

Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации



Российская медицинская академия последипломного образования

В.В. ДОЛГОВ, П.В. СВИРИН

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА



Москва 2005

ДОЛГОВ
Владимир
Владимирович

Заведующий
кафедрой
клинической
лабораторной
диагностики
РМАПО,
профессор,
доктор
медицинских наук



УДК 616.151.5

ББК 54.11

Д 64

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА

Д64

Долгов В.В., Свири́н П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. - М.-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2005. - 227 с, 150 ил. ISBN 5-94789-114-X



СВИРИН

Павел
Вячеславович

Врач Московского
городского
гематологического
центра
Измайловской
детской
клинической
больницы,
старший научный
сотрудник
НИИ детской
гематологии

Книга подготовлена в качестве руководства по исследованию системы гемостаза в клиничко-диагностических лабораториях. Оценка состояния свертывающей системы крови - одна из самых сложных диагностических задач. В настоящем пособии этот вопрос рассматривается с различных точек зрения: общих биологических закономерностей функционирования многокомпонентных систем организма, патофизиологических механизмов нарушений процесса свертывания крови, строения и функции отдельных структур и компонентов системы гемостаза, методологических подходов, приборного обеспечения, стандартизации, контроля качества и других аспектов. Изложение материала сопровождается большим количеством иллюстраций. Материал подобран на основе многолетнего опыта преподавания вопросов лабораторной диагностики нарушений гемостаза на кафедре клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последипломного образования.

Книга предназначена для специалистов клинической лабораторной диагностики, врачей клинических отделений, заинтересованных в лабораторной диагностике системы гемостаза, и студентов медицинских вузов.

Основным спонсором издания книги является компания «Эко-Мед-СМ» (генеральный директор Н.А. Ворошилов), Авторы искренне благодарны компании за поддержку данного издания.

Авторы признательны сотрудникам кафедры клинической лабораторной диагностики РМАПО и сотрудникам Измайловской детской больницы и НИИ детской гематологии за заинтересованное сотрудничество и помощь в подготовке этого издания.

ББК 54.11

© В.В. Долгов, П.В. Свири́н, 2005

© Оформление, издание
ООО «Издательство «Триада», 2005

ООО «Издательство «Триада»
ИД №06059 от 16.10.01 г,
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 504,
тел./факс (0822) 42-90-22, 35-41-30
E-mail: triada@stels.tver.ru

Подписано к печати 11.08.2005
Формат 62x94 1/8, обрезной
Бумага мелованная
Гарнитура Times New Roman. Печать офсетная
Усл. печ. л. 29. Тираж 3000 экз.

Заказ 1717
Отпечатано в ООО «Тверская фабрика печати»
г. Тверь, Беляковский пер., 46

ISBN 5-94789-114-X

Список сокращений

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α_2 -АП	- α_2 -антиплазмин	vWF:F.VIIIВ	- фактор VIII связывающая активность фактора Виллебранда
β	- β -тромбоглобулин (синоним (3-TG))	АПС	- активированный протеин С
Cl-Ing	- ингибитор 1-го компонента комплемента	АТШ	- антитромбин III
C4-СП	- C4-связывающий протеин	АФА	- антифосфолипидные антитела
ELISA	- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	АФС	- антифосфолипидный синдром
F1+2	- фрагменты протромбина	АЧТВ	- активированное частичное тромбопластиновое время (синоним - АПТВ)
MCV	- средний объем эритроцита	БВ	- болезнь Виллебранда
PAI	- ингибитор активатора плазминогена	ВА	- волчаночный антикоагулянт
PDGF	- фактор роста тромбоцитов	ВМК	- высокомолекулярный кининоген
PF4	- фактор 4 тромбоцитов	ГГЦ	- гипергомоцистеинемия
PIVKA	- Proteins Induced by Vitamin K Absence or Antagonists (синоним - ПИВКА)	ГИТ	- гепарин-индуцированная тромбоцитопения
pNA	- паранитроанилин	ГМК	- гладкие мышечные клетки
RDW	- red cell distribution width (показатель анизоцитоза тромбоцитов)	ГП	- гликопротеин (синоним - GP)
TAFI	- тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза	ДВС	- диссеминированное внутрисосудистое свертывание
TXA ₂	- тромбоксан	ИВП	- ингибитор внутреннего пути (синоним - TFPI)
t-PA	- активатор плазминогена тканевого типа	ИЛ	- интерлейкин
u-PA	- урокиназный активатор плазминогена	ИТП	- иммунная тромбоцитопеническая пурпура
u-PAR	- рецептор урокиназного активатора плазминогена	ИФА	- иммуноферментный анализ
vWF	- фактор Виллебранда	КК	- калликреин
vWF:RCo	- ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда	ЛВС	- локализованное внутрисосудистое свертывание крови
vWF:Ag	- антиген фактора Виллебранда	ЛПНП	- липопротеиды низкой плотности ЛПОНП
vWF:CB	- коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда	липопротеиды очень низкой плотности	-
		МЕ	- международные единицы

Список сокращений

МИЧ	- международный индекс чувствительности	СКВ	- системная красная волчанка (синоним - SLE)
МНО	- международное нормализованное отношение	СФ	- сфингомиелин
НМГ	- низкомолекулярные гепарины (синоним - LMWH)	ТАТ	- комплекс тромбин-анти тромбин
ПС	- протеин S	ТВ	- тромбиновое время
ПС	- протеин С	ТМ	- тромбомодулин
ПСИ	- ингибитор протеина С (синоним - PCI)	ТФ	- тканевой фактор
ПАП	- плазмин-антиплазмин-комплекс	ТЭЛА	- тромбоэмболия легочной артерии
ПВ	- протромбиновое время	ф.	- фактор
ПГ	- простагландины	ф.VIII:C	- коагуляционная активность фактора VIII
ПДФ	- продукты деградации фибрина/фибриногена	ф.VII	- фактор коагуляции VII
ПИ	- протромбиновый индекс	ф.VIIa	- активированный фактор коагуляции VII ФВ:RCo
ПК	- прекалликреин		- ристомицин-опосредованная активность фактора Виллебранда
ПО	- протромбиновое отношение	ФЛ	- фосфолипиды
ПТ	- протромбиновый тест	ФМ	- фибрин-мономеры
РАПС	- резистентность к активированному протеину С	ФНО	- фактор некроза опухоли
РФМК	- растворимые фибрин-мономерные комплексы	ФПА	- фибринопептид А
		ФПВ	- фибринопептид В
		ЭДТА	- этилендиаминтетраацетат

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 атеротромбоз и ДВС, являются причиной смерти более чем в половине всех случаев. 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. Из вышесказанного следует, что лабораторная диагностика состояния системы гемостаза - важ-

нейший 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 в последние годы уделяется большое внимание. Появляются новые диагностические методы, лекарственные препараты, схемы лечения больных. В то же время рутинная лабораторная практика в изучении системы гемостаза в нашей стране развивается недостаточно динамично. Необходима качественная подготовка как специалистов клинической лабораторной диагностики, так и клиницистов, для которых проблемы свертывания крови зачастую остаются «камнем преткновения».

Настоящая книга подготовлена совместно специалистом по клинической лабораторной диагностике и врачом-гемостазиологом. Надеемся, что изложенный материал, который во многом включил собственные навыки, умения, клинический опыт лечения детей с гемостазиологической патологией и многолетние навыки преподавания вопросов нарушения свертывания крови, будет полезен как врачам клинической лабораторной диагностики, так и врачам-клиницистам.

Ваши мнения о книге просим присылать по электронному адресу kafedra-kdl@list.ru.

ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Общее представление о гемостазе, гемостатический баланс

Гемостаз - это функция организма, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение крови в кровеносном русле в жидком агрегатном состоянии, а с другой стороны - остановку кровотечения и предотвращение кровопотери при повреждении кровеносных сосудов. Органы и ткани, участвующие в выполнении этих функций, образуют систему гемостаза. Органы и ткани, участвующие в выполнении этих функций образуют систему гемостаза. Элементы системы гемостаза участвуют также в таких важных процессах жизнедеятельности, как воспаление, репарация тканей, поддержание гомеостаза и др. Система гемостаза активно реагирует на различные экзогенные и эндогенные воздействия, может иметь врожденные и приобретенные функциональные нарушения - «болезни системы гемостаза».

Составляющие систему гемостаза компоненты условно можно разделить на **морфологические** и **функциональные**.

Морфологические компоненты системы гемостаза:

- Сосудистая стенка.
- Тромбоциты и клеточные элементы крови.
- Плазменные компоненты - белки, пептиды и небелковые медиаторы гемостаза, цитокины, гормоны.
- Костный мозг, печень, селезенка тоже могут рассматриваться как компоненты системы гемостаза, поскольку в них синтезируются и пулируются тромбоциты и плазменные компоненты системы гемостаза.

Функциональные компоненты системы гемостаза:

- Прокоагулянты.
- Ингибиторы коагуляции, антикоагулянты.
- Профибринолитики.
- Ингибиторы фибринолиза.

На гемостаз могут оказывать влияние как физиологические, так и нефизиологические (патологические) факторы. К последним относятся бактериальные токсины, яды животных, собственные протеолитические ферменты, в физиологических условиях отсутствующие или имеющиеся в крови в незначительных концентрациях, лекарственные препараты.

Активность разных компонентов системы гемостаза может изменяться 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). При смещении гемостатического баланса за рамки физиологических норм возникают условия для развития патологических кровотечений или тромбозов.

Хотя механизмы работы системы гемостаза сложны, итог нормальной ее работы прост. При отсутствии повреждения система препятствует свертыванию крови. Часто говорят, что она интактна, однако на сохранение жидкого состояния крови затрачивается много энергии. При возникновении повреждения запускается процесс остановки кровотечения: происходит спазм сосуда, в зоне повреждения начинается процесс свертывания крови. Через короткое время сформирован-

Характеристика системы гемостаза



Рис. 1. Гемостатический баланс: за счет компенсаторного взаимодействия система гемостаза поддерживает кровь в жидком состоянии в течение всей жизни, в то же время при повреждении кровь быстро сворачивается, купируя кровотечение. При смещении гемостатического баланса за рамки физиологических норм возникают условия для развития патологических кровотечений или тромбозов

ный 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.

Знакомство с физиологией и патологией системы гемостаза на первый взгляд создает впечатление излишней перегруженности различными элементами. Однако система гемостаза великолепно отрегулирована и способна эффективно функционировать в самых различных физиологических и патологических условиях. Система гемостаза изменяется в процессе онтогенеза, и при ее исследовании необходимо учитывать возраст человека.

Поскольку в организме различные мелкие повреждения возникают часто, в системе практически постоянно происходят локальные процессы. При нормальном гемостатическом балансе чувствительная для организма кровопотеря происходит лишь при массивном повреждении. Однако при нарушении гемостатического баланса значимая кровопотеря может возникнуть при незначительных повреждениях. Либо, наоборот, патологическое тромбообразование или неконт-

ролируемое распространение процесса роста тромба приводят к нарушению кровообращения в жизненно важных органах. Возможно также возникновение смешанной проблемы: неконтролируемое тромбообразование приводит к потреблению прокоагулянтов и развитию ишемии и одновременно патологического кровотечения.

Система гемостаза регулируется не только своими внутренними механизмами. Она тесно связана с функционированием организма в целом и меняет 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. А 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 нормальных показателей гемостаза. В сложных случаях диагноз 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 различных методов и реактивов для определения одного и того же показателя.

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

СОСУДИСТАЯ СТЕНКА

Структура и функции 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. В физиологических условиях неповрежденная сосудистая стенка способствует поддержанию жидкого состояния крови. Неповрежденный эндотелий, контактирующий с кровью, не обладает свойствами инициировать процесс свертывания. Кроме того, он содержит на своей поверхности и выделяет в кровоток вещества, которые препятствуют свертыванию. Это свойство предотвращает образование тромба на интактном эндотелии и ограничивает рост тромба за пределы повреждения. При повреждении или воспалении стенка сосуда принимает участие в образовании тромба. Во-первых, субэндотелиальные структуры, контактирующие с кровью только при повреждении или развитии патологического процесса, обладают мощным тромбогенным потенциалом. Во-вторых, эндотелий в зоне повреждения активируется и у него появля-

ются прокоагулянтные свойства. Строение сосудов показано на рис. 2.

Сосудистая стенка у всех сосудов, кроме прекапилляров, капилляров и посткапилляров, состоит из трех слоев: внутренней оболочки (интимы), средней оболочки (медии) и наружной оболочки (адвентиции).

Интима. На всем протяжении кровеносного русла в физиологических условиях кровь контактирует с эндотелием, образующим внутренний слой интимы. Эндотелий, который состоит из монослоя клеток эндотелиоцитов, играет наиболее активную роль в гемостазе. Свойства эндотелия несколько различаются на разных участках кровеносной системы, определяя разный гемостатический статус артерий, вен и капилляров. Под эндотелием находится аморфное межклеточное вещество с гладкими мышечными клетками, фибробластами и макрофагами. Также встречаются вкрапления липидов в виде капель, чаще расположенных внеклеточно. На границе интимы и медии находится внутренняя эластичная мембрана.

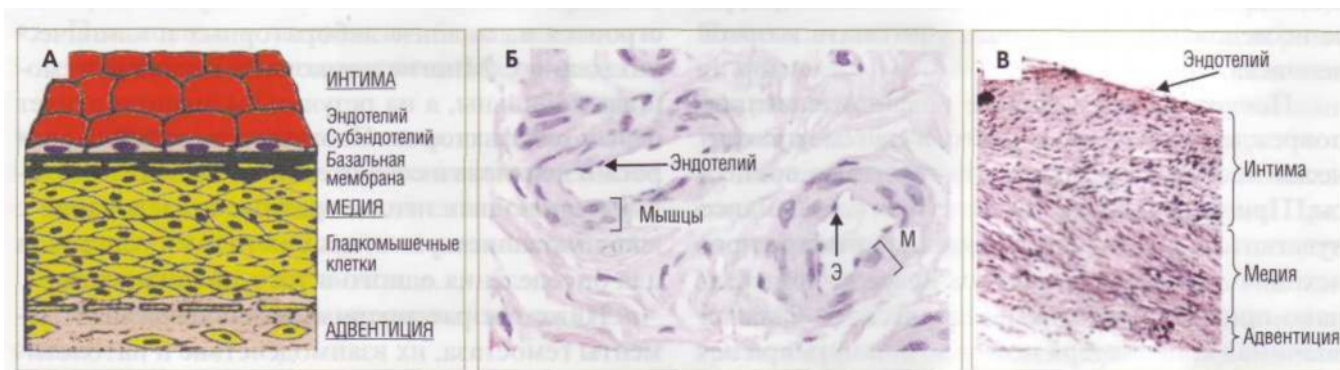


Рис. 2. Сосудистая стенка состоит из интимы, луминальная поверхность которой покрыта однослойным эндотелием, медии (гладкомышечные клетки) и адвентиции (соединительно-тканый каркас): А - крупная мышечно-эластичная артерия (схематическое изображение), Б - артериолы (гистологический препарат), В - коронарная артерия в поперечном разрезе

Сосудистая стенка

Медия состоит из гладких мышечных клеток и межклеточного вещества. Ее толщина значительно варьирует в различных сосудах, обуславливая их разную способность к сокращению, прочность и эластичность.

Адвентиция состоит из соединительной ткани, содержащей коллаген и эластин.

Артериолы (артериальные сосуды с общим диаметром менее 100 мкм) представляют собой переходные сосуды от артерий к капиллярам. Толщина стенок артериол немногим меньше ширины их просвета. Сосудистая стенка самых крупных артериол состоит из трех слоев. По мере ветвления артериол их стенки становятся тоньше, а просвет уже, однако сохраняется соотношение ширины просвета и толщины стенки. В самых мелких артериолах на поперечном срезе видны один-два слоя гладких мышечных клеток, эндотелиоциты и тонкая, состоящая из коллагеновых волокон наружная оболочка.

Капилляры состоят из монослоя эндотелиоцитов, окруженных базальной пластиной. Кроме того, в капиллярах вокруг эндотелиоцитов находят другой тип клеток - перициты, роль которых изучена недостаточно.

Капилляры открываются на своем венозном конце в посткапиллярные венулы (диаметр 8-30 мкм), для которых характерно увеличение количества перицитов в сосудистой стенке. Посткапиллярные венулы, в свою очередь, впадают в

собирающие венулы (диаметр 30-50 мкм), стенка которых, помимо перицитов, имеет наружную оболочку, состоящую из фибробластов и коллагеновых волокон. Собирающие венулы впадают в мышечные венулы, имеющие один-два слоя гладких мышечных волокон в средней оболочке. В целом венулы состоят из эндотелиальной выстилки, базальной мембраны, непосредственно прилегающей снаружи к эндотелиоцитам, перицитов, также окруженных базальной мембраной; снаружи от базальной мембраны имеется слой коллагена. Вены снабжены клапанами, которые ориентированы таким образом, чтобы пропускать кровь по направлению к сердцу. Больше всего клапанов в венах конечностей, а в венах грудной клетки и органов брюшной полости они отсутствуют.

Функция сосудов 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.

Эндотелий

Характеристика эндотелиального покрова

Сосудистая стенка имеет активную поверхность, с внутренней стороны выстланную эндотелиальными клетками. 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**, что является важным условием антитромбогенных свойств сосудистой стенки. Высокая текучесть обеспечивает гладкую внутреннюю поверхность эндотелия (рис. 3), который функционирует как целостный пласт и исключает контакт про-коагулянтов плазмы крови с субэндотелиальными структурами.

Эндотелиоциты синтезируют, представляют на своей поверхности и выделяют в кровь и субэндотелиальное пространство целый спектр биологически активных веществ. Это белки, пептиды и небелковые вещества, регулирующие гемостаз. В табл. 1 перечислены основные продукты эндотелиоцитов, участвующие в гемостазе.

Сосудистая стенка

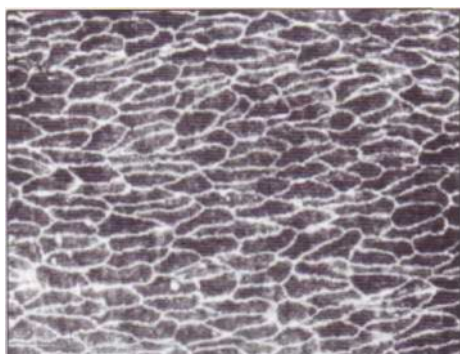


Рис. 3. Эндотелиальный покров сосудов. Гладкая поверхность покрыта одним слоем эндотелиальных клеток. Целостность эндотелиального покрова - важнейшее условие сохранения жидкого состояния крови

Антикоагулянтная активность интактного эндотелия

Антикоагулянтные свойства эндотелия обеспечиваются несколькими механизмами.

- Интактный эндотелий не обладает прокоагулянтной активностью.
- Эндотелий пассивно 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 глико-**

каликса (прежнее название - мукополисахарид), состоящий из протеогликанов, гликопротеидов, гликолипидов (рис. 4).

Основу гликокаликса образуют молекулы протеогликанов (рис. 5). 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. На долю гепарансульфата в некоторых зонах эндотелиального покрова приходится до 80% глюкозаминогликанов.

Таблица 1

Продукты эндотелиоцитов, участвующие в гемостазе

Антикоагулянты	Прокоагулянты
Гепарансульфат	Тканевой фактор*
Тромбомодулин	Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа
Аденозиндифосфатаза	Фактор Виллебранда
Простациклин, ПГЕ ₂ , ПГБ ₂	Рецептор для фактора Ха
Оксид азота	Коллаген IV (рецептор для фактора IX i
Тканевой активатор плазминогена	Индукцированный гипоксией активатор фактора X
Урокиназный активатор плазминогена	Липополисахарид-индуцированный активатор протромбина
Ингибитор пути тканевого фактора	Эндотелиальный рецептор протеина С
Аннексии V	
Аннексии II	
Протеин S	
Эндотелий-продуцируемый фактор релаксации	

* Доказано в экспериментах *in vitro*, *in vivo* имеются лишь единичные данные.



Рис. 4. 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

Гепарансульфат обладает мощным антикоагулянтным действием, являясь кофактором антитромбина. 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.

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.

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 липопротеинлипаза, целый ряд АДФаз, ферменты, разрушающие кинины, серотонин, норадреналин и другие биологически активные вещества, в том числе обладающие прокоагулянтной активностью.

Контроль активности тромбоцитов

Способность интактного эндотелия контролировать активность тромбоцитов связана с по-

Сосудистая стенка

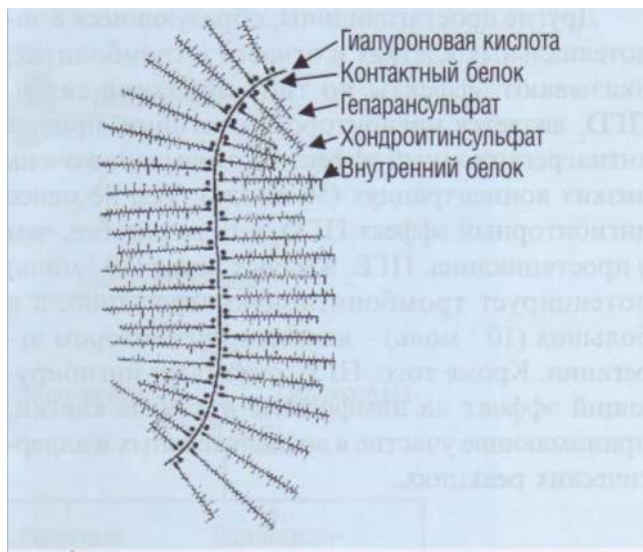


Рис. 5. Протеогликан - основной элемент гликокаликса, сформированного на поверхности сосудистой стенки

стоянным синтезом простаглицина, эктоаденозиндифосфатазы и оксида азота (NO), которые препятствуют активации, адгезии и агрегации тромбоцитов.

Оксид азота (NO) - мощный антиагрегант и вазодилататор. NO образуется из аргинина под влиянием постоянно экспрессированной на эндотелии NO-синтетазы. Прежде чем NO был идентифицирован как вазоактивный метаболит, его эффект приписывали релаксирующему фактору эндотелия (EDRF - endothelium-derived relaxing factor). Брадикинин, гистамин, ацетилхолин повышают образование и освобождение NO из эндотелиальных клеток. Все эти вещества стимулируют гуанилатциклазу, которая переводит ГТФ в цикло-ГМФ. Циклический ГМФ в свою очередь активирует NO-синтетазу.

В местах спонтанной репарации эндотелия кратковременно образуются участки дезэндотелизации. Этот процесс не сопровождается пристеночным тромбообразованием. Видимо, адгезию тромбоцитов к субэндотелию блокирует облако простаглицина, формирующееся над эндотелиальным покровом (рис. 6).

Антиагрегационное действие простаглицина связано со способностью усиливать действие аденилатциклазы тромбоцитов. Это ведет к увеличению синтеза цАМФ, удалению ионов Ca^{2+} в пулы хранения из плазмы и снижению способности тромбоцитов к агрегации (рис. 7).

Сосудистая стенка

Другие простагландины, образующиеся в эндотелиальных клетках и отчасти в тромбоцитах, оказывают эффекты по типу обратной связи. ПГD₂ является ингибитором агрегации, причем антиагрегационный эффект он оказывает в очень низких концентрациях (50 нмоль). Тем не менее ингибиторный эффект ПГD₂ в 10 раз слабее, чем у простаглицлина. ПГЕ, в малых дозах (10⁻⁸ моль) потенцирует тромбоцитарную агрегацию, а в больших (10⁻⁵ моль) - является ингибитором агрегации. Кроме того, ПГЕ, оказывает ингибирующий эффект на лимфоциты и другие клетки, принимающие участие в воспалительных и аллергических реакциях.

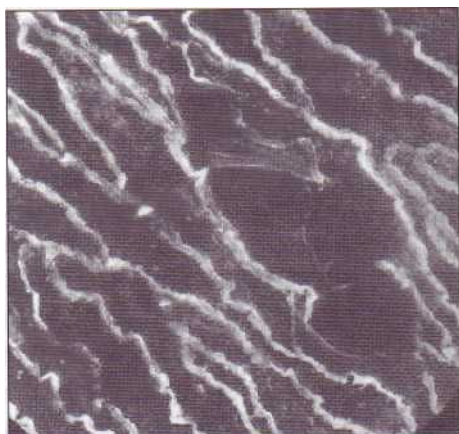


Рис. 6. Деэндотелизация при спонтанной репарации эндотелия не сопровождается адгезией тромбоцитов к сосудистой стенке, по-видимому, из-за облака простаглицлина, формирующегося пристеночно в зоне гликокаликса

Молекулярный каскад образования простаглицлина и тромбосана

В эндотелиальных клетках, активированных тромбоцитах и других клетках из мембранных фосфолипидов под действием фосфолипаз освобождается арахидоновая кислота, которая в свою очередь является предшественником эйкозаноидов - кислородсодержащих производных. В эндотелиальных клетках из полиненасыщенной арахидоновой кислоты при участии специфического мультиферментного комплекса циклооксигеназы синтезируются простаглицлин и ряд активных простаглицлинов (рис. 8).

В тромбоцитах при активации фосфолипаз из образующейся арахидоновой кислоты синтезируется в основном тромбосан (ТХА₂), он оказывает выраженный сосудосуживающий эффект и является мощным стимулятором адгезии тромбоцитов. Механизм действия ТХА₂ связан с активацией фосфоинозитольного механизма и с прямым эффектом по увеличению проницаемости плазматической мембраны для ионов Ca²⁺. ТХА₂, связывая Ca²⁺ своими гидрофобными группами, обеспечивает перенос его через мембраны, тем самым оказывает выраженный прямой эффект на гладкомышечные клетки сосудов и бронхов. Его вазоконстрикторный эффект такой же, как у ангиотензина II, что делает ТХА₂ важнейшим местным регулятором распределения крови и стимулятором гемостаза.

В лейкоцитах арахидоновая кислота является предшественником липоксигеназного пути образования лейкотриенов (ЛТА₄, ЛТВ₄, ЛТС₄, LTD₄, LTE₄).



Рис. 7. Эндотелий ингибирует активацию тромбоцитов за счет выработки простаглицлина

Сосудистая стенка

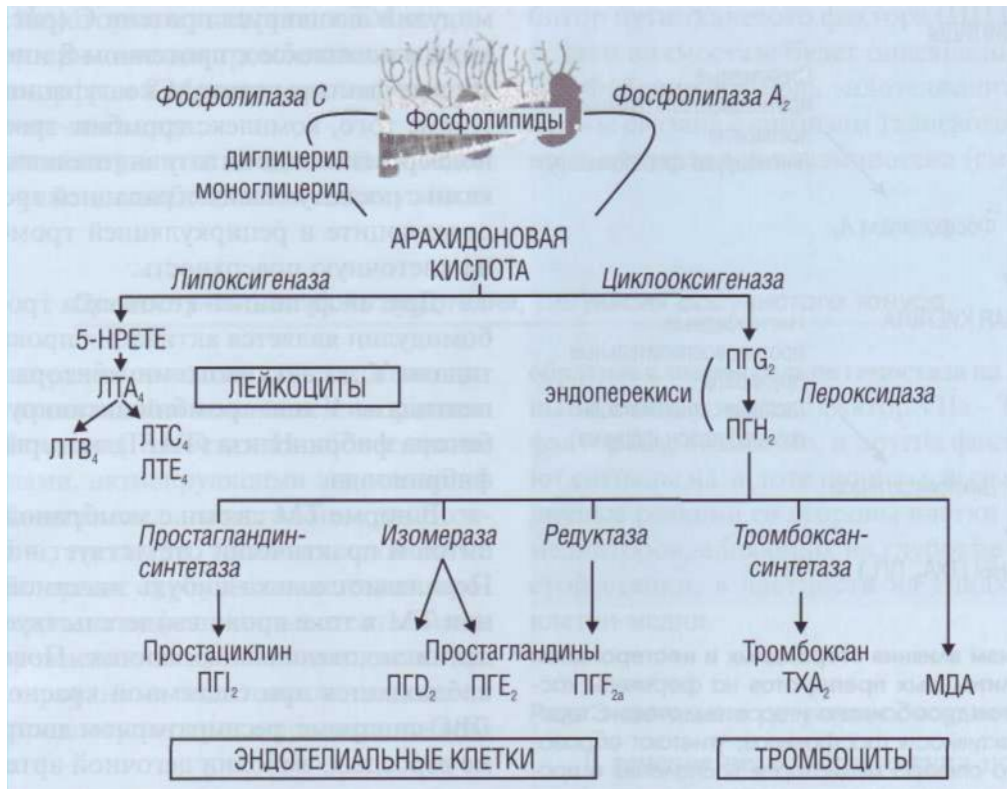


Рис. 8. Каскад метаболитов, образующихся из арахидоновой кислоты. Арахидоновая кислота освобождается из фосфолипидов клеточных мембран за счет ферментов фосфолипазы A₂ или фосфолипазы C. В эндотелиальных клетках и тромбоцитах с участием циклооксигеназы синтезируются эндоперекиси PGG₂ и PGH₂, в лейкоцитах под влиянием липоксигеназы образуются лейкотриены. Из эндоперекисей в эндотелии образуется антиагрегант простаглицин (PGI₂) и ряд других простаглицлинов, в тромбоцитах - проагрегант тромбосан (TXA₂)

На молекулярный каскад образования простаглицлина и тромбосана влияет ряд лекарственных препаратов, часто применяемых в терапии (рис. 9). *Стероидные гормоны*, используемые как противовоспалительные средства, ингибируют фосфолипазы, при этом угнетается образование широкого спектра медиаторов из фосфолипидов клеточных мембран, в том числе медиаторов воспаления и продуктов каскада арахидоновой кислоты. Поэтому наряду с противовоспалительным стероидные гормоны оказывают ряд эффектов, в том числе и на систему гемостаза. *Ацетилсалициловая кислота* (аспирин) ацетирует и ингибирует фермент циклооксигеназу в тромбоцитах и эндотелиальных клетках, что способствует ингибированию синтеза в них соответственно тромбосана (TXA) и простаглицлина (PGI₂). Инактивация происходит очень быстро и практически необратимо. Тромбоциты не способны ресинтезировать циклооксигеназу (они получают ее из

мегакариоцитов), тогда как метаболически активные эндотелиальные клетки вновь ресинтезируют циклооксигеназу и восстанавливают образование PGI₂. Поэтому ацетилсалициловая кислота в низких дозах широко используется для лечения и как профилактическое средство артериальных тромбозов. Однако не следует применять ее в высоких дозах, так как при этом тормозится образование простаглицлина, что блокирует ее антиагрегационное действие и может привести к тромбозу.

Тромбомодулин

Антикоагулянтная активность эндотелия связана также с наличием специфического мембранного белка - тромбомодулина. На поверхности интактного эндотелия содержится значительное количество ТМ. Тромбомодулин с высокой аффинностью связывает тромбин, меняя «направленность» его действия. Комплекс тромбин-тромбо-

Сосудистая стенка

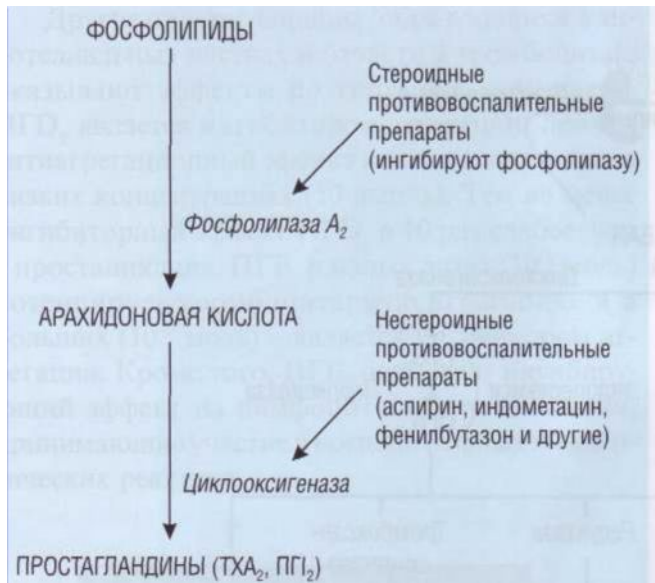


Рис. 9. Механизм влияния стероидных и нестероидных противовоспалительных препаратов на ферменты каскада образования тромбосана и простаглицлина. Стероиды, подавляя активность фосфолипаз, угнетают образование широкого спектра медиаторов воспаления и продуктов каскада арахидоновой кислоты, Ацетилсалициловая кислота и ее аналоги ингибируют циклооксигеназу: в малых дозах влияют в основном на тромбоциты и оказывают антиагрегантный эффект, а в высоких концентрациях подавляют образование простаглицлина в эндотелии и оказывают проагрегантное действие

модулин активирует протеин С (рис. 10). Последний в комплексе с протеином S ингибирует активные факторы каскада коагуляции Va и Villa. 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 прокалксипептидазы Y до активного ингибитора - карбоксипептидазы Y или тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза (ТАFI), 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, ДВС-синдроме, респираторном дистресс-синдроме взрослых, эмболии легочной артерии, инфаркте миокарда, после использования тромболитиков при инфаркте миокарда, при диабетической микроангиопатии, после транскатеральной ангиопластики коронарных артерий. Значение ТМ для регуляции гемостаза имеет клинические под-

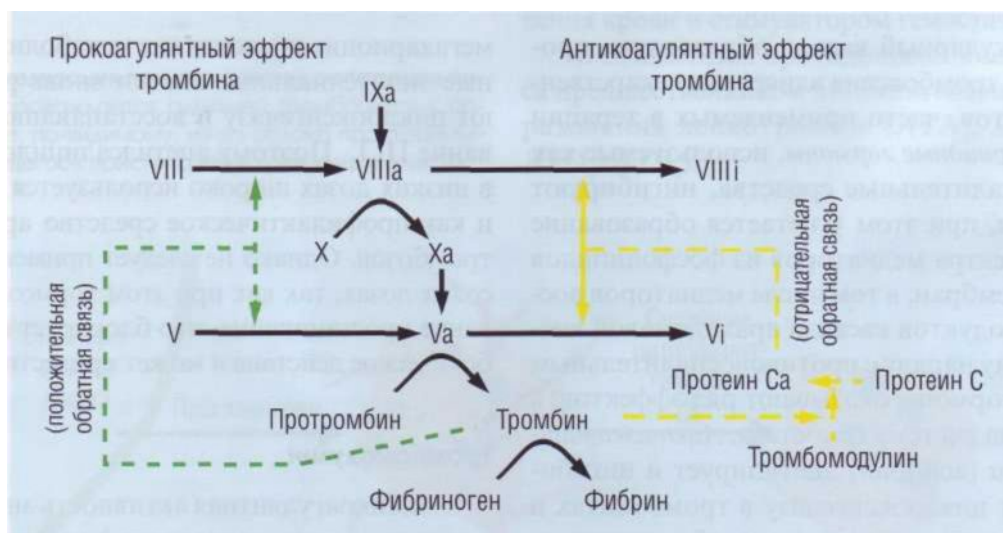


Рис. 10. Прокоагулянтный и антикоагулянтный эффекты тромбина. Тромбин оказывает прямой активирующий эффект на факторы V и VIII и инактивирующее действие на факторы Va и Villa. Фактор VIII может быть активирован высокими концентрациями фактора IXa или следовыми концентрациями тромбина. В то же время тромбин в комплексе с тромбомодулином стимулирует антикоагулянтный эффект протеина С. Эти формы регуляции существенны для эффективного участия факторов Va и Villa в процессах свертывания крови

Сосудистая стенка

тверждения. Некоторые мутации гена ТМ сопровождаются артериальными тромбозами, определенный полиморфизм ТМ имеет значение в развитии инфаркта миокарда.

Другие антикоагулянты. Эндотелий синтезирует и постоянно высвобождает в плазму инги-

битор пути тканевого фактора (ИПТФ), роль которого в гемостазе будет описана ниже.

Фибринолиз. Роль эндотелиоцитов в фибринолизе связана с синтезом тканевого и урокиназного активаторов плазминогена (см. 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 и др.

У стимулированных эндотелиальных клеток появляются прокоагулянтные и провоспалительные свойства:

- Стимулированные эндотелиоциты могут представлять на своей поверхности тканевый фактор (ТФ). Этот процесс был исследован *in vitro* и частично подтвержден *in vivo* в сосудах некоторых злокачественных опухолей.
- На стимулированных эндотелиальных клетках снижается количество тромбомодулина.
- Они начинают секретировать ингибитор активатора плазминогена.
- Из пула хранения эндотелиоцитов (тельца Вейбла-Паллада) 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.
- В дополнение к ферментам классического коагуляционного каскада эндотелиальные клетки вырабатывают ряд дополнительных энзимов, в том числе гипоксия-индуцированный активатор фактора X, липополисахарид-индуцируемый активатор протромбина.

Помимо прямого влияния активированных эндотелиальных клеток на гемостаз, существует

обратное влияние белков гемостаза на эндотелиальные клетки. Комплекс фактор VIIa - ТФ, тромбин, фактор Ха, возможно, и другие факторы передают сигналы на эндотелиоциты, вызывающие различные реакции со стороны клетки и выработку медиаторов, влияющих на глубокие слои сосудистой стенки, в частности на гладкомышечные клетки меди.

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 модуляции этих изменений выполняет **эндотелин**.

Эндотелин (ЕТ) - пептидный гормон, состоящий из 21 аминокислоты, относится к группе цитокинов, имеет 3 изоформы (ЕТ-1, ЕТ-2 и ЕТ-3). Образуется эндотелин из предшественника пре-про-ЕТ (который иногда обозначается как большой эндотелин) при участии металлопептидазы - эндотелинпревращающего фермента.

В низких концентрациях эндотелин действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение факторов релаксации, а в **более высоких** - активирует рецепторы на гладких мышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию.

ЕТ-1 - наиболее сильный вазоконстриктор из всех известных факторов, доминирует в эндотелиальных клетках сосудов человека. Он также присутствует в небольших количествах в гладких мышечных клетках (ГМК) и кардиомиоцитах. ЕТ не хранится в клетках, а постоянно синтезируется *de novo*. Синтез ЕТ и освобождение его из эн-

Сосудистая стенка

дотелиальных клеток стимулируют тромбин, адриналин, ангиотензин, вазопрессин, некоторые цитокины.

Большая часть ET секретируется внутрь сосудистой стенки, где расположены специфичные высокоаффинные рецепторы. ET, 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. 11).

Рецепторы для эндотелина сопряжены с G-белками, присутствуют в 2 формах: ET-A и ET-B. Рецепторы ET-A характеризуются высокой аффинностью и постоянно экспрессированы в миокарде на ГМК сосудов. Они обеспечивают прямое вазоконстрикторное действие эндотелина за счет активации поступления Ca^{2+} в клетку через неселективные ионные каналы. Рецепторы ET-B экспрессированы на эндотелиальных клетках и ГМК в отдельных сосудистых бассейнах. Стимуляция ET-B сопровождается освобождением NO (вазодилатор), тромбосана (вазоконстриктор) и PGI_2 (вазодилатор). Таким образом, один и тот же фактор реализует две противоположные сосудистые реакции (сокращение и расслабление), вызываемые различными химическими механизмами.

Доказано, что дисбаланс эндотелий-зависимой сократимости и релаксации сосудов при артериальной гипертензии может способствовать повышению общего периферического сопротивления сосудов (ОПС) и появлению сердечно-сосудистых осложнений. Характерно увеличение эндотелина крови с возрастом. Наиболее высокий уровень эндотелина отмечен при атеросклерозе, неспецифическом аортоартериите, облитерирующем тромбангите, т. е. при заболеваниях, протекающих с повреждением эндотелия. Поскольку эндотелии действует преимущественно местно, естественно предположить, что повышенное образование и поступление его в кровь может быть причиной возникновения и усугубления тяжести течения ИБС.

Мы исследовали чувствительность лабораторных тестов повреждения сердечно-сосудистой системы у пациентов с нестабильной стенокардией ($n = 11$, возраст $60,7 \pm 9,9$ года) в состоянии компенсации. Все пациенты в течение, по крайней мере, 1 года находились на низкокалорийной диете и корригирующей терапии гиполипидемическими препаратами, в том числе статинами. В группу сравнения входили практически здоровые люди ($n = 13$), средний возраст которых был $27,4 \pm 1,5$ года. Результаты измерений уровня эндотелина-1 и липидных показателей сыворотки представлены в табл. 2.

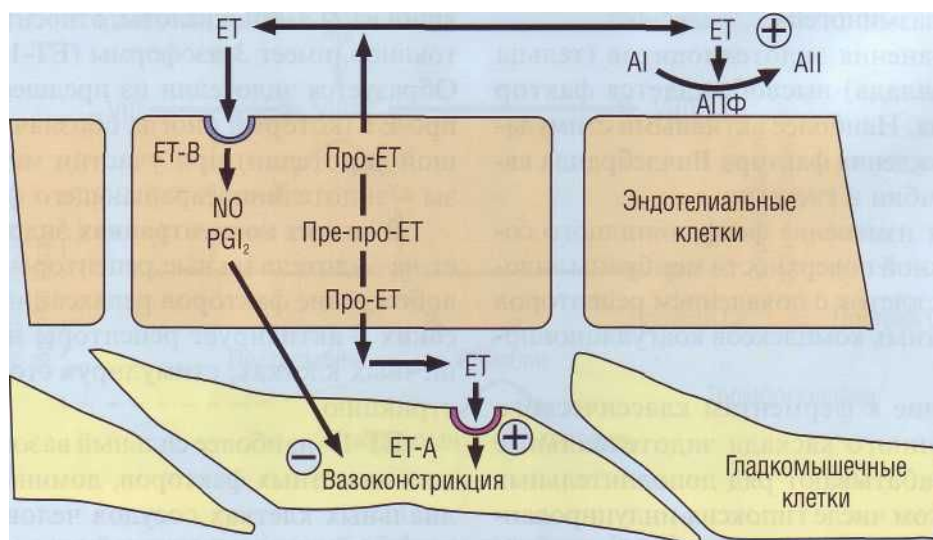


Рис. 11. Эндотелин - основной вазоконстриктор сосудистой стенки, вырабатывается и реализуется сосудистым эндотелием. ET - эндотелин, AI и AII - ангиотензин I и II, АПФ - ангиотензинпревращающий фермент, ET-A и ET-B - рецепторы к эндотелину

Таблица 2

Сравнительная характеристика эндотелина и липидов у пациентов с нестабильной стенокардией

Показатель	Пациенты с нестабильной стенокардией	Здоровые люди	Достоверность различий	Референтные значения
Общий холестерин (ммоль/л)	5,43 ± 0,89	3,98 ± 0,87	p < 0,05	3,5–5,2
ХС-ЛПНП (ммоль/л)	3,27 ± 0,57	2,47 ± 0,69	p < 0,05	1,0–3,5
ХС-ЛПВП (ммоль/л)	1,19 ± 0,25	1,08 ± 0,27	Недостоверно	1,0–1,9
Общие триглицериды (ммоль/л)	1,77 ± 0,65	0,82 ± 0,49	p < 0,05	0,5–2,0
Эндотелин-1 (пг/мл)	1,29 ± 0,59	0,58 ± 0,17	p < 0,01	0,3–0,9*

Значения приведены из инструкции к набору *Parameter-Human Endothelin-1 Assay* производства *R&D System Inc., США*.

У пациентов с нестабильной стенокардией после длительного срока наблюдения и интенсивной терапии (более 1 года приема статинов) удалось достичь целевых уровней основных показателей липидограммы для вторичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, хотя эти показатели были выше, чем у здоровых молодых людей. В то же время уровень ET-1 у пациентов был выше не только показателей группы сравнения, но и рекомендуемого референтного значения. Это расценивается как свиде-

тельство того, что, несмотря на интенсивную терапию, у больных сохраняется активный процесс дисфункции эндотелия. Поэтому пациенты с нестабильной стенокардией, даже при условии нормализации показателей липидного обмена, должны быть под наблюдением кардиолога. В свою очередь, определение ET-1 можно рекомендовать в качестве лабораторного теста активности процесса повреждения сосудистой стенки и, следовательно, прогноза течения болезни.

Субэндотелий

В состав субэндотелиальной базальной мембраны (рис. 12) входят различные 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 ГМК 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.

Субэндотелий является стимулятором адгезии тромбоцитов и активации каскадной системы свертывания крови.

Прокоагулянтные свойства клеток субэндотелия (макрофагов, фибробластов, лейкоцитов и гладких мышечных клеток) обусловлены наличием на их поверхности тканевого фактора. Колла-

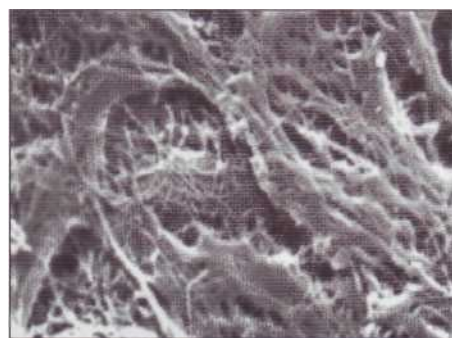


Рис. 12. Субэндотелий сосудистой стенки организован полимерными белками: коллагеном, эластином и другими. Субэндотелий обладает выраженным тромбогенным эффектом, стимулируя процессы свертывания крови

ген субэндотелия является субстратом для адгезии тромбоцитов. Связь коллагена с рецепторами тромбоцитов вызывает активацию последних. Помимо этого, коллаген, видимо, обладает свойством активировать белки системы контактной активации.

Сосудистая стенка

Тканевой фактор

Тканевой фактор (ТФ) - трансмембранный белок (рис. 13), локализованный на клетках субэндотелия (фибробластах, макрофагах, гладких 18 мышечных клетках). Предположительно ТФ есть на базальной мембране эндотелиоцитов, а на апикальной мембране он может появляться после активации клеток. ТФ в норме нет на поверхности циркулирующих лейкоцитов или эритроцитов.

Роль ТФ в процессе свертывания крови очень велика. При связывании фактора VIIa с ТФ формируется активный комплекс, который в присутствии ионов Ca^{2+} активирует фактор X. По современным представлениям этот процесс является основным физиологическим путем запуска процесса свертывания крови.

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.

Изначально ТФ классифицировали как один из плазменных факторов свертывания (тканевой тромбопластин, ф.Ш). Исследования показали, что ТФ фиксирован на клеточной мембране и в физиологических условиях не поступает в кровоток, поэтому он был исключен из классификации плазменных факторов гемостаза.

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 такие цитокины, в том числе ИЛ-1, фактор некроза опухоли (ФНО), фрагмент компонента C5a и др. Повышение экспрессии ТФ на моноцитах обнаружено при воспалении, сепсисе, опухолях, при сердечно-сосудистой патологии, особенно у больных, перенесших инфаркт миокарда, после экстравакулярной 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 правой 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-гидроксилизина* (5Hyl). Присутствие в полипептидной цепи остатков гидроксиаминокислот является характерной особенностью коллагена. Остатки пролина и лизина гидроксируются посттрансляционно, т. е. после включения в полипептидную цепь. На одном из концов молекула коллагена сшита поперечными связями,

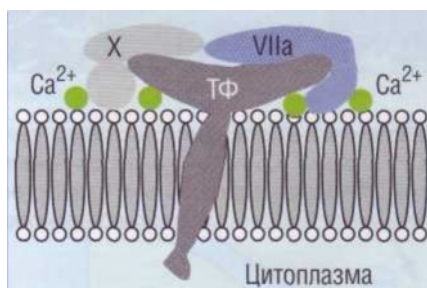


Рис. 13. Формирование активного комплекса внешнего пути активации свертывания на тканевом факторе, ТФ - тканевой фактор, VIIa - активный фактор VII свертывания крови (протеолитический фермент), X - неактивный фактор X свертывания крови (субстрат)

Сосудистая стенка

образованными боковыми цепями остатков лизина. Количество поперечных связей возрастает по мере старения организма. Известно, по крайней мере, 12 вариантов коллагена, характеризующихся различным сочетанием полипептидных ос-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, устойчи-

вость к нагрузкам и реологические характеристики.

Типы III и VI коллагена обладают высокой прокоагулянтной активностью, связывая с высокой аффинностью фактор Виллебранда, и тем самым обеспечивают адгезию тромбоцитов.

Типы I и IV коллагена непосредственно взаимодействуют с тромбоцитарным рецептором GPIIb-IIIa, следствием чего также является адгезия тромбоцитов. Типы I, III, IV и V коллагена активируют тромбоциты, воздействуя непосредственно на тромбоцитарные рецепторы или опосредованно через фактор Виллебранда. Это влечет за собой изменение формы тромбоцитов, их адгезию и дегрануляцию.



ЦИКЛЫ ТЕМАТИЧЕСКОГО УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ «МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА»

Циклы тематического усовершенствования «Методы исследования системы гемостаза» более 20 лет систематически проводятся на кафедре клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последипломного образования для заведующих и врачей клинической лабораторной диагностики.

В программу циклов включены лекции по наиболее актуальным проблемам гемостаза, семинары по вопросам организации исследований гемостаза, разбору клинических случаев, интерпретации коагулограммы. На практических занятиях в малых группах осваиваются и отрабатываются лабораторные методы исследования гемостаза. К работе цикла привлекаются производители оборудования и реагентов с информацией о новейших разработках в этой области, организуются посещения ведущих лабораторий Москвы.

Продолжительность циклов 2 недели, иногородним предоставляется общежитие гостиничного типа, по окончании выдаются свидетельства о повышении квалификации государственного образца.

Заявки для участия в циклах усовершенствования принимаются:

- по почте: 125424, Москва, а/я 32 (кафедра КЛД)
- по факсу (095) 945-84-00 или телефону (095) 945-82-22
- по электронной почте: kafedra-kdl@list.ru

ТРОМБОЦИТЫ

Тромбоцитопоэз

Дифференцировка и созревание клеток мегакариоцитопоэза происходят в костном мозге, где из коммитированных, морфологически неидентифицируемых клеток-предшественников (КОЕ-Мгкц) формируются колонии мегакариоцитарных клеточных элементов. При созревании клетки проходят три морфологически дифференцируемые стадии: мегакариобласт, который не превышает 10% всей популяции, промегакариоцит (около 15%) и мегакариоцит (рис. 14) - на его долю приходится от 75 до 85%.

Процесс дифференцировки мегакариоцитарных элементов продолжается около 25 часов, такое же примерно время (около 25 часов) составляет созревание, а весь жизненный цикл - около 10 суток. Отличительной чертой клеточных элементов мегакариоцитопоэза является их способность к эндомитозу (полиплоидизации) - делению ядра без разде-

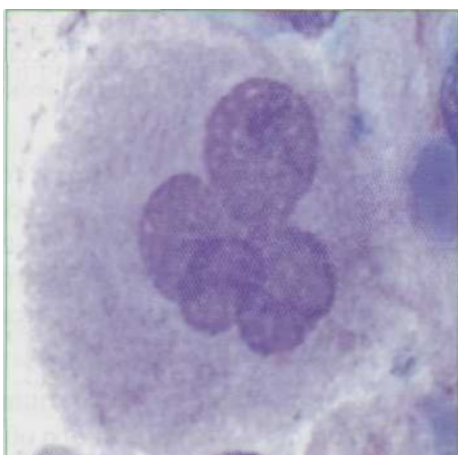


Рис. 14. Мегакариоцит, диаметр 30-40 мкм. Ядро темно-фиолетового цвета, лопатное, с бухтообразными вдавлениями, фрагментированное. Хроматин распределен неравномерно, Цитоплазма обильная, содержит обильную зернистость

ления цитоплазмы, что приводит к появлению гигантского размера клеток (мегакариоцитов). В процессе мегакариоцитопоэза (рис. 15) клетки прорываются от 3 до 6 эндомитозов, что соответствует плоидности мегакариоцита от 8 п до 64 п.

Регуляция мегакариоцитопоэза осуществляется по принципу обратной связи: избыток тромбоцитов в крови тормозит тромбоцитопоэз, а тромбоцитопения его стимулирует. Основными регуляторами, стимулирующими мегакариоцитопоэз, являются ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-11, фактор стволовых клеток, лейкоз-ингибирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), эритропоэтин, тромбопоэтин. К факторам, ингибирующим тромбоцитопоэз, относят тромбоцитарный фактор 4, трансформирующий фактор роста P_r интерфероны-а и -у и другие ингибиторы.

В α -гранулах мегакариоцитов содержится значительное количество белков: фактор Виллебранда, тромбоцитарный фактор 4, тромбоспондин, фибриноген, фибронектин, тромбоцитарный ростовой фактор, трансформирующие ростовые факторы, тромбоцитарный ингибитор коллагеназы. Основная масса их синтезируется в мегакариоцитах, некоторые белки, такие, как альбумин, фибриноген, IgG, поступают в клетку путем эндцитоза. Способность зрелых мегакариоцитов к эндцитозу проявляется в явлении эмпириопозиса, суть которого заключается в захвате гемопозитических клеток. Частота его возрастает при злокачественных новообразованиях. Тромбоцитарная пероксидаза присутствует на всех стадиях созревания клеток мегакариоцитарной линии, включая тромбоциты. Мегакариоциты, синтезируя трансформирующий ростовой фактор (3,

Тромбоциты

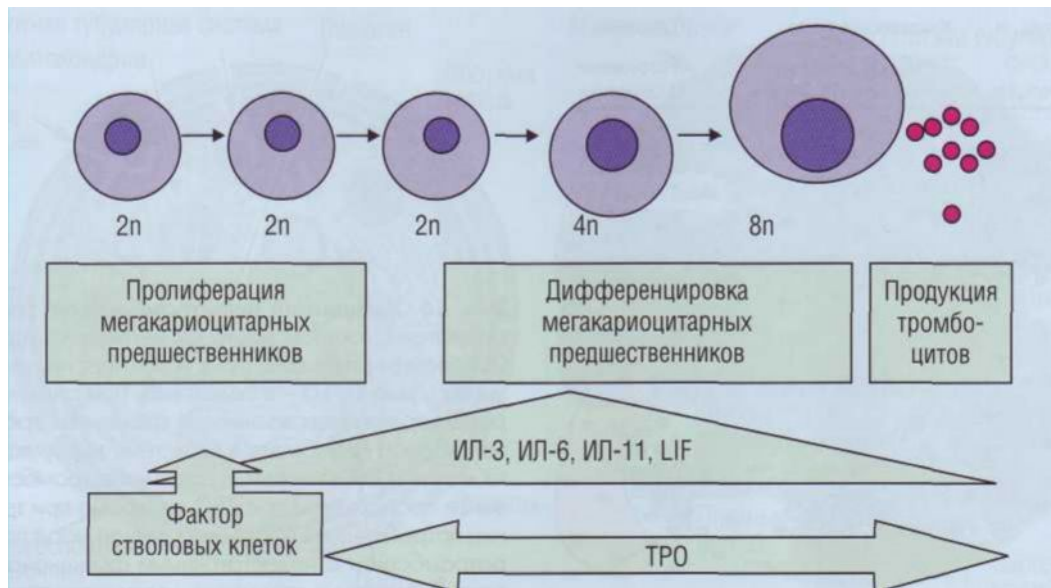


Рис. 15. Схема регуляции мегакариопоэза. Внизу рисунка показаны периоды стимулирующего действия на мегакарицитоз основных стимуляторов. LIF - лейкоз-ингибирующий фактор, ТРО - тромбопоэтин

участвуют в накоплении коллагена и развитии фиброза.

Основная функция мегакариопоэза - репопуляция тромбоцитов, поддержание их количества в кровотоке на постоянном уровне. Мегакарициты располагаются в костном мозге вблизи костно-мозговых синусов и по мере созревания внутрь клетки врастают раздели-

тельные мембраны, по которым в дальнейшем происходит деление цитоплазмы на тромбоциты. Существует точка зрения, что цитоплазматические отростки мегакариоцита (в виде лент диаметром 2-4 мкм) через миграционные поры проникают в синусы костного мозга, где и происходит отшнуровка тромбоцитов (тромбоцитобразование).

Жизненный цикл тромбоцитов

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 тромбоцитозу (рис. 16). После спленэктомии также в течение некоторого времени наблюдается тромбоцитоз, который иногда достигает очень больших величин (до 800-1200 x 10⁹/л). Остальные 2/3 тромбоцитов циркулируют в крови. Средняя продолжительность жизни тромбоцитов составляет 9-10 суток.

Референтные значения. У здорового человека количество тромбоцитов может несколько менять-

ся в течение суток. Нормальное содержание тромбоцитов в крови колеблется в пределах 150-320 x 10⁹/л. (В последнее время в связи с поступлением на отечественный рынок зарубежных гематологических счетчиков и анализаторов, в инструкции к которым даются зарубежные нормы, стали приводить значения нормального содержания тромбоцитов в диапазоне от 150 до 450 x 10⁹/л.)

При отсутствии в крови гемопоэтических стимулов общий объем циркулирующих тромбоцитов довольно постоянен. В патологических условиях количество и объем тромбоцитов могут меняться (рис. 17). При снижении продукции тромбоцитов гемостатический потенциал может быть частично компенсирован за счет

Тромбоциты

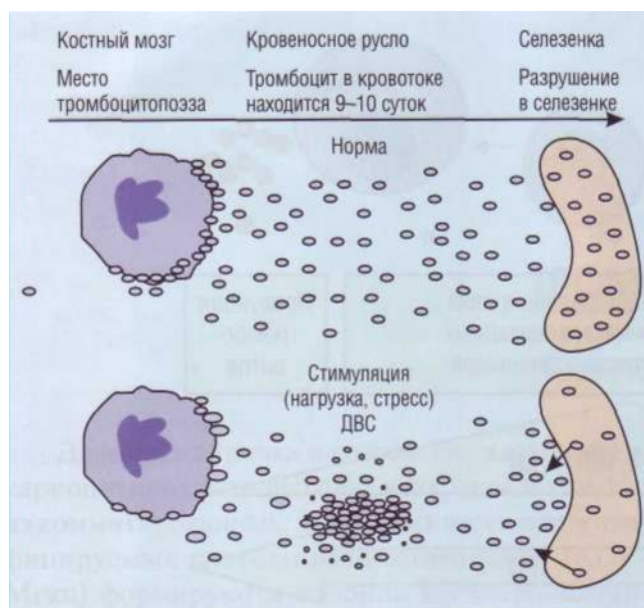


Рис. 16. Жизненный цикл тромбоцитов. Тромбоциты образуются в костном мозге из мегакариоцитов, примерно 2/3 периферического пула находится постоянно в системе циркуляции, 1/3 - в селезенке. При стимуляции адренорецепторов может возникнуть временный тромбоцитоз из-за выброса тромбоцитов в систему циркуляции из костного мозга и селезенки. Опустошение тромбоцитов в селезенке происходит и при ДВС-синдроме при тромбоцитопении потребления, в последнем случае могут появляться макротромбоциты с недостаточными функциональными свойствами адгезии и агрегации - возникает тромбоцитопатия

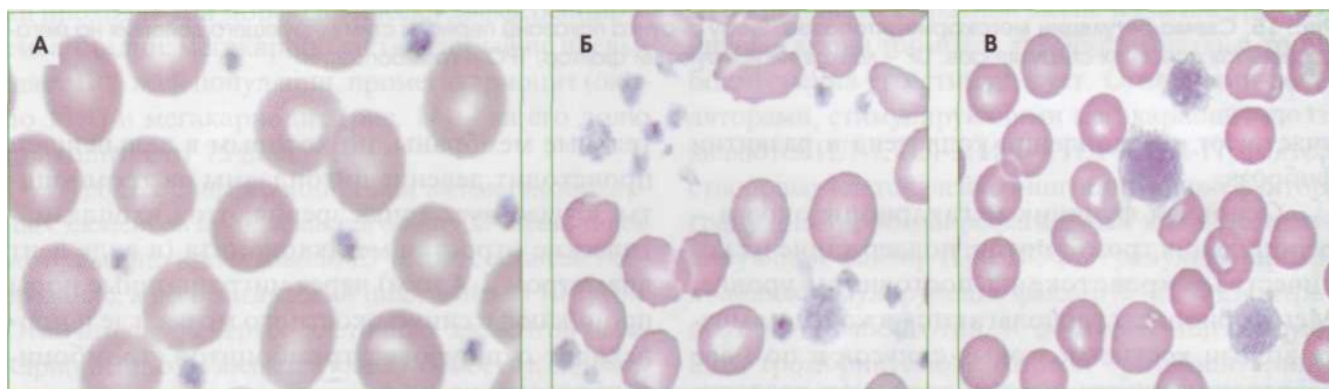


Рис. 17. Тромбоциты в периферической крови: А - нормальные тромбоциты, Б - анизозитоз тромбоцитов при хроническом моноцитарном лейкозе (нарушение дифференцировки на уровне полипотентных коммитированных предшественников мегакариоцитопоза), В - гигантские тромбоциты (макротромбоциты) при аутоиммунной тромбоцитопении

повышения их объема. В обратной ситуации, при повышении количества тромбоцитов выше $450 \times 10^9/\text{л}$, объем тромбоцитов не снижается ниже определенного физиологического уровня. Соответственно общий объем тромбоцитарного пула в крови возрастает пропорционально увеличению количества тромбоцитов. Это может

привести к увеличению тромбогенного потенциала.

С помощью автоматических гематологических анализаторов можно измерить средний объем тромбоцитов (MPV), дисперсию распределения тромбоцитов по объему (RDW) и оценить гистограмму распределения тромбоцитов по объему.

Структура тромбоцитов

Тромбоцит - безъядерная сферическая клетка диаметром 2-4 мкм, средний объем $7,5 \text{ мкм}^3$ (от 3 до 10 мкм^3 , или фл-фемтолитры). Микроформы тромбоцитов имеют диаметр менее 1,5 мкм,

макроформы могут достигать 6-10 мкм. 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 $8,9 \text{ мкм}^3$ (рис. 18). В циркули-

Тромбоцит

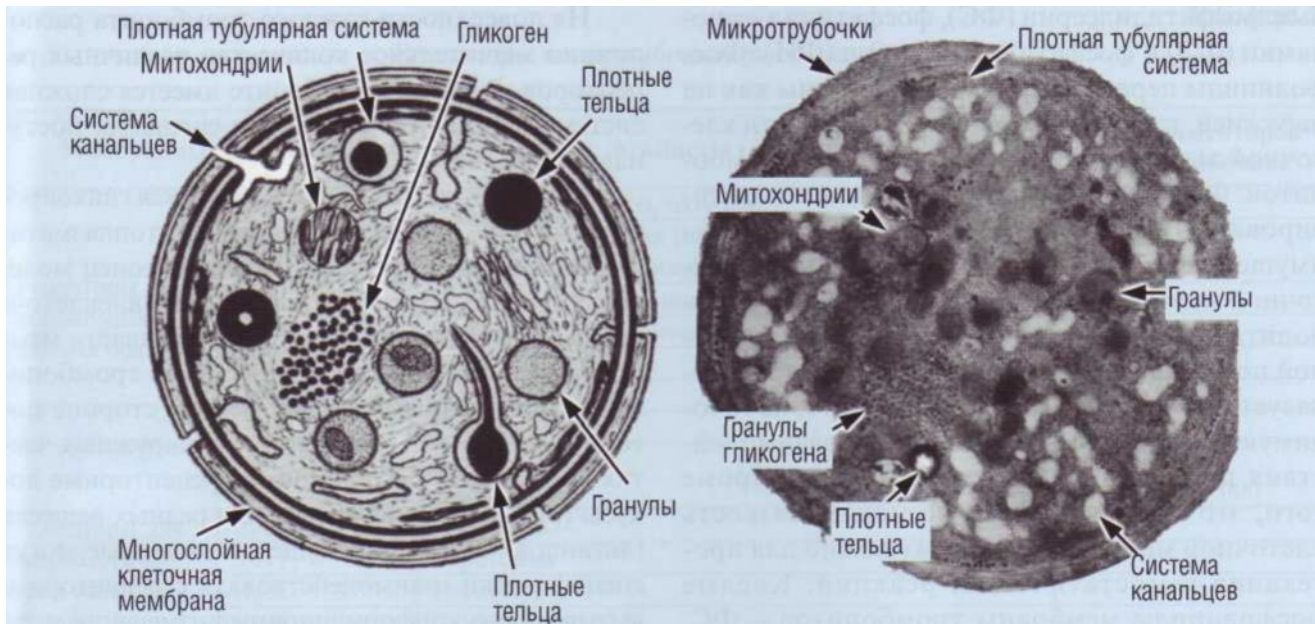


Рис. 18. Тромбоцит (рисунок и микрофотография). Интактные тромбоциты имеют форму диска, в цитоплазме расположены митохондрии, пероксисомы (содержат каталазу), включения гликогена, лизосомы и гранулы, содержащие пулы хранения различных веществ

рующем пуле преобладают зрелые пластинки диаметром 2-3 мкм (80-95%), «молодые» формы - 3 мкм - состав-

ляют 1-10%, а «старые» - микротромбоциты менее 2 мкм - 3-15%. макротромбоциты размером свыше

Мембрана и цитоскелет тромбоцитов

Структура поверхностной мембраны тромбоцита сложна. Наружная поверхность тромбоцита покрыта гликокаликсом, богатым гликопротеинами. В пространствах многослойной мембраны расположены микротрубочки, формирующие цитоскелет тромбоцита. Цитоплазматическая мембрана тромбоцитов внедряется внутрь клетки с образованием многочисленных переплетенных канальцев, связанных с внеклеточным пространством. Эта система называется «связанной с поверхностью канальцевой системой», или «открытой канальцевой системой» (ОКС). Обнаружено, что на поверхности мембраны ОКС имеются те же гликопротеиды, что и на внешней мембране тромбоцитов. Таким образом, ОКС значительно увеличивает активную тромбоцитарную поверхность, что важно при изменении формы тромбоцита во время его активации.

Непосредственно в подмембранном пространстве расположены плотные микротрубочки, образующие особую плотную микротубулярную систему (ПМТС), не связанную с внеклеточным пространством. ПМТС развивается из мегакариоцитарного эндоплазматического ретикулума. Эта система является местом депонирования кальция и синтеза простагландинов. Кроме того, образуя концентрические субмембранные структуры, ПМТС является частью цитоскелета тромбоцитов.

Важное свойство мембраны интактных тромбоцитов - это разный фосфолипидный состав наружной и внутренней поверхности. Основные фосфолипиды, входящие в состав тромбоцитов, можно разделить на 2 группы: 1) не обладающие прокоагулянтной активностью холиновые: фосфатидилхолин (ФХ) и сфингомиелин (СФ), 2) обладающие прокоагулянтными свойствами кис-

Рецепторы на тромбоцитарной мембране

Мембранные рецепторы	Агонисты (лиганды)		Число рецепторов на 1 тромбоците
Рецепторы для высокомолекулярных белков	GP1b-V-IX	Фактор Виллебранда, тромбин	50 000
	GP1b-IIIa	Фибриноген, фактор Виллебранда, фибрин, фибронектин, витронектин, тромбоспондин	50 000
	GP1c-IIIa	Фибронектин, ламинин	1000
	VN-R	Витронектин, тромбоспондин	100
	GP1a-IIIa	Коллаген	1000
	GP1b	Тромбоспондин	
	GPVI	Коллаген	
Рецепторы для физиологических стимуляторов	P2-R	АДФ	Выс. афф. 600 Низ. афф. 60 000
	α_2 -adr-R	Адреналин	300
	5-HT ₂ -R	Серотонин	50
	H ₁ R	Гистамин	
	V ₁ -R	Вазопрессин	
	Thr-R (STDR)	Тромбин	1700-2000
	TP-R	Тромбоксан	1000-1700

Выс. афф. - высокоаффинные места связи, низ. афф. - низкоаффинные места связи.

Рецепторы для высокомолекулярных белков

Гликопротеиновый комплекс GP1b-V-IX тромбоцитов участвует в опосредованной фактором Виллебранда адгезии тромбоцитов к субэндотелиальным структурам и активации тромбоцитов.

Полипептидные цепи GP1ba, GP1b(3, GPV, GPIX полностью расшифрованы по аминокислотной последовательности, известны их кодирующие гены. Характерной особенностью комплекса является включение в пептидные цепи 24 аминокислотных остатков с лейцином, которые находятся в строго определенных местах. Эти белки получили название *богатых лейцином гликопротеинов* (LRG - leucine rich glycoproteins).

Связывание фактора Виллебранда с GP1b-V-IX интактных тромбоцитов незначительно. Контакт молекулы фактора Виллебранда с субэндотелиальным слоем, особенно при воздействии высокой скорости кровотока, приводит к конформационным изменениям в молекуле, что значительно повышает сродство фактора Виллебранда к GP1b-V-IX.

Нефизиологическими стимуляторами процесса взаимодействия фактора Виллебранда и GP1b-V-IX являются антибиотик ристомицин и протейн змеиного яда - ботроцетин. Ристомицин свя-

зывается с богатым пролином участком молекулы фактора Виллебранда и с одним или более доменами GP1b на тромбоцитах, а ботроцетин - только с фактором Виллебранда. Эти воздействия приводят к аналогичным физиологическим конформационным изменениям молекулы фактора Виллебранда и GP1b-V-IX и резко увеличивают сродство между фактором Виллебранда и тромбоцитарной мембраной.

Тромбоцитарный GP1b-V-IX также является высокоаффинным местом связывания тромбина. Взаимодействие GP1b-V-IX с фактором Виллебранда и тромбином приводит к активации тромбоцитов.

При врожденной недостаточности рецепторного комплекса не происходит связывания с фактором Виллебранда (vWF), что характерно для болезни Бернара-Сулье.

Интегрины

Кроме богатых лейцином гликопротеинов, на мембране тромбоцитов находится большое количество адгезивных рецепторов, относящихся к семейству *интегринов*. Интегрины - трансмембранные гликопротеины, характеризующиеся общно-

Тромбоциты

стью протеиновых цепей, антигенных свойств и функции. Они принимают участие во взаимодействии клетки с клеткой и клетки с субэндотелиальным матриксом. Благодаря способности образовывать связи со многими белками интегрины участвуют в процессах распознавания, адгезии, миграции клеток на матриксе, репаративных, иммунных и других реакциях. К семейству интегринов относятся рецепторы к *фибриногену, витронектину, фибронектину, коллагену и другим белкам*. Интегрины способны распознавать характерную аминокислотную последовательность RGD (трипептид Arg-Gly-Asp), имеющуюся в лигандах. Эта последовательность присутствует во всех адгезивных белках крови, белках α -гранул тромбоцитов, фибриногене, факторе Виллебранда, фибронектине, витронектине, ламинине. Для соединения интегринов с лигандами типична зависимость от двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} .

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 - **тромбостении Гланцмана** - резко нарушена или

отсутствует агрегация тромбоцитов с большинством индукторов агрегации, в том числе коллагеном, тромбином, АДФ. Агрегация тромбоцитов с этими индукторами также отсутствует в плазме пациентов с **афибриногемией**, если фибриноген отсутствует также и в пулах хранения самих тромбоцитов.

Наличие в комплексе GPIIb-IIIa мест распознавания RGD объясняет способность этого интегрин соединяться с фактором Виллебранда, фибронектином, витронектином. Показано, что связь GPIIb-IIIa с фактором Виллебранда важна для эффективной агрегации тромбоцитов в условиях воздействия высоких скоростей кровотока. Ключевой особенностью комплекса GPIIb-IIIa является способность исполнять роль рецептора только на поверхности активированных тромбоцитов. Аффинность этого комплекса на поверхности неактивированных клеток очень низкая, а его антигенная характеристика отличается от таковой на активных тромбоцитах. Активация тромбоцитов приводит к значительному повышению аффинности и изменению антигенной характеристики GPIIb-IIIa.

Активированные тромбоциты могут связывать на своей поверхности более 40 000 молекул фибриногена посредством GPIIb-IIIa. Это взаимо-

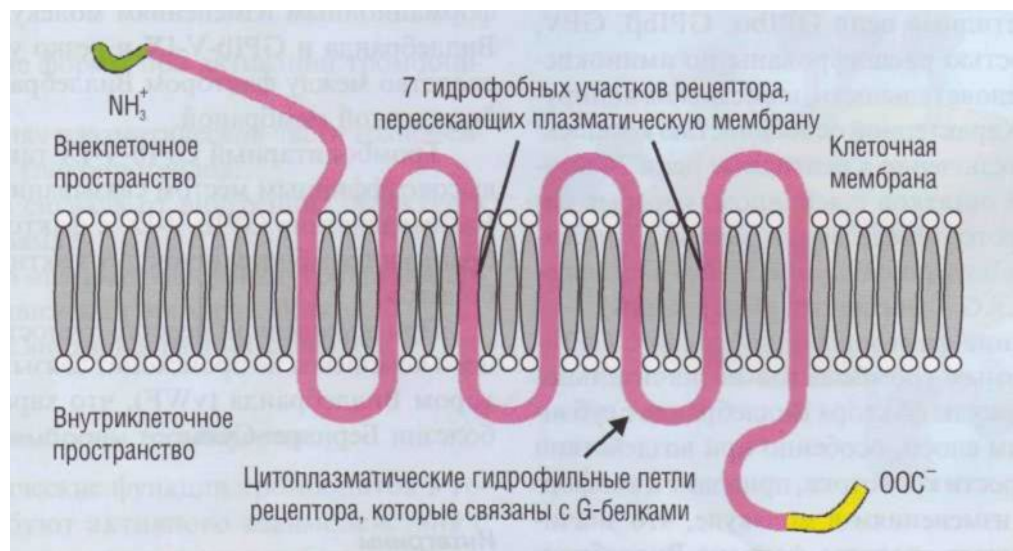


Рис. 20. Тромбиновый рецептор тромбоцитарной мембраны, Схожее строение имеют рецепторы к АДФ, адреналину, серотонину, эйкозаноидам и другим низкомолекулярным соединениям. За счет нескольких петель рецептор имеет многофункциональный характер. Внутриклеточный С-конец взаимодействует с цАМФ-зависимой протеинкиназой, гидрофильные петли рецептора активируют опосредуемые G-белками внутриклеточные функциональные перестройки. Со стороны N-конца тромбин вызывает частичный протеолиз и тем самым активирует рецептор

Тромбоциты

действие происходит в присутствии двухвалентных катионов (Ca^{2+}) и поначалу является обратимым. Далее, по мере образования дополнительных контактов, происходит стабилизация агрегата.

У 25% жителей Северной Европы в связи с полиморфизмом аллелей в GРIIа имеется ассоциация В развитии ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда в относительно молодом возрасте.

Использование ингибиторов для комплекса GРIIb-IIIa на ранних стадиях тромбоза приводит к быстрому восстановлению кровотока по тромбированному сосуду и позволяет избежать инфаркта тромбированного органа.

Рецепторы для физиологических стимуляторов

Рецепторы для физиологических стимуляторов (тромбина, АДФ, адреналина, серотонина,

эйкозаноидов и др.) представляют собой трансмембранные пептиды с 7 гидрофобными повторами, которые 7 раз пересекают плазматическую мембрану (рис. 20). Между ними расположены крупные гидрофильные участки, обращенные наружу и внутрь клетки. Цитоплазматический С-конец может фосфорилироваться протеинкиназами, прежде всего цАМФ-зависимой киназой. В цитоплазматических петлях находятся места связывания с системой G-белков, которые в качестве внутриклеточных посредников обеспечивают разнообразные физиологические реакции, в первую очередь освобождение внутреннего пула Ca^{2+} . Каждый активированный тромбоцитарный рецептор приводит к образованию нескольких внутриклеточных мессенджеров активации тромбоцитов.

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, электронно-плотные тельца (δ -гранулы) и лизосомы (γ -гранулы). На рис. 21 представлены основные компоненты, которые могут освобождаться из гранул и цитозола тромбоцитов при действии разных стимуляторов.

В α -гранулах хранятся до 30 различных белков, большинство из которых были синтезированы еще в мегакариоцитах: 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 типа 1 (PAI-1), α_2 -антиплазмин, α_1 -антитрипсин, протеин S, лейкоцитарный хемотаксический фактор, высокомолекулярный кининоген и др. Участие белков α -гранул в физиологических и патологических процессах многостороннее: а) митогенный и хемотаксический эффекты; б) адгезивное действие, модулирование 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

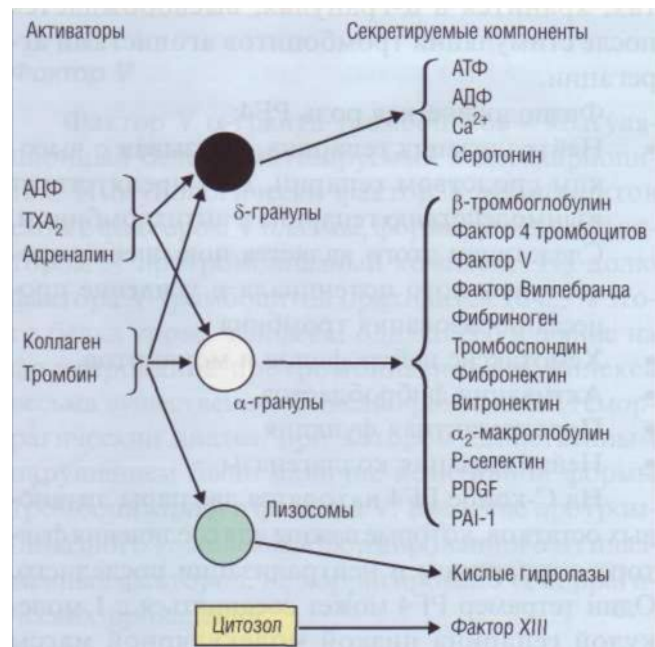


Рис. 21. Секретируемые факторы тромбоцитов присутствуют в тромбоцитах в 3 видах гранул хранения. Разные стимуляторы приводят к освобождению содержимого гранул тромбоцитов

Тромбоциты

нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ, ц-АМФ, ГДФ), серотонин, адреналин, норадреналин, дофамин, гистамин, Ca^{2+} и др. Высвобождающиеся из пула хранения АТФ и АДФ быстро метаболизируются в плазме до АМФ и аденозина; последние обладают прямым коронарорасширяющим действием. АДФ является важнейшим физиологическим метаболитом, обеспечивающим первичный гемостаз, стимулируя 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 необратимой активации.

Тромбоциты способны секретировать содержимое гранул как частично при обратимой ак-

тивации и в процессе трофических взаимодействий с органной капиллярной сетью, так и полностью при реакции освобождения, связанной с необратимой активацией. После дегрануляции цитоплазма тромбоцитов «опустошена». В неактивированных тромбоцитах цитоплазма может выглядеть «опустошенной» при врожденном дефекте заполнения гранул, приводящем к дефициту пула хранения - **синдрому «серых» тромбоцитов**.

После секреции большинство гранулярных мембран деградирует, гранулы не восстанавливаются, и тромбоциты теряют свою физиологическую активность. Если они находятся в токе крови, измененная форма способствует их быстрой элиминации в селезенке.

Тромбоцитарные факторы

Антигепариновый фактор тромбоцитов (фактор 4 тромбоцитов, ф.4, PF4)

PF4 является специфическим тромбоцитарным белком. PF4 синтезируется в мегакариоцитах, хранится в α -гранулах, высвобождается после стимуляции тромбоцитов агонистами агрегации.

Физиологическая роль PF4:

- Нейтрализация гепарина. Связывая с высоким сродством гепарин, PF4 препятствует взаимодействию гепарина с антитромбином. Следствием этого является повышение прокоагулянтного потенциала и усиление процесса образования тромбина.
- Хемотаксис нейтрофилов и моноцитов.
- Активация фибробластов.
- Проагрегантная функция.
- Нейтрализация коллагеназы.

На С-конце PF4 находятся две пары лизиновых остатков, которые важны для соединения фактора с гепарином и нейтрализации последнего. Один тетрамер PF4 может соединиться с 1 молекулой гепарина низкой молекулярной массы (<10 кДа) и с 2 и более молекулами гепарансульфатов высокой молекулярной массы. Конкурентное связывание гепарансульфатов с PF4 нарушает его взаимодействие с антитромбином, ингиби-

рует стимуляцию антитромбина PF4. Это ведет к снижению активности антитромбина и способствует формированию тромба.

PF4 способен подавлять коллагеназу. При врожденной недостаточности α -гранул тромбоцитов и мегакариоцитов - **синдроме серых тромбоцитов** - на поздних стадиях этого заболевания происходит развитие фиброза. Это, вероятно, является следствием избыточной активности коллагеназы.

β -тромбоглобулин β -TG,

β -TG - белок α -гранул тромбоцитов, обладает выраженной хемотаксической активностью по отношению к лейкоцитам. Его освобождение из тромбоцитов опосредовано циклооксигеназной реакцией и происходит до секреции других белков.

После активации тромбоцитов освобождение из них β -TG и PF4 происходит в эквимолярных 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 значи-

гельное повышение β -TG и увеличение отношения β -TG/PF4 (табл. 4).

Таблица 4

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

Группа обследованных	β -TG	PF4	β -TG/PF4
Здоровые люди (референтные значения)	6–8 нг/мл	2 нг/мл	3–4
Повышенная внутрисосудистая активация тромбоцитов	↑↑	(↑), Н	↑↑
Почечная недостаточность	↑	Н	↑
Введение гепарина	Н	↑	↓
Погрешности при лабораторной работе, приводящие к активации тромбоцитов <i>in vitro</i>	↑	↑	Н

Здесь и далее: Н - норма, t - увеличено, Tt - значительно увеличено, I - снижено.

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 ДВС-синдроме и при тромбоцитарной тромбоцитопенической пурпуре, хотя абсолютные значения этих показателей могут быть в пределах нормальных значений.

Фактор роста тромбоцитов (PDGF)

PDGF синтезируется мегакариоцитами, в тромбоцитах содержится в α -гранулах. Каждая клетка содержит порядка 1000 молекул PDGF. Фактор является сильным стимулятором репарации поврежденных тканей.

В сосудистой стенке рецепторы к PDGF присутствуют на фибробластах и гладких мышечных клетках; PDGF стимулирует пролиферацию этих клеток, а также усиливает продукцию гликозаминогликанов, коллагена и других элементов соединительной ткани. В настоящее время установлено, что рецепторы к PDGF имеются в клетках лимфоидной (Т-лимфоциты) и миелоидной линии.

Тромбоциты

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, или синтезируют определенное количество фибриногена *de novo*. Поэтому даже отмытые тромбоциты образуют агрегаты, включающие молекулы фибриногена. У больных с семейной афибриногенемией основным источником фибриногена являются тромбоциты.

Фактор V

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

Фактор XIII

Фактор XIII - трансклотаминаза, участвующая в стабилизации фибринового сгустка и

Тромбоциты

формировании соединительной ткани. Все количество ф.ХШ распределяется примерно поровну между плазмой и тромбоцитами. Большая часть тромбоцитарного пула находится в цитоп-

лазме клеток. Тромбоцитарный ф.ХШ синтезируется мегакариоцитами, плазменный пул - тканевыми макрофагами печени и гемопоэтических тканей.

