∞	Удл/∞	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓

Примечание. Н – норма, Удл – удлинение теста, ↑ – повышение, ↓ – снижение, Удл/∞ – удлинение/тест не определяется в течение времени измерения.

Активация системы гемостаза, которая приводит к тромбозу, сопровождается появлением в крови специфических маркеров. Гиперкоагуляция в плазменном звене проявляется, в первую очередь, избыточной активацией тромбина, что определяется несколькими лабораторными тестами (рис. 6.14).

Однако все эти тесты могут проявляться не только в стадию гиперкоагуляции при синдроме ДВС, но и при тромбообразовании, при массивной тромболитической терапии. Например, при нестабильной стенокардии и остром инфаркте миокарда несколько маркеров активации гемостаза, как правило, дают положительную информацию. Это тесты на фибринопептид А (FPA), комплекс «тромбин–антитромбин» (ТАТ), продукты паракоагуляции, D-димеры. У больных с врожденной тромбофилией из-за дефицита протеина С или S примерно ¼ пациентов имеют увеличение ТАТ или других маркеров активации гемостаза даже без

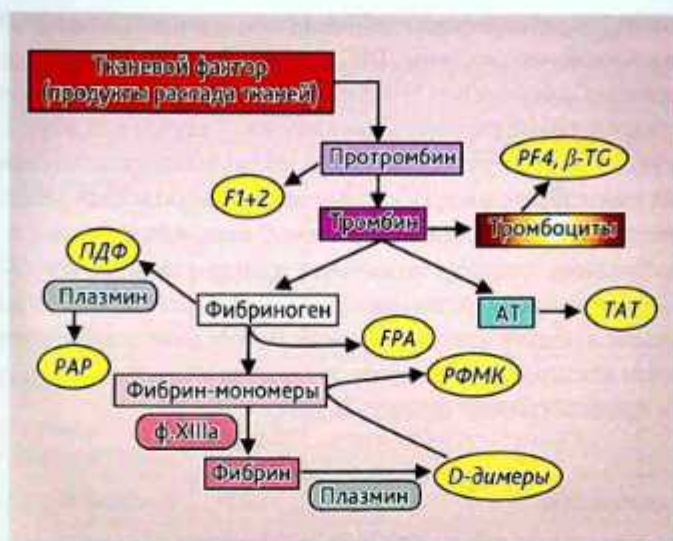


Рис. 14. Продукты гиперактивации плазменного гемостаза, которые не обнаруживаются в норме, но характерны для синдрома ДВС. ПДФ – продукты деградации фибриногена/фирина, ТАТ – тромбин-антитромбиновый комплекс, РАР – комплекс «плазмин-антиплазмин», FPA – фибринопептид А, РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы, F1+2 – фрагменты протромбина, PF4 – фактор 4 тромбоцитов, β-TG – β-тромбоглобулин

каких-либо признаков острых тромбозов. Маркеры активации, такие как D-димер, активность ф. VIII, антиген ф. Виллебранда, фибриноген, могут появиться при тяжелой инфекции, прогрессирующем атеросклерозе, аутоиммунных заболеваниях, характеризующих гиперкоагуляционный синдром, но не стадию развития ДВС. В то же время часто при наличии тромбов не определяются маркеры тромбообразования. Поэтому лабораторные тесты могут служить только вспомогательным инструментом для постановки диагноза клиницистами, при этом ни один из лабораторных тестов и даже их совокупность не являются исключительным основанием для постановки диагноза «синдром ДВС».

Диагностика синдрома ДВС

Золотого стандарта для диагностики синдрома ДВС не существует. Ни один тест сам по себе не способен точно диагностировать ДВС, поэтому исключительное значение имеет динамическое наблюдение (мониторинг) за состоянием гемостаза. Диагностика острого синдрома ДВС начинается с оценки клинической ситуации. Клиническая симптоматика синдрома ДВС часто настолько весома, что лабораторное исследование лишь подтверждает диагноз, способствует уточнению стадии и тяжести процесса, контролирует эффективность проводимой терапии. При шоковых и терминальных состояниях, тяжелых формах сепсиса, массивных травмах и ожогах, остром внутрисосудистом гемолизе и укусах гадюк ДВС

является постоянным компонентом заболевания, его неотъемлемой частью. При всех этих видах патологии синдром ДВС диагностируют одновременно с распознаванием основного заболевания и немедленно начинают его терапию. С более серьезными трудностями связано распознавание нескольких нарушений гемостаза, в особенности в тех случаях, если они последовательно наслаиваются друг на друга. Такая полисиндромность наблюдается при болезнях печени, лейкозах, системной красной волчанке, кровотечениях у новорожденных и в ряде других ситуаций. Необходима дифференциальная диагностика по комплексу тестов, отражающих состояние разных звеньев системы гемостаза. Различные патологические отклонения в общих коагуляционных тестах в сочетании с тромбоцитопенией, появлением в плазме крови маркеров гиперкоагуляции дают в совокупности основание для предположения синдрома ДВС.

Скрининговые тесты

В начальном периоде синдрома ДВС обнаруживается гиперкоагуляция с начальными клиническими признаками (трудность получения крови из вены, свертывание ее в игле и пробирке и т. д.), которая при острых формах весьма кратковременна и нередко не выявляется. Такая гиперкоагуляция может быть подтверждена тромбоэластографически (укорочение параметров г-время и к-время R+K, увеличение угла α , максимальная амплитуда). Повышаются маркеры активации свертывания крови.

В фазе коагулопатии и тромбоцитопатии потребления лабораторно выявляется гипокоагуляция, но она носит умеренный характер. Может иметь место разнонаправленность показаний коагуляционных тестов – важный и несомненный признак синдрома ДВС, поскольку ни при каких других нарушениях в системе гемостаза она не наблюдается. Потребление затрагивает не только коагуляционные факторы и тромбоциты, но и естественные антикоагулянты – в первую очередь антитромбин.

В терминальной фазе генерализации, которая развивается далеко не всегда, увеличиваются все временные показатели свертывания, сгустки становятся малыми, рыхлыми, отмечается выраженная гипофибриногенемия.

В табл. 6.39 приведены типичные изменения скрининговых показателей в разные фазы синдрома ДВС.

Лабораторное обследование больных при подозрении на развитие острого синдрома ДВС ни в коем случае не должно ограничиваться системой гемостаза. Чрезвычайно важны и другие определения: изменения гематокрита, уровня гемоглобина и эритроцитов в крови, степени гипоксемии, кислотно-основного состояния, электролитного баланса, диуреза и мочевых симптомов, динамики креатинина и мочевины в крови. Все показатели при подозрении на синдром ДВС должны исследоваться в динамике – не реже 1–2 раз в сутки, при быстро развивающихся событиях – чаще, по мере клинической необходимости. Трудно переоценить ту информацию, которую может дать тромбоэластография/тромбоэластометрия. Информативна также ее модификация, такая как пьезоэлектрическая ТЭГ.

Таблица 6.39. Дифференциальная диагностика стадий синдрома ДВС

Лабораторные признаки	Норма	Фаза гиперкоагуляции	Фаза потребления	Фаза генерализации
Количество тромбоцитов ($10^9/\text{л}$)	150–400	300–400 и более	<150	100 и даже <50
Концентрация фибриногена (г/л)	2,0–4,0	>4,0	<2,0	1,0 и даже <0,5
Тромбиновое время (с)	15 + 1	N	↑	↑
Протромбиновое время (с)	12–16	5–10	10–15	30–40
Время фибринолиза – лизис эуглобулинов (мин)	180–240	150–180	<180	<100
Концентрация ПДФ (мкг/мл)	0–3	>3	>3–5	>5
Антитромбин (%)	70–120	70–120	70–60 или N	60–40
Д-ТВ (с)	45–55	N	N, ↑	↑

Подтверждающие тесты

Тромбин в крови, взятой для исследования, не сохраняется. Это быстро разрушающаяся сериновая протеаза. В пробирке можно определить только косвенные признаки тромбинемии, существующей *in vivo*, по маркерам активации свертывания, сохранившимся в полученной пробе – то есть по свидетелям тромбинемии, имевшей место в организме. Эти маркеры стойкие, их так и называют: «свидетели» образования тромбина и фибрина. На рис. 6.14 представлены тесты, характеризующие состояние гиперкоагуляции. Указанные на этом рисунке маркеры гиперкоагуляции могут рассматриваться как маркеры, характерные для синдрома ДВС. Синдром ДВС не имеет сугубо специфических маркеров, поэтому исследования должны быть комплексными, поскольку взятые в отдельности любые из указанных маркеров могут наблюдаться при других видах патологии гемостаза.

Основные тесты, указывающие на активацию свертывающей системы, – это тесты, выявляемые иммунохимическими методами. Моноклональные антитела, используемые в этих тестах, позволяют идентифицировать состояние факторов как «активное» или «неактивное» или как «заблокированное ингибиторами», что бывает очень важным с точки зрения диагностики. Методы ELISA, иммунофлуоресценции или турбидиметрии и нефелометрии существенно расширяют возможности клинико-диагностической лаборатории в комплексной оценке и выявлении механизмов активации системы гемостаза. Более быстрыми, но менее точными могут быть экспресс-тесты прикроватной диагностики (D-димеры), основанные на принципе иммунодиффузии.

D-димеры

Определение D-димеров имеет высокую диагностическую чувствительность, но относительно низкую специфичность для синдрома ДВС (табл. 6.40). Низкая специфичность обусловлена ложноположительными результатами, объясняется это тем, что данный тест фактически выявляет продукты деградации поперечно-сшитого фибрина, который составляет основу венозных тромбов и отражает наличие перекрестно-сшитого фибрина, причем не только внутрисосудистого, но и экстравазального.

Таблица 6.40. Сравнительная характеристика специфичности и чувствительности тестов для диагностики синдрома ДВС (%)

Тест	Больные с ДВС (кол-во положительных результатов)	Больные без ДВС (кол-во положительных результатов)
D-димеры	93,7	20
Антитромбин (снижение)	87,5	6
Фибринопептид А	89,5	13
ПДФ	83,7	40

Гипофибриногенемия является важным признаком синдрома ДВС. Однако следует учитывать, что синдром ДВС часто возникает на фоне исходного повышения содержания фибриногена в плазме (при беременности, инфекционно-воспалительных и иммунных процессах, некрозах органов, некоторых опухолях), так как фибриноген – острофазный белок. В силу этого абсолютное снижение концентрации фибриногена ниже нормальных величин наблюдается примерно у 50% больных с синдромом ДВС. Поэтому не абсолютный уровень, а выявление динамики снижения уровня фибриногена имеет более важное диагностическое значение при развитии синдрома ДВС.