Функция 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:
 - а) предоставления фосфолипидной поверхности (*фактор 3 тромбоцитов или тромбоцитарный тромбопластин*), необходимой для взаимодействия большинства плазменных белков гемостаза;
 - б) выброса прокоагулянтов из пулов хранения;
 - ретракция сгустка крови;
 - стимуляция локальной вазоконстрикции, репарации тканей, регулирование местной воспалительной реакции за счет высвобождения соответствующих медиаторов из пулов хранения тромбоцитов.
- 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 гранул хранения;
 - 3 - *агрегация* тромбоцитов.

Адгезия тромбоцитов

На рис. 22 показаны адгезированные тромбоциты на участке деэндотелизации. Через несколько минут после повреждения сосудистой стенки формируется сплошной слой адгезированных и агрегированных тромбоцитов, которые являются основой тромбоцитарного тромба (рис. 23).

В процессе *адгезии* важную роль играют 2 механизма. Один из них - 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 ме-



Рис. 22. Адгезированные тромбоциты на поврежденной (деэндотелизированной) сосудистой стенке



Рис. 23. Тромбоцитарный тромб, сформированный на поврежденной сосудистой стенке

Тромбоциты

ханизм, эффективно удерживающий тромбоциты при высокой скорости кровотока, включает адгезию тромбоцитов, опосредованную молекулами адгезии - фактором Виллебранда, фибронектином, витронектином, ламинином, тромбоспондином и др. *In vivo* оба эти механизма работают параллельно. Возможно, что первичный контакт тромбоцитов с субэндотелием осуществляется благодаря первому механизму, тогда как окончательная фиксация тромбоцитов происходит за счет формирования связей субэндотелий - фактор Виллебранда - GPIb-V-IX и связей, опосредованных другими молекулами адгезии.

Молекулы адгезии

Фактор Виллебранда (vWF) - один из самых больших гликопротеидов плазмы, имеет молекулярную массу от 540 до нескольких тысяч кДа, содержит в цепочке более 2000 аминокислот.

Ген фактора Виллебранда находится на коротком плече 12-й хромосомы. Синтез фактора Виллебранда происходит в эндотелиоцитах и мегакариоцитах. Фактор Виллебранда из эндотелиоцитов секретируется или в плазму, или в субэндотелиальное пространство; кроме того, он может сохраняться в тельцах Вейбла-Палада эндотелиоцитов (пулы хранения) и секретироваться после стимуляции эндотелиальных клеток. Фактор Виллебранда, синтезированный мегакариоцитами, сохраняется в альфа-гранулах тромбоцитов.

Информация о синтезе фактора Виллебранда получена в основном при изучении его в культурах эндотелиальных клеток. 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.

Пре-про-vWF содержит 2813 аминокислотных остатков. В эндоплазматическом ретикулуме после гликозилирования пре-про-vWF преобразуется в про-vWF, который превращается в зрелый vWF после отщепления пептида, состоящего из 741 аминокислотного остатка. Этот полипептид идентифицируется как антиген II vWF (vWF:AgII).

Процесс димеризации и полимеризации vWF происходит одновременно. Зрелая субъединица

vWF содержит 2050 аминокислотных остатков, 169 из которых - цистеин, сгруппированный в областях, расположенных в амино- и карбокси-концах молекулы (N- и С-концы). Процесс димеризации связан с образованием дисульфидных мостиков между С-концами молекулы, а дальнейшая полимеризация происходит за счет образования дисульфидных связей между N-концами. Конечный продукт накапливается в тельцах Вейбла-Палада в эндотелиоцитах и в α -гранулах тромбоцитов.

Фактор Виллебранда состоит из ряда полимеров прогрессивно увеличивающейся молекулярной массы: разделяют легкие, средние, тяжелые и сверхтяжелые мультимеры. Молекулярная масса vWF варьирует от 540 кДа у димеров до 20 тысяч кДа у самых крупных мультимеров, содержащих от 50 до 100 субъединиц. Самым большим тромбогенным потенциалом обладают молекулы vWF с наибольшей молекулярной массой.

В плазме нет мономеров фактора Виллебранда, он всегда образует комплексы. Концентрация vWF в плазме составляет примерно 10 мкг/мл.

При исследовании vWF, содержащегося в пулах хранения, было выявлено, что его молекулярная масса, а следовательно, и тромбогенный потенциал существенно выше, чем у vWF, содержащегося в плазме, и наиболее высок в α -гранулах тромбоцитов (так называемый сверхвысокомолекулярный фактор Виллебранда). После сильной стимуляции тромбоцитов и эндотелиоцитов сверхвысокомолекулярный фактор Виллебранда некоторое время обнаруживается в плазме. Однако потом в сосудистом русле молекулярная масса vWF довольно быстро снижается до «нормальной» под воздействием кальпаиновых протеаз плазмы. 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.

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 различную стимуляцию. Фоновая активность vWF в крови у каждого человека может меняться в значительных

Тромбоциты

пределах. Реализация vWF из тромбоцитарных гранул возникает при активации тромбоцитов под воздействием различных физиологических и нефизиологических индукторов (АДФ, коллаген, адреналин, вазопрессин, серотонин, тромбин, простагландин E₁, тромбоксан A₂ и др.), 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.

Вторичные изменения структуры vWF и его активности являются следствием иммунных процессов, тромбоцитарной тромбоцитопенической пурпуры, гемолитико-уремического синдрома и др. Описаны заболевания (болезнь Виллебранда, тип Виченца; врожденная тромбоцитарная тромбоцитопеническая пурпура), при которых дефект этих ферментов приводит к накоплению сверхвысокомолекулярных мультимеров vWF и преждевременной секвестрации тромбоцитов из кровотока.

Основными функциями фактора Виллебранда являются:

- опосредование адгезии тромбоцитов к субэндотелиальным структурам, в первую очередь к коллагену, и последующей агрегации тромбоцитов (участие в первичном сосудисто-тромбоцитарном гемостазе);
- связывание свободного фактора VIII и защита его молекулы от преждевременной инактивации (участие во вторичном плазменном гемостазе).

Опосредование адгезии и агрегации тромбоцитов. Роль фактора Виллебранда в адгезии и агрегации тромбоцитов наиболее велика в условиях воздействия высоких скоростей кровотока. Молекулы vWF специфически связываются с рецепторами тромбоцитов GPIIb-V-IX и коллагеном субэндотелия. Это обеспечивает прочную фиксацию тромбоцитов к субэндотелиальным структурам в тех участках сосудистого русла, 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 GPIa-IIa.

Агрегация тромбоцитов в условиях воздействия активного тока крови тоже происходит с участием фактора Виллебранда. Помимо GPIIb-V-IX, с фактором Виллебранда также связывается GPIIb-IIIa. Возможно, что это взаимодействие является ключевым в процессе агрегации в местах сосудистого русла с высокой скоростью тока крови.

Тест агрегации, опосредованный фактором Виллебранда, в лабораторных условиях может быть выполнен с использованием фиксированных тромбоцитов. Видимо, эта реакция не требует энергетических затрат. Однако стимуляция рецептора I_b-V-IX приводит к активации тромбоцита.

Учитывая особенности фактора Виллебранда, можно сказать, что он выполняет функцию «биологического клея», фиксируя тромбоциты на поврежденной сосудистой стенке (рис. 24).

Другая функция фактора Виллебранда - **защита ф. VIII от протеолитической деградации системой протеин С - протеин S.** В плазме vWF является белком-носителем фактора VIII.

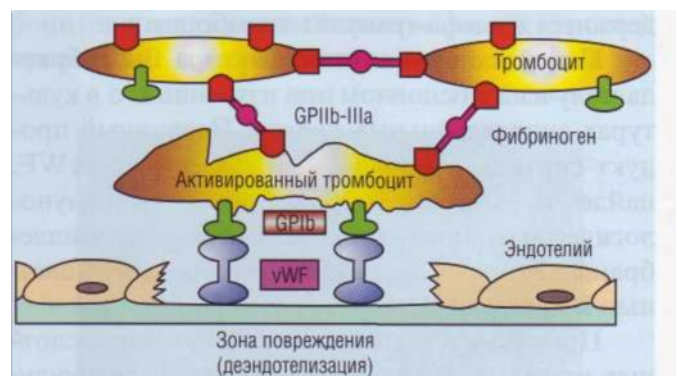


Рис. 24. Фактор Виллебранда (vWF) выполняет роль «биологического клея», прикрепляя к коллагену субэндотелия адгезированные тромбоциты через гликопротеиновый комплекс GPIIb-V-IX, Тромб увеличивается в размерах по мере адгезии и агрегации новых тромбоцитов, скрепление которых в агрегат обеспечивает фибриноген, имеющий дивалентную структуру и взаимодействующий с рецепторами GPIIb-IIIa

Тромбоциты

Молярная концентрация vWF примерно в 50 раз выше, чем молярная концентрация фактора VIII. Фактор VIII практически весь связан с vWF (рис. 25). Это предупреждает быструю деградацию ф. VIII под влиянием протеина С. Связанный с vWF фактор VIII защищен от протеолитической инактивации в плазме, поскольку у него заблокированы сайты связывания с фосфолипидной матрицей и заблокированы сайты связывания с протеином С. Поэтому недостаток vWF часто вызывает вторичный дефицит **ф. VIII**.

В области повреждения сосуда, в процессе vWF-опосредованной адгезии тромбоцитов происходит контакт комплекса vWF-ф. VIII и тромбина (ф. IIa), который активирует ф. III, освобождая его из комплекса с фактором Виллебранда.

Фибронектин (плазматический, субэндотелиальный и тромбоцитарный) - гранулярный контактный белок, который способен образовывать комплексы с GPIIb/IIIa-рецепторами тромбоцитов и коллагеном. Сродство фибронектина к коллагену и тромбоцитам меньше, чем у фактора Виллебранда, однако молекулярная концентрация его выше. Видимо, фибронектин является основной молекулой адгезии в венозной и капиллярной сети, образуя ось: тромбоцитарный рецептор GPIIb/IIIa - фибронектин - коллаген. Гликопротеиновый комплекс GPIIb/IIIa 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 а-гранул тромбоцитов, фибриногене, факторе Виллебранда, фибронектине, витронектине и других белках. Наличие RGD-последовательности на фибронектине определяет зависимость процесса его взаимодействия со своим рецептором на тромбоцитах от двухвалентных катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} .

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

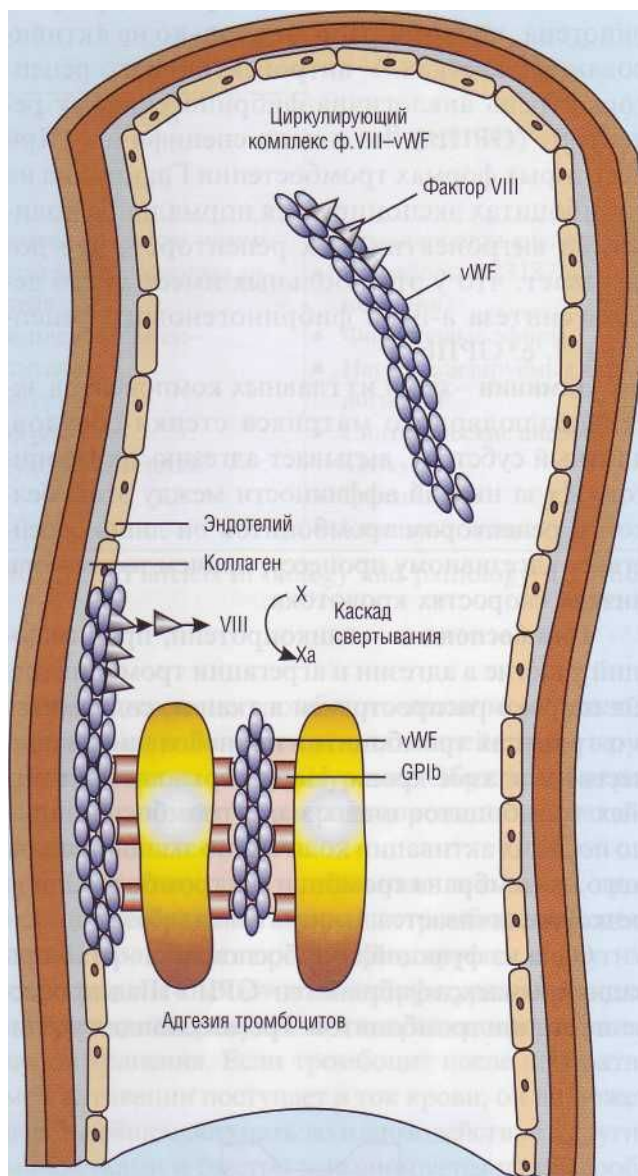


Рис. 25. Комплекс фактор VIII - фактор Виллебранда (ф. VIII—vWF) состоит из 2 отдельных белков, которые выполняют в гемостазе разные функции, имеют разную химическую и иммунологическую структуру. Фактор VIII необходим для активации фактора X в каскаде свертывания крови, его дефицит вызывает гемофилию А. Фактор Виллебранда (vWF) - полимерный белок, который составляет основную массу комплекса. Он необходим для адгезии тромбоцитов к поврежденной стенке сосудов, обеспечивая взаимодействие коллагена с гликопротеиновым комплексом тромбоцитов GPIIb-V-IX. Кроме того, он участвует в агрегации тромбоцитов, взаимодействуя с интегринами GPIIb-IIIa. Недостаток vWF приводит к болезни Виллебранда

Тромбоциты

вый рецептор на тромбоцитах функционирует постоянно, что отличает его от рецептора фибриногена, который работает только на активированных клетках. У витронектинового рецептора р-цепь аналогична фибриногеновому рецептору (GPIIb), но а-цепь специфична. При некоторых формах тромбостении Гланцмана на тромбоцитах экспонируется нормальное количество витронектиновых рецепторов, что доказывает, что у этих больных имеет место дефект синтеза а-цепи фибриногенового рецептора, т. е. **GPIIb**.

Ламинин - один из главных компонентов экстрацеллюлярного матрикса стенки сосудов, плотный субстрат, вызывает адгезию тромбоцитов. Из-за низкой аффинности между этим белком и рецептором тромбоцитов он лишь содействует адгезивному процессу, причем только при низких скоростях кровотока.

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 на мембране тромбоцитов тромбоспондина резко увеличивается.

Одна из функций тромбоспондина - стабилизация комплекса фибриноген-GPIIb-IIIa в процессе агрегации тромбоцитов. Тромбоспондин увели-

чивает его прочность и переводит агрегацию тромбоцитов из обратимой в необратимую (рис. 26).

Помимо этого, тромбоспондин связывается с рядом коагуляционных факторов (тромбином, факторами IXa, Xa), что приводит к повышению их локальной концентрации и защищает от действия ингибиторов.

Активация тромбоцитов

При контакте рецепторов адгезии тромбоцитов с субстратом и под воздействием синтезированного в области повреждения сосуда тромбина начинается процесс активации тромбоцитов. Видимо, основную роль в первичной активации тромбоцитов играет сигнал с рецепторов GPIIb-IIIa, GPIIb-V-IX и GPVI, которые контактируют со своими агонистами, в первую очередь с коллагеном, фактором Виллебранда и тромбином. Помимо коллагена, свойством активировать тромбоциты обладают и другие субэндотелиальные структуры.

Активация тромбоцитов лежит в основе выполнения ими своих функций. В табл. 5 приведен список основных веществ, активирующих тромбоциты. Почти все эти вещества взаимодействуют с тромбоцитами через специфические рецепторы, которые были описаны выше. Несмотря на многообразие активаторов и большое количество рецепторов к ним, клетка имеет ограниченное количество путей передачи сигнала и эффекторных

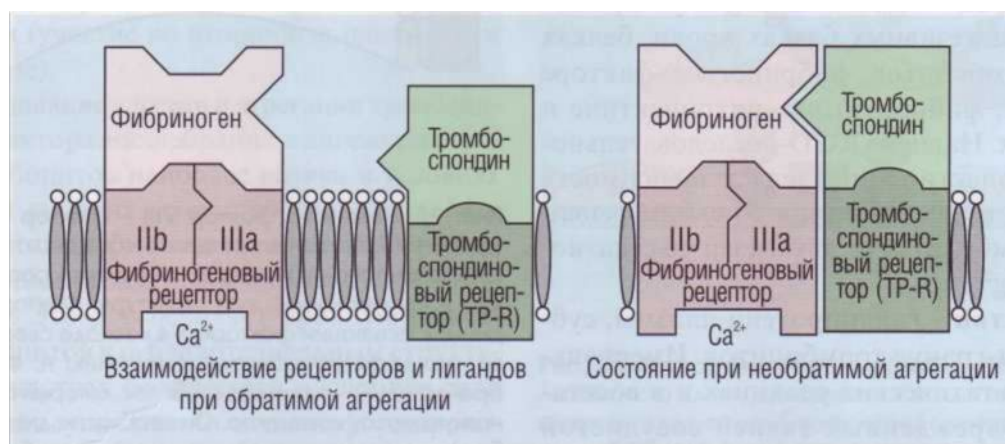


Рис. 26. Взаимодействие рецепторов к фибриногену и тромбоспондину с соответствующими лигандами. При взаимодействии тромбоцитов с фибриногеном на первой фазе происходит их обратимая активация, При стабилизации комплекса тромбоспондином процесс переходит в необратимую стадию агрегации

Субстанции, стимулирующие тромбоциты

В организме			В эксперименте
здорового человека		больного	
в крови в зоне повреждения сосуда	в поврежденной стенке сосуда	в крови	
<ul style="list-style-type: none"> • АДФ • Эпинефрин • Серотонин • Вазопрессин • Тромбин • Плазмин • РАФ • ТХА₂ • ПГГ₂, ПГН₂ • Фактор Виллебранда 	<ul style="list-style-type: none"> • Коллаген • Микрофибриллы вокруг эластина • Фактор Виллебранда 	<ul style="list-style-type: none"> • Протеолитические ферменты • Антитромбоцитарные антитела • Комплекс антиген-антитело • Бактерии • Вирусы • Опухолевые клетки 	<ul style="list-style-type: none"> • Арахидоновая кислота • Ионофоры А23187 и иономицин • Форболовые эфиры • Негидролизуемые аналоги GTP • Синтетические аналоги ТХА₂ • Ристомицин • Гемагглютинины

Данные приведены по: Kinlough-Rathbone R.L. Mustard J.F. // Platelets in biology and pathology, III / Eds D.E. MacIntyre, J.L. Gordon. Amsterdam, 1987.

механизмов. Реакция тромбоцита на активирующие воздействия одностипна:

- Тромбоцит меняет форму (рис. 27): у него появляются псевдоподии, он «распластывается», за счет открытой канальцевой системы (ОКС) увеличивается площадь его поверхности.
- Меняются соотношения различных фосфолипидов между наружным и внутренним листками клеточной мембраны. Это приводит к появлению на наружной поверхности тромбоцита большого количества кислых фосфолипидов с прокоагулянтными свойствами - *фактор 3 тромбоцитов (PF3)*.
- На мембране тромбоцитов экспрессируются или повышают аффинность интегрин.
- Происходит секреция содержимого пулов хранения тромбоцитов во внешнюю среду.
- Тромбоциты фиксируются на поверхностях (субэндотелиальном матриксе и др.) и (или) соединяются друг с другом и другими клетками крови (происходит адгезия и агрегация). Активация тромбоцитов может быть **обратимой**: происходят лишь частичные конформационные изменения, обратимое соединение с другими клетками и частичная секреция гранул. Спустя небольшое время тромбоцит возвращается в интактное состояние и поступает в ток крови. После обратимой активации и возвращения в неак-

тивное состояние тромбоцит снова может активироваться и вступать во взаимодействие с другими клетками и структурами. Обратимая агрегация возникает при кратковременном воздействии слабого стимула.

Если стимуляция длительная или сильная, происходит **необратимая** активация тромбоцита. В этом случае тромбоцит прочно фиксируется к другим клеткам или внеклеточным структурам, происходит полная дегрануляция и секреция содержимого пулов хранения. Если тромбоцит после необратимой активации поступает в ток крови, он не может в дальнейшем вступать во взаимодействие с другими клетками и быстро элиминируется из кровообращения. В случае массивного поступления в ток крови необратимо активированных тромбоцитов выявляется достоверное снижение агрегации тромбоцитов со всеми индукторами. Микроскопия в этом случае позволяет выявить большое количество деформированных тромбоцитов.

Стимуляторы тромбоцитов можно разделить на слабые и сильные.

К **слабым** стимуляторам относятся АДФ, адреналин, вазопрессин, серотонин. Передача сигнала от рецепторов этих веществ проходит стадию усиления внутри клетки через дополнительный этап образования продуктов тромбоксанового завершения и секреции хранимых в грану-

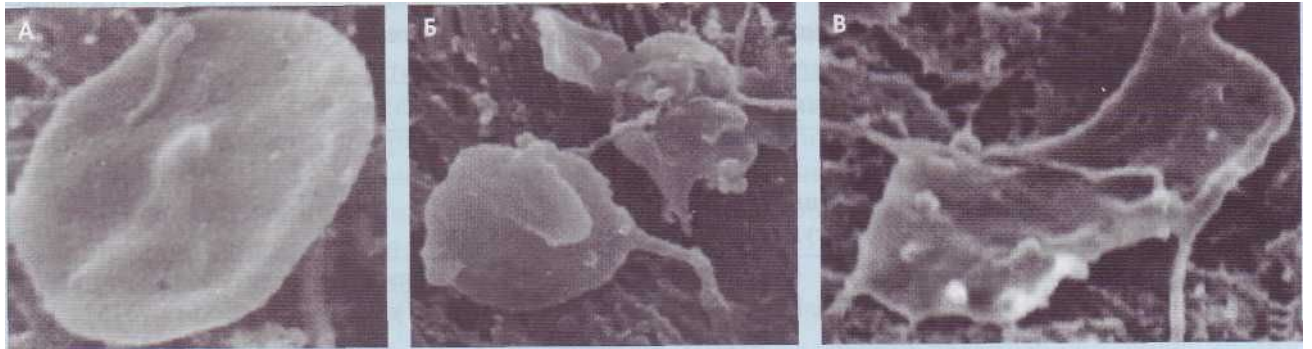


Рис. 27. Стадии контактной активации тромбоцитов: А - неактивный тромбоцит (дискоцит, пластинка); Б - тромбоциты в обратимой стадии контактной активации (шаровидные формы с псевдоподиями); В - тромбоцит в необратимой стадии адгезии (распластанная форма без внутреннего содержимого - «тень тромбоцита»)

лах активных компонентов. При исследовании агрегации тромбоцитов в присутствии слабых стимуляторов на агрегатограммах кривая имеет двухступенчатую форму, что обусловлено усилением агрегации после выделения содержимого пулов хранения (рис. 28).

Сильные стимуляторы тромбоцитов - коллаген, тромбин, большие дозы АДФ - непосредственно после мембранной стимуляции приводят к необратимой активации.

В табл. 5 представлены наиболее важные активаторы тромбоцитов. Часть из них присутствует в подпороговых концентрациях в интактной плазме и избирательно накапливается в зоне повреждения сосудов; другие появляются в системе циркуляции при активации системы свертывания крови в физиологических или патологических условиях. Некоторые факторы выделяются из самих тромбоцитов (АДФ, серотонин, адреналиноподобные субстанции, фактор Виллебранда).

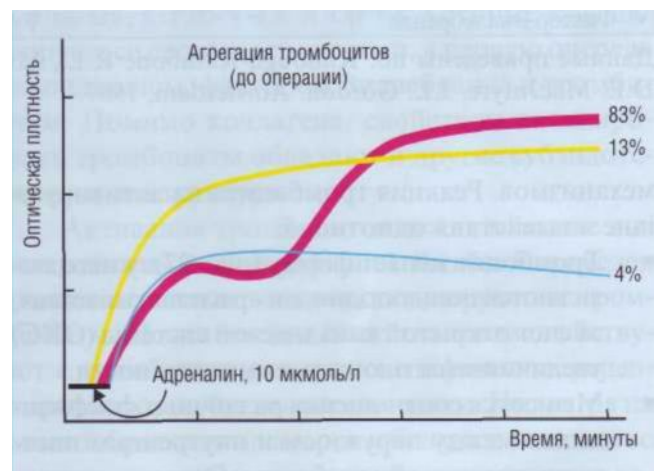


Рис. 28. Типы агрегатограмм. В пациентов при стимуляции агрегации адреналином в дозе 10 мкмоль/л в 83% случаев наблюдается двухфазная агрегация тромбоцитов, в 13% случаев - необратимая агрегация и в 4% - после начальной агрегации наблюдается дезагрегация (собственные данные)

Агрегация тромбоцитов

Процесс агрегации заключается в присоединении активированных тромбоцитов, находящихся в токе крови, друг к другу и ранее фиксированным в области повреждения. Основным рецептором агрегации является GPIIb-IIIa (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$). После активации тромбоцита GPIIb-IIIa значительно повышает свою аффинность по отношению к фибрину и меняет антигенную структуру (что свидетельствует о значительных кон-

формационных изменениях). После этого происходит соединение тромбоцитов, опосредованное фибрином и фактором Виллебранда (рис. 24).

Вследствие распространения активирующего сигнала на агрегированные тромбоциты, удаленные от места повреждения, образуется толстый слой тромбоцитов, армированный фибрином. Этот процесс лежит в основе образования тромбоцитарного тромба. По мере удаления от зоны

Тромбоциты

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 сывотки. Ретракция способствует улучшению механических характеристик сгустка и снижению ак-

тивности фибринолиза внутри него. Ретракция сгустка связана с контрактивными свойствами тромбоцитов. Фибриллы миозина, расположенные в цитоплазме тромбоцитов, фиксированы к мембранному гликопротеину GPIIb-IIIa. В активированных тромбоцитах за счет миозина происходит процесс постепенного «сжимания» цитоплазмы, что приводит к уплотнению всего сгустка крови.

При врожденной недостаточности GPIIb-IIIa - тромбоцитении Гланцмана - грубо нарушается ретракция сгустка крови. Следствием этого является не только грубый дефект тромбоцитарного гемостаза, но и качественный дефект образовавшегося сгустка крови.

РОЛЬ ЛЕЙКОЦИТОВ В ГЕМОСТАЗЕ

Лейкоциты (нейтрофилы и моноциты) в зоне повреждения сосуда участвуют в гемостатических реакциях.

Участие нейтрофилов в пристеночном тромбообразовании

Агрегация тромбоцитов сопровождается освобождением из α -гранул активаторного рецептора Р-селектина (CD62), который остается ассоциированным с плазматической мембраной тромбоцитов. Экспрессия на мембране лейкоцитов Р-селектин-связывающего гликопротеина-1 (PSGL-1) позволяет нейтрофилам присоединять тромбоциты (рис. 29). Связь нейтрофилов с тромбоцитами обеспечивает репаративные и воспалительные реакции, возникающие в ответ на повреждение.

Нейтрофилы после связывания на мембранах способны секретировать адгезивные молекулы и интерлейкины. Некоторые из интерлейкинов, в частности интерлейкин-1 (ИЛ-1) и фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), активируют эндотелиальные клетки. Первичный контакт гранулоцитов приводит к перемещению их вдоль сосудистой стенки с последующей трансэндотелиальной миграцией в субэндотелий. При действии повреждающих факторов, таких, как иммунные комплексы, эндотоксин, гранулоци-

ты могут дегранулироваться и освобождать ИЛ-1, ФНО- α , протеолитические ферменты, такие, как эластаза и катепсин, активные формы кислорода (O_2^- , O_2^+), что в свою очередь ведет к повреждению сосудистой стенки. Этот процесс доминирует при воспалительных реакциях. Протеолитические ферменты, которые освобождаются из лейкоцитов, в участках воспаления вызывают нарушения структуры и функции эндотелия, это является условием развития петехий.

Роль нейтрофилов в модуляции реакций гемостаза требует уточнения. С одной стороны, экспрессия тканевого фактора на мембране нейтрофилов происходит либо при длительной стимуляции различными провоспалительными цитокинами, либо после длительного взаимодействия с Р-селектином активированных тромбоцитов. К этому времени на активированных тромбоцитах уже образуется сгусток крови. С другой стороны, экспериментально доказано моду-



Рис. 29. Участие активных нейтрофилов в повреждении сосудистого эндотелия

Роль лейкоцитов в гемостазе

лирующее воздействие лейкоцитов крови на функцию тромбоцитов при исследовании агрегации тромбоцитов в цельной крови. Кроме того, исследования показали возможность сборки на нейтрофилах протромбиназного комплекса.

В последнее время описан феномен агрегации лейкоцитов (нейтрофилов) при ишемии тканей. Этот феномен особенно значим для повреждения легких при шоке. В развитии геморрагического шока он играет ведущую роль. На рис. 30 представлен агрегат из нейтрофилов, сформированный на поверхности сосудистой стенки.



Рис. 30. Агрегат из нейтрофилов, выделенный из сосудов легких, в которых формируются агрегаты при развитии респираторного дистресс-синдрома (РДС). Сканирующая электронная микроскопия

Участие моноцитов в свертывании крови

Уникальными свойствами обладают моноциты. Это единственные клетки, способные создавать на своей поверхности условия для сборки и успешного функционирования всех ферментативных комплексов системы свертывания крови. Стимулированные моноциты экспрессируют около 16 000 сайтов связывания протромбиназного комплекса. Эффективность синтеза тромбина на их поверхности сопоставима с эффективностью синтеза тромбина на поверхности активированных тромбоцитов.

Синтез и экспрессия тканевого фактора, эффективно связывающего ф. VIIa, происходит на моноцитах под воздействием различных физиологических и патологических стимулов, в том числе бактериальных липополисахаридов, фактора некроза опухоли, интерлейкина-1, С-реактивного белка, иммунных комплексов. Сборка теназного комплекса на моноцитарной мембране - ключевой момент в развитии процесса коагуляции. Комплекс тканевого фактора - ф. VIIa подавляется ингибитором пути тканевого фактора (ингибитором внутреннего пути - ИВП), также синтезируемым и экспрессируемым моноцитами.

Реакции свертывания крови, протекающие на моноцитарной мембране, усиливаются специфическими для моноцитов механизмами. Фиксированные на поверхности моноцитов эластаза и катепсин G активируют ф. V до ф. Va, поэтому ф. V не поступает в кровоток, а остается тут же на мембране моноцитов и формирует протромбиназный

комплекс с ф. Ха. Причем этот комплекс защищен от протеолиза активированным протеином С (АПС), поэтому активность протромбиназы на моноцитарной мембране длительно сохраняется на высоком уровне. Помимо ф. Va, катепсин G активирует ф. X. В отличие от катепсина G действие эластазы дозозависимо. В малых концентрациях она активирует ф. V, а в больших - расщепляет ф. Va. Эластаза, видимо, не обладает способностью инактивировать ф. Ха. Однако воздействие ее высоких концентраций на ф. X изменяет последний так, что его в дальнейшем невозможно активировать.

Другим альтернативным путем, специфичным для моноцитов, является активация ф. X после его соединения с мембранным рецептором Mac-1 (CD11b/CD18). Связавшись с Mac-1, ф. Ха частично активирует моноциты и вызывает экспрессию специфического моноцитарного рецептора EPR-1. Комплекс ф. Ха-EPR-1 способен эффективно активировать протромбин в присутствии Ca^{2+} без участия ф. Уа. Таким образом, на поверхности моноцита может собираться полноценный протромбиназный комплекс.

Прокоагулянтная активность моноцитов зависит от их микроокружения. Коллагены I и IV типов, фибронектин - активные субстраты для адгезии моноцитов в отличие от ламинина. Последний адгезирует моноциты в 6-10 раз хуже. Однако именно на моноцитах, адгезированных к ламинину, процессы коагуляции развиваются

Роль лейкоцитов в гемостазе

в 3-5 раз быстрее, чем на мембранах моноцитов, адгезировавшихся на других субстратах.

Помимо катализа гуморальных реакций свертывания крови, моноциты обладают проагрегантной активностью. Катепсин G обладает свойством вызывать агрегацию тромбоцитов, изменение их формы, мобилизацию кальция, экзоцитоз α -гранул и плотных гранул, уси-

ление адгезии тромбоцитов к лейкоцитам. Часть этих реакций катализируется моноцитарной эластазой.

В отличие от моноцитов нейтрофилы и лимфоциты не экспрессируют PAR-1, однако исследования показали, что на изолированных популяциях этих клеток происходит сборка протромбиназных комплексов.



ЦИКЛЫ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ КАФЕДРЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ РМАПО (Москва)

1.	Клиническая лабораторная диагностика (врачи и биологи, стажировка, профессиональная переподготовка, общее усовершенствование)	Очное, ПП	В течение 4 месяцев
2.	Лабораторная цитология (цитологи)	Очное СУ, выездной	Месячный
3.	Контроль качества лабораторных исследований (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
4.	Клинико-лабораторное исследование эякулята (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
5.	Методы исследования системы гемостаза (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
6.	Лабораторная диагностика урогенитальных инфекций (врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
7.	Иммуноферментный анализ в КДЛ (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
8.	Изоиммунологические методы исследований (врачи станций переливания крови)	Очное ОУ	Месячный
9.	Клиническая лабораторная диагностика. Гематолог, и общеклинич. исследования (зав. КДЛ и врачи клинич. лаб. диагностики)	Очное ОУ	Месячный
10.	ПЦР в КДЛ (врачи и биологи клинич. лаб. диагностики)	Очное ТУ	2 недели
11.	Определение алкоголя в биологических жидкостях	Очное ТУ	2 недели
12.	Лабораторная диагностика лимфопролиферативных заболеваний	Очное ТУ	2 недели

Все циклы длительностью 1 месяц и более дают право сдавать сертификационный экзамен. По окончании более коротких циклов выдаются свидетельства о повышении квалификации государственного образца.

Заявки для участия в циклах усовершенствования принимаются:

- по почте: 125424, Москва, а/я 32 (кафедра КЛД)
- по факсу (095) 945-84-00 или телефону (095) 945-82-22
- по электронной почте: kafedra-kdl@list.ru

ПЛАЗМЕННЫЕ БЕЛКИ ГЕМОСТАЗА

Плазменные белки гемостаза образуют 2 ферментативные системы крови, имеющие своей целью поддержание гемостатического баланса (рис. 31):

1. Система свертывания плазмы. Система состоит из ферментов, ферментативных белковых катализаторов (кофакторов) и ингибиторов свертывания. Конечной целью этой системы является образование важнейшего фермента тромбина, а в конечном итоге - фибринового сгустка, составляющего основу гемостатического тромба.
2. Система фибринолиза. Конечной целью этой системы является образование главного фермента фибринолиза плазмина и лизис фибринового сгустка. Эту систему составляют плазминоген и его активаторы и ингибиторы. Обе эти системы имеют сходные черты:
 - В обеих системах происходит многоэтапный ферментативный процесс активации,

в котором участвует ряд белков - протеаз.

- По крайней мере, *in vitro* имеется несколько путей запуска каждого процесса, а в итоге образуется один конечный продукт.
- Многие реакции нуждаются в наличии специфической поверхности и ионов кальция. *In vivo* твердой фазой для фиксации реагирующих белков служат кислые фосфолипиды клеточных мембран, в частности мембран тромбоцитов, фибробластов, возможно лейкоцитов.

Кроме каскадных систем свертывания плазмы и фибринолиза, к плазменным белкам гемостаза относятся многочисленные ингибиторы и активаторы, эффекты которых проявляются как действие антикоагулянтов или прокоагулянтов и соответственно ингибиторов или активаторов фибринолиза.

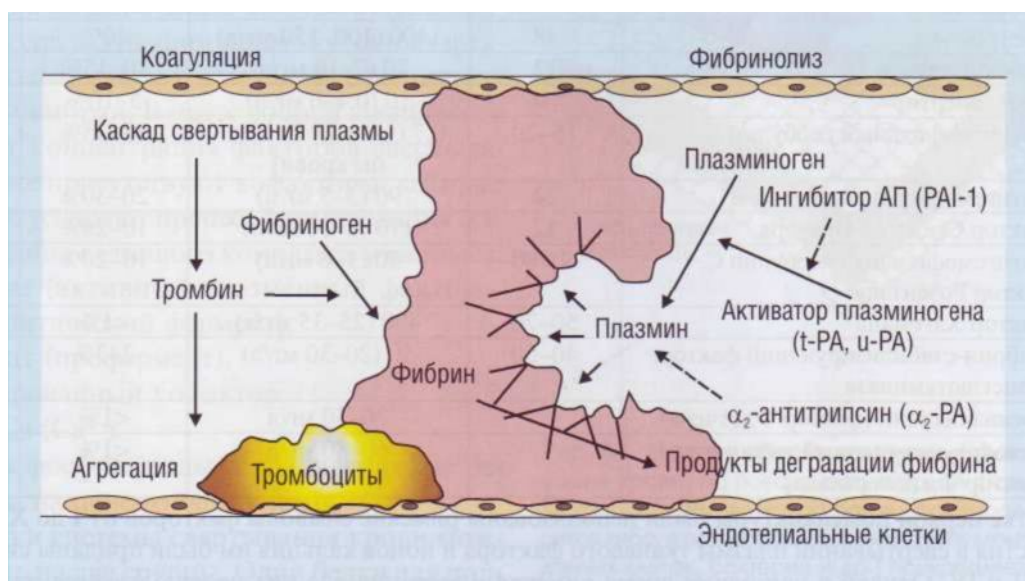


Рис. 31. Система свертывания крови и система фибринолиза - каскадные протеолитические ферментативные системы, обеспечивающие гемостатический баланс крови

Плазменные белки гемостаза

Система свертывания плазмы

Система свертывания плазмы - ферментативная система, осуществляющая каскад протеолитических реакций, в результате которых происходит образование фибриновой пробки в месте повреждения сосуда. Система свертывания тесно связана с другими протеолитическими системами плазмы, в том числе с системой фибринолиза. Белки свертывания плазмы, входящие в каскад свертывания крови, принято называть термином «фактор». В соответствии с международной номенклатурой факторы свертывания плазмы обозначаются римскими цифрами (табл. 6). Активные формы факторов обозначаются теми же римскими цифрами, но с добавлением аббревиатуры «а».

Практически все факторы системы свертывания крови циркулируют в кровотоке в форме неактивных проэнзимов или в форме неактивных кофакторов. Исключение составляет фак-

тор VII, примерно 1-2% которого в норме циркулируют в активной форме. При запуске свертывания крови происходит каскадная активация проэнзимов и кофакторов (рис. 32). Процесс активации представляет собой ограниченный протеолиз неактивных предшественников до активных энзимов и кофакторов. Активированные энзимы являются сериновыми протеазами (за исключением фактора XIII). Активированные кофакторы, не обладая самостоятельной ферментативной активностью, играют роль коферментов.

Сериновыми протеазами являются активированные факторы II, VII, IX, X, XI, XII, ПК.

Трансглутаминаза - фактор XIII.

Кофакторы - факторы V, VIII, ВМК.

Содержание компонентов гемостаза, в том числе плазменных факторов свертывания, в системе циркуляции существенно больше, чем необходимо

Таблица 6

Плазменные факторы свертывания крови

Символ фактора	Название	Время полужизни (ч)	Концентрация в плазме (нмоль/л)	Гемостатический минимум	Зависимость от витамина К
I	Фибриноген	64–96	8800 (2–4 г/л)	0,5–1,0 г/л	–
II	Протромбин	48	1400 (100–150 мг/л)	40%	+
V	Проакцелерин	12	20 (7–10 мг/л)	10–15%	–
VII	Проконвертин	4–6	10 (0,4–0 мг/л)	5–10%	+
VIII	Антигемофильный глобулин А	15–20	0,7 (зависит от группы крови)	30–35%	–
IX	Антигемофильный фактор В	24	90 (3–5 мг/л)	20–30%	+
X	Фактор Стюарта–Прауэра	32	170 (8–10 мг/л)	10–20%	+
XI	Антигемофильный глобулин С, фактор Розенталя	60–80	30 (3–6 мг/л)	10–20%	–
XII	Фактор Хагемана	50–70	400 (25–35 мг/л)	<1%	–
XIII	Фибрин-стабилизирующий фактор, трансглутаминаза	40–50	50 (20–30 мг/л)	2–3%	–
ПК	Прекалликреин (фактор Флетчера)		30–50 мг/л	<1%	–
ВМК	Высокомолекулярный кининоген (фактор Фитцджеральда)		60–80 мг/л	<1%	–

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 этим символом ошибочно был назван фактор Va.

Плазменные белки гемостаза



Рис. 32. Протеолитическая активация факторов гемостаза. Путем ограниченного протеолиза из неактивного предшественника образуются активный пептид и активированный фермент

для формирования фибринового сгустка. Процесс свертывания происходит в условиях насыщения субстратами (рис. 33). 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, если обратиться к рис. 33 - то это начальный диапазон, при котором скорость реакции зависит от концентрации фактора.

Для эффективного взаимодействия и активации белков свертывания крови необходимо образование комплексов этих белков, их кофакторов и субстрата (рис. 34). Эти условия не могут возникнуть в жидкой фазе. Поэтому 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.

Все белки системы свертывания крови можно разделить на две группы. Одни белки для полноценного формирования требуют наличия витамина К (витамин-К-зависимые белки), а другие - нет.

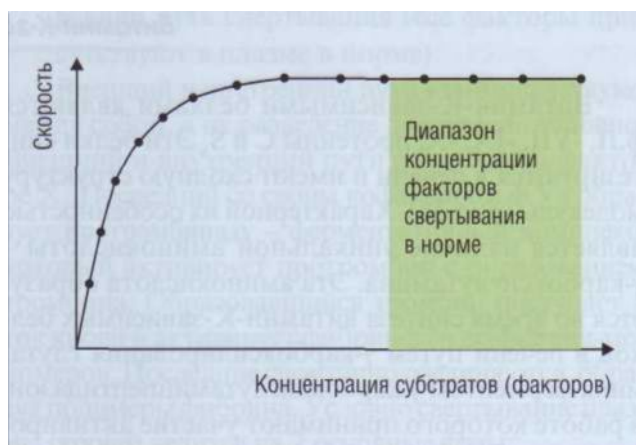


Рис. 33. Соотношение между концентрацией факторов и скоростью процесса свертывания. В норме скорость коагуляции практически не определяется концентрацией факторов, так как они присутствуют в избытке и процесс идет в состоянии насыщения. Только после значительного истощения фактора его концентрация будет влиять на скорость реакции и соответственно на скорость свертывания плазмы

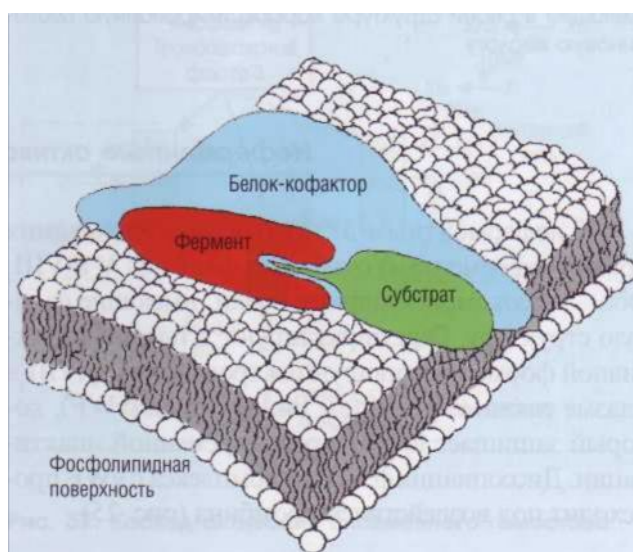


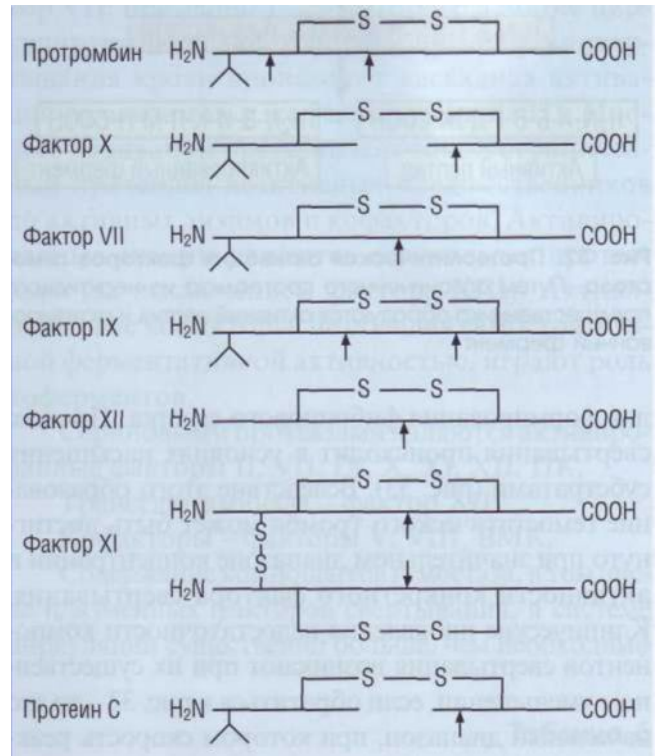
Рис. 34. Модель сборки комплекса факторов свертывания крови. На поверхность твердой фазы (фосфолипиды фибробластов, макрофагов, активированных тромбоцитов либо, в патологических ситуациях, мембраны поврежденных клеток, бактерий и др.) прикрепляется (интернализуются) крупный кофакторный белок, который организует место контакта факторов свертывания, те в свою очередь взаимодействуют друг с другом по принципу комплементарности

Плазменные белки гемостаза

Витамин-К-зависимые белки

Витамин-К-зависимыми белками являются ф. II, -VII, -IX, -X, протеины С и S. Эти белки синтезируются в печени и имеют сходную структуру молекулы (рис. 35). Характерной их особенностью является наличие уникальной аминокислоты - у-карбоксиглутамина. Эта аминокислота образуется во время синтеза витамин-К-зависимых белков в печени путем у-карбоксилирования глутамина ферментом у-карбоксиглутаминпептидазой, в работе которого принимают участие активированные формы витамина К (рис. 142). у-карбоксиглутамин дает возможность витамин-К-зависимым белкам с помощью ионов Ca^{2+} образовывать комплексы с кислыми фосфолипидами.

Рис. 35. Структурная организация некоторых плазменных белков системы гемостаза. Стрелками показаны места протеолитического гидролиза, в результате которого происходит переход неактивных проферментов в активные ферменты - сериновые протеазы каскада коагуляции. Двузубцем обозначены витамин-К-зависимые факторы, имеющие в своей структуре карбоксилированную глутаминовую кислоту



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 (рис. 25).

ф. Va и -VIIIa образуют на фосфолипидных мембранах комплексы с ф. Xa и -IXa соответственно. Специфическая активность ф. Xa и -IXa в комплексах с кофакторами в десятки тысяч раз больше, чем изолированных. Основным ингибитором ф. Va и -VIIIa является комплекс протеин С - протеин S.

Классический коагуляционный каскад активации тромбина

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 так называемой «классической» теории коагуляционного каскада активации тромбина. В насто-

ящее время эта теория пересмотрена с учетом вновь полученной информации о взаимодействии различных компонентов гемостаза. Однако базовые принципы изложенной ниже классической каскадной теории считаются верными до настоящего времени. Кроме того, знание классического каскада свертывания крови необходимо для пра-

вильной интерпретации результатов коагулологических тестов.

Активация протромбина - многостадийный процесс, который происходит по механизму проферментно-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. 36). С другой стороны, многостадийность позволяет более гибко регулировать процесс.

В классическом каскаде свертывания крови выделяют 2 пути активации процесса:

- Активация тканевым фактором (ТФ). Так как ТФ не относится к плазменным факторам и контактирует с кровью только при повреждении сосуда, то активация с его участием обозначается как **внешний путь** свертывания.
- Активация ф.ХII при контакте с отрицательно заряженной поверхностью твердого тела, или контактная активация. Поскольку фактор XII в норме присутствует в плазме, активация с его участием обозначается как **внут-**



Рис. 36. Каскадный принцип усиления сигнала. Каждый предыдущий компонент системы свертывания активирует много последующих

рнный путь свертывания (все факторы присутствуют в плазме в норме). 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 образует **протромбиназу** - ферментативный комплекс, который активирует протромбин с образованием тромбина. Образовавшийся тромбин поступает в ток крови и активирует фибриноген до фибрин-мономеров. Последние спонтанно соединяются, образуя полимеры фибрина. Условно свертывание плазмы (крови) делится на 2 основные фазы:

- 1) многоступенчатый этап, приводящий к активации протромбина и превращению его в активный фермент - тромбин;
 - 2) конечный этап, в котором под влиянием тромбина из фибриногена образуется фибрин.
- Схема коагуляционного каскада плазменного гемостаза представлена на рис. 37.

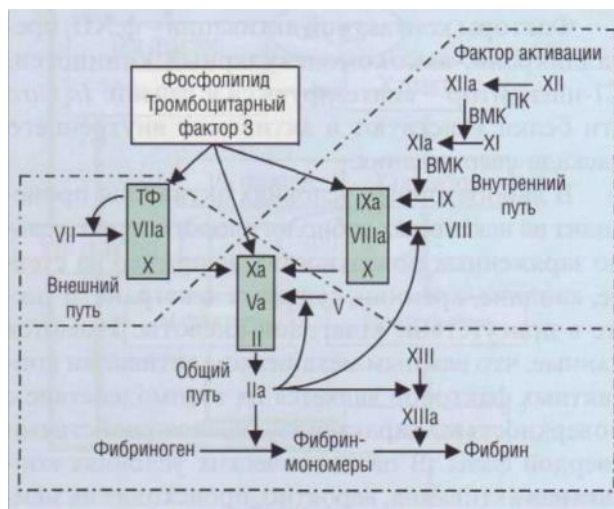


Рис. 37. Каскад активации плазменного гемостаза

Внешний путь образования протромбиназы

Внешний путь образования протромбиназы короткий, что ведет к быстрому образованию тромбина.

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 поверхно-

сти формирует протромбиназу. В настоящее время полагают, что внешний путь - основной физиологический путь запуска процесса свертывания крови. Подробно его значение будет описано в разделе «Современная теория свертывания крови».

Активность внешнего пути поддерживается за счет механизма положительной обратной свя-

Плазменные белки гемостаза

Классическая теория свертывания крови оставалась слишком много вопросов и противоречила клиническим данным. Например, с одной стороны, было неясно, какая поверхность в физиологических условиях является активатором, с другой стороны, почему дефицит факторов внутреннего пути (ф. VIII, -IX, -XI) приводит к выраженной кровоточивости при нормальной активности факторов внешнего пути, а глубокий дефицит факторов контактной активации, как правило, не сопровождается геморрагическим синдромом. **В современной каскадно-матричной теории гемостаза** эти противоречия разрешены.

С современной точки зрения, контактная активация играет большую роль во взаимодействии системы свертывания крови с другими протеолитическими системами крови (фибринолитической, ангиотензин-рениновой, калликреин-кининовой, системой комплемента и др.).

В настоящее время изучены следующие функции белков контактной активации:

1. БРАДИКИНИН стимулирует повышение внутриклеточной концентрации цАМФ и приводит к:
 - Вазодилатации и снижению артериального давления.
 - Активации системы фибринолиза путем стимуляции секреции тканевого активатора плазминогена.
 - Ингибированию активации тромбоцитов.
 - Стимуляции репарации и росту гладкомышечной ткани в поврежденных сосудах.
2. Прямое ингибирование тромбин-индуцированной активации тромбоцитов.
3. Активация фибринолиза.
 - Непосредственная активация плазминогена калликреином и ф. XIIa. Однако оба эти белка значительно менее активны, чем тканевый активатор и урокиназа.
 - Активация калликреином проурокиназы до активной сериновой протеазы - двухцепочечной урокиназы.
4. Блокада клеточной адгезии.
5. Антиангиогенное действие.
6. 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.

Внутренний путь образования протромбиназы (рис. 40) включает активирующее действие ф. XIIa на ф. XI, который в свою очередь активирует ф. IX. Поскольку значение контактной активации в процессе свертывания крови переосмыслено, физиологическая роль ф. XI изучается. Видимо, в физиологических условиях ф. XI в основном активируется тромбином. ф. XI довольно 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 ф. IX, -VIII и -V. В то же время избыток тромбина тормозит начало процесса фибри-

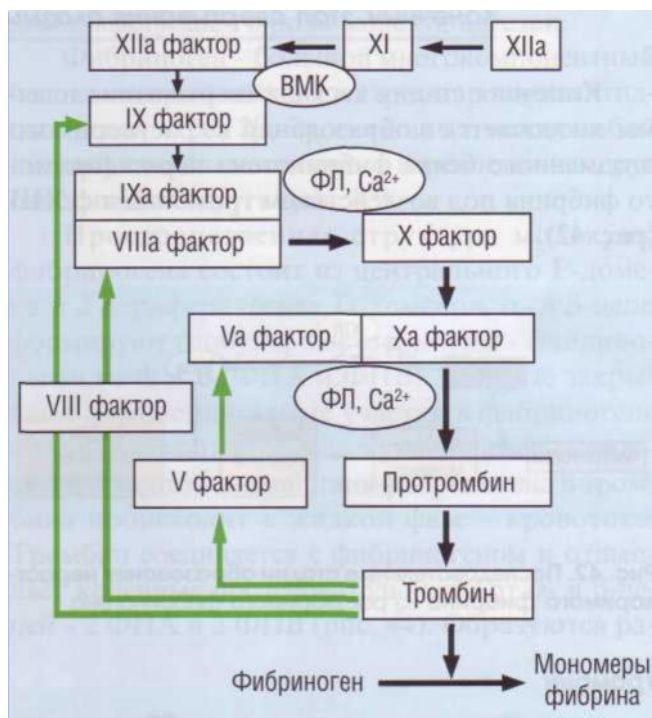
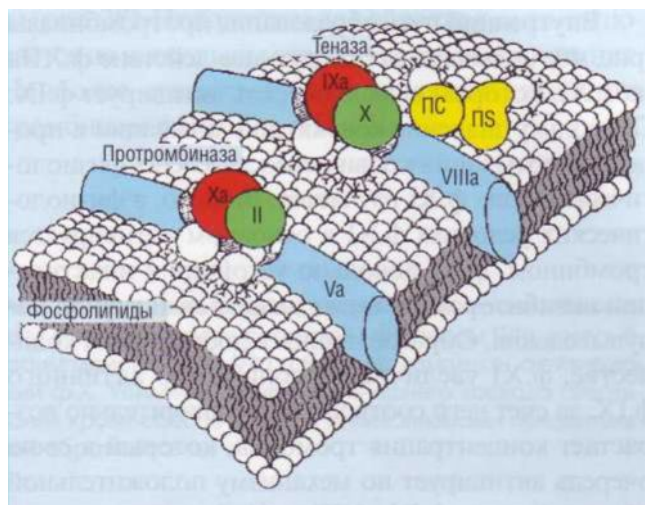


Рис. 40. Внутренний каскад активации плазменного гемостаза. Начинается с взаимной активации контактных факторов системы гемостаза, Фактор XIIa переводит фактор XI в XIa. Фактор XIa активирует фактор IX. Все последующие этапы активации свертывания по внутреннему пути требуют ионов Ca^{2+} и зависят от присутствия фосфолипидов. Фактор IXa активирует фактор X, но эта реакция не очень эффективная. Однако появившийся тромбин активирует фактор VIII. Активный фактор VIIIa вместе с фактором IXa, ионами Ca^{2+} и фосфолипидами очень эффективно активирует фактор Xa. Обратная связь поддерживает развитие процесса за счет активации тромбином ф. VIII, -IX и -V

Плазменные белки гемостаза



нолиза за счет активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (ТАФИ).

Ингибитор С1-компонента комплемента (С1-ингибитор) является элементом системы контактной активации. Помимо комплемента, он ингибирует ф.ХIIa (см. раздел «Ингибиторы системы свертывания крови»).

Другим ингибитором процесса контактной активации в физиологических условиях является апротинин.

Рис. 41. Теназный и протромбиназный комплексы. Образование этих комплексов сопровождается резким увеличением активации соответственно фактора X и протромбина (фактор II)

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.ХIII (рис. 42).

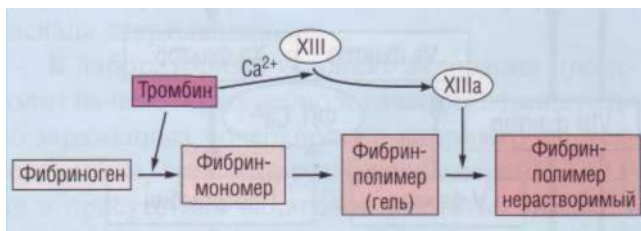


Рис. 42. Последовательные стадии образования нерастворимого фибрина из растворимого фибриногена

Тромбин

Тромбин - ключевой фермент гемостаза. Тромбин - витамин-К-зависимый белок - является сериновой протеазой. В печени происходит синтез неактивного предшественника протромбина, который в дальнейшем циркулирует в плазме. В комплексе ф.Ха-Va-II на фосфолипидной поверхности происходит ограниченный протеолиз протромбина. Образуется несколько активных структур с уменьшающейся молекулярной массой - мезотромбин, α-тромбин, β-тромбин, γ-тромбин. Наиболее значимым продуктом является сериновая протеаза - α-тромбин. На мо-

лекуле тромбина 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 фибрин-мономеров (происходит в жидкой фазе - кровотоке).
- Активация ф. V, -VIII, -VII, -XI.
- Активация тромбоцитов.
- В комплексе с тромбомодулином тромбин активирует протеин С.
- Активация ф.ХIII.
- Ограниченный протеолиз плазматической карбоксипептидазы В до активной формы - активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (ТАФИ).
- Стимуляция выброса из эндотелиоцитов тканевого активатора плазминогена.

Однако роль тромбина в организме не ограничивается вышеперечисленными функциями. Ключевая роль в процессе свертывания крови, активация сосудистого эндотелия, клеточный рост и процессы репарации, активация периферических клеток крови, активация фибринолиза - это наиболее изученные функции тромбина. Видимо, со временем этот список значительно увеличится.

Плазменные белки гемостаза

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 III. Несколько меньшую роль играет кофактор гепарина II.

Фактор XIII

Фактор XIII - транскляминаза. В плазме большая часть неактивного ф.XIII связана с фибриногеном. Активация ф.XIII происходит путем ограниченного протеолиза неактивного ф.XIII тромбином одновременно с отщеплением пептида А от фибриногена. Как и большинство других ферментов, он выполняет несколько функций в гемостазе:

- Стабилизирует фибриновый сгусток путем образования ковалентных связей между у-цепями мономеров фибрина.
- Участвует в связывании, α -ингибитора плазмينا с фибрином, что способствует предотвращению преждевременного лизиса фибринового сгустка.
- Значительную роль ф.XIII играет в процессах полимеризации актина, миозина и других компонентов цитоскелета тромбоцитов, что чрезвычайно важно для активации тромбоцитов и ретракции образовавшегося фибринового сгустка. Это объясняет наличие ф.XIII в цитоплазме тромбоцитов.
- Обнаружены перекрестные реакции ф.XIII с ф.V, фон Виллебранд протеином.

Помимо непосредственно реакций гемостаза, ф.XIII участвует в процессах образования соединительной ткани, репаративных реакциях:

- 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.

Фибриноген.

Формирование гемостатического тромба

Фибриноген - уникальная молекула, обладающая свойством быстро полимеризоваться в токе

крови и образовывать прочную объемную структуру, которая эффективно закрывает повреждение сосуда и предотвращает потерю крови. Концентрация фибриногена в крови здорового человека значительно выше, чем концентрация других белков гемостаза, что связано с его уникальной ролью.

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.

Помимо гепатоцитов и мегакариоцитов, активность гена γ -цепей фибриногена обнаружена в некоторых других тканях - головном мозге, легких, костном мозге, где γ -цепи фибриногена, видимо, выступают в роли молекул адгезии.

Фибриноген - большой многокомпонентный белок, который состоит из трех пар полипептидных цепей - 2α , 2β , 2γ , связанных между собой дисульфидными мостиками и переплетенных друг относительно друга (рис. 43).

Пространственная структура молекулы фибриногена состоит из центрального E-домена и 2 периферических D-доменов. α - и β -цепи формируют глобулярные структуры - фибринопептиды А и В (ФПА и ФПВ), которые закрывают комплементарные участки в фибриногене и не 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 ФПА и 2 ФПВ (рис. 44). Образуются ра-

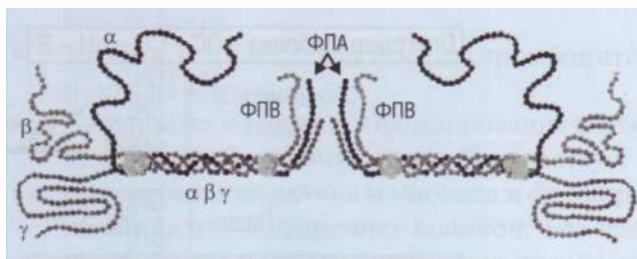


Рис. 43. Фибриноген состоит из 3 парных белковых молекул α , β и γ . Фибринопептиды А и В (ФПА и ФПВ) отщепляются тромбином от фибриногена, инициируя тем самым процесс полимеризации и превращение фибриногена в фибрин

Плазменные белки гемостаза

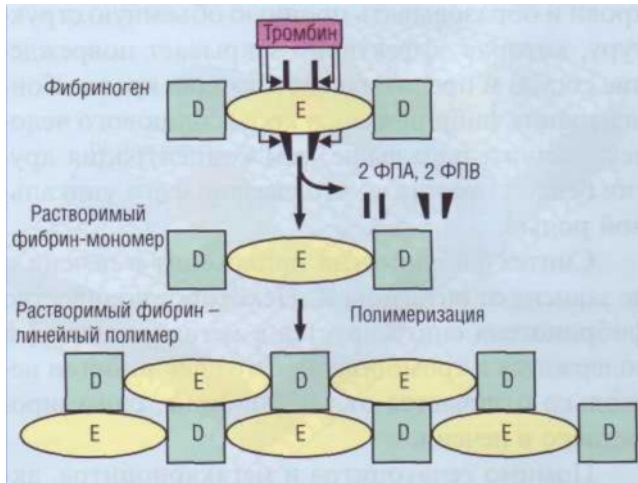


Рис. 44. Формирование фибрин-мономеров из фибриногена. Тромбин отщепляет фибринопептиды ФПА и ФПВ от молекулы фибриногена, тем самым образуются растворимые мономеры фибрина, которые способны полимеризоваться до линейного полимера, или «растворимого фибрина»

створимые мономеры фибрина. В дальнейшем происходит спонтанное соединение комплементарных участков фибрин-мономеров. Сначала образуются димеры, далее олигомеры и в конечном итоге собираются мономериты 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 ФПА. Результатом такой полимеризации является линейный полимер шириной в 2 молекулы (рис. 44). На этом этапе фибрин легко растворим в 5-молярной

мочевине, поэтому он получил название **растворимого фибрина**.

Соединяясь с фибриногеном, тромбин не только отщепляет фибринопептиды, но и активирует связанный с ним фактор XIII. Фактор XIIIа образует ковалентные связи между γ -цепями (D-домами) нитей растворимого фибрина (рис. 45), которые соединяются за счет образования пептидных мостиков между боковыми радикалами лизина и глутамина. Сшитые между собой мономериты фибрина образуют прочную сеть, менее подверженную фибринолизу и более устойчивую к механическим воздействиям. В такой форме фибрин не растворяется в 5-молярной мочеvine и называется **нерастворимым фибрином**.

Образовавшийся фибриновый сгусток - трехмерная молекулярная сеть, в которую включены тромбоциты, эритроциты и лейкоциты (рис. 46). Активированные тромбоциты, связанные с нитями фибрина через рецепторы GPIIb-IIIa, сокращают-

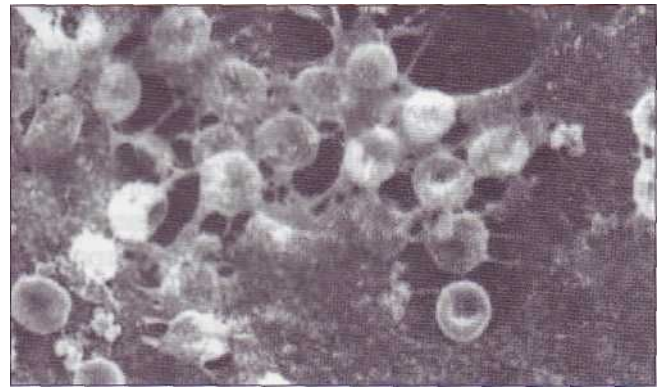


Рис. 46. Организованный тромб, в котором в фибриновую сеть включены клетки крови



Рис. 45. Образование нерастворимого фибрина под влиянием фактора XIIIa

Плазменные белки гемостаза

ся под действием тромбостенина (тромбоцитарного актомиозина) вследствие присущих им контрактных свойств (см. главу «Тромбоциты»). Происходит ретракция сгустка крови. Сгусток уплотняется, из него выдавливается часть сыворотки. Формирование окончательного тромба наступает на 10-15-й минуте после полимеризации фибрина.

Роль кофакторов и микроокружения в процессе свертывания крови

Плазменные ферменты и ингибиторы системы гемостаза эффективно функционируют только в определенном микроокружении. Эффективность функционирования факторов IX, X, протеина С, антитромбина III в присутствии своих кофакторов (факторы VIII, V, протеин S, гепарансульфат соответственно) возрастает в десятки тысяч раз. Большинство реакций протеолитической активации предшественников ферментов эффективно протекают только на «твердой фазе», роль которой играют отрицательно заряженные фосфолипиды. Для всех реакций, протекающих на поверхностях, необходимы ионы кальция. На рис. 47 показана степень активации тромбина фактором Ха в различных условиях микроокружения. Комплекс фактора Ха, фактора Va, фосфолипидов и Ca^{2+} (протромбиназный комплекс) значительно эффективнее активирует тромбин, нежели один фактор Ха, причем в комплексе с кофакторами фактор Ха защищен от деградации антитромбином.

Роль кальция в гемостатических реакциях

Роль кальция в гемостазе огромна. Большинство белков гемостаза имеют сайты связывания кальция. При удалении кальция из плазмы (например, при смешивании крови с цитратом натрия) активировать гемостатические реакции практически невозможно. Наиболее важные из известных функций кальция в гемостазе:

- Участие в образовании связей витамин-К-зависимых факторов (II, VII, IX, X, протеин С, протеин S) с фосфолипидной поверхностью.
- Участие в активации фактора XIII.
- Участие в образовании связи ф. VII и тканевого фактора.
- Ускорение процесса роста фибринового сгустка, участие в стабилизации фибринового сгустка, ограничение протеолиза фибрина и фибриногена плазмином, защита фибриногена и фибрина от температурной и щелочной денатурации.
- Стабилизация структуры многих белков гемостаза и опосредование взаимодействия между ними.
- Участие в процессах активации тромбоцитов и других клеток.
- Кальций необходим для формирования цитос-

Если тромбоциты отсутствуют или имеют дефект GPIIb-IIIa, то ретракции кровяного сгустка не происходит и он быстро лизируется в процессе фибринолиза. При отсутствии ретракции тромба в сосудистом русле возможен отрыв тромботических масс и эмболия удаленных сосудов (тромбоэмболия).

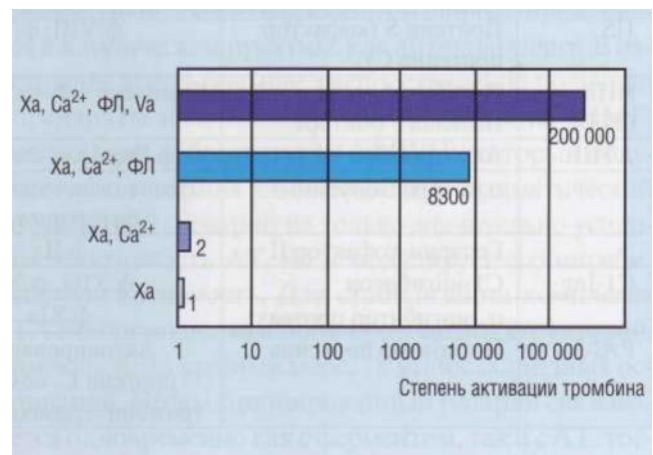


Рис. 47. Влияние условий микроокружения на образование тромбина фактором Ха. Комплекс фактора Ха, фактора Va, фосфолипидов и Ca^{2+} (протромбиназный комплекс) значительно эффективнее активирует тромбин, нежели фактор Ха один или в комбинации только с фосфолипидами и/или Ca^{2+}

келета и возбуждения клетки. Он участвует в полимеризации актина и миозина и формировании актин-миозиновых волокон. Без него невозможны процессы изменения формы активированных клеток, их движение, секреция.

- Кальций участвует в регуляции большинства внутриклеточных процессов как внутриклеточный мессенджер (посредник) перемещения молекул.

Плазменные белки гемостаза
 Ингибиторы системы свертывания плазмы крови
 Ингибиторы системы свертывания крови представлены в табл. 7.

Таблица 7

Ингибиторы системы свертывания плазмы крови

Аббре-виатура	Вещество	Субстрат	Время полужизни	Концентрация в плазме (нмоль/л)	Активизация гепарином
ПС	Протеин С	ф. VIII, ф. V	6	65 (4 мг/л)	
PS	Протеин S (кофактор протеина С)	ф. VIII, ф. V	42	300 (25 мг/л)	
ИПВ (TFPI)	Ингибитор пути тканевого фактора	Комплекс ТФ-ф. VIIa-ф. X	Неизвестно	2,5 (0,1 мг/л)	+
АТIII	Антитромбин III	ф. IIa, -IXa, -Xa, -XIa	18-30	2400 (150 мг/л)	+
	α_2 -макроглобулин	Неспецифический ингибитор протеаз	24-36	3500 (2,5 г/л)	
	Гепарин-кофактор II	ф. IIa	60	1200 (87 мг/л)	+
C1-Ing	C1-ингибитор	ф. XIIa, ф. XIa	50-70	1700 (180 мг/л)	
	α_1 -ингибитор протеаз	ф. XIa	24-48	3500 (2,5 г/л)	
PAI-3	Ингибитор протеина С	Активированный протеин С, комплекс тромбин-тромбомодулин			

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 и многие другие. Все они имеют гомологичную структуру. Существует группа ингибиторов, специфичных для сериновых протеаз, - серпины. Механизм их ингибирующего действия изучен довольно хорошо. Серпины имеют строение, похожее на строение субстрата сериновых протеаз. Однако, охотно соединяясь с ферментами, серпины не подвергаются немедленному расщеплению. Это соеди-

нение блокирует ферментативную активность сериновой протеазы (рис. 48). Различные серпины несколько отличаются по строению, могут быть более или менее специфично ингибировать разные ферменты. Кроме того, на актив-

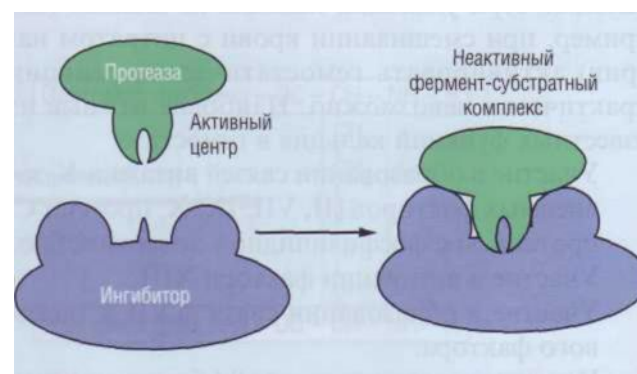


Рис. 48. Ингибирование активных сериновых протеаз серпинами за счет образования стабильного неактивного фермент-субстратного комплекса

Плазменные белки гемостаза

ность и специфичность серпинов может влиять микроокружение.

Антитромбин и гепарин

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

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. Несмотря на это, уже при снижении активности АТ в плазме ниже 60% возрастает риск патологических тромбозов. При изолированном дефиците активности АТ риск тромботических проявлений возрастает пропорционально степени снижения активности. Помимо тромбина, АТ ингибирует фактор Ха, а также факторы IXa, XIa, XIIa и калликреин.

Антитромбин по структуре гомологичен α_1 -антитрипсину. В его активном центре 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 потенциру-

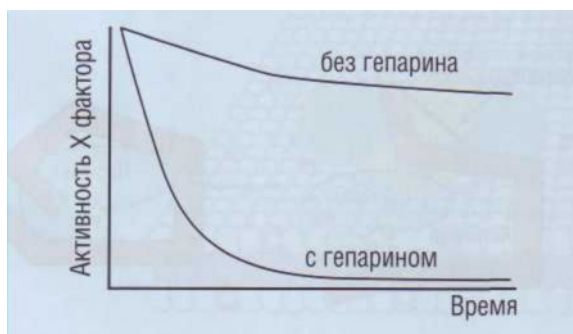


Рис. 49. Влияние гепарина на активность фактора Ха в плазме. Гепарин существенно усиливает ингибирующий эффект антитромбина на фактор Ха

ющее действие на АТ оказывает гепарин (рис. 49), 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.

Нефракционированный гепарин представляет собой смесь гепаринов различной молекулярной массы. До последнего времени он широко применялся в клинической практике как антикоагулянт. В настоящее время большее распространение получили препараты низкомолекулярного гепарина (НМГ, английская аббревиатура - LMWH), который получается из гепарина химической или ферментативной обработкой. Гепарин не только значительно усиливает активность АТ, но и модулирует его ингибиторную активность. Для стабилизации комплекса ТАТ гепарин должен быть представлен структурой, имеющей, по крайней мере, 18 моносахаридных оснований. Нефракционированный гепарин связывается одновременно как с ферментом, так и с АТ, тогда как НМГ связывается только с молекулой АТ (рис. 50). Нефракционированный гепарин усиливает активность АТ в отношении всех сериновых протеаз каскада свертывания крови, тогда как низкомолекулярный - в основном в отношении ф.Ха.

Наиболее эффективно АТ «работает» в токе крови. В составе протромбиназного комплекса (рис. 41), содержащем также фосфолипиды, Са и ф. Va, фактор Ха лучше защищен от ингибирования комплексом АТ-гепарин.

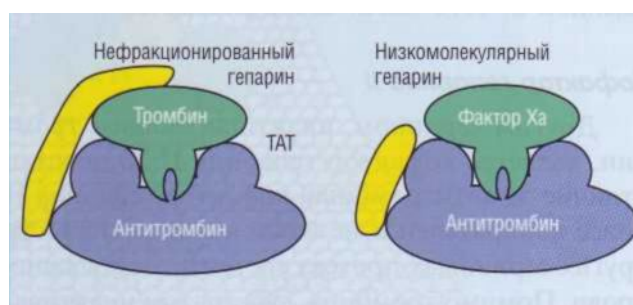


Рис. 50. Эффект нефракционированного гепарина (молекулярная масса до 30 кДа) по стабилизации комплекса тромбин-антитромбин и низкомолекулярного гепарина (молекулярная масса 3 кДа), предпочтительно влияющего в качестве кофактора на образование комплекса фактор Ха - антитромбин, ТАТ - тромбин-антитромбиновый комплекс

Плазменные белки гемостаза

Гепарин и НМГ широко используются для профилактики и лечения тромбозов.

Антикоагулянтное действие гепарина можно быстро и обратимо снять внутривенным введением протаминасульфата - основного белка, содержащегося в сперме рыб и ковалентно связывающегося 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 гепариновой тромбоцитопении и рикошетных тромбозов (см. раздел «Тромбоцитопения, вызванная гепарином»).

Комплекс тромбин-антитромбин

Продукт взаимодействия тромбина и АТ (ТАТ) - неактивный комплекс, в нем тромбин и АТ быстро теряют свою активность. ТАТ удаляется из системы циркуляции печенью в течение нескольких минут. Увеличение ТАТ в системе циркуляции свидетельствует о развитии гиперкоагуляции с увеличением образования тромбина. В частности, ТАТ повышен у пациентов с *гипергомоцистеинемией*, которая вызывает, по-видимому, воспалительную реакцию на уровне эндотелиальных клеток. У таких больных увеличен риск тромбоэмболической болезни и окклюзии артериальных сосудов. После лечения фолиевой кислотой и витамином В₆ ТАТ значительно снижается.

Кофактор гепарина II

Другим серпином, инактивирующим тромбин, является кофактор гепарина II. Однако, в отличие от антитромбина, кофактор гепарина II более избирателен и не ингибирует активность других сериновых протеаз системы свертывания крови. Помимо тромбина, субстратом инактивации для кофактора гепарина II являются химотрипсин и катепсин Н.

C1-ингибитор

C1-ингибитор (C1-Ing) - наиболее важный ингибитор факторов контактной активации (см. раз-

дел «Внутренний путь образования протромбиназы. Факторы 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. 51). 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.

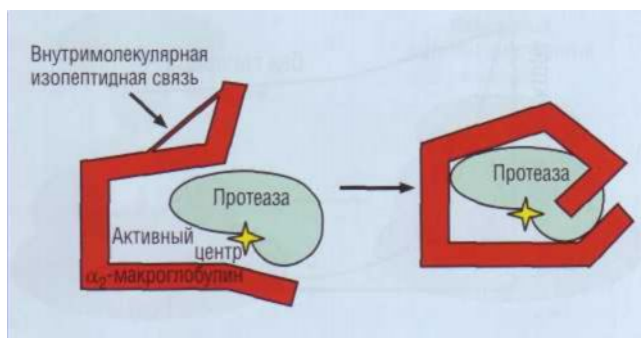


Рис. 51. Ингибирование активных протеаз за счет погружения фермента внутрь макромолекулы α_2 -макроглобулина

Ингибиторы коферментов

Наиболее значимым ингибитором в этой группе является система протеина С.

Система протеина С

Система протеина С включает непосредственно сам протеин С (ПС) и его кофактор протеин S (PS). Другими компонентами системы являются мембранный белок тромбомодулин (ТМ), рецептор протеина С на эндотелиальных клетках (РПСЭК) и С4-связывающий протеин. Система протеина С вместе с антитромбином и ингибитором внешнего пути - наиболее важные и эффективные компоненты, очищающие плазму от активированных кофакторов плазменного гемостаза и ограничивающие процесс свертывания крови.

Протеин С

Протеин С (ПС) - витамин-К-зависимый белок плазмы, синтезируется в печени. Активированный протеин С (АПС) является специфической сериновой протеазой, сходной по структуре с другими витамин-К-зависимыми сериновыми протеазами. Основная функция его в гемостазе - инактивация факторов Va и VIIIa. Помимо это-

го, он ингибирует РАІ, что приводит к усилению фибринолиза.

Активация ПС происходит на поверхности эндотелиальных клеток. ПС связывается с РПСЭК на эндотелиальной мембране и контактирует с комплексом тромбин-тромбомодулин. Происходит ограниченный протеолиз неактивного ПС с образованием активной сериновой протеазы.

АПС способен инактивировать факторы Va и VIIIa, расположенные на мембране активированных тромбоцитов или других клеток, в присутствии ионов Ca^{2+} . Протеин S является кофактором этой реакции (рис. 52). Механизм инактивации факторов Va и VIIIa протеином С заключается в их лизисе. Время полувыведения АПС из плазмы примерно 15 мин.

Фактор Виллебранда (vWF) защищает ф. VIII от протеолитического воздействия протеина С. При типе 2N болезни Виллебранда мутация затрагивает сайт vWF, связывающий ф. VIII. Последний лишается защиты и подвергается ускоренному разрушению АПС, что приводит к снижению его активности в крови. ф. VIII в комплексе с ф. IX и ф. V в комплексе с ф. X также относительно защищены от инактивации. Основным ин-

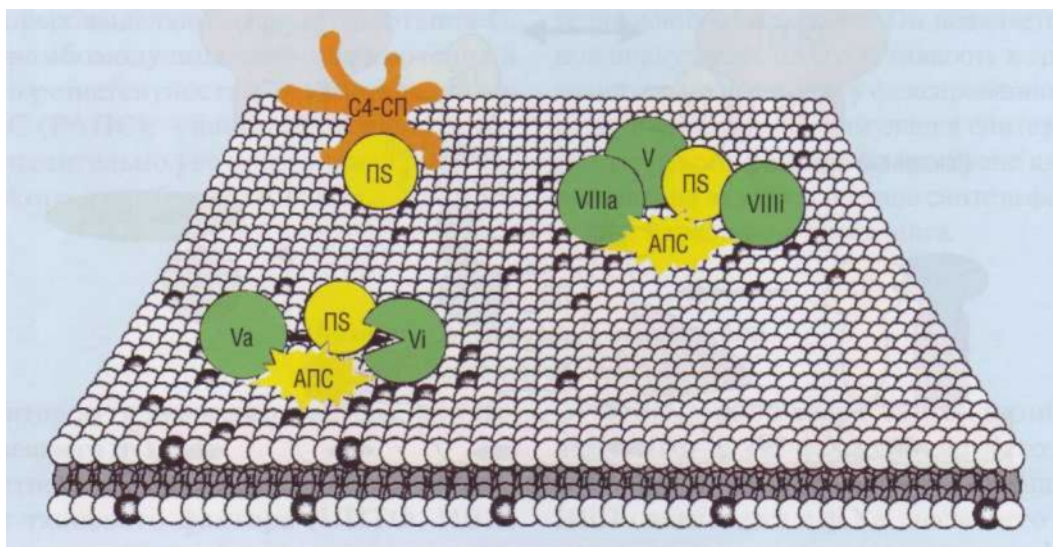


Рис. 52. Дegrаdация активных факторов Va и VIIIa активированным протеином С (АПС), Транспортный С4-связывающий протеин (С4-СП) доставляет протеин S (F1S), участвующий как кофактор в формировании комплексов на фосфолипидной мембране

Плазменные белки гемостаза

гибитором АПС является PAI-3, который иногда обозначают как протеин С ингибитор (ПСИ, в английской аббревиатуре PCI), другим ингибитором АПС является α_2 -макроглобулин.

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. Пациенты с гомозиготным дефицитом протеина С не описаны, видимо, это состояние не совместимо с жизнью.

Протеин S

Протеин S (ПС) - витамин-К-зависимый белок, синтезируемый в печени. Протеин S присутствует в плазме частично в свободном состоянии, частично в комплексе с С4-связывающим протеином (С4-СП), который доставляет протеин S на фосфолипидную мембрану. Это важно учитывать, так как комплекс протеин S - С4-СП не обладает кофакторной активностью по отношению к протеину С. Только свободный протеин S является кофактором АПС. Активность АПС в кооперации со свободным протеином S значительно выше, чем без него.

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

На рис. 53 схематично представлена последовательность взаимодействий компонентов системы протеин С - протеин S при инактивации фактора Va.

С4-связывающий протеин

С4-связывающий протеин (С4-СП) - острофазный белок, синтезируется в печени. В плазме присутствует в виде молекулы, содержащей 7 идентичных ос-цепей и одну β -цепь (рис. 54). Сниженный уровень С4-СП имеет место у новорожденных и лиц, принимающих непрямые антикоагулянты. Повышение С4-СП 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 тромбофилии. С4-СП способен также регулировать активность системы комплемента, образовывать Ca-зависимые комплексы с амилоидным

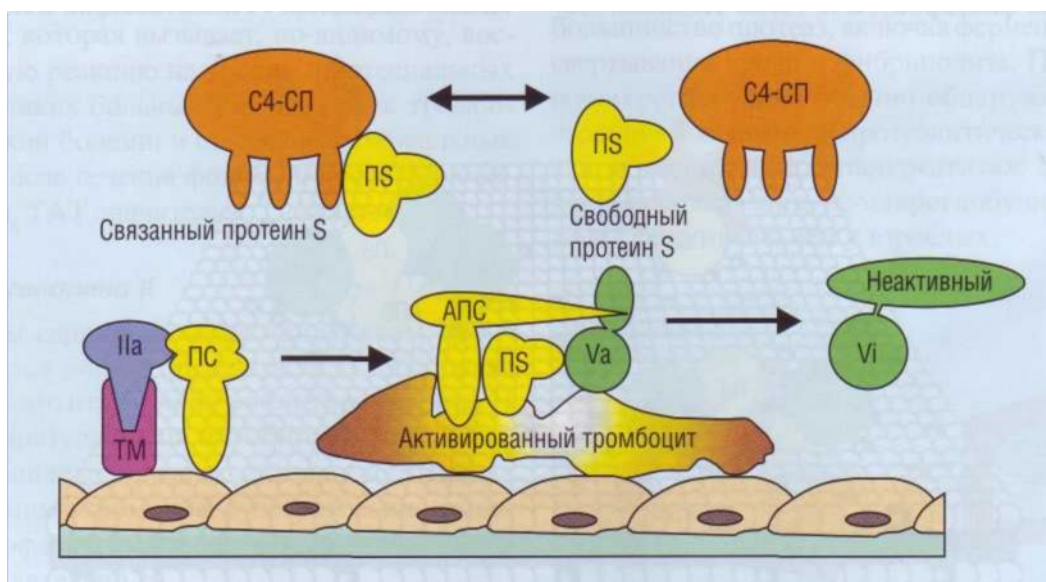


Рис. 53. Система протеина С. Активированный протеин С (АПС), сопрягаясь с теназным комплексом на фосфолипидной поверхности (активированный тромбоцит), вызывает деградацию фактора V. ТМ - тромбомодулин, С4-СП - связывающий протеин, F1S - протеин S, ПС - протеин С, IIa, Va - активированные плазменные факторы, Vi - деградированный фактор V

Плазменные белки гемостаза

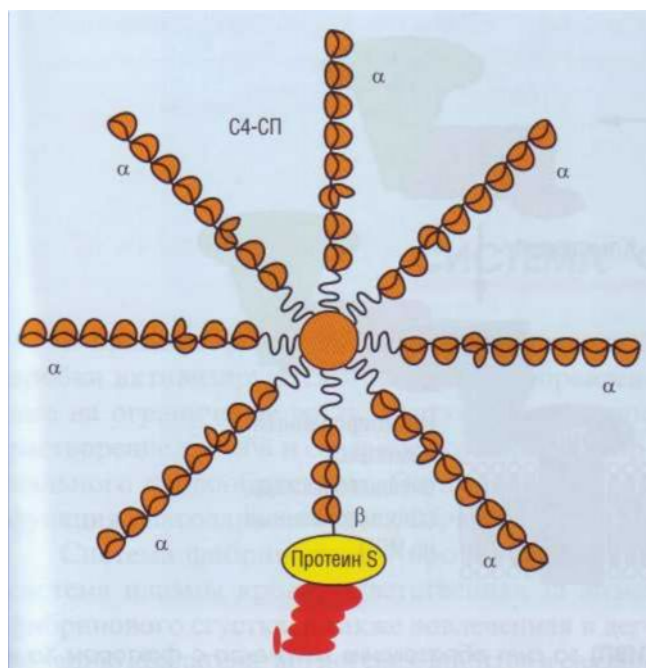


Рис. 54. Схематическое изображение α- и β-цепей C4-связывающего протеина и участок связывания протеина S

P-белком сыворотки. Определение C4-СП возможно методом иммунотурбидиметрии или ELISA. Концентрация C4-СП в сыворотке составляет в норме около 200 мкг/мл.

Тромбомодулин был описан ранее в разделе, посвященном функции эндотелия.

Нарушения в системе протеина C (рис. 55), среди которых выделяют дефицит протеина C, дефицит тромбомодулина, дефицит протеина S и особенно резистентность к активированному протеину C (РАПС), - наиболее изученная патология, значительно увеличивающая риск патологического тромбообразования - тромбофилии.

Ингибиторы активных комплексов

Ингибитор пути тканевого фактора, или ингибитор внешнего пути

Открытие в последнее десятилетие ингибитора пути тканевого фактора (ИПТФ, ИВП, TFPI) стало важным шагом в пересмотре классического каскада свертывания крови и создания современной каскадно-матричной теории гемостаза.

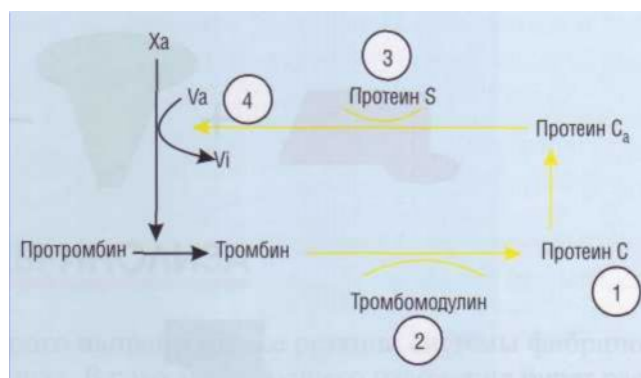


Рис. 55. Нарушения в системе протеина C, способствующие развитию тромбофилий: 1 - дефицит протеина C, 2 - дефицит тромбомодулина, 3 - дефицит протеина S, 4 - резистентность к активированному протеину C

Система протеина C активно реагирует на развитие воспаления в организме. Известно, что развитие воспаления, особенно в условиях **грамнегативного сепсиса** значительно воздействует на гемостатический баланс, вызывая гиперкоагуляцию. Это связано с несколькими эффектами в системе протеина C. *Во-первых*, медиаторы воспаления подавляют синтез тромбомодулина, что ведет к уменьшению активации протеина C. *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 экспрессии тканевого фактора на мембране клеток в зоне воспаления ведет к усилению синтеза факторов IXa и Ха и нарастанию дисбаланса.

ИВП ограничивает синтез тромбина комплексом ТФ-ф.VII-ф.Ха, блокируя его вскоре после образования. Один из ингибирующих доменов ИВП связывается с ф.Ха, после чего другой домен реагирует с активным центром ф.VII, когда последний связан с тканевым фактором. Аффинность ИВП к ф.VIIa значительно повышается в присутствии гепарина (рис. 56). Образуется пол-

Плазменные белки гемостаза

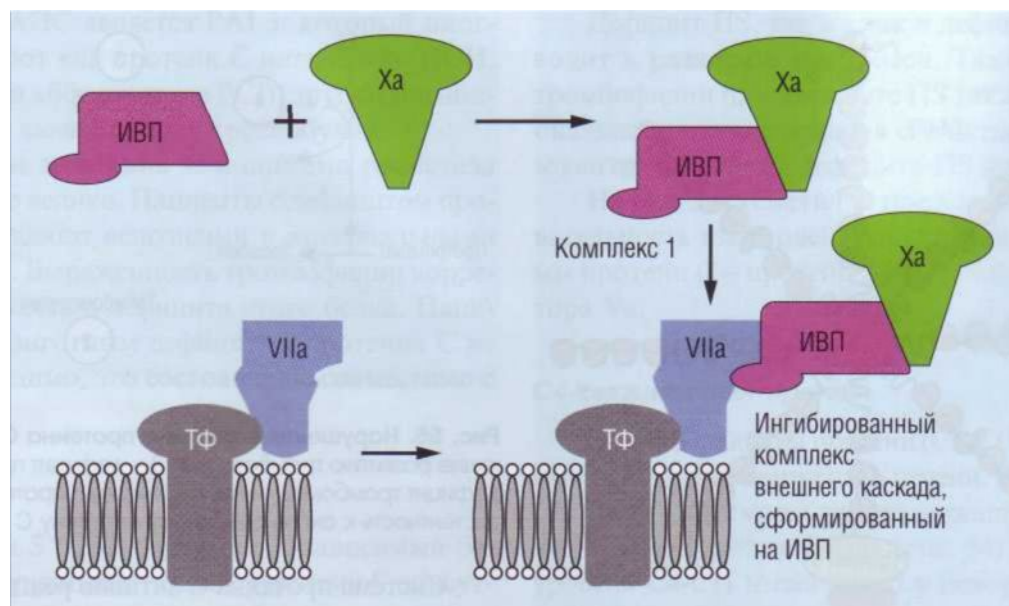


Рис. 56. Механизм действия ингибитора внешнего пути (ИВП) за счет образования комплекса с фактором Ха и формирования четырехкомпонентного комплекса - фактор VIIa + тканевой фактор + ИВП + фактор Ха

ностью неактивный тетрамолекулярный комплекс ТФ-ф.VII-ИВП ф.X. Помимо ингибирования, ИВП способствует поглощению и деградации этого комплекса. Таким образом, во внешнем каскаде плазменного гемостаза формируется отрицательная обратная связь.

ИВП, по-видимому, ответственен при лечении гепарином за удлинение ряда тестов коагулограммы, в частности АЧТВ. ИВП в плазме частично связан с липопротеидами низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП). В таком комплексе ИВП более устойчив к инактивации. Появились сообщения, что тромбин способен стимулировать освобождение ИВП из эндотелия и ЛПНП, тем самым формируется обратная от-

рицательная связь для снижения образования тромбина.

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

СИСТЕМА ФИБРИНОЛИЗА

В процессе формирования гемостатической пробки активизируются механизмы, направленные на ограничение роста сгустка, постепенное растворение тромба и создание условий для нормального кровообращения. Осуществляется эта функция благодаря *системе фибринолиза*.

Система фибринолиза - протеолитическая система плазмы крови, ответственная за лизис фибринового сгустка, а также вовлеченная в деградацию коллагена, ангиогенез, апоптоз и связанная с другими протеолитическими системами. Центральным ферментом системы фибринолиза является **плазмин**, на регуляцию активации кото-

рого направлены все реакции системы фибринолиза. В рамках настоящего изложения будет рассматриваться роль компонентов системы фибринолиза в гемостазе.

Фибринолиз локализует образование фибрина в месте повреждения, сдерживает избыточное фибринообразование, препятствуя окклюзии просвета сосуда. Баланс между фибринообразованием и фибринолизом (рис. 31) способствует сохранению окончательного тромба на весь период восстановления целостности сосудистой стенки, после чего равновесие сдвигается в сторону фибринолиза и, став ненужным, тромб растворяется.

Компоненты фибринолиза

Система фибринолиза, так же как и система свертывания крови, - многокомпонентная система, в которую

входят активаторы, ингибиторы и конечный фермент (табл. 8). протеолитическая система, в состав которой

Таблица 8

Основные компоненты системы фибринолиза

Фактор	Концентрация (мг/л)	Период полувыведения	Функция
1	2	3	4
Плазминоген	200	2,2 дня	Профермент (предшественник плазмина)
Активатор плазминогена тканевого типа (t-PA)	0,005	4 мин	Протеаза, активирует плазминоген
Урокиназный активатор плазминогена (и-PA)	0,002	7 мин	Протеаза, активирует плазминоген
Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1)	0,01	8 мин	Ингибитор t-PA и и-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

Система фибринолиза

Окончание табл. 8

1	2	3	4
С1-ингибитор	180	70 ч	Ингибитор ф.ХПа. калликреина, плазмина
α_2 -антиплазмин	70	3 дня	Ингибитор плазмина
α_2 -макроглобулин	2500	—	Ингибитор плазмина. калликреина, урокиназы, t-PA и др.
Богатый гистидином гликопротеин	100	3 дня	Ингибитор плазмина
Аполипопротеин(а)	<70	-	Снижает фибринолиз
Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза	5	10 мин	Предшественник ингибитора (зимоген)
Рецептор урокиназного активатора плазминогена (u-PAР)	—	—	Рецептор u-PAР, модулирующий его активность
Аннексии II	—	—	Рецептор t-PA, активирующий его функцию
Рецептор LRP/ α^2 -макроглобулина	—	—	Рецептор t-PA, способствующий его элиминации
Рецептор маннозы	—	—	Рецептор t-PA, способствующий его элиминации

Плазминоген

Плазминоген - одноцепочечный гликопротеин. Концентрация его составляет примерно 2 микромоля в литре плазмы. У женщин в последнем триместре беременности активность плазминогена повышается. 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.

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. Связанный с фибрином плазмин относительно защищен от инактивации. В токе же крови плазмин очень быстро (примерно за 0,1 с) инактивируется ингибиторами.

Активатор плазминогена тканевого типа

Активатор плазминогена тканевого типа (t-PA) является сериновой протеазой. Он высокоспецифичен; его единственным доказанным субстратом является плазминоген. Видимо, t-PA - основной физиологический активатор фибринолиза в просвете сосуда. Основным местом синтеза t-PA является эндотелий. Помимо эндотелия, t-PA синтезируется во многих других клетках: моноцитах, мегакариоцитах, мезотелиальных клетках, мышечных клетках сосудов, фибробластах сердца и др. Большая часть плазменного t-PA связана с его основным ингибитором PAI-1. Как связанный, так и свободный активатор быстро удаляются из тока крови клетками печени.

Помимо активации фибринолиза, t-PA участвует в противовоспалительных реакциях, стимуляции пролиферации эндотелия. Есть данные, что t-PA может активировать ф. VII.

Функция t-PA связана с наличием ряда рецепторов. *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.

Система фибринолиза

В группе рецепторов, способствующих элиминации t-PA, изучены **маннозный рецептор и рецептор LRP/ α_2 -макроглобулина**. Первый располо-

жен на мембране эндотелиоцитов печени и купферовских клеток, второй работает на мембране гепатоцитов.

Урокиназный активатор плазминогена

Урокиназный активатор плазминогена (уро-киназа, u-PA) найден в больших количествах в моче человека. Предшественником u-PA является белок проурокиназа, или scu-PA. Проурокиназа синтезируется в различных клетках. Особенно активно scu-PA синтезируется эпителиальными клетками почечных протоков, а также 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 физиологичес-

ких и патологических процессах - заживлении ран, воспалении, эмбриогенезе, метастазировании опухолевых клеток.

Известен еще ряд функций урокиназы помимо активации плазминогена. Наиболее важные из них - активация ростовых факторов, модуляция миграции и инвазии клеток, оказание митогенного эффекта на клетки меланомы.

Рецептор урокиназы (u-PA_R) обнаружен на моноцитах. Он способствует активации плазминогена урокиназой, что необходимо для участия моноцитов в деградации фибринового тромба. Такой же рецептор найден на тромбоцитах. Описаны 2 рецептора, элиминирующие урокиназу и комплекс урокиназа-серпин из кровотока.

Другие активаторы плазминогена

Помимо указанных выше 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 эквимольным 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.

Механизм активации фибринолиза

В фибринолизе, так же как в системе коагуляции, имеется 2 пути: внешний и внутренний путь активации плазминогена (рис. 57). Внешний путь

активации плазминогена обеспечивается в основном тканевым активатором, внутренний путь - урокиназой.

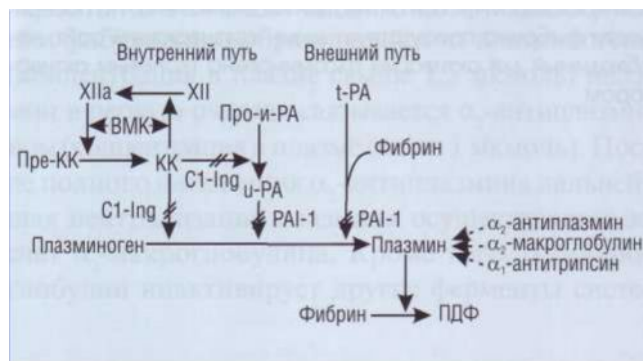


Рис. 57. Основные звенья фибринолиза. Образование основного фермента фибринолиза плазмина происходит под влиянием факторов внутреннего или внешнего пути активации фибринолиза. Внутренний путь начинается с активации проурокиназы. Внешний путь определяется влиянием тканевого активатора плазминогена (t-PA). Накопление свободного плазмина в системном кровотоке предотвращается группой острофазных белков, КК - калликреин, ВМК - высокомолекулярный кининоген, и-РА - урокиназа, C1-Ing - ингибитор 1-го компонента комплемента, PAI-1 - ингибитор тканевого активатора плазминогена типа 1, ПДФ - продукты деградации фибрина

Система фибринолиза

Внутренний путь активации фибринолиза

Внутренний путь активации фибринолиза начинается в комплексе реакций контактной активации свертывания крови. Калликреин активирует проурокиназу с образованием активного фермента урокиназы. Кроме калликреина, активация проурокиназы до активной двухцепочечной формы u-PA происходит под воздействием ф.ХIIa и -XIa, пламина (положительная обратная связь) и усиливается при связывании с урокиназным рецептором. В связи с этим у пациентов с дефицитом прекалликреина, XII фактора (болезнь Хагемана) или высокомолекулярного кининогена (ВМК), у которых, казалось бы, из-за не-

достатка плазменных факторов должна быть склонность к кровотечениям, наоборот, в результате неполноценной активации фибринолиза имеется тенденция к тромбозам.

Определение u-PA для диагностики нарушений гемостаза практически не проводится, так как диагностическое значение этого фермента пока недостаточно ясно. 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.

Внешний путь активации фибринолиза

Плазминоген имеет высокое сродство к выпавшему фибрину за счет присутствия на фибрине специфических лизин-связывающих участков (сайтов). Эндотелиальные клетки синтезируют и освобождают в систему циркуляции тканевой активатор плазминогена (t-PA). Изучение процесса высвобождения t-PA из клеток показало, что основным стимулятором этого является брадикинин, который отщепляется от высокомолекулярного кининогена калликреином. Таким образом, процесс активации факторов контактной фазы является основным физиологическим пусковым механизмом фибринолиза. Этот процесс резко усиливается при остановке кровотока и образовании фибрина. t-PA обладает высоким сродством к фибрину. На фибрине формируется комплекс фибрин - тканевой активатор - плазминоген (рис. 58) - наиболее специфическое и эффективное действующее начало фибринолиза. Фибрин, особенно частично деградированный фибрин, служит кофактором t-PA-индуцированной протеолитической активации плазминогена. В результате образования это-

го комплекса плазминоген переходит в активный плазмин, который разрушает пептидные связи в фибрине/фибриногене.



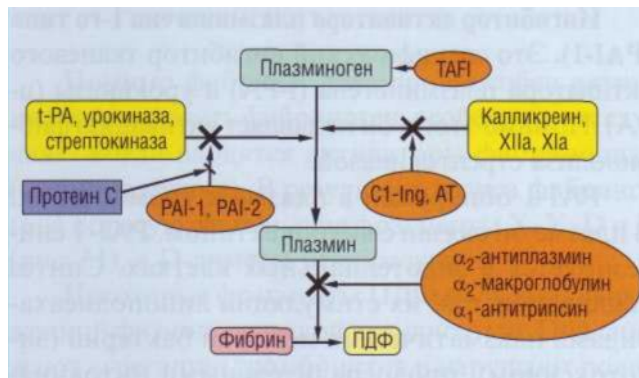
Рис. 58. Активация плазминогена при формировании комплекса фибрин - тканевой активатор - плазминоген на фибрине. Фибрин служит кофактором t-PA-индуцированной протеолитической активации плазминогена. На поверхности фибрина присутствует лизин-связывающий сайт, необходимый для активации плазминогена тканевым активатором

Система фибринолиза

Ингибиторы фибринолиза

Участки действия основных ингибиторов фибринолиза представлены на рис. 59.

Рис. 59. Ингибиторы фибринолиза, показаны участки основного ингибирующего эффекта. Практически все ингибиторы фибринолиза являются белками острой фазы. TAFI - тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза, t-PA- тканевой активатор плазминогена, CI-Ing - ингибитор 1-го компонента комплемента, AT - антитромбин III, PAI-1, PAI-2 - ингибиторы тканевого активатора плазминогена (тип 1 и 2), ПДФ - продукты деградации фибрина/фибриногена



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 плазмина 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 ДВС-синдроме, 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 -антиплазмина дальнейшая нейтрализация плазмина осуществляется за счет α_2 -макроглобулина. Кроме того, α_2 -макроглобулин инактивирует другие ферменты систе-

мы фибринолиза: 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.

Все 3 описанных ингибитора совместно предупреждают появление плазмина в системе циркуляции в свободном виде, исключая его деградирующий эффект на фибриноген, а также на факторы свертывания VIII, V и другие плазменные белки. Деятельность этих ингибиторов является важным условием поддержания гемостатического баланса.

Система фибринолиза

Ингибиторы тканевого активатора плазминогена (РАI)

Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (РАI-1). Это специфический ингибитор тканевого активатора плазминогена (t-РА) и урокиназы (u-РА). Помимо этого он подавляет активацию фибринолиза стрептокиназой.

РАI-1 обнаружен в плазме и тромбоцитах. В плазме он связан с витронектином. РАI-1 синтезируется в эндотелиальных клетках. Синтез усиливается при их стимуляции липополисахаридами плазматических мембран бактерий (эндотоксином), провоспалительными цитокинами, такими, как ИЛ-1 или ФНО- α , а также тромбином. Наиболее значительная стимуляция происходит в условиях сепсиса и при обширных тромбозах.

РАI-1 ингибируется протеином С. Таким образом, протеин С ингибирует не только активированные факторы Va и VIIIa, но и РАI-1, проявляя, следовательно, профибринолитическую активность.

Ингибитор тканевого активатора плазминогена 2-го типа (РАI-2) обнаружен в очень низких концентрациях в плазме, но может существенно повышаться при беременности. Он в большей степени ингибирует активность u-РА, чем t-РА.

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

Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАFI)

ТАFI (карбоксипептидаза Y, или плазменная карбоксипептидаза В) - один из наиболее важных ингибиторов фибринолиза. Его неактивная форма - прокарибоксипептидаза Y - активируется тромбином, связанным с тромбомодулином, и, вероятно, трипсином, калликреином, плазмином до активной карбоксипептидазы Y или ТАFI.

Механизм ингибирования фибринолиза карбоксипептидазой Y отличается от описанных выше. ТАFI разрушает каталитическую поверхность фибрина (лизин-связывающий сайт), необходимую для активации плазминогена t-РА. Кроме того, в более высокой концентрации ТАFI обладает прямой ингибирующей активностью по отношению к плазминогену.

ТАFI играет большую роль в формировании гемостатического тромба, предотвращая его преждевременный 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 ТАFI проводится методом ELISA. Повышение ТАFI зарегистрировано при тромбозах и при применении тромболитических препаратов. Обнаружена корреляция между концентрацией и активностью ТАFI, с одной стороны, и временем, в течение которого лизируется сгусток крови.

Другие элементы системы фибринолиза

Аполипопротеин (а). Аполипопротеин (а) конкурирует с плазминогеном и t-РА за связь с фибрином, что приводит к снижению активности процесса фибринолиза. Кроме того, было показано, что в присутствии аполипопротеина (а) уменьшается активация плазминогена на поверхности фибрина.

Витронектин. Витронектин стабилизирует РАI-1 в его активной конформации, являясь, по сути, его кофактором, и повышает период полураспада последнего. Кроме того, он способствует клиренсу РАI-1 липопротеинами низкой плотности.

Система фибринолиза

Лизис фибринового сгустка. Продукты деградации фибрина/фибриногена и D-димеры

Плазмин является очень активной и в то же время относительно неспецифичной сериновой протеазой, которая разрушает фибрин и фибриноген. Образующиеся вследствие этого молекулы, имеющие разную молекулярную массу, обозначаются как продукты деградации фибрина/фибриногена (ПДФ).

Продуктами деградации фибрина в основном являются комплексы DDE и D-димеры (рис. 60).

Помимо фибрина, плазмин способен активно деградировать фибриноген, особенно в тех случаях, когда вводятся активаторы фибринолиза (фибринолитики). В результате лизиса фибриногена образуются меньшие фрагменты X, Y, D и E (рис. 61), а D-димеры не образуются.

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

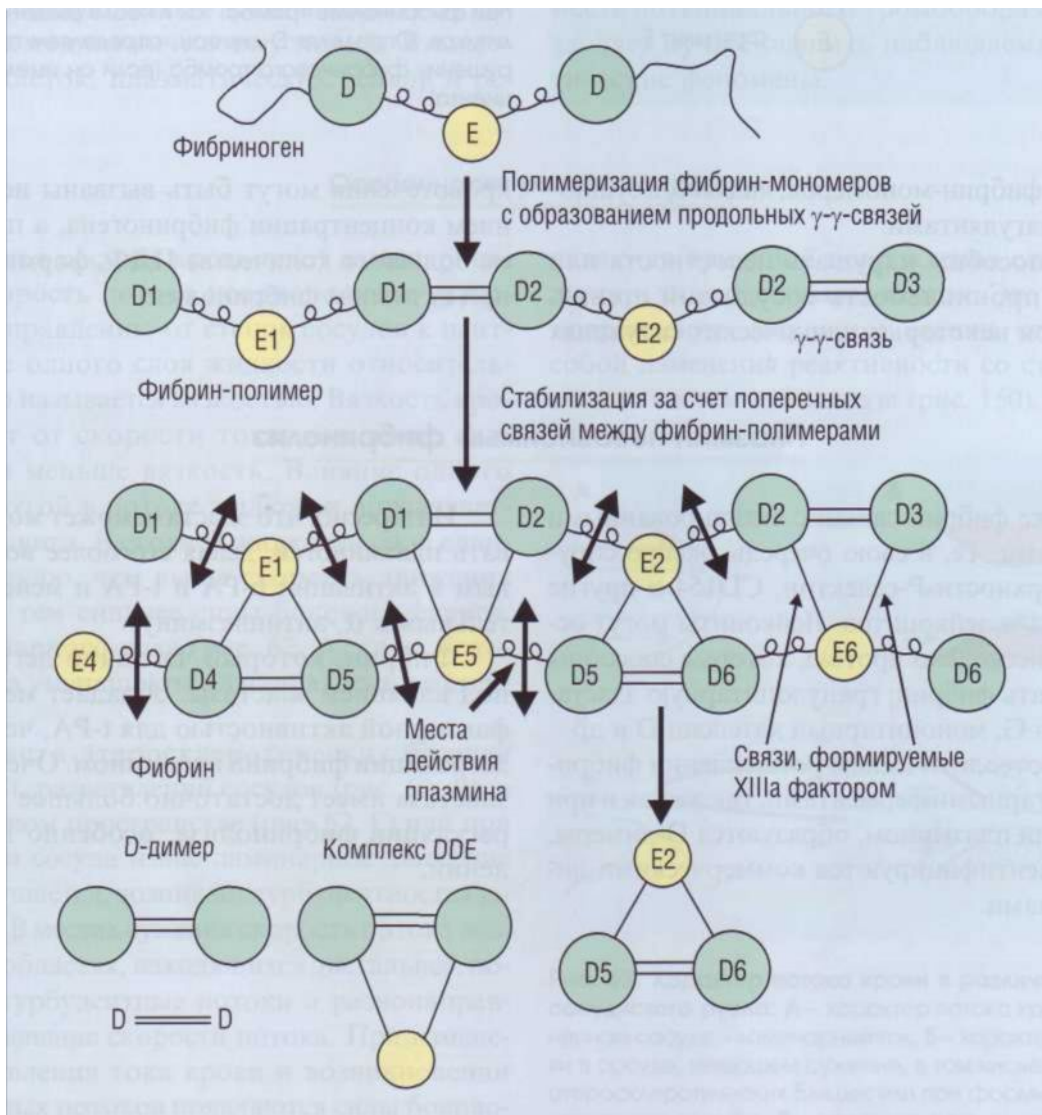


Рис. 60. Образование фибрина из фибриногена и формирование D-димеров при деградации фибрина плазмином

Система фибринолиза

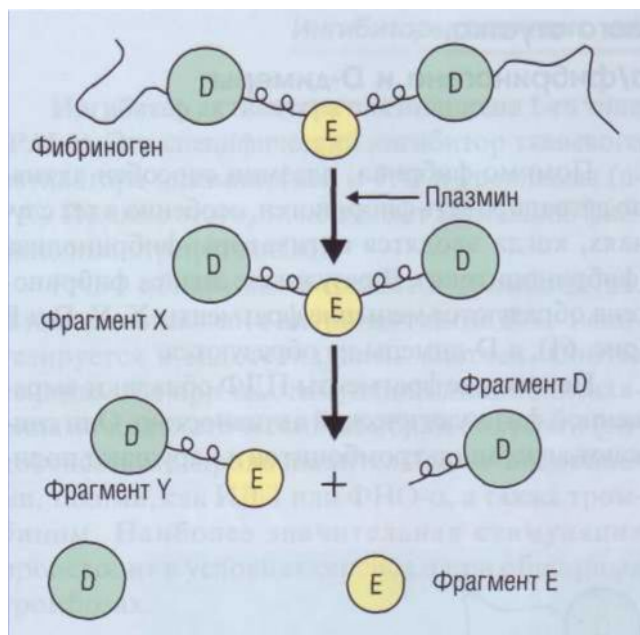


Рис. 61. Образование ПДФ при деградации фибриногена плазмином. Свободный плазмин является неспецифической протеазой, он разрушает фибриноген до мелких продуктов деградации. При этом D-димеров не формируется. D-димеры образуются при разрушении плазмином фибрина. Определяя ПДФ, выявляем продукты деградации фибрина/фибриногена, которые могут формироваться как при фибринолизе тромба, так и после введения фибринолитиков. Определяя D-димеры, определяем продукты разрушения фибринового тромба (если он имел место у пациента)

меризацию фибрин-мономеров, являясь, в сущности, антикоагулянтами.

ПДФ способны нарушать целостность или повышать проницаемость сосудистой стенки. Поэтому при некоторых клинических ситуациях

кровотечения могут быть вызваны не уменьшением концентрации фибриногена, а присутствием большого количества ПДФ, формирующихся при активном фибринолизе.

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 освободить несколько протеаз, которые способны деградировать фибрин: гранулоцитарную эластазу, катепсин G, моноцитарный катепсин D и др.

При протеолитическом расщеплении фибрина лейкоцитарными ферментами, так же как и при расщеплении плазмином, образуются D-димеры, которые идентифицируются коммерческими диагностическими методами.

Интересно, что 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.

РЕОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕМОСТАЗА

Кровь - динамичная система. Силы, возникающие в результате взаимодействия текущей крови и сосудистой стенки, оказывают существенное регуляторное влияние на систему гемостаза и на всю систему кровообращения. Запуск процесса тромбообразования, скорость и характер образующегося тромба зависят от локальных гемодинамических условий. Взаимодействие клеток, плазматических белков и ре-

цепторов системы гемостаза, экспрессия генов и метаболизм клеток, участвующих в гемостатических реакциях, модулируются локальными реологическими условиями, а те, в свою очередь, изменяются при образовании тромба. Учет гемодинамических особенностей, возникающих в месте потенциального тромбообразования, позволяет лучше оценить наблюдаемые гемостатические феномены.

Особенности реологии крови

В норме в сосудах кровь течет ламинарным током, скорость потока неоднородна и нарастает по направлению от стенок сосудов к центру. Трение одного слоя жидкости относительно другого называется вязкостью. Вязкость крови зависит от скорости тока: чем выше скорость, тем меньше вязкость. Влияние одного слоя на другой в потоке жидкости определяется силой сдвига. В стоячей жидкости сила сдвига равна нулю, чем выше скорость движения жидкости, тем сильнее силы бокового сдвига. Для ламинарного тока (рис. 62, А) силы бокового сдвига уменьшаются в направлении к стенке сосуда.

В области атеросклеротических бляшек (рис. 62, Б), разветвлений сосудов (рис. 62, В), в подклапанном пространстве (рис. 62, Г) или при компрессии сосуда извне ламинарное движение крови нарушается, возникает турбулентность (завихрения). В местах сужения скорость потока возрастает. В областях, находящихся дистальнее, появляются турбулентные потоки и разнонаправленное изменение скорости потока. При изменении направления тока крови и возникновении турбулентных потоков появляются силы бокового сдвига, которые ударяют по поверхности сосудистой стенки. Поэтому турбулентные потоки

являются причиной повреждения слоя гликокаликса и эндотелиальных клеток. Это приводит к повреждению сосудистой стенки, что влечет за собой изменения реактивности со стороны элементов системы гемостаза (рис. 150).

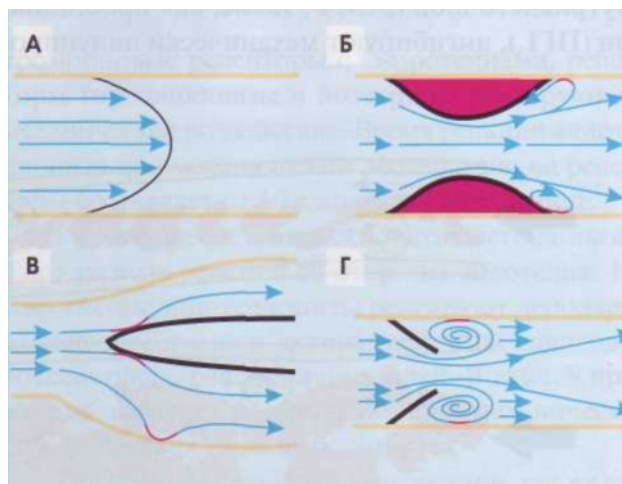


Рис. 62. Характер потока крови в различных условиях сосудистого русла: А - характер потока крови в неизменном сосуде - ламинарный ток, Б - характер потока крови в сосуде, имеющем сужение, в том числе при развитии атеросклеротических бляшек или при формировании пристеночного тромба, В - характер потока крови в области бифуркации крупных сосудов, Г - характер потока крови в области клапанов сердца и сосудов

Функция тромбоцитов в различных гемодинамических условиях

В норме в кровотоке большинство тромбоцитов находятся в неактивной форме на всех участках кровеносного русла. Однако, в условиях воздействия сил сдвига, превышающих нормальные, тромбоциты могут спонтанно активироваться без контакта с субэндотелием. Предположительный механизм этого процесса связан с особенностями функционирования фактора Виллебранда (vWF). В условиях нормального кровотока vWF мало связывается со своими рецепторами на интактных тромбоцитах. Однако, когда воздействие сил тока крови превышает обычное, например в области атеросклеротического сужения артерии, аффинность vWF к рецепторам повышается. Он связывается с GPIb и GPIIb-IIIa одновременно. Следствием этого становится активация тромбоцитов с образованием мобильных тромбоцитарных агрегатов. АДФ и эпинефрин (адреналин) - агонисты этого процесса, они увеличивают процесс тромбообразования. Механизм этого действия неясен. Исследования показали, что ингибирование циклооксигеназы аспирином оказывает небольшое влияние на агрегацию тромбоцитов под воздействием напряжения сдвига, а агенты, повышающие уровень внутриклеточной цАМФ, такие, как простагландин (ПГ1), ингибируют механически индуциро-

ванную агрегацию. Природа чувствительных к механическому воздействию компонентов этой системы неизвестна.

Интенсивность воздействия потока крови на тромбоциты влияет на адгезию к субэндотелиальным структурам и агрегацию. В условиях слабого воздействия тока крови адгезия тромбоцитов происходит за счет прямой фиксации к коллагену через рецептор GPIa-IIa и посредством молекулы адгезии фибронектина, а агрегация происходит за счет фибриновых мостиков. В условиях интенсивного кровотока для надежной фиксации тромбоцитов к субэндотелию и прочной агрегации необходим vWF. У пациентов с количественным и качественным дефектом vWF нарушение адгезии и агрегации тромбоцитов приводит к геморрагическим проявлениям различной тяжести.

В медленно текущей и сгущенной крови наступает агрегация клеток крови (рис. 63). Эритроциты собираются в монетные столбики, образуются агрегаты тромбоцитов, в легких формируются агрегаты нейтрофилов. Повышается вязкость крови.

Проводились экспериментальные исследования роста тромба в зависимости от интенсивности кровотока. Процесс тромбообразования

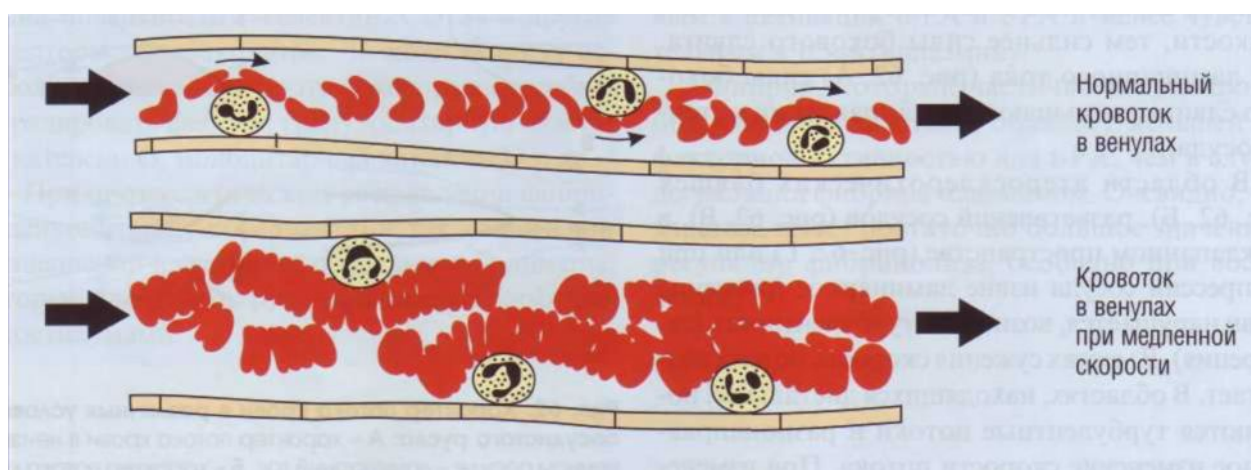


Рис. 63. Кровоток в венулах в норме характеризуется центральным расположением эритроцитов и краевым движением лейкоцитов. При низкой скорости эритроциты собираются в монетные столбики и придавливают лейкоциты к стенке, способствуя их выходу в ткань

Реологические аспекты гемостаза

проходил на компонентах, выделенных из эндотелия. Установлено, что повышение скорости тока, а следовательно, увеличение напряжения сдвига, увеличивало отложение тромбоцитов. Однако в этих условиях снижался рост тромба. Возможные объяснения этому: 1) связи тромбоцитов с компонентами эндотелия недостаточно сильны, чтобы удержать их на поверхности по

мере нарастания воздействия сил сдвига; 2) при уменьшении времени контакта тромбоцитов с поверхностью прочные связи не успевают образовываться; 3) при увеличении скорости тока крови происходит интенсивное вымывание активированных компонентов гемостаза из зоны реакции.

Влияние сил потока крови на процесс коагуляции

Процесс свертывания крови связан с фиксацией комплекса плазменных белков на поверхностях в области повреждения сосуда. Интенсивность этого процесса зависит от доставки белков плазмы к месту реакции. В условиях ламинарного течения крови белки поступают к месту повреждения в основном путем радиальной диффузии. Повышение скорости тока крови, возникновение турбулентных потоков увеличивают доставку протеаз к месту реакции. Экспериментальные исследования показали, что в условиях стандартной ограниченной концентрации ф. Va, фиксированного на поверхности, и циркулирующего в жидкой фазе ф. X ста-

бильный уровень продукции тромбина ограничен количеством фиксированного ф. Va. В условиях лимитированного количества ф. Va увеличение циркулирующего ф. Xa или скорости циркуляции не меняет конечный уровень продукции тромбина, однако ускоряет этот процесс. Таким образом, увеличение интенсивности тока крови сокращает время тромбообразования.

Однако, индуцированный механическим воздействием выброс из эндотелия тканевого активатора плазминогена приводит к сокращению отложения фибрина и ограничению роста сгустка за пределы повреждения.

Гемодинамическое воздействие на функцию сосудистой стенки

Ток крови оказывает на сосудистую стенку механическое воздействие, растягивая ее, оказывая давление с внутренней стороны и воздействуя силами напряжения сдвига. Эндотелиоциты реагируют на условия тока крови:

- изменяется активность синтеза различных белков;
- изменяется концентрация циклических нуклеотидов в цитоплазме;
- происходят количественные и качественные изменения рецепторов и фосфолипидов мембраны. Эти процессы в том числе влияют на активность эндотелиоцитов в гемостазе. Имеется два типа реакции эндотелиоцитов на механические воздействия тока крови - *быстрые и медленные реакции*.

Быстрые реакции (в течение секунды) являются следствием прямого воздействия сил тока крови на текучую мембрану клеток. *Медленные реакции* опосредованы рецепторами. Ионные каналы,

тромбиновые рецепторы с G-протеинами, рецепторы тирозинкиназы и интегрины реагируют на механическое воздействие. Время реакции эндотелиоцита при механическом воздействии на рецепторы составляет от 10 с до нескольких минут.

Различные механические воздействия вызывают разные реакции со стороны эндотелия. На растяжение эндотелиоциты реагируют деполяризацией мембраны и активацией, а на сдвиговое воздействие - гиперполяризацией. В табл. 9 приведены эффекты различных видов механического воздействия на эндотелиоциты.

Гладкие мышечные клетки сосудов, так же как и эндотелиоциты, отвечают на механические воздействия. Например, длительное воздействие растяжения вызывает снижение их пролиферативной активности. Воздействие повышенного напряжения сдвига приводит к усилению секреции тканевого активатора плазминогена, оксида азота, простаглицлина, ПГ₂, некоторых ростовых факторов.

Реологические аспекты гемостаза

Таблица 9

Физиологические и патологические эффекты механического воздействия на эндотелиоциты

Воздействие напряжения сдвига	Воздействие растяжения
Гиперполяризация и снижение активности	Деполаризация и активация
Повышение уровня плазматического цГМФ, цАМФ	Повышение секреции ингибитора активатора плазминогена-1
Повышение уровня инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола	Повышение секреции эндотелина-1 и простациклина (ПГ ₂)
Активизация протеинкиназ, отвечающих за внеклеточные сигналы	
Изменение сайтов адгезии эндотелиоцитов и формы клеток	
Усиление продукции тканевого активатора плазминогена и урокиназы	
Усиление продукции простациклина	
Снижение продукции эндотелина-1	
Усиление синтеза оксида азота	

СОВРЕМЕННАЯ ТЕОРИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Разработанная и дополненная в начале - середине XX века теория гемостаза базировалась на исследованиях, выполненных *in vitro*, и не учитывала реальные условия в системе кровообращения. В последнее десятилетие под давлением накопившихся фактов взгляд на механизмы гемостатических реакций изменился. Наиболее значимым шагом явилась разработка каскадно-матричной теории свертывания крови, в которой учтены не только реакции взаимодействия белков плазмы и тромбоцитов, но влияние компонентов сосудистой стенки и других клеток крови. Реакции гемостаза привязали к конкретным структурам на мембранах клеток и субэндотелия. Были учтены особенности мембранных рецепторов клеточных компонентов гемостаза и микроокружения, в котором происходят реакции.

На рис. 64 представлена последовательность гемостатических реакций. Однако эта схема отражает проблему на феноменологическом уровне. Видимо, в организме запуск всех процессов происходит в течение нескольких секунд после возникновения травмы, но каждый процесс име-

ет различную скорость развития. При этом различные внешние воздействия и особенности организма могут менять соотношение скоростей разных гемостатических реакций.

Сложно подробно описать весь комплекс реакций гемостаза, привязываясь к динамике процесса, поэтому мы опишем лишь важнейшие моменты. Более подробная информация была дана ранее в разделах, посвященных конкретным системам. Тем не менее целостное представление необходимо для правильной клинической интерпретации лабораторных тестов.

В первый момент после повреждения сосуда развиваются следующие реакции:

- Вазоконстрикция (в сосудах, имеющих мышечный слой). Она механически ограничивает кровопотерю, создает условия для более эффективного тромбоцитарного гемостаза и позволяет теснее сопрягать гемостатические реакции в зоне повреждения.
- Активация эндотелиоцитов с последующим экзоцитозом под воздействием стимуляторов: тромбина, гистамина, фибрина, компонентов



Рис. 64. Последовательность развития гемостатических реакций в системе кровотока после повреждения сосудистой стенки

Современная теория свертывания крови

комплемента, гипоксии. Экзоцитоз содержимого пулов хранения эндотелиоцитов приводит к локальному повышению концентрации прокоагулянтов, в первую очередь фактора Виллебранда. Видимо, на поверхности активированных эндотелиоцитов появляется тканевой фактор. Таким образом, антикоагулянтные свойства эндотелия сменяются на прокоагулянт-

ные в зоне повреждения. Однако прокоагулянтный потенциал уменьшается по мере удаления от области повреждения и меняется на антикоагулянтный в области интактного эндотелия. Немедленно после повреждения происходит контакт крови с субэндотелиальными структурами и развиваются события, которые описывает каскадно-матричная теория свертывания крови.

Каскадно-матричная теория свертывания крови

В настоящее время имеются доказательства того, что в условиях *in vivo* внутренний и внешний пути активации протромбиназы взаимосвязаны. Комплекс ТФ-ф. VIIa активирует фактор IX, а факторы XIIa и XIa могут активировать фактор VII. Кроме того, оказалось, что, несмотря на сходную структуру мембранных липидов, клетки, несущие тканевой фактор, и активированные тромбоциты экспрессируют рецепторы, которые локализуют на их поверхности различные компоненты свертывающей системы крови.

Условно процесс свертывания крови можно разделить на три перекрывающихся друг друга фазы.

1-я фаза - инициация процесса свертывания крови. Сразу же после повреждения эндотелия кровь контактирует с матриксом субэндотелия и клетками субэндотелия (фибробластами, макрофагами, гладкими мышечными клетками). ТФ, фиксированный на мембране этих клеток, образует комплекс с плазменным ф. VII. Поскольку около 1% ф. VII присутствует в кровотоке в активной форме, сразу после повреждения эндотелия образуется некоторое количество активных комплексов ТФ-ф. VIIa, которые активируют ф. X до ф. Xa. ф. Xa на поверхности субэндотелия образует комплекс со своим кофактором ф. Va. При этом превращение фактора V в активную форму осуществляется фактором Xa на поверхности клеток, несущих ТФ. Сформировавшийся протромбиназный комплекс приводит к образованию незначительного стартового количества тромбина.

Одновременно с ф. Xa комплекс ТФ-ф. VIIa активирует ф. IX.

Большинство ТФ образует комплекс с неактивным ф. VII и не способно активировать ф. X. Однако этот процесс имеет положительную обратную связь за счет следующих механизмов: 1) акти-

вации фактора VII в комплексе с ТФ образовавшимся фактором Xa; 2) активации ф. VII тромбином. Активированного на этом этапе тромбина недостаточно для образования фибринового сгустка, поскольку активация протромбина на мембранах субэндотелиальных клеток ограничивается целым рядом механизмов:

- Комплекс ТФ-ф. VIIa-ф. Xa быстро подавляется ингибитором пути тканевого фактора (ИВП).
- ф. Xa, поступающий в плазму с поверхности мембраны, также очень быстро ингибируется антитромбином III.
- Неактивированный фактор VII, который конкурирует с фактором VIIa за места связывания на ТФ, также вносит вклад в ограничение процесса образования тромбина. Его ингибиторный эффект наиболее значителен при минимальной концентрации ТФ.

2-я фаза - усиление процесса свертывания крови. Образовавшееся в первой фазе небольшое количество тромбина не приводит к интенсивному образованию фибрина, однако это количество важно для активизации других компонентов системы гемостаза. Тромбин более устойчив к инактивации, чем фактор Xa. Он сохраняет свою активность в токе крови и играет ключевую роль в усилении процесса свертывания крови.

ф. IX, активизированный на клетках субэндотелия в 1-й фазе процесса свертывания крови, так же как и тромбин, имеет относительно высокую устойчивость к ингибированию АТ. Он преодолевает расстояние между мембраной клеток субэндотелия и мембраной активированного и адгезированного тромбоцита. Там он фиксируется на тромбоцитарном ф. B и образует с ф. VIIa теназный комплекс.

Современная теория свертывания крови

Адгезированные к субэндотелию в области повреждения сосуда тромбоциты активируются за счет сигнала с рецепторов адгезии. Однако наиболее сильным стимулом является тромбин. Неактивированные и активированные тромбоциты имеют несколько рецепторов для тромбина: рецептор, активируемый протеазой (PAR1), гликопротеин Ib-V-IX (GPIb-V-IX) и, возможно, другие. Активированные тромбоциты экспонируют на своей поверхности тромбоцитарный фактор 3, или тромбоцитарный тромбопластин, и специфические рецепторы к различным факторам свертывания крови. Помимо изменений клеточной поверхности, тромбоциты секретируют содержимое пулов хранения, увеличивая локальную концентрацию прокагулянтов.

GPIb-V-IX является рецептором не только тромбина, но и фактора Виллебранда, оба этих белка реагируют с различными частями рецептора, поэтому они могут связываться с одним рецептором одновременно. Тромбин, связанный с рецептором GPIb-V-IX, вычлняет ф. VIII из комплекса с фактором Виллебранда и активирует его. ф. VIIIа остается на тромбоцитарной поверхности, формируя теназный комплекс. Тромбин активирует фактор V, который выделяется в процессе секреции из альфа-гранул тромбоцитов; ф. Va также остается на поверхности активированных тромбоцитов, формируя протромбиназный комплекс.

Еще одним фактором свертывания, активируемым тромбином, образовавшимся под воздействием комплекса ТФ-ф. VIIa, является ф. XIa, который связывается с поверхностью активированных тромбоцитов через цепь GPIba комплекса GPIb-V-IX.

Таким образом, небольшие количества тромбина, образовавшиеся в *ходе* первой фазы, обеспечивают в течение второй фазы свертывания крови распространение процесса активации свертывания крови на активированную тромбоцитарную поверхность с одновременной трансформацией в активную форму факторов XI, IX, VIII и V.

3-я фаза - распространение процесса свертывания крови. Активированные тромбоциты имеют на своей поверхности рецепторы для факторов XI, XIa, IX, IXa, X, VIII, VIIIa, V, Va, Xa, протромбина и тромбина. В 3-й фазе на их по-

верхности происходит формирование теназного и протромбиназного комплексов.

ф. VIIIa/IXa начинают ограниченный протеолиз ф. X до ф. Xa, последний с ф. Va образует протромбиназный комплекс и наращивает количество тромбина в зоне повреждения. Однако активированного на этом этапе тромбина еще недостаточно для образования полноценного фибринового сгустка. Критическое количество активного фактора IXa, которое необходимо для остановки кровотечения, образуется под влиянием фактора XIa. Показано, что ф. XI связывается с GPIba тромбоцитов и активируется образовавшимся тромбином. Эта положительная обратная связь усиливает коагуляционный потенциал в 5000-10 000 раз.

Образование теназного комплекса, состоящего из энзима IXa и кофактора VIII, на поверхности тромбоцитов приводит к активации фактора X со скоростью, превышающей в 50-100 раз активацию фактора X под влиянием комплекса ТФ-ф. VIIa. Кроме того, факторы в этом комплексе относительно защищены от инактивации. Вследствие этого процесса образуется значительное количество тромбина, которого достаточно для формирования гемостатического тромба.

Одновременно с фибриногеном тромбин активирует фактор XIII (фибрин-стабилизирующий фактор). Параллельно тромбин активирует тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза (ТАФИ), который тормозит развитие фибринолиза и позволяет сформироваться плотному гемостатическому тромбу, достаточному для надежной остановки кровотечения и развития репаративных реакций сосудистой стенки. Таким образом, в зоне повреждения возникают условия для формирования и стабилизации адекватного гемостатического тромба.

В нормальных условиях процесс развития тромба ограничивается несколькими механизмами:

- Тромбин в токе крови ингибируется анти тромбином III.
- На интактных эндотелиальных клетках тромбин связывается с тромбомодулином (ТМ), при этом тромбин теряет свои коагуляционные свойства и одновременно приобретает способность активировать антикоагулянт протеин С.
- Эндотелиальные клетки усиливают инактивацию коагуляционных факторов антитром-

Современная теория свертывания крови

бином и TFPI, преимущественно за счет наличия на своей поверхности гепариноподобных гликозаминогликанов.

- По мере удаления от места повреждения снижается прокоагулянтный стимул и возрастает антикоагулянтный. В зоне неповрежденного эндотелия он преобладает и ограничивает рост сгустка.

Параллельно с развитием реакций коагуляции адгезированные активированные тромбоциты выбрасывают содержимое своих гранул. Следствием этого является местное нарастание концентрации прокоагулянтов, в первую очередь факторов V, XIII, vWF, фибриногена. Тромбоцитарный фактор 4 (ТФ4) локально ингибирует гепарин и гепарансульфаты, усиливая процесс свертывания крови. Поступающие в кровь стимуляторы агрегации тромбоцитов активируют и рекрутируют из тока крови новые тромбоциты.

Полноценный гемостатический тромб формируется через 10-15 минут после начала полимеризации фибрина за счет стабилизации фибринового скелета ф. XIII и ретракции.

Активация фибринолиза, видимо, происходит в первые секунды повреждения сосуда. Однако нарастание процесса фибринолиза в области формирования сгустка происходит медленнее, чем реакции свертывания, вследствие «работы» ингибиторов фибринолиза. Это необходимо для эффективной остановки кровотечения и репарации поврежденных тканей. Однако на периферии, в области неповрежденного эндотелия, фибринолиз значительно более выражен и ограничивает распространение сгустка. Постепенно, по мере репарации сосудистой стенки, интенсивность воздействия прокоагулянтных стимулов снижается и нарастает активность фибринолитических реакций, что приводит в конечном итоге к лизису сгустка и восстановлению кровотока в сосуде.

В процессе развития ответной реакции на повреждение сосудистой стенки эндотелий и тромбоциты выбрасывают не только вещества, обладающие гемостатической активностью, но и стимуляторы репарации, хемотаксические вещества для фагоцитов, иммуномодуляторы, что обеспечивает комплексный ответ на повреждение.

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ И ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСТАЗА У ПЛОДОВ, НОВОРОЖДЕННЫХ И ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Система гемостаза, как и все остальные системы организма, претерпевает изменения в процессе роста и развития человека. К сожалению, наши знания об особенностях гемостаза плода и новорожденного малы по сравнению с информацией о гемостазе детей после года и взрослых. Для этого есть несколько причин: *во-первых*, оценка гемостаза с использованием возрастных референтных интервалов в раннем возрасте затруднена, поскольку он претерпевает быстрые количественные и качественные изменения; *во-вторых*, имеются значительные технические трудности сбора образцов крови; *в-третьих*, возможно взятие лишь небольшого количества крови, следовательно, необходимо использование микрометодов; *в-четвертых*, значительная вариабельность концентрации различных плазматических компонентов требует набора больших референтных групп пациентов одного возраста, что усугубляется быстрыми (в течение нескольких часов и дней) количественными изменениями концентрации и активности компонентов гемостаза в этом возрасте.

Гемостаз плода адаптирован к условиям внутриутробного статуса и родовому стрессу. В течение первого полугодия жизни состояние гемостаза изменяется соответственно изменившимся условиям существования и к 6 месяцам соответствует статусу зрелого организма. Поскольку гемостаз детей раннего возраста отличается от такового у взрослых, нарушения гемостаза в этом возрасте также имеют свои особенности. Кроме того, коррекция нарушений гемостаза у плодов и детей до 6 месяцев часто требует отличного подхода.

Важнейшей *клинической особенностью* состояния гемостаза плодов, новорожденных и детей первых месяцев жизни является тенденция к более легкому возникновению разнонаправленных нарушений по сравнению с детьми старшего возраста и взрослыми. Чем младше ребенок, чем более незрелым он родился, тем выше у него риск развития тромботических и геморрагических осложнений.

Тромбоциты

Размер, количество и время жизни тромбоцитов в крови у плодов старше 30 недель гестации и новорожденных достоверно не отличаются от норм взрослых людей. Количество тромбоцитов у плодов от 18-й до 30-й недели гестации относительно ниже, чем у взрослых. Структура тромбоцитов из пуповинной крови под электронным микроскопом не отличается от структуры тромбоцитов взрослых людей. Однако концентрация серотонина и АДФ в плотных гранулах составляет менее 50% от взрослой нормы. Также на мембранах тромбоцитов из пуповинной крови концентрация GPIIb-IIIa существенно ниже в отличие от GPIIb и P-селектина, которые представлены «нормальным» количеством.

Концентрация и относительное содержание активных высокомолекулярных мультимеров

фактора Виллебранда (vWF) в пуповинной крови выше, чем в крови детей старшего возраста и взрослых, а активность металлопротеаз, редуцирующих высокомолекулярный vWF, ниже. Состав vWF в пуповинной крови сходен с составом vWF в пуле хранения эндотелия. Эта особенность, видимо, является причиной положительного теста агрегации тромбоцитов из пуповинной крови с малыми дозами ристоцетина и вносит вклад в укороченное время кровотечения у новорожденных.

Важнейший для агрегации тромбоцитов рецептор GPIIb-IIIa появляется на мембране на ранних сроках гестации. Фибриноген присутствует в достаточной концентрации во все сроки гестации. Однако адреналин-индуцированная агрега-

Особенности физиологии и исследования гемостаза у плодов и детей

ция в целом снижена относительно взрослых норм из-за меньшей доступности α -адренергических рецепторов. Агрегация тромбоцитов пуповинной крови, индуцированная АДФ, коллагеном, тромбином и арахидоновой кислотой, варьирует, но в то же время имеется тенденция к более низким показателям относительно норм взрослых людей. К концу 2-х суток жизни у здоровых новорожденных агрегация тромбоцитов с АДФ уже не отличается от таковой у взрослых. Исследования функции тромбоцитов новорожденных в цельной крови методом проточной цитометрии показали сниженную реакцию на тромбин, комбинацию АДФ и эпинефрина и аналог тромбосана А.

Наконец, ретракция кровяного сгустка у плодов и новорожденных такая же, как у взрослых.

Время кровотечения, возможно, лучший в настоящее время тест, отражающий взаимодействие тромбоцитов и сосудистой стенки *in vivo*. Исследование этого теста у новорожденных показало в целом более короткое время.

Исследование активности тромбоцитов с использованием динамического агрегометра PFA-100, требующего очень маленькое количество крови,

идеально для новорожденных и грудных детей. Результаты этого исследования у здоровых новорожденных не отличаются от таковых у взрослых людей.

При исследовании *состояния тромбоцитарного звена в процессе родов* были получены убедительные доказательства его активации. Уровень тромбосана А₂, β -тромбоглобулина и тромбоцитарного фактора 4 был повышен, содержание гранул снижено, а доступность рецепторов эпинефрина уменьшена из-за их загруженности агонистами. Видимо, в родах имеется многофакторный механизм активации тромбоцитов, включающий температурные колебания, гипоксию, ацидоз, адренергическую стимуляцию, тромбогенный эффект амниотической жидкости. Активация коагуляционной системы приводит к парадоксальным изменениям в тестах: с одной стороны, выявляется удлинение времени свертывания в одностадийном исследовании, с другой стороны, время свертывания цельной крови, исследованное различными методами, укорочено по сравнению с нормой взрослых людей. Все эти данные свидетельствуют, что активация гемостаза в родах носит ограниченный и строго регулируемый характер.

Антикоагулянтные свойства сосудистой стенки

Исследование обмена полиненасыщенных жирных кислот выявило избыток синтеза простаглицлина сосудами пуповины относительно сосудов взрослых. Оксид азота, вырабатываемый сосудистой стенкой, играет большую роль в формировании нормального сосудистого тонуса в легких плода и новорожденного, он модулирует физиологические изменения сосудистой резистентности в процессе родов.

Исследования показали, что пуповинная кровь генерирует меньше тромбина в присутствии эндотелиоцитов пуповины. Вероятно, это свидетельствует об активации ингибиторов свертывания крови, в первую очередь АТШ, клетками эндотелия пуповины.

Коагуляционное звено гемостаза

Белки системы гемостаза не проникают через плацентарный барьер, они синтезируются организмом плода *de novo*. Концентрация большинства плазменных белков гемостаза становится измеримой после 10 недель гестации и постепенно повышается по мере созревания плода. В приложении, в табл. 1-8 приведены результаты исследования активности белков гемостаза и тестов, полученных у плодов раз-

ного возраста в зависимости от сроков гестации, недоношенных и доношенных новорожденных, младенцев и детей разного возраста. Эти результаты с осторожностью можно использовать при оценке гемостаза недоношенных новорожденных. Корректные показатели гемостаза недоношенных новорожденных малодоступны, поскольку почти все недоношенные имеют различную патологию.

Особенности физиологии и исследования гемостаза у плодов и детей

Коагуляционные белки. Активность витамин-К-зависимых факторов, фактора XI и факторов контактной системы у плодов и новорожденных детей более низкая, чем у взрослых и постепенно повышается, доходя до взрослой нормы к 6 месяцам. Следствием этого является более длинное АЧТВ. Плазменный уровень vWF и ф. XIII у новорожденных аналогичен взрослым нормам. У плода активность ф. VII и ф. VIII снижена на ранних сроках гестации и повышается до нормы взрослого человека ко времени рождения.

Фетальная форма белков коагуляции. Некоторые коагуляционные белки (ф. XII, ф. VII, прекаликреин, фибриноген) имеют фетальную форму. Особенностью фетального фибриногена является повышенное относительно зрелой формы содержание сиаловой кислоты. Концентрация фибриногена у плодов значительно ниже, чем у взрослых и постепенно повышается. Рождаются здоровые дети с уровнем фибриногена, близким к взрослым нормам, однако он может повышаться в течение первой недели жизни.

Генерация тромбина у плодов и новорожденных замедлена и снижена, что напрямую связано с концентрацией протромбина и других прокагулянтов.

Прямые ингибиторы тромбина. Из трех важнейших ингибиторов тромбина - АТIII, кофактора гепарина II, α_2 -макроглобулина - последний играет большую роль у новорожденных, чем у взрослых, так как концентрация других ингибиторов относительно снижена.

Помимо этого, в пуповинной крови находят циркулирующий антикоагулянт, аналогичный гликозаминогликанам дерматансульфата, - *фетальный антикоагулянт*. Его концентрация в плазме составляет около 0,29 мкг/мл, молекулярная масса - 150 кДа. Есть мнение, что фетальный антикоагулянт потенцирует активность кофактора гепарина II. Видимо, он поступает в кровь плода из крови матери и (или) синтезируется в плаценте. Длительность циркуляции фетального антикоагулянта в крови новорожденного неизвестна, однако он в течение недели обнаруживается в крови недоношенных детей, больных респираторным дистресс-синдромом (у которых часто причиной патологии является недоразвитие сурфактанта). За исключением этих особенностей, активность ингибирования тромбина остается более

низкой у новорожденных детей по сравнению со взрослыми.

Система протеинов C и S. При рождении плазменная концентрация протеина C значительно ниже, чем у взрослых, и остается сниженной в течение первого полугодия жизни. Концентрация общего протеина S тоже снижена, однако функционально это практически несущественно, потому что большая часть протеина S находится в свободной форме. С4-связывающий протеин у новорожденных низкий. Плазменная концентрация тромбомодулина повышена в раннем детстве и постепенно снижается до взрослой нормы после десяти лет. Однако разницы в экспрессии тромбомодулина на эндотелии в зависимости от возраста выявлено не было.

Физиологические механизмы, потенциально объясняющие разницу плазменных концентраций различных белков гемостаза у плодов и новорожденных, включают сниженную продукцию и ускорение клиренса. Исследования показали ускоренный клиренс фибриногена у новорожденных по сравнению со взрослыми. Период полувыведения антитромбина у здоровых новорожденных меньше. Видимо, ускоренный в целом метаболизм новорожденных и детей раннего возраста вносит вклад в относительно быстрое выведение коагуляционных белков.

Активация системы коагуляции в момент рождения не влечет за собой значимого потребления факторов свертывания крови и не является причиной низкой активности ряда компонентов гемостаза, а представляет собой жестко контролируемый, ограниченный процесс.

Система фибринолиза. У новорожденных концентрация плазминогена и α_2 -антиплазмина достоверно ниже, чем у взрослых, а α_2 -макроглобулина - выше. Концентрация тканевого активатора плазминогена (t-PA) и ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1) у плодов снижена, но после рождения ребенка происходит значительное нарастание их активности в крови; начиная с 1-х суток жизни их концентрация достоверно превышает норму взрослых людей.

Плазминоген, как и фибриноген, имеет фетальную форму, точнее 2 гликоформы, содержащие большее количество маннозы и сиаловой кислоты. Энзиматическая активность фетального плазминогена и его способность связываться

Особенности физиологии и исследования гемостаза у плодов и детей

с фибрином/фибриногеном ниже, чем у зрелой формы.

В целом активность фибринолитической системы у новорожденных имеет разнонаправленные тенденции. Укороченное время лизиса эритроцитарного сгустка и повышение уровня продуктов

фибринолиза в плазме новорожденных доказывает, что эта система активируется в родах. В то же время способность плазмы генерировать плазмин в ответ на воздействие различных активаторов фибринолиза снижена, что является следствием относительно низкого уровня плазминогена.

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ И ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСТАЗА У ЖЕНЩИН ПРИ МЕНСТРУАЦИИ И БЕРЕМЕННОСТИ

Менструальные кровотечения

Менструация - физиологическое периодическое кровотечение из матки. Кровотечению предшествуют изменения сосудов матки, которые сначала сокращаются, а затем расслабляются и тем самым обеспечивают менструальное кровотечение. Оба эти процесса контролируются простагландинами, которые образуются в слизистой и мускулатуре матки. По крайней мере, 2 механизма участвуют в обеспечении менструальных кровотечений:

1. Ингибирование агрегации тромбоцитов, которое обеспечивается теми же простагландинами, которые определяют дилатацию сосудов матки.
2. Усиление фибринолиза. Менструальное кровотечение поддерживается образованием в эндотелиальных клетках большого количества тканевого активатора плазминогена (t-PA), что сопровождается примерно 5-кратным увели-

чением его содержания в менструальной крови по сравнению с венозной кровью. Кроме того, в менструальной крови содержание проурокиназы (scu-PA) может быть повышено до 50 раз по сравнению с венозной кровью. Большое количество проурокиназы поддерживается фактором некроза опухоли- α (ФНО- α), вырабатываемым эндометриальными клетками. ФНО- α стимулирует образование scu-PA эндотелиальными клетками сосудов матки.

Тканевой активатор и урокиназа стимулируют переход плазминогена в плазмин, который эффективно разрушает образующийся в менструальной крови фибрин, поэтому фибриновый сгусток не формируется. Усиление фибринолиза при менструации - всегда локальный процесс, ограниченный пределами матки.

Изменения гемостаза при беременности

Изменения показателей системы гемостаза начинают регистрировать не раньше, чем со 2-го месяца беременности, затем изменения прогрессивно увеличиваются вплоть до родов. Скрининговые тесты ПТ, АЧТВ и показатели фибринолиза указывают на развитие гиперкоагуляции и гипофибринолиза. Отдельные факторы гемостаза чаще всего меняются следующим образом:

- Концентрация фибриногена и содержание ф. VII и ф. VIII увеличиваются. Причем для ф. УП имеет место пропорциональное повышение как активности, так и содержания (VII:C и VII:Ag), тогда как ф. VIII непропорционально повышается по отношению к комплексу ф. VII- vWF.
- Имеет место некоторое повышение факторов IX, X и протромбина.

- Содержание ф. XIII имеет тенденцию к снижению.
- Обнаруживают уменьшение свободного протеина S, что связывается с увеличением С4-связывающего белка.
- Высококочувствительными методами регистрируется повышение активационных маркеров протромбина - F1+2.
- Обнаруживается повышение агрегации тромбоцитов.

Наиболее значительным является угнетение фибринолиза во 2-м и особенно в 3-м триместре беременности. Причем количество плазминогена, эндогенных и экзогенных активаторов фибринолиза имеет тенденцию к повышению (t-PA, u-PA, ф. XII, прекалликреин и высокомолекулярный кининоген). Угнетение же фибринолиза связано

Особенности физиологии и исследования гемостаза у женщин

с существенным увеличением ингибиторов: *ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1)*, который освобождается из эндотелиальных клеток, и особенно *ингибитора активатора плазминогена 2-го типа (PAI-2)*, который нарабатывается плацентой. Ингибирование фибринолиза при беременности - основная причина сдвига гемостатического баланса к гиперкоагуляции и формированию предтромботического состояния.

Клинический пример 1

Пациентка 20 лет. Беременность 32 недели. Без осложнений.

Коагулологическое обследование: АЧТВ 31 с (норма для взрослых, принятая для общей популяции в данной лаборатории, - 35-45 с), ПТ 100%, ТВ 26 с (норма 28-30 с), фибриноген 4,8 г/л (нор-

После родов все показатели гемостаза возвращаются к норме примерно за 6 недель.

Гиперкоагуляция при беременности - физиологическое состояние, которое обеспечивает эффективную имплантацию яйцеклетки, адекватное соединение плаценты с маткой и остановку кровотечения во время родов. Однако необходимо учитывать, что при беременности повышен риск венозных тромбозов и эмболии легочных артерий.

ма 2-4 г/л), РКФМ 7,5 мг/дл (норма до 4 мг/дл), лизис эуглобулиновой фракции 220 мин (норма 140-240 мин). Агрегация тромбоцитов с АДФ (2,5 мкмоль/л): степень 72%, скорость 40%>/мин, время 7'25", однофазная, необратимая.

Заключение: коагулограмма соответствует сроку беременности.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИИ ГЕМОСТАЗА В

Общие подходы

Исследование нарушений гемостаза проводится в несколько этапов.

Перед проведением лабораторного исследования собирается *анамнез*. Во-первых, необходимо выяснить наличие клинических признаков геморрагического или тромботического заболевания у пациента. Во-вторых, требуется определить наличие таких признаков у членов семьи. 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 учитывать сопутствующие заболевания и симптомы, а также применяемые пациентом медикаментозные препараты, которые могли повлиять на гемостаз.

Однако данные анамнеза являются субъективной информацией и не всегда помогают в установке правильного диагноза. Клиническое обследование пациента выявляет ряд признаков нарушения гемостаза - петехии, синячки на коже, кровоизлияния в слизистые оболочки, признаки венозного застоя или артериальной недостаточности и др. Необходимость сбора анамнеза и осмотра перед началом лабораторного обследования важна еще и потому, что проведение всех возможных тестов оценки состояния системы гемостаза - чрезвычайно дорогостоящее занятие. Кроме того, в настоящее время нет лабораторных тестов, позволяющих досконально охарактеризовать все звенья системы гемостаза. Поэтому на предварительном этапе необходимо выбрать рациональную палитру тестов, наиболее соответствующую клинической картине нарушений у данного пациента.

На следующем этапе рекомендуется провести некоторое количество скрининговых тестов, которые позволят определить направленность нарушения. И лишь на следующем этапе рационально выполнить соответствующие данным клинической картины и скрининговых тестов анализы, способные выявить конкретные нарушения гемостаза у пациента.

Важно понимать, что применяемые 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 дорогим, 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

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

назначения. Они могут указать на заболевания печени или почек, которые имеют значение для синтеза и катаболизма факторов гемостаза. Опухоль с метастазами способна стать причиной тромбоза. Лекарственные препараты могут вызывать кровотечения, а в некоторых случаях передозировка прямых и непрямых антикоагулянтов, наоборот, приводит к тромбофилии.

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

Преаналитический этап

Взятие крови

Существенное значение имеет, на какой крови выполняется тот или иной тест: на цельной, стабилизированной капиллярной или на плазме венозной крови.

Капиллярная кровь

Капиллярная кровь как диагностический материал имеет ограниченное значение. Тем не менее у больных, принимающих непрямые антикоагулянты, использование капиллярной крови из пальца позволяет избежать повторного травмирования и тромбирования вен, затрат времени на центрифугирование крови и отделение плазмы. При этом использование капиллярной крови увеличивает вероятность преаналитической ошибки; становится сложнее стандартизировать исследование, требуются специальные реактивы и оборудование. Стоимость реактивов для исследования протромбинового времени в капиллярной крови выше, их стабильность ниже, чем обычного тромбопластина, используемого для анализа плазмы венозной крови. Для избежания неверных результатов капиллярная кровь может использоваться только для некоторых специально адаптированных методов: подсчет тромбоцитов, определение времени кровотечения, определение протромбинового (ПВ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Определение АЧТВ в капиллярной крови используется исключительно для мониторинга гепаринотерапии.

Определение ПВ в капиллярной крови используется в основном для контроля за приемом непрямых антикоагулянтов в амбулаторных и домашних условиях, а также для экспресс-диагностики у детей первых месяцев жизни.

Фирма «Roche Diagnostics» выпускает комбинированный тромбопластиновый реагент «Hepato Quick», который специально предназначен для работы с капиллярной кровью. В состав реактива входят тромбопластин, фактор V и фибриноген, для определения используется 20 мкл цельной крови. Реагент прокалиброван. Для проведения работ по контролю качества используются специально подготовленные лиофилизированные плазмы. При использовании реактива предусмотрена возможность коррекции влияния гематокрита на результат теста. Все эти условия позволяют проводить контроль за антикоагулянтами непрямого действия по протромбиновому тесту, выполняемому на полученной из пальца капиллярной крови. Этот метод оценивает международное нормализованное отношение (МНО) в микрообъемах цельной или стабилизированной цитратом капиллярной крови. Существенным ограничением метода является то, что используемый в нем реагент сложен, дорог и малодоступен многим практическим лабораториям. Одновременно фирма «Roche» предлагает портативный прибор «CoaguCheck Plus» для определения ПВ и АЧТВ, в котором в качестве биологического материала используется капля капиллярной крови. Прибор может применяться в амбулаторных условиях или самостоятельно пациентами для контроля терапии непрямыми антикоагулянтами (рис. 65).

Основные проблемы и рекомендации при работе с капиллярной кровью:

- При прохождении крови через поврежденную ткань активируется свертывание, длительность взятия крови является критическим показателем.
- Немецкий стандарт DIN 58910-D: кровь, вытекающая *самостоятельно*, должна быть забрана

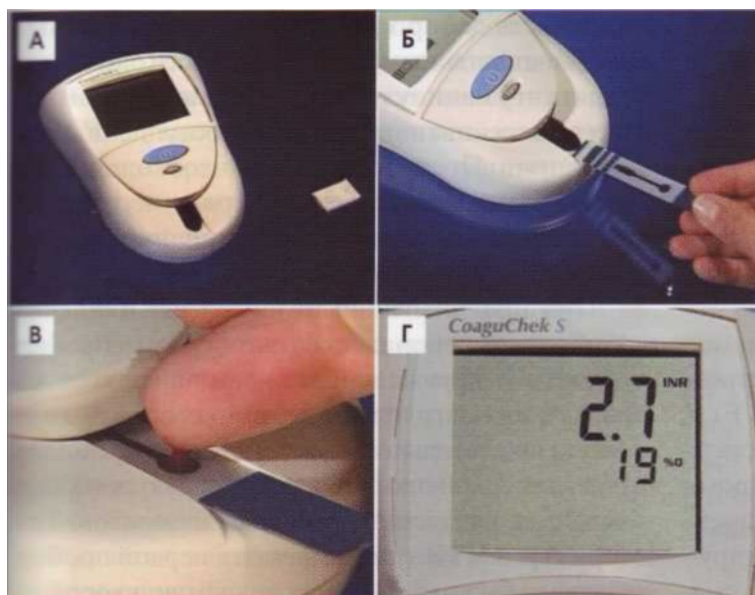


Рис. 65. Портативный прибор «CoaguChek Plus» (фирма «Roche») для определения ПВ и АЧТВ: А - общий вид и картридж для программирования прибора, Б - тест-полоска вводится в прибор, В - капля капиллярной крови наносится непосредственно на тест-полоску, помещенную в прибор, Г - результат готов через несколько минут, причем данные по протромбиновому времени (ПВ) представляются сразу в единицах международного нормализованного отношения (МНО)

в *стерильный капилляр* и перенесена в нитратный буфер в течение 10 с. Чистое и сухое место кончика пальца или ушной мочки пунктируется стерильным скарификатором. Прокол должен быть достаточно глубоким, чтобы кровь текла самотеком. Не допускается давление или сжатие. Для исследования используются первые капли крови, берется 10-50 мкл в стерильный капилляр, который держится горизонтально, один конец касается места прокола. В капилляре кровь с цитратом не перемешивается, предварительный забор антикоагулянта только усложняет процедуру. Капиллярная кровь при взятии в пробирку с цитратом должна быть перемешана во время или сразу после взятия. Не допускается, чтобы кровь стекала на дно по стенке пробирки, она должна прямо скапывать в цитрат, перемешиваясь с ним (рис. 66).

Венозная кровь

До настоящего времени венозная кровь - основной источник материала для анализа состояния гемостаза. Взятие венозной крови - критическая процедура для тестов на коагулограмму. Взятие крови должно быть приурочено ко времени исследования, чтобы свести до минимума время хранения проб. В то же время, учитывая суточные биоритмы, рекомендуется брать кровь на

исследование утром от 7 до 9 часов. Необязательно брать кровь строго натощак, можно рекомендовать пациенту легкий завтрак, но без жировой

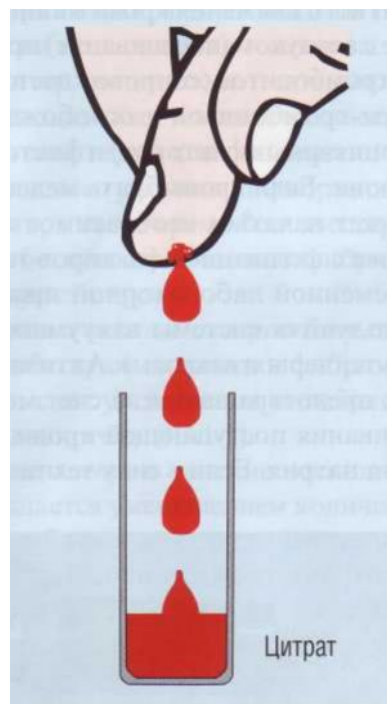


Рис. 66. При взятии крови в антикоагулянт не допускается стекание крови по коже пальца, по стенке пробирки и любой другой поверхности, так как мгновенно происходит контактная активация процесса свертывания. Кровь самотеком из прокола должна попадать прямо в антикоагулянт, перемешиваясь с ним

пищи. Исследование рекомендуется проводить у пациентов, отдохнувших не менее 15 мин после незначительной физической нагрузки.

Важным моментом является длительность наложения манжеты. Во время венопункции длительность венозного стаза рекомендуется не более 1 мин, а сила сжатия - ниже на 10 мм Hg диастолического давления крови. Стаз крови при длительном наложении манжеты вызывает активацию фибринолиза, повышение концентрации факторов гемостаза из-за освобождения белков из сосудистой стенки (в том числе t-PA и vWF) и активацию тромбоцитов. Так, после 3 мин стаза крови происходит укорочение ПВ, АЧТВ и тромбинового времени, примерно на 10% повышается количество антитромбина, фибриногена и других факторов свертывания, ф. VIII в отдельных случаях повышается более чем на 20%.

Кровь берут из локтевой вены утром натошак силиконированной иглой с широким просветом (внутренний диаметр 1,0 - 0,8 - 0,6 мм) без шприца (самотеком). Использование шприца нежелательно. Если кровь брать слишком быстро, то из-за турбулентного движения крови в шприце и смешивании ее с воздухом (вспенивание) происходит активация тромбоцитов (сопровождается изменением формы тромбоцитов и освобождением из них тромбоцитарных факторов) и факторов свертывания крови. Если кровь брать медленно, то в шприце может начаться необратимое свертывание, опять же с активацией факторов гемостаза.

В современной лабораторной практике все чаще используются системы вакуумного забора крови (вакутейнеры и вакуэты). Активация гемостаза в них предотвращается за счет моментального смешивания поступающей крови с раствором цитрата натрия. Если в силу технических об-

стоятельств забор крови проводится пластиковым (не стеклянным) шприцем, необходимо выполнять эту манипуляцию как можно аккуратнее, избегая вспенивания и резкого поступления крови в шприц. После этого кровь необходимо также аккуратно в минимальные сроки перенести в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку с раствором цитрата натрия.

При прокалывании иглой сосуда тканевый тромбопластин попадает с током крови в пробирку, поэтому первые капли крови не годятся для проведения коагулологических тестов. Кровь на гемостаз желательно брать во вторую пробирку. Кровь из первой пробирки рекомендуется использовать для подсчета форменных элементов. Так, например, АЧТВ, определяемое в первой пробирке, может быть на 20% короче, чем во второй.

Кровь рекомендуется брать:

- «бабочкообразной» иглой в градуированную силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку, содержащую антикоагулянт;
- в градуированный пластиковый шприц, со держащий антикоагулянт;
- в моноветт - коммерческая аспирационная система (градуированный шприц), содержащая антикоагулянт;
- в вакутейнер - коммерческая система (пробирка с определенным отрицательным давлением для взятия точного объема крови), со держащая антикоагулянт (рис. 67);
- в специальные пробирки для транспортировки крови для исследования гемостаза. Например, пробирка СТАД (рис. 68) содержит цитрат натрия (0,105 М), теofilлин, аденозин и дипиридамоl. Три последних вещества предотвращают активацию тромбоцитов. СТАД



Рис. 67. Вакутейнер - система для взятия венозной крови, состоит из аспирационной иглы, переходника и пробирки с отрицательным давлением для набора крови. После введения иглы в вену пробирки могут меняться, при этом в каждую берется дозированная порция крови



Рис. 68. Пробирка СТАД специально создана для транспортировки крови на исследование гемостаза, содержит цитрат натрия (0,105 М), теofilлин, аденозин и дипиридамоl

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

существуют и в виде вакутейнеров. Скрининговые тесты и исследования отдельных факторов свертывания могут выполняться из СТАД так же, как из цитратной плазмы. 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 (подключичного) катетера. При этом желательно удалить до 10 мл крови (использовать ее на проведение гематологических или биохимических исследований), а затем забрать кровь на коагулологические исследования. Такой способ взятия крови применим только в тех случаях, когда в катетер не вводился гепарин. Если же через этот катетер гепарин вводился, то удаляют до 20 мл крови, а затем берут кровь на исследование гемостаза. Тем не менее даже в этом случае приоритет должны получать гепарин-независимые тесты (ПВ, рептилазное время, фибриноген, фибрин-мономеры, анти-тромбин), так как сохраняется высокая вероятность влияния следов гепарина на такие тесты, как АЧТВ, тромбиновое время.