Диагностический алгоритм Международного общества тромбозов

Комбинация клинического наблюдения и панели лабораторных тестов с обязательным их повторением позволяет с уверенностью ставить диагноз в большинстве случаев. Эта концепция была положена в основу разработки Международным обществом по тромбозам и гемостазу (ISTH) диагностического алгоритма (табл. 6.41), который может быть использован для диагностики явного ДВС. В этом подходе нет четкого деления синдрома ДВС на фазы, но все позиции представлены и включены в алгоритм на основании клинической валидации и лабораторной практики.

Начальной точкой отсчета диагностики синдрома ДВС является клиническая оценка больного и основной диагноз. Только при наличии заболевания, которое ассоциировано с развитием ДВС, целесообразно предпринять дальнейшие диагностические шаги. Диагноз синдрома ДВС должен быть обоснован комбинацией

Таблица 6.41. Алгоритм диагностики развернутого синдрома ДВС

1.	Оценка риска развития ДВС: имеет ли больной заболевания или расстройства, которые могут явиться причиной развития ДВС? • Если ДА, продолжите использование алгоритма. • Если НЕТ, откажитесь от заполнения следующих граф
2.	Выполните основные коагуляционные тесты : количество тромбоцитов, протромбиновое время, фибриноген, продукты, подтверждающие образование фибрина (ПДФ, D-димер)
3.	Баллы по результатам основных коагуляционных тестов: • количество тромбоцитов ($10^9/\text{л}$) ($>100 = 0$, $<100 = 1$, $<50 = 2$); • повышение продуктов, подтверждающих образование фибрина, например, D-димеры (не повышены = 0, умеренно повышены = 2, значительно повышены = 3); • удлинение протромбинового времени (менее чем на 3 с = 0; >3 с, но <6 с = 1; >6 с = 2); • концентрация фибриногена в плазме ($>1,0$ г/л = 0; $<1,0$ г/л = 1)
4.	Расчет индекса : • Результат ≥ 5 соответствует острому синдрому ДВС: повторить исследования на следующий день. • Результат <5 предполагает (но не утверждает), что синдрома ДВС нет. Повторить исследования в течение последующих 1–2 дней

исследований: количество тромбоцитов, общие клоттинговые тесты (АЧТВ, ПВ), исследование активности 1–2 факторов свертывания и ингибиторов (антипротромбина) и тесты для обнаружения ПДФ. Выполнение исследований в динамике значительно важнее, чем единичные лабораторные тесты.

Уменьшенное количество тромбоцитов или тенденция к их снижению при последовательных измерениях является чувствительным (хотя и неспецифичным) тестом для диагностики ДВС. Удлинение клоттинговых тестов отражает потребление и истощение факторов свертывания, которое в дальнейшем может быть подтверждено исследованием факторов V или VII. Определение количества фибриногена, которое широко представляется как полезное исследование для диагностики ДВС, на самом деле не дает достоверной информации. Уровень фибриногена как белка острой фазы может быть не изменен или повышен; он может быть повышен также при беременности. Вследствие этого, несмотря на потребление, плазменный уровень фибриногена может быть сохранен в референтных пределах.

Важным в диагностике ДВС является определение растворимого фибрина в плазме. Большинство клинических исследований показали чувствительность этого метода 90–100% при очень низкой специфичности. Однако надежные тесты для определения растворимого фибрина, количественной его оценки, маркеров активации свертывания, таких как фрагмент 1+2 протромбина, не всегда доступны для практического использования.

Тесты на определение ПДФ и D-димеров могут быть неспецифично повышены, однако дают полезную информацию при дифференциальной диагностике ДВС и других клинических ситуаций, сопровождающихся снижением числа тромбоцитов и факторов свертывания, например при хронических заболеваниях печени.

Диагностический алгоритм для неявного ДВС несколько отличен (табл. 6.42). В представленном алгоритме основным является динамика показателей, и соответственно, результаты ежедневных расчетов. Предполагается, что шкала должна быть адаптирована к конкретным условиям работы и выполняемым в лаборатории тестам.

Таблица 6.42. Алгоритм диагностики неявного синдрома ДВС (шкала Международного общества по тромбозам и гемостазу ISTH)

1.	Оценка риска развития ДВС: имеет ли больной заболевания или расстройства, которые могут явиться причиной развития ДВС? ДА = 2 балла НЕТ = 0 баллов		
2.	Балльные критерии по результатам основных коагуляционных тестов. Динамика изменений за 24 часа		
	Количество тромбоцитов ($10^9/\text{л}$): >100 = 0 <100 = 1	+	Повышается = -1 Стабильно = 0 Снижается = 1
	Растворимый фибрин/продукты деградации фибрина: не повышены = 0 повышены = 1		Снижается = -1 Стабильно = 0 Повышается = 1
	Удлинение протромбинового времени: менее чем на 3 с = 0 >3 с = 1		Снижается = -1 Стабильно = 0 Повышается = 1
3.	Проведите расчеты. Максимальное количество баллов = 6		
4.	Специфические критерии: Антитромбин: нормальный = -1 Протеин С: нормальный = -1 Тромбин-антитромбиновые комплексы: нормальный = -1 Другие доступные исследования: нормальный = -1		
5.	Произведите расчет: сумма баллов более 5 – скрытый синдром ДВС		
6.	Выполняйте исследования и калькуляцию ежедневно		

Лабораторные исследования дополнены показателями клинического анализа крови (лейкоциты, сдвиг формулы влево). Однако основные лабораторные критерии коагуляции немногочисленны и стандартны – тромбоциты, протромбиновое время, фибриноген. Принципиальное положение шкалы ISTH состоит в обязательном выявлении и учете возможной причины ДВС.

Клинический случай 6.24

Пациентка И., 28 лет, поступила в отделение реанимации с диагнозом «состояние после родоразрешения путем кесарева сечения в сроке беременности 32–34 недели; эклампсия; антенатальная гибель плода; геморрагический синдром».

Коагулограмма пациентки И.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	49	25–40 с
Протромбиновая активность по Квику	50	>70%
Протромбиновое время	17	12 с
Тромбиновое время	38	16–25 с
Концентрация фибриногена	1,6	2,8–4,7 г/л
Активность антитромбина	40	83–123%
D-димеры	1,89	0–0,24 мкг/мл
Количество тромбоцитов	48	150–450 × 10 ⁹ /л

Заключение. Наиболее вероятной причиной нарушений является наличие синдрома ДВС, для которого имеется клиническое основание. Требуется дифференциальная диагностика со вторичной коагулопатией, связанной со снижением белок-синтезирующей функции печени и гемодилюционной коагулопатией за счет разведения крови при массивной инфузионной терапии.

Комментарии. Учитывая клиническую ситуацию, возможно и необходимо применение шкалы диагностики ДВС Международного общества по тромбозу и гемостазу. Коагулограмма свидетельствует о гипокоагуляции по клоттинговым тестам плазменного гемостаза (удлинение протромбинового времени на 5 сек = 1 балл), гипофибриногемии (уровень фибриногена >1 г/л = 0 баллов), тромбоцитопении (количество тромбоцитов <50 × 10⁹/л = 2 балла), повышении D-димера как продукта, подтверждающего образование фибрина (умеренное = 2 балла). В соответствии со шкалой оценки количество набранных баллов = 6, показатели соответствуют острому синдрому ДВС. Кроме того, имеет место снижение активности антитромбина за счет потребления естественных антикоагулянтов.

Для снижения белок-синтезирующей функции печени нехарактерна тромбоцитопения; гемодилюционная коагулопатия не сопровождается повышением продуктов деградации фибрина, однако наличие маркеров тромбинемии (D-димеры) может иметь место в послеоперационном периоде и при воспалении.

Для окончательной верификации диагноза необходимо повторение исследований в динамике при тщательном контроле инфузионной тактики, коррекции параметров гемостаза и предотвращении инфекционных осложнений.

Шкала ISTH является не единственным вспомогательным инструментом для диагностики синдрома ДВС. Японским министерством здравоохранения (Japan Ministry of Health Labor and Welfare – JMHLW) и Ассоциацией специалистов неотложной медицины (Japanese Association for Acute Medicine – JAAM) предложены две шкалы с дополнительными критериями оценки. Японские шкалы включают оценку клинических проявлений, уточняют количественную характеристику наличия ПДФ и используют протромбиновое отношение (протромбиновое время больного / протромбиновое время нормальной плазмы) вместо протромбинового времени в секундах. Сравнительная характеристика диагностических шкал представлена в табл. 6.43.

Таблица 6.43. Сравнительная характеристика международных шкал диагностики синдрома ДВС

Параметр	Критерии явного ДВС по ISTH	Критерии ДВС по JMHLW	Критерии ДВС по JAAM
Соответствующее заболевание	0 баллов	1 балл	0 баллов
Клинические проявления	0 баллов	Кровотечение – 1 балл ОПП – 1 балл	SIRS более 3 – 1 балл
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	От 50 до 100 – 1 балл Менее 50 – 2 балла	От 80 до 120 – 1 балл От 50 до 80 – 2 балла Менее 50 – 3 балла	От 80 до 120 и снижение на 30% – 1 балл От 50 до 80 и снижение – 3 балла
ПДФ, мкг/мл	Умеренное повышение – 2 балла Выраженное повышение – 3 балла	От 10 до 20 – 1 балл От 20 до 40 – 2 балла Более 40 – 3 балла	От 10 до 25 – 1 балл Более 25 – 3 балла
Фибриноген, г/л	Менее 1,0 – 1 балл	От 1 до 1,5 – 1 балл Менее 1,0 – 2 балла	Нет
Протромбиновое время или протромбиновое отношение	От 3 до 6 с – 1 балл Более 6 с – 2 балла	1,25–1,67 – 1 балл Более 1,67 – 2 балла	Более 1,2 – 1 балл
Диагноз ДВС	Более 5 баллов	Более 7 баллов	Более 4 баллов

Закljučая главу о патологии гемостаза, необходимо еще раз отметить сложность клинико-диагностических задач, многообразие подходов и неисчерпанные возможности лабораторной диагностики. Дальнейшее совершенствование методов и технологий позволит максимально эффективно транслировать научные достижения в практику, разрабатывать отечественные тест-системы и приборы, делать диагностические шаги клинически эффективными и экономически целесообразными.