Положение тела

Положение тела влияет на состав крови, число клеток, состав белков и белково-связывающих макромолекул, особенно выраженные изменения наблюдаются у пациентов с отеками. Уровень этих показателей всегда выше в положении стоя, так как при этом часть жидкости из сосудистого ложа переходит в окружающие ткани. При переходе из стоячего положения в сидячее, а особенно в положение лежа, жидкость быстро возвращается в сосуды («разведение крови»), этот эффект в большей степени выражен у пациентов с отеками. У здоровых людей через 8 ч лежания в постели концентрация фибриногена и активность антитромбина в крови примерно на 20% ниже, чем после 1 ч в положении стоя. У больных с отеками эта разница будет еще больше. Поэтому при мониторинге за состоянием пациента кровь всегда нужно брать из одного и того же положения пациента.

Влияние физической нагрузки и эмоционального стресса

Физическая нагрузка и эмоциональные переживания сопровождаются изменениями плазменного гемостаза, фибринолиза и функции тромбоцитов. После серии приседаний содержание в плазме фактора Виллебранда (vWF:Ag) увеличивается до 50%, у спортсменов после бега на 10 км содержание ф. VIII повышается на 60%, vWF - примерно в 3 раза, что приводит к укорочению АЧТВ. Активация фибринолиза после физической нагрузки связана с повышением в плазме тканевого активатора пламиногена (t-PA). Аналогичные изменения наблюдаются у пациентов, перенесших эмоциональный стресс.

Влияние факторов преаналитического этапа на показатели плазменного гемостаза представлено в табл. 10.

Влияние пищи на показатели гемостаза

Практика показывает, что исследование гемостаза необязательно проводить натощак. Легкий завтрак без жира даже показан перед взятием крови на исследование гемостаза.

Характер пищи после длительного периода голодания оказывает влияние на показатели плазменного гемостаза и фибринолиза.

Жирное мясо уменьшает фибринолитическую активность, в то же время бесхолестериновая диета способствует повышению фибринолитической активности крови.

Фрукты и зеленые овощи в большом количестве способствуют активации фибринолиза в основном за счет уменьшения ингибитора активатора плазминогена (РАI-1).

Рыбная диета в течение нескольких недель сопровождается уменьшением количества и агрегации тромбоцитов, а также снижением фибринолиза. Уменьшение агрегации тромбоцитов объясняется увеличением в их мембране полиненасыщенных жирных кислот, которыми богата рыба и морепродукты.

Витамин С, витамин Е, лук и чеснок могут вызвать нарушения агрегации тромбоцитов.

Витамин К в организме человека частично синтезируется микрофлорой кишечника, частично поступает с пищевыми продуктами. Несмотря на то что при применении *per os* антибиотиков

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Таблица 10

Влияние различных факторов преаналитического этапа 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 АТ
Длительный стаз (более 3 мин)	Увеличение фибринолитической активности, укорочение АЧТВ, ПВ, ТВ, повышение уровня фибриногена, АТ
Стресс, физическая нагрузка	Повышение фибринолитической активности (уровня t-РА), укорочение АЧТВ, активация фактора VIII, увеличение vWF
Положение тела	В положении стоя происходит относительное увеличение содержания факторов свертывания
Температура +18... +24 °С в течение 8 часов	Снижение активности факторов VIII, V и IX (удлинение АЧТВ)
Температура +4 °С	Увеличение активности факторов VII, XI и XII

широкого спектра могут возникнуть кровотечения из-за недостатка витамин-К-зависимых факторов, тем не менее для организма важен и пищевой витамин К. Витамин К в больших концентрациях содержится в овощах (шпинате, кабачках), злаках и печени. ПТ может стать патологически удлиненным, если полностью заменить в пище хлеб на помидоры, которые не содержат витамина К. У больных, принимающих непрямые антикоагулянты, исключительно овощная диета в больших количествах требует дополнительной корректировки антикоагулянтного потенциала крови по ПТ. Если такую коррекцию проводить, то овощная диета не будет доставлять особых проблем пациентам, принимающим непрямые антикоагулянты.

Алкоголь влияет на показатели системы гемостаза в зависимости от дозы. После приема алкоголя наблюдается уменьшение антитромбина и фибриногена, повышение ингибитора активатора плазминогена и уменьшение времени кровотечения. Хронический алкоголизм сопровождается уменьшением количества тромбоцитов и нарушением их агрегации, которые однако достаточно быстро восстанавливаются после выхода из запоя.

Кофе даже после 5 чашек не влияет на показатели свертывания крови. Большие дозы кофеина повышают количество t-РА и уменьшают активность PAI-1.

Курение приводит к увеличению агрегации тромбоцитов и их адгезии, повышению β-тромбоглобулина, t-РА, активности PAI-1 и фибриногена, снижению ф. VII.

Кокаин в большой дозе может вызвать настолько сильную активацию и агрегацию тромбоцитов, что это перерастает в тяжелую тромбоцитопению и ДВС-синдром.

Интерферирующие лекарственные препараты

Оральные контрацептивы повышают активность большинства факторов плазменного гемостаза, увеличивают агрегацию тромбоцитов и снижают уровень протеина С и протеина S. Как правило, сами оральные контрацептивы не вызывают клинических проявлений патологии гемостаза, но они резко увеличивают вероятность тромбозов при наличии наследственных или приобретенных риск-факторов тромбофилий.

Вальпроиновая кислота (используется в препаратах для лечения эпилепсии) может вызвать тромбоцитопению, уменьшение уровня фибриногена, состояние, имитирующее болезнь Виллебранда II типа.

Аспарагиназа (препарат для лечения лимфобластных лейкозов) может приводить к снижению фибриногена, уменьшению антитромбина, протеинов С и S, витамин-К-зависимых факторов, снижению плазминогена.

Антибиотики широкого спектра действия могут привести к различным отклонениям в показателях гемостаза. Принимаемые внутрь антибиотики вызывают дефицит витамина К в организме за счет подавления активности бактериальной микрофлоры. После назначения высокой дозы пенициллина наблюдалась тромбоцитопения, нарушения функций тромбоцитов, удлинение тромбинового времени.

Анальгетики (нестероидные противовоспалительные, антиревматоидные, жаропонижающие препараты), содержащие ацетилсалициловую кислоту, влияют на функцию тромбоцитов. Необратимое ингибирование циклооксигеназы вызывает подавление, вплоть до полного отсутствия, адгезии тромбоцитов. Другие анальгетики (индометацин, фенилбутазон, диклофенак) подавляют агрегацию тромбоцитов в меньшей степени, чем аспирин.

Подбор антикоагулянтов

Материалом для коагулологических исследований является плазма (рис. 69).

Для получения плазмы или крови для лабораторных исследований используют противосвертывающие вещества (табл. 11). Согласно стандарту для производителей DIN ISO Standard 6710 коммерческие пробирки с антикоагулянтом метятся цветом крышки: пробирки с ЭДТА закрыты крышкой светло-лилового (лаванды) цвета, пробирки с гепарином - зеленой, пробирки с цитратом - синей крышкой.

Трехзамещенный цитрат натрия обладает специфической способностью стабилизировать

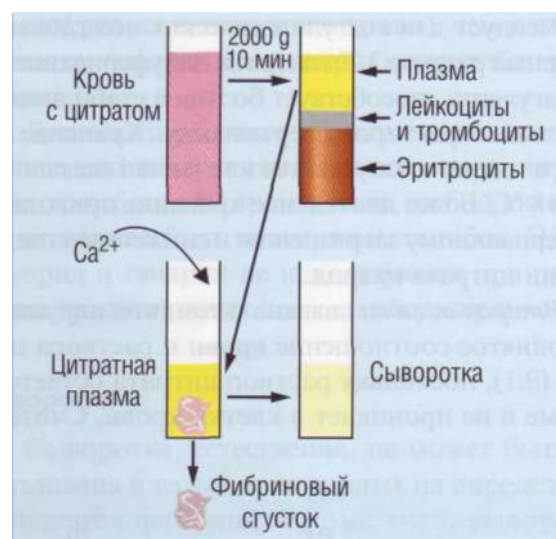


Рис. 69. Получение фракций крови для проведения коагулологических исследований

лабильные факторы свертывания (V и VIII). Цитратная плазма, обогащенная 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.

Кровь смешивают с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. На этом этапе могут быть допущены три ошибки.

Первая ошибка - неточность приготовления раствора стабилизатора. Важно учесть, что трехзамещенный 5,5-водный цитрат натрия готовится в концентрации 3,8% (0,11 моль), а 2-водный - в концентрации 3,2% (0,11 моль). Американский Комитет Стандартизации Клинических Лабораторий

Таблица 11

Применение и механизм действия антикоагулянтов

Антикоагулянт	Механизм действия	Применение
Цитрат натрия (Na ₃ C ₆ H ₆ O ₇ × 2H ₂ O)	Обратимое связывание ионов Ca ²⁺	Исследование системы свертывания (объем крови/объем антикоагулянта – 9:1)
Оксалат натрия или калия	Обратимое связывание ионов Ca ²⁺	Используется редко, 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
Гепарин	Стимуляция связывания тромбина с антитромбином и ингибирование свертывания крови	Биохимические и гормональные исследования, маркеры опухолей. Вызывает такие комплексные изменения, что невозможно оценить состояние гемостаза
Флуорид натрия	Связывание ионов Ca ²⁺	Определение глюкозы, подавляет гликолиз в тромбоцитах

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

рекомендует для коагулологических исследований буферный раствор 3,2% цитрата. Забуферивание антикоагулянта способствует большей стабилизации лабильных факторов свертывания. Хранение раствора цитрата допускается в течение 1 недели при +2...+8 °С. Более длительное хранение приводит к бактериальному загрязнению и снижению концентрации цитрата натрия.

Вторая ошибка связана с тем, что нарушается принятое соотношение крови и раствора цитрата (9:1), поскольку раствор цитрата остается в плазме и не проникает в клетки крови. Считает-

ся, что в пределах разведения крови цитратом 9:1 и 12:1 практически нет различий в результатах коагулологических тестов. Большое количество антикоагулянта по отношению к плазме может вызвать удлинение ПВ и АЧТВ (рис. 70).

Такая ситуация может возникнуть, когда в приготовленную заранее пробирку с цитратом набрано слишком мало крови (рис. 71).

Аналогичная ситуация возникает при разном гематокрите (рис. 72): гематокрит в пределах между 0,25-0,55 (25-55%) несущественно влияет на результаты, при гематокрите свыше 60%



Рис. 70. Влияние разведения крови антикоагулянтом на протромбиновый тест (ПТ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Разведение крови антикоагулянтом сопровождается удлинением ПВ (снижение ПТ) и АЧТВ, при разведении меньшем, чем 8:1, это приводит к регистрации ложноположительного результата



Рис. 71. Взято недостаточное количество крови в антикоагулянт - типичная преаналитическая ошибка. Большое количество антикоагулянта по отношению к плазме может вызвать значительное изменение показателей коагулограммы



Рис. 72. Соотношение объема плазмы и раствора цитрата при разном гематокрите. При высоком гематокрите создаются условия избыточного количества антикоагулянта и слишком сильного разведения плазмы с получением результатов, соответствующих состоянию гипокоагуляции. Наоборот, при низком гематокрите есть высокая вероятность регистрации «ложной» гиперкоагуляции

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

создается избыточная концентрация цитрата в плазме, приводящая к «ложной» гипокоагуляции. Напротив, при снижении гематокрита (ниже 25%) обнаруживается «ложная» гиперкоагуляция, кровь при смешивании с цитратом в отношении 9:1 может свернуться в пробирке еще до исследования. Высокий гематокрит - физиологическая характеристика крови новорожденных, у взрослых высокий гематокрит возникает при полицитемиях (эритремиях), сердечной недостаточности.

Перерасчет объема стабилизатора в соответствии с гематокритным показателем позволяет избежать этой ошибки (табл. 12). Если же у больного нет значительного сгущения крови или, наоборот, анемизации, приемлемо стандартное соотношение крови и цитрата (9:1).

Таблица 12

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

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 закрыть ее крышкой (не резиновой) или чистой полиэтиленовой пленкой и 2-3 раза медленно перевернуть (не встряхивая).

Для рекальцификации к цитратной плазме добавляют определенное количество хлорида кальция. Причиной изменения времени свертывания может стать несоответствие добавляемого кальция содержанию цитрата: коагулологические исследования являются более чувствительными к избытку кальция в плазме (высокий

гематокрит, слишком мало крови), чем к его недостатку (низкий гематокрит, слишком много крови).

Для некоторых тестов рекомендуются специальные антикоагулянты. При исследовании функции тромбоцитов практически любой антикоагулянт может быть источником ошибок. ЭДТА, флуорид и гепарин не используются при проведении традиционных тестов коагулограммы.

Сыворотка

Сыворотка, естественно, не может быть использована в тестах, основанных на определении выпадения фибрина. Кроме того, сыворотка практически не содержит факторов II, V, VIII и XIII, которые удаляются со сгустком, в сыворотке частично сохраняются ф. VII, -IX, -X и -XII. Сыворотку можно использовать для исследования некоторых компонентов, на определение которых оказывают интерферирующий эффект компоненты плазмы, в частности, в сыворотке можно определять содержание продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ).

Хранение и центрифугирование

Кровь в пробирке необходимо тщательно перемешать, перевертывая пробирку, при этом не допускается образования пены. Нельзя трясти пробу, так как это может вызвать денатурацию белков и активацию тромбоцитов.

Сразу же после взятия крови происходит изменение активности компонентов системы свертывания и фибринолиза. В пробе, не закрытой пробкой, возрастает pH из-за потери CO₂. Следствием этого является увеличение времени свертывания. На стабильность pH пробы влияет буферная система эритроцитов, а также использование буферных растворов цитрата. В пробе крови, хранящейся при комнатной температуре и 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.

Согласно международным рекомендациям срок доставки проб в лабораторию (ARUP Laboratories, 2002) для исследования показате-

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

лей гемостаза **не должен превышать 45 минут** после взятия крови у пациента. Стабилизированную кровь до центрифугирования (в том числе и в процессе транспортировки) хранят при комнатной температуре (+18... +25 °С). Транспортировка крови на большие расстояния и ее частое встряхивание искажают результаты исследования. Кровь нельзя хранить во льду (что делается в некоторых клиниках), так как это может привести к холодовой активации фактора XII (процесс запускается через контактную фазу и развивается достаточно часто) и вызвать значительные изменения функции тромбоцитов.

Центрифугирование для получения плазмы должно проводиться при ускорении 1500-2000 g в течение 10 минут, при этом получается плазма, «бедная» тромбоцитами. Если пробы необходимо заморозить перед проведением теста, то после размораживания рекомендуется повторно отцентрифугировать пробу и работать с супернатантом. Это делается для удаления остатков разрушенных тромбоцитов, фосфолипидов и белков их мембран, которые могут влиять на некоторые коагуляционные тесты.

Проверка исследуемых образцов перед выполнением тестов

Проверка образцов крови или плазмы перед проведением коагуляционных тестов позволяет избежать многих ошибок, связанных с преаналитическими погрешностями.

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. В зависимости от степени свертывания коагуляционные тесты могут быть укорочены, нормальны или удлинены.

Гемолиз может произойти при хранении не-отцентрифугированной крови или после центрифугирования. В таких тестах результаты варьируют в зависимости от степени гемолиза. Если гемолиз присущ *in vivo*, что подтверждается взятием нового образца, то тесты могут выполняться для оценки гемостатической ситуации. Если гемолиз произошел после взятия крови, то такие образцы следует отбросить, чтобы не получить ложных результатов.

Тесты для оценки сосудистого и тромбоцитарного компонентов гемостаза

Традиционные тесты на исследование сосудистого и тромбоцитарного компонентов гемостаза, в том числе пробы на резистентность (ломкость) капилляров, пробы на длительность и величину капиллярного кровотечения, подсчет тромбоцитов в камере, изучение размеров тромбоцитов в мазке, визуальные методы на

спонтанную и индуцированную агрегацию, хорошо известны и представлены во многих пособиях. В настоящем изложении остановимся только на относительно новых методах, отработанных на новой лабораторной технике, поступающей в клиничко-диагностические лаборатории.

Время кровотечения

Время кровотечения - это время от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови. Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов и взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой. Время кровотечения не выявляет всех тромбоцитарных нарушений (такого метода вообще не существует), этот скрининговый тест позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного ге-

неза, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки. После выявления патологии нет необходимости повторять это исследование, нужно использовать более чувствительные и специфичные методы. У этого метода есть серьезные недостатки: Метод плохо стандартизуется. Результаты

теста позволяют лишь предположить наличие тех или иных нарушений.

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Низкая чувствительность. Отсутствие удлинения времени кровотечения не всегда позволяет исключить нарушения тромбоцитарного или сосудистого звеньев гемостаза. Низкая специфичность не позволяет однозначно интерпретировать результаты метода.

Однако это наиболее доступный метод для выявления нарушений взаимодействия тромбоцитов с сосудистой стенкой. Кроме того, это дешевый метод, позволяющий заподозрить нарушения соответствующего звена гемостаза и решить вопрос о необходимости дальнейших углубленных исследований.

Динамический анализ функции тромбоцитов

Новым подходом в лабораторной диагностике является имитирование тромбоцитарного гемостаза на приборе PFA-100® (фирма «Dade Behring», Германия). В PFA-100 в измерительном картридже цитратная кровь пропускается через капилляр диаметром 150 мкм, моделирующий микрососуд, покрытый пленкой из коллагена/адреналина или коллагена/АДФ (рис. 73-74). Это сопровождается образованием тромбоцитарной пробки, что оценивается по перфузионному давлению. Остановка перфузии фиксируется как «время окклюзии сосуда». Метод позволяет эффективно с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять дефицит фактора Виллебранда, функциональные нарушения тромбоцитов, вызванные аспирином, наследственные и приобретенные нарушения адгезии и агрегации тромбоцитов. С применением

2 агонистов (индукторов агрегации) возможно селективное выделение аспириновых тромбоцитопатий. По типу измерения PFA-100 является динамическим агрегометром.

На практике трудно наработать материал с первичным нарушением гемостаза, чтобы установить референтные значения теста, так как больных с однородными нарушениями достаточно мало. При тромбоцитопатиях, вызванных длительным приемом антитромбоцитарных препаратов, очень много различных вариантов изменений первичного гемостаза. Тем не менее метод позволяет выявлять ранние признаки нарушений первичного гемостаза и, по-видимому, имеет большие перспективы для внедрения в коагулологические лаборатории и лаборатории экспресс-диагностики.



Рис. 73. Динамический агрегометр PFA-100. Он позволяет наблюдать *in vitro* за процессом закупорки сосуда при моделировании этого процесса в специально созданном картридже. Образование тромбоцитарной пробки оценивается по перфузионному давлению

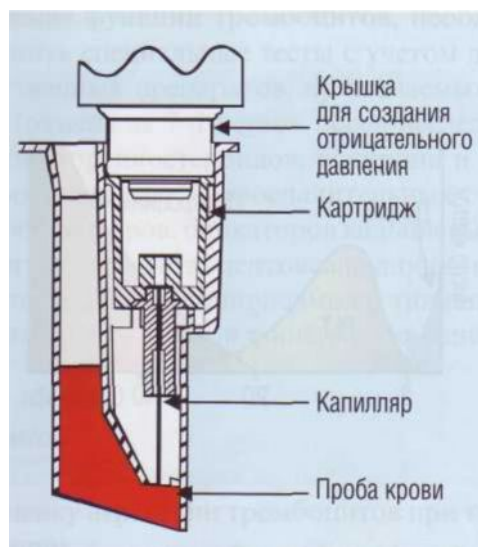


Рис. 74. Датчик динамического агрегометра PFA-100 содержит капилляр, моделирующий микрососуд. В цельной крови, проходящей по капилляру, активируется образование сгустка. На стенках нанесен коллаген и адреналин или АДФ, которые являются первичной причиной запуска гемостаза

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Тромбоцитарные показатели

Число тромбоцитов (Platelets, PL, PLT)

При подсчете на автоматических анализаторах тромбоциты распознаются по размерам в диапазоне 2-20 фл (рис. 75). Автоматические счетчики позволяют получать достаточно надежные результаты по количеству тромбоцитов. При подсчете тромбоцитов в камере Горяева коэффициент вариации составляет 7-15%, тогда как автоматический подсчет воспроизводится с точностью до 2-4%. Современные анализаторы сигнализируют (флагируются на бланке) о выходе количества тромбоцитов за референтные пределы, наличии агрегатов тромбоцитов, макротромбоцитов или других элементов, сравнимых по объему с тромбоцитами (микроэритроциты).

Ложное занижение числа тромбоцитов может быть при их агрегации, агглютинации под действием тромбоцитарных агглютининов и при прилипанию тромбоцитов к лейкоцитам (тромбоцитарный «сателлитизм»). При подсчете на гематологических анализаторах в качестве антикоагулянта используется ЭДТА. При наличии аутоантител к тромбоцитам калиевая соль ЭДТА инициирует агрегацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией.

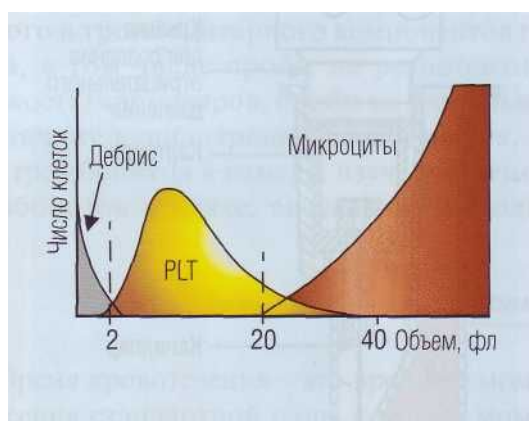


Рис. 75. Гистограмма тромбоцитов, которая изображается при представлении результатов счета клеток крови на гематологических анализаторах. Помимо гистограммы, гематологические анализаторы представляют результаты подсчета количества тромбоцитов (PLT), среднего объема тромбоцитов (MPV), дисперсии распределения тромбоцитов по объему (PDW), тромбоцитокрита (PCT)

Средний объем тромбоцита (MPV)

У здоровых людей MPV равен 6-12 фл и находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов. Такое соотношение определяет постоянство тромбоцитарной массы в циркулирующей крови. MPV увеличивается с возрастом; отмечено, что у мужчин MPV несколько выше, чем у женщин.

Использование ЭДТА в качестве антикоагулянта вызывает изменение формы тромбоцитов от диска к сфере, что приводит к увеличению MPV на 10-12% в течение 2 часов, а затем показатель существенно не меняется. Под действием цитрата натрия MPV может уменьшаться или увеличиваться, а при высокой концентрации (1:4) - не изменяться со временем. Кроме типа применяемого антикоагулянта и времени от момента взятия пробы до исследования, на MPV оказывает влияние температура окружающей среды. Преходящее увеличение MPV отмечается у рабочих, контактирующих с асфальтовыми испарениями, органическими растворителями. MPV - важный диагностический показатель функции тромбоцитов. Причины изменения MPV представлены в табл. 13.

Таблица 13

Причины изменения MPV

Увеличение MPV	Уменьшение MPV
Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура	Цитостатическая, лучевая терапия
Сахарный диабет	Спленомегалия
Гипертиреоз	Апластическая анемия
Хронические обструктивные заболевания легких (гипоксия)	Миелодиспластический синдром
Табакокурение	Мегалобластная (В ₁₂ -фолиево-дефицитная) анемия
Септицемия	Цирроз печени
Талассемии	Заболевания, сопровождающиеся нарушением функции печени
Преэклампсия беременных	
Предродовой период	
Спленэктомия	
Восстановительный период после цитостатической миелосупрессии	

Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (PDW)

PDW - показатель, являющийся мерой гетерогенности размеров (анизоцитоза) тромбо-

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

цитов. Величина PDW в среднем составляет 10-15%.

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 ее 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 тромбоцитопоэза), 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).

PDW может применяться для дифференциальной диагностики. Так, увеличение PDW выше 10,5% было обнаружено у 50% больных эссенциальной тромбоцитемией, у 21% пациентов с реактивным тромбоцитозом и лишь у 14% здоровых людей.

Тромбоцитокрит (PCT)

PCT - показатель, характеризующий процент тромбоцитарной массы в объеме крови: вычисляется суммированием прямо измеренных объе-

мов 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, 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. Также было отмечено, что 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, аденоблокаторов, блокаторов кальциевых каналов, антиагрегантов: пентоксифиллина, папаверина, теофиллина, дипиридамола, тиклопидина, антибиотиков - пенициллина, карбенициллина).

Агрегация тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов исследуют на агрегометре с использованием индукторов агрегации. Требования к пробам критичны. Исследование агрегации проводят на плазме, богатой тромбоцитами (ПБТ, английская аббревиатура PRP). Желательно использовать ПБТ, содержащую примерно 200 клеток/нл. Это требование затруд-

няет 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 повыша-

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

ется прозрачность плазмы и, следовательно, увеличивается поток проходящего через кювету света (рис. 76). Изменение светопропускания регистрируется в виде кривой.

Агрегация с АДФ

Характер агрегации тромбоцитов при индукции АДФ зависит от дозы. Как правило, при концентрации 0,5-1 мкмоль возникает обратимая агрегация, при концентрации до 5 мкмоль - двухфазная агрегация, при большей концентрации (до 10 мкмоль) - необратимая однофазная агрегация (или агрегация, при которой неразличим переход от 1-й до 2-й волны).

При связывании на поверхности тромбоцитов АДФ с рецептором происходит изменение формы тромбоцитов, экспозиция на мембране комплекса GPIIb-IIIa (рецептор для фибриногена) и первичная Ca-зависимая агрегация. Если первичный ответ на АДФ не будет поддержан вторичной реакцией, то в отсутствие фибриногена происходит десенситизация рецепторов, которая приводит к дезагрегации тромбоцитов. Вторичная агрегация опосредована внутриклеточной передачей сигнала через G-белки с повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Происходит активация простагландин-тромбоксановой системы, развивается секреция из α -гранул vWF, β -тромбоглобулина, тромбоспондина, фибронектина и других активных компонентов, развивается вторичная агрегация.

Выяснение путей АДФ-активации тромбоцитов позволило использовать в клинике антиагрегационные соединения. Оказалось, что тиклопи-

дин и клопидогрель селективно ингибируют активацию G-белка, АДФ-агрегацию и активность стимулированной аденилатциклазы.

Агрегация с адреналином

Особенности агрегации с адреналином в значительной степени обусловлены концентрацией Ca^{2+} в среде. При физиологических концентрациях Ca^{2+} (1-2 ммоль, которая характерна для плазмы крови) адреналин не вызывает активации тромбоцитов и их агрегации. При значительном снижении Ca^{2+} в цитратной плазме до 20-40 мкмоль адреналин вызывает дозозависимую агрегацию с экспрессией комплекса GPIIb-IIIa при первичной волне агрегации и ТХА₂-опосредованную вторичную волну (рис. 28).

По-видимому, в условиях организма прямая адреналиновая агрегация отсутствует, что связано с относительно высокой концентрацией Ca^{2+} в плазме и низкой концентрацией самого адреналина. Однако адреналин, очевидно, потенцирует действие других агонистов, что проявляется уже при его концентрации порядка 0,01 мкмоль. Поэтому при курении, стрессе и особенно кардиогенном шоке, когда уровень адреналина в крови повышается до 0,6 мкмоль, он становится существенным фактором внутрисосудистой агрегации тромбоцитов.

Агрегация с тромбином

Тромбин - очень сильный физиологический индуктор агрегации. Воздействие тромбина на тромбоцит опосредовано собственным рецепто-



Рис. 76. Принцип оценки индуцированной агрегации. А - до агрегации; Б - агрегация. После добавления индуктора агрегации и формирования агрегатов тромбоцитов происходит просветление суспензии

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

ром (рис. 20) и GPIIb/IIIa. Стимуляция тромбинового рецептора сопровождается активацией тромбоцитов через G-белок, фосфолипазы C и включение фосфоинозитольного механизма активации. Этот путь сопровождается быстрым увеличением концентрации цитозольного Ca²⁺ и секрецией α-гранул и электронно-плотных δ-гранул. Секретируемый из δ-гранул АДФ существенен для образования агрегатов, а выделяемые α-гранулами фибриноген, vWF, тромбоспондин - для их стабилизации. Оккупация молекулами тромбина высокоаффинных рецепторов GPIIb/IIIa приводит к перестройке фосфолипидной мембраны, стимуляции ее прокоагулянтной активности и повышению аффинности GPIIb/IIIa. В результате комплексной стимуляции тромбином практически не наблюдается двухволновой агрегации.

Агрегация с арахидонатом

Арахидоновая кислота в цитратной плазме вызывает дозозависимое изменение формы тромбоцитов, первичную и вторичную агрегацию. Арахидонат активирует тромбоциты без участия специфических рецепторов, проникая внутрь клетки, активируя свои метаболиты - ПГG₂,

ПГH₂ и тромбоксан. Эту особенность активации тромбоцитов арахидоновой кислотой используют для дифференциации нарушений, связанных с дефицитом пулов хранения и нарушениями в циклооксигеназном пути активации тромбоцитов.

Вид агрегатограммы зависит от типа и концентрации индуктора. Наиболее распространенные индукторы АДФ и адреналин используются в нескольких концентрациях. Форма агрегатограммы может быть несколько отлична на агрегометрах разных производителей, так как выводимый результат теста в определенной степени зависит от скорости и характера перемешивания, температуры, способа регистрации и некоторых других факторов.

Лекарственные средства, такие, как аспирин и другие нестероидные противовоспалительные препараты, антибиотики (3-лактамнового ряда, некоторые витамины, пряности могут быть причиной нарушенной агрегации. Из вышесказанного следует, что для адекватной оценки результатов теста требуется тщательная стандартизованная подготовка больных и стандартизация протокола аналитических процедур.

Болезнь Виллебранда и врожденные нарушения функции тромбоцитов легко диагностируются агрегатометрией (табл. 14).

Таблица 14

Изменения агрегатограмм при нарушениях функции тромбоцитов

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	↓
Синдром Бернара-Сулье	Н	Н	Н	Н	Н	Н/↓	Н	↓
Тромбоцитостения Гланцмана	↓	↓	↓	↓	↓	↓		+/-
Передозировка аспирина	↓	↓	↓	↓	↓	+/-	↓	+/-
Синдром серых тромбоцитов	↓	↓/↓↓	↓	↓	Н/↓	+/-	↓	+/-

Н - нормальная агрегатограмма, 4- - сниженная реакция на индуктор агрегации.

Клинический пример 2

Мальчик А. 6 лет. Обратился за помощью по поводу носового кровотечения. Со слов родителей - единственный ребенок в семье, имеющий геморрагические проявления в виде кожного гемосиндрома, гемартрозов и носовых кровотечений. Ребенок наблюдается по месту

жительства с диагнозом гемофилия А. При носовых кровотечениях и гемартрозах получает переливания цельной крови с положительным эффектом. При осмотре, помимо кровотечения из полости носа, выявлен кожный гемосиндром смешанного типа - гематомы, экхимозы, петехии и пурпурозные элементы. Для оказания экстренной помощи был введен концентрат фак-

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

тора VIII, после чего кровотечение остановилось, однако рецидивировало через несколько часов. С учетом характера кожного гемосиндрома диагноз гемофилии А вызвал сомнения. Необходимо было проводить дифференциальный диагноз между коагулопатией, болезнью Виллебранда и нарушением тромбоцитарного гемостаза. Было проведено коагулологическое обследование.

Исследования агрегации тромбоцитов в образцах цельной крови

Корпорация «Chrono-log» производит агрегометры, работающие на образцах цельной цитратной крови и использующие электронно-импедансный и люминесцентный методы детекции (рис. 77). Прибор регистрирует микротоки, протекающие в специальном электродном блоке, при погружении его в различные образцы - цельную кровь, плазму, богатую тромбоцитами (ПБТ), разведенную кровь или во взвесь отмытых тромбоцитов. Первоначальный контакт электродов с образцом приводит к образованию монослоя тромбоцитов. Затем при добавлении индукторов агрегации и других активных агентов происходит постепенная агрегация тромбоцитов на электродах, которая приводит к характерным изменениям электрических свойств системы.

Методом электронного импеданса можно проводить измерения агрегации в условиях, в

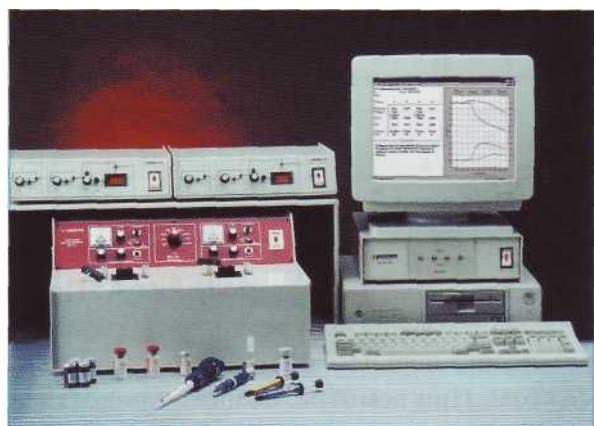


Рис. 77. Агрегометр «Chrono-log», исследующий агрегацию тромбоцитов на цельной крови электронно-импедансным методом

Результаты: время кровотечения значительно удлинено, количество тромбоцитов $150 \times 10^9/\text{л}$. ПТ-тест 155%, АЧТВ 31 с (норма 28-43 с), ф.УШ >200%, ф.1X 195%, ристоцетин-кофакторная активность 71%. Агрегация тромбоцитов с АДФ, коллагеном и адреналином отсутствует, агрегация тромбоцитов с аггристином нормальная. Данные обследования позволили поставить диагноз: **тромбастения Гланцмана.**

которых оптическая агрегация это сделать не может - в гемолизированных, иктеричных и липемичных образцах. Импедансная агрегометрия может быть использована с успехом при исследовании пациентов с синдромом гигантских тромбоцитов, где оптическая агрегометрия приводит к неправильным результатам.

Исследование агрегации на агрегометрах «Chrono-log» проводится очень быстро: для исследования агрегации в 5 мл цельной крови необходимо времени меньше, чем требуется для приготовления плазмы для коагулограммы. При этом методика позволяет выявить большинство видов дисфункции тромбоцитов. Высокочувствительный импедансный метод позволяет очень быстро и точно провести скрининг для выявления болезни Виллебранда на основе ристоцетин-агрегации цельной крови (рис. 78). Этот же подход помогает подтвердить синдром Бернара-Сулье у детей, быстро найти объяснение длительным кровотечениям у пациентов, принимающих различные противовоспалительные лекарства.



Рис. 78. Быстрая диагностика болезни Виллебранда и врожденных нарушений функции тромбоцитов на агрегометре «Chrono-log» с цифровым и графическим представлением результатов

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Наличие на агрегометре люминесцентного датчика позволяет одновременно с агрегацией тромбоцитов исследовать и другие процессы, например секрецию гранул.

В то же время практически все агрегометры корпорации «Chrono-log», как дополнение к импедансным и люминесцентным каналам, имеют оптические каналы для проведения классической (турбидиметрической) агрегометрии.

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 нативных элементов цельной крови, включая эритроциты и лейкоциты.

Тромбоэластография

Тромбоэластография (ТЭГ) - один из первых методов комплексной оценки гемостаза. Тромбоэластография была предложена еще в 1948 г. Гартертом (Hartert) и до настоящего времени остается единственным методом, который качественно и полуколичественно позволяет охарактеризовать процесс образования сгустка, его механические характеристики, плотность, стабильность и процесс фибринолиза. В настоящее время метод усовершенствован, он позволяет количественно оценить перечисленные параметры. Модификацию метода с использованием компьютерного анализа данных можно назвать тромбоэластометрией (ТЭМ). ТЭГ и ТЭМ могут быть использованы для исследования цельной крови, цельной крови с антикоагулянтами, богатой и бедной тромбоцитами плазмы с цитратом в качестве антикоагулянта.

Принцип ТЭГ: 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 колебания с одной поверхности начинают передаваться на другую и регистрироваться. Получающаяся кривая зависимости амплитуды колебаний от времени характеризует процесс свертывания крови, а позже фибринолиза (рис. 79).

Наиболее важной информацией, которую можно извлечь из кривой ТЭГ (рис. 80), 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 различных активаторов и реактивов позволяет достичь разных диагностических целей. В качестве дополнительных реактивов могут использоваться гепарин, фибринолитики или их ингибиторы. Изменения ТЭГ, которые отражают наиболее распространенные изменения гемостаза, представлены на рис. 81. Наряду с изменениями, вызываемыми лекарственными препаратами, ТЭГ позволяет идентифицировать тромбоцитопатию, гиперкоагуляцию и другие нарушения.

В настоящее время разработаны достаточно компактные тромбоэластографы, которые можно размещать на каталке около постели больного и оценивать процесс гемостаза немедленно после взятия крови, что существенно уменьшает влияние преаналитических факторов. Один из наиболее адаптированных к клиническим исследованиям тромбоэластографов «Rotem Gamma» показан на рис. 82.

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

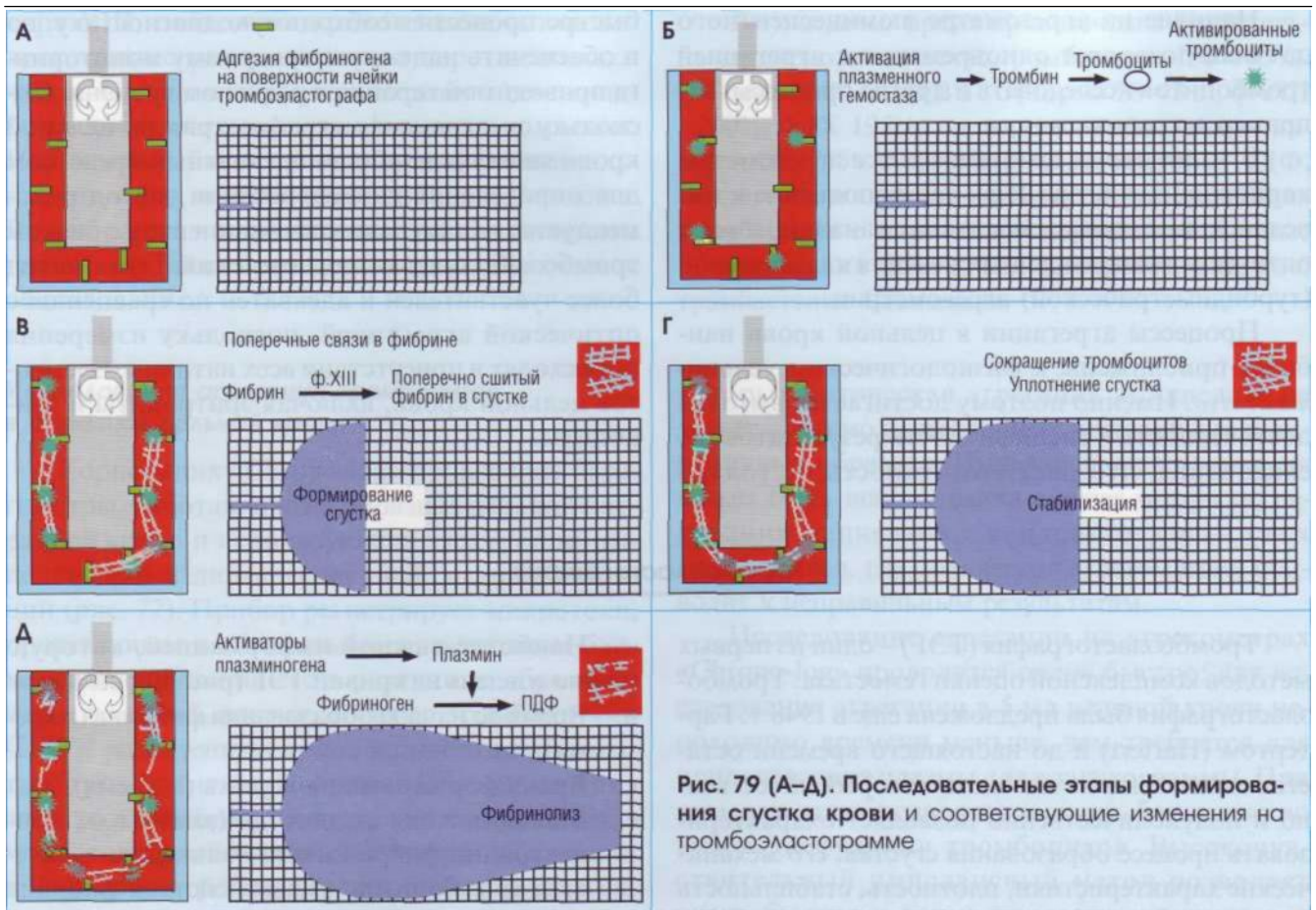


Рис. 79 (А–Д). Последовательные этапы формирования сгустка крови и соответствующие изменения на тромбозаграмме



Рис. 80. Тромбозаграмма

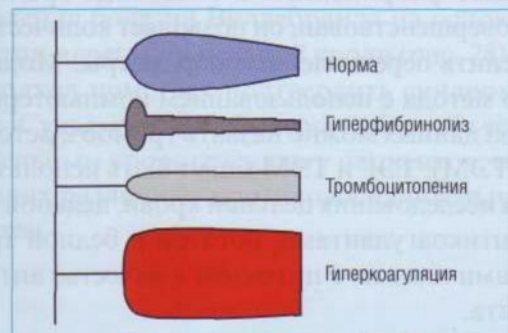


Рис. 81. Типичные примеры измененных ТЭГ



Рис. 82. Тромбозаграф «Rotem Gamma». Оценивает стадии образования, стабилизации и лизиса сгустка цельной крови. Прибор имеет 4 параллельных канала, может быть использован для оценки влияния лекарственных препаратов на свертывание крови

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Молекулярно-биологические методы

Высокоинформативным методом, сочетающим иммунохимические технологии с исследованием клеточных популяций, является **проточная цитометрия**. Проточная цитометрия 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. Тем не менее использование данной технологии для оценки гемостаза используется крайне редко, так как технология дорогая и требуется высококвалифицированный персонал, подготовленный в области проточной цитометрии и гемостазиологии.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) начинает внедряться в лаборатории, занимающиеся ге-

мостазом, в первую очередь наследственными нарушениями свертывания крови. Наследственные заболевания связаны с отсутствием или дисфункцией белков в результате мутаций в генах, кодирующих их синтез. Задачей молекулярно-биологических методов является выявление этих мутаций. Обширные молекулярно-генетические исследования проводятся при диагностике гемофилии А и В, а также болезни Виллебранда. ПЦР используется для выявления мутаций фактора V Лейден, протромбина 20210G→A, полиморфизма фактора XIII, дефицита AT, протеинов C и S и в других случаях. ПЦР и другие методы молекулярной и генной диагностики используются для выявления наследственных заболеваний, при которых нарушения гемостаза являются сочетанной формой патологии.

Эти методы играют очень важную роль в пренатальной диагностике, объектом для исследования может быть амниотическая жидкость или хорион, которые можно получить на 8-10-й неделе беременности. Этими исследованиями можно выявить гетерозиготное и гомозиготное носительство патологических генов.

Методические основы лабораторной оценки плазменного гемостаза

Коагуляционные методы

Коагуляционные, или клоттинговые, методы основаны на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания плазмы, до момента образования сгустка (выпадения фибрина). При постановке коагуляционных тестов необходимо перемешать плазму с реактивом до гомогенной суспензии и поддерживать стабильной температуру реакции. Коагуляционные тесты - в настоящее время наиболее распространенный методический подход для оценки плазменного гемостаза в клинико-диагностических лабораториях. Необходимо подчеркнуть, что коагуляционные методы являются скрининговыми, тем не менее на их основе сконструирован ряд методов для оценки активности факторов плазмы.

Ручные методы

Ручные методы обнаружения момента выпадения сгустка проводятся на водяной бане. Автоматическая регуляция температуры воды только частично решает проблему поддержания постоянной температуры. Частое вынимание пробирки во время исследования для наблюдения за появляющимся сгустком является причиной того, что температура реакции не соответствует температуре водяной бани. При визуальной оценке времени появления сгустка даже опытному лаборанту невозможно точно установить момент появления сгустка, что является главной причиной плохой повторяемости результатов. Однако следует помнить, что в ситуациях, в которых отсутствуют или подводят автоматические методы

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

(формируется неплотный сгусток), применение этого метода обоснованно.

Точность определения времени больше зависит от исследователя, чем от типа используемого в исследованиях секундомера. Удовлетворительной следует считать точность определения времени до 0,5 с. К недостаткам этого метода можно отнести длительность его выполнения и необходимость максимального внимания во время проведения исследования.

Автоматизированные коагулометры

Автоматизированные коагулометры существенно улучшили точность и повторяемость результатов коагуляционных тестов, уменьшили влияние человеческого фактора. В настоящее время имеется большой выбор различных приборов для исследования гемостаза, начиная от самых простых, в которых автоматизирован лишь процесс фиксации момента свертывания крови, до сложных машин, требующих лишь установить отцентрифугированные пробирки в штатив и задать программу исследований. В последние годы появляются биохимические анализаторы, в которых предлагаются программы для регистрации коагуляционных тестов методом турбидиметрии по резкому изменению светопропускания в момент свертывания плазмы. Все это значительно расширило возможности оценки гемостаза в клинико-диагностических лабораториях. В то же время исследование гемостаза по-прежнему предъявляет высокие требования к преаналитическому этапу, качеству подготовки проб, квалификации лаборантов, проводящих исследования.

В последние несколько лет в аналитическом подходе к оценке гемостаза, в том числе и из-за внедрения автоматизации, существенно повышены требования к стандартизации. 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 внутрिलाбораторного контроля качества, участия во внешнем и международном контроле качества и др. Наиболее ярким примером такого подхода является переход от определения нестан-

дартизованного протромбинового индекса к определению международного нормализованного отношения (МНО) при использовании аттестованного по международным стандартам тромбопластина (см. ниже). Однако многие коагуляционные методы плохо поддаются стандартизации, в том числе такой широко распространенный тест, как активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ).

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

Ограничения коагуляционных методов:

- Ограниченное время регистрации. Тест должен быть проведен в течение примерно 10-200 с. Это возможно далеко не для всех анализов.
- 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 клоттинговым методом.
- Метод чувствителен к различным неспецифическим внешним воздействиям. Например, исследование активности ф. VIII клоттинговым методом невозможно у пациента, получающего терапию гепарином или непрямыми антикоагулянтами, хотя ни те ни другие не оказывают непосредственного влияния на этот фактор.
- Метод малочувствителен для определения повышенной активности компонентов системы свертывания крови.
- 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, которые имитируют твердую фазу поверхности (каолин, целит), или физиологическими

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

(экстракты тканей, очищенные или рекомбинантные активаторы факторов свертывания). Несколько этапов свертывания требуют 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 учреждениях с высоким научным потенциалом часто применяются активаторы на основе змеиных ядов. Эти натуральные активаторы зачастую превышают по своим характеристикам даже высокоочищенные и рекомбинантные активаторы. Они бывают устойчивыми к действию ингибиторов и прямых антикоагулянтов, часто не требуют кофакторов и ионов Ca^{2+} . Однако использование таких активаторов ограничено высокой стоимостью и малой доступностью для практических лабораторий.

Механические коагулометры

Принцип работы механических коагулометров представлен на рис. 83. В одном из вариантов кювета с плазмой вращается в наклонном



Рис. 83. 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

положении. 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. Кроме того, они могут работать с цельной кровью. 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. Другой проблемой является формирование на шарике, мешалке или других устройствах, погруженных в кювету, белковых конгломератов, которые мешают регистрации.

Оптико-механические коагулометры

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. Принцип оптико-механического коагулометра представлен на рис. 84. 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, в принципе возможно исследовать свертывание плазмы с тромбоцитами.

Турбидиметрические коагулометры

Турбидиметрические коагулометры регистрируют момент свертывания крови по приросту оптической плотности (рис. 85). При свертывании плазмы происходит резкое изменение светопропускания или рассеивания. В коагулометре программируется, при каком приросте

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

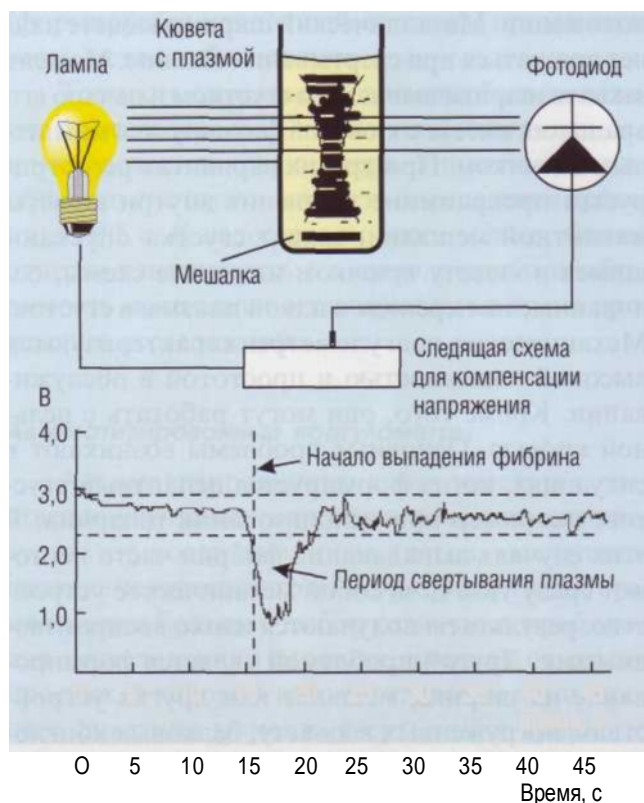


Рис. 84. Принцип регистрации выпадающего фибрина оптико-механическим коагулометром. Выпавшие в кювете нити фибрина меняют световой поток, падающий на фотодиод. Фотодиод связан через следящую схему компенсации с напряжением на лампе. В результате на лампу подается такое напряжение, которое меняет яркость свечения лампы, чтобы световой поток, попадающий на фотодиод, поддерживался в заданном диапазоне. По изменению напряжения на лампе регистрируется начало выпадения фибринового сгустка

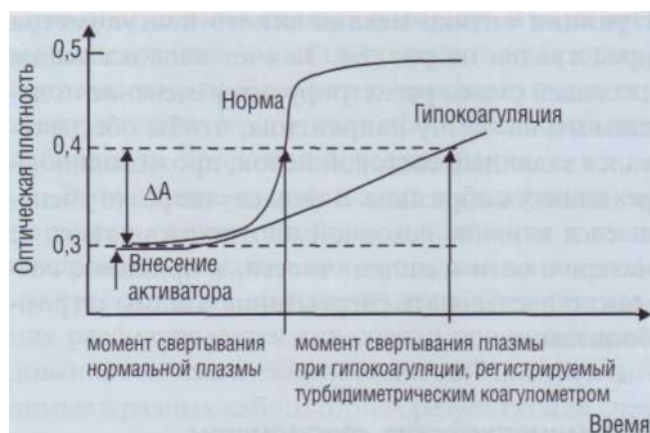


Рис. 85. Принцип регистрации момента образования сгустка турбидиметрическим коагулометром. При свертывании плазмы происходит резкое увеличение оптической плотности в фотометрической ячейке. Коагулометр определяет время от внесения активатора свертывания до момента изменения оптической плотности на ΔA (например, на 0,1 ед. оптической плотности)

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». Программы для исследования гемостаза стали использовать даже на многофункциональных планшетных фотометрах, в которых свертывание плазмы исследуется на стриппах или планшетах.

Основными преимуществами оптических систем измерения являются:

1. Более точные результаты измерений при низких показателях свертывания. Полностью исключена проблема «слабого сгустка».
2. Исключено загрязнение пробы, так как отсутствуют мешалки и другие механические компоненты.
3. Имеется возможность снижения объема пробы, так как не нужно место под механические компоненты (мешалки), это важно, особенно в педиатрии. Кроме того, уменьшает расход реагентов.
4. Эргономичность и удобство работы.

Типичным представителем этого семейства приборов является оптический двухканальный коагулометр KG-1 производства компании «Cognata» (рис. 86).

Нефелометрические коагулометры

Нефелометрические коагулометры определяют момент образования сгустка по изменению рассеяния света. Новейшие разработки в этой области технологий нашли воплощение в коагулометрах фирмы «Systex» (Япония), в которых используется принцип определения сгустка по боковому рассеиванию света (рис. 87). Метод рассеивания обеспечивает высокое качество анализов - высокую специфичность и чувствительность метода детекции сгустка даже для сложной липемичной или иктеричной плазмы.

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ



Рис. 86. Оптический двухканальный коагулометр KG-1 производства компании «Сорма». Точность результатов повышается за счет синхронизации времени попадания реагента в измерительную кювету и запуска отсчета времени, а также исключения из применения магнитных мешалок в измерительных кюветах. Прибор эргономичен, термостат для проб и реагентов размещен в самом приборе, у кювет есть перемычки и держатели для удобства переноса из термостата в измерительные ячейки. Работа на приборе экономна, так как снижен расход реагентов за счет уменьшения объема кювет, использования многоразовых кювет

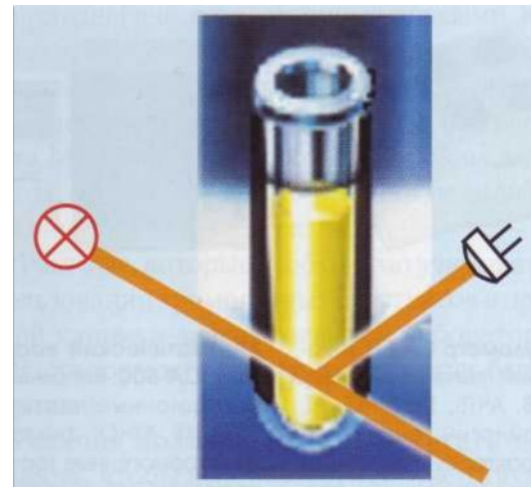


Рис. 87. Нефелометрический принцип измерения светорассеяния, заложенный в основу определения момента выпадения сгустка на коагулометрах фирмы «Sysmex» (Япония). Метод позволяет повысить точность измерений и их воспроизводимость до 2-3%, а также снизить влияние на результат самого образца. Анализаторы работают на любых реагентах (в том числе на российских)

В табл. 15 указаны преимущества и недостатки автоматизированных коагулометров, использующих разные принципы регистрации выпадающего сгустка.

Современные коагулометры сочетают в одном приборе несколько методов измерения, по-

этому могут использоваться для комплексной оценки гемостаза. Так, фирма «Sysmex» предлагает серию коагулометров с разными возможностями и производительностью для любой клинико-диагностической лаборатории любого уровня исследования гемостаза (рис. 88).

Таблица 15

Преимущества и недостатки различных методов обнаружения сгустка

Методы	Преимущества	Недостатки
Механический	Принципиальная возможность работы на цельной крови, высокая толерантность к типу используемых реагентов и пробирок, низкая стоимость анализаторов	Низкая чувствительность - нет детекции слабых сгустков, необходимо применять мешалки в пробах
Оптико-механический	Точность больше, чем в механическом методе, перемешивание пробы во время снятия показаний	Чувствительность ниже нефелометрического метода, необходимо применять мешалки в пробах
Турбидиметрический	Чувствительность выше предыдущих методов, низкая стоимость анализаторов	Чувствительность ниже нефелометрического метода
Нефелометрический	Высокая чувствительность, высокая точность измерения	Высокая стоимость прибора

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ



Рис. 88. Коагулометры фирмы «Sysmex»

Амидолитические методы с использованием хромогенных и флуорогенных субстратов

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, поэтому легко автоматизируются и могут выполняться на биохимических анализаторах как в клинико-диагностических, так и в научных лабораториях.

Принцип тестов с хромогенными субстратами представлен на рис. 89. Протеаза расщепляет короткоцепочечный пептид (из 3-10 аминокислот), к которому через эфирную связь пришит хромоген (в нашем случае паранитроанилин - рNA). Комплекс пептид-рNA имеет максимум поглощения в области короткого ультрафиолета, свободный рNA - при 380 нм. Итоговая концентрация рNA пропорциональна активности протеазы и определяется по увеличению поглощения светового пучка с длиной волны 405 нм.

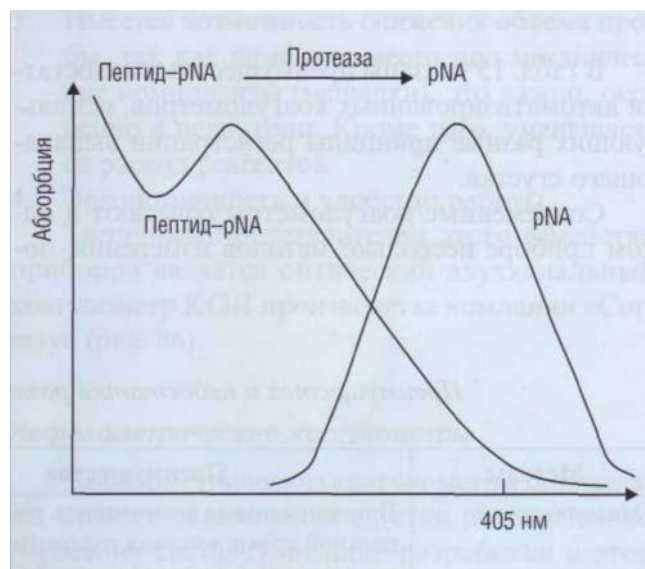


Рис. 89. Принцип определения активности протеолитического фермента (протеазы) с использованием хромогенного субстрата. Максимум поглощения паранитроанилина, связанного с пептидом, находится в области короткого ультрафиолета, а свободного паранитроанилина - 380 нм. При длине волны 405 нм поглощает практически только свободная форма хромогена, на этой длине волны проводится регистрация протеолитической реакции

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Для оценки активности факторов гемостаза стали использовать **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.

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 3 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 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:

- Растворимость субстратов должна быть хорошей.
- 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 приносит 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. Некоторые хромогенные субстраты, используемые для определения активности факторов свертывания, представлены в табл. 16.

Таблица 16

Типичные хромогенные и флуорогенные субстраты и ингибиторы, применяемые для выявления активности протеолитических ферментов системы гемостаза

Фермент	Субстрат	Наиболее важный ингибитор
Тромбин	CHG-Ala-Arg-pNA (Pefachrome [®] TH) CHG-Ala-Arg-AMC (Pefafluor [®] TH)	Гирудин (Pefabloc [®] TH-синтетический ингибитор)
Фактор Ха	CH ₃ OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA (Pefachrome [®] FXa) CH ₃ OCO-D-CHA-Gly-Arg-AMC (Pefafluor [®] FXa)	Антитромбин (Pefabloc [®] FXa-синтетический ингибитор)
Плазмин	Ala-HHT-Lys-pNA (Pefachrome [®] PL)	Апротинин, α ₂ -ингибитор плазмينا (Pefabloc [®] PL-синтетический ингибитор)
Тканевой активатор пламиногена (t-PA)	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA (Pefachrome [®] t-PA) Pyr-CHG-Arg-AMC (Pefafluor [®] t-PA)	PAI-1, апротинин (Pefabloc [®] t-PA/Ха-синтетический ингибитор)
Урокиназа (u-PA)	Ala-Gly-Arg-pNA (Pefachrome [®] u-PA) Ala-Gly-Arg-AMC (Pefafluor [®] u-PA)	PAI-1 (Pefabloc [®] u-PA-синтетический ингибитор)
Активированный протеин С	Pyr-CHG-Arg-pNA (Pefachrome [®] PCa 3297) Pyr-CHG-Arg-AMC (Pefafluor [®] PCa 3342)	Pefabloc [®] SP-синтетический ингибитор

Иммунохимические методы

Иммунохимические методы активно начали внедряться в клинико-диагностических лабораториях с целью исследования гемостаза в последнее десятилетие. Они 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. В современных клинико-диагностических лабораториях доступными стали иммунохимические методы для ручного и автоматизированного использования, основанные на латекс-агглютинации (рис. 90) и методе ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Латекс-агглютинация

Латекс-агглютинация выявляется визуально или на автоматизированных нефелометрах. Не-

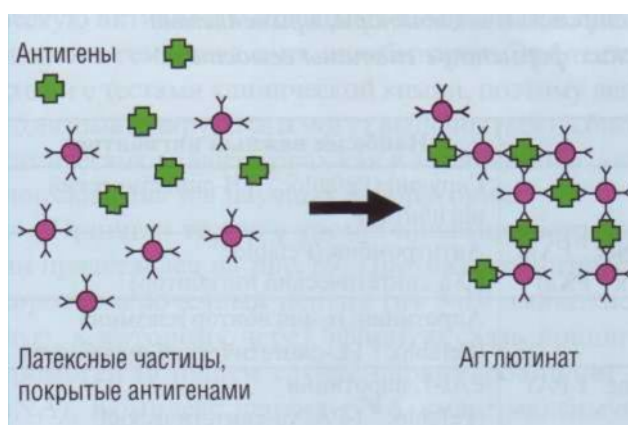


Рис. 90. Принцип латекс-агглютинации. Латексные частицы, покрытые антителами против фактора гемостаза, при взаимодействии с этим фактором (антигеном) образуют агрегаты, видимые визуально или регистрируемые на соответствующих приборах

достатком этого подхода является нелинейность оптического сигнала при турбидиметрическом и нефелометрическом методах регистрации.

Метод ELISA

Метод ELISA (рис. 91) для выявления концентрации факторов гемостаза, как правило, использует принцип «сендвича». На стенки микроплашки наносятся антитела к исследуемому фактору гемостаза (твердая фаза). После добавления плазмы происходит осаждение специфического антигена (белка системы гемостаза) на фиксированных антителах. Плашка промывается и заполняется вторичными антителами, взаимодействующими с этим же белком, но по другим эпитопам (антигенным структурам). Вторичные антитела конъюгированы с ферментом (ELISA), радиоактивной меткой (РИА), люминесцентной меткой (ЛИА). В тесте ELISA после отмывки несвязавшихся антител добавляется субстрат ферментативной реакции и хромоген. Изменение светопропускания раствора пропорционально количеству антигена (фактора), осажденного на фиксированных антителах. Методика позволяет оценить этот параметр количественно в концентрации <1 нг/мл, что достаточно для многих компонентов свертывающей системы.

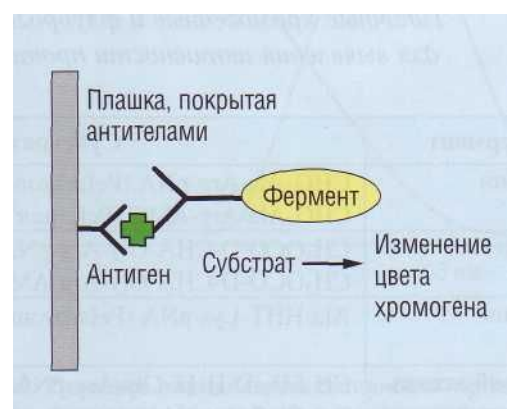


Рис. 91. Принцип ELISA. На плашке, покрытой антителами против фактора гемостаза, связывается антиген, проявляющие антитела, конъюгированные с ферментом, связываются с антигеном. Фермент меняет цвет хромогена пропорционально количеству антигена

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

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

Радиальная иммунодиффузия

Метод радиальной иммунодиффузии (РИД) основан на образовании колец преципитации в результате взаимодействия специфических антител, содержащихся в геле, с анализируемым антигеном, помещаемым в углубления стандартного размера (рис. 92). В результате диффузии в геле растворимых антигенов кольцо преципитации образуется в зоне оптимального соотношения антиген/антитело. Площадь, ограниченная кольцом преципитации, пропорциональна количеству антигена.

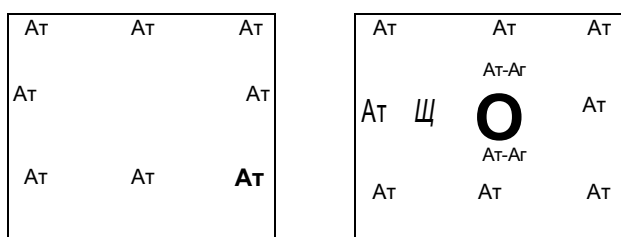


Рис. 92. Принцип метода радиальной иммунодиффузии,

используемый для полуколичественной оценки некоторых факторов гемостаза

«Ракетный» иммуноэлектрофорез

«Ракетный» иммуноэлектрофорез - иммунологический метод, сочетающий в себе электрофорез и иммунодиффузию (рис. 93). Метод дает возможность различить сходные по электрофоретической подвижности вещества с помощью специфической реакции преципитации между антигеном, помещаемым на гелевую (целлюлозо-ацетатную) пластинку, и соответствующими антителами, которые содержатся в ней. Длина «ракетных» иммунопреципитатов пропорциональна концентрации антигена. Метод довольно прост в исполнении и обладает относительно высокой точностью.

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

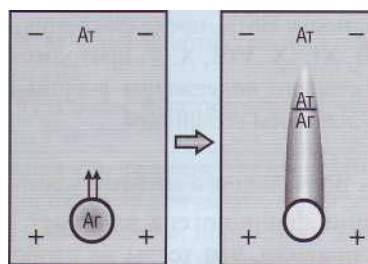


Рис. 93. Принцип метода «ракетный» иммуноэлектрофорез

Скрининговые тесты оценки плазменного звена гемостаза

Лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза является одной из самых дорогостоящих в лабораторной практике. Выполнение всех возможных тестов для уточнения характера нарушений для всех пациентов - практически недоступная задача. Поэтому чрезвычайно важно соблюдать этапность проведения тестов, исходить 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 для данной лаборатории, может отличаться от такового в дру-

гих лабораториях. Однако существует набор тестов, традиционно называемых (и рекомендуемых) скрининговыми для диагностики состояния системы гемостаза. Обычно к ним относят определение *времени кровотечения* и несколько тестов, оценивающих состояние плазменного звена гемостаза, которые входят как основной компонент в понятие **коагулограммы**. Наиболее полно этапность разработана для диагностики геморрагических нарушений. Скрининговые тесты:

- Время кровотечения.
- Количество тромбоцитов.
- АЧТВ.
- Протромбиновое время (по Квику).
- Тромбиновое время и/или фибриноген.

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Для пациентов с тромботическими заболеваниями адекватного скрининга для диагностики нарушений системы гемостаза не разработано. Имеет смысл проведение исследования наиболее значимых маркеров тромбофилии, о которых будет говориться ниже. Однако есть возможность контроля активности самого процесса патологического тромбообразования на основе анализа концентрации маркеров тромбообразования.

Скрининговые тесты на состояние внутреннего и внешнего каскада 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 внутреннего каскада свертывания плазмы является АЧТВ, на состояние внешнего каскада - ПВ. Их диагностическое значение представлено в табл. 17 и на рис. 94.

Несмотря на то что в тестах АЧТВ и ПВ участвует большинство плазменных факторов, далеко не во всех случаях при патологии того или иного звена или действии лекарственных препаратов эти показатели меняются (табл. 18). Коагулограмма - это комплексный анализ по многим тестам, совокупность которых может позволить определить конкретную причину нарушения свертывания крови.

Таблица 17

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, или АПТВ)	Протромбиновое время (ПВ)
Оценка активности ВМК, прекалликреина, факторов XII, XI, IX, VIII, X, V, протромбина и, в некоторой степени, содержания фибриногена*	Оценка активности факторов VII, X, V, протромбина и, в некоторой степени, содержания фибриногена*
Контроль за лечением гепарином	Контроль за лечением непрямыми антикоагулянтами (антагонистами витамина К)
Определение волчаночного антикоагулянта	

- Концентрация фибриногена начинает влиять на результаты тестов при снижении ее ниже определенного порога. Как правило, эти тесты не позволяют количественно определить фибриноген или заподозрить умеренное снижение его концентрации.

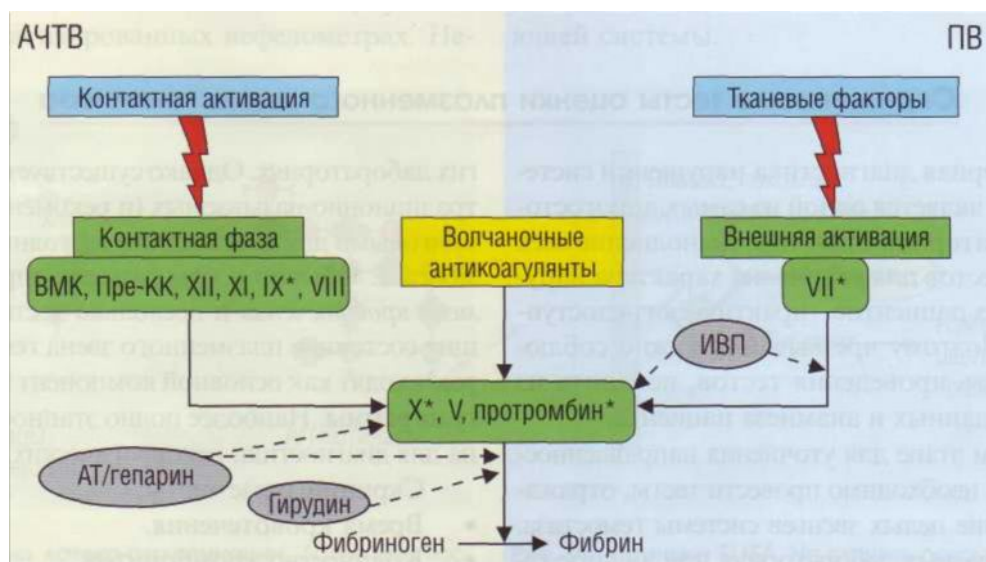


Рис. 94. Факторы, влияющие на результаты скрининговых тестов АЧТВ и ПВ. Звездочкой зависимые факторы, на которые влияют антикоагулянты непрямого действия

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Таблица 18

Изменение А ЧТВ 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	ПВ более чувствительно
Дефицит фактора VII	Удлинено	Норма	Подтип фактор 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 (зависит от реактивов)	Удлинено/не определяется	Влияние гепарина на АЧТВ зависит от использованных реактивов
Низкомолекулярный гепарин	Норма/граничные изменения	Норма/удлинено	Изменения АЧТВ зависят от использованных реактивов
Лечение непрямыми антикоагулянтами	Удлинено	Тенденция к удлинению	АЧТВ менее чувствительный показатель, чем ПВ
Гирудин в терапевтических дозах	Удлинено	Удлинено	АЧТВ более чувствительный показатель, чем ПВ
ДВС-синдром	Удлинено/норма	Удлинено/норма	Зависит от тяжести и стадии ДВС
Волчаночный антикоагулянт	Норма/удлинение	Изменено/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

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)

В названии АЧТВ (иногда его обозначают как активированное парциальное тромбопластиновое время, АПТВ) слово «частичное», или «парциальное», указывает на то, что в тесте используются реагенты, содержащие фосфолипиды, а не тканевые факторы (в этом отличие от ПВ, где используется тканевой тромбопластин). Факторы и взаимные влияния некоторых из них на АЧТВ представлены на рис. 95.

АЧТВ используется как скрининговый тест для оценки внутреннего каскада свертывания плазмы, скрининговой диагностики волчаночного антикоагулянта и слежения за антикоагулянтным действием гепаринов. АЧТВ - более значимый тест для первичного выявления патологии,

чем ПВ, так как выявляет относительно часто встречающуюся гемофилию А и В (дефицит факторов VIII и IX соответственно) и наличие волчаночного антикоагулянта.

Лабораторные условия, влияющие на АЧТВ

Нормальные значения теста АЧТВ зависят от используемых реактивов и приборов. Большое значение имеет преаналитическая стадия: принимаемые пациентом лекарственные препараты, правильность взятия крови, использованный антикоагулянт, условия хранения и транспортировки пробы и т. д. Охлаждение пробы ведет к активации контактной фазы *in vitro*. Стабильность

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

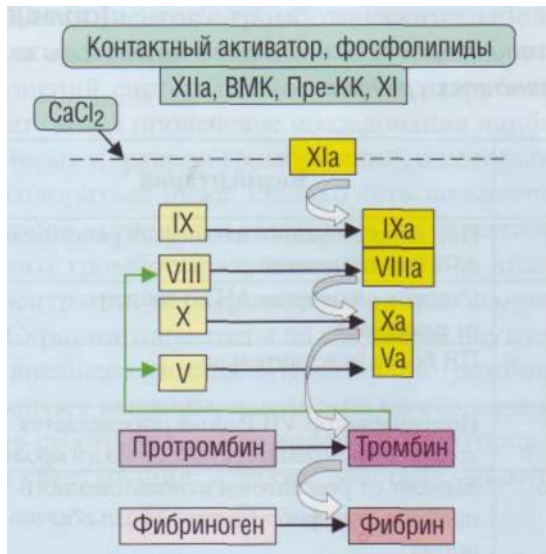


Рис. 95. Последовательные и взаимовлияющие реакции, определяющие значение активированного частично тромбoplastинного времени (АЧТВ)

пробы зависит от применяемых пробирок. Поэтому каждая лаборатория должна наработать собственные нормы. До настоящего времени практически нет системы межлабораторной стандартизации теста АЧТВ, приборная и реагентная база этого теста пока не поддаются стандартизации. 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.
- Должны 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.
- Выявлять наличие волчаночного антикоагулянта, для этого рекомендуется использовать, в частности, 2 набора с разной чувствительностью к волчаночному антикоагулянту.

Предпочтительно использовать готовые реактивы, что уменьшает ошибку оператора.

Время преинкубации в тесте АЧТВ имеет большое значение для выявления патологии гемостаза. При коротком времени от момента добавления активаторов (каолин и кефалин) до момента внесения CaCl_2 тест АЧТВ получается достаточно длительным и нестабильным. Опыт показывает, что 30 с преинкубации недостаточно, однозначные стабильные результаты гарантированно получаются после 600 с преинкубации. Однако такая длительная преинкубация нетехнологична. Общепринятой считается преинкубация 60 с, при которой нестабильность не приводит к искажениям результатов, которые бы значимо влияли на диагностические характеристики теста.

Тем не менее при дефицитной плазме по одному из факторов контактной фазы (XII, XI, прекалликреин, ВМК), особенно прекалликреину, длительная фаза преинкубации с активаторами создает условия для нивелирования результатов. Только при коротком периоде преинкубации в этих условиях удастся выявить дефицит фактора, при 60-минутной преинкубации часто дефицит факторов контакта не выявляется. Результаты будут ложно «нормальными», что ведет к ошибочному диагнозу.

Диагностическое значение АЧТВ

Укорочение А ЧТВ иногда определяется у больных с тромбофилией. Это может быть связано с резистентностью фактора V к активному протеину C, повышенным уровнем фактора VIII или активированных факторов свертывания. Однако чаще всего укорочение АЧТВ объясняется нарушениями работы с кровью на преаналитическом этапе.

Удлинение А ЧТВ происходит при:

- врожденном или приобретенном дефиците факторов II, V, VIII, IX, X, XI, XII, прекалликреина, ВМК;
- снижении активности ф-VIII на фоне болезни Виллебранда;
- лечении гепарином, гирудином или апротинином (ингибитор контактной фазы коагуляции);
- присутствии в крови ПДФ, волчаночного антикоагулянта;

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

- нарушении функции печени;
- коагулопатии потребления (ДВС-синдром);
- тяжелой дисфибриногемии или афибриногемии.

Важно подчеркнуть (обычно это не учитывается), что при хранении снижается стабильность пробы, особенно от больных, которым вводился гепарин. В результате резко увеличивается вариация данных АЧТВ, регистрируемых подряд из одной пробы.

Реактивы, используемые для постановки АЧТВ, не стандартизуются. Поэтому свойства реактивов должны быть известными, лучше пользоваться реактивами от одного производителя. 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 или синтетические, или выделенные из тканей животных (мозг кролика) или из сои. Лучшие результаты достигаются при использовании смеси разных фосфолипидов, включая отрицательно заряженный фосфатидилсерин. Вид и концентрация фосфолипидов - более важный компонент для характеристики набора АЧТВ, чем компоненты контактной фазы активации. Стабилизация реактива обеспечивается в первую очередь ионной силой раствора и свойствами буферной системы, это во многом влияет на коагуляционные свойства АЧТВ-реактива.

Чувствительность теста АЧТВ к разным изменениям гемостаза в значительной мере связана со свойствами используемых в тесте реактивов. Большинство тест-наборов АЧТВ (но не все) чувствительно к снижению активности факторов VIII или IX. Однако умеренное снижение активности ф. IX может не вызывать удлинения АЧТВ при высокой активности ф. VIII, несмотря на наличие геморрагических проявлений у пациента. При дефиците 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, трав-

мах. Данный 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).

В присутствии ПДФ происходит значительное удлинение АЧТВ (рис. 96). Следует отметить, что ингибирующий эффект зависит от используемых реактивов для определения АЧТВ.

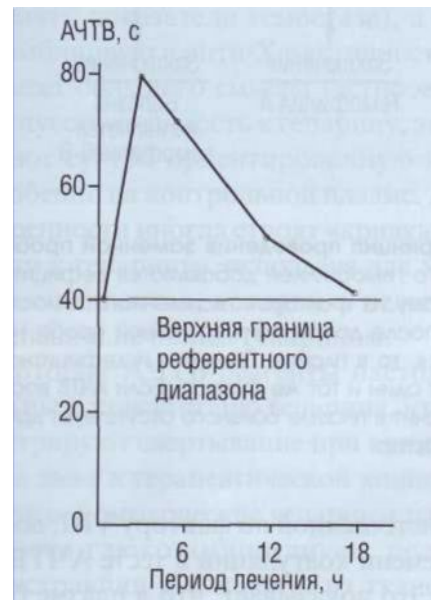


Рис. 96. Изменение АЧТВ из-за накопления ПДФ при лечении стрептокиназой тромбоза глубоких вен бедра. Удлинение АЧТВ значительно превысило референтный диапазон. Результат нельзя объяснить снижением активности отдельных факторов гемостаза. Эффект связан с прямым действием ПДФ на полимеризацию фибрин-мономеров

Выявление дефицита факторов с использованием принципа заменных проб

АЧТВ используется для выявления дефицита отдельных факторов плазменного гемостаза, для этого применяются *заменные пробы* с контрольными плазмами, дефицитными по конкретному фактору (рис. 97). Например, при гемофилии А (дефицит фактора VIII) тест АЧТВ с плазмой больного пациента будет соответственно удлинен. При добавлении к такой плазме контрольной

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

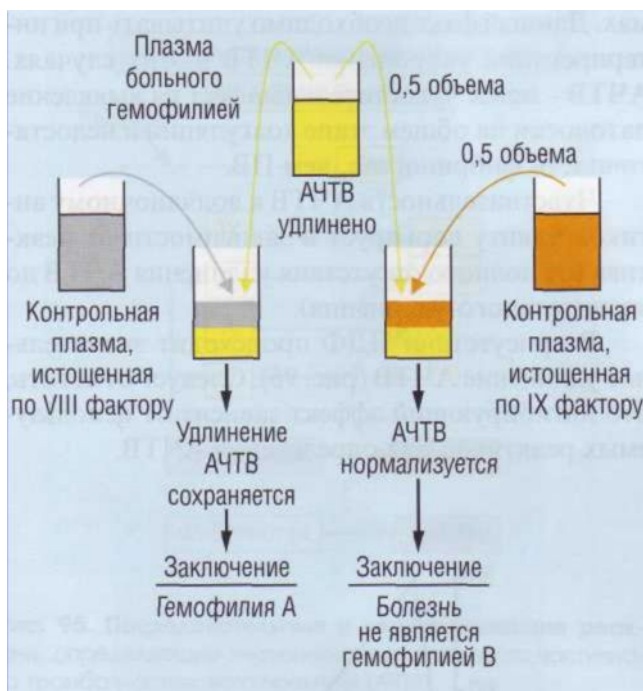


Рис. 97. Принцип проведения заменной пробы. К плазме больного гемофилией добавляются дефицитные плазмы по одному из факторов плазменного гемостаза. Если тест АЧТВ после добавления заменной пробы не восстанавливается, то в плазме больного и дефицитной плазме отсутствует один и тот же фактор. Если АЧТВ восстанавливается, значит в плазме больного отсутствует другой плазменный фактор

плазмы, истощенной по фактору VIII, восстановления времени коагуляции в тесте АЧТВ не произойдет. Это доказывает, что в плазме больного и в контрольной, истощенной по фактору VIII, отсутствует один и тот же компонент. Если же к плазме больного гемофилией А добавить плазму, истощенную по другому фактору (например, IX), то время свертывания в тесте АЧТВ восстановится до нормальных значений, так как в этой плазме присутствует фактор VIII, с недостатком которого было связано удлинение АЧТВ плазмы больного гемофилией А. Эта методика позволяет диагностировать дефицит того или иного плазменного фактора.

Использование АЧТВ для выявления волчаночного антикоагулянта

Волчаночный антикоагулянт может удлинять как АЧТВ, так и ПВ, однако тест АЧТВ, как правило, более чувствителен. В то же время эффект

волчаночного антикоагулянта в значительной степени зависит от состава фосфолипидов в реагентах. Принцип проведения теста АЧТВ в этом случае представлен на рис. 98. Если 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. Чувствительность к волчаночному антикоагулянту проявляют отрицательно заряженные фосфолипиды, поэтому тест зависит от реактивов. В некоторых лабораториях применяются 2 набора реактивов для теста АЧТВ, по-разному чувствительные к волчаночному антикоагулянту. В то же время присутствие волчаночного антикоагулянта отмечается у пациентов, склонных к тромбозам. Поэтому удлинение АЧТВ при наличии тромбоза сразу настораживает на присутствие волчаночного антикоагулянта.

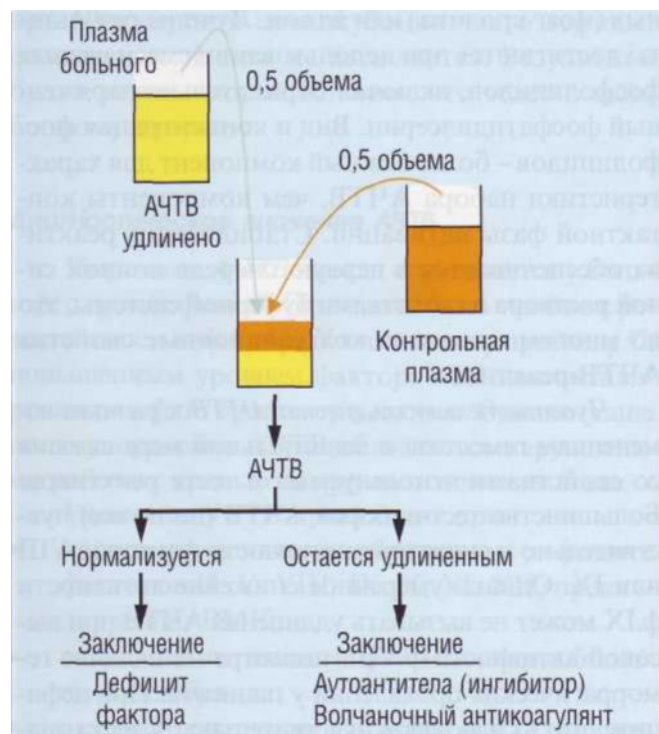


Рис. 98. Заменная проба на основе АЧТВ для дифференциальной диагностики между дефицитом фактора или присутствием ингибитора (волчаночного антикоагулянта) в плазме

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Трудность вызывает ситуация с транзиторным повышением волчаночного антикоагулянта при инфекции или лечении некоторыми препаратами, при которых нет клинических проявлений. Например, гепарин оказывает синергичный эффект с волчаночным антикоагулянтом, вызывая слишком сильное удлинение времени свертывания. В этом случае изменение АЧТВ будет указывать на передозировку гепарина. В то же время использование реактивов, нечувствительных к волчаночному антикоагулянту, покажет относительно адекватное изменение АЧТВ на вводимую дозу гепарина. Поэтому еще раз рекомендуем использовать для постановки АЧТВ реактивы с разной чувствительностью к волчаночному антикоагулянту.

Использование АЧТВ для контроля гепаринотерапии

Лечение гепарином контролируется тестом АЧТВ. Общепринято, что при использовании нефракционированного гепарина «терапевтический диапазон» достигается при удлинении АЧТВ в 1,5-2,5 раза. АЧТВ - тест более чувствительный к присутствию гепарина, чем ПВ, в то же время сильно зависит от качества применяемых реактивов. Это, вероятно, связано с тем, что реактивы при выполнении АЧТВ добавляются последовательно. Сначала вводится каолин и кефалин и проводится преинкубация в отсутствие ионов Са. В этот период происходит: 1) максимальная активация факторов XII и XI; 2) инаktivация антитромбином и гепарином следов тромбина и других активных факторов. Затем при добавлении Са практически отсутствует активирующий эффект тромбина на факторы VIII и V по механизму обратной связи. Если же в пробе не было гепарина, то активирующий эффект тромбина на факторы VIII и V сохранен. Такое же объяснение, по-видимому, справедливо к оценке действия гирудина, эффект которого также регистрируется тестом АЧТВ, но не ПВ.

Реактивы в тесте АЧТВ имеют разную чувствительность к гепарину и ингибитору внешнего пути (ИВП, TFPI), который повышается в пробах пациентов, леченных гепарином. Это приводит к тому, что при использовании малочувствительных гепаринов однотипное удлинение АЧТВ достигается при разных концентрациях гепари-

на, а при использовании высокочувствительных реактивов нетерапевтические малые дозы будут существенно удлинять АЧТВ-тест. Кроме того, сам гепарин имеет разные свойства, варьирует по размеру, степени очистки, активности *in vivo* и *in vitro*. У пациентов во время инфузии гепарин представлен нативной молекулой, а через некоторое время гепариноподобный эффект оказывают его дериваты, но уже с другой антикоагулянтной активностью. Причем продукты метаболизма гепарина по-разному влияют на нейтрализацию фактора 4 тромбоцитов (освобождается из тромбоцитов *in vivo* и *in vitro*, особенно при нарушениях преаналитического этапа, что может существенно изменять показатели гемостаза), а также на антитромбиновую и анти-Ха-активность. Поэтому не имеет большого смысла тестировать реактивы на чувствительность к гепарину, эти результаты дают сугубо ориентировочную информацию, особенно на контрольной плазме. Для большей уверенности иногда строят «кривую чувствительности к гепарину», используя для этого пул-плазму от пациентов, которые в недавнем прошлом успешно лечились гепарином.

Некоторые АЧТВ-реагенты настолько чувствительны к присутствию гепарина, что вообще не регистрируют свертывание при концентрации гепарина даже в терапевтической концентрации. Кроме того, коммерческие гепарины разные. Гепарин - это глюкозаминогликан, получаемый путем экстракции в основном из тканей легких крупного рогатого скота или свиньи или из слизистой оболочки кишечника быков. Слабо очищенная фракция - это *нефракционированный гепарин*, он имеет молекулярную массу от 5000 до 30 000 Да, в основном ингибирует тромбин и фактор Ха. С недавнего времени стали широко использовать низкомолекулярный гепарин (НМГ), который получают из нефракционированного гепарина путем энзиматической и химической дегградации. Сравнительные характеристики нефракционированного и фракционированного низкомолекулярного гепарина представлены в табл. 19.

Контроль за лечением низкомолекулярным фракционированным гепарином

Контроль за лечением низкомолекулярным фракционированным гепарином рекомендуется на

Сравнительная характеристика нефракционированного и низкомолекулярного гепарина

	Низкомолекулярный гепарин	Нефракционированный гепарин
Молекулярная масса (Да)	3000–5000	5000–30 000
Удлинение АЧТВ	+	++++
Удлинение тромбинового времени	+	++++
Реакция теста анти-Ха	++++	++
Изменение агрегации тромбоцитов	+	++++
Связывание с эндотелином	+	++
Липопротеинлипазная активность	+	++++
Клинические проявления кровоточивости	++	+++

основе теста анти-Ха (единица измерения - анти-Ха-МЕ/мл), ставить который следует перед очередным введением препарата. Тест анти-Ха заключается в измерении оставшегося Ха с использованием специфического хромогенного субстрата (табл. 20).

Контроль лечения гирудином

АЧТВ применяется для контроля лечения гирудином. Гирудин - антикоагулянт слюны медицинской пиявки. Это полипептид, состоящий из 65 аминокислот, имеющий молекулярный вес около 7000 Да. Гирудин - высокоспецифичный ингибитор действия тромбина, он необратимо блокирует активные центры тромбина и центры связывания тромбина на фибриногене. Тем самым блокируется переход фибриногена в фибрин. Гирудин не взаимодействует с АТ, он действует как прямой ингибитор свертывания крови. Передозировка гирудином может привести к тяжелым кровотечениям. После подкожного или внутривенного введения гирудин быстро распределяется по кровотоку и межклеточному пространству. Он не метаболизируется печенью, а выводится через почки, период полувыведения у здоровых людей от 60 до 120 минут. Особенно тщательно контроль за применением гирудина следует проводить у больных с нарушением почечной функции, при ожирении и у детей. Гирудин показан у больных с гепарин-индуцированной тромбоцитопенией.

АЧТВ-реактивы существенно отличаются по чувствительности к выявлению антикоагулянтного эффекта гирудина. Многие наборы регистрируют «эффект плато» с гирудином, т. е. при увеличении дозы гирудина не удлиняется АЧТВ, что может быть условием передозировки гирудина.

АЧТВ-реактивы существенно отличаются по чувствительности к выявлению антикоагулянтного эффекта гирудина. Многие наборы регистрируют «эффект плато» с гирудином, т. е. при увеличении дозы гирудина не удлиняется АЧТВ, что может быть условием передозировки гирудина.

Терапевтический диапазон анти-Ха при терапии фракционированным гепарином

Препарат	Показания	Дозировка	Анти-Ха (МЕ/мл)
Фрагмин, фраксипарин	Профилактика венозного тромбоза – умеренный риск	2000–2500 МЕ п/к 1 раз в сутки	Мониторинг не требуется
Ловенокс, клексан	Профилактика венозного тромбоза – высокий риск	4000–5000 МЕ п/к 1–2 раза в сутки	0,2–0,4
Дальтепарин, ревивипарин, эноксипарин	Интенсивная терапия при инфаркте миокарда, венозных и артериальных тромбозах	100–120 МЕ/кг веса п/к 2 раза в сутки	0,3 МЕ/мл до инъекции, через 3–4 ч после инъекции <1,5 МЕ/мл
	Экстракорпоральное кровообращение, гемодиализ <4 часов	Болус 3000–6000 МЕ	≈1,0
	Экстракорпоральное кровообращение, гемодиализ >4 часов	Болус 2000–3000 МЕ + 1000–1500 МЕ/ч	≈1,2

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Скрининговый тест на основе АЧТВ для оценки антикоагулянтной активности протеина С

Антикоагулянтная активность протеина С, связанная с ингибированием активных факторов VIIa и Va, рассматривается в последнее время как один из основных физиологических барьеров против тромбоза. Поэтому определение резистентности к активированному протеину С (РАПС) - один из самых первых подходов при выявлении индивидуального риска тромбоза. Наиболее ре-

альным скрининговым тестом для определения РАПС является постановка АЧТВ в условиях предварительной активации протеина С активатором из змеиного яда с фирменным названием Protac® (см. ниже). Чувствительность теста к фактору Лейден и дефициту протеина С близка к 100%. Тест с Protac® может нарушаться также при наличии волчаночного антикоагулянта, мутации протромбина 20210G→A или повышенной активности ф.УШ:С (> 150%).

Протромбиновое время

Протромбиновое время (ПВ) - широко используемый скрининговый тест для оценки внешнего каскада свертывания плазмы. ПВ обычно используется для определения активности ф.УП, контроля за лечением непрямыми антикоагулянтами, при скрининге системы гемостаза, редко для количественного определения фибриногена (в автоматических коагулометрах, имеющих специальную программу).

ПВ удлиняется при:

- дефиците факторов VII, X, V, протромбина и фибриногена, в том числе при тяжелых заболеваниях печени, при наличии аутоантител против факторов свертывания. Чувствительность к недостатку протромбина и фибриногена в тесте ПВ меньше, чем к недостатку других вышеперечисленных факторов;
- иногда в присутствии волчаночных антикоагулянтов.

Несколько типов реагентов для постановки ПВ используется в КДЛ:

• Рекомбинантные ПВ-реактивы

Рекомбинантный тканевой фактор, Ca²⁺, фосфолипиды, буфер, стабилизаторы.

• Тканевые тромбопластины

Экстракты тканей, богатые тканевым тромбопластином (печень, мозг кролика, быка, свиньи, плацента человека).

• Комбинированные тромбопластины

Тканевой тромбопластин, разведенный в растворе фибриногена быка; его целесообразно использовать при контроле за лечением непрямыми антикоагулянтами.

Реактивы могут отличаться по нескольким показателям: чувствительностью, реактивностью

к гепарину, разной активностью по свертыванию контрольной плазмы, характеризоваться межсерийными колебаниями. Свертывание в тесте ПВ не должно быть <10 с, особенно в тех случаях, когда определение проводится в относительных единицах или процентах. На результат протромбинового теста (ПТ) могут влиять патологические ингибиторы фосфолипид-зависимых реакций и ингибиторы полимеризации фибрина - продукты его деградации (ПДФ) или миеломные белки (парапротеины).

Для представления результатов ПВ в разное время предлагалось использовать:

- 1) время свертывания в секундах;
- 2) протромбиновый индекс (ПИ), который определяется как

$$ПИ = \frac{\text{время свертывания нормальной плазмы}}{\text{время свертывания плазмы больного}} \times 100\%;$$

- 3) протромбиновое отношение (ПО), которое определяется как

$$ПО = \frac{\text{время свертывания плазмы больного}}{\text{время свертывания нормальной плазмы}};$$

- 4) ПТ по Квику - % от нормы, которая определяется по калибровочному графику;
- 5) международное нормализованное отношение (МНО), которое представляет собой ПО, возведенное в степень Международного индекса чувствительности (МИЧ):

$$МНО = ПО^{МИЧ}.$$

Первые три выражения, хотя и представляются в виде цифр, но из-за отсутствия калибровки являются, по сути, качественными показате-

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

лями с неопределенным масштабам. Кроме того, существенным недостатком определения протромбинового времени в секундах является низкая воспроизводимость из-за использования нестандартизованного тромбопластина. Поэтому нельзя сопоставлять результаты у одного пациента, полученные в разных лабораториях, на разных приборах или с тест-наборами разных серий. Выражение ПИ в процентах не несет смысловой нагрузки и путает врачей, так как между количеством факторов и измерением ПВ в секундах нет прямой пропорциональной зависимости.

Два последних выражения для ПВ являются взаимодополняющими.

Протромбиновый тест (ПТ) по Квику

Методика выполнения ПТ-теста была предложена Квиком (Quick A.J. и соавт.) в 1935 г. и состоит в определении времени свертывания цитратной плазмы после добавления тромбопластина и Ca^{2+} .

В тесте протромбиновое время по Квику для перевода времени свертывания в % факторов протромбинового комплекса строится калибровочный график с использованием разведений стандартной плазмы. График имеет форму логарифмической зависимости. Для вычислений вручную можно использовать линелизацию графика (рис. 99) 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). Недостатком этого метода калибровки ПВ является то, что разведе-

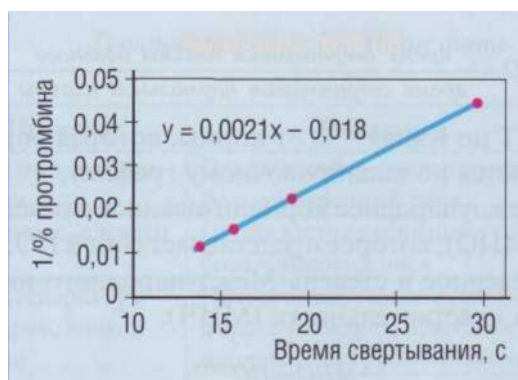


Рис. 99. Линелизация калибровочного графика протромбиновое время по Квику в координатах «1/% протромбина» - время

ние 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 (непрямых антикоагулянтов) концентрация факторов может быть близкой к норме, но их функциональные свойства существенно изменены. Поэтому ПВ по Квику рекомендуется использовать при постановке коагулограммы для выявления механизмов нарушения свертывания крови.

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 собой серьезную проблему, которая окончательно не решена до настоящего времени. Две основные причины обуславливают сложность проблемы. Во-первых, в тесте активируется ряд последовательных и взаимовлияющих реакций, и суммарная скорость зависит от многих параметров (рис. 100). Во-вторых, время свертывания нормальной и, что исключительно важно, патологической плазмы значительно варьирует в зависимости от источника и метода получения тромбопластина.

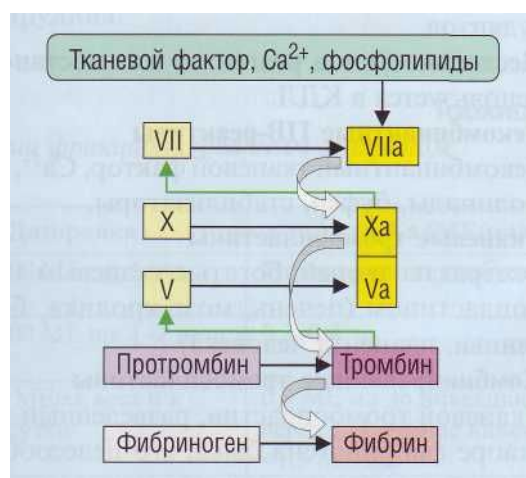


Рис. 100. Последовательные и взаимовлияющие реакции, определяющие суммарную активность протромбинового теста (ПТ)

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Протромбиновое время, выраженное через международное нормализованное отношение (МНО)

Современные коагулометры программируются на вычисление МНО. Стандартизованный протромбиновый тест был разработан Международным комитетом по стандартизации в гематологии и Международным комитетом по тромбозу и гемостазу и принят ВОЗ в 1983 г. В его основе лежит наличие линейной зависимости между логарифмами протромбинового времени, определенными с разными тромбопластинами. На практике это означает, что значения ПО, определенные с использованием разных тромбопластинов, 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 стандартом 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, сравнивая ее с эталоном тромбопластина, чувствительность которого принята за единицу.

МНО рассчитывают по формуле:

$$\text{МНО} = \left(\frac{\text{ПВ пациента}}{\text{ПВ нормальной плазмы}} \right)^{\text{МИЧ}}$$

Контроль за лечением непрямыми антикоагулянтами

При приеме непрямого антикоагулянта меняются как внешний, так и внутренний пути активации протромбиназы, однако эффект непрямого антикоагулянта в большей степени сказывается на внешнем каскаде, и соответственно больше меняется ПВ, чем АЧТВ.

При терапии непрямыми антикоагулянтами использование МНО позволяет оценивать степень гипокоагуляции независимо от используемого тромбопластина, сравнивать результаты, полученные разными лабораториями. Для конт-

роля за терапией непрямыми антикоагулянтами рекомендуется использовать тромбопластины со значениями МИЧ ниже 2 (лучше 1,0-1,2).

Ограничения использования МНО

Имеются достаточно значительные ограничения в использовании МНО в лабораторной практике:

- МНО не может использоваться на начальном этапе лечения непрямыми антикоагулянтами, так как существующие различия между разными тромбопластинами вносят слишком большие флуктуации на этом этапе, которые не могут быть компенсированы производителями реагентов.
- МНО не используется для контроля и мониторинга состояния внешнего каскада активации протромбиназы в общей популяции пациентов, не принимающих непрямого антикоагулянта. В этом случае нужно использовать ПТ, различия в определении которого сохраняются между разными лабораториями.

Комментарии по поводу разных способов выражения ПТ-теста представлены в табл. 21.

Интерпретация результатов

ПВ удлинено (ПИ снижен, ПО и МНО повышены) - врожденный дефицит факторов II, V, VII, X, хронические заболевания печени с нарушением функции, дефицит витамина К (холестаз, мальабсорбция, дисбактериоз), лечение антикоагулянтами непрямого действия, гипофибриногенемия (менее 0,5 г/л), дисфибриногенемия и нарушение полимеризации фибрина, ДВС-синдром, присутствие ингибиторов свертывания (гепарин, ПДФ).

ПВ укорочено (ПИ увеличен, ПО и МНО снижены) - состояние гиперкоагуляции, массивное поступление тканевого тромбопластина в кровоток (травма, некроз), повышенная свертываемость во время беременности и после родов.

Выявление дефицита факторов с использованием принципа заменных проб в тесте ПВ

Клоттинговый метод определения активности ф. VII основан на использовании заменных

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Таблица 21

Способы выражения протромбинового теста

Выражение, единицы	Расчет	Комментарий
Время свертывания, секунды		Очень сильно зависит от реагентов, приборов, способа регистрации
Протромбиновый индекс (ПИ), %	$ПИ = \frac{\text{время свертывания нормальной плазмы}}{\text{время свертывания плазмы больного}} \times 100\%$	ПИ в % не несет смысловой нагрузки, так как между количеством факторов и измерением ПВ в секундах нет пропорциональной зависимости
Протромбиновое отношение (ПО)	$ПО = \frac{\text{время свертывания плазмы больного}}{\text{время свертывания нормальной плазмы}}$	Зависит от реагентов, приборов; сравнивать ПО, измеренное в разных лабораториях, практически невозможно
ПТ по Квику – % от нормы	Определяется по калибровочному графику, который строится путем разведения стандартной плазмы (100% протромбина) в соотношении 1:1 (50% протромбина), 1:2 (33% протромбина), 1:3 (25% протромбина), 1:4 (20% протромбина)	Тест не стандартизован, однако рекомендуется для оценки состояния факторов внешнего пути активации плазменного гемостаза
Международное нормализованное отношение (МНО)	$МНО = ПО^{МНЧ}$	Рекомендуется использовать при контроле лечения непрямыми антикоагулянтами

проб с плазмой, лишенной ф.УП. Метод аналогичен определению активности других факторов

в тесте АЧТВ, однако при анализе активности ф. VII используется тест ПВ.

Тромбиновое время

Тромбиновое время (ТВ) - скрининговый тест на полимеризацию фибриногена/фибрина и на антикоагулянтную активность в плазме. ТВ регистрируется по свертыванию плазмы при добавлении к ней низкой или средней концентрации тромбина (бычьего или человеческого). ТВ определяется в основном количеством и качеством фибриногена и присутствием антикоагулянтов в плазме. Если в плазме присутствует гепарин, то комплекс гепарин-анти-тромбин быстро нейтрализует добавленный тромбин и ТВ будет удлиняться. Среди скрининговых тестов ТВ - наиболее чувствительный тест на присутствие гепарина. В то же время известно, что чувствительность к гепарину у ТВ зависит от рН, ионной силы тест-системы, свойств тромбина (происхождение и степень очистки), т. е. в значительной степени определяется составом набора реагентов.

Увеличение ТВ происходит также в присутствии относительно высокой концентрации про-

дуктов деградации фибрина (ПДФ), наблюдаемой при назначении тромболитической терапии, при ДВС-синдроме, заболеваниях печени и при дисфибриногемиях. Результат определяется не только общим количеством ПДФ, но и их составом. Непрямые антикоагулянты не влияют на результаты теста.

Иногда удлинение ТВ наблюдается в присутствии аутоантител к тромбину или парапротеинов при миеломной болезни, которые препятствуют полимеризации мономеров фибрина. Ингибиторами полимеризации фибрин-мономеров могут быть IgG или IgM, которые удлиняют как ТВ, так и рептилазное время. Аутотела к тромбину подавляют только ТВ и не влияют на рептилазное время.

К увеличению ТВ приводят: • снижение концентрации фибриногена менее 0,5 г/л (врожденная или приобретенная гипофибриногемия);

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

- качественные изменения молекулы фибриногена (дисфибриногенемия);
- присутствие физиологических (гепарин) и патологических (ПДФ, моноклональные белки) ингибиторов тромбина и фибринообразования;
- наличие парапротеинемии, уремии, в некоторых случаях волчаночных антикоагулянтов.

Пределы нормальных значений ТВ зависят от условий постановки метода и должны определяться в каждой лаборатории самостоятельно. Тест не стандартизован, в разных лабораториях могут ис-

пользоваться разные концентрации тромбина. 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. Результаты во многом зависят от того, на каком коагулометре проводилось исследование - механическом или оптическом, но в любом исполнении характеризуются низкой воспроизводимостью.

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. 101) 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 часто определяют одновременно с ТВ (табл. 22).

базы. Рептилазное время удлиняется при афибриногенемии и при некоторых формах дисфибриногенемии, часто не параллельно ТВ и в присутствии относительно высоких концентраций ПДФ (при гиперфибринолизе).

Таблица 22

Тромбиновое и рептилазное время при различных состояниях

Состояние	Тромбиновое время	Рептилазное время
Гепаринотерапия	↑	Н
Наличие иммунных антитромбинов	↑	Н
Гипофибриногенемия (≤0,3 г/л)	↑	↑
Дисфибриногенемия	↑	↑↑
Наличие ПДФ	↑↑	↑

Нормальные значения рептилазного времени устанавливаются в каждой лаборатории, так как показатель зависит от реагентной и приборной

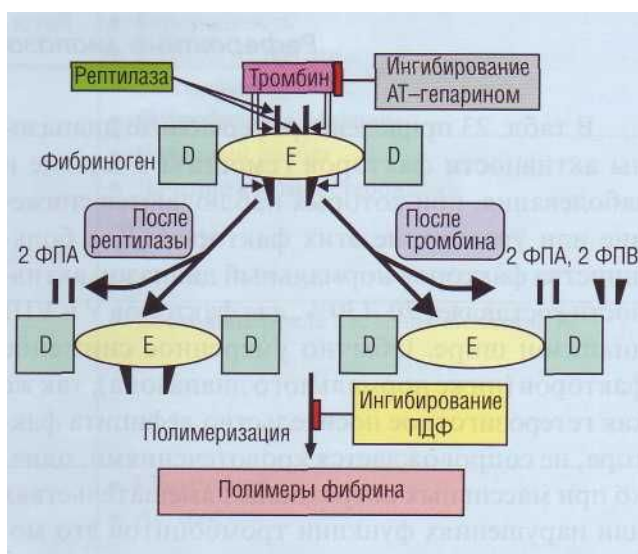


Рис. 101. Принцип и влияние факторов при постановке тестов тромбиновое время (ТВ) и рептилазное время. Тромбин оказывает комплексный эффект, рептилаза отщепляет от фибриногена только фибринопептид А (ФПА), на ТВ активно влияет АТ-гепарин, на рептилазное время гепарин не влияет, ПДФ за счет ингибирования полимеризации фибрин-мономеров удлиняют как ТВ, так и рептилазное время

Отдельные факторы гемостаза

В случае обнаружения патологических изменений АЧТВ и/или ПВ необходимо проводить дополнительные исследования с целью выяснения причины этих отклонений. Несмотря на то что за последнее время для определения отдельных факторов гемостаза были разработаны методы с использованием хромогенных субстратов (амидолитические методы), многие лаборатории продолжают пользоваться коагуляционными технологиями с использованием контрольных плазм, обедненных по определенному фактору. Дефицитные плазмы получают: 1) путем иммуносорбции отдельных факторов с добавлением других факторов, 2) от доноров, больных гемофилией с недостаточностью одного из факторов свертывания. Важнейшими качественными критериями наборов с дефицитной плазмой являются очень низкий или неопределяемый уровень од-

ного фактора, высокий уровень других факторов, наличие в наборе калибраторов с дробным содержанием фактора, чтобы можно было построить калибровочную кривую как в зоне с нормальным, так и патологическим содержанием фактора. Для получения калибровочной кривой возможно разведение калибраторов. Ведущие мировые производители выпускают калибраторы, тестированные относительно стандартов ВОЗ (там, где они имеются). Следует подчеркнуть, что далеко не любая комбинация дефицитной плазмы и тест-наборов на ПВ или АЧТВ дают схожие результаты, поэтому следует пользоваться рекомендациями фирм-производителей дефицитных плазм и тест-наборов. Качество дефицитной плазмы и чувствительность реагентов имеют существенное значение в определении дефицита факторов в клинике.

Референтные диапазоны содержания факторов

В табл. 23 приведены референтные диапазоны активности факторов гемостаза в плазме и заболевания, при которых наблюдаются снижение или увеличение этих факторов. Для большинства факторов нормальный диапазон активности составляет 70-130%, для факторов V и VIII диапазон шире. Обычно умеренное снижение факторов (ниже нормального диапазона), так же как гетерозиготное носительство дефицита фактора, не сопровождается кровотечениями, однако при массивных оперативных вмешательствах или нарушениях функции тромбоцитов это может быть решающим моментом развития геморрагического синдрома. Количественная характеристика факторов является значимой для диагностики гемофилии и лечения с использованием гемоконцентратов. Содержание факторов свертывания крови важно знать перед операцией у больных с заболеваниями печени, злокачественными опухолями, сепсисом, нефротическим синдромом, у пациентов, принимающих антикоагулянты непрямого действия, так как оператив-

ное вмешательство, особенно обширное, в этих случаях может привести к дополнительному потреблению проблемных факторов и развитию кровотечения. Технологией с использованием дефицитных плазм определяются все факторы, за исключением фибриногена и фактора XIII. Эта технология представлена в многочисленных пособиях по исследованию факторов гемостаза, поэтому в данной книге воспроизводиться не будет.

В последние несколько лет появился интерес к выявлению случаев повышения содержания отдельных факторов гемостаза, что объясняется обнаружением хотя и относительно невысокой, но достоверной корреляции между повышенным содержанием факторов II, VII, VIII, IX, XI и увеличенным риском тромбозов. Повышение активности факторов может быть зарегистрировано коагуляционными методами с применением технологии значительного разведения плазмы или методами с использованием хромогенных субстратов.

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Таблица 23

Диапазоны активности факторов гемостаза в плазме и клинико-диагностическое значение изменения активности факторов

Фактор	Нормальный диапазон активности (%)	Снижение активности (без наследственных заболеваний)	Повышение активности
Протромбин	70–130	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты витамина К • Дефицит витамина К • Патология печени • Антифосфолипидный синдром 	<ul style="list-style-type: none"> • Стадия гиперкоагуляции при ДВС • Состояние после операции • Мутация протромбина 20210G→A • После введения витамина К
V	65–150	<ul style="list-style-type: none"> • Гиперфибринолиз • Патология печени • ДВС-синдром • Злокачественная опухоль 	<ul style="list-style-type: none"> • Последний триместр беременности • Холестаз • Состояние после операции • При/после ДВС
VII	70–130	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты витамина К • Патология печени • Дефицит витамина К 	<ul style="list-style-type: none"> • Тромбофилия • Острый тромбоз • Инфаркт миокарда • Гипертриглицеридемия • Введение витамина К • Холодовая активация
VIII	50–150	<ul style="list-style-type: none"> • ДВС-синдром • Гиперфибринолиз • Дефицит фактора Виллебранда • Лечение вальпроиновой кислотой 	<ul style="list-style-type: none"> • Тромбофилия • Рекуррентный тромбоз • Опухолевый процесс • Беременность • Патология печени • Заболевания почек • Острофазовая реакция
IX	50–130	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты витамина К • Патология печени • Амилоидоз • Лечение вальпроиновой кислотой • Дефицит витамина К 	<ul style="list-style-type: none"> • Сахарный диабет • Лечение кортикостероидами
X	70–140	<ul style="list-style-type: none"> • Антагонисты витамина К • Патология печени • L-аспарагиназа • Амилоидоз • Дефицит витамина К 	<ul style="list-style-type: none"> • Состояние после введения витамина К
XI	70–130	<ul style="list-style-type: none"> • ДВС-синдром • Патология печени • Гиперфибринолиз 	<ul style="list-style-type: none"> • Гипертония • Астма
XII	70–130	<ul style="list-style-type: none"> • Тромбоз • ДВС-синдром • Гиперфибринолиз • Нephротический синдром 	<ul style="list-style-type: none"> • Диабет • Беременность

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

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 и др. Для дифференцирования дефицита факторов свертывания от присутствия специфического ингибитора или 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. Особенности проведения скрининговых тестов были описаны выше.

Исследование коррекции активности факторов свертывания проводится путем смешивания иссле-

дуемой плазмы с контрольной нормальной плазмой. Соотношения компонентов могут быть различными. Чаще применяется смешивание 1:1 (1 часть исследуемой плазмы / 1 часть контрольной), это соотношение удобно для подсчета и обладает неплохой чувствительностью. При низкой активности ингибитора можно использовать соотношение: 2 части исследуемой плазмы / 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 определить характер ингибитора (табл. 24).

Для более точной дифференциальной диагностики между истинным и вторичным дефицитом

Таблица 24

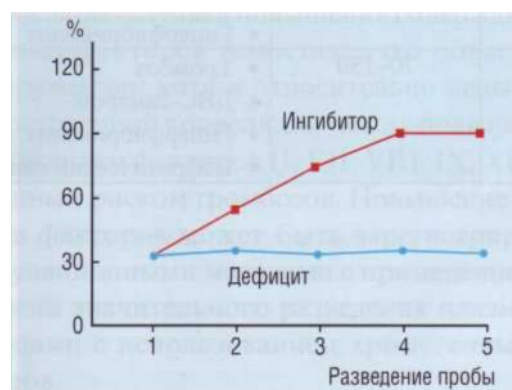
Дифференциальная диагностика врожденного дефицита факторов VIII и IX, специфического ингибитора и волчаночного антикоагулянта

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

можно провести пробу с разведением, по крайней мере, до 3 разных концентраций. 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 заблокированного состояния (рис. 102).

Рис. 102. 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



Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Определение фибриногена

Определение фибриногена - один из рутинных тестов коагулограммы, выполняемый разными методами.

Определение по Клауссу

Определение фибриногена по Клауссу считается наиболее адекватным тестом, выполняется на коагулометрах. Он основан на определении времени выпадения сгустка при добавлении очень высокой концентрации тромбина к разбавленной в 10-20 раз плазме. При этом логарифм времени выпадения сгустка прямо пропорционален логарифму концентрации фибриногена. В этих условиях критической для свертывания становится концентрация фибриногена. Калибровочная кривая показывает укорочение времени свертывания при увеличении концентрации фибриногена. Если время свертывания очень короткое (<5 с), то тест проводится на разведенной плазме. Гепарин не оказывает влияния на результаты определения фибриногена. Основными ограничениями метода определения фибриногена по Клауссу является чувствительность результатов к гипо-, дис- и гиперфибриногенемии, а также к ПДФ, которые влияют на процесс полимеризации фибрин-мономеров и могут быть причиной ложно низких результатов (рис. 103).

Турбидиметрический метод

Определение фибриногена по изменению мутности плазмы с использованием батроксоби-



Рис. 103. На результаты определения фибриногена по методу Клаусса могут оказывать влияние присутствующие в системе циркуляции продукты деградации фибриногена/фибрина (ПДФ), а также гипо-, дис- и гиперфибриногенемия

на широко используется на автоматических коагулометрах и клинических анализаторах. В ручном исполнении он малопригоден, так как изменение мутности нелинейное, необходимо кинетическое измерение пропускания. В частности, фирмой «Instrumentation Laboratory» (IL) разработан кинетический метод определения фибриногена на основе использования коммерческого тромбoplastина и неразведенной плазмы (*PT-Fibrinogen Recombinant*). Определено, что в турбидиметрическом тесте «протромбиновое время (ПВ)» скорость нарастания мутности (производная измерения мутности) при выпадении фибрина пропорциональна концентрации фибриногена в плазме. Фактически ставится турбидиметрический метод определения ПВ, и в этом же тесте определяется концентрация фибриногена. Однако для этого необходимо, чтобы прибор, регистрирующий изменение пропускания, имел возможность автоматически определять производную

$$\frac{dT}{dt}$$

В этом исполне-

изменения пропускания нии результаты менее подвержены влиянию ПДФ и дисфибриногенемиям.

Иммунохимические методы

Иммунохимические методы для фибриногена основаны на турбидиметрическом или нефелометрическом способах регистрации, использовании поликлональных антител и адаптированы на иммунохимические анализаторы. Как правило, для каждого иммунохимического анализатора применяется специфический тест-набор на фибриноген. Недостатком иммунохимических методов является то, что они не дифференцируют нативный фибриноген и продукты его деградации. Это особенно существенно при ведении больных на тромболитической терапии, обширных тромбозах и ДВС-синдроме, когда происходит значительное увеличение в плазме ПДФ.

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.

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Интерпретация результатов

Референтный диапазон для фибриногена в плазме в норме составляет 1,8-3,5 г/л (часто приводят значения 2-4 г/л), практически не зависит от возраста и пола. Печень синтезирует 2-5 г фибриногена в день, время полувыведения фибриногена из крови составляет около 4 дней.

Фибриноген - острофазный белок. Концентрация его может превышать 10 г/л при тяжелых бактериальных инфекциях, при травме и тромбозе. Повышение уровня фибриногена в острой фазе воспаления, как правило, имеет транзиторный характер. У курящих людей уровень фибриногена в плазме крови несколько выше, чем у некурящих. К значительному росту фибриногена приводят заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром), коллагенозы (ревматоидный артрит, узелковый периартериит), ночная пароксизмальная гемоглобинурия, новообразования (рак легкого).

При атеросклерозе наблюдается устойчивое увеличение фибриногена, трудно корригируемое лекарственными препаратами. В результате риск сердечно-сосудистых заболеваний повышается с возрастанием исходного уровня фибриногена в интервале 3,0-4,5 г/л. Обнаружено, что повышение уровня фибриногена в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями предше-

ствует развитию инфаркта миокарда и инсульта. Корреляция между уровнем фибриногена и развитием этих осложнений особенно четко прослеживается у пациентов молодого и среднего возраста. Определение уровня фибриногена - наиболее чувствительный тест для выявления бессимптомных стадий заболевания периферических артериальных сосудов.

Дисфибриногенемия - относительно часто встречающееся заболевание, причем это состояние может определяться несколькими мутациями, одни из которых не сопровождаются, другие сопряжены с кровотечениями, а при некоторых - развиваются тромбозы.

Снижение концентрации фибриногена в плазме наблюдается при врожденном дефиците фибриногена, печеночно-клеточной недостаточности, ДВС-синдроме, острых фибринолитических состояниях, поражениях костного мозга (лейкоз, опухолевые метастазы), при инфекционном мононуклеозе. Гипофибриногению могут вызвать такие лекарственные препараты, как вальпроат натрия, фибраты, фенобарбитал, стрептокиназа, урокиназа, L-аспарагиназа. Физическая перегрузка снижает фибриноген. Лекарственную дефибринизацию плазмы можно достичь, используя ферменты змеиного яда (Reptilase® или анкрод), которые применяются для улучшения реологии крови за счет снижения вязкости.

Определение фактора Виллебранда (vWF)

Определение vWF проводится в основном для:

- диагностики и последующего мониторинга врожденной или приобретенной болезни Виллебранда;
- диагностики тромбофилии;
- дифференциальной диагностики гемофилии А.

Имеется несколько методических подходов для диагностики болезни Виллебранда. Один из алгоритмов диагностики болезни Виллебранда представлен в табл. 25.

Концентрация vWF определяется методами иммунотурбидиметрии, ELISA, «ракетным» электрофорезом. Связывающая способность фактора Виллебранда с коллагеном определяется в мик-

роплашках, 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 ристомицином (Ристоцетин®). Метод с хромогенными субстратами в настоящее время рекомендуется использовать только как ориентировочный.

Алгоритмы дифференциальной диагностики приводятся в разделе, посвященном болезни Виллебранда.

Алгоритм диагностики болезни Виллебранда

Основные методы диагностики
<ul style="list-style-type: none"> • Время кровотечения • Число тромбоцитов • АЧТВ • Активность фактора VIII
Подтверждающие тесты
<ul style="list-style-type: none"> • Ристоцетин-кофакторная активность vWF • Антиген фактора Виллебранда (vWF:Ag) или определение vWF иммунотурбидиметрией • Ристоцетин-индуцированная агрегация тромбоцитов
Специальные тесты
<ul style="list-style-type: none"> • Коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда • Исследование мультимерного состава vWF • Определение тромбоцитарного vWF • Молекулярно-генетическая диагностика мутаций гена фактора Виллебранда методом ПЦР • <u>Определение с использованием хромогенного субстрата</u>

Определение фактора X с использованием хромогенного субстрата

Определение фактора X - один из самых распространенных методов с использованием хромогенных субстратов. Это объясняется тем, что по активности фактора Xa в последнее время все больше и больше контролируют антикоагулянтный эффект низкомолекулярных гепаринов (табл. 20). Появились предложения контролировать лечение непрямыми антикоагулянтами также с помощью определения фактора Xa.

В тесте используют фермент яда гадюки Рассела, активирующий фактор X (RVV-X - factor X activation enzyme from Russel viper venom), или яда гюрзы обыкновенной - лебетоксовый тест. Ак-

тивный фактор Xa определяют в прямой реакции с хромогенным субстратом, в частности с Pefachrome® FXa (фирма «DADE Behring Marburg GmbH», Германия). Принцип метода представлен на рис. 104.

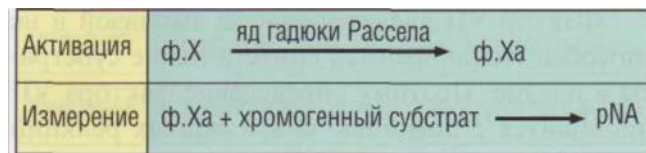


Рис. 104. Принцип определения содержания фактора X с использованием хромогенного субстрата. pNA-пара-нитроанилин. Измерение проводится при длине волны (λ) 405 нм фотометрическим методом

Определение фактора VIII с использованием хромогенного субстрата

Определение фактора VIII основано на том, что количество образующегося фактора Xa в реакциях активации плазменного гемостаза пропорционально содержанию фактора VIII в пробе (рис. 105).

Этот тест выполняет не только аналитическую функцию, но и характеризует функциональную активность, так как фактор VIIIa оценивается в присутствии физиологических кофакторов фосфолипидов и ионов Ca²⁺. Тест может выпол-

няться как на специализированных фотометрах для исследования гемостаза, так и на обычных фотометрах и биохимических анализаторах. Калибровочная кривая для этого теста, как правило, имеет линейный участок в широком диапазоне концентраций фактора VIII.

Исследование с хромогенными субстратами позволяет надежно количественно определять не только дефицит, но и избыток активности ф. VIII. Это позволяет диагностировать и прогнозировать

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

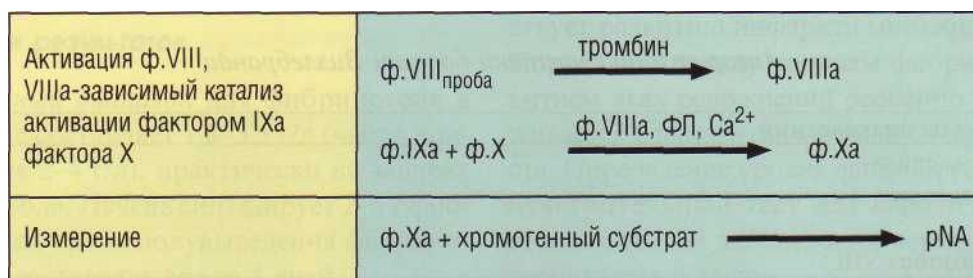


Рис. 105. Принцип определения содержания фактора VIII с использованием хромогенного субстрата. ФЛ - фосфолипиды

развитие патологических тромбозов, поскольку увеличение в плазме активности фактора VIII рассматривается как фактор тромбофилии.

Методические и аналитические моменты (образование комплекса между фактором VIII и фактором Виллебранда (vWF) в дефицитной плазме, разные типы фосфолипидов, использование плазмы или концентратов и т. д.) могут приводить к систематическим различиям результатов между коагуляционными методами и методами с хромогенными субстратами при определении фактора VIII.

Более того, одна технология может выявлять патологию, а другая свидетельствовать о нормальном содержании фактора VIII. Поэтому в настоящее время проводятся активные попытки стандартизации как коагуляционных, так и хромогенных методов определения фактора VIII. До введения стандартизации рекомендуется метод с хромогенными субстратами использовать только как ориентировочный и предпочтительно для оценки концентратов фактора VIII, а не с диагностическими целями.

Определение фактора VII с использованием хромогенного субстрата

Фактор VII является слабой амидазой и не способен гидролизовать синтетические субстраты в плазме. Поэтому определение фактора VII проводится с помощью сопряженных реакций (рис. 106).

Фактор VII в пробе активируется тканевым фактором, фосфолипидами и ионами Ca^{2+} . Образующийся комплекс ф. VII-ТФ-ФЛ- Ca^{2+} активирует фактор X, активную форму которого определяют тест-системой, аналогичной Pefachrome®. В то же время следует учитывать, что метод со-

пряженных реакций в случае определения фактора VII характеризуется существенным усилением сигнала, так как фактор VIIa приводит к активации не одного, а нескольких десятков молекул фактора X.

Соотношение коагуляционного и хромогенного методов. Коагуляционный метод не всегда позволяет достаточно точно оценить активность фактора VII в плазме. Это связано с тем, что тканевыми тромбопластинами активируется только часть фактора VII. Кроме того, разные тромбо-

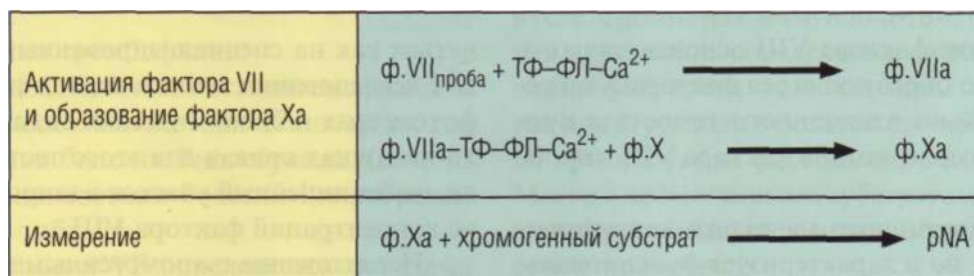


Рис. 106. Принцип определения содержания фактора VII с использованием хромогенного субстрата. ТФ - тканевой фактор

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

пластины обладают разным активирующим эффектом, хотя полной активации фактора VII в пробе не удастся достичь ни одним из тромбопластинов. Еще одной причиной ошибок может быть способность ф. VII к нестимулированной и холодной активации.

По-видимому, при оценке активности фактора VII с использованием хромогенных субстратов выявляется большее количество этого фактора, чем при использовании клоттинговых тестов. Клоттинговые тесты практически не выявляют

повышения фактора VII, а технология с хромогенными субстратами способна определить его повышенное содержание в плазме. Исходя из того, что повышение фактора VII в плазме увеличивает риск тромбоэмболической болезни, а лечение стероидами, беременность, сахарный диабет, состояние после инфаркта миокарда и гипертриглицеридемия сопровождаются повышением активности фактора VII, методы с хромогенными субстратами необходимо внедрять, чтобы оценивать риск тромбозов.

Определение протромбина (фактора II) с использованием хромогенного субстрата

Протромбин достаточно надежно определяется коагуляционным методом. Однако определение протромбина с использованием хромогенного субстрата относительно хорошо стандартизовано. Кроме того, измерительный диапазон существенно расширяется при скрининге пациентов с протромбиновой мутацией G20210A, при которой увеличен риск тромбоэмболии. Протромбин активируется металлопротеазой экарином (фермент яда эфы многощетучатой) до мейзотромбина - производное, которое не блокируется гепарином и комплексом антитромбин-гепарин, но способно гидролизовать хромогенный субстрат (рис. 107) и свертывать не только обыкновенный фибриноген, но и некоторые тромбин-резистентные его производные (РКМФ).

PIVKA-протромбин активируется экарином, поэтому этот хромогенный тест может дать ложно-

завышенные результаты по активности протромбина у пациентов, принимающих непрямые антикоагулянты или страдающих дефицитом витамина К. *Примечание.* PIVKA - Proteins Induced by Vitamin K Absence or Antagonists - протеины, синтезируемые печенью при отсутствии витамина К или в присутствии его антагонистов (непрямых антикоагулянтов). PIVKA не способны участвовать в процессе свертывания крови (см. раздел «Лечение антикоагулянтами непрямого действия».

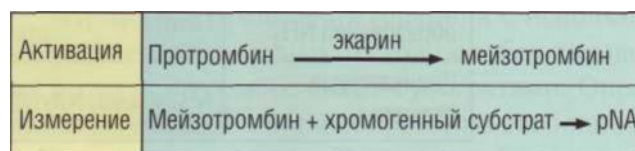


Рис. 107. Принцип определения протромбина с использованием хромогенного субстрата

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 тромбоэластограмма, 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, гиперфибринолизе, после

удаления миндалин, при патологии печени и костно-мозгового кровотока. Дефицит ф. XIII может быть врожденным и приобретенным, в том числе в результате появления аутоантител. Определение дефицита ф. XIII и его причины необходимо 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 высокополимерный белок, определение его

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

структурных компонентов часто бывает недостаточным, поэтому требуются функциональные тесты с определением активности ф. XIII.

Фотометрический метод

Фактор XIII - фермент трансглутаминаза, которая образует поперечные сшивки между пептидами. При этом изолепептидные связи образуются между остатками глутамина и лизина, в реакции освобождается аммиак. Последний определяется в ферментной реакции с глутаматдегидрогеназой (ГлДГ) и α -кетоглутаратом, кофактором реакции является НАДН, окисляющийся до НАД (рис. 108). Измерение проводится фотометрически при длине 340 нм, метод может выполняться на биохимических анализаторах.

Инкорпорирующий метод

Разработан новый метод определения фактора XIII, основанный на введении субстрата в

иммобилизованный белок, которое обеспечивается фактором XIIIа. Раньше иммобилизовался казеин. В новом методе используется физиологический субстрат-фибрин. Фактор XIIIа инкорпорирует субстрат 5-(биотинамидо)-пептиламин (БАПА) в фибрин, который определяется количественно с конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза (рис. 109). Инкорпорирующий метод позволяет оценивать физиологическую роль мутации Val34Leu фактора XIII, которая сочетается с риском внутримозговых 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 мониторинга больных с очень низким уровнем ф. XIII, что бывает при наследственных дефицитах.

Активация	$\text{ф. XIII}_{\text{проба}} \xrightarrow{\text{протромбин} / \text{Ca}^{2+}} \text{ф. XIIIa}$
Ферментная реакция образования NH_3	$\text{Пептид} + \text{глицинэтиловый эфир} \xrightarrow{\text{ф. XIIIa}} \text{поперечные сшивки пептида} + \text{NH}_3$
Индикаторная реакция	$\text{NH}_3 + \alpha\text{-кетоглутарат} + \text{НАДН} \xrightarrow{\text{ГлДГ}} \text{глутамат} + \text{НАД} + \text{H}^+$

Рис. 108. Принцип определения фактора XIII фотометрическим методом

Активация	$\text{ф. XIII}_{\text{проба}} \xrightarrow{\text{протромбин} / \text{Ca}^{2+}} \text{ф. XIIIa}$
Инкорпорация	$\text{Фибрин} + \text{БАПА} \xrightarrow{\text{ф. XIIIa} / \text{Ca}^{2+}} \text{фибрин-БАПА}$
Индикаторная реакция	$\text{Фибрин-БАПА} + \text{стрептавидин-ЩФ} + \text{субстрат} \longrightarrow \text{цветная реакция}$

Рис. 109. Принцип определения фактора XIII инкорпорирующим методом. БАПА - 5-(биотинамидо)-пептиламин, ЩФ-щелочная фосфатаза

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Тесты для определения гепарина

Антикоагулянты прямого действия широко используются для профилактики и лечения тромбозной болезни. Традиционный тест АЧТВ полезен для контроля за лечением гепарином, когда гепарин применяется в относительно низких концентрациях (описан выше). При высоких дозах гепарина, например при операциях на открытом сердце или при диализе, АЧТВ не позволяет следить за эффектами гепарина. Антикоагулянтное действие низкомолекулярного гепарина АЧТВ не улавливает.

Определение гепарина с помощью хромогенных субстратов

Синтетические субстраты применяются для определения гепарина, особенно при использовании низкомолекулярного гепарина (НМГ). Гепарин определяется опосредованно: используется его способность усиливать комплексообразование ф.Ха или тромбина с антитромбином и тем самым подавлять активность этих протеаз, после чего определяется их остаточная активность (рис. 110). Тест с определением остаточной активности ф.Ха («анти-Ха-активность») применяется при контроле за лечением короткоцепочечным фракционированным гепарином, который обладает большей тропностью к ф.Ха, чем к тромбину. Кроме того, ф.Ха - относительно стабильный фермент, поэтому тест с использованием этого фактора технически более надежный, чем тест с активным тромбином.

Тест может выполняться в разных модификациях: как кинетический метод, определение по начальной скорости или метод по конечной точке. В некоторых тестах используется насыщающая концентрация АТ, тогда тест обозначается как «общий гепарин», в других - исполь-

зуется эндогенный АТ пробы, в этих случаях тест обозначается как набор для определения комплекса гепарин-АТ, или «активный гепарин». Определение гепарина с использованием хромогенных субстратов легко адаптируется для автоматических биохимических анализаторов. На результаты теста с хромогенными субстратами не оказывают влияния продукты деградации фибрина (ПДФ) и повышенное содержание ф. VIII, которые меняют результаты при определении АЧТВ.

Для тестов на определение гепарина разработаны и промышленно выпускаются калибраторы - лиофильно высушенные препараты плазмы со стандартным содержанием гепарина. Калибраторы должны быть тестированы по стандарту ВОЗ, которому придано значение активности 1,0 анти-Ха-Ед/мл. Терапевтический диапазон для лечения гепарином рекомендуется в пределах 0,3-0,7 анти-Ха-Ед/мл.

Определение гепарина с помощью коагуляционных методов

Принцип определения гепарина с использованием коагуляционных тестов подобен таковому в тестах с хромогенными субстратами. Определение основано на ингибировании свободного ф.Ха на первом этапе. После инкубационного периода выпадение сгустка вызывается добавлением реактивов, содержащих фосфолипиды с адсорбированными на них фактором V, протромбином, фибриногеном из бычьей плазмы и CaCl_2 (рис. 111). Автоматизация этого метода затруднена, так как сигнал достаточно слабый для оптического метода. Тест может выполняться на цельной крови на коагулометрах с механической системой регистрации.

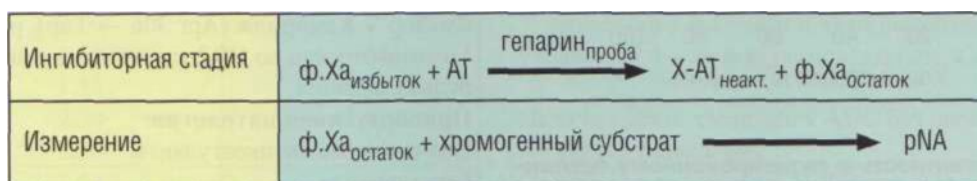


Рис. 110. Принцип определения содержания гепарина с использованием хромогенного субстрата, АТ - антитромбин

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

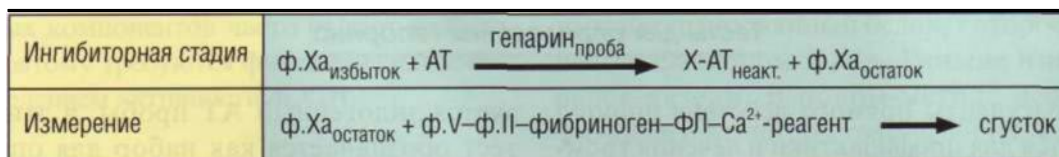


Рис. 111. Принцип определения содержания гепарина коагуляционным методом

Преаналитические факторы, влияющие на результаты определения гепарина

Качество подготовки пробы - существенный фактор, влияющий на результаты определения гепарина. Нарушение взятия крови из локтевой вены может сопровождаться активацией тромбоцитов *in vitro*, что приведет к ложным результатам с недооценкой содержания гепарина в крови больных. При активации тромбоцитов освобождается фактор 4 тромбоцитов (PF4). PF4 выступает как естественный антигепарин, нейтрализующий

как нефракционированный, так и низкомолекулярный фракционированный гепарин (НМГ), хотя следует отметить, что НМГ менее чувствителен к подавляющему действию PF4.

Для предупреждения этого эффекта и подавления активации тромбоцитов при транспортировке крови рекомендуется использовать специальные пробирки для крови, например СТАD tubes, в которых содержится цитрат, теofilлин, аденозин, декстроза - «коктейль», который предупреждает активацию тромбоцитов.

Методы для определения резистентности к активированному протеину С,

активности протеина С, антитромбина, антифосфолипидных антител

Резистентность к протеину С

Термин «резистентность к протеину С» введен при описании феномена практического отсутствия удлинения АЧТВ после добавления активированного протеина С (рис. 112). Устойчивость (резистентность) ф. Va к ингибирующему воздействию активированным протеином С (РАПС) - один из серьезных факторов риска патологичес-

ких тромбозов. РАПС - нарушение функционирования системы протеина С.

Факторы, которые влияют на РАПС, представлены в табл. 26. РАПС может быть как врожденной, так и приобретенной. В случае наследования РАПС гетерозиготы имеют риск развития тромбозов примерно в 7 раз, а гомозиготы - в 80 раз выше, чем в среднем по популяции. РАПС была обнаружена среди 20% больных с первичным тромбозом глубоких вен бедра и среди 40% больных тромбофилией. По разным данным от 20 до 60% больных с тромбозом глубоких вен бедра имеют РАПС.



Рис. 112. Резистентность к активированному протеину С (АПС) при мутации в гене, контролирующем синтез фактора V, которая приводит к образованию фактора Лейден. Тест основан на определении АЧТВ

Таблица 26

Факторы, влияющие на резистентность к АПС

Наследственные факторы	
Фактор V Лейден (Арг 506 → Гли)	
Фактор V Кембридж (Арг 306 → Тир), редкая мутация	
Гомозиготность по HR2-гаплотипу в гене фактора V, редкая мутация	
Приобретенная патология	
Волчаночные антикоагулянты	
Беременность	
Использование антикоагулянтов непрямого действия	
Увеличение фактора VIII	

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Скрининговые тесты на АПС разработаны на основе модифицированного теста АЧТВ, который проводится с и без АПС, или на основе ПВ со змеиным ядом.

Тест резистентности фактора Va к АПС на основе модифицированного АЧТВ

Добавление АПС в норму вызывает удлинение АЧТВ за счет инактивации факторов Va и Villa в плазме. Поэтому в тесте сравнивается время выпадения сгустка в тесте АЧТВ с добавлением и без добавления АПС и рассчитывается отношение (рис. 114). Референтные значения теста зависят от используемых реактивов и приборов. Тем не менее, несмотря на разные методы и приборную базу, обычно добавление АПС к плазме приводит, по крайней мере, к 2-кратному удлинению АЧТВ (табл. 27).

Недостаточное удлинение АЧТВ (патологический результат, свидетельствующий о РАПС) наблюдается у пациентов с фактором V Лейден, волчаночным антикоагулянтом, при беременности, увеличенном содержании фактора VIII и при-

еме оральных контрацептивов. 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 непрямых антикоагулянтов и введение гепарина. Тест полезен для выявления пациентов с высоким риском тромбоэмболической болезни.

Тест для диагностики фактора V Лейден

Мутация гена фактора V (фактор Лейден) оценивается как наиболее распространенная причина РАПС. Эту патологию можно выявить при проведении теста на РАПС с плазмой пациента, разбавленной 1:5 плазмой с дефицитом ф.V. Этот тест обладает высокой специфичностью и чувствительностью на выявление фактора V Лейден (табл. 28).

Тест на РАПС проводится также с использованием змеиного яда, обозначаемого как протак (Protac), специфически активирующего протеин C. При внесении активатора протеина C в смесь нор-

Таблица 27

Примеры резистентности к активированному протеину C

Показатель	Здоровый донор	Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3
АЧТВ без АПС (с)	84,9	57,8	47,1	36,1
АЧТВ с АПС (с)	31,4	32,3	31,0	31,6
Отношение АПС	2,70	1,79	1,52	1,14
Заключение	Норма	Резистентность к АПС частичная и полная		

Таблица 28

Примеры определения резистентности к активированному протеину C методом без разведения и методом разведения испытуемой плазмы плазмой с дефицитом ф. V

Пациент	Отношение АПС в тесте без разведения (норма >2,15)	Отношение АПС в тесте с разведением (норма >1,90)	Лабораторное заключение
1	2,67	2,42	Норма
2	2,06	1,77	У пациентов 2 и 3 частичная резистентность к АПС, у пациента 4 – полная резистентность к АПС
3	1,52	1,54	
4	1,15	1,23	
5	2,24	1,82	
6	2,30	1,69	Наличие резистентности к АПС без проявления в тесте АЧТВ без разведения
7	1,54	2,19	Отсутствие дефицита ф.V Лейден, но наличие резистентности к АПС, которое определяется присутствием ингибитора (вероятно, волчаночного антикоагулянта)
8	1,92	2,32	

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

мальной и дефицитной по ф.V плазмы время свертывания в тесте АЧТВ удлинится примерно в 2 раза. Если имеется РАПС, удлинение АЧТВ выражено в малой степени.

Определение протеина С

Для определения протеина С разработано несколько методов: иммунохимический метод, метод с хромогенным субстратом и коагуляционный вариант. Для функциональных методов используется специфический активатор протеина С из яда змеи щитомордника, обозначаемый как протак.

Определение протеина С с использованием хромогенного субстрата

Определение основано на активации протеина С активатором протак с последующим определением (кинетическим методом или методом конечной точки) изменения оптической плотности пробы из-за образования паранитроанилина (рис. 113). Этот метод прост, специфичен, легко автоматизируется. Так как протеин С - витамин-К-зависимый гликопротеин, то при лечении непрямыми антикоагулянтами (антагонистами витамина К) появляются PIVKA-формы протеина С, которые не обладают антикоагулянтной активностью, но определяются методами с хромогенными субстратами. Поэтому у больных, принимающих непрямые антикоагулянты, могут быть завышенными результаты определения протеина С хромогенными методами.

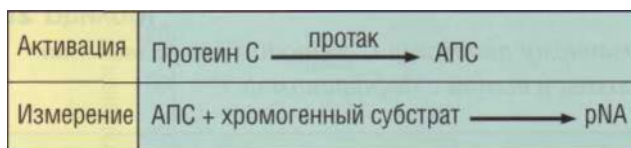


Рис. 113. Принцип определения протеина С с использованием хромогенного субстрата, АПС - активированный протеин С

Определение протеина С коагуляционным методом

Пробы пациентов сопоставляются с дефицитной по протеину С плазмой, которую получают методом иммуносорбции. Протеин С в об-

разцах исследуемой плазмы активируется протак. Для контроля тест проводится с и без протак (рис. 114). Активированный протеин С вызывает протеолиз и соответственно инактивацию факторов Va и VIIIa в плазме (рис. 115). Последнее сопровождается удлинением времени свертывания в тесте АЧТВ, по которому оценивается активность протеина С в плазме пациента. Если фактор Va нечувствителен к активному протеину С, то АЧТВ не удлинится в присутствии активатора протеина С. Рассчитывают отношение АЧТВ с протак/АЧТВ без протак, 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.

Коагуляционный метод оценивает активность протеина С, фиксирующегося карбоксилированной частью на фосфолипидах. PIVKA-формы не функционируют в этой системе, и тест не дает ложных результатов у пациентов, принимающих непрямые антикоагулянты или имеющих дефицит витамина К.

Исказить результаты теста могут такие факторы, как наличие мутации ф.V Лейден, присутствие в плазме волчаночного антикоагулянта,

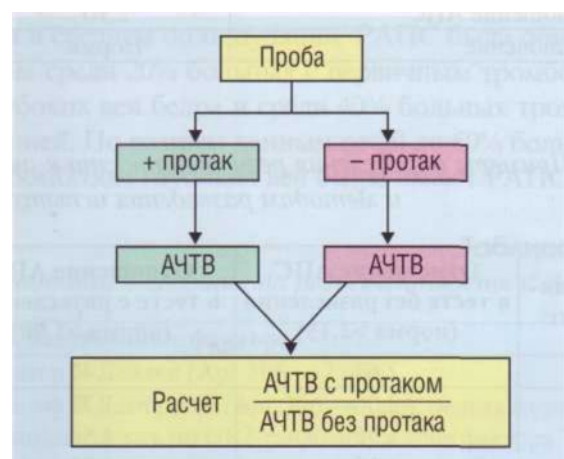


Рис. 114. Принцип скрининга на резистентность к активированному протеину С (РАПС). Активатор протеина С из змеиного яда (протак), добавленный к пробе, в норме существенно удлиняет АЧТВ, Если же имеет место РАПС, то удлинения АЧТВ в присутствии протак не происходит

Стадия активации / инактивации	А: факторы контакта + АЧТВ-реактивы → ф. XIa Б: протеин C _{проба} + протак → АПС В: АПС + ф. VIII-ф. V _{проба} → ф. VIII _{неакт.} + ф. V _{неакт.}
Измерение	ф. XI, другие факторы свертывания + ФЛ + Ca ²⁺ → сгусток

Рис. 115. Принцип определения протеина С коагуляционным методом. АПС - активированный протеин С, ФЛ фосфолипиды

терапия гепарином. Для получения достоверных результатов очень важно качество используемой протеин-С-дефицитной плазмы.

У некоторых пациентов, принимающих не-прямые антикоагулянты, 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 АПС.

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

В норме активность протеина С у взрослых составляет 70-140%.

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;
- геморрагической болезни новорожденных;
- заболеваниях печени с нарушением функции;
- синдроме острой дыхательной недостаточности;
- менингококковом сепсисе;
- ДВС-синдроме;
- гемодиализе;

- лечении L-аспарагиназой;
- лечении пероральными (непрямыми) антикоагулянтами (дефицит витамина К).

Отдельные результаты могут колебаться в зависимости от используемых методов и тест-наборов, тем более что многие из них разработаны до того, как стала известна мутация гена фактора V Лейден. В общем случае разведение пробы может минимизировать влияние фактора V Лейден в коагуляционных тестах.

В некоторых случаях при лечении больных с дефицитом протеина С непрямыми антикоагулянтами у них могут возникнуть некрозы кожи в результате **рикошетных тромбозов**. Если антикоагулянты назначаются в высокой дозе без поддержки гепарином, то возникает состояние, при котором протеин С 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. 116).

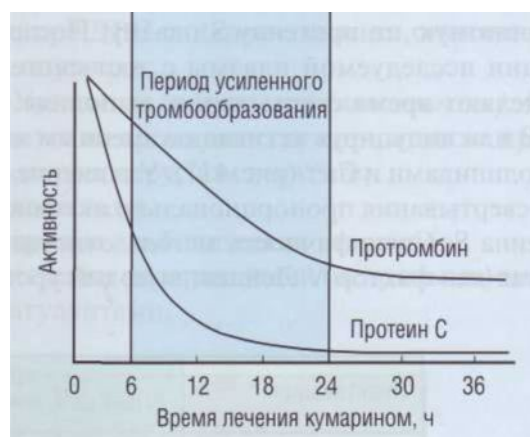


Рис. 116. Быстрое снижение протеина С, превышающее уменьшение витамин-К-зависимых факторов свертывания, может быть причиной возникновения тромботического состояния (рикошетные тромбозы) при начале лечения высокими дозами непрямыми антикоагулянтами

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Эта ситуация может усугубляться тем, что непрямые антикоагулянты начинают назначать в случае развития тромбозов или угрожающей ситуации по тромбообразованию (при воспалении, инфекциях, лихорадке), когда система прокоагулянтов активирована. Быстрое снижение протеина С провоцирует в этом случае массивное тромбообразование, проявляющееся вплоть до некрозов кожи. Непосредственно в период лечения непрямыми антикоагулянтами (кумаринами) определение протеина С затруднено. Определять его следует до начала лечения кумаринами.

Определение протеина S

Протеин S - витамин-К-зависимый белок, который является кофактором АПС. Эта функция положена в основу всех известных коммерческих тест-систем определения протеина S. Описаны случаи как функционального, так и количественного дефицита протеина S. При проведении тестов важно помнить, что протеин S присутствует в плазме частично в свободном состоянии, частично в комплексе с С4-связывающим протеином (С4-СП), но активна только свободная форма протеина S.

Определение протеина S коагуляционным методом

Для определения протеина S необходимо использовать тест-систему, содержащую очищенный активный протеин С, 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+} (рис. 117). 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 АПС, 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 С4-СП. 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 неактивные формы протеина S, которые иногда появляются в плазме.

Оценка результатов

Уменьшение содержания (активности) протеина S наблюдается при:

- врожденном (наследственном) дефиците;
- врожденном (наследственном) уменьшении свободной фракции протеина S;
- заболеваниях печени с нарушением синтетической функции;
- нефротическом синдроме;
- ДВС-синдроме;

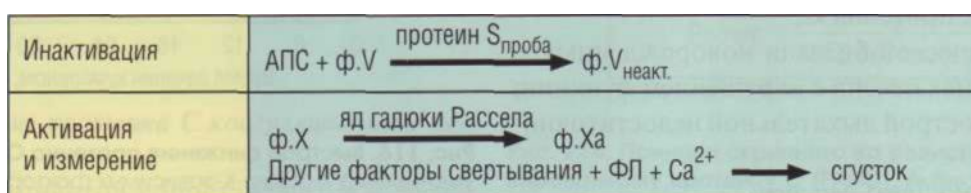


Рис. 117. Принцип определения протеина S коагуляционным методом

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

- системной красной волчанке;
- лечении L-аспарагиназой;
- лечении пероральными (непрямыми) антикоагулянтами;
- приеме эстрогенов (пероральных контрацептивов);
- беременности, в послеродовом периоде;
- наличии аутоантител к протеину S.

Относительный дефицит протеина S наблюдается при повышении С4-СП. С4-СП - белок острой фазы, его количество повышается в плазме крови при воспалении, аутоиммунных реакциях, беременности, у женщин, принимающих стероидные контрацептивы. С4-СП определяют методом иммунотурбидиметрии или ELISA.

Определение антитромбина

В клинико-диагностических лабораториях АТ определяют иммунохимическими методами (ELISA, турбидиметрия, нефелометрия), тестами с хромогенными субстратами или коагуляционными методами.

Методом с хромогенным субстратом АТ определяется через фактор Ха или Па при насыщающей концентрации гепарина. Принцип определения АТ представлен на рис. 118. При выборе предпочтение отдают методу с использованием ф.Ха, так как он более стабилен и подвержен меньшим влияниям со стороны интерферирующих воздействий, чем тромбин (фактор На).

Нормальный уровень активности АТ в плазме взрослых колеблется в диапазоне 75-125%, этот диапазон практически одинаков при использовании разных тест-наборов. Дефицит АТ - серьезный фактор риска развития венозных тромбозов.

У новорожденных уровень АТ составляет около 50% и достигает уровня взрослых к 6 мес.

Небольшое снижение АТ наблюдается в середине менструального цикла, в пред- и послеродовом периоде, при токсикозах второй половины беременности, в послеоперационном периоде. Эти сдвиги более выражены у пациентов с группой крови А (II), а также у пожилых.

Снижение содержания (активности) АТ отмечается при:

- врожденном (наследственном) дефиците или аномалии АТ (снижение активности или чувствительности к гепарину);
- заболеваниях печени (опухоль, цирроз, алкогольный гепатит);
- нефротическом синдроме (протеинурия свыше 5 г/л);
- карциноме легких;
- ДВС-синдроме;
- множественных травмах, тяжелых родах, поздних гестозах;
- приеме эстрогенов (пероральных контрацептивов), кортикостероидов;
- лечении L-аспарагиназой;
- многие протеазы, включая гранулоцитарную эластазу, могут вызывать деградацию АТ.

Тест может применяться для мониторинга лечения гепарином. 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. 119), особенно у больных с тяжелой патологией, в критических случаях, при ДВС-синдроме, сепсисе, злокачественных опухолях.

Увеличение содержания (активности) АТ отмечается во время менструации, а также при:

- остром вирусном гепатите;
- холестазах;
- приеме анаболических стероидов;
- лечении пероральными (непрямыми) антикоагулянтами.



Рис. 118. Принцип определения антитромбина (АТ) хромогенным методом

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ



Рис. 119. Снижение уровня АТ в плазме в период активного лечения нефракционированным гепарином

Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома и волчаночного антикоагулянта (см. также «Тромбозы. Волчаночный антикоагулянт»)

При антифосфолипидном синдроме в крови циркулируют антитела против фосфолипидов или фосфолипид-связанных белков. При этом синдроме возникает лабораторный феномен, при котором происходит удлинение времени свертывания крови в тестах, выполняемых на фосфолипидах (АЧТВ, ПВ). Этот феномен впервые был описан у пациентов с системной красной волчанкой и поэтому получил название **волчаночного антикоагулянта**. Клинически, однако, при антифосфолипидном синдроме и волчаночном антикоагулянте нет геморрагических проявлений, но есть выраженная тенденция к патологически усиленному тромбообразованию. Нельзя ставить знак равенства между

волчаночным антикоагулянтом и антифосфолипидным синдромом. В некоторых случаях при коагулологических признаках волчаночного антикоагулянта не находят иммунологических признаков антифосфолипидного синдрома, в свою очередь антифосфолипидный синдром не всегда сопровождается коагулологическими признаками волчаночного антикоагулянта.

Антифосфолипидный синдром, сопровождающийся волчаночным антикоагулянтом, выявляют комбинацией фосфолипид-зависимых коагуляционных и иммунохимических методов, причем надежная диагностика обеспечивается только комплексным использованием группы тестов. Как правило, волчаночный антикоагулянт распознается по удлинению фосфолипид-зависимых коагуляционных тестов. Волчаночный антикоагулянт является неспецифическим ингибитором. При подозрении на волчаночный антикоагулянт необходимо начинать лабораторные анализы со скрининговых тестов и теста смешивания. В табл. 29 представлены данные скрининговых тестов при врожденном дефиците факторов VIII и IX, при наличии специфического ингибитора и волчаночном антикоагулянте. Важно помнить, что не все реактивы для проведения АЧТВ одинаково чувствительны к волчаночному антикоагулянту. Для анализа АЧТВ при подозрении на волчаночный антикоагулянт необходимо применять реактивы, содержащие каолин, но не эллаговую кислоту.

Выявление волчаночных антикоагулянтов проводят последовательно: сначала в скрининговых методах, а затем в подтверждающих. На рис. 120 представлен алгоритм выявления вол-

Таблица 29

Изменения скрининговых тестов при врожденном дефиците факторов VIII и IX, наличии специфического ингибитора и 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

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

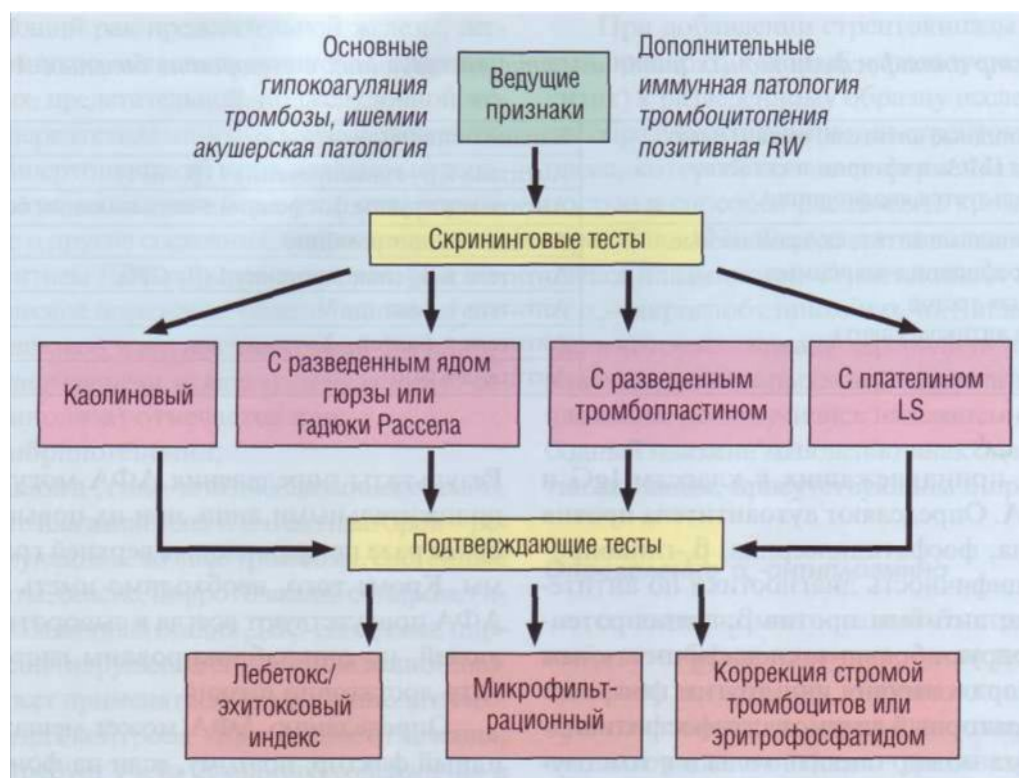


Рис. 120. Алгоритм выявления волчаночных антикоагулянтов

чаночного антикоагулянта (Баркаган З.С., Мотом А.П., 1999).

Еще одним подтверждающим тестом для определения волчаночного антикоагулянта является тест разведения. В серии последовательных разведений анализируемой плазмы буфером активность факторов свертывания крови, определяемая коагуляционным методом, относительно возрастает при наличии волчаночного антикоагулянта (табл. 30).

Таблица 30

Эффект разведения на активность факторов свертывания в присутствии волчаночного антикоагулянта

Разведения	Цельная плазма	1:2	1:4	1:8
Активность ф. VIII в смеси (%)	12	5	4	6,7
Пересчет на цельную плазму	×1	×3	×5	×9
Расчетная активность в цельной плазме (%)	12	15	20	60

Для подтверждения диагноза волчаночного антикоагулянта необходимо провести подтверждаю-

щие тесты, например тест нейтрализации на тромбоцитах. Проводится определение АЧТВ и активности факторов внутреннего пути плазмы больного до и после инкубации с тромбоцитами здорового донора или эритрофосфатидом. При наличии волчаночного антикоагулянта АЧТВ сокращается, а активность факторов возрастает за счет связывания части антифосфолипидных антител на тромбоцитах здорового человека. В группу подтверждающих внесены также индексы, основанные на сравнении результатов фосфолипид-зависимых и фосфолипид-независимых тестов (лебетокс/эхитоксовый индекс).

Для уточнения диагноза антифосфолипидного синдрома необходимо провести определение кардиолипидных антител с использованием метода ELISA. В табл. 31 представлен перечень антифосфолипидных антител, которые выявляются ИФА и коагуляционным методом.

Определение антифосфолипидных антител (АФА)

АФА, выявляемые твердофазным ИФА, представляют собой различные комбинации иммуно-

Спектр антифосфолипидных антител, присутствующих в сыворотке больных А ФС

Антифосфолипидные антитела, выявляемые твердофазным ИФА, в котором в качестве антигена используется кардиолипин	Кардиолипиновые антитела
	Антитела к β_2 -гликопротеину I (β_2 -GPI)
	Антитела к другим фосфолипид-связывающим белкам
Антифосфолипидные антитела, выявляемые с помощью фосфолипид-зависимых коагуляционных тестов (волчаночный антикоагулянт)	Антитела к протромбину
	Антитела к β_2 -гликопротеину I (β_2 -GPI)
	Антитела к фактору V
	Антитела к фактору X
	Антитела к ФЛ

глобулинов, принадлежащих к классам IgG и IgM, реже IgA. Определяют аутоантитела против кардиолипина, фосфатидилсерина, β_2 -гликопротеина I. Специфичность диагностики по антителам различна: антитела против β_2 -гликопротеина I демонстрируют большую специфичность, чем антитела к кардиолипину или другим фосфолипидам. Лабораторный диагноз антифосфолипидного синдрома можно ставить только в том случае, если содержание диагностических аутоантител в сыворотке крови, выявленных иммуноферментным методом, подтверждает патологию повторно с интервалом, по крайней мере, в 6 недель.

Результаты определения АФА могут считаться положительными лишь при их повышении в 2 и более раза по сравнению с верхней границей нормы. Кроме того, необходимо иметь в виду, что АФА присутствуют всегда в сыворотке здоровых людей, но они заблокированы гистонами и их титр достаточно низкий.

Определению АФА может мешать ревматический фактор, поэтому, если на фоне клинических признаков заболевания иммунохимические тесты на АФА дают отрицательный результат, то необходимо провести коагулянтные тесты на наличие волчаночного антикоагулянта.

Тесты для исследования фибринолитической системы

Основным функциональным ферментом фибринолиза является плазмин. При лизисе фибринового сгустка плазминоген и его активаторы фиксируются на фибрине, где идет активное расщепление субстрата, тогда как в плазме фибринолиз слабо выражен, плазмин блокирован α_2 -антиплазмином.

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. 121). 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. Укорочение времени лизиса эуглобулинов (активация фибринолиза) отмечается при:

• уменьшении концентрации фибриногена - гипо- и дисфибриногенемия;

• увеличении содержания плазминогена и его активаторов - панкреатит, панкреонекроз, мета-

- уменьшении концентрации фибриногена - гипо- и дисфибриногенемия;
- увеличении содержания плазминогена и его активаторов - панкреатит, панкреонекроз, мета-

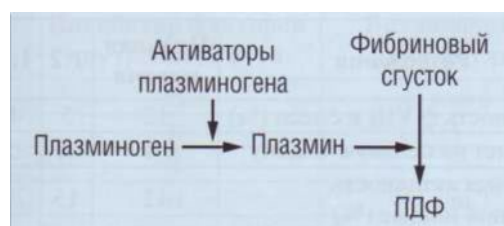


Рис. 121. Компоненты фибринолитической системы, которые определяют результаты метода «спонтанный эуглобулиновый лизис»

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

стазирующий 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 ДВС-синдрома, цирроз, рак, метастатическое поражение печени (снижение ан-типлазминовой и антиактиваторной функции). *Увеличение времени лизиса эуглобулинов* (угнетение фибринолиза) отмечается при:

- гиперфибриногенемии;
- врожденной а-, гипо- или дисплазминогенемии;
- дефиците плазминогена и его активаторов - рецидивирующие венозные тромбозы, системные васкулиты, сепсис, нефротический синдром, гипокоагуляционная стадия ДВС-синдрома, цирроз печени (нарушение синтеза плазминогена).

Тест может применяться при фибринолитической терапии для контроля эффективности лечения. Метод требует учета исходного содержания в плазме фибриногена, так как 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. В связи с ориентировочным характером и недостаточной специфичностью в последнее время вместо теста спонтанного лизиса эуглобулинового сгустка начали использовать определение отдельных факторов фибринолиза, в первую очередь плазминогена.

Определение плазминогена

Дефицит плазминогена - один из потенциальных факторов риска тромбоза, хотя клинически это подтверждается не всегда.

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. 122). Ферментативная активность комплекса плазминоген-стрептокиназа не подавляется α_2 -макроглобулином и α_2 -антиплазмином. Тесты, в которых сначала переводили плазминоген в плазмин, а затем пытались определить активность плазмина, не получились надежными, так как свободный плазмин мгновенно инактивируется α_2 -антиплазмином, присутствующим в пробе.

Определение α_2 -антиплазмينا

α_2 -антиплазмин - самый быстрый «реактивный» ингибитор плазмина, он не позволяет присутствовать плазмину в крови в свободном виде. α_2 -антиплазмин, помимо плазмина, ингибирует активаторы плазминогена - урокиназу (u-PA) и тканевой активатор (t-PA). Дефицит α_2 -антиплазмينا встречается относительно редко, но если возникает, то это сопровождается тяжелым геморрагическим синдромом, проявляющимся диapedезными кровотечениями. Основной причиной кровотечений является присутствие свободного плазмина, который разрушает все тромбы и деградирует фибриноген.

Определение α_2 -антиплазмينا вместе с определением ингибитора тканевого активатора плазминогена типа 1 (PAI-1), XIII фактора можно рассматривать как тесты 2-го уровня, которые необходимо выполнять, если скрининговые тесты (ПВ, АЧТВ, ТВ и определение функции тромбоцитов) нормальны, а больной страдает кровотечениями.

Уменьшение содержания (активности) α_2 -антиплазмينا наблюдается при:

- врожденном (наследственном) дефиците;
- заболеваниях печени (нарушается синтез α_2 -антиплазмينا);

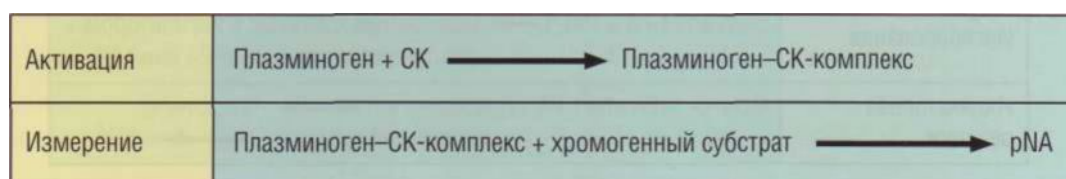


Рис. 122. Принцип определения плазминогена хромогенным методом. СК - стрептокиназа

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

- ДВС-синдроме;
- 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. 123). 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).

Определение ингибитора активатора плазминогена типа 1 (PAI-1)

PAI-1 в качестве основного ингибитора урокиназы (u-PA) и тканевого активатора (t-PA) играет важную роль в контроле за активностью фибринолиза. Определение PAI-1 часто включа-

ется как один из тестов профиля (панели) оценки тромбофилии. 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. Это имеет клиническое значение, так как является причиной рецидивирующего венозного тромбоза и отмечается часто у мужчин в преклонном возрасте. **PAI-1** повышается при:

- инфекционных и воспалительных процессах;
- послеоперационном периоде;
- злокачественных опухолях;
- ожирении;
- гипертриглицеридемии;
- лечении дексаметазоном.