Вопросы к главе 6

1. Каким образом связаны тромбоцитопения и миелодиспластический синдром?
2. По какой причине при синдроме ДВС развивается тромбоцитопения и тромбоцитопатия?
3. Почему контроль по АЧТВ не является наиболее эффективным при лечении низкомолекулярным гепарином?
4. Каковы лабораторные критерии, используемые при диагностике антифосфолипидного синдрома?
5. В чем идея проведения лабораторного скрининга при подозрении на патологию системы гемостаза?
6. Какие тесты логично включить в ориентировочную коагулограмму для выявления тромбофилии?
7. Каковы основные тесты при выполнении расширенной коагулограммы для определения причины кровотечения?
8. Какие лабораторные тесты позволяют выявить тип болезни Виллебранда?
9. Какими лабораторными тестами выявляются нарушения свертывания крови при дефиците факторов контактной активации?
10. Какие лабораторные тесты необходимы, чтобы диагностировать врожденное нарушение функции тромбоцитов?
11. В результате каких механизмов и когда развивается гепарин-индуцированная тромбоцитопения?
12. Какие лабораторные исследования и с какой целью назначаются для диагностики ТЭЛА?
13. Почему рекомендуются генетические исследования при тромбофилии? Каковы их ограничения?
14. Опишите диагностические шкалы для определения синдрома ДВС.
15. Какие лабораторные тесты, отрицательные в норме, становятся значимыми при синдроме ДВС?

Тесты для главы 6

Инструкция: Выбрать один правильный ответ

06.01. Увеличение содержания в крови фибриногена прямо связано со следующими качествами, кроме:

- А) изменения реологических свойств крови
- Б) независимый риск-фактор инфаркта миокарда и инсульта
- В) аутоиммунная тромбоцитопения
- Г) воспалительная реакция
- Д) усиление агрегации тромбоцитов

06.02. Определение протеина С рекомендовано в следующих случаях, кроме:

- А) диагностика наследственной тромбофилии
- Б) при терапии оральными антикоагулянтами
- В) при синдроме привычного невынашивания беременности
- Г) при синдроме ДВС
- Д) при контроле лечения фибринолитическими препаратами

06.03. К патологическому состоянию, протекающему преимущественно с гипокоагуляцией, относится:

- А) атеросклероз
- Б) болезнь Виллебранда
- В) облитерирующий эндартериит
- Г) злокачественные новообразования
- Д) тромбоз

06.04. У больного гемофилией А на фоне применения терапии концентратами фактора VIII возникло тяжелое кровотечение. Возможная причина:

- А) возникла недостаточность фибринолиза
- Б) развилась болезнь Виллебранда
- В) возникла системная красная волчанка
- Г) образовался иммунный ингибитор фактора VIII
- Д) лечение осложнилось тромбоцитопатией

06.05. Фаза «потребления» синдрома ДВС характеризуется:

- А) высоким уровнем фибриногена
- Б) удлинением АЧТВ
- В) нормальным тромбиновым временем
- Г) продукты деградации фибрина не обнаруживаются или их мало
- Д) нормальным количеством тромбоцитов

06.06. Маркером тромбоза является:

- А) увеличение количества фибриногена
- Б) активация фибринолиза
- В) D-димер
- Г) удлинение АЧТВ
- Д) активация протеина С

06.07. При поражении гепатоцитов наиболее типично:

- А) повышение фибриногена
- Б) снижение активности факторов II, VII, IX, X
- В) снижение активности фактора VIII
- Г) повышение антитромбина
- Д) тромбоцитопения

06.08. Больному со стенозом митрального клапана планируется операция.

Коагулограмма: количество тромбоцитов – $210 \times 10^9/\text{л}$ (*референтный интервал* $150\text{--}400 \times 10^9/\text{л}$), время кровотечения – 8 мин,

ПВ, АЧТВ, концентрация фибриногена, фибринолитическая активность, антитромбин – в норме. Снижена ретракция кровяного сгустка. В каком звене гемостаза имеются нарушения? Какие дополнительные методы исследования необходимы?

- А) возможны нарушения в тромбоцитарном звене гемостаза: признаки тромбоцитопатии, рекомендуется исследовать функцию тромбоцитов (адгезия, агрегация)
- Б) нарушения во внутреннем каскаде активации протромбиназы, рекомендуется определить активность факторов VIII, IX
- В) нарушения во внешнем каскаде активации протромбиназы, рекомендуется определить активность фактора X
- Г) нарушения в антикоагулянтном звене, следует определить активность протеина С
- Д) нарушения фибринолиза, следует определить наличие продуктов паракоагуляции, ПДФ

06.09. Ребенок, 2 года. Кожный гемосиндром по гематомному типу, возник после падения. Коагулограмма: время кровотечения – 6 мин,

ПВ – 13 с (*референтный интервал* $16\text{--}20$ с),

АЧТВ – 92 с ($20\text{--}45$ с), фибриноген – $2,8 \text{ г/л}$ ($2\text{--}4 \text{ г/л}$), тромбоциты – $280 \times 10^9/\text{л}$ ($150\text{--}400 \times 10^9/\text{л}$), активность ф. VIII – 4%, активность ф. IX – 95%. При молекулярно-генетическом исследовании была выявлена мутация в гене фактора VIII. Диагноз:

- А) наследственная гемофилия А
- Б) наследственная гемофилия В
- В) болезнь Виллебранда
- Г) болезнь Стюарта–Прауэра
- Д) наследственная гипопротромбинемия

- 06.10.** У больной 34 лет имеется осложненный акушерский анамнез:
2 потери беременности по неизвестной причине на сроке 7–8 недель.
При обследовании волчаночный антикоагулянт не определяется.
Имеется повышение антикардиолипидных антител класса G –
23 МЕ/мл (N до 20 МЕ/мл). Выберите правомочное утверждение:
- А) для диагностики АФС необходимо повторить через 12 недель исследование волчаночного антикоагулянта и антикардиолипидных антител
 - Б) для диагностики АФС необходимо выполнить исследование антител к β_2 -гликопротеину 1
 - В) диагноз АФС очевиден, необходима постоянная антикоагулянтная терапия
 - Г) для диагностики АФС недостаточно клинического критерия, необходимо продолжить наблюдение за больной

Глава 7. ПРИНЦИПЫ И ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Антитромботические средства

Выбор лекарственных препаратов для лечения состоявшегося тромбоза или его профилактики должен основываться на понимании приведенных выше механизмов функционирования системы гемостаза. Препаратами выбора при артериальных сосудистых событиях являются антиагреганты (аспирин, клопидогрел, тикагрелор и др.). При венозных тромбозах и риске образования внутрисердечных тромбов требуется применение антикоагулянтных препаратов, воздействующих на плазменные факторы свертывания крови – белки, последовательная активация которых приводит в конечном итоге к образованию фибринового тромба. Прерывание этой физиологической цепочки обеспечивает предупреждение тромбообразования, хотя и несет в себе риски геморрагических осложнений.

В арсенале современных антикоагулянтов можно выделить несколько групп – гепарины и близкий им по активности и механизму действия фондапаринукс, антагонисты витамина К (антивитамин К препараты – АВК) и прямые пероральные ингибиторы факторов свертывания. В табл. 7.1 представлены группы антитромботических средств, которые используются в клинической практике.

Таблица 7.1. Антитромботические средства

Антиагреганты (влияют на функциональное состояние тромбоцитов)	Антикоагулянты (влияют на плазменные факторы свертывания крови)	
	Парентеральные	Пероральные
Ацетилсалициловая кислота (<i>аспирин</i>) Блокаторы рецепторов тромбоцитов к АДФ Блокаторы рецепторов тромбоцитов к фибриногену (рецепторов GP IIb/IIIa)	Гепарин нефракционированный Гепарин низкомолекулярный – <i>надропарин, фраксипарин, эноксапарин, бемипарин</i> и др. Блокатор фактора Ха – <i>фондапаринукс</i> Прямой ингибитор тромбина – <i>бивалирудин</i>	Антагонисты витамина К – <i>варфарин, аценокумарол, фенпрокумон</i> (монокумарины), индандионы Прямые ингибиторы факторов свертывания – <i>дабигатран, аликсабан, ривароксабан, эдоксабан</i>

Необходимость и выбор метода лабораторного контроля антитромботического средства определяются многими факторами: фармакологическим действием, шириной терапевтического окна, фармакокинетикой, индивидуальной чувствительностью, лекарственными взаимодействиями, клинической доказательной базой, а также лабораторными возможностями – чувствительностью и специфичностью соответствующих лабораторных исследований. Исходя из этих характеристик, не все лекарственные препараты антитромботической группы нуждаются в лабора-

торном контроле (табл. 7.2). Часть из них строго зависит от результатов лабораторных исследований, которые определяют дозу препарата; другие нуждаются лишь в периодической оценке метаболизирующих и выводящих органов; третьи не

Таблица 7.2. Лабораторные исследования в оценке действия и контроле антитромботических препаратов

Группы препаратов	Лабораторные тесты	
	Обязательные	Могут быть полезны
Ацетилсалициловая кислота (аспирин)	Нет	Исследования с индукторами: коллаген, арахидоновая кислота – для аспирина, АДФ – для блокаторов рецепторов тромбоцитов к АДФ
Блокаторы рецепторов тромбоцитов к АДФ (клопидогрел, тикагрелор, прасугрел)		
Блокаторы рецепторов тромбоцитов к фибриногену (рецепторов GP IIb/IIIa)	Нет	Нет
Гепарин нефракционированный	Время активированного свертывания при тотальной гепаринизации (экстракорпоральные методы), АЧТВ при использовании лечебных доз, количество тромбоцитов регулярно с 5-го по 14-й день терапии	Антитромбин, оценка функции почек
Гепарин низкомолекулярный (надропарин, фраксипарин, эноксапарин, бемипарин и др.)	Количество тромбоцитов регулярно с 5-го по 14-й день терапии	Антитромбин, анти-Ха активность при использовании терапевтических доз в отдельных группах больных
Блокатор фактора Ха – фондапаринукс	Нет	Нет
Прямой ингибитор тромбина – бивалирудин	Нет	Нет
Антагонисты витамина К: варфарин, аценокумарол, фенпрокумон, индандионы	МНО в течение всего времени терапии, АЧТВ однократно в начале лечения	Оценка функции печени, фармакогенетический анализ чувствительности к варфарину – генотип CYP2C9, VKORC1
Прямые ингибиторы факторов свертывания – аликсабан, дабигатран, ривароксабан, эдоксабан	Разведенное тромбиновое время (дабигатран), анти-Ха активность (аликсабан, ривароксабан, эдоксабан)	Скрининговые тесты коагулограммы, в определенных клинических ситуациях наблюдение за функцией почек с оценкой скорости клубочковой фильтрации

зависят от лабораторных исследований, назначаются и дозируются в соответствии с клиническими показаниями и факторами риска тромбозов и кровотечений. Клиническая оценка факторов риска тромбозов и кровотечений для обеспечения оптимального соотношения эффективности и безопасности антитромботической терапии – ключевой момент для успешной терапии.

Лабораторный контроль гепаринотерапии

Гепарин – глюкозаминогликан, получаемый путем экстракции в основном из тканей легких крупного рогатого скота, свиньи или из слизистой оболочки кишечника быков. Слабо очищенная фракция – это *нефракционированный гепарин (НФГ)*, он имеет М. м. от 5000 до 30 000 Да, в основном ингибирует тромбин. *Низкомолекулярный гепарин (НМГ)*, получают из НФГ путем энзиматической и химической деградации. НМГ в большей степени ингибирует фактор Ха, чем тромбин. Сравнительные характеристики НФГ и фракционированного НМГ представлены в табл. 7.3.

Таблица 7.3 Сравнительная характеристика нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов

	Низкомолекулярный гепарин	Нефракционированный гепарин
Молекулярная масса, Да	3000–5000	5000–30 000
Удлинение АЧТВ	+	++++
Удлинение тромбинового времени	+	++++
Реакция теста анти-Ха с использованием соответствующих калибраторов и контрольных материалов	++++	++
Изменение агрегации тромбоцитов	+	++++
Связывание с эндотелином	+	++
Липопротеинлипазная активность	+	++++
Клинические проявления кровоточивости	++	+++

Контроль за лечением нефракционированным гепарином

АЧТВ – основной тест в контроле за дозированием и оценке соотношения эффективность/безопасность использования нефракционированного высокомолекулярного гепарина. При назначении гепаринотерапии необходимо определять количество тромбоцитов до лечения и далее каждые 3 дня с 5-го по 14-й день терапии. Периодичность, сроки и характер лабораторного контроля НФГ определяются дозами и путем введения препарата.

- Временная массивная гепаринизация – определение времени активированного свертывания (ФСТ – activated clotting time). Тест выполняется на

специальном приборе в режиме прикроватной диагностики анестезиологом и перфузиологом при проведении искусственного кровообращения.

- Низкие дозы гепарина (менее 15 000 Ед/сут) существенно не влияют на тесты коагулограммы, не требуют временного лабораторного мониторинга. АЧТВ дозо-зависимо не меняется.
- Лабораторный контроль терапевтических доз НФГ (400–800 Ед/кг/день) состоит в определении кратности удлинения АЧТВ по сравнению с контрольной плазмой. Обычно рекомендуется удлинение в 2,0–2,5 раза; время взятия крови не имеет значения, действие гепарина начинается быстро. При первом болюсном введении гепарина с последующей инфузией кровь можно исследовать через 1 час. В настоящее время отдается предпочтение внутривенному инфузионному методу введения для поддержания стабильной гипокоагуляции. При подкожном введении используются профилактические дозы гепарина, не требующие контроля (до 20 000 Ед/сутки).

Клинический случай 7.1

Пациент Н., 24 года, находится в отделении реанимации с диагнозом «состояние после пластики дефекта межжелудочковой перегородки (5 ч после операции) в условиях искусственного кровообращения; геморрагический синдром». Кровь направлена в КДЛ для выяснения причины геморрагического синдрома.

Коагулограмма пациента Н.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	200	25–40 с
Протромбиновая активность по Квику	117	>70%
Тромбиновое время	Не определяется	16–25 с
Концентрация фибриногена	5,1	2,8–4,7 г/л
Активность антитромбина	93	83–123%
D-димеры	1,2	0–0,24 мкг/мл
Количество тромбоцитов	415	150–450 × 10 ⁹ /л

Заключение. Недостаточная нейтрализация нефракционированного гепарина.

Комментарий. Причину геморрагического синдрома в послеоперационном периоде приходится дифференцировать между острым синдромом ДВС, передозировкой антикоагулянтных препаратов (недостаточной нейтрализацией гепарина) и дилуционной коагулопатией. Такого рода гипокоагуляцию по гепарин-зависимым тестам (АЧТВ и ТВ), без изменения протромбиновой активности и концентрации фибриногена, вызывает в терапевтической дозировке нефракционированный гепарин (НФГ). Против синдрома ДВС и дилуционной коагулопатии говорит нормальная протромбиновая активность, сохранная

активность антитромбина и несниженное количество тромбоцитов. Кроме того, в крови отсутствуют признаки повышенного фибринообразования, характерного для ДВС, но не для дилуционной коагулопатии. Снимается передозировка гепарина положительным эффектом антидота гепарина – протаминсульфатом.

Контроль за лечением низкомолекулярным фракционированным гепарином

Низкомолекулярные гепарины вводятся в соответствии с показаниями на основании инструкций к применению препаратов; их дозирование отличается у разных пациентов и при разных целях применения – профилактика или лечение тромбозмболических осложнений. Препараты этой группы не влияют на результаты измерения скрининговых тестов и не могут быть обнаружены или мониторированы с помощью скрининговых тестов. Единственным лабораторным исследованием, которое дозо-зависимо отражает их фармакологическое действие, является анти-Ха-активность, однако рутинное измерение этого параметра не требуется. Исследование может быть полезно в отдельных группах больных, получающих лечебные дозы НМГ: беременные (клинический пример 7.1), больные с экстремально низкой или высокой массой тела, больные с почечной недостаточностью. Рекомендуется определение анти-Ха-активности, по крайней мере, в начале лечения. Тест анти-Ха заключается в измерении оставшегося фактора Ха с использованием специфического хромогенного субстрата. Взятие крови должно осуществляться через 3 часа после инъекции препаратов в соответствии с их фармакокинетикой. В среднем рекомендуемый диапазон анти-Ха-активности в этой точке составляет 0,8–1,2 МЕ/мл. По данным некоторых производителей, она не должна превышать 1,5 МЕ/мл на пике действия препарата, в противном случае существенно повышается риск кровотечений. Минимальное значение (перед следующей инъекцией) для различных популяций пациентов – 0,3–0,6 МЕ/мл.

Клинический случай 7.2

Больная Ш., 34 года, консультирована в связи с беременностью 11 недель и носительством Лейденской мутации в гетерозиготном состоянии. Имеет осложненный акушерский анамнез: выкидыш на 6-й неделе, настоящая беременность вторая. Имеется семейная история тромбозов у мамы и бабушки. Соматически здорова. Тромбозов у пациентки не было, не курит, масса тела не повышена. При обследовании: УЗИ плода в 9 недель – норма, гомоцистеин, D-димер – норма. Получает по назначению акушера-гинеколога дипиридамол (курантил) по 1 табл. × 3 раза (направлен на улучшение микроциркуляции, в том числе за счет эффекта дезагрегации), с 9-й недели получает надропарин 0,3 × 1 раз (низкомолекулярный гепарин). Однократно имело место носовое кровотечение.

Заключение врача, которое вызывает возражения. Больной, имеющей осложненный акушерский анамнез, семейную историю тромбозов и выявленную наследственную тромбофилию, показана профилактика тромбозмболических

осложнений и потери плода введением низкомолекулярного гепарина (надропарина) в течение беременности + не менее 2 недель после родов при благополучном течении.

Комментарий. Пациентка страдает наследственной тромбофилией умеренного риска. Потеря беременности на сроке 6 недель не характерна для данного вида тромбофилии. Тромбозов в анамнезе у женщины не было. В связи с этим представляется неоправданным раннее назначение профилактики гепарином, тем более что имеется указание на носовое кровотечение. Целесообразно начать профилактику при отсутствии иных дополнительных факторов риска с 28-й недели беременности. Назначение курантила, не являющегося антитромботическим препаратом и не включенного в рекомендации по профилактике тромбозомболических осложнений, в данном случае излишне. Лабораторное наблюдение за пациенткой не требуется. Показаний к дополнительным исследованиям для выявления иных форм тромбофилии на фоне беременности нет.

Контроль за лечением антагонистами витамина К

С середины XX в. основными препаратами с доказанной эффективностью в профилактике кардиоэмболических инсультов и рекуррентных венозных тромбозов и эмболий были антагонисты витамина К – препараты группы монокумаринов: варфарин, аценокумарол, фенпрокумон. В России основным препаратом является варфарин, зарегистрированный в 2002 г. Результаты многих исследований показали, что применение варфарина снижает относительный риск развития инсультов на 64%, а общую смертность на 26%. В результате действия варфарина на витамин-К-эпоксид-редуктазу блокируется переход неактивных витамин-К-зависимых факторов в активную форму. Образуются не способные к активации витамин-К-зависимые факторы (PIVKA), которые не могут фиксироваться на фосфолипидной поверхности, что приводит к удлинению времени фосфолипид-зависимых тестов. К витамин-К-зависимым относятся факторы IX, X, VII, II и естественные антикоагулянты-протеины С и S.

Преимущества антагонистов витамина К:

- доказанная высокая эффективность;
- пероральный способ введения;
- возможность длительного приема;
- не вызывают аутоиммунную тромбоцитопению;
- относительно низкая стоимость;
- возможность отследить влияние на свертывание крови по лабораторному показателю (см. клинический случай 7.3).

Недостатки антагонистов витамина К:

- сложность подбора дозы – большая вариабельность индивидуальной чувствительности к препарату и узкое терапевтическое окно;
- медленное развитие эффекта в начале терапии и медленное его угасание при отмене препарата;

- зависимость эффекта от диеты и приема других лекарств;
- относительно высокий риск кровотечения, особенно при неправильно организованной системе наблюдения за больными и высокой чувствительности к препарату.

Индивидуальная чувствительность к варфарину

Метаболизм варфарина зависит от влияния генетически запрограммированной активности печеночных ферментов семейства P-450 (CYP2C9), метаболизирующих варфарин, и белка-мишени (VKORC1). Эти ферменты и белок влияют на дозу препарата, необходимую для эффективной и безопасной защиты от тромбообразования. При затруднении подбора терапии для выявления или подтверждения генетически детерминированной высокой чувствительности пациента к действию варфарина исследуют генотип CYP2C9 и VKORC1:

- генотип CYP2C9*1/*1 – биотрансформация варфарина в печени не нарушена;
- «медленные» генотипы с носительством аллельных вариантов *2 и *3 – CYP2C9*1/*2, CYP2C9*2/*2, CYP2C9*1/*3, CYP2C9*3/*3, CYP2C9*2/*3 – биотрансформация замедлена / значительно замедлена;
- VKORC1 – аллельные варианты, генотип GG – «нормальная» чувствительность;
- VKORC2 – генотип GA, генотип AA – высокая/ очень высокая чувствительность.

Генетическое тестирование на полиморфизм, определяющий чувствительность к варфарину, выполненное до начала терапии для прогноза дозирования или снижения стартовой дозы препарата, позволяет персонализировать терапию. Тестирование доступно в большом количестве лабораторий. Знание генотипа по двум ключевым генам увеличивает безопасность приема препарата, уменьшает сроки подбора дозы и снижает время пребывания больного в зоне чрезмерной гипокоагуляции, имеет прогностическое значение. Генетическое тестирование стоит проводить только до начала лечения, поскольку коррекция дозы в дальнейшем осуществляется по уровню гипокоагуляции в соответствии с лабораторными критериями (МНО) независимо от результата исследования генотипа.