У больных с инфарктом миокарда персистирующий подъем PAI-1 рассматривается как неблагоприятный прогностический признак.

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. 124).

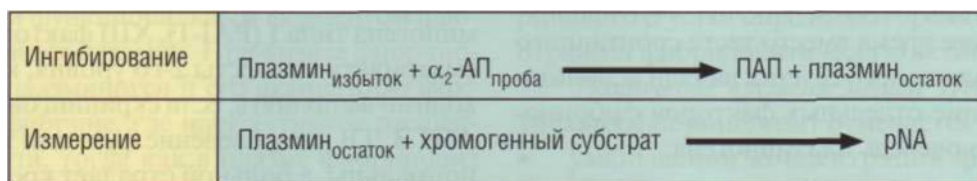


Рис. 123. Принцип определения α_2 -антиплазмина хромогенным методом. ПАП - комплекс плазмин-антиплазмин

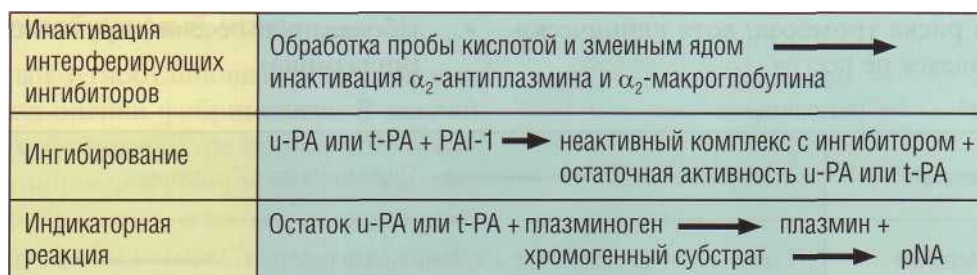


Рис. 124. Принцип определения ингибитора тканевого активатора плазминогена типа 1 (PAM) хромогенным методом. u-PA - урокиназа, t-PA - тканевой активатор



При использовании *u*-РА метод в техническом исполнении несколько проще, чем при использовании избытка *t*-РА, и может быть автоматизирован на современных анализаторах.

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.

Завышенные результаты теста можно получить при увеличении активности PAI-2. Этот ингибитор повышается при беременности, поэтому в данном случае 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 (*t*-РА)

Тканевой активатор плазминогена (*t*-РА) освобождается в кровотоке из эндотелиальных клеток сосудистой стенки, где он синтезируется. Поэтому диагностика дефицита *t*-РА основывается не только на определении концентрации *t*-РА 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*-РА, 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*-РА. 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*-РА *in vitro*. В настоящее время выпускаются специальные пробирки с кислым антикоагулянтом. *t*-РА имеет суточный ритм, поэтому его необходимо определять так же, как PAI-1.

t-РА обладает высокой амидазной активностью, позволяющей эффективно использовать для его определения метод хромогенных субстратов. Однако при низких концентрациях *t*-РА в плазме требуется проведение дополнительных процедур непрямого определения активности фермента через плазминоген и использование растворимого фибрина (рис. 125).

Определение *t*-РА проводится у больных с тромбофилией как часть панели тестов на выявление причины тромбофилии, особенно при нагрузочных манжеточных пробах. Повышение *t*-РА после инфаркта миокарда рассматривается как неблагоприятный фактор. Нарушение освобождения *t*-РА после венозного стаза описано у больных с тромбозами и патологией почек.

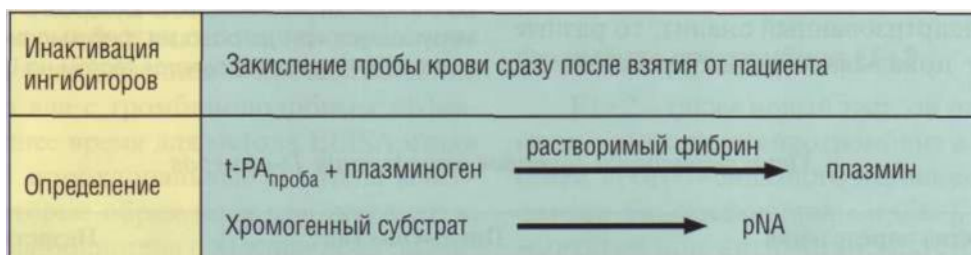


Рис. 125. Принцип определения тканевого активатора плазминогена (*t*-РА) хромогенным методом

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Тесты активации свертывания крови

Определение D-димеров

D-димеры - это специфические продукты деградации фибрина, входившего в состав тромба. Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием пламина и некоторых неспецифических фибринолитиков (рис. 60). 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 иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител, иммунодиффузии, методом турбидиметрии, латекс-агглютинации (табл. 32). Во всех методах исследования используются моноклональные антитела к эпитопам на D-димере, которые образуются при расщеплении нерастворимого фибрина плазином. Эпителий нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономерах, поэтому D-димеры - показатель того, 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.

Принцип теста, основанный на методе ELISA на твердой фазе (стриппированные планшеты), с нанесенными на поверхность пластика первичными антителами, показан на рис. 126. Так как D-димеры - не стандартизованный аналит, то разные методы могут показывать разные результаты,

несмотря на то, что используются специфические антитела и калибраторы.

На определение D-димеров практически не оказывает влияние 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, тромбоэмболии легочной артерии, ДВС-синдроме, после операций, особенно при большом операционном поле и других состояниях с повышенным образованием

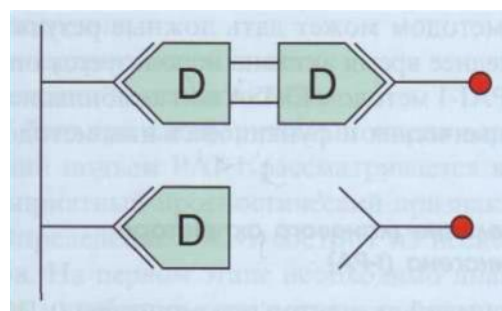


Рис. 126. Принцип метода ELISA для определения D-димеров. Специфические антитела нанесены на твердую фазу (пластик). С ними взаимодействует субъединица D из пробы и остается иммобилизованной на твердой фазе. Добавляются проявляющие антитела, конъюгированные с ферментом, которые могут взаимодействовать только с D-димерами. Несвязавшиеся антитела отмываются, добавляется субстрат для фермента, по изменению окраски раствора определяется количество D-димеров, D-мономеры, формирующиеся при деградации фибриногена и входящие в состав ПДФ, не определяются тестом на D-димеры

Таблица 32

Характеристики методов определения D-димеров

Метод определения	Преимущества	Недостатки
ИФА	Высокая чувствительность	Высокая цена единичных исследований, при планшетной технологии – задержка анализов
Агглютинация эритроцитов цельной крови и латексная агглютинация	Низкая цена, быстрое выполнение	Чувствительность ниже, серая зона, субъективный фактор
Мембранная иммунодиффузия	Высокая чувствительность, рутинные анализы единичных образцов	Необходимо специальное оборудование
Турбидиметрия, фотометрическая регистрация агглютинации латексных частиц	Любой анализатор, рутинные анализы единичных образцов	Более низкая чувствительность, чем у ИФА

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

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.

Уровень D-димеров повышен у больных с тромбозом глубоких вен бедра, с тромбозом легочной артерии, он может повышаться после обширных хирургических вмешательств, травм, при онкологических заболеваниях. 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 важной 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. D-димеры определяются в моче, но их появление интерпретируется как маркер почечной дисфункции.

Продукты деградации фибрина/фибриногена (ПДФ)

Продукты деградации фибрина/фибриногена определяются традиционно в общей группе с использованием поликлональных антител. При этом антитела могут взаимодействовать с эпитопами фибриногена, поэтому требуется не только использование сыворотки, но и полное удаление фибриногена с добавлением к крови тромбина или змеиного яда с тромбиноподобным эффектом. В последнее время для метода ELISA стали использовать моноклональные антитела к не-эпитопам, которые образуются при деградации фибрина или фибриногена под влиянием плазмина. Тем не менее трудно отдифференцировать ПДФ, образующиеся при деградации фибрина из тромба, от ПДФ, сформировавшихся при деградации фибриногена, особенно при использовании активаторов фибринолиза. Для определения ПДФ широко распространен метод латекс-агглютинации. Этот метод легко автоматизируется на турбидиметрах, но характеризуется относительно низкой специфичностью.

Положительная проба - содержание ПДФ в плазме/сыворотке свыше 0,5 мкг/мл - указывает на:

- ДВС-синдром;
- тромбоз глубоких вен;
- тромбоз легочной артерии;
- метастазы в легкие, рак яичников;
- фибринолитическую терапию.

Тромбин-антиромбиновый комплекс (ТАТ)

Определение ТАТ - новый тест в диагностике ДВС-синдрома, он активно внедряется в практику клиническо-диагностических лабораторий. 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 антиромбином, присутствующем 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 фибринопептида А (ФПА), однако для ТАТ менее критичными являются требования к процедуре взятия крови. Иногда тест с некоторыми модификациями используется для определения антиромбина (АТ).

Фрагменты протромбина F1+2

F1+2 - также новый тест, он отражает активность превращения протромбина в тромбин с участием протромбиназного комплекса (фактор Ха, фактор Va, фосфолипиды и Ca^{2+}), который формируется при активации системы плазменного гемостаза (рис. 127).

Определение F1+2, так же как ТАТ, проводится с целью диагностики состояния гиперкоагуляции, которое 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 тромбоза, остром инфаркте миокарда и

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

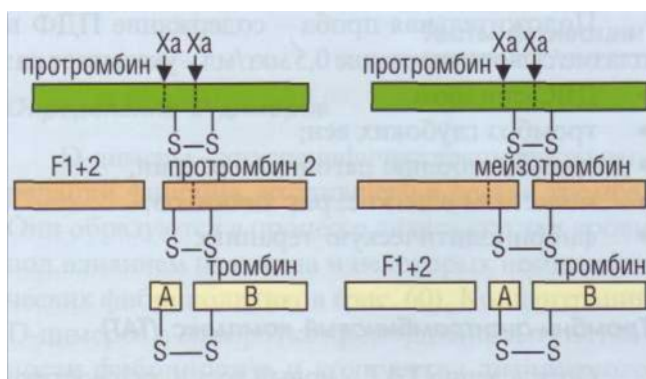


Рис. 127. Образование фрагмента протромбина F1+2.

Протромбин расщепляется протромбиназным комплексом в 2 участках в 2 этапа с образованием различных промежуточных продуктов, но обязательным формированием тромбина и фрагмента F1 + 2. Между количеством фрагментов F1 + 2 и количеством образующегося тромбина существует стехиометрическое соотношение

синдрома. F1+2, в отличие от ТАТ, имеют относительно продолжительный период циркуляции в системе кровотока. Состояние гиперкоагуляции можно зарегистрировать с помощью как ТАТ, так и F1+2, тогда как состояние гипокоагуляции можно выявить только по уменьшению F1+2. Поэтому определение F1+2 проводится иногда с целью мониторинга антикоагулянтов непрямого действия, эффективности профилактического подкожного или внутривенного введения гепарина.

Определение F1+2 можно использовать для решения вопроса о назначении/неназначении терапевтических вмешательств у пациентов с дефицитом антикоагулянтов и при беременности в случае риска возникновения тромбозов (табл. 33).

Фибринопептид А (ФПА, FPA)

ФПА отщепляется от молекулы фибриногена тромбином (рис. 44), поэтому при тромбинемии количество ФПА в плазме увеличивается. Опреде-

последующей тромболитической терапии. Исследование ФПА достаточно давно используется как вание F1+2 полезно использовать при мониторинге маркер активации гемостаза. В современных наборах лекарственной коррекции состояния гиперкоагуля- используется метод ELISA с моноклональными ции, в частности при лечении гепарином и концент- антителями. ФПА - очень чувствительный тест на ратами анти тромбина. Определение ТАТ и F1+2 ха- потребление фибриногена, его концентрация рактеризуется высокой аналитической чувствитель- повышается при различных заболеваниях с тром- ностью, поэтому их увеличение можно зарегистри- ровать до появления клинических признаков ДВС-

Таблица 33

Примеры решения вопроса о назначении антикоагулянтной терапии у 3 пациентов с дефицитом анти тромбина (референтные значения AT > 80%, F1 + 2 < 1,4 нмоль/л)

Показатель (исследования повторялись 4 раза)	Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3
1. AT (%)	41	48	49
F1+2 (нмоль/л)	3,70	1,36	2,82
2. AT (%)	43	52	-
F1+2 (нмоль/л)	2,83	1,53	4,60
3. AT (%)	46	49	-
F1+2 (нмоль/л)	3,91	1,26	5,77
4. AT (%)	44	-	45
F1+2 (нмоль/л)	3,41	-	6,83
Лабораторное заключение	Увеличение F1+2	Нет или минимальное повышение F1+2	Постоянное увеличение F1+2
Клинические данные	2 случая тромбоза за последнее время	Не было тромбозов	Беременность
Рекомендации по лечению	Продолжать прием не прямых антикоагулянтов	Нет необходимости в лечении	Профилактическое назначение гепарина

Полужирным шрифтом выделены показатели, выходящие за границы принятого в лаборатории референтного диапазона.

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

боэмболией. Результаты теста очень сильно зависят от процедуры взятия крови, даже небольшие отступления от прописанной схемы могут вызвать значительные сдвиги в уровне ФПА в пробе.

Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК)

При ряде форм патологии, характеризующихся активацией свертывания крови (ДВС, тромбозы, тромбофилии), происходит расширение пула фибриногена. В норме в крови из пула фибриногена присутствует практически только сам фибриноген в количестве 1,8-3,5 г/л. Все остальные продукты (рис. 128) находятся в минимальном количестве, которое практически не определяется лабораторными тестами.

При ДВС-синдроме за счет свободного тромбина 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. 129).

Паракоагуляционные тесты

Для выявления растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) в КДЛ традиционно использовали так называемые паракоагуляци-

онные («гельобразующие») тесты - *этаноловый* и *протаминсульфатный*. Однако из-за качественной оценки результатов они малоинформативны. Различные модификации протаминсульфатного теста с количественным и полуколичественным представлением результата малоточны и плохо воспроизводимы. Протаминсульфат связывается с гепарином, поэтому у больных, получавших гепарин, протаминсульфатный тест дает отрицательный результат. В настоящее время эти тесты можно считать устаревшими.

В последнее время стал активно использоваться паракоагуляционный *ортофенантролиновый тест*. С помощью ортофенантролинового теста возможно не только качественное, но и количественное определение РФМК. Гепаринотерапия с содержанием гепарина в плазме крови до концентрации 10 ед/мл не влияет на результаты теста. Ортофенантролиновый тест более чувствителен, чем другие паракоагуляционные тесты. Однако при остро протекающих (катастрофических) формах ДВС с глубокой гипофибриногемией показатели паракоагуляционных тестов могут снижаться. Краткая характеристика и диагностическое значение представленных выше и дополнительных тестов активации системы гемостаза даны в табл. 34.

В табл. 35 суммированы наиболее вероятные изменения лабораторных тестов при некоторых патологических состояниях.

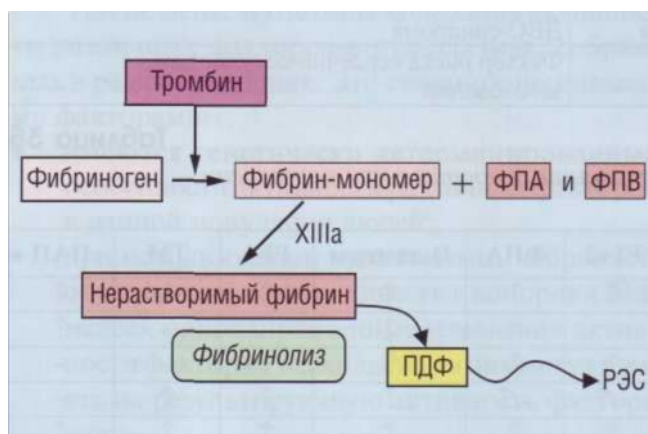


Рис. 128. Пул метаболитов фибриногена в норме. Из обозначенных продуктов в крови присутствует только сам фибриноген, все остальные метаболиты находятся в исчезающе малых количествах

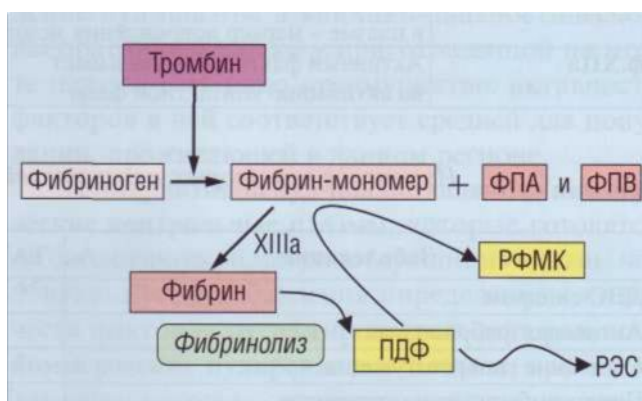


Рис. 129. Пул метаболитов фибриногена при ДВС-синдроме. Количество фибриногена снижается, появляются продукты деградации фибрина (ПДФ), фибринопептиды (ФПА и ФПВ), растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), РЭС - ретикулоэндотелиальная система

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Таблица 34

Маркеры активации гемостаза

Показатель	Характеристика	Диагностическое значение
D-димеры	Продукты, образующиеся при лизисе фибрина под влиянием плазмينا. Накапливаются при активации гемокоагуляции и фибринолиза	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, оценка эффективности тромболитической терапии
TAT – тромбин-анти- тромбиновый комплекс	Комплексы взаимодействия тромбина и анти- тромбина. Отражают количество образующе- гося тромбина в системе циркуляции за ко- роткий период	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубо- ких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
F1+2 – фрагменты про- тромбина	Указывают на активацию протромбина фак- тором Ха и на образование тромбина <i>in vivo</i> . Отражают количество образующегося тромбина в системе циркуляции за длительный период	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубо- ких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением гепарином и непрямыми антикоа- гулянтами. Наследственный или приобретенный дефицит ингибиторов
РФМК	Фибрин-мономеры и олигомеры, а также их комплексы с ПДФ. Отражают активность тромбина <i>in vivo</i>	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубо- ких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
ФПА – фибрино- пептид А	Продукт протеолиза фибриногена. Отражает активность тромбина <i>in vivo</i>	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубо- ких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
ПДФ	Продукты деградации фибрина/фибриногена под влиянием плазмينا	Определяют состояние гиперфибринолиза, повышаются у больных с тромбозами (реактивный фибринолиз) и ДВС, при лечении фибринолитиками
ПАП – плазмин- α_2 -анти- плазминовый комплекс	Отражает образование плазмينا <i>in vivo</i>	Выявление гиперфибринолиза или реактивного фибринолиза, ДВС, инфаркта миокарда, неста- бильной стенокардии
PF4 – фактор 4 тромбоцитов, β -TG – β -тромбо- глобулин	Метаболиты, освобождаемые из тромбоцитов в плазму. Отражают активацию тромбоцитов <i>in vivo</i>	Диагностика гиперактивного состояния тромбоцитов, артериального тромбоза, повре- ждения сосудов, инсульта
vWF – фактор Вилле- бранда	Освобождается из эндотелиальных клеток. Маркер повреждения эндотелиальных клеток	Диагностика поражения сосудистой стенки, фактор риска инфаркта миокарда и инсульта
TM	Мембранный белок в эндотелиальных клетках, в плазме – маркер повреждения эндотелия	Диагностика повреждения сосудистой стенки, ДВС-синдрома
ф.ХIIa	Активный фактор XII, указывает на активацию контактной фазы	Фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний

Таблица 35

Изменение некоторых показателей активации гемостаза при патологии

Заболевание	TAT	F1+2	ФПА	D-димеры	PF4	TM	ПАП
ДВС-синдром	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Активация фибринолиза	–	–	–	↑	–	–	↑
Состояние гиперкоагуляции	↑	↑	↑	↑	↑	–	–
Предтромботическое состояние	-/↑	-/↑	-/↑	↑	↑	↑	–
Инфаркт миокарда	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Малигнизация	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	–	-/↑
Антифосфолипидный синдром	-/↑	-/↑	-/↑	-/↑	↑	-/↑	–
Иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП)	–	–	–	–	↑	–	↑
Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура	↑	↑	↑	↑	↑	–	–

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Обеспечение качества лабораторной оценки системы гемостаза

Контроль качества в коагулологии является центральным элементом обеспечения 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 подготовки образца на преаналитическом этапе, 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. Решающим фактором правильности выполнения исследования является проведение всеобъемлющего внутрилабораторного контроля качества всех выполняемых тестов. Оптимальная система контроля предполагает оценку качества лабораторных исследований на внутрилабораторном, федеральном и международном уровнях.

Стандартные образцы (калибраторы)

Калибраторы требуются для многих тестов. Часто для практических целей используется свежая **сливная плазма** от нескольких (не менее 5, желательнее более 20) здоровых доноров (пулированная плазма, или пул-плазма). Основой применения пул-плазмы является представление о том, что при смешивании плазмы значительного количества здоровых доноров (в импортных пулах смешивается плазма десятков и сотен тысяч здоровых доноров) активность практически всех факторов гемостаза 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 факторами:

- 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 факторы 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 до однородной массы;
- рационально хранить ее небольшими порциями;
- температура хранения должна быть не выше $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

Альтернативой пул-плазме являются **коммерческие контрольные плазмы**, которые готовятся на биологической матрице (лучшие из плазмы человека) путем добавления определенных количеств факторов от тестированных доноров, или **коммерческие пулированные плазмы**, при изготовлении которых смешивается плазма десятков и даже сотен тысяч доноров. Такие плазмы, как правило, проходят строгий международный контроль. В продаже имеются не только нормальные контрольные плазмы, но и плазмы, дефицитные по отдельным факторам.

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

Обычно на основе калибраторов делается серия разведений и строится калибровочная кривая. Как правило, для построения калибровочной кривой бывает достаточно 4 разведений. При нелинейной калибровке используют 6 разведений калибратора.

В соответствии с клиническими и аналитическими потребностями предлагаются калибровочные растворы для следующих основных коагулологических тестов:

- калибровочная плазма для установления активности протромбина, факторов протромбинового комплекса и всех факторов свертывания, определяемых коагуляционными методами;
- калибровочная плазма для колориметрических методов определения АТ, протеина С;
- калибровочная плазма для определения фибриногена хронометрическим или оптическим методом на основе протромбинового времени;
- калибровочная плазма для определения концентрации нефракционированного и низкомолекулярного гепарина.

Референтная плазма - централизованно приготовленная нормальная плазма, критерии и про-

цедура приготовления которой определены в стандарте DIN58939-1.

Стандарты ВОЗ

Для некоторых аналитов, определяемых в клинико-диагностических лабораториях, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует международные стандарты. На основе этих стандартов изготовлены стандартные образцы (первичные стандарты), которые предлагаются производителям коммерческих наборов, а те в свою очередь производят вторичные стандарты, тестированные по первичным стандартам. Вторичные стандарты фасуются вместе с выпускаемыми коммерческими наборами реактивов. Среди стандартов ВОЗ для системы гемостаза широко известен стандарт тромбопластина, используемый в тесте протромбиновое время (ПВ). Фирмами-изготовителями стандартизация по «индексу чувствительности» (ISI, или МИЧ) проводится по одному из международных эталонов (RBT/90, BCT/253 и др.). Этот индекс чувствительности, если он определен, указывается на упаковке реактива и в инструкции к выпускаемому тромбопластину.

Внутрилабораторный контроль качества

К тестам на исследование гемостаза предъявляются такие же требования по контролю качества, как и к другим лабораторным исследованиям. Все тесты в лаборатории должны быть обеспечены внутрилабораторным контролем качества, лаборатории должны участвовать в программах межлабораторного контроля качества.

При проведении внутрилабораторного контроля контрольные пробы необходимо включать в каждую серию измерений. По крайней мере, 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. Для каждого контролируемого показателя строятся контрольные карты с использованием, по крайней мере, 2 контрольных проб - с показателями в нормальном и патологическом диапазоне. Фирма «Bio-Rad»

(наиболее известный производитель контрольных материалов в мире) для проведения контроля качества выпускает контрольные материалы для исследования коагуляции 3 уровней под общим наименованием «Lyphochek Coagulation». Если проводится лекарственный мониторинг, то желательно использовать контрольные материалы с показателями в терапевтическом диапазоне. При использовании 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 коагулологических тестов следует применять аликвотированные сливные плазмы для контроля воспроизводимости.

Требования к аналитическому качеству, принятые в настоящее время в России, изложены в

Обеспечение диагностики нарушений гемостаза в КДЛ

двух документах: приказе МЗ РФ № 45 и отраслевом стандарте ОС 91500.13.0001-2003.

Согласно этим документам требуемое аналитическое качество анализов определяется следующими характеристиками:

1. «Предельно допустимые значения смещения (В) и коэффициента общей аналитической вариации (CV), рассчитанные по 20 измерениям определяемого аналита в контрольном материале». В табл. 36 приведены объединенные данные нормативных документов, установленные путем экспертной оценки на основе сведений о биологической вариации и данных об аналитической вариации в лабораториях России.
2. «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, или:

$$CV < 0,5 CV_I$$

где CV - целевое значение коэффициента общей аналитической вариации, %; CV_I - коэф-

фициент внутрииндивидуальной биологической вариации, %.

Требования к целевому значению смещения формулируются в виде неравенства:

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

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

Таблица 36

Биологически обоснованные нормы аналитической точности клинических лабораторных исследований

№ п/п	Аналит	CV _I (%)	CV _G (%)	±B ₂₀ (%)	CV ₂₀ (%)
1	Активированное частичное тромбопластиновое время	4,4	8,9	3,4	3,0
92	Протромбиновое время	1,7	6,8	2,1	1,2
111	Тромбоциты, подсчет в крови	9,0	23,3	8,2	6,2

Внелабораторный контроль качества

Межлабораторный контроль качества показателей гемостаза организован в рамках Федеральной системы внешней оценки качества лабораторных исследований (ФСВОК). Ниже приведены соответствующие программы, в которых должна участвовать каждая КДЛ, занимающаяся исследованием гемостаза.

Раздел ФСВОК «Коагулология»: оценка качества исследований показателей плазмы крови в нормальном и патологическом диапазонах - протромбиновое время (индекс и международное нормализованное отношение); АЧТВ (индекс); фибриноген и тромбиновое время (индекс).

Контрольные образцы: лиофилизированная плазма человека.

Число циклов за год: 3 или 6 по выбору лаборатории.

«Коагулология-1,5»: для лабораторий, которым для двукратного измерения всех исследуемых из числа вышеперечисленных показателей достаточно 1,5 мл плазмы.

«Коагулология-3»: для лабораторий, которым для двукратного измерения всех исследуемых из числа вышеперечисленных показателей достаточно 3,0 мл плазмы.

«Коагулология-4,5»: для лабораторий, которым для двукратного измерения всех исследуемых из числа вышеперечисленных показателей достаточно 4,5 мл плазмы.

ПАТОЛОГИЯ ГЕМОСТАЗА

В норме в организме гемостатический баланс сохраняется при широком диапазоне активности различных компонентов. Однако в случае возникновения значительного дисбаланса компонентов системы гемостаза развиваются нарушения, характеризующиеся повышенной кровоточивостью, либо повышенной склонностью к тромбообразованию, либо одновременно обоими этими явлениями. К сожалению, в рамках настоящего издания нет возможности представить все аспекты нарушений гемостаза; здесь будут охарактеризованы только наиболее распространенные клинически значимые формы патологии свертывания крови.

Теоретически геморрагические проявления могут возникать при дефиците прокоагулянтов или избытке антикоагулянтов, а тромботические - наоборот. Однако в действительности, как правило, возникают более сложные ситуации. Например, патологическое снижение активности фибринолиза или значительное повышение активности факторов свертывания крови на практике нечасто приводят к развитию тромбозов, а снижение активности фактора XII или высокая актив-

ность антитромбина III могут не иметь 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.

Помимо изменения активности различных компонентов гемостаза, у пациентов с тромботическими проявлениями возможны так называемые «протективные» нарушения, т. е. нарушения субстрата, защищающие его от воздействия ингибитора или системы элиминации. При этом активность этого фактора (субстрата) может оставаться в пределах нормы, но неконтролируемое его участие в свертывании приводит к неограниченному тромбообразованию.

В табл. 37 описаны генетически детерминированные изменения активности некоторых факторов свертывания крови.

Таблица 37

Генетически детерминированные изменения некоторых факторов свертывания

Белок	Изменения	Патологическое состояние (нозология)	Проявления	Частота встречаемости	Характер наследования	Диагностически значимые тесты
1	2	3	4	5	6	7
Фибриноген (фактор I)	Снижение содержания в крови	Афибриногенемия, гипофибриногенемия	Кровотечения	1×10^6		АЧТВ, ПВ, ТВ, количество фибриногена
	Снижение активности	Дисфибриногенемия	Чаще умеренное кровотечение			АЧТВ, ПВ, ТВ, рептилазное время
	Повышение резистентности к плазмину	Дисфибриногенемия	Тромбозы			Время лизиса эуглобулинового сгустка (?). Исследование генетических маркеров

Патология гемостаза

Окончание табл. 37

1	2	3	4	5	6	7
Протромбин (фактор II)	Снижение активности	Гипопротромбинемия	Кровотечения	$0,5 \times 10^{-6}$		АЧТВ, ПВ, определение активности ф. II
	Повышение устойчивости к ингибиторам	Носительство протромботических мутаций ф. II (мутация А 20210)	Склонность к тромбозам			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 протромботических мутаций ф. V (фактор V Лейдена и др.)	Склонность к тромбозам			Исследование резистентности к АПС, анализ генетических маркеров
Фактор VII	Снижение активности	Дефицит фактора VII. Гипопротромбинемия	Кровотечения	2×10^{-6}	Аутосомно-рецессивное	ПВ, определение активности ф. VII
Фактор VIII	Снижение активности	Гемофилия А	Кровотечения	$3-20 \times 10^{-6}$	Связанное с полом	АЧТВ, определение активности ф. VIII
	Повышение устойчивости к ингибированию (?)	–	Склонность к тромбозам	?	?	Генетическое исследование
Фактор IX	Снижение активности	Гемофилия В (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	Кровотечения			АЧТВ, определение активности ф. XI
Фактор XII	Снижение активности	Дефицит ф. XII (болезнь Хагема-на)	Тромбозы (?), кровотечения (?)			АЧТВ
Фактор XIII	Снижение активности	Дефицит ф. XIII, дефицит фибрин-стабилизирующего фактора	Кровотечения, плохое заживление ран	$1-2 \times 10^{-6}$	Аутосомно-рецессивное	Исследование активности ф. XIII
Фактор V и VIII (комбинированный дефицит)	Комбинированное снижение активности ф. V и ф. VIII	Комбинированный дефицит ф. V и ф. VIII	Кровотечения	1×10^{-6}		АЧТВ, ПВ, определение активности ф. V и ф. VIII
Антитромбин III	Снижение активности	Дефицит анти-тромбина III	Тромбозы			Определение активности анти-тромбина III
Протеин С	Снижение активности	Дефицит протеина С	Тромбозы			Определение активности протеина С
Протеин S	Снижение активности	Дефицит	Тромбозы			Определение активности протеина S

Патология гемостаза

Задачи лабораторной службы при ведении пациентов с подозрением на нарушения системы гемостаза

При ведении пациентов с подозрением на нарушения системы гемостаза, как ни в каком другом разделе медицины, важны результаты лабораторных исследований. Многие геморрагические заболевания имеют сходную клиническую картину, однако требуют разных терапевтических подходов. Только лабораторная диагностика позволяет установить точный диагноз и назначить современную адекватную терапию. Тромботические проявления, как правило, возникают при сочетании разных протромботических факторов, как врожденных, так и приобретенных. Лабораторная диагностика позволяет выявить эти факторы и провести не только лечение развившегося тромбоза, но и 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:

1. Диагностика нарушений системы гемостаза:
 - выявление нарушенного звена или звеньев;
 - уточнение характера нарушения (дефицит синтеза, специфический или неспецифический ингибитор).
2. Контроль проводимой терапии.

Врожденные геморрагические заболевания

Наследственные геморрагические коагулопатии

Наследственные геморрагические коагулопатии, 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, что, 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, а больные концентрируются в гематологических центрах. Среди наследственных геморрагических заболеваний наиболее частой является болезнь Виллебранда, которая в некоторых популяциях встречается с частотой до 1%. Однако классически болезнь Виллебранда не относят к коагулопатиям. Среди наследственных геморрагических коагулопатии

наиболее распространены гемофилия А и В, гораздо реже встречается дефицит ф. VII (гипопротромбинемия). Дефицит других факторов свертывания встречается еще реже, а его 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 генноинженерным путем (рекомбинантные препараты). Также для лечения может применяться свежезамороженная или лиофилизированная плазма или ее первичные производные - криопреципитат или супернатант.

Патология гемостаза

Гемофилия А

Гемофилия А - геморрагическая коагулопатия, связанная со снижением активности фактора VIII в крови. Выделяют наследственную форму гемофилии, связанную с мутациями гена фактора VIII и приобретенную гемофилию.

Наследственная гемофилия А

Ген фактора VIII расположен в X-хромосоме, наследственная гемофилия А - заболевание, сцепленное с полом. Тяжелый врожденный дефицит ф. VIII встречается у лиц мужского пола. Женщины являются носителями гена, но у них очень редко возникают геморрагические проявления, связанные с дефицитом ф. VIII (рис. 130). Девочки могут иметь клинические проявления врожденной гемофилии в нескольких случаях: если обе X-хромосомы с дефектным геном ф. VIII (отец болен гемофилией, а мать является носителем гена гемофилии и передала ей дефектную хромосому); если активна только одна X-хромосома с дефектным геном ф. VIII (например, при синдроме Шерешевского-Тернера) и др.

Гемофилия А - наиболее распространенная геморрагическая коагулопатия. Встречается, по разным данным, с частотой от 3 до 20 случаев на 100 000 мужского населения. Примерно в половине случаев диагностируется тяжелая форма за-

болевания. В настоящее время существует несколько классификаций гемофилии по тяжести. Все они основаны на определении активности ф. VIII в крови. В табл. 38 приведена классификация гемофилии А, рекомендованная Всемирной федерацией гемофилии.

Помимо приведенной, предложены другие классификации, в которых тяжелая форма диагностируется при уровне фактора до 2 или 3%.

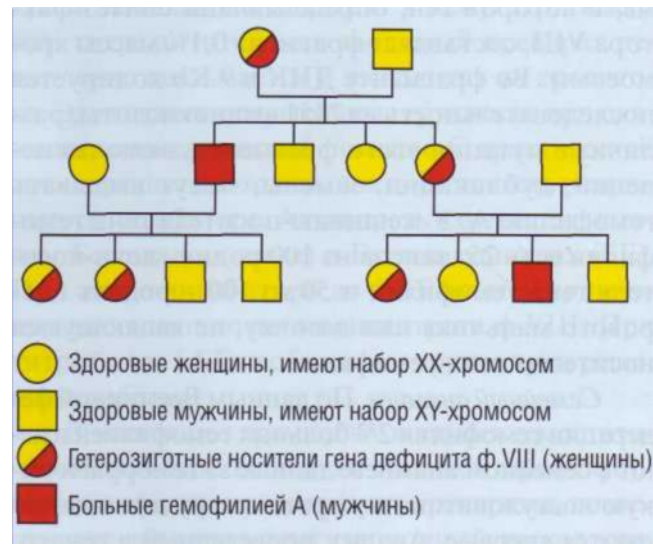


Рис. 130. Генетическое древо наследственной гемофилии. Поскольку ген ф. VIII и ф. IX находится в X-хромосоме и отсутствует в Y-хромосоме, риск передачи его от матери составляет 50%, а риск рождения мальчика - 25%

Таблица 38

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 нескольких 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, реже большего количества, суставов, 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

Патология гемостаза

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.

Генетика гемофилии А. Врожденная гемофилия А обусловлена дефектами в X-хромосоме, в которой ген, определяющий синтез фактора VIII, составляет фрагмент 0,1% массы хромосомы. Во фрагменте ДНК в 9 Kb кодируется последовательность из 2351 аминокислоты, различные мутации этого фрагмента, включая делеции, дубликации, замены, могут вызывать гемофилию А. У женщины-носителя гена гемофилии есть 25 шансов из 100 родить дочь-носителя гена гемофилии и 50 из 100 - родить здорового мальчика или девочку, не являющуюся носителем гена гемофилии.

Семейный анамнез. По данным Всемирной федерации гемофилии 2/3 больных гемофилией имеют в семейном анамнезе данные за геморрагическую коагулопатию, а у трети - 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 ДНК гена фактора VIII в настоящее время является важной частью обследования семьи больного гемофилией. В развитых странах в программы медицинского страхования больных гемофилией введен генетический анализ больных и их семей, что имеет большое практическое значение. Во-первых, это позволяет проводить семейную консультацию с оценкой риска рождения детей с гемофилией у родственников больного. Во-вторых, генетический анализ позволяет провести диагностику гемофилии у плода на ранних сроках беременности. В-третьих, выяснение характера мутации позволяет предсказать риск развития ингибитора к вводимому с лечебными целями фактору VIII. К сожалению, в нашей стране до настоящего времени генетический анализ малодоступен.

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 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.

Наиболее значимыми осложнениями гемофилии являются поражение опорно-двигательного аппарата, хроническая постгеморрагическая (железодефицитная) анемия. У пациентов, имевших в анамнезе внутричерепные кровоизлияния, выявляется остаточная неврологическая симптоматика.

Лечение гемофилии

Основным патогенетическим методом лечения гемофилии А является введение препаратов фактора VIII. Поскольку ф. VIII содержится в цельной крови и плазме, это были первые препараты, которые использовали для остановки острых кровотечений. Однако в настоящее время от их использования отказались из-за целого ряда серьезных недостатков. Во-первых, относительно низкое содержание ф. VIII в единице объема не позволяет создать в крови больного активность, достаточную для достижения гемостаза в сложных случаях. Во-вторых, поскольку содержание ф. VIII в каждой конкретной дозе неизвестно, нельзя точно дозировать препарат. В-третьих, имеется высокий риск инфицирования гемотрансмиссивными инфекциями (гепатитами и ВИЧ). В-четвертых, имеется проблема

Патология гемостаза

хранения. Цельная кровь и плазма могут храниться только при температурах ниже -20°C ограниченное время, что исключает их применение вне больницы. В-пятых, при частом применении возрастает число аллергических и анафилактических реакций.

Препаратом следующего поколения стал криопреципитат - осажденная при $+4^{\circ}\text{C}$ часть плазмы, содержащая большое количество ф. VIII, фибриногена и ф. XIII. По сравнению с кровью и плазмой криопреципитат содержит большее количество ф. VIII на единицу объема, что позволяет останавливать кровотечения даже при некоторых хирургических вмешательствах. Однако в остальном криопреципитат обладает теми же недостатками. В качестве гемостатического препарата при гемофилии А в развитых странах он практически не применяется.

Революционным шагом стала разработка высокоочищенных препаратов ф. VIII. Это позволило создать препараты с высокой активностью ф. VIII в малом объеме, что решило проблему достижения любой необходимой концентрации ф. VIII в крови реципиента. К тому же разработанные методы удаления вирусов позволили свести на нет риск заражения наиболее значимыми инфекциями, передающимися через кровь, - ВИЧ, гепатитами 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 такие препараты стоят дорого. Создание концентратов ф. VIII сделало возможным их профилактическое введение для предотвращения кровоизлияний в суставы. В настоящее время разработано четвертое поколение антигемофильных препаратов - концентраты рекомбинантного ф. VIII. При их производстве вообще не применяются компоненты крови человека, что теоретически полностью исключает риск инфицирования гемотрансмиссивными вирусами. К сожалению, стоимость этих препаратов значительно выше, чем препаратов производных человеческой плазмы.

Современные подходы к лечению гемофилии, с учетом стоимости гемостатических препаратов,

требуют регулярного контроля состояния гемостаза с обязательным определением активности дефицитного фактора.

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). При титре ингибитора до 5 БЕ возможно лечение высокими дозами концентрата ф. VIII. При титре более 5 БЕ необходимы другие пути решения проблемы.

В настоящее время 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 NovoSeven.

FEIBA - активированный концентрат факторов протромбинового комплекса. В его состав входят факторы IX, X, VIIa. Его внутривенное введение активирует образование протромбиназного комплекса.

NovoSeven - 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.

Коагулограмма при гемофилии А

Диагностический алгоритм гемофилии представлен в табл. 39:

- На первом этапе выполняются скрининговые тесты: время кровотечения, ПВ, АЧТВ, фибриноген, количество тромбоцитов.

Изменение коагулограммы при заболеваниях, сопровождающихся гемorragиями

	Гемофилия А	Гемофилия В	Болезнь Виллебранда	Дефицит витамина К
Время кровотечения	Норма	Норма	Удлинено	Норма, редко удлинено
ПВ	Норма	Норма	Норма	Удлинено
АЧТВ	Удлинено	Удлинено (редко нормальное)	Норма или удлинено	Удлинено
Фибриноген	Норма	Норма	Норма	Норма
Количество тромбоцитов	Норма	Норма	Норма или снижено (при форме 2В)	Норма
Уточняющие тесты				
ф. VIII:С	Снижен	Норма	Норма или снижен	Норма
ф. IX	Норма	Снижен	Норма	Снижен
Ристоцетин-кофакторная активность	Норма	Норма	Снижена или нормальная (при форме 2Н)	Норма
ф. VII, -X, -II	Норма	Норма	Норма	Снижен

- На втором этапе выполняются уточняющие тесты.
- После выявления удлинения АЧТВ и снижения активности ф. УШ проводится тест смешивания. Плазма пациента смешивается с нормальной контрольной плазмой (100% активности факторов) в соотношении 1:1. АЧТВ и активность ф. УШ определяются не медленно и после инкубации в течение часа при 37 °С. Если активность ф. УШ 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. УШ. Если активность снижается в обеих пробах (при исследовании сразу после смешивания и после часовой инкубации), можно заподозрить наличие волчаночного антикоагулянта.
- При наличии признаков специфического ингибитора на этапе первичной диагностики или при контрольном обследовании показано проведение исследования титра ингибитора по методу Бетезда.

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 опре-

деленной 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. В ряде случаев достаточно проводить однократное определение активности, но для большей точности дозирования дорогостоящих препаратов более надежный способ - это проведение теста восстановления активности ф. VIII после введения известной дозы препарата. Тест описан ниже.

Исследование активности ингибитора по методу Бетезда

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 2-3 последовательных разведений и вычислять среднее арифметическое.

Патология гемостаза

Пример. У пациента с подозрением на ингибиторную форму гемофилии активность ф.УШ в результатах тестов смешивания следующая (табл. 40).

Вычисляем по данным табл. 40. Разведение плазмы пациента 1/16 блокирует 20% активности ф.УШ 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. Так же 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.УШ 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.УШ в крови после введения концентратов в дозе 1 МЕ/кг веса по-

вышается в 1,5-2 раза, а период полувыведения составляет около 12 часов. Однако возможны значительные индивидуальные колебания этих показателей. Проведение теста восстановления активности ф.УШ 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 мин, 6, 12, 24 и 48 часов после введения препарата. Доза вводимого препарата должна быть не менее 25 МЕ/кг, но желательнее не более 50 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 меняются 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 влияние потребление фактора из-за кровотечения.

Таблица 40

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.УШ в контрольной плазме (%)	100	100	100	100	100	100
Ожидаемая активность ф.УШ в тесте разведения (соотношение 1:1) контрольной плазмы и плазмы пациента (%)	50	50	50	50	50	50
Активность ф.УШ в тесте смешивания 1:1 контрольной плазмы и разведенной плазмы пациента (%)	0	0	3	9	30	42

Клинический пример 3

Больной, возраст 2,5 года. Страдает гемофилией А тяжелой формы, ф.УШ:С 0,8%, получал гемостатическую терапию по требованию концентратом фактора VIII в дозе 250 МЕ на введение. В возрасте 1 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.УШ <0,5%, ф.IX 95%, ф.ХI 105%, ф.ХII 73%. АЧТВ после смешивания 1:1 с нормальной плазмой (активность ф.УШ 100%) 89 с. Предположили наличие специфического ингибитора к ф.УШ. 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.УШ в дозе 2000 МЕ 1 раз в 2 дня. Исследование ингиби-

Патология гемостаза

тора 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 у пациента.

Гемофилия В

Гемофилия В - геморрагическая коагулопатия, возникающая вследствие снижения активности фактора 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 - ГХа <1%, среднетяжелая - 1-5%, легкая форма - >5-30%. Встречаются врожденные и приобретенные формы. Причина меньшей частоты врожденных и приобретенных форм этого заболевания, возможно, кроется в меньшем размере гена и молекулы ф. IX, чем гена и молекулы ф. VIII. По этой же причине, вероятно, частота развития ингибиторных форм гемофилии В также значительно меньше, чем при гемофилии А.

В настоящее время для лечения гемофилии В применяются свежезамороженная плазма, криосупернатант (концентрат нативной плазмы), различные препараты концентрированного фактора IX. Осложнения лечения гемофилии В сходны с осложнениями лечения гемофилии А.

В табл. 41 представлены изменения основных коагулологических тестов у больных гемофилией В. Следует помнить, что 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. При наличии клинических проявлений легкой гемофилии необходимо исследовать активность ф. VIII и ф. IX.

Исследования активности ингибитора и теста восстановления проводятся 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.

Таблица 41

Изменения лабораторных показателей при гемофилии В

Скрининговые тесты	
Время кровотечения	Норма
ПВ	Норма
АЧТВ	Удлинено
Тромбиновое время (фибриноген)	Норма
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф. IX	Снижена

Дефицит фактора XI

Дефицит фактора XI (ранее заболевание определялось как гемофилия С) - геморрагическое заболевание, возникающее из-за дефекта гена фактора XI. Дефицит фактора XI передается как аутосомно-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, 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. 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.ХI между 50 и 70%.

Лечение. Для лечения геморрагических проявлений при дефиците ф.ХI используется свежемороженая плазма. Разработаны и концентрированные очищенные препараты ф.ХI, которые применяются в некоторых странах.

Лабораторная диагностика дефицита ф.ХI основана на проведении стандартных тестов коагулограммы и на определении активности ф.ХI в плазме (табл. 42).

Таблица 42

Изменения лабораторных показателей при дефиците ф.ХI

Скрининговые тесты	
Время кровотечения	Норма
ПВ	Норма
АЧТВ	Удлинено
Тромбиновое время (фибриноген)	Норма
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф.ХI	Снижена

Врожденный дефицит фактора VII (гипопротромбинемия)

Геморрагическое заболевание, возникающее вследствие дефицита активности ф. VII в плазме (гипопротромбинемия), передается как аутосомно-рецессивный признак. Литературных данных о распространенности этого заболевания практически нет, что, вероятно, связано с отсутствием клинических проявлений у многих пациентов с уровнем активности ф. VII выше 5%. При тяжелой форме с активностью ф. VII ниже 3% геморрагический синдром похож на проявления у больных тяжелой формой гемофилии А, включая эпизоды гемартрозов. Первые проявления могут возникать сразу после рождения: кровотечения из пупочного канатика, пупочной ранки, кефалогематомы, внутричерепные гематомы. В дальнейшем характерны кожные геморрагические проявления в виде множественных гематом и экхимозов, носовые, маточные кровотечения, длительные кровотечения после травм и хирургических процедур. Реже встречаются гематомы мягких тканей. Тяжесть геморрагических проявлений коррели-

Патология гемостаза

рует с активностью ф. VII. С целью коррекции гемостаза при дефиците ф. VII может вводиться свежемороженая плазма, концентраты факторов протромбинового комплекса. Имеется очищенный концентрат ф. VII.

Лабораторная диагностика дефицита ф. VII основана на изменении стандартных тестов коагулограммы и на определении активности ф. VII (табл. 43).

Таблица 43

Изменения лабораторных показателей при дефиците ф. VII

Скрининговые тесты	
Время кровотечения	Норма
ПВ	Снижено
АЧТВ	Норма
Тромбиновое время (фибриноген)	Норма
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф. VII	Снижена

Дефицит фактора X (болезнь Стюарта-Прауэра)

Болезнь Стюарта-Прауэра - редкое геморрагическое заболевание, вызванное дефицитом активности ф. X. Имеются немногочисленные литературные описания этого заболевания. Болезнь Стюарта-Прауэра передается как аутосомно-рецессивный признак. Наследственный дефицит ф. X встречается в популяциях с частыми родственными браками. Клинические проявления имеются в основном у гомозиготных носителей, у которых активность ф. X составляет около 1%. Реже у гомозигот может быть активность до 25%. Тяжесть заболевания коррелирует с активностью ф. X в крови. При тяжелой форме заболевания проявления сходны с таковыми при тяжелой гемофилии: гемартрозы, гематомы мягких тканей, кровотечения из ран слизистых, тяжелые послеоперационные кровотечения. Очень характерны для тяжелого врожденного дефицита ф. X внутричерепные кровоизлияния сразу после рождения и на первом году жизни, когда диагноз еще неизвестен. Часто эти эпизоды заканчиваются гибелью ребенка.

Геморрагические проявления при болезни Стюарта-Прауэра купируются применением све-

Патология гемостаза

жезамороженной плазмы или концентратов факторов протромбинового комплекса.

Лабораторная диагностика дефицита ф.Х основана на изменении стандартных тестов коагулограммы и определении активности ф.Х (табл. 44).

Клинический пример 4

Мальчик 3 мес. Родители обратились с жалобами на кожный геморрагический синдром в виде синяков в области груди и спины, кровотечение из слизистой рта в течение 3 суток. Кровотечения из мест инъекции после прививок не было. Проявлений кровоточивости в семейном анамнезе также не отмечалось. 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 х 107/л. АЧТВ 101с (норма 28-43 с), ПВ значи-

Дефицит фактора V (гипопротромбемия, или парагемофилия)

Наследственный дефицит ф. V - редкое аутосомно-рецессивное геморрагическое заболевание, для которого характерна умеренная или легкая кровоточивость по гематомному типу: послеоперационные и посттравматические кровотечения, гематомы мягких тканей, послеродовые кровотечения, меноррагии, эпистаксис, редко бывают гемартрозы. У новорожденных возможны внутричерепные гематомы.

У гомозиготных носителей активность ф. V, как правило, находится в пределах до 10%. Корреляция клинических проявлений и уровня активности ф. V в крови невысокая. Однако имеются данные, что геморрагические проявления при гомозиготном дефиците ф. V коррелируют с активностью ф. V в тромбоцитах, а этот показатель не всегда страдает при

Таблица 44

Изменения лабораторных показателей при дефиците ф.Х

Скрининговые тесты	
Время кровотечения	Норма
ПВ	Удлинено
АЧТВ	Удлинено
Тромбиновое время (фибриноген)	Норма
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф.Х	Снижена

тельно удлинено (не определяется), агрегация тромбоцитов с АДФ, коллагеном, адреналином и аггристином 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 был установлен диагноз: врожденный дефицит ф.Х, в дальнейшем подтвержденный генетическим анализом. Профилактическое введение концентрата протромбинового комплекса 1 раз в неделю в дальнейшем позволило избежать тяжелых геморрагических проявлений.

дефиците плазменного ф. V. Для гемостатической помощи применяют свежемороженную плазму. Лабораторная диагностика дефицита ф. V основана на изменении стандартных тестов коагулограммы и определении активности ф. V (табл. 45).

Таблица 45

Изменения лабораторных показателей при дефиците ф. V

Скрининговые тесты	
Время кровотечения	Норма
ПВ	Норма
АЧТВ	Удлинено
Тромбиновое время (фибриноген)	Норма
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф. V	Снижена

Патология гемостаза

Дефицит фактора II (гипопротромбинемия)

Наследственный дефицит протромбина - чрезвычайно редко встречающееся геморрагическое заболевание, связанное с мутацией гена ф. II. Различают гипо- и диспротромбинемии. Заболевание передается аутосомно-рецессивным путем.

Основные проявления - кожный гемосиндром в виде гематом и экхимозов, эпистаксис, маточные кровотечения, тяжелые кровотечения после хирургических вмешательств. Гемартрозы редки. Тяжесть геморрагического синдрома, как правило, соответствует уровню активности ф. II в крови. Пациенты с активностью протромбина менее 2% не описаны. Видимо, такой дефект не совместим с жизнью.

Лабораторная диагностика дефицита ф. II основана на проведении стандартных тестов коагулограммы и на определении активности ф. II (табл. 46).

Таблица 46

Изменения лабораторных показателей при дефиците ф. II

Скрининговые тесты	
Время кровотечения	Норма
ПВ	Удлинено
АЧТВ	Удлинено
Тромбиновое время (фибриноген)	Норма
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Активность ф. II	Снижена

Афибриногенемия, гипофибриногенемия и дисфибриногенемия

Наследственные количественные и качественные нарушения фибриногена, приводящие к развитию геморрагических или тромботических состояний, встречаются достаточно часто. В этом разделе коротко представлены геморрагические заболевания, связанные с нарушением синтеза фибриногена.

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. Отсутствие фибриногена плазмы не всегда сочетается с дефицитом фибриногена ос-гранул тромбоцитов, поэтому тромбоцитарный тромб может формироваться.

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 *дисфибриногенемий* соответствует состоянию, при котором изменена структура фибриногена, однако содержание самого белка в крови (антигена) нормальное или снижено непропорционально функции. Дисфибриногенемий могут проявляться кровотечениями, тромбозами или не иметь никаких проявлений. Клинические проявления геморрагических дисфибриногенемий сходны с проявлениями гипофибриногенемии.

Лабораторная диагностика количественных и качественных нарушений фибриногена основана на изменении стандартных тестов коагулограммы (табл. 47). Для установления диагноза дисфибриногенемий показано проведение дополнительных тестов. Часто этот диагноз можно поставить только после исследования гена ф. I.

Таблица 47

Изменение скрининговых тестов при афибриногенемии

Тесты	Изменения
Время кровотечения	Чаще удлинено
ПВ	Значительно удлинено (не определяется)
АЧТВ	Значительно удлинено (не определяется)
Тромбиновое время	Значительно удлинено (не определяется)
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Количество фибриногена	Не определяется
Изменения скрининговых тестов при гипофибриногенемии	
Время кровотечения	Как правило, нормальное
ПВ	Нормальное или удлинено
АЧТВ	Нормальное или удлинено
Тромбиновое время	Удлинено
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Количество фибриногена	Определяется, но <1,5 г/л
Изменения скрининговых тестов при дисфибриногенемии	
Время кровотечения	Как правило, нормальное
ПВ	Нормальное или удлинено
АЧТВ	Нормальное или удлинено
Тромбиновое время	Удлинено
Количество тромбоцитов	Норма
Уточняющие тесты	
Соотношение антиген фибриногена/количество фибриногена, определенное коагулологическим методом, значительно больше единицы	

Патология гемостаза

Дополнительным тестом, позволяющим по косвенным признакам заподозрить дисфибриногению, является тромбозластография.

Дефицит факторов контактной активации

Дефицит ф.ХII, 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.ХII (болезнь Хагемана) имеются разнонаправленные тенденции. У большинства из них, даже при глубоком дефи-

ците, нет геморрагических проявлений, однако у некоторых пациентов этой группы имеет место повышенная кровоточивость. Некоторые пациенты с дефицитом ф.ХII имеют тенденцию к тромботическим проявлениям.

Распространенность дефицита ф.ХII в популяции довольно высока. Большинство случаев удлинения АЧТВ у пациентов без клинических проявлений связано с этой патологией. По некоторым данным частота гетеро- и гомозиготных форм дефицита ф.ХII в популяции достигает 1,5-3%.

Лабораторные данные при дефиците ф.ХII, ПК, ВМК представлены в табл. 48.

Таблица 48

Изменения скрининговых тестов при дефиците факторов контактной активации

Тест	ф.ХII	ПК	ВМК
Время кровотечения	Нормальное	Нормальное	Нормальное
ПВ	Нормальное	Нормальное	Нормальное
АЧТВ	Удлинено	Удлинено	Удлинено
Тромбиновое время	Нормальное	Нормальное	Нормальное
Количество тромбоцитов	Нормальное	Нормальное	Нормальное
Уточняющие тесты			
Активность ф.ХII	Снижена	Нормальная	Нормальная
Активность ПК	Нормальная	Снижена	Нормальная
Активность ВМК	Нормальная	Нормальная	Снижена

Комбинированный врожденный дефицит факторов свертывания

Встречаются два основных типа врожденных комбинированных дефектов факторов свертывания крови.

Первый тип возникает вследствие общности мутации:

- Сочетанный дефицит факторов V и VIII связан с дефектом гена, расположенного на длинном плече 18-й хромосомы. Ген отвечает за синтез белка, участвующего в осуществлении транспортной функции в эндоплазматическом ретикулуме. Этот белок участвует в транспорте в том числе факторов V и VIII.

- Комбинированный дефицит факторов II, V, IX, X возникает у пациентов с 1-м доминантным типом эластической псевдоксантомы, при варфариновой эмбриопатии, мутации гена гаммаглутамилкарбоксилазы.
- Комбинированный дефицит факторов VIII и IX, гены которых расположены на X-хромосоме, возникает вследствие дефекта хромосомы, затрагивающего оба гена.
- Комбинированный дефицит факторов VII и X, связанный с делецией 13-й хромосомы.

Второй тип возникает вследствие независимых мутаций гена у одного пациента.

Диагностика комбинированных мутаций проводится по стандартному плану.

Врожденные нарушения функции тромбоцитов

Врожденные нарушения функции тромбоцитов - достаточно гетерогенная группа тромбоцитопатий. До настоящего времени исследуются внутриклеточные механизмы активации и функционирования тромбоцитов, которые обеспечиваются разнообразными функциональными механизмами. Поэтому существует несколько предложений по классификации наследственных тромбоцитопатий, одна из них, которая учитывает наиболее разработанные представления о метаболизме и регуляции тромбоцитарных функций, представлена в табл. 49.

На рис. 131 показана схема нарушения функции тромбоцитов при наиболее распространенных врожденных дефектах.

Клинические проявления врожденных нарушений функции тромбоцитов для большинства заболеваний сходны. Отмечается разной

степени выраженности кровоточивость по микроциркуляторному типу: петехии, экхимозы, длительные первичные кровотечения после травм слизистых, первичные послеоперационные кровотечения, носовые кровотечения, маточные кровотечения на фоне менструации. В большинстве случаев геморрагический синдром выражен не сильно и редко угрожает жизни. Исключение составляют такие заболевания, как тромбастения Гланцмана и синдром Бернара-Сулье, при которых возможны опасные для жизни проявления: внутричерепные кровоизлияния, тяжелые маточные и носовые кровотечения, кровотечения со слизистых других локализаций, послеоперационные кровотечения. При тромбастении Гланцмана описаны гемартрозы с развитием артропатии, сходной с гемофилической.

Таблица 49

*Классификация врожденных нарушений функции тромбоцитов
(Rao. Am J Med Sci 1998; 316: 69-77)*

<p>Дефекты взаимодействия тромбоцитов – сосудистая стенка (дефекты адгезии)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Болезнь Виллебранда (нарушение фактора Виллебранда) (см. раздел «Болезнь Виллебранда») – Псевдоболлезнь Виллебранда – Синдром Бернара–Сулье (дефект GPIb) <p>Дефекты межтромбоцитарного взаимодействия (дефекты агрегации)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Врожденная афибриногенемия (отсутствие плазменного фибриногена) – Тромбастения Гланцмана (дефект GPIIb-IIIa) <p>Нарушения функции секреции и передачи сигнала</p> <ul style="list-style-type: none"> – Аномалии гранул <ul style="list-style-type: none"> • Дефицит пула хранения • Квебекская аномалия тромбоцитов – Дефекты передачи сигнала (первичные дефекты секреции) <ul style="list-style-type: none"> • Дефекты тромбоцитарных рецепторов: рецептора тромбосана A₂, коллагена, АДФ, эпинефрина (адреналина) • Дефекты активации протеина G, дефицит Gαq • Дефекты метаболизма фосфатидилинозитола, дефицит фосфолипазы C-32 • Дефекты мобилизации кальция – Аномалии обмена арахидоновой кислоты и синтеза тромбосана A₂ <ul style="list-style-type: none"> • Снижение высвобождения арахидоновой кислоты • Дефицит циклооксигеназы • Дефицит тромбосансинтазы <p>Дефекты регуляции цитоскелета</p> <ul style="list-style-type: none"> – Синдром Вискотта–Олдрича <p>Нарушения взаимодействия тромбоцитов с белками гемостаза</p> <ul style="list-style-type: none"> – Дефект фиксации факторов Va и Ха на поверхности тромбоцитов (синдром Скотта)

Патология гемостаза

Изменения лабораторных тестов при врожденных нарушениях функции тромбоцитов представлены в табл. 50.

Индукцированная агрегация на различные активаторы является одним из наиболее показательных лабораторных тестов для выявления на-

следственных нарушений функции тромбоцитов (рис. 132). Наиболее значимые лабораторные тесты, используемые для диагностики врожденных нарушений функций тромбоцитов, суммированы в табл. 51.

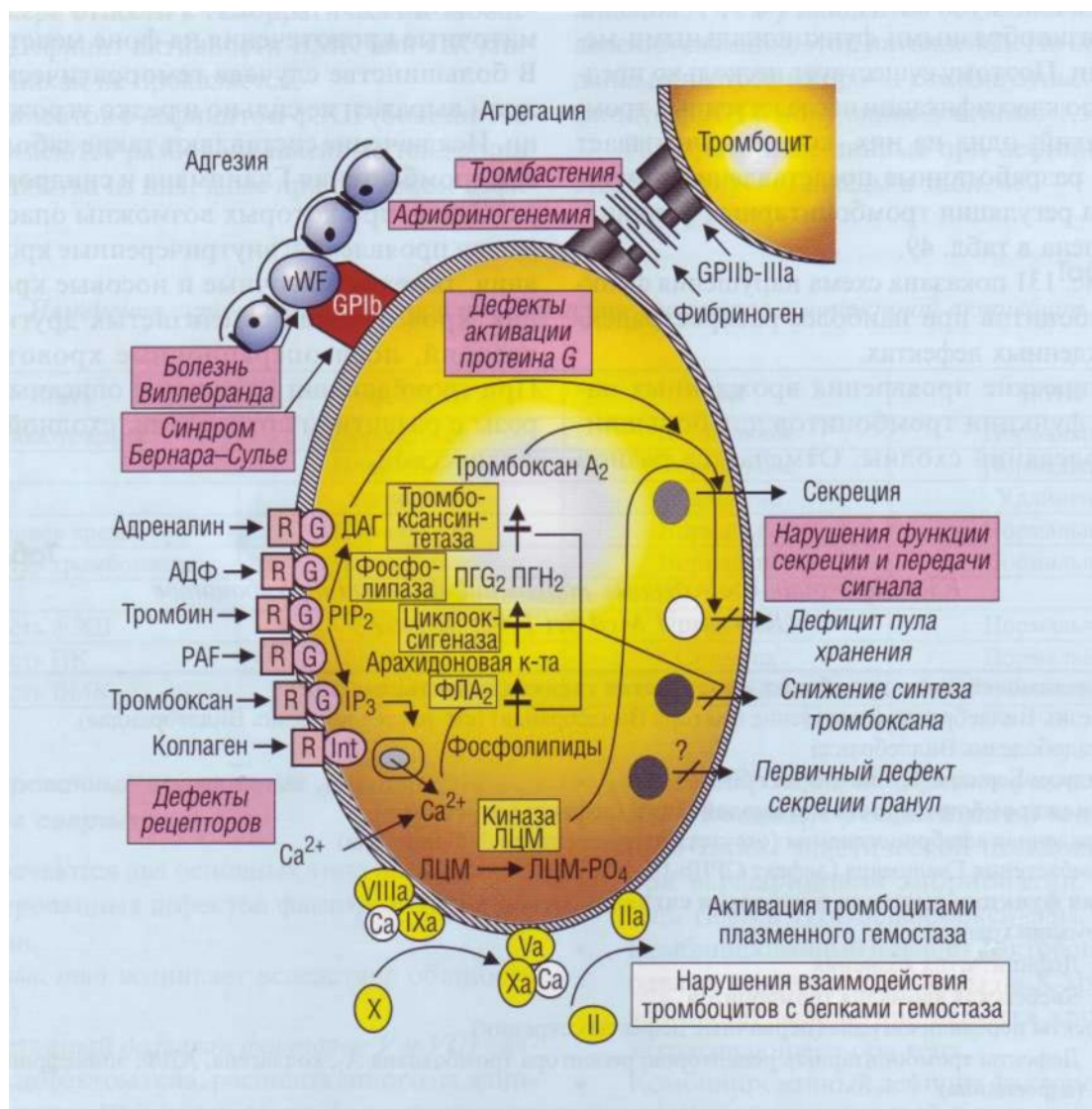


Рис. 131. Схема механизмов развития врожденных нарушений функции тромбоцитов. DAG - диацилглицерол, ЛЦМ - легкие цепи миозина, ПГС₂ и ПГН₂ - эндоперекиси, ФЛА₂ - фосфолипаза А₂, G - G-белок, IP₃ - инозитолтрифосфат, PAF - тромбоцит-активирующий фактор, PIP₂ - фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, R - рецептор, vWF - фактор Виллебранда

Патология гемостаза

Врожденные нарушения функции тромбоцитов

Таблица 50

	Тип наследования	Количество тромбоцитов	Размер тромбоцитов	Агрегация тромбоцитов				
				Адреналин	АДФ	Коллаген	Ристоцетин	Арахидоновая кислота
Нарушения адгезии								
Псевдоблезнь Виллебранда	А-Д	↓	Норма	+	+	+	Усилена	+
Синдром Бернара–Сулье	А-Р	↓	Крупные	+	+	+	–	+
Первичные нарушения агрегации								
Тромбастения Гланцмана	А-Р	Норма	Норма	–	–	–	+	~
Вторичные нарушения агрегации								
Дефекты пулов хранения								
Дефицит плотных гранул	А-Р	Норма	Норма	–	±	–	±	±
Дефицит α-гранул (синдром серых тромбоцитов)	А-Р	↓	Крупные	+	±	±	+	+
Смешанный дефицит α- и плотных гранул	А-Д			±	±	–	±	±
Квебекская аномалия тромбоцитов	А-Д	↓	Норма	–	+	+	+	+
Нарушения секреции	Различный	Норма	Норма	–	±	–	±	–
Нарушения прокоагулянтной активности тромбоцитов. Синдром Скотта	А-Р	Норма	Норма	+	+	+	+	+

А-Р - аутосомно-рецессивный, А-Д - аутосомно-доминантный, «+» - присутствует, нормальная, «-» - отсутствует или снижена, «±» - вариабельна либо слегка снижена.

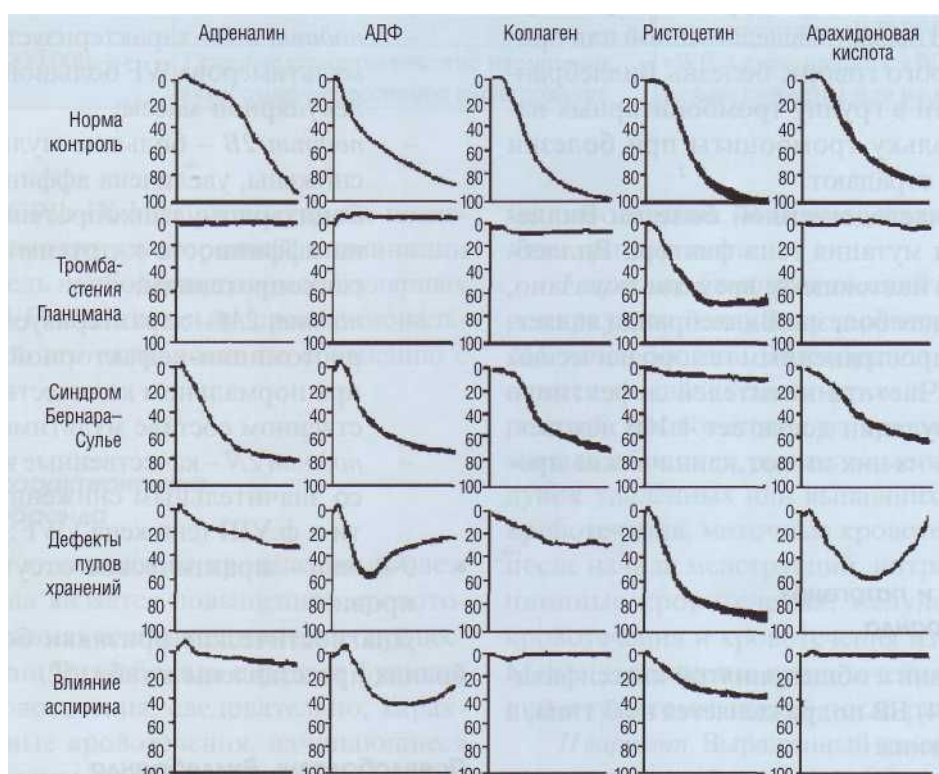


Рис. 132. Агрегация тромбоцитов с различными индукторами у здоровых людей и при врожденных нарушениях функции тромбоцитов

Наиболее значимые лабораторные тесты, используемые для диагностики врожденных нарушений функций тромбоцитов

Первичные тесты
<ul style="list-style-type: none"> • Количество тромбоцитов в периферической крови • Время кровотечения • Исследование агрегации тромбоцитов • Ретракция кровяного сгустка
Подтверждающие тесты
<ul style="list-style-type: none"> • Определение гликопротеинов GPIb-V-IX, GPIIb-IIIa • Электронно-микроскопическое или иммунологическое исследование гранул и цитоскелета тромбоцитов • Исследование реакции высвобождения • Определение активности тромбоксансинтазы и циклооксигеназы • Исследование агрегации тромбоцитов с низкими и обычными разведениями ристоцетина • Определение прокагулянтной активности тромбоцитов (определение формирования протромбиназного комплекса)

Наследственная болезнь Виллебранда

Болезнь Виллебранда (БВ) - геморрагическое заболевание, являющееся следствием качественных или количественных нарушений фактора Виллебранда. БВ бывает наследственной или приобретенной. Строго говоря, болезнь Виллебранда нельзя отнести в группу тромбоцитарных нарушений, поскольку тромбоциты при болезни Виллебранда не страдают.

Причиной наследственной болезни Виллебранда является мутация гена фактора Виллебранда (vWF). К настоящему времени показано, что наследственная болезнь Виллебранда является наиболее распространенным геморрагическим заболеванием. Частота носителей дефектного гена vWF в популяции достигает 1:100 человек, но лишь 10-30% из них имеют клинические проявления.

Классификация и патогенез болезни Виллебранда

В соответствии с общепринятой классификацией (Sadler, 1994) БВ подразделяется на 3 типа, а тип 2 - на 4 подтипа:

- 1-й тип - наследственное заболевание с частичным дефицитом vWF в крови и нормальным распределением мультимеров vWF;

- 2-й тип - наследственная патология с качественным изменением vWF. Второй тип подразделяют на 4 подтипа:
 - подтип 2A - характеризуется снижением мультимеров vWF большой и средней молекулярной массы;
 - подтип 2B - большие мультимеры vWF снижены, увеличена аффинность к тромбоцитарному гликопротеину 1b и снижена аффинность к другим рецепторным гликопротеинам;
 - подтип 2M - характеризуется сниженной ристомин-кофакторной активностью при нормальном количественном и качественном составе мультимеров vWF;
 - подтип 2N - качественные варианты vWF со значительным снижением аффинности к ф. VIII (снижена vWF:FVIIIb);
- 3-й тип - практическое отсутствие vWF в крови.

Диагностические признаки болезни Виллебранда представлены в табл. 52.

Псевдобольная Виллебранда

Псевдобольная Виллебранда (тромбоцитарный тип) возникает вследствие повышенного связы-

Клинические особенности и диагностические признаки болезни Виллебранда (БВ)

Под-типы	Частота встречаемости	Клинические особенности	Диагностика
Тип 1	1–30:1000; наиболее распространенный вариант БВ (>70% всех случаев)	Легкие и умеренные признаки кровото- чивости; аутосомно-доминантный тип наследования с неполной пенетрантно- стью (примерно 60%)	vWF:Ag, активность vWF и ф.VIII сниже- на пропорционально (20–50%). Все фрак- ции мультимеров представлены пропор- ционально
Тип 2А	Приблизительно 10–15% всех кли- нически значимых случаев БВ	Легкие и умеренные признаки кровото- чивости; чаще аутосомно-доминантное, но возможно и аутосомно-рецессивное наследование с более полной пенетрант- ностью, чем при 1-м типе	Вариабельное снижение vWF:Ag, актив- ности vWF и ф.VIII, отсутствие высоко- и среднемoleкулярных мультимеров vWF
Тип 2В	Довольно редкий вариант (<5% всех клинически значи- мых случаев БВ)	Легкие и умеренные признаки кровото- чивости; чаще аутосомно-доминантное наследование с более полной пенетрантностью, чем при 1-м типе	Возможно снижение vWF:Ag и ф.VIII; уменьшение высокомолекулярных мульт- имеров, положительная агрегация с низ- кими концентрациями ристоцетина, лег- кая и умеренная тромбоцитопения
Тип 2М	Редкий тип (еди- ничные описания)	Тяжесть геморрагических расстройств различна; аутосомно-доминантный тип наследования	Вариабельное снижение vWF:Ag и ф.VIII. Активность vWF снижена относительно антигена, несмотря на присутствие высо- комoleкулярных мультимеров vWF
Тип 2N	Встречается редко	Разнообразные по тяжести геморрагиче- ские нарушения. Клинические наруше- ния сходны с нетяжелыми формами ге- мофилии А. Наследование аутосомное	Активность vWF:Ag и vWF различны, часто нормальные. Диспропорционально снижен ф.VIII. Как правило, нормальное распределение мультимеров, снижение или отсутствие vWF:F.VIIB
Тип 3	1–5:1 000 000	Тяжелые геморрагические нарушения; аутосомно-рецессивное наследование	vWF:Ag, активность vWF и ф.VIII значи- тельно снижены или не определяются

вания vWF с GPIb-IX-V за счет мутации послед- ного. Это приводит к ускоренной элиминации в первую очередь наиболее высокомолекулярных комплексов vWF из плазмы и диспропорциональ- ному снижению его активности по сравнению с антигеном.

Клиническая характеристика болезни Виллебранда

Основным клиническим проявлением болез- ни Виллебранда является повышенная кровото- чивость при травмах или патологических процес- сах. При болезни Виллебранда страдает функция остановки кровотечения, следовательно, харак- терны первичные кровотечения, начинающиеся сразу после травмы.

Характер и тяжесть геморрагического синд- рома при болезни Виллебранда зависят от фор-

мы заболевания. В целом можно условно выде- лить три варианта:

I вариант. Геморрагический синдром по мик- роциркуляторному типу характерен для 1, 2А, 2В, 2М типов болезни Виллебранда. Типичными яв- ляются кожный гемосиндром в виде экхимозов, петехий, кровотечения из травмированных сли- зистых оболочек, длительные кровотечения из лунок удаленных или выпавших зубов, носовые кровотечения, маточные кровотечения у девочек после начала менструаций, интра- и послеопера- ционные кровотечения, желудочно-кишечные кровотечения и кровотечения из мочевых путей. Менее характерны кровотечения из мест инъек- ций и гематомы тканей после различных травм.

II вариант. Выраженный геморрагический син- дром по смешанному (гематомному и микроцирку- ляторному) типу. Этот вариант характерен для больных тяжелыми формами 1-го и 3-го типов бо-

Патология гемостаза

лезни Виллебранда, клинически напоминает гемофилию. Первые проявления могут отмечаться в период новорожденности: кожный гемосиндром, гематомы и кровотечения из мест инъекций. У детей и подростков возникают гематомы мягких тканей, кровотечения при травмах слизистой рта, смене зубов, кровотечения из ран кожи и слизистых, носовые, кишечные кровотечения, кровотечения из мочевых путей. После начала менструаций у девочек нередко маточные кровотечения. Кровоизлияния в суставы, так же как и при гемофилии, могут начаться на первом году жизни. Эти больные страдают от интра- и послеоперационных кровотечений.

/// вариант. Клиническая картина сходна с таковой у больных гемофилией А с аналогичным уровнем фактора VIII: гематомный тип кровоточивости, редко сопровождающийся поражением суставов. Для этого варианта болезни Виллебранда характерен кожный гемосиндром в виде гематом, отсроченные (возникающие через несколько часов или дней после наступления травмы) кровотечения при травмах и после операций. Могут возникать посттравматические гематомы мягких тканей.

Осложнения геморрагических проявлений. Наиболее частым проявлением геморрагическо-

го синдрома у детей является хроническая постгеморрагическая анемия. Артриты суставов возникают у детей с рецидивирующими гемартрозами при 3-м типе болезни Виллебранда. Также описаны единичные случаи формирования псевдоопухолей у пациентов с болезнью Виллебранда.

Лабораторная диагностика болезни Виллебранда

Диагностика болезни Виллебранда основана на анализе анамнестических, клинических и лабораторных данных.

Диагностические критерии болезни Виллебранда:

- Типичный геморрагический синдром.
- Признаки снижения специфической активности vWF: vWF:RCo, vWF:RCB, vWF:FVIIIb.
- Для типа 2В типична положительная реакция агрегации тромбоцитов при использовании в качестве индуктора ристоцетина в низкой концентрации.

Дифференциальный диагноз болезни Виллебранда представлен в табл. 53.

Таблица 53

Дифференциальный диагноз болезни Виллебранда

Тесты	Заболевания									
	БВ, типы 1, 3, 2А, 2М	БВ, тип 2В	БВ, тип 2N	Тромбоцитопатия Бернара-Сулье	Тромбастиения Гланцмана	Гемофилия А	Другие коагулопатии	Другие тромбоцитопении	Волчаночный антикоагулянт	Приобретенный синдром Виллебранда
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Время кровотечения	Н/↑	Н/↑	Чаше Н	Чаше ↑	↑	Н	Н, редко ↑	Н/↑	Н	Н/↑
АЧТВ	Н/↑	Н/↑	↑	Н	Н	↑	Н/↑	Н	Н/↑	Н/↑
ПВ	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н/↑	Н	Н/↑	Н
Количество тромбоцитов	Н	↓, может повышаться до нормы	Н	↓	Н	Н	Н	↓	↓/Н	Н/↓
vWF:RCo	↓	↓, реже Н	Н/↓	Н	Н	Н	Н	Н	Как правило, Н	↓

Патология гемостаза

Окончание табл. 53

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
vWF:Ag	↓ (кроме типа 2М)	Н/↓	Н/↓	Н	Н	Н	Н	Н	Как правило, Н	↓
ф.VIII	Н/↓ (кроме типа 2М)	Н/↓ (кроме типа 2М)	↓	Н	Н	↓	Н	Как правило, Н	Часто ↓	Н/↓
Агрегация с АДФ, коллагеном, адреналином	Н	Н	Н	Н	↓/Н	Н	Н		Может быть ↓	Н
Агрегация с ристоцетином	↓/Н	↓/Н	Как правило, Н	↓/Н	Н	Н	Н		Как правило, Н	↓/Н
Кровоточивость	По микроциркуляторному или смешанному типу	По микроциркуляторному типу	По гематомному типу	По микроциркуляторному типу	По микроциркуляторному типу	По гематомному типу	По гематомному или смешанному типу	По микроциркуляторному типу	Нет признаков кровоточивости	По микроциркуляторному типу
Наследование	А-Д с неполной пенетрантностью, (для 3-го типа А-Р)	А-Д с неполной пенетрантностью	А-Д с неполной пенетрантностью	А-Р	А-Р	Сцепленное с полом			Нет	Нет

vWF:Ag - антиген фактора Виллебранда, vWF:RCo - коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда, ф.VIII - фактор коагуляции VIII, А-Д - аутосомно-доминантное, А-Р - аутосомно-рецессивное.

Клинический пример 5

Мальчик, 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 свежзамороженной 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 с), активность ф.VIII 1,5%, активность ф.IX 55%, **ристоцетин-кофакторная активность <3%, агрегация тромбоцитов с аггристином отсутствует; агрегация с АДФ, коллагеном и адреналином - нормальная.**

*Ребенку был выставлен диагноз: **болезнь Виллебранда, тип 3.** В дальнейшем гемостатическая терапия препаратами, содержащими фактор Виллебранда, позволила останавливать кровотечения.*

Патология гемостаза

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 болезни Виллебранда часто снижены как vWF, так и ф. VIII. При гемофилии А уровень ф. VIII снижен, а vWF нормальный (рис. 133).

В табл. 54 представлены изменения основных коагулологических тестов у пациентов с болезнью Виллебранда (тип 1) по сравнению с больными гемофилией А с геморрагическими проявлениями и при передозировке непрямыми антикоагулянтами (дефиците витамина К).

Таблица 54

Изменение 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

Алгоритм диагностики болезни Виллебранда

Необходимый минимум обследования: время кровотечения, количество тромбоцитов, ПВ,

АЧТВ, агрегация, индуцированная ристоцетином, ристомин-кофакторная активность фактора Виллебранда.

При снижении vWF:RCo следует определить антиген фактора Виллебранда (vWF:Ag), рассчитать отношение vWF:RCo/vWF:Ag.

При подозрении на тип 2В требуется выполнить индуцированную агрегацию с низкими дозами ристоцетина, а при подозрении на тип 2N - определить vWF:F.VIIIВ.

В дальнейшем для типирования формы болезни Виллебранда следует провести тесты в соответствии с табл. 55.

Соотношение активности фактора Виллебранда и группы крови

Исследования активности и антигена фактора Виллебранда у здоровых лиц показали, что vWF:RCo и vWF:Ag в целом не одинаковы у людей с разными группами крови. У лиц с 1-й группой имеет место наиболее низкое содержание фактора Виллебранда. Ниже приведены нормы vWF:Ag в зависимости от группы крови, рекомендованные Всемирной ассоциацией тромбоза и гемостаза.

Группа крови	Нормальное содержание vWF:Ag		
	36-157	49-234	57-241
1(0)	64-238		
2(A)			
3(B)			
4(AB)			

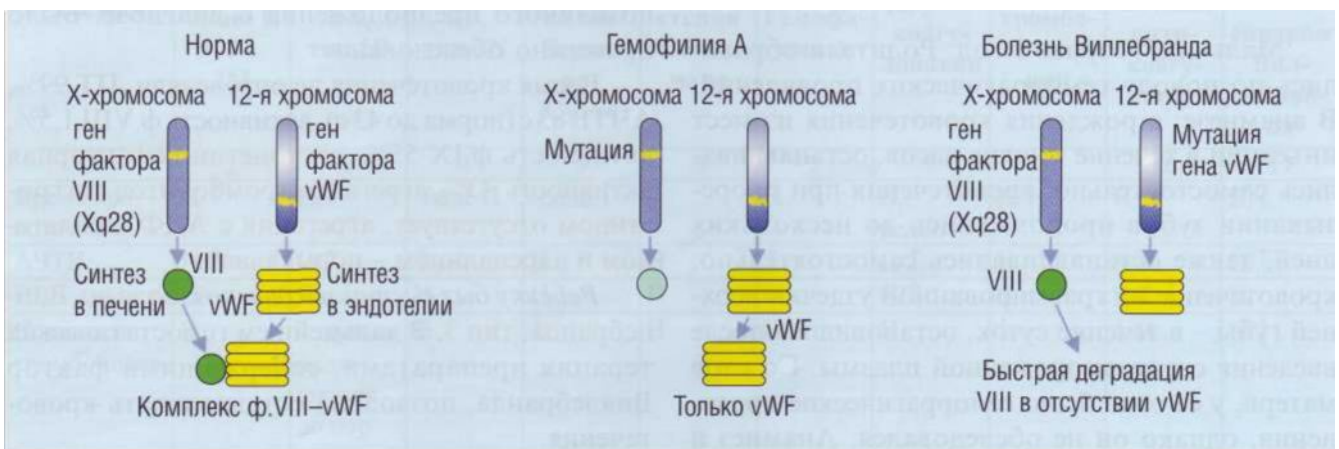


Рис. 133. Комплекс ф. VIII—vWF определяется синтезом фактора VIII на основе информации в X-хромосоме и синтезом vWF, программированном в 12-й хромосоме. Гемофилия А зависит от мутации в X-хромосоме, болезнь Виллебранда - от мутации в 12-й хромосоме

Дифференциальный диагноз форм болезни Виллебранда

Тест	Тип болезни Виллебранда						
	1	3	2A	2B	2M	2N	Псевдо-БВ
vWF:Ag	Снижен, но >5%	<5%	Снижен, редко нормальный	Снижен или нормальный	Нормальный или снижен	Нормальный или снижен	Нормальный или снижен
vWF:RCo	Снижена	Значительно снижена (практически отсутствует)	Снижена	Снижена или нормальная	Снижена	Нормальная	Нормальная или снижена
vWF:F.VIIIСВ	Снижена	Значительно снижена (практически отсутствует)	Снижена	Снижена или нормальная	?	Нормальная	Снижена
Агрегация с ристоцетином	Снижена или нормальная	Значительно снижена (отсутствует)	Снижена	Нормальная или умеренно снижена	Снижена или нормальная	Как правило, нормальная	Нормальная или умеренно снижена
Агрегация с низкими дозами ристоцетина	Нет	Нет	Нет	Есть	Нет	Нет	?
vWF:RCo/vWF:Ag	Нормальное	Практически не определяется	Снижено ($\leq 0,7$)	Нормальное или снижено	Значительно снижено ($\leq 0,7$)	Нормальное	Чаще снижено ($\leq 0,7$)
Время кровотечения	Удлинено или нормальное	Удлинено	Удлинено	Удлинено	Удлинено или нормальное	Как правило, нормальное	Удлинено
ф. VIII	Умеренно снижен или нормальный	Снижен значительно	Снижен или нормальный	Нормальный или снижен	?	Снижен	Нормальный или снижен
Количество тромбоцитов	Нормальное	Нормальное	Нормальное	Снижено, реже нормальное	Нормальное	Нормальное	Нормальное или умеренно снижено
Мультимеры	Пропорционально снижены все	Нет	Нет тяжелых и средних	Снижены тяжелые	Нормальные	Нормальные	Несколько снижены тяжелые
vWF:F.VIIIВ	Нормальная или снижена	Снижена	Нормальная или снижена	Как правило, нормальная	Нормальная	Значительно снижена	Нормальная или снижена

80% лиц с диагностированной лабораторно БВ имеют 0 группу крови. У людей с не первой группой крови риск венозного тромбоза и ИБС примерно в 2 раза выше по сравнению с лицами с 1-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

При рассмотрении вопроса о лечении болезни Виллебранда надо понимать, что речь идет о терапии или профилактике проявлений болезни. Гемостатические препараты можно разделить на 2 большие группы - специфические гемостатические препараты, повышающие активность vWF в крови, и неспецифические гемостатические препараты.

Патология гемостаза

Специфическая гемостатическая терапия (ДДАВП, концентраты фактора Виллебранда). Десмопрессин (1-дезамино-8D-аргинин-вазопрессин, ДДАВП) - синтетический аналог антидиуретического гормона вазопрессина, стимулирует высвобождение vWF из депо, что приводит к повышению его концентрации в плазме. Наиболее эффективно применение ДДАВП при 1-м типе болезни Виллебранда, возможен эффект при типе 2А болезни Виллебранда. Во всех остальных случаях показано применение препаратов vWF. Наиболее рационально использование очищенных, вирус-инактивированных концентратов ф. VIII+vWF.

Неспецифические гемо статические препараты. Ингибиторы фибринолиза - эпсилон-аминокапроновая кислота, трансэксамовая кислота - могут применяться внутривенно, перорально или местно.

Местные гемостатические препараты, такие, как фибриновый клей, гемостатическая губка и др., показаны в первую очередь при оперативном лечении и в стоматологической практике.

Этамзилат (дицинон) применяется в качестве дополнительного гемостатического препарата при купировании кровотечений различной этиологии. В ряде случаев препарат эффективен для профилактики носовых кровотечений.

Осложнения терапии БВ. У больных с 3-м типом БВ примерно в 10-15% случаев к вводимому vWF развиваются блокирующие антитела (инги-

битор). При ингибиторе введение концентратов vWF противопоказано из-за риска развития постинфузионных анафилактических реакций. В этих случаях возможно применение противоингибиторных препаратов (NovoSeven), ингибиторов фибринолиза и терапии, направленной на элиминацию ингибитора (гормональная терапия, плазмаферез, в/в иммуноглобулин и др.).

Лабораторный контроль за лечением болезни Виллебранда очень важен. Дело в том, что созданы единичные препараты, в которых известны и строго контролируются активность и мультимерный состав vWF. В России в настоящее время такие препараты не зарегистрированы. Поэтому необходимо контролировать состояние гемостаза, особенно у больных тяжелыми формами БВ 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 повторять тест после повторных введений. Это связано с тем, что скорость восстановления vWF в депо у разных людей отличается, поэтому данная информация будет необходима для прогноза эффективности терапии.

Клинический пример 6

Мальчик В. 12 лет. Обследовался и наблюдался в другом регионе с диагнозом гемофилия А. В анамнезе - кожный 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, 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, и пациент был направлен в детский гематологический центр для уточнения диагноза.

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 с), тромбиновое время 17 с (норма 15-20 с), фибриноген 2,5 г/л, ф. VIII 1,8%, ф. IX 89%, ристоцетин-кофакторная

Патология гемостаза

активность <3%, ингибитор к ф. VIII не выявлен. Агрегация тромбоцитов с АДФ, коллагеном, адриналином нормальная, 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 геморрагические заболевания

Приобретенные нарушения тромбоцитарного звена

Тромбоцитопении

Тромбоцитопения - снижение числа тромбоцитов ниже 150 тыс./мкл. Тромбоцитопения может быть обусловлена недостаточным образованием тромбоцитов, повышенным их разрушением или потреблением (табл. 56). Тяжелая тромбоцитопения проявляется множественными петехиями на коже, кровотечениями из слизистых оболочек.

Таблица 56

Классификация тромбоцитопенических состояний

Причины тромбоцитопении	Состояния, при которых возникает тромбоцитопения
Нарушение образования тромбоцитов Уменьшение числа или отсутствие мегакариоцитов в костном мозге. Недостаточное образование тромбоцитов – неэффективный тромбопоэз	Лейкозы, апластическая анемия, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (иногда). Алкогольная тромбоцитопения, тромбоцитопения при мегалобластной анемии, некоторые миелодиспластические синдромы
Усиленное потребление тромбоцитов	ДВС-синдром, выраженный ангиоматоз, гигантская кавернозная гемангиома (синдром Казабаха–Меритта)
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, тромбоцитопения, связанная с ВИЧ, лекарственная тромбоцитопения, системная красная волчанка, лимфома

Подсчет форменных элементов периферической крови - важнейшее исследование не только для выявления тромбоцитопении, но и для выяснения ее причины (табл. 57). Следует обратить внимание на размеры тромбоцитов (рис. 17): повышение 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).

Таблица 57

Периферическая кровь при тромбоцитопениях

Нормальные показатели эритроцитов и лейкоцитов	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, тромбоцитопеническая пурпура при ВИЧ-инфекции, лекарственная (гаптенная) тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура
Фрагментация эритроцитов	Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитико-уремические синдромы, эмболия опухолевыми метастазами
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. Однако в некоторых случаях у больных с тромбоцитемией может быть повышенным риск тромбозов

Патология гемостаза

Иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП)

Иммунные тромбоцитопенические пурпуры в зависимости от механизма развития делятся на:

- аутоиммунные тромбоцитопении, при которых антитела вырабатываются к антигенам собственных тромбоцитов (чаще всего аутоантитела бывают направлены против комплекса GPIIb-IIIa и GPIb). Группа аутоиммунных пурпур включает:
 - острые или хронические;
 - первичные (идиопатические) или вторичные (симптоматические);
 - неонатальную трансиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (проникновение антител матери с аутоиммунной тромбоцитопенической пурпурой через плацентарный барьер вызывает тромбоцитопению у ребенка);
 - циклическую аутоиммунную пурпуру;
- аллоиммунные, при которых антитела вырабатываются к антигенам тромбоцитов, которых нет у источника антител, например аллоантитела матери, проникающие в кровь плода и направленные против антигенов тромбоцитов плода или отца, посттрансфузионные аллоиммунные тромбоцитопении (антитела к антигенам донорских тромбоцитов);
- изоиммунные, при которых вырабатываются антитела против неизменных антигенов

Клинический пример 7

Больная 28 лет. Консультация в городском гематологическом центре.

Основной диагноз: иммунная тромбоцитопения.

Проявления нарушений гемостаза: синяки на коже, кровохарканье, носовые кровотечения, обильные менструальные кровотечения, спленомегалия, предстоит операция спленэктомии.

Лабораторные данные: НБ 142 г/л, СОЭ 2 мм, тромбоциты 102×10^9 /л. АЧТВ 38 с, ПТ 97%, ТВ 28 с, фибриноген 2,2 г/л, лизис эглобулиновой фракции 240 мин, РКМФ отр. Ретракция кровяного сгустка 27% (норма 44-66%). Агрегация тромбоцитов с АДФ (0,625 мкмоль/л) 1,5% с дезагрегацией (норма 24-40%) (рис. 134). Агрегация тромбоцитов с ристомисином 30% (норма 48-91%).

Заключение: умеренная тромбоцитопения с выраженным снижением функциональных

донорских тромбоцитов, например при переливании тромбоцитов больным с тромбастенией Гланцмана или синдромом Бернара-Сулье;

- гаптеновые, при которых антитела образуются против комплекса лекарства с тромбоцитарным антигеном.

Идиопатические аутоиммунные тромбоцитопении (ИТП) наиболее распространены среди иммунных тромбоцитопений, они составляют 40% всех геморрагических заболеваний. Частота ИТП - около 1:10 000. Это заболевание у детей обычно развивается после перенесенных вирусных или бактериальных инфекций, после прививок. В ряде случаев причина заболевания остается неизвестной. Острая тромбоцитопеническая пурпура заканчивается выздоровлением. После перенесенной острой ИТП возможны рецидивы тромбоцитопении, которые почти всегда заканчиваются восстановлением нормального количества тромбоцитов. Хронические тромбоцитопенические пурпуры могут протекать циклично, с колебанием количества тромбоцитов от нормального до единичных. В других случаях тромбоциты могут быть снижены постоянно.

Для ИТП у взрослых более характерно отсутствие видимой причины и длительное течение. Женщины болеют в 2 раза чаще мужчин. Среди детей мальчики и девочки поражаются с равной частотой.

своих кровяных пластинок (ретрактивных, агрегационных).

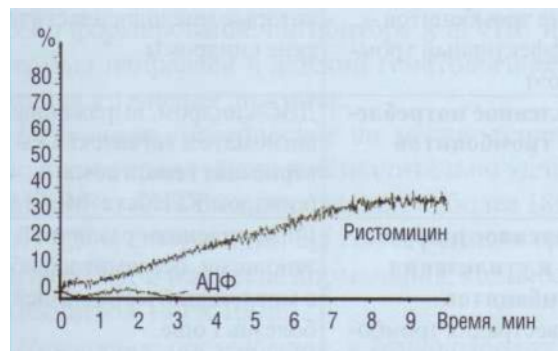


Рис. 134. Агрегация тромбоцитов у больной с иммунной тромбоцитопенией. Агрегация тромбоцитов с АДФ (0,625 мкмоль/л) составляет всего 1,5% (норма 24-40%), быстро развивается дезагрегация, Агрегация тромбоцитов с ристомисином также снижена - 30% (норма 48-91%)

Патология гемостаза

Вторичная иммунная тромбоцитопения может наблюдаться при: *Лимфопролиферативных заболеваниях:*

- Хронический лимфолейкоз.
- Неходжкинская лимфома.
- Болезнь Ходжкина.
- Макроглобулинемия Вальденстрема.

Солидных опухолях, иммунных заболеваниях:

- Системы крови (синдром Фишера-Эванса).
- Генерализованные (ревматоидный артрит, системная красная волчанка).
- Органоспецифичные:
 - иммунологические заболевания суставов (анкилозирующий спондилит и др.);
 - иммунологические заболевания кишечника (болезнь Крона, неспецифический язвенный колит);
 - иммунологические заболевания печени (хронический активный гепатит);
 - тиреоидит.

Инфекционных заболеваниях:

- Бактериальные инфекции.
- Некоторые вирусные инфекции.
- Хронические и персистирующие вирусные инфекции (HIV-инфекция, вирус Эпштейна-Барра).

Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения

При неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении антитела вырабатываются в результате иммунизации матери аллоантигенными де-

терминантами, содержащимися на тромбоцитах отца и ребенка. Тромбоцитопения в этом случае сохраняется у новорожденного в течение 2-3 недель.

Гаптенковые (гетероиммунные) тромбоцитопении

Гаптенковые тромбоцитопении сопровождаются выработкой антител против измененных или чужеродных структур на поверхности тромбоцитов, появляющихся в результате воздействия некоторых лекарственных препаратов (табл. 58). Хинин и препараты хининового ряда способны стимулировать образование гаптенных антител, так как они связываются с тромбоцитарными рецепторами с образованием комплексов.

Следует подчеркнуть, что 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 некоторых других нестероидных противовоспалительных средств.

Тромбоцитопения, вызванная гепарином

Тромбоцитопения развивается примерно у 5% больных, получавших бычий гепарин, и 1% больных, получавших свиной гепарин. У больных с гепариновой тромбоцитопенией прогрессивно увеличивается риск тромбоза, возникают угрожа-

Таблица 58

Препараты, способные вызвать лекарственную тромбоцитопению

Антибактериальные препараты: цефалоспорины, хлорамфеникол (левомецетин), котримоксазол, 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 (фонуриг), 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-метилдофа, антигистаминные, хинидин, карбимазол, дигитоксин, гепарин, гидралазин, мерказолил, преднизолон, стибофен, витамин К (водные растворы)

Патология гемостаза

ющие жизни артериальные тромбы (рикошетные тромбозы). Патогенез гепарин-индуцированной тромбоцитопении (ГИТ) связан с действием патогенных гепарин-зависимых IgG-антител (ГИТ-IgG). Тромбоцитарный фактор 4 является гепарин-связывающим белком. На поверхности тромбоцитов формируется мультимолекулярный комплекс между IgG и гепарином/тромбоцитарным фактором 4 (рис. 135). Мультимолекулярный комплекс связывается со специфическим рецептором (FcγRIIA) на тромбоцитарной мембране. Предрасположенность к этому осложнению связана с мутацией в FcγRIIA-гене. В результате в молекуле FcγRIIA-рецептора происходит замена Arg 131 → His 131, и пациенты с такой мутацией становятся склонны к развитию гепарин-индуцированных рикошетных тромбозов. В будущем, по-видимому, молекулярно-генетическая диагностика позволит идентифицировать пациентов с повышенным риском развития гепариновой тромбоцитопении и рикошетных гепариновых тромбозов. В настоящее время диагностика таких состояний проводится сочетанием метода ELISA с использованием антител против комплекса гепарин - тромбоцитарный фактор 4 или методом определения агрегации или освобождения ¹⁴C-серотонина из предварительно нагруженных тромбоцитов под действием гепарина. Однако эти методы неспецифичны и часто бывают нечувствительными.

Покрытые IgG 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.

Следует отметить, что низкомолекулярные гепарины (фраксипарин, фрагмин, ловенокс, клексан) не вызывают тромбоцитопении, вероятно, из-за меньших, чем требуется для образования иммунного комплекса, размеров молекул этих препаратов.

Если у больного, получавшего гепарин, развивается тромбоцитопения, необходимо провести тест для определения гепарин-ассоциированной агрегации тромбоцитов и гепарин-индуцированной тромбоцитопении. Для этой цели с успехом использовали импедансный и люминесцентный агрегометр «Chrono-log» (рис. 77), 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 1 часа поставить диагноз нарушения функции тромбоцитов и дефектов накопления.

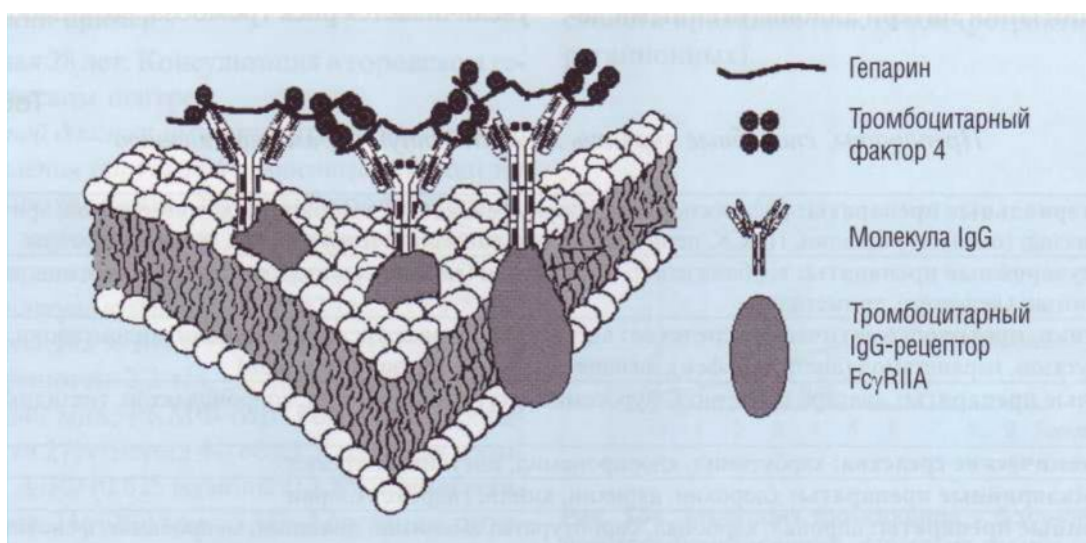


Рис. 135. Активация тромбоцитов гепарином за счет образования на поверхности мембран мультимолекулярного комплекса между гепарин-зависимыми IgG-антителами и тромбоцитарным фактором 4

Таблица 59

Методы лабораторной диагностики тромбоцитопении

Анализ тромбоцитов в периферической крови (количество, морфология)	Микроскопия, автоматические счетчики
Анализ мегакариоцитов костного мозга (количество, морфология)	Микроскопия
Анализ антитромбоцитарных антител	РИА, ИФА, проточная цитометрия
Определение времени жизни тромбоцитов	⁵¹ Cr- или ¹¹¹ In-меченные тромбоциты

Дифференциальная диагностика тромбоцитопений должна быть направлена на выяснение природы тромбоцитопении: 1) иммунной природы (иммунные тромбоцитопении), 2) тромбоцитопении, возникающей в результате угнетения тромбоцитопоэза в костном мозге, или 3) наследственных тромбоцитопении, ассоциированных с тромбоцитопатиями. Лабораторные методы, применяемые при диагностике тромбоцитопении, представлены в табл. 59.

Приобретенный дефицит факторов свертывания крови

Развитие специфического ингибитора

Чаще всего встречается развитие ингибитора к факторам VIII и IX у пациентов, страдающих соответственно гемофилией А и В и получающих специфическую заместительную терапию. Однако описаны приобретенные формы гемофилии А, болезни Виллебранда, реже приобретенный дефицит других факторов свертывания у лиц, не страдавших врожденными нарушениями.

Основными предрасполагающими факторами являются:

- аутоиммунные заболевания;
- онкологические заболевания;
- перенесенная инфекция;
- прием некоторых лекарственных препаратов.

Возможно возникновение антител без явных провоцирующих воздействий.

Приобретенный ингибитор к фактору VIII (приобретенная гемофилия А)

Возникает вследствие образования антител к собственному ф. VIII. Чаще развивается у лиц старше 50 лет, однако описаны случаи заболевания детей. Мужчины и женщины страдают оди-

наково часто. Расчетная частота развития ингибитора к ф. VIII у пациентов, не болевших гемофилией, составляет 1 случай на миллион человек в год.

У описанных в литературе за последние 10 лет 215 пациентов в 50% случаев ингибитор развился спонтанно. В качестве фоновых заболеваний называют: системные заболевания соединительной ткани, ревматоидный артрит, многоформную эритему, герпетиформный дерматит, аллергические реакции на пенициллин, бронхиальную астму, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, терапию 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. Терапия аналогична лечению ингибиторной формы гемофилии А.

Диагностика основана на клинических (признаки развившегося геморрагического заболевания с кровоточивостью по гематомному типу) и лабораторных данных (снижение активности ф. VIII, наличие специфического ингибитора к ф. VIII).

Клинический пример 8

Больная 68 лет. Поступила в отделение гастроэнтерологии. На 3-й день в области бедер, ягодицы появились обширные гематомы. Переведе-

на в гематологическое отделение с диагнозом: геморрагический синдром неясной этиологии.

Лабораторный анализ: АЧТВ 161 с (норма 35-45 с), ПТ 93%, ТВ 34 с (норма 28-30 с), фибриноген 2,4 г/л, лизис эуглобулиновой фракции 140 мин,

Патология гемостаза

ретракция кровяного сгустка 46%, фактор VIII 1,3%, агрегация тромбоцитов с АДФ 72%.

Заключение: значительное удлинение времени свертывания крови при активации по внутреннему пути, резкое снижение ф. VIII. Подозрение

Приобретенный ингибитор к ф. IX

Чрезвычайно редкое заболевание. Клиника и диагностика приобретенной гемофилии В аналогичны таковым при приобретенной гемофилии А.

Ингибитор к фактору Виллебранда (приобретенная болезнь Виллебранда, приобретенный синдром Виллебранда)

Приобретенная болезнь Виллебранда (приобретенный синдром) лабораторно подобна 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, опухоль Вильмса, прием цiproфлоксацина и др. 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 деградаци vWF.
- Потеря тяжелых молекул vWF в условиях стресса, связанного с высоким напряжением сдвига при активном кровотоке.
- Снижение синтеза или высвобождения vWF.

Диагностика: выявление развившихся признаков приобретенного геморрагического заболевания, сходных с наследственной болезнью Виллебранда. Лабораторная диагностика приобретенной болезни Виллебранда аналогична диагностике врожденной болезни Виллебранда. При этом, помимо состояния гемостаза, необходимо выявить фоновые заболевания.

Лечение приобретенного синдрома Виллебранда: симптоматическая терапия и/или профи-

на ингибиторную форму гемофилии А. Для подтверждения необходимо определение ф. VIII:Ag. Большая направлена в гематологический центр, где была подтверждена приобретенная (ингибиторная) гемофилия А.

лактика кровотечений - ДДАВП и концентраты фактора VIII + vWF; патогенетическое лечение, включая лечение фонового 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 развитие дефицита ф. V происходило после операций, в которых использовался фибриновый клей из бычьей плазмы, или после применения антибиотиков с бета-лактамным кольцом, или после переливания крови.

Диагностика основывается на появлении признаков геморрагического заболевания, сходного с врожденным дефицитом ф. V, и наличии лабораторных данных за ингибитор к ф. V.

Приобретенные ингибиторы к протромбину, факторам VII и X

За исключением антител к протромбину, ассоциированных с волчаночным антикоагулянтом, специфические антитела к ф. II, -VI, -X встречаются очень редко. Есть лишь единичные описания таких случаев. Диагностика основывается на наличии клинических и лабораторных признаков ингибитора к соответствующему фактору.

Описаны единичные случаи развития **ингибитора к ф. XI, ф. XII и другим факторам контактной активации**. Их диагностика была лабораторной находкой, и никто из пациентов, за исключением имеющих ингибитор к ф. XI, не страдал значительными геморрагическими проявлениями.

Приобретенные ингибиторы к фибриногену, фибрину, ф. XIII и промежуточным продуктам

Патология гемостаза

последней фазы свертывания крови. Имеются немногочисленные описания развития ингибитора к фибриногену, фибрину, ф.ХIII и промежуточным продуктам процесса полимеризации и стабилизации фибрина. Большинство из больных страдали тяжелыми геморрагическими проявлениями с угрозой для жизни, сходными с проявлениями афибриногемии или дефицита ф.ХIII.

Лабораторная диагностика основана на снижении активности ф.ХIII и признаках его ингибитора либо удлинении тромбинового времени, которое не корригируется в тесте смешивания с нормальной плазмой. Специальное исследование позволяет выявить специфичность антител.

Приобретенный дефицит витамина К

Причины дефицита витамина К у детей старшего возраста и взрослых:

- Синдромы нарушенного кишечного всасывания (мальабсорбции), в том числе дефицит α -антитрипсина, абеталипопротеинемия, атрезия желчных путей, целиакия, хроническая диарея, холестатическая болезнь и др.
- Недоедание (голод).
- Алкоголизм.
- Прием лекарственных препаратов - кумаринов, в том числе из растительных сборов, отравление ядами и др., антиконвульсанты, антибиотикотерапия (цефалоспорины, антибиотики, содержащие бета-лактамную цепь), передозировка витамина Е, салицилаты.

Коагулопатия, возникающая вследствие приобретенного дефицита витамина К, проявляется кожным геморрагическим синдромом различной степени выраженности, кровотечениями

с слизистых, в том числе из желудочно-кишечного тракта, носовыми кровотечениями. Лабораторная диагностика при приобретенном дефиците витамина К аналогична диагностике дефицита витамин-К-зависимых факторов другой этиологии.

Лечение антикоагулянтами непрямого действия, отравление антагонистами витамина К

Передозировка не прямых антикоагулянтов или отравление антагонистами витамина К приводят к состоянию гипокоагуляции. Эти препараты являются неактивными аналогами витамина К и конкурируют с активными формами витамина К. Вследствие этого синтезированные витамин-К-зависимые факторы не имеют у-карбоксиглутамина, не могут фиксироваться на фосфолипидной матрице и выполнять свою функцию (PIVKA-белки). Клиника и диагностика передозировки и отравления антагонистами витамина К аналогична геморрагическому состоянию, вызванному дефицитом витамина К, и варьирует по тяжести (в зависимости от дозы препарата). Лечение передозировки не прямых антикоагулянтов описано в разделе, посвященном применению не прямых антикоагулянтов для лечения тромбозов.

Поскольку антагонисты витамина К используются в качестве ядов для борьбы с домашними грызунами (кумарины), гематологи эпизодически сталкиваются со случаями отравления этими препаратами. Лечение отравлений требует массивного введения препаратов витамина К и заместительной терапии препаратами протромбинового комплекса. Продолжительность лечения может быть очень большой (многие месяцы) из-за кумулятивного эффекта кумаринов.

Клинический пример 9

Больной 68 лет. Находился на санаторном лечении. Состояние после аортокоронарного шунтирования (АКШ). Принимает варфарин.

Коагулограмма для контроля антикоагулянтной терапии: количество тромбоцитов $330 \times 10^9/л$.

В моче **микрогематурия** (2-3 эритроцита в поле зрения).

ПВ 80,5 с (норма 15,5-21,2 с), **МНО 8,5**.

Заключение: передозировка варфарина. Необходимо уменьшить дозу. Контроль МНО проводить ежедневно до достижения рекомендуемого для профилактики тромбоэмболии значения МНО = 2-3.

Патология гемостаза

Гепариноподобные антикоагулянты

Развитие гепариноподобного антикоагулянта было описано у пациентов, страдающих неоплазиями или получающих терапию сураминол при аденокарциноме. Клинически это нарушение проявляется выраженными геморрагическими симптомами. Лабораторно выявляется удлинение тромбинового времени, которое корректируется применением протаминасульфата, либо толудинового голубого, либо гепариназы. Биохимические и физико-химические исследования показали сходство этого антикоагулянта с гликозаминогликанами.

Заболевания печени

Кровотечения часто сопутствуют хроническим или острым заболеваниям печени. Геморрагичес-

кий 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.

В табл. 60 перечислены основные дефекты системы гемостаза, связанные с поражением печени.

В табл. 61 представлены особенности результатов лабораторного анализа гемостаза при различных заболеваниях печени.

Системный фибринолиз

Значительная активизация системного фибринолиза - довольно редкая причина геморрагического синдрома. Однако развитие системного гиперфибринолиза может повлечь за собой

Таблица 60

Дефекты системы гемостаза при поражениях печени

Дефект	Возможные механизмы развития
Снижение прокоагулянтной активности плазмы	<ul style="list-style-type: none"> • Снижение синтеза в печени белков системы гемостаза • Дефицит витамина К
Тромбоцитопения и нарушение функции тромбоцитов	<ul style="list-style-type: none"> • Гиперспленизм • Недостаточное выведение ингибиторов функции тромбоцитов
ДВС	<ul style="list-style-type: none"> • Выброс прокоагулянтов из клеток печени • Эндотоксикоз • Недостаточно активная элиминация активированных факторов свертывания • Снижение концентрации антитромбина и протенина С • Повышение активности цитокинов • Интеркуррентные состояния
Системный фибринолиз	<ul style="list-style-type: none"> • Снижение α_2-антиплазмина • Недостаточно активная элиминация ферментов фибринолиза • Снижение элиминации тканевого активатора плазминогена

Таблица 61

Возможные изменения показателей гемостаза при заболеваниях печени

Патология	ПТ	АЧТВ	ТВ	Фибриноген	ПДФ/Д-димеры	Время лизиса эуглобулинового сгустка	ф.V	ф.VIII	ф.VII	Тромбоциты
Острый тяжелый гепатит	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↓↓↓	↑↑	↓	↓↓	↑↑↑	↓↓	Н/↓
Билиарный цирроз	↑↑↑	↑	Н/↑	Н/↑	Н/↑	Н/↓	Н/↓	↑	↓↓↓	Н/↓
Билиарная обструкция	↑↑↑	Н/↑	Н	Н/↑	Н	Н	Н	Н/↑	↓↓↓	Н
Цирроз печени	↑↑↑	Н/↑	Н/↑	Н/↓	Н/↑	Н/↓	Н/↓	Н/↑↑	↓↓↓	↓

Патология гемостаза

опасные геморрагические проявления, а при истощении плазминогена - тромбозы (табл. 62). Системный фибринолиз может быть причиной массивных кровотечений из желудочно-кишечного тракта у пациентов с печеночной недостаточностью.

Таблица 62

Гиперфибринолиз и его осложнения

Проявление	Следствие
Деструкция фибриногена, образование продуктов деградации фибриногена (ПДФ)	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 др.)	Избыточный фибринолиз, разрушение фибриногена
Деградация тромбоцитарных рецепторов GPIIb/IX (vWF-рецепторов)	Снижение адгезии тромбоцитов к участкам повреждения сосудистой стенки
Потребление плазминогена	Снижение фибринолитической активности
Массивные кровотечения с последующей тенденцией к тромботическим состояниям	

Большинство скрининговых тестов не выявляет состояние гиперфибринолиза. Относительно специфичными являются тесты определения времени лизиса сгустка. Тромбоэластограмма способна наглядно продемонстрировать развитие гиперфибринолиза.

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, ДВС-синдроме, 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. Для коррекции гиперфибринолиза используются аprotинин, ингибиторы фибринолиза и ингибиторы протеолитических ферментов.

Геморрагические мезенхимальные дисплазии

Мезенхимальные дисплазии (МД) - группа врожденных заболеваний соединительной ткани, в основе которых лежит недостаточное или аномальное развитие коллагеновых структур, приводящее к неполноценности сосудистой стенки, связочного аппарата, клапанов сердца, кожи, скелета и других стромальных образований, часто сочетающихся с неполноценностью иммунитета и гемостаза.

Мезенхимальные дисплазии, сочетающиеся с нарушениями в системе гемостаза и геморрагическим синдромом, в современной литературе обозначают как геморрагические мезенхимальные дисплазии (ГМД). Геморрагические проявления описаны при многих мезенхимальных дисплазиях: генерализованной фибродисплазии (синдром Черногубова-Элерса-Данлоса), мезодермальной аномалии Марфана, несовершенном остеогенезе, синдроме отсутствия лучевой кости (ТАР-синдроме), мозжечковой атаксии-телеангиэктазии (синдром Луи-Бар), болезни Рэндию-Ослера, диффузной ангиокератоме туловища (болезнь Фабри), гемангиомах (синдром Казабаха-Меритта, микроангиоматозы с тромбоцитопенией) и др. В основе геморрагического синдрома при гематомезенхимальных дисплазиях лежат несколько механизмов:

- Нарушение строения соединительной ткани приводит к повышенной ранимости сосудов.
- Сочетание генетически обусловленных аномалий коллагена с генетически обусловленными нарушениями компонентов системы гемостаза (качественные и/или количественные дефекты тромбоцитов, дефицит активности факторов свертывания, качественные и/или количественные дефекты фактора Виллебранда, нарушения взаимодействия

тромбоцитов с коллагеном сосудов, качественные и/или количественные дефекты фибриногена, в том числе нарушение его полимеризации).

- Сочетание аномалии строения коллагена с приобретенными нарушениями системы гемостаза (секвестрация тромбоцитов и потребление факторов свертывания в гемангиомах, вторичные дефекты системы гемостаза на фоне хронических инфекций у пациентов с иммунодефицитными состояниями, в частности при синдроме Луи-Бар). Несколько подробнее остановимся на двух состояниях.

Гемангиомы, особенно **гигантские** кавернозные гемангиомы Казабаха-Меритта, 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 острый или хронический 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.

Болезнь Рэнду-Ослера-Вебера - наследственное заболевание, проявляющееся множественными телеангиэктазиями на коже, в желудочно-кишечном тракте, дыхательных путях и других органах. 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 1:2500-40 000 человек.

Специфических изменений при исследовании свертывающей системы крови нет, однако болезнь Рэнду-Ослера-Вебера может сочетаться с болезнью Виллебранда.

Диагностика гематомезенхимальных дисплазий основана на сочетании тщательного клини-

ческого обследования пациента и комплекса лабораторных методов.

Спектр лабораторных исследований, применяемых для уточнения характера патологии гемостаза, очень широк. Помимо обязательного проведения скрининговых тестов, в диагностическую палитру необходимо включить исследование функции тромбоцитов (агрегация с различными индукторами, исследование адгезии тромбоцитов, определение доступности фактора 3 тромбоцитов, тест ретракции кровяного сгустка), при исследовании плазменных белков системы свертывания крови обязательно исследование концентрации фибриногена по Клауссу, анализ процесса аутополимеризации фибриновых мономеров, активности фактора Виллебранда в тестах ристоцетин-кофакторной активности и коллаген-связывающей активности. При наличии нарушений в скрининговых тестах необходимо проведение углубленного исследования соответствующего звена гемостаза. Помимо анализа состояния системы гемостаза, при гематомезенхимальных дисплазиях показано проведение исследования структуры коллагена и молекулярно-генетическое исследование.

Нарушения структуры коллагена

Синдром Элерса-Данлоса, синдром Марфана могут сопровождаться геморрагическим синдромом различной тяжести. Лабораторные нарушения при этой патологии могут отсутствовать. Однако может быть удлинение времени кровотечения, умеренное нарушение функции тромбоцитов, признаки дисфибриногенемии.

Кровотечения, связанные с массивной кровопотерей

Быстрая массивная кровопотеря - нередкое осложнение тяжелых травм и патологических родов; она может осложнять операции трансплантации органов, оперативное лечение сердечно-сосудистой патологии и рака. Это состояние может требовать массивных гемотрансфузий (более чем 1 ОЦК в сутки). При кровопотере интенсивностью 1 ОЦК менее чем за 2 часа могут возникать серьезные нарушения гемостаза.

Имеется несколько патогенетических факторов этих нарушений.

Патология гемостаза

Наиболее распространенная клиническая проблема - разведение плазменных компонентов гемостаза и тромбоцитов вводимыми плазмозаменителями. Использование коллоидных и кристаллоидных растворов, эритроцитарной массы, разведенной изотоническим солевым раствором В 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, разведения и секвестрации 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 ДВС-синдром.

Рекомендуемые лабораторные тесты для контроля состояния гемостаза при массивной кровопотере и массивных гемотрансфузиях: ПТ, АЧТВ, фибриноген, гематокрит, количество тромбоцитов, ПДФ, D-димеры, тест лизиса эуглобулинового сгустка.

Нарушения гемостаза, связанные с патологией почек

До начала использования гемодиализа кровотечения были серьезным осложнением у пациентов с хроническим поражением почек. Однако даже при систематическом проведении гемодиализа примерно у половины больных с хронической почечной недостаточностью имеются такие проявления, как пурпура, меноррагии, носовые кровотечения, реже кровотечения из желудочно-кишечного тракта. Тяжелые кровотечения у данной группы пациентов, как правило, связаны с травмой или оперативным лечением, тем не менее геморрагический синдром осложняет их ведение и в других ситуациях.

Патофизиологические механизмы, приводящие к геморрагиям у пациентов с хронической почечной недостаточностью, 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; патогенетические механизмы этого неясны, однако после трансфузии эритроцитарной массы уменьшается время кровотечения и геморрагический синдром.

Еще одним патогенетическим фактором повышенной кровоточивости при хронической почечной недостаточности является тромбоцитопения, которая довольно часто бывает у таких пациентов.

Процедура гемодиализа сопровождается применением гепарина. Остаточное его количество может вносить вклад в геморрагические проявления.

Лабораторные данные

У пациентов с уремией часто удлинено время кровотечения. Степень удлинения может варьировать от незначительной до очень большой. Агрегация тромбоцитов может быть снижена, однако ее снижение не коррелирует с тяжестью геморрагических проявлений. Другие скрининговые тесты (ПТ, АЧТВ, тромбиновое время, фибриноген) могут быть нормальными или немного удлиненными.

У пациентов с нефротическим синдромом, особенно у детей, 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. Безусловно, кожный гемосиндром у них может быть связан с повышением хрупкости сосудов в связи с отложением амилоида в их стенках и в периваскулярном пространстве. Кроме того, у этих больных имеются также системные дефекты гемостаза, в первую очередь - снижение активности ф. X. Вероятной причиной этого является адсорбция ф. X на амилоиде. Активность

Патология гемостаза

ф.Х в плазме пациентов с амилоидозом может составлять 2-4% от нормальных значений.

При данном заболевании также отмечается усиление системного фибринолиза. Полностью механизм этого процесса не раскрыт. Происходит снижение оц-антиплазмина, видимо, тоже за счет адсорбции его на амилоиде. Описано повышение в плазме активаторов плазминогена и сни-

жение ингибитора активатора плазминогена-1. Наконец, имеются единичные описания развития специфического ингибитора к ф. VIII.

Лабораторная диагностика включает стандартные тесты скрининга (ПТ, АЧТВ, ТВ, фибриноген, время кровотечения, количество тромбоцитов), помимо этого, рекомендуется проводить исследование рептилазного времени.

Тромботические заболевания

Тромбоцитоз

Увеличение содержания тромбоцитов в сыворотке свыше $400 \times 10^9/\text{л}$ определяется как тромбоцитоз. Тромбоцитоз возникает при миелопролиферативных заболеваниях, злокачественных состояниях (рак, болезнь Ходжкина, лимфомы), воспалениях (ревматоидный артрит, язвенный колит, туберкулез, остеомиелит), после удаления селезенки (2 месяца) и при другой патологии. Тромбоцитоз - компонент острофазной реакции. Эссенциальная тромбоцитемия - миелопролиферативное заболевание. Состояние после спленэктомии объясняется удалением основного места разрушения тромбоцитов. Увеличенное содержание тромбоцитов может привести к артериальному или венозному тромбозу.

Тромбофилии. Общее представление

Проблема патологического тромбообразования - одна из важнейших терапевтических проблем в развитых странах. Ишемическая болезнь сердца, тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА), тромбозы глубоких вен - патологические состояния, приводящие к тяжелой инвалидности и гибели человека. При лечении таких пациентов **лабораторный контроль состояния гемостаза** - важнейший фактор успеха.

Артериальные и внутрисердечные тромбы, образуясь в условиях высокой скорости кровотока, состоят преимущественно из тромбоцитов, соединенных фибриновыми мостиками - белые тромбы. Артериальные тромбы преимущественно пристеночные. Важнейшими факторами патогенеза 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 тромбы образуются в условиях относительно медленного кровотока и низкого напряжения сдвига, включают в себя значительное количество эритроцитов и большое количество фибрина. Венозные тромбы часто полностью обтурируют 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 тромбофилии

Как правило, тромбофилия - комбинированное состояние, возникающее вследствие действия нескольких патогенетических факторов. Основные патогенетические факторы тромбофилии: • Повреждение эндотелиальных клеток с обнажением тромбогенных субэндотелиальных структур.

Патология гемостаза

- Активация тромбоцитов циркулирующими агонистами либо вследствие взаимодействия тромбоцитов с субэндотелиальными структурами или фактором Виллебранда.
- Активация свертывания крови.
- 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 патологического тромбообразования (генетические дефекты выявляются у 30-50% пациентов с тромботическим состоянием):

- Мутация фактора V (фактор V Лейден).
- Дефицит антитромбина III.
- Дефицит протеина S.
- Дефицит протеина S.
- Мутации протромбина, в первую очередь G20210A.
- Полиморфизм тромбоцитарного рецептора GPIIb/IIIa.
- Дисфибриногенемия.
- Гиперлипопротеинемия (a).
- Мутация ингибитора пути тканевого фактора (ИВП), 536C/T.
- Гипергомоцистеинемия (у детей, как правило, носит наследственный характер).
- Дефекты тромбомодулина.
- Мутации гена GPIIb/IIIa тромбоцитов.
- PAI-1.

Приобретенные факторы патологического тромбообразования:

- Возраст.
- Пороки сердца и сосудов.
- Атеросклероз.
- Катетеризация вен, особенно длительное нахождение катетера в вене.
- Повышение вязкости крови (полицитемия, потеря жидкости).
- Операция или травма.
- Длительная иммобилизация.
- Инфекция (ВИЧ, ветряная оспа, гнойный тромбоз).
- Аутоиммунные заболевания (волчаночный антикоагулянт, антифосфолипидный синдром, сахарный диабет, болезнь Бехчета и др.).
- Нефротический синдром.

- Ингибиторы к протеинам S и C.
- Онкологические заболевания.
- Химиотерапия (L-аспарагиназа, преднизолон).
- Заболевания печени.
- Талассемия (постспленэктомический тромбоз печеночных вен).
- Серповидно-клеточная анемия.
- Прием гормональных противозачаточных препаратов.

Факторы, роль которых в развитии тромбозов неясна:

- Высокий уровень активности факторов VIII, XI, XII, Виллебранда, ингибитора активатора плазминогена.
- Дефицит факторов XII, кофактора гепарина II, плазминогена, активаторов плазминогена, тромбомодулина.

Лабораторные тесты при тромбофилии

Лабораторные тесты при диагностике тромбофилии можно сгруппировать в 2 группы:

1. *Маркеры активации.* Повышение концентрации этих маркеров является признаком высокой активности образования фибрина, но не предоставляет информации о причинах гиперкоагуляции. Эти тесты дают возможность решить вопрос о назначении антикоагулянтов.

2. *Тесты на выявление причин тромбофилии.* Эти тесты проводятся для выяснения причин тромбофилии. Они не дают представления о риске развития тромбоза в момент исследования. Часто эти тесты проводятся после постановки тестов 1-й группы и купирования тромбоза. К сожалению, далеко не во всех случаях удается установить причину тромбофилии.

Маркеры активации - индикаторы тромбоза, их повышение в сыворотке свидетельствует, что происходит активация тромбина. Казалось бы, что резонно измерять сам тромбин в сыворотке, однако после образования тромбина в течение 15 с инактивируется, главным образом за счет образования комплекса тромбин-антитромбин (ТАТ). Маркеры активации представлены на рис. 136.

Время появления маркеров активации коагуляции неоднозначно:

- *Ранними маркерами* активации тромбина являются F1+2 и ТАТ.

Патология гемостаза

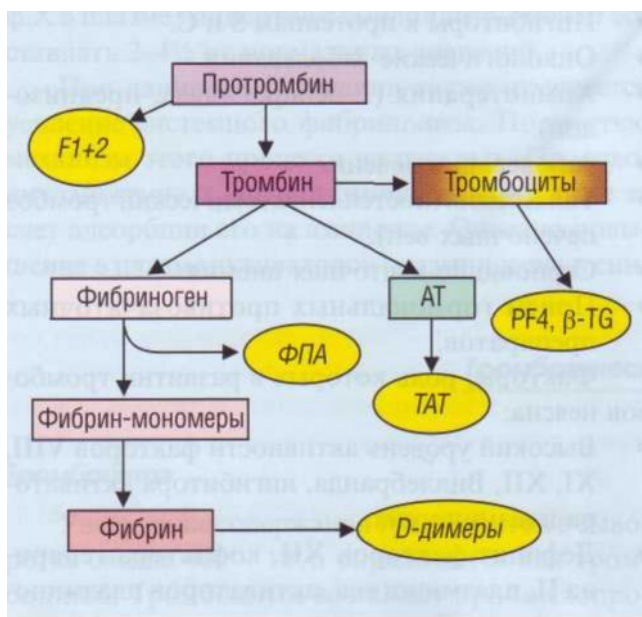


Рис. 136. Маркеры активации коагуляции. К ним относятся: фрагменты протромбина 1 + 2 (F1 + 2), тромбин-анти тромбиновый комплекс (ТАТ), фибрин-мономеры, фибриноген (ФП), фактор 4 тромбоцитов (PF4), р-тромбоглобулин ((β -TG), D-димеры

- Непосредственно в момент образования сгустка определяют фибрин-мономеры (ФМ) и ФПА.
- Поздними маркерами, возникающими после образования фибрина, являются D-димеры, которые представляют собой одновременно маркеры фибринообразования и фибринолитической активности.

Маркеры активации имеют разный период полувыведения ($t_{1/2}$) из системы циркуляции:

- ФПА - 3-5 минут (быстро выводятся через почки);
- ТАТ- 15 минут;
- F1+2-90 минут;
- D-димеры - несколько часов;
- ФМ - несколько часов (комплексы фибрин-мономеров перераспределяются в организме в зависимости от их количества).

Клиническое значение определения этих маркеров различно (см. раздел «Тесты активации свертывания крови»), что во многом определяется процессами их появления, способами удаления из системы циркуляции, а также преаналитическими факторами и аналитическими возможностями лабораторий.

Маркеры тромбофилии

Мутация фактора V (фМ Лейден, Leiden)

Мутация фактора свертывания крови V была описана в 1993 году в семьях с патологической устойчивостью к действию протеина C. При изучении этого феномена выяснилось, что примерно в 95% случаев патология была вызвана точечной заменой аргинина на глутамин в позиции 506 гена ф.V. ф.V Лейден - наиболее распространенный в европейской популяции протромботический дефект. Частота гетерозиготного наследования у европейцев колеблется от 2 до 16%. Гомозиготы по этой мутации встречаются гораздо реже, примерно в 0,1%. В африканской, американской, австралийской (аборигены) и азиатской популяции эта мутация практически отсутствует. По расчетам гетерозиготное носительство гена ф.V Лейден увеличивает риск развития тромбоза в 5-10 раз, а гомозиготы по этой мутации имеют риск развития тромбоза в 80 раз больше, чем лица, не страдающие тромбофилией. Тромботические проявления у лиц с ф.V Лейден, как правило, впервые

возникают в пубертатном возрасте с расчетной частотой 0,28%. 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 при приеме оральных контрацептивов, при развитии антифосфолипидного синдрома (наличие аутоантител к фосфолипидам или белкам, связанным с фосфолипидами, таким, как протеины C и S, протромбин, α_2 -гликопротеин I и др.), при дефиците одного из ингибиторных белков, таких, как протеин C, протеин S или анти тромбин. Фактор V Лейден часто обнаруживается у женщин с хроническим невынашиванием беременности. Спонтанные аборт у них возникают на поздних сроках и связаны с характерным для этих сроков повышением С4-СП и функциональным гипофибринолизом, что в сочетании с РАПС приводит к тромбозу сосудов плаценты. Риск тромбоэмболии легочных артерий у лиц с

ф.V Лейден, по сравнению с общей популяцией, повышается незначительно. У детей и лиц молодого возраста тромбозы возникают при присоединении дополнительных факторов риска (инфекционных заболеваний, болезни Пертеса, Бехчета, при ДЦП, порэнцефалии и др.), не связанных с возрастом.

Клинический пример 10

Больной 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 найдено снижение резистентности фактора Va к активированному

Дефицит протеина С

Несмотря на то что первые описания дефицита ПС появились с начала 80-х годов XX века, до сих пор в литературе имеются противоречивые сведения о характере наследования и значении разных форм в патогенезе тромбообразования. До последнего времени предполагалось, что дефицит ПС наследуется по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью. Однако в последние годы было показано, что наследование осуществляется по аутосомно-рецессивному типу, что одна и та же мутация гена ПС может встречаться у лиц с тромботическими эпизодами из семей с наследственной тромбофилией и у родственников, не име-

Лабораторная диагностика: определение повышения резистентности к протеину С, молекулярный анализ гена ф.V. Мутация Лейден адекватно выявляется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

протеину С (НО = 0,52, контроль $1,10 \pm 0,02$). 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. Другие показатели гемостаза нарушены не были.

Таким образом, у больного выявлено: посттромботическая окклюзия правой почечной артерии. Вторично сморщенная почка. Вазоренальная гипертензия, гематогенная тромбофилия сложного генеза: **резистентность фактора Va к протеину С, тяжелая форма**, гиперагрегационный синдром, вторичная ренальная полиглобулия. Учитывая молодой возраст пациента, можно предположить врожденный характер тромбофилии.

Выявленные изменения позволили составить план профилактики рецидивов тромбозов в течение жизни. В связи с резистентностью к протеину С назначение непрямых антикоагулянтов не проводилось.

ющих клинических проявлений, но являющихся носителями мутации. Выделяют 2 типа дефицита ПС:

- Тип I (гипоформа) - количественный дефицит с пропорциональным снижением антигена и активности ПС.
- Тип II (дисформа) - качественный дефект, при котором на фоне сниженной активности антигена ПС нормальный.

Расчет показал, что гетерозиготное носительство гена дефицита ПС повышает риск венозного тромбоза в 7 раз. Частота мутации у здоровых лиц составляет 0,2-0,3%, у отдельных пациентов с эпизодами тромбоза глубоких вен дефицит ПС встречается в 3% случаев, а в семьях с наследственной тромбофилией - 6%.

Патология гемостаза

Значение дефицита ПС, как изолированного дефекта в патологическом тромбообразовании, также дискутируется. Видимо, в детстве тромбозы развиваются у лиц с гомозиготным носительством. При сочетании с другими дефектами даже гетерозиготное носительство дефицита ПС приводит к возникновению тромботических эпизодов в детском возрасте. Были описаны сочетания с дефектом ф. V Лейден. По некоторым данным это сочетание встречается в 20% семей с наследственной тромбофилией и дефицитом ПС. Дефицит ПС встречается как при артериальных, так и при венозных тромбозах. Тромботические про-

явления у пациентов с изолированным гетерозиготным дефицитом ПС, как правило, начинаются после 15 лет. Для пациентов с глубоким дефицитом ПС при гомозиготном носительстве характерны тяжелые ранние тромботические проявления в виде неонатальной фульминантной пурпуры или ДВС-синдрома в первые дни жизни при активности ПС <1%. Это состояние практически не совместимо с жизнью. Если активность ПС составляет 5-25%, то рецидивирующие эпизоды тромбоэмболии проявляются позже.

Лабораторная диагностика: определение активности и антигена протеина С.

Клинический пример 11

Больная 34 лет. 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 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 предыдущие 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:

АПТВ - 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 отмечался повышенный уровень РФМК в плазме - от 4,5 до 6,0 мг% (норма 3,5 мг%), замедление ХИ-зависимого фибринолиза от 12 до 20 минут (контроль 6 минут), высокий уровень спонтанной агрегации тромбоцитов - от 30 до 38% (контроль до 20%). Активность АТIII - 120%, протеина S - 105%, протеина С при повторном определении клоттинговым методом - 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 фраксипарином. Беременность закончилась в 39-40 недель родами здорового ребенка. Учитывая характер тромбофилии, от назначения не прямых антикоагулянтов воздержались.

Дефицит протеина S

Описания дефицита ПС, как причины тромбофилии, появились в конце 1984 года. Наследование дефекта происходит по аутосомно-доминантному пути с неполной пенетрантностью. К настоящему времени описано более 70 генетических дефектов у пациентов с дефицитом ПС. ПС в плазме присутствует в двух видах - свободный (примерно 40% от общего) и связанный с С4-связывающим протеином (60% соответственно). Свободный ПС является ак-

тивным антикоагулянтом, его уровень коррелирует с клиническими симптомами тромбоза.

Выделяют три типа дефицита ПС:

- Тип I - количественное снижение ПС (пропорциональное снижение активности и антигена ПС).
- Тип II - качественный дефект (сниженная активность при нормальном или непропорционально сниженном антигене).
- Тип III - снижение свободного ПС при нормальном общем.

Патология гемостаза

Частота дефицита PS у больных с венозными тромбозами составляет 1-2%, в семьях с наследственной тромбофилией - 6%. Частота мутации в популяции неизвестна; по расчетам она составляет 1:33 000.

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. К настоящему времени описано только 2 пациента с проявлениями, аналогичными проявлениям при гомозиготном носительстве дефицита PS. Значение гетерозиготного носительства в патологическом тромбообразовании изучается. По разным данным гетерозиготное носительство может увеличивать риск тромбоза в 1,5-6-10 раз. При этом основную роль играет уровень свободного PS.

Описаны случаи появления вторичного ингибитора к протеинам C и S, которые клинически проявляются аналогичным образом. Причинами вторичного дефицита PS могут быть заболевания печени, передозировка непрямых антикоагулянтов, дефицит витамина K, заболевания почек, коагулопатия потребления, беременность, длительные лихорадки, сопровождающиеся острой фазой реакцией с повышением C4-связывающего протеина.

Лабораторная диагностика: исследование активности свободного PS, антигена PS

Мутация протромбина 20210A

Описана в 1996 году Poort с соавторами. Точечная мутация (аденин замещен гуанином) в позиции 20210 3' нетранслируемого региона гена протромбина, что приводит к повышению уровня протромбина (сам протромбин не изменен) в крови и ассоциируется с повышенным риском тромбообразования. Каких-либо других изменений со стороны протромбина при этой мутации выявить не удалось. Расчетная частота этой мутации в европейской популяции составляет 2-3%, а в средиземноморском регионе - 4-5%. У лиц с эпизодами венозных тромбозов, особенно тромбозов нижних конечностей, протромбин

20210A встречается в 6—10% случаев. От 4 до 8%> пациентов с впервые выявленным тромбозом глубоких вен имеют эту мутацию. Роль этой мутации в развитии артериальных тромбозов изучается. Гомозиготные носители этой мутации редки. 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. Особенно сильно риск тромбофилии возрастает при сочетании этой мутации с другими факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний - курением молодых женщин, ожирением, гипертонией, сахарным диабетом.

Лабораторная диагностика: молекулярный анализ гена протромбина.

Дефицит антитромбина

Первое сообщение о дефиците АТ, как о факторе риска патологического тромбообразования, было сделано в 1965 году Egeberg. В настоящее время описано более 80 мутаций гена АТ. Наследование - аутосомно-доминантное с неполной пенетрантностью. Выделяют два типа дефицита АТ:

- *Тип I* - количественный дефект, приводящий к пропорциональному снижению активности и антигена АТ:
 - *подтип Ia* - снижение синтеза АТ;
 - *подтип Ib* - увеличенная скорость распада (выведения).
- *Тип II* - качественный тип, характеризуемый снижением активности при нормальном антигене АТ:
 - *подтип IIa* - дефект активного центра (измененное свойство реактивировать тромбин) и участка связывания гепарина (измененная реактивность с гепарином);
 - *подтип IIb* - дефект активного центра;
 - *подтип IIc* - дефект участка связывания гепарина.

При II типе функциональный дефицит АТ возникает в результате различных мутаций, требуются дополнительные исследования, в частности определение гепарин-связывающих свойств АТ.

Гомозиготных носителей гена дефицита АТ не описано: предположительно эта мутация не

Патология гемостаза

совместима с жизнью, дети погибают внутриутробно или вскоре после рождения. Однако были описаны гомозиготные носители дефекта связывания АТ с гепарином. Гетерозиготное носительство встречается у 0,05-1% 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 гепарином или НМГ (фрагмин, фраксипарин, ловенокс, клексан), заболеваниях печени, нефротическом синдроме, лечении L-аспарагиназой, эстрогенами, при коагулопатиях потребления. Уменьшение активности АТ на 25-30% сопровождается развитием гепаринорезистентности, что может вызвать появление рикошетных тромбозов. На неэффективность антикоагулянтного действия гепарина указывает отсутствующее удлинение АЧТВ, персистенция и даже повышение фибринопептидов А и В или других маркеров активного фибринообразования. Если же имеет место дефицит или врожденная аномалия АТ, то антикоагулянтный эффект гепарина будет изначально ослаблен. Во всех этих случаях необходим контроль за активностью АТ в плазме. При значительном дефиците АТ и высоком риске тромбозов показано введение больным концентратов АТ или инфузия свежезамороженной плазмы.

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 I типа, причем снижение активности АТ коррелирует с уровнем гликирования плазменных белков.

Расчетное повышение риска тромбообразования у лиц с гетерозиготными мутациями гена АТ - 5-10 раз. 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.

Лабораторная диагностика: определение активности АТ хромогенным методом, а также антигена АТ.

Гипергомоцистеинемия

Гомоцистеин - аминокислота, производное метионина, в клетке имеет два пути метаболизма (рис. 137): 1) реметилирование в метионин с участием ферментов метионинсинтазы (кофактором является кобаламин), 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы и бетаинметионинметилтрансферазы; 2) трансульфирование в цистеин с участием цистатионинсинтазы, кофактором которой является пиридоксин. В плазме гомоцистеин окисляется в дисульфиды и смешанные дисульфиды и находится как в свободной, так и в связанной с белком форме (общий гомоцистеин). Нормальная концентрация в плазме составляет 5-16 мкмоль/л.

У взрослых лиц гипергомоцистеинемия (ГГЦ) может быть врожденным и приобретенным дефектом, у детей, как правило, - следствие дефицита ферментов, метаболизирующих гомоцистеин. Наиболее тяжелые формы ГГЦ связаны с дефектом цистатионин-бета-синтазы. Частота ее гомозиготного носительства среди населения составляет от 1:200 000 до 1:335 000, гетерозиготное - 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, проявляющимися с детства. Приобретенная гипергомоцистеинемия связана с недостаточным поступлением с пищей кобаламина, фолиевой кислоты или пиридоксина, применением лекарственных препаратов, нарушающих функции ферментов или обмен витаминов.

Для гипергомоцистеинемии характерно возникновение как артериальных, так и венозных тромбозов. Патогенез развития тромбофилии при

Патология гемостаза

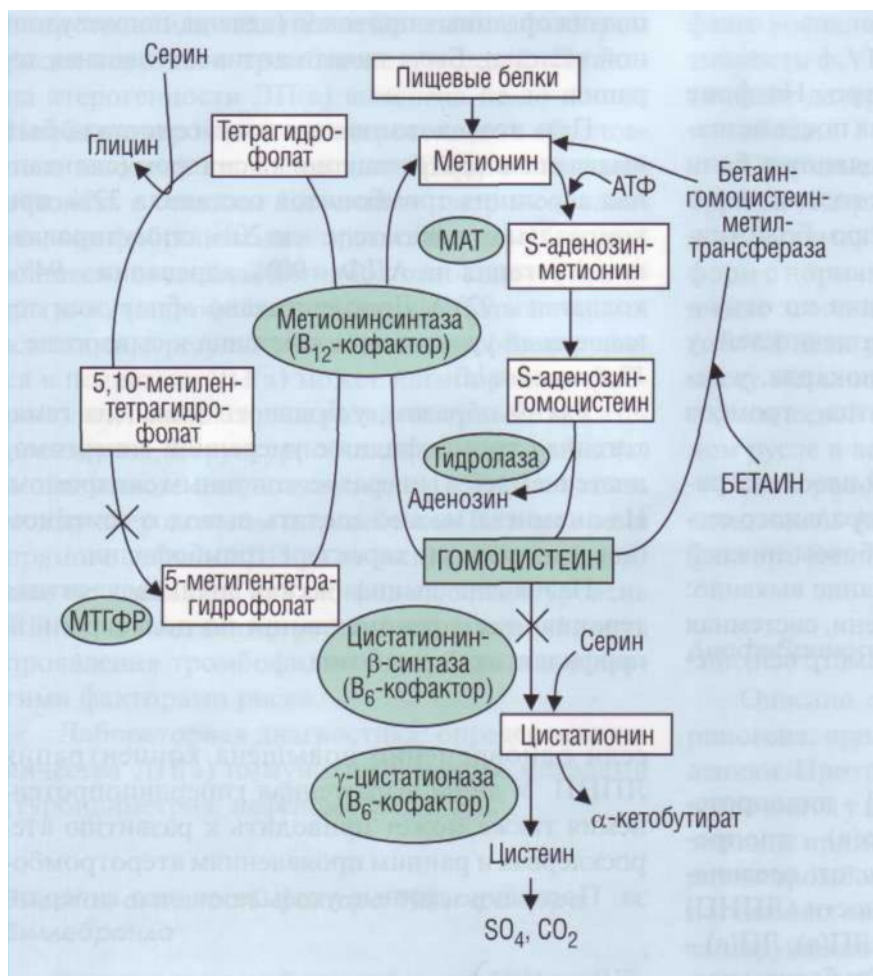


Рис. 137. Метаболические пути с участием гомоцистеина в тканях. Знаком X обозначены генетические дефекты, связанные с нарушением обмена гомоцистеина и развитием тромбоземболических осложнений. При недостаточности фермента цистатионин-β-синтазы происходит нарушение превращения гомоцистеина в цистеин. 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. При мутации гена МТГФР наблюдается стойкая гипергомоцистеинемия, высок риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и склонность к тромбообразованию, МТГФР - метилентетрагидрофолатредуктаза, МАТ - метионинаденозилтрансфераза

гипергомоцистеинемии изучен недостаточно. Есть данные, что происходит нарушение антикоагулянтных свойств эндотелия за счет десквамации эндотелиальных клеток, снижения экспрессии тромбомодулина и гепарансульфатов, ПГ₂, ингибируется тканевый активатор плазминогена, активируется экспрессия тканевого фактора и ф.Х. 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-вос-

становительным реакциям. В процессе окисления сульфгидрильных групп гомоцистеина и гомоцистеин-тиолактона образуются перекисные анионы (O^- , 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 $OONO^-$ (NO^-), не обладающих вазодилаторными свойствами.

Лабораторная диагностика: исследование содержания гомоцистеина в плазме, молекулярный анализ генов, участвующих в метаболизме гомоцистеина, в том числе метилентетрагидрофолатредуктазы.

Патология гемостаза

Клинический пример 12

Больной 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 степени, системная ангиодисплазия - увеличенный диаметр вен, дис-

Гиперлипопротеинемия (а)

Липопротеид (а) [ЛП(а), Lp(a)] - липопротеид-ассоциированный антиген. Апо(а) - апопротеин, состоящий из 4529 аминокислот; соединяясь с липопротеидом низкой плотности (ЛПНП) дисульфидным мостиком, образует ЛП(а). ЛП(а) - сходная с ЛПНП, обогащенная ХС и белком частица, содержит молекулу Апо(а) в дополнение к молекуле Апо-В (рис. 138).

Концентрация ЛП(а) в сыворотке широко варьирует от 2 до 1200 мг/л. Особый интерес представляет выявление сходства в аминокислотной последовательности Апо(а) и плазминогена. Плазминоген содержит 791 аминокислоту, включая пять богатых цистеином последовательностей из 80-114 аминокислот каждая, называемых «kringle», и участок обладающей активностью сериновой протеазы. Апо(а) содержит 37 копий 4 «kringle» плазминогена, за которыми следует 5-й «kringle» и участок протеазы. Апо(а), тем не менее, не обладая ферментативной активностью сериновой протеазы, не способен превращаться в активный плазминоподобный фермент. Увеличение концентрации ЛП(а) в крови считают независимым фактором риска атеросклероза и инфаркта миокарда. Концентрация ЛП(а) выше 300 мг/л связана с 2-кратным повышением риска ИБС и 5-кратным увеличением риска ИБС,

плазия органических 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 - 12,6 мкмоль/л.

Таким образом, у больного выявлена гематогенная тромбофилия с умеренной гипергомоцистеинемией и гиперагрегационным синдромом. Из анамнеза можно сделать вывод о семейном (наследственном) характере тромбофилии.

Назначена специфическая антикоагулянтная терапия, даны рекомендации по долгосрочной профилактике тромбозов.

если одновременно повышена концентрация ЛПНП. У детей выраженная гиперлипопротеинемия также может приводить к развитию атеросклероза и ранним проявлениям атеротромбоза. Последние данные указывают, что гиперли-

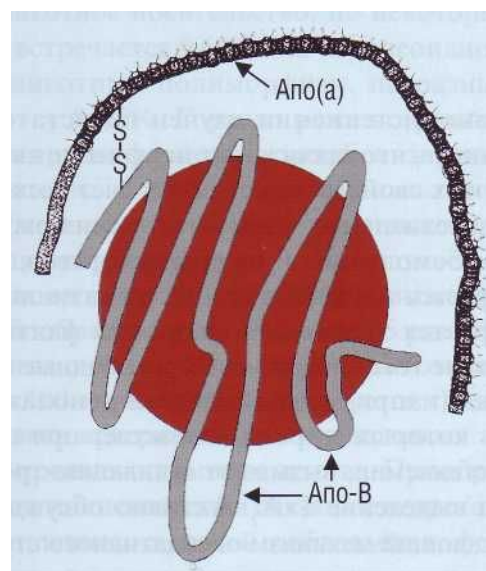


Рис. 138. Липопротеид (а) имеет в структуре Апо(а) и Апо-В-100, которые соединены между собой дисульфидными мостиками. Апо(а) имеет структурное сходство с плазминогеном, что, вероятно, определяет связь между атерогенезом и тромбозом

Патология гемостаза

попротеинемия является независимым фактором риска венозного тромбоза у детей. Причина атерогенности ЛП(а) выяснена не до конца. Наиболее вероятно, что атерогенность обусловлена высокой способностью ЛП(а) взаимодействовать с белками клеточного матрикса, такими, как фибронектин и протеоглики. Образующиеся комплексы активно поглощаются моноцитами, макрофагами и гладкими мышечными клетками, в результате клетки трансформируются в пенистые. ЛП(а) может ингибировать фибринолиз, повышая риск развития тромбоза и атеросклероза. Структурное сходство между Апо(а) и плазминогеном, возможно, и определяет связь между атерогенезом и тромбозом. В то же время прямого влияния ЛП(а) на развитие тромбофилии не показано, однако повышенный уровень ЛП(а) существенно увеличивает вероятность проявления тромбофилии в комбинации с другими факторами риска.

Лабораторная диагностика: определение количества ЛП(а) иммунохимическими методами (турбидиметрия, нефелометрия и др).

Высокая активность фактора VIII и фактора Виллебранда

Значение высокой активности ф.УШ и vWF, как независимого фактора риска патологического тромбообразования, изучается. Примерно у 25% пациентов с венозными тромбозами выявлено повышение ф.УШ. У 16% лиц с тромботическими эпизодами выявлено повышение активности ф.УШ выше 150%. В целом при исследовании европейской популяции у 11% людей была определена активность ф.УШ выше 150%. Расчеты показали, что риск тромбоза у лиц с активностью ф.УШ в пределах 100-150% в 2,7 раза выше, чем в среднем в популяции, а при активности выше 150% риск возрастает в 6 раз.

В ряде работ изолированное значение высокой активности ф.УШ и vWF ставится под сомнение, так как эти белки повышаются при воспалении, а их высокая активность у лиц с тромбозами может быть следствием посттромботического воспаления и не являться генетически детерминированным фактором. Однако было показано, что высокая активность ф.УШ не коррелирует с повышением других белков острой

фазы воспаления. Следовательно, высокая активность ф.УШ может быть независимым генетически детерминированным фактором риска тромбоза.

Сверхвысокомолекулярный фактор Виллебранда, содержащийся в депо (тромбоцитах и эндотелиоцитах), после выброса расщепляется до форм с нормальной молекулярной массой. Нарушение этого процесса вследствие мутации самого vWF или редуцирующих его молекулярную массу металлопротеаз может быть причиной патологической агрегации тромбоцитов в кровеносном русле и вести к тромбозам.

Лабораторная диагностика: исследование активности ф.УШ и vWF, анализ мультимеров фактора Виллебранда.

Дисфибриногенемия

Описано около 45 различных мутаций фибриногена, приводящих к тромботическим проявлениям. Протромботическая дисфибриногенемия встречается у взрослых, имевших тромботические эпизоды примерно в 1% случаев. Причинами развития тромбоза при тромботических дисфибриногенемиях являются: снижение фибринолиза из-за нарушения связи тканевого активатора плазминогена (t-РА) и плазминогена с аномальным фибрином, аномальная сборка фибрина, дефект активации плазминогена аномальным фибрином, сформированным из аномального фибриногена.

Клинически для тромботических дисфибриногенемий характерны венозные и артериальные тромбозы и тромбоэмболии легочных артерий. Гомозиготные дисфибриногенемии очень редки и проявляются в детском возрасте инсультами, тромбозами брюшной аорты и постоперационными тромбозами.

Другие врожденные аномалии, предрасполагающие к патологическому тромбообразованию

Дефекты тромбомодулина. В некоторых исследованиях было показано, что около 5% семей с наследственной тромбофилией имеют дефект одного из генов ТМ. Также есть сообщения о том, что полиморфизм гена ТМ повышает риск артериального тромбоза, особенно в сочетании с дру-

Патология гемостаза

гими факторами патологического тромбогенеза. Изучение активности ТМ затруднено из-за того, что он связан с мембраной эндотелиоцитов и отсутствует в кровотоке.

Мутации гена тромбоцитарного рецептора GPIIb/IIIa, ингибитора активатора плазминогена. Их значение в развитии тромбозов, распространенность в популяции и механизм развития тромбофилии изучаются, однако известно, что эта мутация приводит к возрастанию риска артериальных и венозных тромбозов.

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия, видимо, может расцениваться как фактор, предрасполагающий к тромбозам.

Возраст и атеросклероз. Чрезвычайно важные факторы патологического тромбообразования. По мере старения организма риск тромботических осложнений значительно возрастает. Растущая атеросклеротическая бляшка вызывает местную дисфункцию и десквамацию эндотелия с развитием атеротромбоза.

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз при действии факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний

Нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза могут быть причиной сердечно-сосудистых заболеваний - ускоренного развития атеросклероза, клинически проявляться нарушениями коронарного, мозгового кровообращения, кровотока в периферических органах.

Тромбоатерогенез

Липидные пятна и атеросклеротические бляшки на поверхности магистральных сосудов, выпирающие в просвет (рис. 139), приводят к резкому увеличению сил бокового сдвига на поверхности, которые могут вызывать механическое повреждение поверхностного слоя гликокаликса и

деэндотелизацию с последующим пристеночным тромбообразованием.

Особенно опасны лопающиеся атеросклеротические бляшки, так как в момент разрыва вскрываются внутренние слои стенки, которые обладают выраженными прокоагулянтными свойствами. Кроме того, активные метаболиты, выделяющиеся из адгезированных тромбоцитов и лейкоцитов, могут в этот момент вызвать локальный спазм, тем самым дополнительно сужая просвет артерии. Это сочетание - локальный тромбоз и одновременный спазм - является причиной острой сосудистой, в частности коронарной, недостаточности и внезапной смерти.

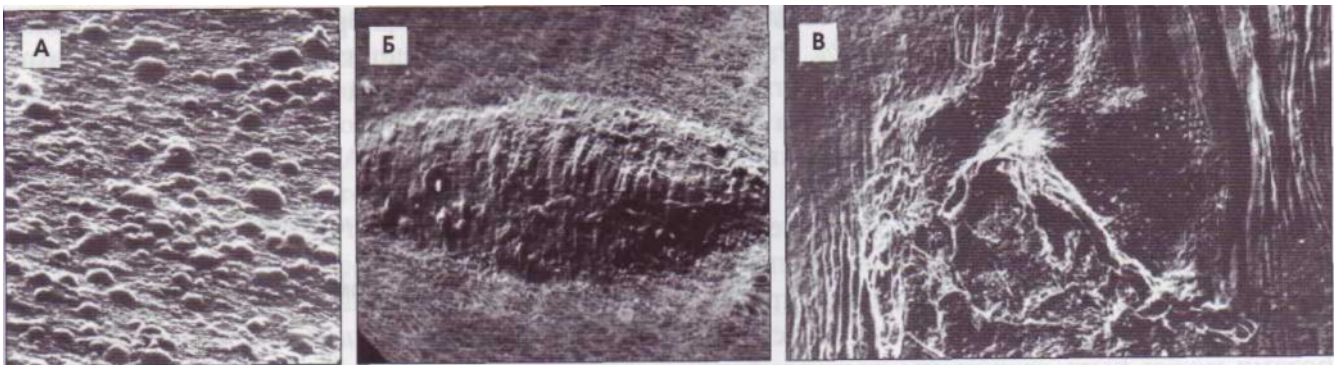


Рис. 139. Повреждение сосудистой стенки при атерогенезе: А - липидные пятна, выпирающие в просвет аорты, Б - атеросклеротическая бляшка, поверхность которой подвергается деэндотелизации за счет сил бокового сдвига, В - лопнувшая атеросклеротическая бляшка в коронарной артерии, которая явилась причиной активного пристеночного тромбообразования и острой коронарной недостаточности

Клинический пример 13

Больной 58 лет. Атеросклероз, эндартериит нижних конечностей. Состояние после пластики бедренной артерии с установкой протеза типа

Гортекс. В качестве профилактического средства от повторной окклюзии протеза больной в течение года принимает ацетилсалициловую кислоту в дозе 0,125 1 раз в день.

Коагулограмма для решения вопроса об адекватности антиагрегационной терапии

Тест	Больной	Референтное значение
АЧТВ (с)	42	35–45
ПТ (%)	94	80–100
Фибриноген (г/л)	3,7	2–4
ТВ (с)	27	28–30
Лизис эуглобулиновой фракции (мин)	170	140–240
АТШ (%)	80	75–125
Агрегация с 2,5 мкмоль/л АДФ (%)	92	50–70
Заключение	Усиление агрегационной активности тромбоцитов. Недостаточная эффективность принимаемого аспирина. Рекомендуется принимать антиагреганты другого ряда	

Катетеры центральных вен

Среди приобретенных факторов риска тромбоза на первом месте у детей всех возрастов стоит катетеризация центральных вен. В более старшем возрасте значение этого фактора относительно снижается, но его актуальность остается. Дети с обширными тромбозами вследствие катетеризации центральных вен имеют серьезный риск длительно сохраняющихся осложнений, включая посттромботический синдром. В большинстве случаев тромбозы, связанные с установкой катетеров, возникают в системе верхней полой вены и в сердце. Система нижней полой вены может страдать при установке катетера в пупочную вену.

Катетер-зависимые тромбозы описывались даже у лиц с гемофилией, у которых катетер находился более 48 месяцев. Этот факт указывает на возрастание риска тромбоза пропорционально длительности установки катетера.

Антифосфолипидный синдром и волчаночный антикоагулянт

Термин «антифосфолипидный синдром» (АФС, английская аббревиатура - APS) используется для обозначения состояния, сопровождающегося накоплением антител против анионных фосфолипидов (ФЛ), белков, связанных с ФЛ,

или кофакторных белков в отсутствие фосфолипидов. Основное проявление АФС - тромбозы различной локализации. Часто эти антитела обозначают как волчаночные антикоагулянты из-за того, что они изначально определены у больных с системной красной волчанкой (СКВ, английская аббревиатура - SLE - systemic lupus erythematosus).

Развитие волчаночных антикоагулянтов происходит при системных заболеваниях соединительной ткани и ревматических заболеваниях (СКВ, ревматоидный артрит), при первичном АФС, при различных инфекциях, злокачественных новообразованиях, на фоне приема некоторых лекарственных препаратов (прокаинамид, хлорпромазин, хинидин). Частота АФС у женщин и мужчин соотносится как 9:1, а при первичном АФС - 2:1. Клинически АФС представляет собой васкулопатию, для которой характерны окклюзивные и тромботические поражения артерий и вен (рис. 140). При этом отсутствуют признаки воспалительных и дегенеративных изменений глубоких слоев стенки сосудов, в процесс вовлечен только поверхностный слой эндотелия. Почти у 80% пациентов с АФС выявляются изменения в сердце и сосудах. Примерно у 30% пациентов с антифосфолипидными антителами развиваются тромбозы, особенно часто - тромбозы глубоких вен бедра, эмболия легочной

Патология гемостаза

артерии, тромбозы коронарных или мозговых сосудов. АФС лежит в основе ряда цереброваскулярных нарушений, синдрома Бадда-Киари, синдрома Рейно, тромботического неинфекционного эндокардита, асептического некроза головок бедренных костей. При АФС имеется очень высокий риск спонтанных абортов, мертворождения или внутриутробной гибели плода. Тромбоцитопения развивается у 20-25% пациентов с АФС, редко бывает тяжелой и почти никогда не осложняется кровотечениями.

Анионные фосфолипиды являются ключевыми компонентами основных этапов коагуляционного каскада и вовлечены в регуляцию антикоагулянтной системы протеина С. Ранее считалось, что волчаночные антикоагулянты направлены против фосфолипидов. Согласно последним исследованиям плазменные белки β_2 -гликопротеин 1 (β_2 -GPI) и протромбин являются мощными кофакторами взаимодействия аутоантител с фосфо-

фолипидной поверхностью. Структура (3-гликопротеина 1 представлена на рис. 141. Это основной кофактор распознавания анионных фосфолипидов антителами. По-видимому, β_2 -GPI участвует в удалении анионных фосфолипидов после апоптоза клеток, тем самым предотвращает гиперкоагуляцию.

Антифосфолипидный синдром сопровождается присутствием в сыворотке аутоантител классов IgM, IgA и IgG. Это поликлональные антитела, которые связываются с кардиолипном клеточных мембран тромбоцитов и эндотелиальных клеток, поэтому получили название *кардиолипидных антител*. Связывание антител на поверхности эндотелиальных клеток приводит к активации эндотелия. В результате происходит гиперэкспрессия клеточных молекул адгезии, увеличивается адгезия моноцитов к эндотелию, повышается прокоагулянтная активность эндотелия, индуцируется апоптоз эн-

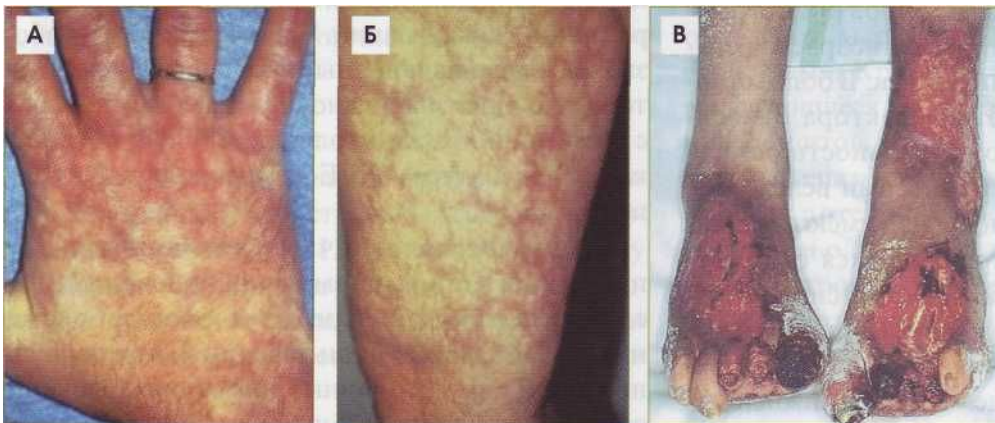


Рис. 140 (А, Б, В). Антифосфолипидный синдром. Всксуплопатии с окклюзивными и тромботическими поражениями вен и артерий

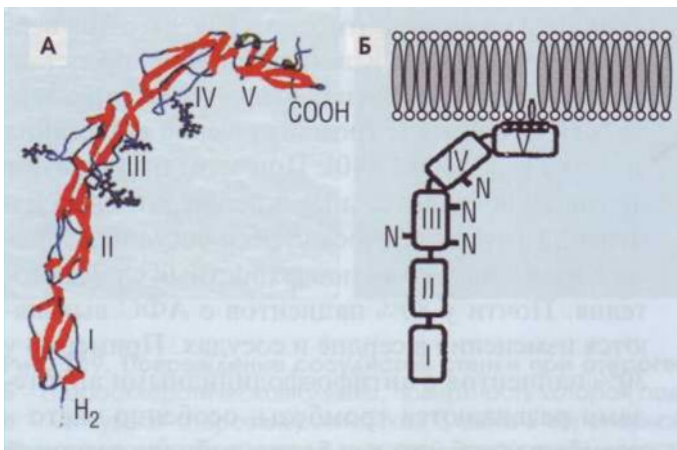


Рис. 141. Структурная организация (А) и функциональное взаимодействие (Б) β_2 -гликопротеина 1 с фосфолипидной мембраной. β_2 -GPI - высокогликозированный одноцепочечный белок (250 кДа), состоящий из 5 доменов и 326 аминокислот

Патология гемостаза

дотелиоцитов. Патогенез развития тромбоза при АФС изучен недостаточно. Возможно, антифосфолипидные антитела снижают анти-тромботический потенциал эндотелия за счет уменьшения экспрессии тромбомодулина (ТМ), снижения синтеза простациклина (ПГ₂), тканевого активатора плазминогена и гепарина; повышают экспрессию тканевого фактора и ингибитора активатора плазминогена. У больных с АФС выявлено снижение активности АТШ, протеина С, свободного протеина S, активация тромбоцитов. Мишенью для антител к кардиолипину могут явиться белки, экспрессированные на мембранах эндотелиальных клеток, такие, как рецепторы протеина С, протеина S, тромбомодулин. При этом повышается резистентность к активированному протеину С (РАПС). Появление антител могут индуцировать лекарственные препараты (фенитоин, хинин, гидралазин, прокаинамид, фенотиазины, α -интерферон, кокаин), бактериальные и вирусные инфекции, опухоли, частые аборт, другие повреждающие факторы. Очень часто кардиолипидные анти-

Клинический пример 14

Больной 13 лет. Заболевание началось остро. Без видимых провоцирующих обстоятельств летним вечером ребенок почувствовал тяжесть в области правой ноги. Семейный анамнез по тромбофилии не отягощен.