Контроль с использованием МНО

Узкое терапевтическое окно и риск передозировки с развитием кровотечений требуют постоянного контроля уровня гипокоагуляции на фоне приема варфарина. Лабораторным критерием является стандартизованный для «варфариновых» больных показатель – международное нормализованное отношение (МНО), целевое терапевтическое значение которого определено на основании многолетнего опыта наблюдения за пациентами, получающими монокумарины при разных заболеваниях. В основном клиническая ситуация требует поддержания уровня МНО в интервале 2,0–3,0, при котором достигается хорошая эффективность при достаточной безопасности приема препарата. Однако в

некоторых случаях (механические искусственные клапаны сердца, рецидивирующие тромбозы при антифосфолипидном синдроме) такой гипокоагуляции бывает недостаточно, и уровень МНО рекомендуется поднимать до 2,5–3,5 (табл. 7.4).

Таблица 7.4. Показания к использованию антивитамина К препаратов и рекомендуемая интенсивность гипокоагуляции по уровню МНО

Показания	Препараты и уровень МНО
Венозный тромбоз/эмболизм	МНО = 2,0–3,0, при антифосфолипидном синдроме до 2,5–3,5
Фибрилляция/трепетание предсердий	МНО = 2,0–3,0
Искусственные механические клапаны сердца; имеет значение позиция протеза (аортальная, митральная, комбинированное протезирование) и тип протеза	МНО = 2,5–3,5, редко – 2,0–3,0, при высоком риске и рецидивирующих тромбозных осложнениях может быть рассмотрено повышение МНО до 4–4,5

Клинический случай 7.3

Пациент С., 16 лет. Страдает врожденным пороком сердца. Получает антагонисты витамина К по поводу протезированного клапана. Госпитализирован в отделение интенсивной терапии в связи с внутричерепным кровоизлиянием. Выполнена коагулограмма. МНО = 1,8. Предположили, что передозировка антагонистов витамина К не явилась причиной кровоизлияния. Выполненное хирургическое вмешательство с последующим анализом удаленного материала показало, что причиной стала аневризма сосудов головного мозга. Значимых геморрагических проявлений интраоперационно не было.

Подбор дозы варфарина

- Подбор дозы всегда осуществляется по уровню МНО. Значение активности протромбинового комплекса, выраженное в процентах (процент протромбина по Квику), широко варьирует в разных лабораториях, не стандартизовано для больных, получающих варфарин, поэтому не может быть основанием для коррекции дозы препарата.
- Обычной стартовой дозой является 5 мг, а первое измерение МНО должно быть выполнено не позднее, чем после приема двух доз препарата.
- Последующий интервал измерений зависит от активности наращивания дозы и возможности лабораторного контроля (стационарное наблюдение или амбулаторное), составляя в среднем 3 дня; более частое измерение имеет смысл только в том случае, если при первом измерении получен результат МНО 2,0 и более (высокая чувствительность, опасность передозировки).

- Шаг наращивания дозы варфарина индивидуален, при хорошем контроле и медленном ответе больного может составлять 2,5 мг (1 таблетка) в сутки, хотя чаще используется 1,25 мг.
- После двух последовательно полученных результатов измерений МНО в терапевтическом интервале можно перейти на более редкое измерение, сохраняя в последующем частоту измерения не реже 1 раза в 1–1,5 мес.; при маленькой дозе препарата (высокая чувствительность, доза 2,5–3,75 мг/сут) измерение следует проводить чаще.
- Повышение МНО более 3,5 прогрессивно увеличивает риски кровотечений, однако в некоторых случаях даже МНО около 12 и более не дает клинических проявлений геморрагии. Тем не менее все случаи повышения этого показателя у пациента, принимающего варфарин, полученные в лаборатории, должны быть сообщены лечащему врачу или пациенту в тот же день. Критические значения для немедленного оповещения точно не определены, наиболее часто критическим устанавливается значение МНО > 4.

При подборе дозы, особенно в период поддержания гипокоагуляции, нет необходимости стремиться к ежедневной одинаковой дозировке; можно использовать варьирование дозы в разные дни, но обязательно равномерно распределяя их в течение недели. Истинная резистентность к варфарину встречается крайне редко, а доза в 25 мг/сут не является предельной. Важно соблюсти принцип «Не считайте таблетки, а следите за МНО». Одновременно с МНО в период подбора дозы необходимо выполнить измерение АЧТВ.

Успех использования варфарина и предупреждение геморрагических осложнений в большой степени зависит от организации работы с пациентом на длительном амбулаторном этапе. Оптимальная модель – организация кабинетов контроля антикоагулянтной терапии или on-line наблюдение за результатами измерения МНО. Кабинеты контроля антикоагулянтной терапии – это система подразделений стационара или поликлиники, тесно связанных с лабораторией, в которых наблюдаются больные, получающие варфарин, выполняется исследование МНО и вносится коррекция в антикоагулянтную терапию. Измерение МНО может проводиться и на портативном коагулометре, в том числе в режиме самоконтроля. Преимущество такой модели заключается в быстром получении информации об уровне антикоагуляции специально обученным медицинским персоналом, и соответственно, быстром принятии решения по дозированию препарата.

Клинический случай 7.4

Пациент М., 47 лет, доставлен «скорой помощью» в бессознательном состоянии с подозрением на острое нарушение мозгового кровообращения по геморрагическому типу. Со слов родственников, три месяца назад находился в стационаре по поводу тромбоза глубоких вен нижней конечности, принимает какой-то лекарственный препарат.

Коагулограмма пациента

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	55	25–40 с
МНО	11,0	0,9–1,2, при терапии антивитамином К препаратами индивидуальные уровни
Тромбиновое время	19	16–25 с
Концентрация фибриногена	4,9	2,8–4,7 г/л
Количество тромбоцитов	315	150–450 × 10 ⁹ /л

Заключение. Передозировка варфарина.

Комментарий. Антивитамин К препараты (варфарин) влияют на способность четырех факторов свертывания крови (II, VII, IX, X) переходить в активное состояние и проявлять свою активность. Снижение активности этих факторов выявляется гипокоагуляцией по АЧТВ (за счет фактора IX) и МНО (влияние факторов II, VII, X), без изменений со стороны ТВ и фибриногена. Передозировка варфарина может манифестироваться тяжелым геморрагическим синдромом, самым грозным проявлением которого является острое нарушение мозгового кровообращения по геморрагическому типу.

Рикошетные тромбозы при лечении антивитамином К препаратами

При лечении больных с дефицитом протеина С антивитамином К препаратами у них могут возникнуть некрозы кожи в результате рикошетных тромбозов. Если антикоагулянты назначаются в высокой стартовой дозе без поддержки гепарином, то возникает состояние, при котором протеин С, как витамин-К-зависимый антикоагулянт, очень быстро снижается (время его полужизни в системе циркуляции 4–6 ч). В то же время витамин-К-зависимые факторы свертывания, в том числе протромбин, остаются еще в пределах нормы (у них период полужизни 16–20 ч) (рис. 7.1). Быстрое снижение протеина С провоцирует в этом случае массивное тромбообразование, проявляющееся вплоть до некрозов кожи. Непосредственно в период лечения непрямymi антикоагулянтами (кумаринами) определение протеина С затруднено. Определять его в случае подозрения на наследственную тромбофилию следует до начала лечения кумаринами. В настоящее время варфариновые некрозы встречаются крайне редко. Это связано с тем, что, во-первых, стартовая доза препарата снижена до 5–10 мг (в 60–70-е годы XX века использовались значительно более высокие дозы), во-вторых, лечение тромбозов начинается часто с введения гепарина или его фракционированных препаратов и одновременного приема варфарина. Введение гепарина продолжается до достижения терапевтического значения МНО, но не менее 5 дней. В целях первичной профилактики тромбозов варфарин не используется. Его заменили низкомолекулярные гепарины или (в ортопедии) прямые ингибиторы факторов свертывания крови в таблетированном виде.



Рис. 7.1. Быстрое снижение протромбина С, превышающее уменьшение витамин-К-зависимых факторов свертывания, может быть причиной возникновения тромботического состояния (рикошетные тромбозы) при начале лечения высокими дозами антивитамина К препаратов

Прерывание терапии варфарином

В случае проведения оперативных вмешательств или по другим показаниям прерывание терапии варфарином проводится по определенным правилам с использованием принципа «моста», когда у больных высокого тромботического риска используются инъекции низкомолекулярного гепарина, а варфарин отменяется. Операция может выполняться достаточно безопасно при уровне МНО менее 1,5. При этом МНО постепенно снижается. Скорость снижения у разных пациентов разная — от 4–5 дней до недели и более. В послеоперационном периоде при условии надежного гемостаза и восстановленного питания больного как можно быстрее следует начинать прием варфарина, а введение НМГ сохраняется до достижения терапевтического значения МНО.

Прерывание терапии варфарином может быть связано и с другими причинами: кровотечением, госпитализацией в связи с острыми состояниями, восстановлением ритма, плохим контролем терапии. В том случае если варфарин назначается на определенный отрезок времени, например на 3, 6, 12 месяцев, при первом эпизоде тромбоза глубоких вен и ТЭЛА его отмена осуществляется по определенным правилам. Во-первых, прием препарата прекращается одномоментно, не требуется постепенного снижения дозы. При этом МНО снижается в указанные выше сроки. Во-вторых, перед отменой варфарина и через один месяц после его отмены необходимо измерить уровень D-димера количественным методом. Повышение уровня D-димера более верхней границы референтного интервала свидетельствует о повышенном риске повторного тромбоза в течение последующих 1–2 лет. Необходимо возобновить антикоагулянтную терапию и одновременно проанализировать возможные причины повышения D-димера. Важно не пропустить у пациента онкологическое заболевание. Не всеми исследователями признается целесообразность онкоскрининга у таких больных, исходя из соотношения затраты/эффективность.

Контроль за лечением пероральными антикоагулянтами – прямыми ингибиторами факторов Ха и IIa

Нежелательные свойства монокумаринов в значительной мере устранены в группе новых антикоагулянтов – прямых ингибиторов факторов свертывания крови (клинический случай 7.5). Предсказуемость эффекта, широкое терапевтическое окно и улучшенная безопасность, особенно в отношении внутричерепных кровоизлияний, выгодно отличают эти препараты.

Ривароксабан, апиксабан, эдоксабан – пероральные антикоагулянтные препараты, прямые ингибиторы факторов Ха (рис. 7.2). Они связываются с активным центром ф.Ха, снижая его активность.

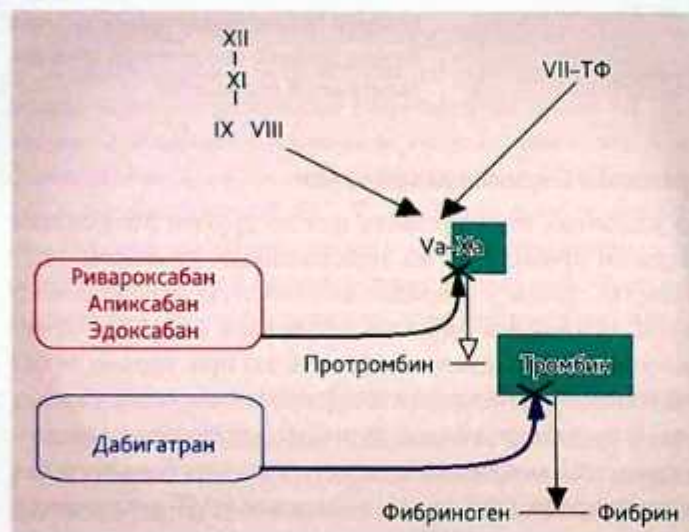


Рис. 7.2. Действие антикоагулянтов – прямых ингибиторов факторов свертывания крови. Они связываются с активным центром ф.Ха или тромбина и ингибируют эти активные факторы каскада свертывания

Клинический случай 7.5

Больная Л., 44 года. Диагноз: «посттромботический синдром; рецидивирующие тромбозы глубоких вен обеих нижних конечностей». Больная перенесла непровоцированный тромбоз глубоких вен в возрасте 34 лет; в дальнейшем – неоднократные рецидивы. Постоянно проводит антикоагулянтную терапию ривароксабаном 20 мг/сут. Не курит, наследственность не отягощена. Эстроген-содержащие препараты не принимала.

Заключение врача. Для исключения гематологических рисков и причин тромбозов необходимо дообследование. На фоне приема ривароксабана определение протейнов С, S, волчаночного антикоагулянта нецелесообразно. Учитывая невозможность прерывания терапии антикоагулянтами (высокий риск рецидивов), перечень исследований ограничен:

- 1) генетический анализ на тромбофилию;
- 2) гомоцистеин;
- 3) антитромбин;

4) антитела к $\beta 2$ -гликопротеину 1 (IgG/IgM), антикардиолипидные антитела (IgG/IgM).

Комментарий. Предполагаемые положительные результаты не будут иметь значения для тактики лечения. Перенесенные неоднократные эпизоды тромбозов являются показанием к постоянной антикоагулянтной терапии. В случае обнаружения антифосфолипидных антител к терапии добавить аспирин и плаквинил.

Дабигатран этексилат (прадакса) – прямой ингибитор ф. IIa (тромбина) – оказывает обратимое ингибирующее воздействие на тромбин, не зависящее от уровня антитромбина; прерывает процесс самоактивации коагуляционного каскада; выводится через почки в неизмененном виде, не ингибируется тромбоцитарным фактором 4, не вызывает аутоиммунную тромбоцитопению.

Скрининговые тесты не отражают дозо-зависимое действие прямых ингибиторов факторов свертывания крови и не должны использоваться в их мониторинге. Тем не менее присутствие активного вещества может влиять на результаты их измерения, поэтому исследование АЧТВ, протромбинового теста и тромбинового времени (для дабигатрана только) может быть полезно в экстренной ситуации или для безопасного проведения планового хирургического вмешательства (клинический случай 7.6). В настоящее время имеются лабораторные методы измерения концентрации прямых ингибиторов факторов свертывания крови в плазме: определение анти-Ха-активности для ривароксабана и апиксабана (использовать соответствующие калибраторы и контрольные материалы!), разведенное тромбиновое время или экариновое время – для дабигатрана. Эти методы доступны, но распространенность их невелика, так как препараты назначаются в фиксированной дозе в соответствии с результатами многочисленных и убедительных клинических исследований. Варианты лабораторных тестов и влияние препаратов на результаты измерений представлены в табл. 7.5.

Всем больным, получающим прямые ингибиторы факторов свертывания крови, необходимо мониторировать состояние почечной функции с целью при необходимости своевременной коррекции дозы. Критерием является клиренс креатинина или скорость клубочковой фильтрации. Частота измерения – не реже одного раза в год. В возрасте старше 70 лет – 1 раз в 6 месяцев, а при наличии хронической болезни почек – один раз в 3–4 месяца, так как почечная недостаточность у таких пациентов может прогрессировать быстро, а применение стандартных доз в этом случае небезопасно с точки зрения геморрагических осложнений. Прямые ингибиторы факторов Ха и IIa не применяются у детей и беременных женщин, пациентов с искусственными клапанами сердца, больных с нарушениями сердечного ритма клапанной этиологии. Недостаточно сведений о лечении этими препаратами тромбозов у больных с онкологическими заболеваниями и антифосфолипидным синдромом, у пациентов с максимальной опасностью тромбообразования. Только варфарин, влияющий в коагуляционном каскаде на несколько факторов свертывания, длительность циркуляции в кровотоке которых зависит от скорости их синтеза и элиминации, способен пре-

Таблица 7.5. Лабораторные тесты оценки концентрации прямых ингибиторов факторов свертывания и влияние препаратов на основные скрининговые лабораторные исследования

Параметр	Дабигатран	Аликсабан	Ривароксабан
Ожидаемая концентрация пероральных антикоагулянтов в плазме крови у пациентов с фибрилляцией предсердий			
Специфичные методы исследования	Разведенное тромбиновое время/экариновое время	Анти-Ха-активность плазмы	Анти-Ха-активность плазмы
Ожидаемый диапазон макс. концентрации в плазме крови для стандартной дозы (нг/мл)	64–443	69–321	184–343
Ожидаемый диапазон мин. концентрации в плазме крови для стандартной дозы (нг/мл)	31–225	34–230	12–197
Ожидаемое влияние пероральных антикоагулянтов на параметры коагуляции			
ПВ	↑	(↑)	↑↑ (↑)
АЧТВ	↑↑ (↑)	(↑)	↑
ТВ	↑↑↑↑	–	–

дотвратить опасность и стабильно сохранить пролонгированную необходимую гипокоагуляцию. Длительность и стабильность действия новых антикоагулянтов зависит от периода полужизни самого препарата и ограничивается временем его присутствия в крови. Это создает сложности при их приеме, а также зависимость от путей элиминации в случае печеночной или почечной недостаточности. Так, у пациентов с тяжелой почечной недостаточностью (клиренс креатинина менее 15 мл/мин), нуждающихся в антикоагулянтной терапии, возможно применение только варфарина. По-видимому, нет необходимости заменять варфарин на другой антитромботический препарат, если гипокоагуляционный эффект варфарина стабилен, а доза не изменяется в течение многих месяцев и даже лет.

Клинический случай 7.6

Пациент С., 80 лет, страдающий ишемической болезнью сердца, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью, доставлен «скорой помощью» в бессознательном состоянии с подозрением на острое желудочно-кишечное кровотечение. Имеет нарушения сердечного ритма – фибрилляцию предсердий. Со слов родственников, принимает большое количество лекарственных препаратов. Для выяснения характера нарушений гемостаза и определения типа препарата выполнена коагулограмма.

Коагулограмма пациента С.

Наименование теста	Результаты пациента	Референсные интервалы
АЧТВ	49	25–40 с
МНО	1,2	0,9–1,2. При терапии варфарином индивидуальные уровни
Тромбиновое время	Не определяется (более 300 сек)	16–25 с
Концентрация фибриногена	5,1	2–4 г/л
Количество тромбоцитов	550	150–400 × 10 ⁹ /л

Заключение. Лабораторные признаки эффектов прямого селективного ингибитора тромбина (Па-фактора) – дабигатран этаксилата. Целесообразно использование препарата, купирующего действие дабигатрана – идаруцизумаба – для остановки кровотечения.

Лабораторный контроль за терапией антиагрегантами

В лечебных целях применяется несколько групп ингибиторов сосудистотромбоцитарного гемостаза. Антиагреганты жизненно необходимы больным с клиническими проявлениями атеросклероза, включая больных с острым коронарным синдромом с подъемом и без подъема сегмента ST на ЭКГ, нестабильной стенокардией, ишемической болезнью мозга, периферическим атеросклерозом.

Ингибиторы циклооксигеназы

Основным действием ингибиторов циклооксигеназы является блокада образования тромбоксана А₂ в тромбоцитах. К этой группе относится ацетилсалициловая кислота (аспирин, кардиомагнил, тромбоасс). До 10% людей в популяции имеют низкую чувствительность тромбоцитов к аспирину. Биохимическая резистентность по уровню тромбоксана В₂, измеренного в моче, составляет около 5%. Этот феномен получил название резистентности. В основном резистентность связана с тем, что циклооксигеназа (ЦОГ) присутствует на тромбоцитах в виде 2 изоформ – ЦОГ-1 и ЦОГ-2. При преобладании ЦОГ-2 действие аспирина слабо выражено или отсутствует. В результате в тромбоцитах сохраняется синтез тромбоксана А₂, его активирующее действие на тромбоциты не снимается аспирином. Так как препараты ацетилсалицилового ряда для профилактики сосудистых осложнений принимаются годами, в том числе в комплексе с другой антитромботической терапией, в некоторых группах пациентов целесообразен контроль функции тромбоцитов в процессе приема аспирина.

Обязательных рекомендаций для лабораторного контроля терапии антиагрегантами не существует; их назначение и дозирование проводятся исходя из клинических данных. Тем не менее опыт ряда медицинских центров показывает, что исследование агрегации тромбоцитов при оценке эффективности лечения антиагрегантами может быть полезным. В соответствии с международными ре-

комендациями считается целесообразным исследование остаточной активности тромбоцитов на фоне приема антиагрегантов у особых групп больных высокого риска (тромбоз стента в анамнезе), для оценки приверженности лечению, при подозрении на резистентность к препаратам, высоком риске кровотечений.

Блокаторы АДФ-рецепторов тромбоцитов

Разработка препаратов, влияющих только на P2Y₁₂-рецепторы, и низкая распространенность «аспиринрезистентности» привели к тому, что изучение функции тромбоцитов связано в основном с антиагрегантами, влияющими на АДФ-зависимые рецепторы, и в первую очередь с клопидогрелом. В табл. 7.6 представлены методы оценки агрегации тромбоцитов на фоне приема антиагрегантов с указанием их преимуществ и недостатков.

Блокаторы АДФ-рецепторов – это препараты, проявляющие на фоне приема антиагрегантов P2Y₁₂-специфичность, в частности клопидогрел, эффекты которого с точки зрения резистентности наиболее изучены. Однако действие клопидогрела является слабо прогнозируемым, так как препарат не является активным веществом, а требует для осуществления антитромбоцитарного эффекта связывания с преобразованием в системе печеночных микросомальных ферментов семейства цитохрома 450 (CYP 450). После абсорбции в кишечнике около 85% принятого препарата инактивируется эстеразами плазмы и выводится кишечником. Оставшаяся часть подвергается двухэтапной биотрансформации в печени с участием ферментов семейства CYP 450. Образовавшийся короткоживущий метаболит действует на тромбоциты, связываясь с рецепторами. Системам транспортеров и биотрансформации присущ генетический полиморфизм с изоформами с высокой и низкой активностью. Генотипирование на полиморфизм CYP2C19* может быть полезно для определения генетической резистентности к клопидогрелу.

Длительное применение клопидогрела можно контролировать по спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов. Выбор метода зависит от возможностей лаборатории, накопленного локального опыта и задач, которые ставят клиницисты.

Лабораторный контроль за лечением фибринолитическими препаратами

Тромболитическая терапия является основным методом быстрой и ранней медикаментозной ликвидации тромбов, частичного или полного восстановления кровотока в тромбированном сосуде. Введение препаратов осуществляется системно, реже непосредственно к месту образования тромба через катетер.

Фибринолитики применяются разово в период острого тромбоза, болюсно. Как правило, лабораторный контроль не требуется, введение препарата выполняется по клиническим показаниям с клиническим и ультразвуковым или ангиографическим контролем. Некоторые лабораторные методы реагируют на проведение тромболитической терапии и в какой-то мере позволяют оценить ее эффективность и безопасность (табл. 7.7).

Таблица 7.6. Основные методы исследования активности тромбоцитов для оценки действия антиагрегантных препаратов

Параметр	Методы оценки					
	Агрегация по Борну	PFA-100/200	VerifyNow	Multiplate	VASP-проточная цитометрия	Импедансная агрегатометрия
Материал	Плазма, богатая тромбоцитами	Цельная кровь	Цельная кровь	Цельная кровь	Цельная кровь	Цельная кровь
Индуктор	АДФ, коллаген, арахидоновая кислота	АДФ, коллаген	АДФ	АДФ	АДФ	АДФ, коллаген
Время проведения теста	20–25 мин	8 мин	6 мин	10 мин	2–3 часа	20 мин
P2Y12-специфичность	Частичная	Частичная	Частичная	Частичная	Полная	Частичная
Порог риска тромбоза	Отсутствует	Не регламентирован	>208PRU	>46U	>50% PRI	Определяется логическим референсным интервалом
Порог риска кровотечения	Отсутствует	Не регламентирован	<85PRU	<19U	<16% PRI	Определяется логическим референсным интервалом
Основные преимущества	Исторический золотой стандарт	Стимуляция в состоянии потока, относительная простота измерения	Возможность прикроватной диагностики, простота измерения, нет контакта с кровью	Много клинических наборов	Высокая P2Y12-специфичность и при оценке риска кровотечений	Работа с цельной кровью, минимальное влияние преаналитических факторов, наглядность результатов
Основные недостатки	Отсутствие стандартизации, порог развития сердечно-сосудистых событий варьирует	Зависимость результатов от уровня фактора Виллебранда	Низкие значения гематокрита и числа тромбоцитов влияют на результаты	Частичная автоматизация, контакт с кровью, стоимость	Необходимость в проточной цитометрии, значительные временные потери	Необходимость локального опыта

Примечание. PFA – анализатор функции тромбоцитов (аналог времени кровотечения *in vitro*); PRU – единицы реактивности тромбоцитов; PRI – индекс реактивности тромбоцитов, VASP – фосфолирирование вазодилатор-стимулированного фосфопротеина (метод, основанный на проточной цитометрии).

Таблица 7.7. Лабораторные методы, отражающие действие тромболитических препаратов

Основной тест	Рекомендуемое значение
Фибриноген, концентрация	Более 1,0 г/л; при <1,0 г/л высок риск кровотечений
Тромбиновое время (ТВ)	Увеличение из-за влияния ПДФ на преобразование фибриногена в фибрин
D-димеры в плазме	Значительно повышены; маркер лизиса фибрина
Концентрация плазминогена	Не менее 65%; применение тромболитиков неэффективно при выраженном снижении плазминогена

При назначении фибринолитиков в результате активации плазминогена может разрушаться не только фибрин в составе стабилизированного тромба, но и фибриноген, поэтому мониторинг тромболитического эффекта по ПДФ малоинформативен из-за выраженного ложноположительного результата. Основным показателем эффективности тромболиза является определение D-димера.

При исследовании больных с нарушениями свертывания крови необходимо ориентироваться на клиничко-анамнестические данные. Лаборатория должна получать сведения, какая клиническая картина имеется у больного, какие препараты, влияющие на гемостаз, он получает, в каком направлении следует вести диагностический поиск. По мнению ведущих гематологов, нет ничего более бесполезного, чем выполнение в любом случае одинакового, стандартного набора лабораторных тестов, независимо от того, с какими нарушениями гемостаза столкнулись врачи при лечении того или иного больного. Только совместная работа команды клиницистов и сотрудников лаборатории с активным вовлечением пациента принесет пользу в диагностике и коррекции патологии гемостаза.

Вопросы к главе 7

1. В чем сходство и в чем различие антикоагулянтного действия нефракционированного и фракционированного гепаринов?
2. По какой причине продукты деградации фибрина дают ложный результат при оценке фибринолитической активности тромболитиков?
3. Какие методы используются для контроля за гепаринотерапией?
4. Способы оценки эффектов антагонистов витамина К.
5. Объясните механизм возникновения рикошетных тромбозов при активном начале лечения антагонистами витамина К.
6. Какими лабораторными тестами возможно оценить лечение клопидогрелом?
7. Какие лабораторные тесты могут быть полезны при лечении низкомолекулярным гепарином?

8. Объясните необходимость лабораторного контроля лечения нефракционированным гепарином.
9. Что такое балльная система оценки вероятности гепарин-индуцированной тромбоцитопении?
10. Какова цель и какими методами она достигается при лабораторном контроле лечения фибринолитиками?
11. Что такое PIVKA₁, когда они появляются и нужно ли их контролировать лабораторно?
12. Каковы основные достоинства и недостатки антагонистов витамина К?
13. В каком диапазоне необходимо поддерживать МНО при лечении пациентов с установленными механическими клапанами сердца?
14. По какой причине ввели определение МНО при лечении антагонистами витамина К?
15. Какая группа антикоагулянтов не требует непрерывного лабораторного контроля эффективности их использования?

Тесты для главы 7

Инструкция: Укажите один правильный ответ

07.01. При массивном применении варфарина с целью профилактики тромбозов у больной появились некрозы на дистальных отделах кистей рук. Причина их формирования:

- А) дефицит плазменных факторов свертывания крови
- Б) дефицит антикоагулянтов протеинов С и S
- В) активация агрегации тромбоцитов
- Г) активация компонентов комплемента
- Д) активация калликреин-кининовой системы

07.02. Лечение фракционированным гепарином можно контролировать:

- А) тромбиновым временем
- Б) АЧТВ
- В) остаточной активностью фактора Ха
- Г) протромбиновым временем
- Д) временем свертывания крови

07.03. Терапию нефракционированным гепарином следует контролировать:

- А) активированным частичным тромбопластиновым временем
- Б) лизисом эритроцитов
- В) ретракцией кровяного сгустка
- Г) концентрацией фибриногена
- Д) агрегацией тромбоцитов

07.04. Контроль за антивитамином К препаратами следует осуществлять:

- А) активированным частичным тромбопластиновым временем (АЧТВ)
- Б) международным нормализованным отношением (МНО)
- В) определением D-димеров
- Г) антитромбином
- Д) протеином С

07.05. Возможное осложнение лечения нефракционированным гепарином:

- А) активация фибринолиза
- Б) гепарин-индуцированная тромбоцитопения
- В) неэффективность не прямых антикоагулянтов
- Г) истощение фибриногена
- Д) печеночная недостаточность

07.06. У больного при использовании нефракционированного гепарина в дозе 20 000 Ед/сут через неделю эффективность гипокоагуляционного действия снизилась. Выберите из предложенных возможных механизмов этого явления:

- А) истощение антитромбина
- Б) активация фибринолиза
- В) накопление продуктов деградации фибрина (ПДФ), блокирующих эффект гепарина
- Г) развитие реактивной тромбоцитопении
- Д) повысилось содержание фибриногена

07.07. К пероральным антикоагулянтам относится:

- А) ацетилсалициловая кислота (*аспирин*)
- Б) блокатор рецепторов тромбоцитов к АДФ
- В) антагонист витамина К
- Г) гепарин нефракционированный
- Д) гепарин низкомолекулярный

07.08. Пациентка принимает варфарин по поводу фибрилляции предсердий.

При очередном плановом измерении МНО получен результат 5,0.

Каковы действия врача лаборатории?

- А) валидировать результат в лабораторной информационной системе в стандартном режиме
- Б) валидировать результат в лабораторной информационной системе и оповестить лечащего врача о полученном результате
- В) не валидировать результат в лабораторной информационной системе, вызвать пациентку для повторного измерения МНО
- Г) выполнить дополнительные лабораторные исследования коагулограммы
- Д) повторить калибровку прибора

07.09. Больной М., 52 года. Диагноз: ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь. Принимает аспирин 150 мг/сут. Для контроля антиагрегационной терапии сделана агрегация с АДФ 5 мкмоль/л. Степень агрегации выше нормы – 89% (рис. 7.3). Выберите из предложенных правильное заключение:

- А) агрегация соответствует дозе аспирина
- Б) необходимо снизить дозу аспирина
- В) необходимо повысить дозу аспирина
- Г) по-видимому, у больного аспиринорезистентность
- Д) назначить дополнительно другой антиагрегант

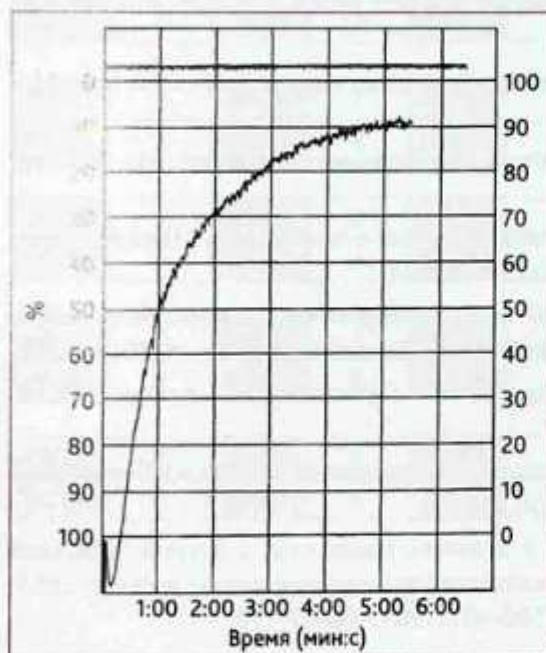


Рис. 7.3. Индуцированная агрегация тромбоцитов с индуктором АДФ 5 мкмоль/л

07.10. Причиной возникновения тромботического состояния (рикошетные тромбозы) при начале лечения высокими дозами антивитамина К препаратов является:

- А) активация тромбоцитов
- Б) активация протромбина
- В) подавление фибринолиза
- Г) быстрое снижение протеина С
- Д) снижение антитромбина

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Вавилова Т.В. Тромбозмболические осложнения и лабораторные исследования системы гемостаза. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 64 с.

Гильманов А.Ж., Вавилова Т.В., Мамаев А.Н. Коагулологические исследования // Клиническая лабораторная диагностика: Национальное руководство. Т. 1 / Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. С. 749–815.

Грашин Р.А., Вавилова Т.В. Программы и алгоритмы наиболее часто встречающихся нарушений гемостаза // Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы: пособие для врачей / Под ред. проф. А.И. Карпищенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. С. 517–564.

Долгов В.В., Свиринов П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М.–Тверь: Триада, 2005. 230 с.

Кишкун А.А. Лабораторная диагностика неотложных состояний. М.: Лабора, 2012. С. 271–279.

Клиническая лабораторная диагностика. Учебник в двух томах / Под ред. профессора В.В. Долгова. Т. 2. М.: Лабдиаг, 2018. 624 с.

Кузник Б.И., Стуров В.Г., Левшин Н.Ю. и др. Геморрагические и тромботические заболевания и синдромы у детей и подростков. Новосибирск: Наука, 2018. 524 с.

Мамаев А.Н. Практическая гемостазиология // Практическая медицина. 2014. 233 с.

Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинко-лабораторной диагностики. СПб.: Форма Т, 2008. 200 с.

Рекомендации ESC по диагностике и ведению пациентов с острой эмболией системы легочной артерии 2014 // Российский кардиологический журнал. 2015. № 8 (124). С. 67–110. doi: 10.15829/1560-4071-2015-08-67-110

Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозмболических осложнений. М.: Планида, 2015. 52 с.

Синьков С.В., Заболотских И.Б. Диагностика и коррекция расстройств системы гемостаза. М.: Практическая медицина, 2017. 336 с.

Тютрин И.И., Удун В.В. Низкочастотная пьезотромбозластография цельной крови: алгоритмы диагностики и коррекции гемостазиологических расстройств. Томск: Издательский дом Томского государственного университета, 2016. 170 с.

Kirchhof P., Benussi S. et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. Eur J Cardiothorac Surg. 2016. Vol. 50 (5). P. e1–e88.

Steffel J., Verhamme P. et al. The 2018 European Heart Rhythm Association practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation // European Heart Journal. 21 April 2018. Vol. 39. Issue 16. P. 1330–1393.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ НА ТЕСТЫ

01.01	Г	01.02	А	01.03	Г	01.04	В	01.05	Г
01.06	Г	01.07	Б	01.08	А	01.09	Д	01.10	В

02.01	Б	02.02	Б	02.03	Б	02.04	Б	02.05	Б
02.06	В	02.07	Б	02.08	Д	02.09	Б	02.10	А

03.01	А	03.02	В	03.03	А	03.04	В	03.05	Г
03.06	В	03.07	А	03.08	В	03.09	А	03.10	Б

04.01	В	04.02	Г	04.03	В	04.04	Г	04.05	Г
04.06	А	04.07	Б	04.08	Д	04.09	В	04.10	В

05.01	А	05.02	В	05.03	В	05.04	Г	05.05	Г
05.06	А	05.07	А	05.08	Д	05.09	Г	05.10	В

06.01	Д	06.02	Д	06.03	Б	06.04	Г	06.05	Б
06.06	В	06.07	Б	06.08	А	06.09	А	06.10	А

07.01	А	07.02	В	07.03	А	07.04	Б	07.05	Б
07.06	А	07.07	В	07.08	Б	07.09	Г	07.10	Г

НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ КОАГУЛОМЕТРОВ ЭМКО – НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ

М.В. Кутепов, к. т. н., группа компаний ЭМКО

Лабораторные исследования состояния системы гемостаза – важный фактор повышения эффективности лечения многих болезней. Коагулологические анализы включены в перечень более 200 утвержденных стандартов специализированной помощи больным разных нозологических форм, включая заболевания, являющиеся основными причинами смертности в России.

С 2015 года ООО «МЛТ» производит серию инновационных полуавтоматических коагулометров – анализаторы показателей гемостаза АПГ2-03-П, АПГ2-03-Пх, АПГ4-03-П, АПГ4-03-Пх с принадлежностями, РУ № РЗН 2015/2379 от 05.02.2015 г. (рис. 1).



Рис. 1. Коагулометр АПГ4-03-ПХ

Это отечественные полуавтоматические коагулометры, сочетающие в одном приборе следующие уникальные возможности.

- Проба цитратная плазма или кровь (венозная или капиллярная), штатный объем пробы составляет всего 50 мкл.
- Два метода регистрации образующегося фибринового сгустка в одном канале – оптический и механический.
- 16 клоттинговых методик: ПВ (ПО, МНО, % Квик), ТВ, АЧТВ, фибриноген, антитромбин, протейн С, анти-Ха-гепарин, факторы свертывания II, V, VII, X и VIII, IX, XI, XII и др.
- 6 хромогенных методик: антитромбин, плазминоген, протейн С, анти-Ха-гепарин, антиплазмин, D-димер.
- Полноценный контроль качества с построением контрольных карт.

Коагулометры позволяют проводить анализ гемолизированных, иктеричных и хилезных образцов крови (например, для проб онкологических пациентов с поражением кроветворных органов), проблемность которых не связана с качеством преаналитических процедур. Для получения корректных результатов анализа

образцов с высокой оптической плотностью, обусловленной наличием свободного гемоглобина, триглицеридов, билирубина, требуется использование механического метода детекции сгустка (по изменению вязкости пробы), поскольку данный метод не зависит от оптической плотности пробы. Для проб с высоким содержанием белка в плазме (например, при гаммапатиях) целесообразно проводить коагулологические измерения с помощью оптического метода детекции сгустка. Применение двух методов детекции сгустка в одном канале позволяет иметь в лаборатории не два разных коагулометра, а один, на котором возможно исследовать сложные по своим свойствам пробы и получать при этом достоверные результаты. Наличие дополнительного канала в моделях АПГ 2-02-ПХ, АПГ 4-02-ПХ для выполнения хромогенных тестов расширяет функциональные возможности для применения коагулометра в лабораториях любого уровня (например, экспресс-лаборатории).

Анализаторы АПГ 2-03-П, АПГ 2-03-Пх, АПГ 4-03-П, АПГ 4-03-Пх позволяют проводить полноценный контроль качества с построением контрольных карт Льюиса-Джессингса, проводить оценку аналитической серии по контрольным правилам Вестгаарда и осуществлять расчет ключевых параметров контрольной карты. Ведение внутривлабораторного контроля качества помогает выявить и затем исключить большинство ошибок как преаналитического, так и аналитического этапов исследования. Для упрощения процесса калибровки и исключения случайных ошибок ввода калибровочных данных коагулометры оснащены считывателем штрихкода (рис. 2).

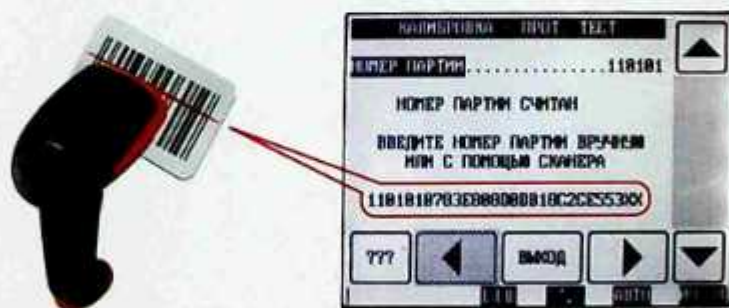


Рис. 2. Пример ввода калибровки с помощью сканера штрихкода

После считывания в прибор заносятся данные о серии реагента и калибровки для данного теста, осуществляется проверка соответствия тест – реагент (контроль правильности считывания). При использовании наборов реагентов производства ООО «МЛТ» и НПО «РЕНАМ» со штрихкодированием сотрудникам лаборатории не потребуется проведения процедуры калибровки тест-системы (системы прибор – реагент). Применение такой тест-системы в ЛПУ расширяет возможности исследований гемостаза и уменьшает количество ошибок при выполнении рутинных тестов. Себестоимость выполняемого анализа на анализаторах показателей гемостаза АПГ 2-02-П, АПГ 2-03-Пх, АПГ 4-03-П, АПГ 4-03-Пх ниже импортных аналогов, появляется возможность широкого оснащения российских медучреждений любого уровня и профиля специализации отечественными коагулометрами и реагентами.

В.В. ДОЛГОВ, Т.В. ВАВИЛОВА, П.В. СВИРИН

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

ООО «Издательство «Триада»
ИД № 06059 от 16.10.01 г.
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 504,
тел./факс (4822) 429022, 354130
E-mail: triadatver@yandex.ru
<http://www.triada.tver.ru>

Подписано к печати 11.02.2019 г.
Формат 70×100 ¹/₁₆. Усл. печ. л. 25
Бумага мелованная. Печать офсетная
Гарнитура Times New Roman. Тираж 2000 экз.

Заказ 01118/19
Отпечатано в соответствии
с предоставленными материалами
в ООО «ИПК Парето-Принт», г. Тверь
www.pareto-print.ru



Долгов

Владимир Владимирович

Профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России
Москва



Вавилова

Татьяна Владимировна

Профессор, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой лабораторной медицины и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, врач-гематолог СПб ГБУЗ «Городской консультативно-диагностический центр» № 1
Санкт-Петербург



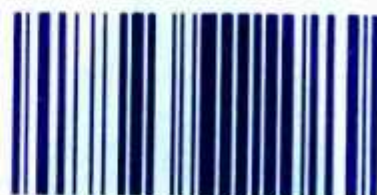
Свирин

Павел Вячеславович

Врач-гематолог высшей категории отделения гематологии Морозовской детской городской клинической больницы
Москва



9 785947 898774



1044787