Обследование показало наличие тромбоза подколенной, глубокой бедренной и подвздошной вены справа.

Коагулологическое обследование: незначительная тромбоцитопения $116 \times 10^9/\text{л}$, ПВ 16 с (норма), тромбиновое время 15с (норма 15-20 с), фибриноген 4,5 г/л, АТШ 100%, протеин С 95%, протеин S

Приобретенные состояния, предрасполагающие к развитию тромбозов. Аутоиммунные заболевания

Пациенты с аутоиммунными заболеваниями имеют повышенный риск развития тромбоза. Механизм этого явления изучен недостаточно. Возможно, явления микроваскулита и микротромбозов, связанные с аутоиммунными заболеваниями, играют роль в патогенезе тромбофилии.

тела появляются при ревматических заболеваниях, системных коллагенозах, аутоиммунных эндокринных заболеваниях.

Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома была описана выше.

Лечение АФС включает использование кортикостероидов, таких, как метилпреднизолон, непрямым антикоагулянтам, дезагрегантам или гепарина и плазмаферез. Лабораторный контроль за непрямыми антикоагулянтами у таких больных затруднен, так как используемый тромбопластин часто чувствителен к волчаночным антикоагулянтам.

Не все случаи АФС сопровождаются лабораторными признаками наличия волчаночного антикоагулянта. В то же время более чем в 20% случаев присутствия волчаночных антител в плазме крови может не быть лабораторных данных за АФС. АФС встречается у 5-15% лиц с венозными тромбозами. Риск тромбоза у лиц с волчаночным антикоагулянтом в 9 раз выше, чем в среднем в популяции.

110%, АЧТВ 45,9 с (норма 28-40 с), активность ф. IX 68%, ф. XI 80%, ф. XII 96%, ф. VIII 120%, скрининговый тест на волчаночный антикоагулянт положительный.

Был сделан вывод о тромбозе вследствие развившегося волчаночного антикоагулянта. Иммунологическое обследование подтвердило наличие **первичного антифосфолипидного синдрома**. Проводилось продолжительное лечение антифосфолипидного синдрома, длительно назначались антикоагулянты с МНО около 2 и терапия Детралексом. Рецидивов тромбозов не было, тромбированная вена реканализировалась через год.

Злокачественные заболевания

Злокачественные заболевания и их химиотерапия, в частности L-аспарагиназа, преднизолон, хорошо известны как факторы, предрасполагающие к развитию тромбозов, в том числе у детей. Врожденные факторы развития тромбоза и внутривенные катетеры, устанавливаемые для длительной терапии - дополнительные факторы риска патологического тромбогенеза при злокачественных новообразованиях.

Патология гемостаза

Клинический пример 15

Больная 43 лет.

Диагноз: полипоз матки. Направляется на оперативное лечение.

Коагулологическое обследование: АЧТВ 31 с (норма 35-45 с), ПИ 87%, ТВ 25 с (норма 28-30 с), фибриноген 7,3 г/л, РФМК 11 мг/дл (норма до 4 мг/дл), лизис эуглобулиновой фракции >250 мин (норма 140-240 мин).

Нефротический синдром

Риск тромбоза при нефротическом синдроме довольно высок. Частота тромбоэмболических осложнений у детей достигает 28%, у взрослых может быть выше. Наиболее часто при нефротическом синдроме поражаются почечные вены. Кроме того, описаны поражения артерий и вен

Клинический пример 16

Больная, возраст 51 год. Находится в отделении гемодиализа.

Диагноз: нефротический синдром. Повторные тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА). Проводилась гепаринотерапия 10 000 ед/сут, отменена 2 дня назад.

Коагулологическое обследование: тромбоциты 300×10^9 /л, СОЭ 45 мм/ч, АЧТВ 29 с (норма

Прием оральных контрацептивов

Эстроген-содержащие оральные контрацептивы, применяемые для регуляции менструального цикла, являются фактором риска развития тромбозов. Выявлены следующие изменения гемостаза у женщин, принимающих эстрогены:

- Относительно низкое содержание свободного протеина S и антитромбина, однако, как правило, в пределах нормы.
- Некоторое повышение факторов II, VII, VIII, XII и фибриногена, но тоже в пределах нормы.
- Приобретенное повышение резистентности к протеину С, без мутации ф. V Лейдена.
- Повышение активности фибринолиза.

Учитывая все перечисленные изменения, нельзя сделать однозначного вывода о механизме развития протромботического состояния при при-

Заключение: на фоне значительного гипофибринолиза ускорение протромбинообразования по внутреннему пути. Тромбинемия. Снижение фибринолитической активности. Состояние гиперкоагуляции.

На гистологическом исследовании - злокачественная опухоль.

других регионов сосудистого русла. Механизм тромбофилии, связанной с нефротическим синдромом, изучается. По-видимому, повышение при воспалении некоторых прокоагулянтов, таких, как фибриноген, и потеря низкомолекулярных белков, например АТШ, играют определенную роль. Наиболее часто тромбозы возникают в течение первых трех месяцев после установления диагноза.

35-45 с), ПИ 98%, ТВ 32 с (норма 28-30 с), фибриноген 4,1 г/л, лизис эуглобулиновой фракции >250 мин (норма 140-240 мин), агрегация с АДФ 100%.

Заключение: нарушение (ускорение) протромбинообразования по внутреннему пути. Снижение фибринолитической активности. Резкое усиление агрегационных свойств тромбоцитов. **Состояние гиперкоагуляции.**

еме эстроген-содержащих препаратов. Тем не менее прием оральных контрацептивов у взрослых повышает риск тромбоза приблизительно в 4 раза, а при наличии врожденных факторов, таких, как ф. V Лейден и мутация протромбина 20210 - в 35 и 16 раз соответственно.

Инфекции

Описаны тромботические осложнения при ветряной оспе в виде ДВС, фульминантной пурпуры и различных тромбозов. В основе патогенеза этих осложнений лежит образование специфических антител к протеину S. Определенный вклад вносит волчаночный антикоагулянт. ВИЧ-инфекция также может проявляться тромбозами различной локализации.

Патология гемостаза

Гнойный тромбоз внутренней яремной вены, или синдром Лемьера. - редкое проявление тромбозов у детей, однако тромбоэмболические осложнения и смертность около 20% требуют своевременно распознавать это заболевание.

Гипофибринолиз

Недостаточность фибринолиза может быть связана с:

- Дефицитом тканевого активатора плазминогена (t-РА), урокиназы (u-РА) или плазминогена.
- Нарушением освобождения t-РА из эндотелия (дефект синтеза или пула хранения).
- Повышенной концентрацией α -антиплазмина или PAI-1.
- Дефицитом факторов контактной активации - ф.ХП, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена, что сопровождается недостаточной активацией и-РА.

Встречается (достаточно редко) врожденный гипофибринолиз, связанный с мутацией фибрина, у которого утеряна способность стимулировать t-РА-зависимую активацию плазминогена. Этиологическая значимость этого фактора дискутируется. До настоящего времени отсутствуют серьезные клинические наблюдения, подтверждающие значение гипофибринолиза в развитии патологического тромбообразования.

Лечение тромбозов

Основная терапия тромбозов включает применение антикоагулянтов.

Антикоагулянты делятся на прямые и непрямые, или антагонисты витамина К.

Прямые антикоагулянты. Гепарин

Как правило, антикоагулянтную терапию начинают с применения гепарина. Это позволяет быстро создать необходимый антикоагуляционный потенциал и блокировать патологическое тромбообразование. При наличии данных за дефицит АТ совместно с гепаринотерапией рационально использовать свежезамороженную плазму (СЗП) или концентраты АТШ. В настоящее

время препаратами выбора являются нефракционированные и низкомолекулярные гепарины (табл. 19 ирис. 50).

Лабораторный контроль терапии нефракционированными гепаринами проводится на основании оценки изменения АЧТВ. Хотя различные реактивы неодинаково чувствительны к гепарину, а изменения АЧТВ неоднозначно коррелируют с его клинической эффективностью, этот тест на практике применяется наиболее часто. При подкожном введении через сутки от начала лечения терапевтические дозы гепарина в крови достигаются примерно у 40% пациентов, а у получающих непрерывную инфузию - у 70%. При лечении тромбозов считается, что терапевтическая концентрация гепарина достигнута, если АЧТВ удлинилось в 1,5-2,3 раза.

Терапия низкомолекулярными гепаринами. Особенностью низкомолекулярных гепаринов является низкая активность в отношении тромбина и высокая активность в отношении ф.Ха. Несмотря на высокую стоимость препаратов, они находят все большее применение для лечения тромбозов. Их несомненные плюсы заключаются в меньшем риске развития осложнений, более длительном периоде выведения, что позволяет вводить их 1 раз в сутки.

Лабораторный контроль терапии низкомолекулярными гепаринами основан на определении анти-Ха-активности плазмы (табл. 20).

Осложнения терапии гепаринами - кровотечения и гепарин-индуцированная тромбоцитопения.

Гепарин-индуцированная тромбоцитопения наблюдается примерно у 2% больных, получающих свиной гепарин, а при использовании гепарина из других источников частота ее значительно ниже. Механизм развития гепарин-индуцированной тромбоцитопении связан с появлением антител к комплексу гепарин - тромбоцитарный фактор 4. Помимо тромбоцитопении, стимуляция антителами тромбоцитарных гликопротеинов приводит к активации тромбоцитов, и может возникнуть тромбоз (рис. 132).

Терапия оральными (непрямыми) антикоагулянтами

Антикоагулянты непрямого действия широко используются в медицинской практике для

Патология гемостаза

длительной профилактики тромбозов у пациентов с протромботическими состояниями.

Механизм действия. Антикоагулянты непрямого действия блокируют в клетках печени конечный этап синтеза (γ -карбоксилирование) витамин-К-зависимых факторов VII, X, IX, протромбина, а также двух антикоагулянтов - протеинов C и S. Эти препараты действуют как конкурентные ингибиторы витамин-К-редуктазы и витамин-К-эпоксидредуктазы (рис. 142). Под влиянием антикоагулянтов непрямого действия образуются неактивные белковые молекулы факторов VII, X, IX и II PIVKA (PIVKA Proteins Induced by Vitamin K Absence or Antagonists) - протеины, индуцированные отсутствием витамина К или наличием его антагонистов. PIVKA обладают теми же иммунологическими свойствами и аминокислотным составом, что и активные

факторы, но не способны участвовать в процессе свертывания крови. Наиболее корректное название для PIVKA-белков - акарбоксібелки. В результате формирования акарбоксібелков снижается интенсивность активации протромбина и соответственно риск развития патологического тромбоза. Гипокоагуляция при использовании антагонистов витамина К развивается медленно, эти препараты отличаются продолжительным действием и обладают кумулятивным эффектом.

Скорость снижения концентрации витамин-К-зависимых факторов зависит от периода их циркуляции в организме: сначала уменьшается содержание фактора VII (время полувыведения - $t_{1/2} = 4-6$ ч), затем IX ($t_{1/2} = 15-30$ ч), X ($t_{1/2} = 24-40$ ч) и протромбина ($t_{1/2} = 48-96$ ч). Через 4-7 дней концентрация витамин-К-зависимых факторов

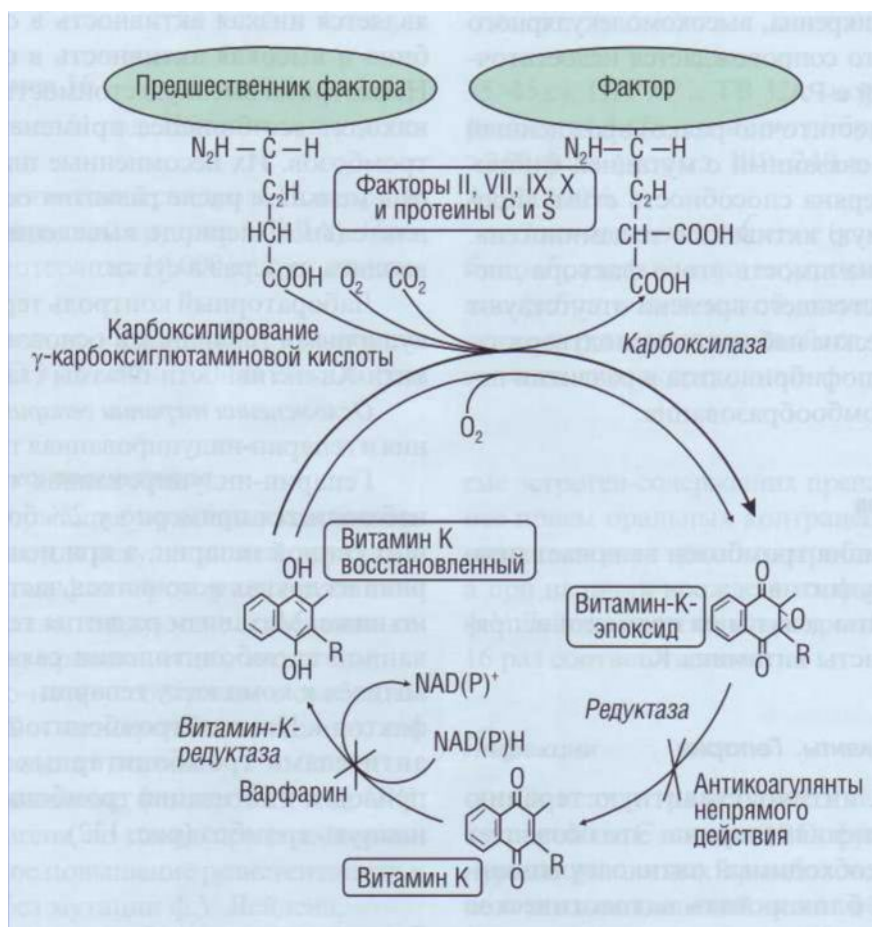


Рис. 142. Механизм действия антикоагулянтов непрямого действия, которые ингибируют витамин-К-редуктазу и витамин-К-эпоксидредуктазу в цикле восстановления витамина К. Витамин К, в свою очередь, необходим для карбоксилирования глутаминовой кислоты при синтезе факторов II, VII, IX и X и протеинов C и S

Патология гемостаза

устанавливается на низком, примерно одинаковом уровне, обеспечивающем необходимый антикоагулянтный эффект.

Антагонисты витамина К имеют целый ряд преимуществ по сравнению с антикоагулянтами прямого действия (препаратами гепарина и гирудина), в том числе:

- Препараты применяются внутрь, не требуют инъекционного введения, поэтому могут применяться самим пациентом.
- Препараты малотоксичны и могут применяться для длительной (годы) профилактики тромбозов.
- Разработана эффективная технология мониторинга дозировок антикоагулянтов непрямого действия на основе использования стандартизированных тромбопластинов. Использование международного стандартизованного индекса и расчета международного нормализованного отношения (МНО) позволяет однозначно интерпретировать результаты, независимо от места их проведения и используемых реактивов. Это значительно снизило риск развития у больных геморрагических осложнений и частоту случаев недостаточной эффективности препаратов.
- Создана методика контроля эффективности терапии непрямыми антикоагулянтами по анализу цельной капиллярной крови, которая позволяет проводить мониторинг в амбулаторных условиях, в том числе на дому самим пациентом.
- При вторичной профилактике тромбозов в условиях правильного мониторинга антикоагулянтов непрямого действия эффективность этих препаратов не уступает эффективности терапии прямыми антикоагулянтами.
- Стоимость не прямых антикоагулянтов ниже стоимости аналогичного по эффективности курса гепаринотерапии.
- Имеется прямая зависимость гипокоагуляционного эффекта от дозы препарата. Большая широта терапевтического эффекта позволяет подбирать и поддерживать необходимую степень гипокоагуляции.

После многих операций на коронарных сосудах и клапанах сердца, после хирургических вмешательств у ортопедических, онкологических больных необходима длительная, часто пожиз-

ненная профилактика, и антикоагулянты непрямого действия для этого наиболее удобны.

Применяемые в настоящее время в медицинской практике антикоагулянты непрямого действия подразделяют на две основные группы: 1) кумарины, к которым относятся дикумарол, пелентан, синкумар, варфарин (кумадин, мареван) и 2) индандионы, представителями которых являются фенилин и омефин. Препараты второй группы во всем мире вышли из употребления в связи с нестабильностью их действия, токсичностью, рядом серьезных побочных эффектов. Однако в России и странах СНГ они все еще применяются, так как до недавнего времени в арсенале отечественной фармации не было современных стандартизированных кумаринов.

Препараты применяются *per os*, поэтому часто обозначаются как пероральные или оральные антикоагулянты. Поскольку препараты конкурируют с витамином К за включение в ферменты, степень их действия и соотношение активных и неактивных ферментов гемостаза зависят от дозы принимаемого антикоагулянта.

Мониторинг терапии непрямыми антикоагулянтами

Для мониторинга терапии непрямыми антикоагулянтами используют определение протромбинового времени (ПВ), результат которого выражается в виде МНО - международного нормализованного отношения (см. раздел «Протромбиновое время»). ПВ следует определять ежедневно (в крайнем случае, через день) до тех пор, пока не будет подобрана индивидуальная поддерживающая доза и не станут стабильными показатели теста. Затем ПВ оценивают 1 раз в неделю в течение первого месяца лечения, в дальнейшем 1-2 раза в месяц и реже.

В табл. 63 приводятся значения МНО при клинических ситуациях, требующих приема пациентами антикоагулянтов непрямого действия.

Во время подбора дозы антикоагулянта непрямого действия следует периодически определять АЧТВ: оптимальными считаются значения в 1,5-2 раза превышающие верхнюю границу референтной величины. Меньшие результаты свидетельствуют о недостаточном уровне гипокоагуляции, что может наблюдаться при гиперак-

Показания к применению антикоагулянтов непрямого действия	Значения МНО
Профилактика тромбозов центрального венозного катетера	Мини-дозы без контроля МНО
Профилактика тромбозов на фоне химиотерапии IV стадии рака молочной железы Первичная профилактика инфаркта миокарда у лиц высокого риска сердечно-сосудистых инцидентов при наличии противопоказаний к аспирину	1,6 (1,3–1,9)
Лечение венозных тромбозов Лечение тромбозов легочной артерии Профилактика венозных тромбозов Профилактика системных тромбозов при мерцательной аритмии, пороках сердца Профилактика системных тромбозов при механических протезах клапанов сердца Профилактика системных тромбозов при остром переднем Q-инфаркте миокарда Вторичная профилактика инфаркта миокарда при наличии противопоказаний к аспирину Критическая ишемия нижних конечностей	2,5 (2,0–3,0)
Профилактика системных тромбозов: – при механических двустворчатых или одностворчатых протезах клапанов сердца в митральной позиции – при мерцательной аритмии – при дополнительных факторах риска Профилактика тромбозов при антифосфолипидном синдроме	3,0 (2,5–3,5)

тивации факторов внутреннего пути, чаще фактора VIII. В этом случае следует несколько увеличить дозу препарата или временно усилить лечение назначением гепарина. Увеличение АЧТВ более чем в 2 раза резко усиливает риск кровотечения, что требует снижения дозы препарата или прекращения терапии непрямыми антикоагулянтами.

При необходимости быстрого достижения антикоагулянтного эффекта одновременно назначают гепарин и несколько большую дозу непрямого антикоагулянта. В этом случае необходим мониторинг гепаринотерапии по АЧТВ и ежедневный мониторинг терапии антикоагулянтом непрямого действия по МНО. По достижении необходимого терапевтического уровня значений ПВ переходят на поддерживающую дозу препарата, а гепарин отменяют только тогда, когда поддерживающая доза непрямого антикоагулянта не менее 2 дней подряд обеспечивает необходимый уровень гипокоагуляции.

Осложнения терапии непрямыми антикоагулянтами

Наиболее тяжелым осложнением является усиление тромбоза или возникновение тромбоза подкожных сосудов с развитием некроза тка-

ней - «кумудинового некроза». Возникают эти осложнения у лиц с низкой активностью протеинов S и C. Поскольку эти белки являются витамин-К-зависимыми, их активность быстро снижается после начала приема не прямых антикоагулянтов, тогда как их субстрат - факторы V и VIII - не меняет своей активности. Нарушение соотношения фактор-ингибитор может приводить к усилению тромбозов и развитию «кумудинового некроза».

Лечение «кумудинового некроза» заключается в назначении прямых антикоагулянтов и свежезамороженной плазмы как источника протеинов C и S.

Другая группа осложнений - геморрагические проявления при передозировке антикоагулянтов. При этом возможны выраженные кожные геморрагические проявления, преимущественно по гематомному типу, носовые кровотечения, кровотечения из мест инъекций, гематомы мягких тканей, желудочно-кишечные, почечные кровотечения и даже внутричерепные кровоизлияния.

Лечение геморрагических проявлений заключается в снижении дозы или временной отмене не прямых антикоагулянтов, применении свежезамороженной плазмы, криопреципитата или не-

Патология гемостаза

активированных препаратов протромбинового комплекса.

Фибринолитическая терапия

Фибринолитические препараты широко используются при инфаркте миокарда: на протяжении многих лет применяли стрептокиназу и урокиназу. Однако эти препараты малоэффективны при лечении эмболии легочной артерии и массивного тромбоза глубоких вен бедра. Существенным ограничением применения фибринолитических препаратов являются геморрагические осложнения, особенно церебральные геморрагии. Природа геморрагических осложнений связана не столько с лизисом фибриновой пробки, сколько с появлением большого количества продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ), которые способны повреждать сосудистую стенку, особенно эндотелий, влиять на функции тромбоцитов. Поэтому природа геморрагии при использовании фибринолитических препаратов комплексная. Существенное улучшение результатов фибринолитической терапии достигнуто при внедрении тканевого активатора плазминогена (t-РА), особенно при введении его через катетер при инфаркте миокарда.

В настоящее время в качестве препаратов применяются:

- Стрептокиназа - бактериальный белок, продукт жизнедеятельности (β-гемолитического стрептококка (стрептодеказа).
- t-РА - специфический активатор плазминогена, нарабатываемый рекомбинантной технологией (альтеплаза) или генной инженерией как дериват t-РА с увеличенным временем

полувыведения из системы циркуляции (репеплаза, ланотеплаза) или как другой дериват t-РА с устойчивостью к ингибированию PAI-1 (тенектеплаза).

- Урокиназа - рекомбинантный препарат u-РА или проурокиназы (саруплаза).
- Фибринолитическую терапию часто сочетают с гепаринотерапией. В результате достигается эффект системного или локального гиперфибринолиза, что может оказать благоприятный эффект по лизису фибринового тромба и реканализации окклюзированных сосудов.

Частично деградированный фибриноген способствует снижению вязкости крови и уменьшению

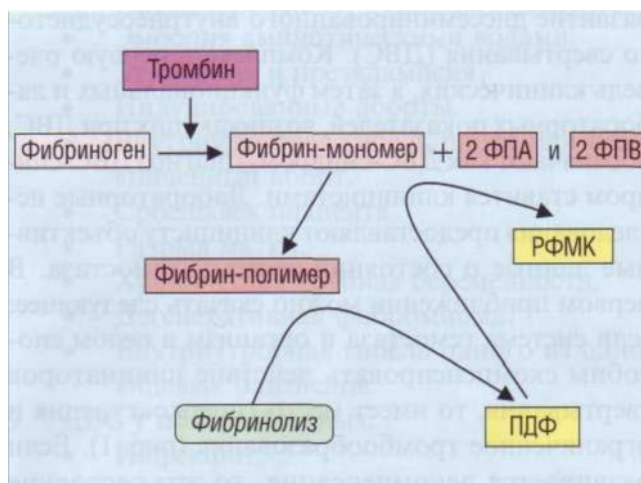


Рис. 143. Гиперфибринолиз сопровождается образованием избыточного количества продуктов деградации фибрина (ПДФ), которые способны вступать во взаимодействие с фибрин-мономерами, нарушая полимеризацию фибрина. При этом образуются растворимые комплексы мономеров фибрина (РКМФ) и проявляется гипокоагулянтный эффект ПДФ

Таблица 64

Влияние тромболитической терапии на показатели коагулограммы

Показатель	Изменение при тромболитической терапии
ПВ, АЧТВ	Удлинение, изменения показателей зависят от используемой аппаратуры и реактивов
Тромбиновое время	Резкое удлинение при накоплении ПДФ, использовании гепарина и снижении фибриногена
Рептилазное время	Удлинение (не зависит от использования гепарина)
Фибриноген	Снижение (результаты зависят от примененных препаратов и метода определения)
Плазминоген, α ₂ -антиплазмин	Снижение (результаты зависят от использованных препаратов)
Тромбоэластограмма	Изменения, типичные для гиперфибринолиза

Патология гемостаза

нию адгезии и агрегации тромбоцитов. Кроме того, ПДФ оказывают потенциально антикоагулянтное действие, так как, вступая во взаимодействие с фибрин-мономерами, вызывают образование растворимых комплексов мономеров фибрина (РКМФ) и нарушение полимеризации фибрина (рис. 143).

Побочным эффектом тромболитической терапии могут быть кровотечения. Однако современные схемы применения тромболитических препаратов и модернизация самих препаратов значительно снизили частоту таких осложнений. Влияние тромболитической терапии на некоторые лабораторные показатели представлены в табл. 64.

Вторичные комплексные нарушения гемостаза

ДВС-синдром

Крайним проявлением активации системы гемостаза с включением всех его звеньев является развитие диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС). Комплекс в первую очередь клинических, а затем функциональных и лабораторных показателей, возникающих при ДВС, обозначают как ДВС-синдром. Диагноз ДВС-синдром ставится клиницистами. Лабораторные исследования предоставляют клиницисту объективные данные о состоянии системы гемостаза. В первом приближении можно сказать следующее: если система гемостаза и организм в целом способны скомпенсировать действие инициаторов свертывания, то имеет место гиперкоагуляция и ограниченное тромбообразование (рис. 1). Если развивается декомпенсация, то это состояние можно трактовать как ДВС-синдром (рис. 144).

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 др.), антикоагулянтов и тромбоцитов;
- имеется частичная обструкция наиболее мелких сосудов с ишемическими нарушениями в органах;
- обнаруживается реактивный фибринолиз.

Этиология и патогенез ДВС

ДВС-синдром возникает обычно в результате поступления в кровь или образования в ней веществ, инициирующих свертывание крови. Основопологающее событие в генезе острого ДВС-синдрома -

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:

1. Повреждение тканей (массивный контакт крови с тканевым фактором):
 - Механическая травма (краш-синдром, проникающие повреждения, например повреждения мозга).
 - Термальные повреждения (ожоги, обморожения).
 - Асфиксия и гипоксия.
 - Оперативные вмешательства.
 - Ишемия органов, инфаркты.

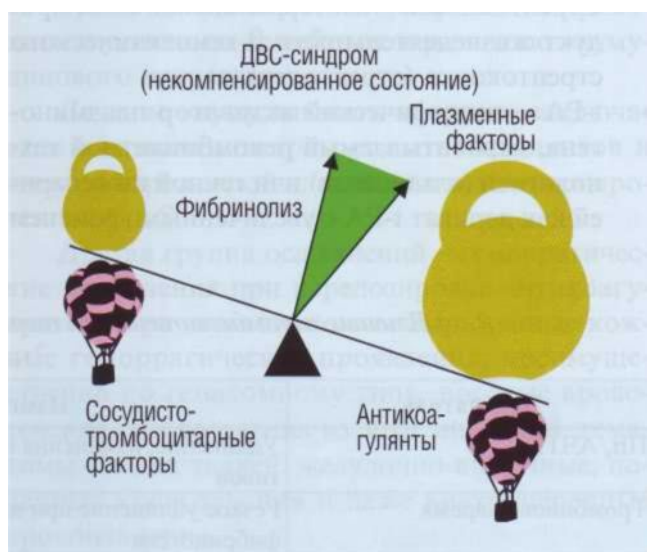


Рис. 144. ДВС-синдром - состояние, при котором развивается декомпенсация, динамическое равновесие не достигается из-за чрезмерной активации факторов, вызывающих гиперкоагуляцию

Патология гемостаза

- Жировая эмболия.
 - Гиповолемический/геморрагический/анафилактический шок.
 - Гипертермия.
2. Онкология (контакт с онкологическими прокоагулянтами, тканевым фактором, фактором некроза опухоли, клеточными протеазами):
 - Солидные опухоли.
 - Лейкозы.
 3. Инфекция (воздействие эндотоксинов, повреждение эндотелиальных клеток, активация тромбоцитов):
 - Бактериальные инфекции, вызванные менингококками, *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Pneumococcus*, *Hemolytic streptococci*, *Staphylococcus*.
 - Вирусные инфекции, вызванные *Dengue*, *Lassa*, *Ebola*, *Marburg*, *Hantaan*, *Rubella*, *Herpes* и др.
 - Протозойные - малярия.
 - Другие - кандидозы, аспергиллезы, клостридиозы, туберкулез.
 - Токсический шок.
 - Грамотрицательный сепсис.
 4. Патология сосудов и циркуляторные нарушения (поражение эндотелия, активация тромбоцитов):
 - Гигантская гемангиома, сосудистые опухоли.
 - Аневризма аорты.
 - Хирургические вмешательства на сосудах, внутрисосудистые манипуляции.
 - Опухоли сердца.
 - Операции шунтирования сосудов сердца.
 - Острый инфаркт миокарда.
 - Васкулиты.
 - Эмболия легочной артерии.
 5. Иммунологические нарушения (активация комплемента, экспозиция тканевого фактора):
 - Анафилактические реакции.
 - Аллергические реакции.
 - Острые гемолитические посттрансфузионные реакции.
 - Гепарин-индуцированная тромбоцитопения.
 - Реакция отторжения трансплантата.
 - Болезнь Кавасаки.
 6. Прямая активация ферментов:
 - Панкреатит.
 - Укусы ядовитых змей.
 7. Другие расстройства:
 - Фульминантный некроз печени.
 - Синдром Рейе.
 - Цирроз печени.
 - Респираторный дистресс-синдром у взрослых.
 - Инфузия концентратов протромбинового комплекса.
 - Гемолитико-уремический синдром.
 - Воспалительные заболевания кишечника, перитонит.
 - Саркоидоз, амилоидоз.
 - Геморрагический шок.
 - Гомозиготный дефицит протеинов С и S.
 8. Осложнения беременности:
 - Преждевременная отслойка плаценты.
 - Эмболия амниотическими водами.
 - Эклампсия и преэклампсия.
 - Индуцированные аборт.
 - Внутритробная гибель плода или незавершенный аборт.
 - Сросшаяся плацента.
 - Разрыв матки.
 - Хроническая трубная беременность.
 - Дегенеративная фибромиома.
 - Внутритробная гибель одного из однояйцевых близнецов.
 9. ДВС у новорожденных:
 - Инфекции.
 - Асфиксия в родах.
 - Болезнь гиалиновых мембран.
 - Аспирационный синдром, апноэ, ателектаз, пневмония.
 - Легочное кровотечение.
 - Переохлаждение.
 - Глубокая недоношенность.
 - Тромбозы крупных сосудов.
 - Фульминантная пурпура.
 - Некротизирующий энтероколит.
 - Новообразования у плода и лейкозы.
 - Повреждение головного мозга (некрозы и кровоизлияния).
 - Фетальный эритробластоз.
 - Поражение печени.
 - Врожденное нарушение толерантности к фруктозе.
- Основные патогенетические механизмы запуска ДВС:
- Нарушение или повреждение эндотелия, сопровождающееся высвобождением прокоагу-

Патология гемостаза

лянтов и контактом крови с тканевым фактором.

- Активация моноцитов с экспрессией тканевого фактора и прокоагулянтов моноцитов. Именно чрезмерная активация и дегрануляция моноцитов-макрофагов, обладающих полноценным кровяным тромбопластином, часто рассматривается как центральное звено ДВС-синдрома при сепсисе.
- Контакт с тканевым фактором клеток злокачественных опухолей. ДВС особенно часто возникает при аденокарциноме поджелудочной и предстательной желез, продуцирующей 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 и др. Травмы головы с нарушением гематоэнцефалического барьера и контактом крови с тканью мозга - мощный источник тканевого тромбопластина. Осложнения беременности, при которых материал, обладающий активностью тканевого фактора, попадает из полости матки в кровь матери (преждевременная отслойка плаценты, аборт, задержка мертворожденного 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 капсуле бактерий присутствует большое количество липополисахаридов (эндотоксин, рис. 145), 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 ДВС-синдроме в первую очередь приводит к гипотонии и вазодилатации.

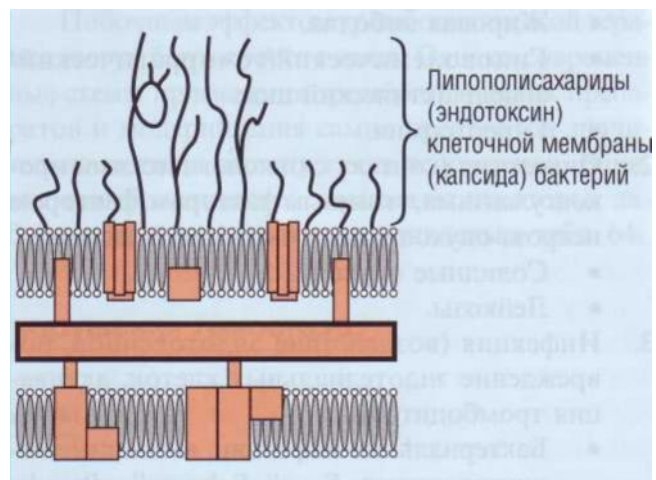


Рис. 145. Эндотоксин капсулы бактерий. Особенно его много у грамотрицательных бактерий. Эндотоксин вызывает массивную активацию с дегрануляцией моноцитов-макрофагов и освобождение в кровь большого количества кровяного тромбопластина, который индуцирует гиперкоагуляцию и развитие ДВС-синдрома

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. Возможно, что активация системы комплемента также усиливает процесс потребления, но более вероятно, что это лишь два параллельных процесса.

Имеются данные, что у пациентов с коагулопатией потребления снижена функция тканевых макрофагов и содержание фибронектина. Это приводит к снижению активности удаления макрофагами ретикулоэндотелиальной системы микроагрегатов фибрина, обломков коллагена и, возможно, бактерий и продуктов их жизнедеятельности.

Виды ДВС-синдрома

Лабораторные показатели, характеризующие состояние гиперкоагуляции и внутрисосудистого свертывания, меняются в зависимости от тече-

ния и стадии процесса. По течению ДВС-синдром подразделяют на:

- Острый, включая молниеносную (катастрофическую) форму. Острый ДВС-синдром является 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 ДВС-синдрома:
 - 1) гиперкоагуляция и гиперагрегация;
 - 2) коагулопатия и тромбоцитопатия потребления с активацией фибринолитической системы;
 - 3) генерализация фибринолиза;
 - 4) восстановление.
- Подострый с длительным периодом гиперкоагуляции и/или гиперагрегации тромбоцитов. Подострый ДВС-синдром, характеризующийся вялотекущим, скорее хроническим течением, лабораторно проявляется тромбоцитопенией, нормальным или несколько удлиненным ПВ, укорочением АЧТВ, нормальным или несколько сниженным фибриногеном и повышением уровня в плазме продуктов деградации фибрина (ПДФ). Следует отметить, что фибриноген, как острофазный белок, при инфекционных и травматических формах ДВС может быть повышенным. Это состояние может приводить к тромбоэмболическим осложнениям, в том числе к тромбозам вен, артериальной тромбоэмболии. Кровоточивость встречается нечасто.
- Хронический. Для хронической формы ДВС-синдрома характерно постоянное, но менее сильное активирующее воздействие на систему гемостаза. Это обуславливает малую скорость генерации тромбина, однако достаточную для развития микроциркуляторных нарушений. Хроническая форма ДВС-синдрома наблюдается при хронических заболеваниях легких, почек, атеросклерозе, сахарном диабете, артериальной гипертензии и других заболеваниях.

Тромбоцитарно-сосудистый гемостаз при ДВС-синдроме

Ведущим механизмом патологических изменений при ДВС являются нарушения в системе микроциркуляции. Выпадение фибрина в мелких сосудах сопровождается замедлением кровотока, сборкой эритроцитов в монетные столбики, травматизацией с изменением формы эритроцитов, увеличением анизоцитоза и появлением клеточного дебриса (рис. 146). Количественной характеристикой анизоцитоза эритроцитов является увеличение показателя RDW, определяемого гематологическими анализаторами и рассчитываемого как коэффициент вариации объема клеток. Травматизация эритроцитов сопровождается внутрисосудистым гемолизом. Симптомом комплекса внутрисосудистого гемолиза: повышение свободного НЬ, неконъюгированного билирубина и ретикулоцитоз. ДВС с внутрисосудистым гемолизом характеризуется более тяжелым течением, чем без гемолиза, так как гемолиз усиливает свертывание из-за освобождения АДФ из эритроцитов, который дополнительно активирует тромбоциты. Кроме того, поврежденные эритроциты являются источником эритрофосфатидов.

Тромбоциты при ДВС всегда вовлечены в развитие патологических реакций. При ряде форм ДВС тромбоциты являются основным субстратом действия патологического фактора: при эндотоксиновых формах поражения, сепсисе, вызванном грамотрицательными бактериями, ДВС развивается через активацию тромбоцитарно-сосудистого гемостаза (рис. 147); системные васкулиты перерастают в ДВС через тромбоцитарные нарушения.

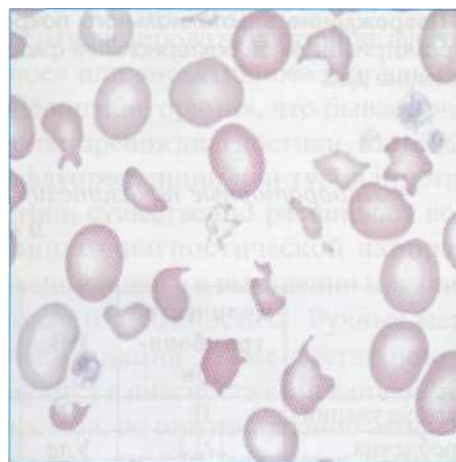


Рис. 146. Анизоцитоз эритроцитов и клеточный дебрис при ДВС

Патология гемостаза

Тромбоцитопения (<150 тыс./мкл) 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 ДВС-синдроме является острое снижение в крови тромбоцитов при одновременном повышении спонтанной агрегации. Однако при значительной тромбоцитопатии агрегация, как спонтанная, так и индуцированная, будет сниженной.

Плазменный гемостаз при ДВС-синдроме

Комплекс лабораторных показателей, характеризующих состояние активации плазменного

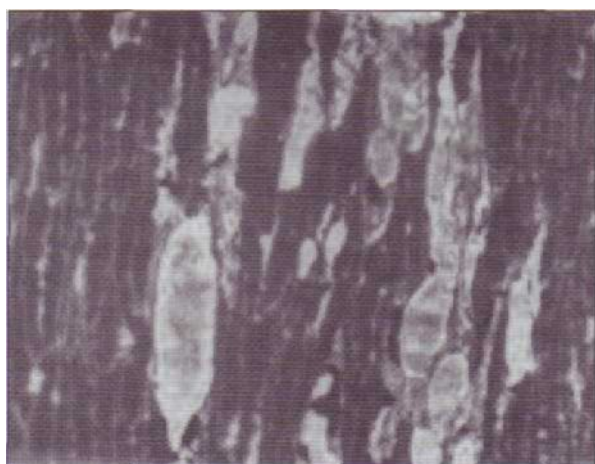


Рис. 147. Повреждение эндотелиального покрова при сепсисе грамотрицательной бактериальной флорой, вызвавшее развитие ДВС

гемостаза при ДВС-синдроме, представлен в табл. 65.

Помимо данных, указанных в табл. 62, в ряде случаев ДВС определяется сниженная активность протеина С.

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. 148).

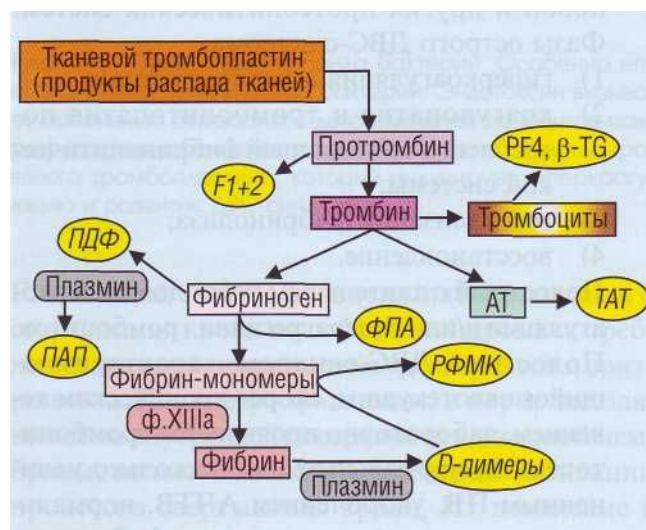


Рис. 148. Продукты гиперактивации плазменного гемостаза, которые не обнаруживаются в норме, но характерны для ДВС-синдрома. ПДФ - продукты деградации фибриногена/фибрина, ПДФ - продукты деградации фибриногена/фибрина, ТАТ - тромбин-антитромбиновый комплекс, ПАП - комплекс плазмин-антиплазмин, ФПА - фибринопептид А, РФМК - растворимые фибрин-мономерные комплексы, F1 + 2 - фрагменты протромбина, PF4 - фактор 4 тромбоцитов, P-TG - (3-тромбоглобулин

Таблица 65

Лабораторные показатели, характеризующие состояние гиперкоагуляции и фазы ДВС-синдрома

Примечание	Количество тромбоцитов	ПВ	АЧТВ	Фибриноген	АТ	ТАТ	РФМК	ПДФ/Д-димеры	Факторы плазмы
Фаза гиперкоагуляции	Н	Н	Н	Н/↑	↓	↑	Н/↑	Н/↑	Н
Фаза потребления	↓/↓↓	Удл	Удл	↓/↓↓	↓/↓↓	↑↑	↑	↑↑	↓↓
Фаза генерализации	↓↓↓	Удл/∞	Удл/∞	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↓↓↓

Удл - удлинение теста, Удл/∞ - удлинение / тест не определяется в течение времени измерения.

Патология гемостаза

Однако все эти тесты могут проявляться не только в стадии гиперкоагуляции при ДВС-синдроме, 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 фибриноген (ФПА), комплекс тромбин-антитромбин (ТАТ), продукты паракоагуляции, D-димеры. При врожденной

тромбофилии из-за дефицита протеина С или S примерно у $1/4$ пациентов выявляют увеличение ТАТ или других маркеров активации гемостаза даже без каких-либо признаков острых тромбозов. В то же время часто при наличии тромбов не определяются маркеры тромбообразования. Поэтому лабораторные тесты, даже в совокупности, играют вспомогательную роль в постановке диагноза ДВС-синдром.

Клинический пример 17

Больная 59 лет. Острый промиелоцитарный лейкоз. ДВС (?).

В области верхних, нижних конечностей гематомы.

Коагулологическое обследование: НБ 118 г/л, тромбоциты - единичные, АЧТВ 65 с (норма 35-45 с), ПИ 49%, ТВ >60 с, фибриноген 0,7 г/л, лизис эуглобулиновой фракции 75 мин (норма

140-240 мин), ПДФ (латекс-тест) 10-40 мг/мл (норма - отр.), агрегация тромбоцитов с АДФ отсутствует.

Заключение: на фоне резкой гипофибриногемии отмечается значительное замедление протромбиназообразования по внешнему и внутреннему путям. Активация фибринолиза. Агрегация на фоне выраженной тромбоцитопении отсутствует.

Диагностика ДВС-синдрома

Диагностика острого ДВС-синдрома начинается с оценки клинической ситуации. При подозрении на возможность развития острого ДВС рекомендуется срочно исследовать число тромбоцитов и содержание фибриногена, что позволит избежать ошибочных выводов, так как часто при патологических состояниях, приводящих к развитию острого ДВС, уровень тромбоцитов и фибриногена может быть повышен. В этих случаях снижение числа тромбоцитов и уровня фибриногена до нормальных величин является серьезным основанием для подозрения на начало ДВС. В этом случае рационально, кроме числа тромбоцитов и концентрации фибриногена, провести общие скрининговые тесты - ПВ, АЧТВ и ТВ, а также исследовать активность естественных антикоагулянтов, прежде всего антитромбина. Однако при трактовке общих скрининговых тестов следует помнить, что на показатели ПВ и АЧТВ в значительной степени влияет тромбин. Последний в избытке имеется в плазме больных с острым ДВС и может стать причиной нормальных результатов даже на фоне значительного снижения прокоагулянтов. Поэтому для подтверждения диагноза ДВС рекомендуется провести специаль-

ные тесты на повышенное образование тромбина и плазмина.

Диагностика хронического ДВС-синдрома требует тщательной оценки клинических и лабораторных данных. Для хронического ДВС-синдрома характерно повышение маркеров тромбемии, в том числе D-димеров.

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 клиничко-диагностической лаборатории в комплексной оценке и выявлении механизмов активации системы гемостаза. Ручные методы латекс-агглютинации также достаточно широко используются в диагностике механизмов нарушения гемостаза, но они постепенно заменяются автоматизированными методами иммунохимии. Все более активно в клинику внедряются экспресс-тесты прикроватной диагностики (D-димеры).

Патология гемостаза

ры, фибринопептиды, ТАТ), основанные на принципе иммуно диффузии.

Определение D-димеров имеет высокую диагностическую чувствительность, но относительно низкую специфичность для ДВС-синдрома (табл. 66). Высокая чувствительность - показатель наибольшей надежности; использование этого теста гарантирует выявление ДВС. Низкая специ-

фичность обусловлена ложноположительными результатами, объясняется это тем, что данный тест фактически выявляет продукты деградации поперечно-сшитого фибрина, который составляет основу любых тромбов и не зависит от причины их образования. Поэтому этот тест выявляет лизис нерастворимого фибрина, а реактивный фибринолиз - практически обязательный элемент ДВС.

Таблица 66

Сравнительная характеристика специфичности и чувствительности диагностики ДВС-синдрома

Тест	Количество положительных результатов (%)	
	Больные с ДВС	Больные без ДВС
D-димеры	93,7	20
Антитромбин III	87,5	6
Фибринопептид А	89,5	13
ПДФ	83,7	40
Протаминсульфатный тест	26	13
Протромбиновое время	20	
АЧТВ	48	

Локализованное внутрисосудистое свертывание крови (ЛВС)

ЛВС - патологическое состояние, связанное с потреблением факторов свертывания крови, происходящим в строго анатомически ограниченном участке, как правило, в области сосудистых аномалий.

Лабораторные изменения при ЛВС характеризуются тромбоцитопенией, гипофибриногемией, повышением количества продуктов деградации фибриногена/фибрина или D-димеров. Состояние почти никогда не связано с окклюзией микроциркуляторного русла и ишемией органов.

Основные патологические состояния, которые приводят к ЛВС:

1. Аневризма аорты. Синдром потребления при аневризме аорты может быть значительно выражен и приводит к развитию геморрагических проявлений.
2. Гемангиомы. Выраженность синдрома потребления часто зависит от размеров опухоли. Геморрагический синдром в этих случаях связан не только с коагулопатией и тромбоцитопенией, но и с повышенной кровоточивостью из измененных сосудов.
3. При некоторых заболеваниях почек, особенно при возникновении реакции отторжения

аллогенного почечного трансплантата, возникает процесс потребления фибриногена, при котором лабораторно находят повышение продуктов деградации фибриногена/фибрина в моче, тогда как в крови эти показатели повышены незначительно или нормальные.

Сахарный диабет

Микро- и макроангиопатии при сахарном диабете сопровождаются существенными повреждениями сосудистого эндотелия (рис. 149). При хронической гипергликемии гликопротеины сосудистого гликокаликса, тромбоцитов и других клеток крови подвергаются неферментативному гликированию, что сопровождается нарушением их функциональных свойств. Очевидно, с этим связано нарушение системной сосудистой проницаемости, потеря антиадгезивных свойств сосудистого эндотелия, усиление тромбообразования и, в результате, формирование микро- и макроангиопатии, сопровождающееся лабильностью всей системы гемостаза. У больных сахарным диабетом, особенно страдающих ретино- и нефропати-

Патология гемостаза

ями, должен проводиться контроль состояния сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.

Повышенное артериальное давление и гемодинамическое напряжение сдвига

Повышенное артериальное давление и напряжение сдвига могут быть причиной повреждения сосудистой стенки и активного пристеночного тромбообразования. Турбулентные потоки крови в местах бифуркации, участках отхождения боковых артерий от аорты (рис. 150), выступающих в просвет атероматозных бляшек, наиболее уязвимы для развития атеротромбоза. При хроническом повышении системного давления риск патологического тромбообразования существенно возрастает.

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитико-уремический синдром

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура и гемолитико-уремический синдром - два близких заболевания, характеризующихся диффузной окклюзией артериол и капилляров, вызывающей ишемическую дисфункцию многих органов.

Этиология:

- Шигатоксин-продуцирующие *E. coli* - наиболее распространенная причина развития ге-

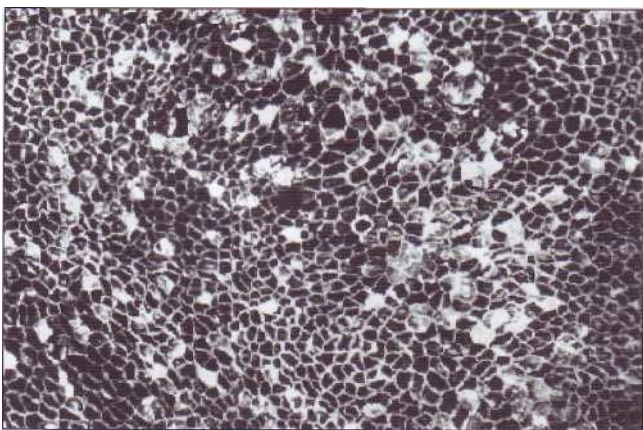


Рис. 149. Эндотелиальный покров пупочной вены больной некомпенсированным сахарным диабетом. Многочисленные аргирофильные клетки свидетельствуют о нарушении целостности и проницаемости эндотелиального покрова. На эндотелии часто обнаруживаются адгезированные тромбоциты и лейкоциты

молитико-уремического синдрома у маленьких детей, однако может служить причиной тромботической тромбоцитопенической пурпуры и гемолитико-уремического синдрома в любом возрасте.

- Другие инфекции, в частности *S. dysenteriae* (тип I), *Shigella*.
- Лекарства, чаще всего хинин, митомицин С и циклоспорины.
- Трансплантация костного мозга.
- Онкологические заболевания.
- Осложнения беременности и родов, особенно преэклампсия.
- Аутоиммунные заболевания.

Патогенез обоих заболеваний. В основе обоих заболеваний лежит, по-видимому, высвобождение сверхвысокомолекулярного фактора Виллебранда из депо вследствие поражения эндотелия и тромбоцитов. Фактор Виллебранда со сверхвысокой молекулярной массой связывается с тромбоцитами, активирует их, вызывает образование тромбоцитарных микросгустков и их отложение в микроциркуляторном русле с развитием ишемии и органной симптоматики. Различие в патогенезе этих двух заболеваний заключается в том, что у пациентов с тромботической тромбоцитопенической пурпурой снижена активность плазменных металлопротеаз, редуцирующих фактор Виллебранда, а у пациентов с гемолитико-уремическим синдромом их активность нормальная. Разрушение эритроцитов при этих

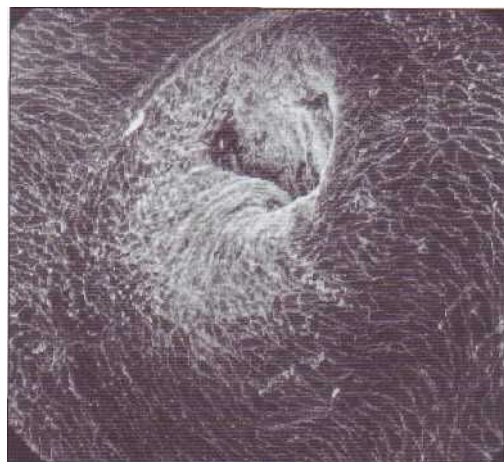


Рис. 150. Повреждение эндотелиального покрова в области гемодинамического напряжения у места отхождения межреберных артерий от аорты

Патология гемостаза

состояниях является следствием повреждающего воздействия на них сил тока крови. На участках микроциркуляторного русла, частично обтурированных микротромбами, повышается интенсивность механического воздействия на клетки крови, что приводит к внутрисосудистому гемолизу. В табл. 67 даны сравнительные характеристики тромботической тромбоцитопенической пурпуры и гемолитико-уремического синдрома.

Помимо поражения почек и ЦНС, для пациентов с тромботической тромбоцитопенической пурпурой и гемолитико-уремическим синдромом характерны микроангиопатическая гемолитическая анемия, тромбоцитопения, нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта (боль, диарея, тошнота, рвота).

Лабораторная картина. Исследование мазков крови выявляет нарастающую фрагментацию эритроцитов (в первые часы признаков фрагментации может не быть или она минимальна) и тромбоцитопению. При исследовании на гематологическом анализаторе характерно увеличение показателя RDW, уменьшение MCV и PLT. В биохимическом анализе крови - изменение непрямо-

го билирубина, повышение активности лактатдегидрогеназы пропорционально интенсивности гемолиза.

Приобретенные нарушения гемостаза, ассоциированные с парапротеинемиями

Приобретенные нарушения гемостаза, ассоциированные с парапротеинемиями, возникают при множественной миеломе, макроглобулинемии Вальденстрема, хроническом лимфолейкозе, злокачественной лимфоме, моноклональных гаммапатиях, амилоидозе, реже при некоторых других заболеваниях.

Патогенез этих нарушений следующий. Вырабатываемые опухолями моноклональные иммуноглобулины связываются с тромбоцитами и белками. Фиксированные на тромбоцитах антитела приводят к тромбоцитопении, нарушению функции тромбоцитов или к их сочетанию. В том числе может возникать приобретенный синдром Виллебранда. Клинически эти нарушения могут проявляться повышенной кровоточивостью по микроциркуляторному типу, значительным удлинением тромби-

Таблица 67

Сравнительная характеристика тромботической тромбоцитопенической пурпуры и гемолитико-уремического синдрома

Характеристика	Гемолитико-уремический синдром	Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура
Течение заболевания	Возраст обычно <3 лет Частота заболеваемости одинакова у мужчин и женщин Продромальный период: инфекция, особенно геморрагическая диарея Рецидивы редко	Максимальная частота возникновения – третье десятилетие жизни Частота заболеваемости выше среди женщин Продромальный период: какие-либо клинические проявления малохарактерны Рецидивы бывают часто
Диагноз	Триада: <ul style="list-style-type: none"> • Острое поражение почек • Тромбоцитопения • Микроангиопатия Поражение ЦНС бывает редко Лихорадка нехарактерна	Пентада: <ul style="list-style-type: none"> • Поражение ЦНС • Тромбоцитопения • Микроангиопатия • Поражение почек • Лихорадка
Этиология	Наиболее часто – инфекция (<i>E. coli</i> , <i>Shigella gastroenteritis</i> , <i>Pneumococcal</i> и др.) Семейные формы и рецидивы бывают редко У взрослых – в послеродовом периоде, после приема митомидина С и циклоспорина А	В большинстве случаев неизвестна В остальных случаях: беременность, аутоиммунные заболевания, опухоли, лекарства
Прогноз	90% полного выздоровления Редкие летальные исходы	Около 90% ремиссии Смертность 9–15%

Патология гемостаза

нового времени, однако геморрагических проявлений может и не быть. Влияние парапротеинов на коагуляционное звено гемостаза чаще выражается в нарушении полимеризации фибрина, кроме того,

описаны случаи ингибирования фактора **VIII**, других факторов свертывания крови, белков системы фибринолиза и возникновение лабораторного феномена волчаночного антикоагулянта.

Приобретенные нарушения гемостаза у новорожденных и детей первого полугодия жизни

Геморрагическая болезнь новорожденных

Геморрагическая болезнь новорожденных возникает вследствие дефицита витамина К. Основное проявление геморрагической болезни - геморрагический синдром, преимущественно по гематомному типу за счет значительного снижения витамин-К-зависимых белков в плазме. В табл. 68 представлены классификация и характеристики геморрагической болезни новорожденных.

Диагностика геморрагической болезни новорожденных основана на наличии геморрагического синдрома и лабораторных данных о дефиците витамин-К-зависимых факторов свертывания крови. Дифференциальная диагностика геморрагических состояний в периоде новорожденности, основанная на скрининговых лабораторных тестах, представлена в табл. 69.

Таблица 68

Характеристика геморрагической болезни новорожденных

Форма заболевания	Возраст начала проявлений	Характерная локализация геморрагического синдрома	Причины	Частота (без профилактики витамином К)
Ранняя форма	0–24 часа	Цефалогематома, внутричерепное кровоизлияние, кровоизлияние в грудную клетку, в брюшную полость	Прием матерью лекарственных препаратов (варфарина, антиконвульсантов, противотуберкулезных препаратов) Идиопатическая	Около 5% при беременности повышенного риска
Классическая форма	1–7-й дни жизни	Кожный гемосиндром, носовые, желудочно-кишечные кровотечения, послеоперационные и постинъекционные кровотечения	Идиопатическая Прием матерью препаратов во время беременности	0,01–1% в разных популяциях
Поздняя форма	2 нед.–6 мес. (иногда позднее)	Кожный гемосиндром, носовые, желудочно-кишечные кровотечения, послеоперационные и постинъекционные кровотечения	Идиопатическая Вторичные: при диареях, синдромах нарушенного кишечного всасывания, дефиците α_1 -антитрипсина, атрезии желчевыводящих путей, гепатите	5–20 на 100 000 новорожденных

Клинический пример 18

Мальчик 2 мес. Поступил с жалобами на длительные кровотечения из травм кожи. В анамнезе: у матери токсикоз в течение всей беременности, ребенок родился на 4 недели раньше срока. После рождения поставлен диагноз: внутриутробное инфицирование плода. Однако из роддома родители с ребенком ушли домой. В течение пер-

вых 2 месяцев отмечалось небольшое отставание в весе. За 2 недели до поступления перенес ОРЗ. Получал дома лечение препаратами Називин, Амброгексал, Сумамед. После выздоровления был взят анализ капиллярной крови из пальца. Кровотечение из места прокола продолжалось более 2 суток. Геморрагических проявлений у родственников не было.

Дифференциальная диагностика геморрагических состояний у новорожденных и грудных детей на основании данных лабораторного скрининга

ПТ (с)	АЧТВ (с)	Количество тромбоцитов	Состояния
Н	Н	↓	<ul style="list-style-type: none"> Иммунная тромбоцитопения, тромбозы, дефекты кроветворения Потребление тромбоцитов (инфекция, некротизирующий энтероколит, тромбозы почечных вен), иммунная тромбоцитопения
↑	↑	Н	<ul style="list-style-type: none"> Геморрагическая болезнь новорожденных Поражение печени
Н	↑	Н	<ul style="list-style-type: none"> Врожденный дефицит ф. VIII и ф. IX
Н	Н	Н	<ul style="list-style-type: none"> Кровотечения вследствие локальных причин (травма, аномалия развития сосудов), нарушение функции тромбоцитов, дефицит ф. XIII. Вторичное нарушение целостности сосудов, например при гипоксии, ацидозе, гиперосмолярности, у недоношенных новорожденных и др.
↑	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> ДВС

При поступлении: состояние средней тяжести, на коже единичные геморрагические элементы - экхимозы и петехии. Из места прокола кожи незначительное кровотечение.

В этом случае необходимо проводить дифференциальный диагноз между тромбоцитопенией, врожденным нарушением функции тромбоцитов, геморрагической болезнью новорожденных, некоторыми врожденными коагулопатиями. Провести подробное коагулологическое исследование в момент поступления было невозможно, выполнили коагулологический скрининг.

Результаты скрининга: время кровотечения значительно удлинено (не определяется), количество тромбоцитов $220 \times 10^9/\text{л}$, АЧТВ 80 с (норма

до 43 с), протромбиновое время более 60 с (норма 10-14 с), фибриноген 1,8 г/л.

Учитывая результаты скрининга, необходимо проводить дифференциальный диагноз между геморрагической болезнью новорожденных, изолированным дефицитом факторов X или II, врожденным заболеванием печени с нарушением синтеза белков.

Для уточнения диагноза было проведено исследование активности факторов VIII -120%, IX -15%, V - 80%, VII - 6%, X - 8%, II - 25%. Эти результаты позволили подтвердить диагноз: **геморрагическая болезнь новорожденных**. Проведено лечение концентратом протромбинового комплекса, витамином К. Кровотечение было остановлено. Подробное коагулологическое исследование, проведенное через 3 дня, показало нормальные результаты всех тестов.

ДВС-синдром

ДВС в период новорожденности возникает относительно часто, поскольку содержание ингибиторов свертывания крови (протеинов С и S) ниже, чем в более старшем возрасте. Лабораторные маркеры активации свертывания крови повышаются так же, как и в более старшем возрасте.

Тромбоцитопения

Трансиммунная тромбоцитопеническая пурпура у детей первого полугодия жизни является след-

ствием чресплацентарного проникновения антител к тромбоцитам из материнской крови. Это состояние, как правило, не вызывает тяжелых геморрагических проявлений и редко нуждается в коррекции. Тромбоцитопения проходит до 6-месячного возраста. Диагностика аналогична описанной в разделе, посвященном тромбоцитопениям.

Тромбозы у новорожденных детей

Распространенность в первом полугодии жизни тромботических эпизодов оценивается как 5,1:100 000 новорожденных, а после 6 месяцев сред-

Патология гемостаза

ная частота встречаемости тромботических эпизодов у детей колеблется от 0,7 до 1,9 на 100 000 в год. Литературные данные не позволяют сделать однозначных выводов о соотношении артериальных и венозных тромбозов у детей, однако последние встречаются примерно в 2 раза чаще. Причина относительно большей частоты тромбозов у детей первых месяцев жизни кроется, по-видимому, в низком соотношении активности протеинов С и S к активности факторов V и VIII. Однако тромбозы у детей почти всегда связаны с комплексным нарушением гемостаза. Исключение составляют случаи генетически обусловленного значительного снижения активности естественных ингибиторов свертывания крови - протеинов С, S, антитромбина III.

Наиболее значимые факторы патологического тромбообразования у детей первого полугодия жизни

Наследственные факторы риска тромбообразования у детей:

- Дефицит антитромбина III.
- Дефицит протеина С.

- Дефицит протеина S.
Приобретенные факторы риска:
- Катетеризация вен, особенно длительное нахождение катетера в вене.
- Повышение вязкости крови (полицитемия, потеря жидкости).
- Инфекции.
- Врожденные пороки развития сердца и сосудов.
- Заболевания печени.

Диагностика и контроль терапии тромботических состояний у детей аналогичны таковым у взрослых с учетом возрастных норм активности компонентов гемостаза, возможностей лаборатории и состояния пациента. Наибольшая трудность заключается в ограниченном количестве материала для анализа, так как у новорожденных и недоношенных детей нельзя забрать много крови. Поэтому врач должен выбирать наиболее информативные тесты, исходя из клинической ситуации.

Приложение

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Тесты коагуляционного скрининга, активность факторов свертывания крови у плодов различного срока гестации, здоровых доношенных новорожденных и взрослых

Параметр	Плоды (недели гестации)			Новорожденные (n = 60)	Взрослые (n = 40)
	19–23 (n = 20)	24–29 (n = 22)	30–38 (n = 22)		
Протромбиновое время (с)	32.5 (19–45)	32.2 (19–44)!	22.6 (16–30)!	16.7 (12.0–23.5)*	13.5 (11.4–14.0)
Протромбиновое время (МНО)	6.4 (1.7–11.1)	6.2 (2.1–10.6)!	3.0 (1.5–5.0)*	1.7 (0.9–2.7)*	1.1 (0.8–1.2)
АЧТВ (с)	168.8 (83–250)	154.0 (87–210)!	104.8 (76–128)!	44.3 (35–52)*	33.0 (25–39)
Тромбиновое время (с)	34.2 (24–44)*	26.2 (24–28)	21.4 (17.0–23.3)	20.4 (15.2–25.0)!	14.0 (12–16)
Фибриноген (по Клауссу) (г/л)	0.85 (0.57–1.50)	1.12 (0.65–1.65)	1.35 (1.25–1.65)	1.68 (0.95–2.45)!	3.0 (1.78–4.50)
Фибриноген (антиген) (г/л)	1.08 (0.75–1.50)	1.93 (1.56–2.40)	1.94 (1.30–2.40)	2.65 (1.68–3.60)!	3.5 (2.50–5.20)
Фактор II (активность, %)	16.9 (10–24)	19.9 (11–30)*	27.9 (15–50)!	43.5 (27–64)!	98.7 (70–125)
Фактор VII (активность, %)	27.4 (17–37)	33.8 (18–48)*	45.9 (31–62)	52.5 (28–78)!	101.3 (68–130)
Фактор IX (активность, %)	10.1 (6–14)	9.9 (5–15)	12.3 (5–24)!	31.8 (15–50)!	104.8 (70–142)
Фактор X (активность, %)	20.5 (14–29)	24.9 (16–35)	28.0 (16–36)!	39.6 (21–65)!	99.2 (75–125)
Фактор V (активность, %)	32.1 (21–44)	36.8 (25–50)	48.9 (23–70)!	89.9 (50–140)	99.8 (65–140)
Фактор VIII (активность, %)	34.5 (18–50)	35.5 (20–52)	50.1 (27–78)!	94.3 (38–150)	101.8 (55–170)
Фактор XI (активность, %)	13.2 (8–19)	12.1 (6–22)	14.8 (6–26)!	37.2 (13–62)!	100.2 (70–135)
Фактор XII (активность, %)	14.9 (6–25)	22.7 (6–40)	25.8 (11–50)!	69.8 (25–105)!	101.4 (65–144)
Прекалликреин (%)	12.8 (8–19)	15.4 (8–26)	18.1 (8–28)!	35.4 (21–53)!	99.8 (65–135)
Высокомолекулярный кининоген (%)	15.4 (10–22)	19.3 (10–26)	23.6 (12–34)!	38.9 (28–53)!	98.8 (68–135)

Вне скобок даны средние показатели. В скобках - минимальные и максимальные результаты 95% обследованных; n - число обследованных; * - p < 0.05, ! - p < 0.01 по отношению к нормам взрослых людей (Reverdiau-Moalic P, Delahousse B, Body G, et al. Evolution of blood coagulation activators and inhibitors in the healthy human fetus. *Blood* 1996; 88: 900-906).

Таблица 2

Уровень ингибиторов свертывания крови у плодов, доношенных новорожденных и взрослых

Параметр	Плоды (недели гестации)			Новорожденные (n = 60)	Взрослые (n = 40)
	19–23 (n = 20)	24–29 (n = 22)	30–38 (n = 22)		
АТIII (%)	20.2 (12–31)*	30.0 (20–39)	37.1 (24–55)	59.4 (42–80)	99.8 (65–130)
Кофактор гепарина II (%)	10.3 (6–16)	12.9 (5.5–20)	21.1 (11–33)	52.1 (19–99)	101.4 (70–128)
Ингибитор пути тканевого фактора (%)	21.0 (16.0–29.2)	20.6 (13.4–33.2)	20.7 (10.4–31.5)	38.1 (22.7–55.8)	73.0 (50.9–90.1)
Антиген протеина С (%)	9.5 (6–14)	12.1 (8–16)	15.9 (8–30)	32.5 (21–47)	100.8 (68–125)
Активность протеина С (%)	9.6 (7–13)	10.4 (8–13)	14.1 (8–18)*	28.2 (14–42)	98.8 (68–125)
Общий протеин S (%)	15.1 (11–21)	17.4 (14–25)	21.0 (15–30)	38.5 (22–55)	99.6 (72–118)
Свободный протеин S (%)	21.7 (13–32)	27.9 (19–40)	27.0 (18–40)	49.3 (33–67)	98.7 (72–128)
Свободный протеин S / общий протеин S	0.82 (0.75–0.92)	0.83 (0.76–0.95)	0.79 (0.70–0.89)	0.64 (0.59–0.98)	0.41 (0.38–0.43)
С4-связывающий протеин (%)	1.8 (0–6)	6.1 (0–12.5)	9.3 (5–14)	18.6 (3–40)	100.3 (70–124)

Вне скобок даны средние показатели. В скобках - минимальные и максимальные результаты 95% обследованных; n - число обследованных; * - p < 0.05 по отношению к нормам взрослых людей (Reverdiau-Moalic P, Delahousse B, Body G, et al. Evolution of blood coagulation activators and inhibitors in the healthy human fetus. *Blood* 1996; 88: 900-906).

Приложение

Таблица 3

Референтные интервалы результатов коагулологических тестов у здоровых недоношенных детей, родившихся на 30~36-й неделях гестации в течение первых 6 месяцев жизни

Коагуляционные тесты	1-й день	5-й день	30-й день	90-й день	180-й день	Взрослые
Протромбин (с)	13.0 (10.6–16.2)*	12.5 (10.0–15.3)*	11.8 (10.0–13.6)*	12.3 (10.0–14.6)	12.5 (10.0–15.0)*	12.4 (10.8–13.9)
МНО	1.0 (0.61–1.70)	0.91 (0.53–1.48)	0.79 (0.53–1.11)	0.88 (0.53–1.32)	0.91 (0.53–1.48)	0.89 (0.64–1.17)
АЧТВ (с)	53.6 (27.5–79.4)	50.5 (26.9–74.1)	44.7 (26.9–62.5)	39.5 (28.3–50.7)	37.5 (27.2–53.3)	33.5 (26.6–40.3)
Тромбиновое время (с)	24.8 (19.2–30.4)	24.1 (18.8–29.4)*	24.4 (18.8–29.9)	25.1 (19.4–30.8)	25.2 (18.9–31.5)	25.0 (19.7–30.3)
Фибриноген (г/л)	2.43 (1.50–3.73)*	2.80 (1.60–4.18)*	2.54 (1.50–4.14)	2.46 (1.50–3.52)	2.28 (1.50–3.60)	2.78 (1.56–4.00)
Фактор II (МЕ/мл)	0.45 (0.20–0.77)	0.57 (0.29–0.85)	0.57 (0.36–0.95)	0.68 (0.30–1.06)	0.87 (0.51–1.23)	1.08 (0.70–1.46)
Фактор V (МЕ/мл)	0.88 (0.41–1.44)*	1.00 (0.46–1.54)*	1.02 (0.48–1.56)*	0.99 (0.59–1.39)	1.02 (0.58–1.46)*	1.06 (0.62–1.50)
Фактор VII (МЕ/мл)	0.67 (0.21–1.13)	0.84 (0.30–1.38)	0.83 (0.21–1.45)	0.87 (0.31–1.43)	0.99 (0.47–1.51)*	1.05 (0.67–1.43)
Фактор VIII (МЕ/мл)	1.11 (0.50–2.13)	1.15 (0.53–2.05)*	1.11 (0.50–1.99)	1.06 (0.58–1.88)*	0.99 (0.50–1.87)*	0.99 (0.50–1.49)
Фактор Виллебранда (МЕ/мл)	1.36 (0.78–2.10)	1.33 (0.72–2.19)	1.36 (0.66–2.16)	1.12 (0.75–1.84)*	0.98 (0.54–1.58)*	0.92 (0.50–1.58)
Фактор IX (МЕ/мл)	0.35 (0.19–0.65)	0.42 (0.14–0.74)*	0.44 (0.13–0.80)	0.59 (0.25–0.93)	0.81 (0.50–1.20)	1.09 (0.55–1.63)
Фактор X (МЕ/мл)	0.41 (0.11–0.71)	0.51 (0.19–0.83)	0.56 (0.20–0.92)	0.67 (0.35–0.99)	0.77 (0.35–1.19)	1.06 (0.70–1.52)
Фактор XI (МЕ/мл)	0.30 (0.08–0.52)	0.41 (0.13–0.69)*	0.43 (0.15–0.71)	0.59 (0.25–0.93)*	0.78 (0.46–1.10)	0.97 (0.67–1.27)
Фактор XII (МЕ/мл)	0.38 (0.10–0.66)	0.39 (0.09–0.69)*	0.43 (0.11–0.75)	0.61 (0.15–1.07)	0.82 (0.22–1.42)	1.08 (0.52–1.64)
Прекалликреин (МЕ/мл)	0.33 (0.09–0.57)	0.45 (0.25–0.75)	0.59 (0.31–0.87)	0.79 (0.37–1.21)	0.78 (0.40–1.16)	1.12 (0.62–1.62)
Высокомолекулярный кининоген (МЕ/мл)	0.49 (0.09–0.89)	0.62 (0.24–1.00)	0.64 (0.16–1.12)*	0.78 (0.32–1.24)	0.83 (0.41–1.25)*	0.92 (0.50–1.36)
Фактор XIIIa (МЕ/мл)	0.70 (0.32–1.08)	1.01 (0.57–1.45)*	0.99 (0.51–1.47)*	1.13 (0.71–1.55)*	1.13 (0.65–1.61)*	1.05 (0.55–1.55)
Фактор XIIIb (МЕ/мл)	0.81 (0.35–1.27)	1.10 (0.68–1.58)*	1.07 (0.57–1.57)*	1.21 (0.75–1.67)	1.15 (0.67–1.63)	0.97 (0.57–1.37)

Активность всех факторов, за исключением фибриногена, выражена в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл) при условии, что нормальная контрольная плазма содержит активность факторов 1 МЕ/мл. Вне скобок даны средние показатели, в скобках - минимальные и максимальные результаты 95% обследованных. Для всех показателей у детей исследовалось от 40 до 96 образцов плазмы; * - интервалы у новорожденных, достоверно не отличимые от интервалов взрослых (Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood* 1988; 72: 1651-1657).

Приложение

Таблица 4

Референтные интервалы результатов коагулологических тестов у здоровых доношенных новорожденных в первые 6 месяцев жизни

Тесты	1-й день	5-й день	30-й день	90-й день	180-й день	Взрослые
Протромбиновое время (с)	13.0 (10.1–15.9)*	12.4 (10.0–15.3)*	11.8 (10.0–14.3)*	11.9 (10.0–14.2)*	12.3 (10.7–13.9)*	12.4 (10.8–13.9)
МНО	1.00 (0.53–1.62)	0.89 (0.53–1.48)	0.79 (0.53–1.26)	0.81 (0.53–1.26)	0.88 (0.61–1.17)	0.89 (0.64–1.17)
АЧТВ (с)	42.9 (31.3–54.5)	42.6 (25.4–59.8)	40.4 (32.0–55.2)	37.1 (29.0–50.1)*	35.5 (28.1–42.9)	33.5 (26.6–40.3)*
Тромбиновое время (с)	23.5 (19.0–28.3)*	23.1 (18.0–29.2)	24.3 (19.4–29.2)*	25.1 (20.5–29.7)*	25.5 (19.8–31.2)	25.0 (19.7–30.3)*
Фибриноген (г/л)	2.83 (1.67–3.99)*	3.12 (1.62–4.62)*	2.70 (1.62–3.78)*	2.43 (1.50–3.79)*	2.51 (1.50–3.87)	2.78 (1.56–4.00)*
Фактор II (МЕ/мл)	0.48 (0.26–0.70)	0.63 (0.33–0.93)	0.68 (0.34–1.02)	0.75 (0.45–1.05)	0.88 (0.60–1.16)	1.08 (0.70–1.46)
Фактор V (МЕ/мл)	0.72 (0.34–1.08)	0.95 (0.45–1.45)	0.98 (0.62–1.34)	0.90 (0.48–1.32)	0.91 (0.55–1.27)	1.06 (0.62–1.50)
Фактор VII (МЕ/мл)	0.66 (0.28–1.04)	0.89 (0.35–1.43)	0.90 (0.42–1.38)	0.91 (0.39–1.43)	0.87 (0.47–1.27)	1.05 (0.67–1.43)
Фактор VIII (МЕ/мл)	1.00 (0.50–1.78)*	0.88 (0.50–1.54)*	0.91 (0.50–1.57)*	0.79 (0.50–1.25)*	0.73 (0.50–1.09)	0.99 (0.50–1.49)
Фактор Виллебранда (МЕ/мл)	1.53 (0.50–2.87)	1.40 (0.50–2.54)	1.28 (0.50–2.46)	1.18 (0.50–2.06)	1.07 (0.50–1.97)	0.92 (0.50–1.58)
Фактор IX (МЕ/мл)	0.53 (0.15–0.91)	0.53 (0.15–0.91)	0.51 (0.21–0.81)	0.67 (0.21–1.13)	0.86 (0.36–1.36)	1.09 (0.55–1.63)
Фактор X (МЕ/мл)	0.40 (0.12–0.68)	0.49 (0.19–0.79)	0.59 (0.31–0.87)	0.71 (0.35–1.07)	0.78 (0.38–1.18)	1.06 (0.70–1.52)
Фактор XI (МЕ/мл)	0.38 (0.10–0.66)	0.55 (0.23–0.87)	0.53 (0.27–0.79)	0.69 (0.41–0.97)	0.86 (0.49–1.34)	0.97 (0.67–1.27)
Фактор XII (МЕ/мл)	0.53 (0.13–0.93)	0.47 (0.11–0.83)	0.49 (0.17–0.81)	0.67 (0.25–1.09)	0.77 (0.39–1.15)	1.08 (0.52–1.64)
Прекалликреин (МЕ/мл)	0.37 (0.18–0.69)	0.48 (0.20–0.76)	0.57 (0.23–0.91)	0.73 (0.41–1.05)	0.86 (0.56–1.16)	1.12 (0.62–1.62)
Высокомолекулярный кининоген (МЕ/мл)	0.54 (0.06–1.02)	0.74 (0.16–1.32)	0.77 (0.33–1.21)	0.82 (0.30–1.46)*	0.82 (0.36–1.28)*	0.92 (0.50–1.36)
Фактор XIIIa (МЕ/мл)	0.79 (0.27–1.31)	0.94 (0.44–1.44)*	0.93 (0.39–1.47)*	1.04 (0.36–1.72)*	1.04 (0.46–1.62)*	1.05 (0.55–1.55)
Фактор XIIIb (МЕ/мл)	0.76 (0.30–1.22)	1.06 (0.32–1.80)	1.11 (0.39–1.73)*	1.16 (0.48–1.84)*	1.10 (0.50–1.70)*	0.97 (0.57–1.37)

Активность всех факторов, за исключением фибриногена, выражена в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл) при условии, что нормальная контрольная плазма содержит активность факторов 1 МЕ/мл. Вне скобок даны средние показатели, в скобках - минимальные и максимальные результаты 95% обследованных. Для всех показателей у детей исследовалось от 40 до 77 образцов плазмы; * - интервалы у новорожденных, достоверно не отличимые от интервалов взрослых (Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70: 165-172).

Приложение

Таблица 5

Референтные интервалы результатов исследования ингибиторов коагуляции у детей в течение первых 6 месяцев жизни

Уровень ингибиторов	1-й день	5-й день	30-й день	90-й день	180-й день	Взрослые
<i>Здоровые доношенные новорожденные</i>						
АТIII (МЕ/мл)	0.63 (0.39–0.87)	0.67 (0.41–0.93)	0.78 (0.48–1.08)	0.97 (0.73–1.21)*	1.04 (0.84–1.24)*	1.05 (0.79–1.31)
б ₂ -макроглобулин (МЕ/мл)	1.39 (0.95–1.83)	1.48 (0.98–1.98)	1.50 (1.06–1.94)	1.76 (1.26–2.26)	1.91 (1.49–2.33)	0.86 (0.52–1.20)
С1-эстеразы ингибитор (МЕ/мл)	0.72 (0.36–1.08)	0.90 (0.60–1.20)*	0.89 (0.47–1.31)	1.15 (0.71–1.59)	1.41 (0.89–1.93)	1.01 (0.71–1.31)
б ₁ -анти-трипсин (МЕ/мл)	0.93 (0.49–1.37)*	0.89 (0.49–1.29)*	0.62 (0.36–0.88)	0.72 (0.42–1.02)	0.77 (0.47–1.07)	0.93 (0.55–1.31)
Кофактор гепарина II (МЕ/мл)	0.43 (0.10–0.93)	0.48 (0.00–0.96)	0.47 (0.10–0.87)	0.72 (0.10–1.46)	1.20 (0.50–1.90)	0.96 (0.66–1.26)
Протеин С (МЕ/мл)	0.35 (0.17–0.53)	0.42 (0.20–0.64)	0.43 (0.21–0.65)	0.54 (0.28–0.80)	0.59 (0.37–0.81)	0.96 (0.64–1.28)
Протеин S (МЕ/мл)	0.36 (0.12–0.60)	0.50 (0.22–0.78)	0.63 (0.33–0.93)	0.86 (0.54–1.18)*	0.87 (0.55–1.19)*	0.92 (0.60–1.24)
<i>Здоровые недоношенные дети (30–36-я недели гестации)</i>						
АТIII (МЕ/мл)	0.38 (0.14–0.62)!	0.56 (0.30–0.82)	0.59 (0.37–0.81)!	0.83 (0.45–1.21)!	0.90 (0.52–1.28)!	1.05 (0.79–1.31)
б ₂ -макроглобулин (МЕ/мл)	1.10 (0.56–1.82)!	1.25 (0.71–1.77)	1.38 (0.72–2.04)	1.80 (1.20–2.66)	2.09 (1.10–3.21)	0.86 (0.52–1.20)
С1-ингибитор эстеразы (МЕ/мл)	0.65 (0.31–0.99)	0.83 (0.45–1.21)	0.74 (0.40–1.24)!	1.14 (0.60–1.68)*	1.40 (0.96–2.04)	1.01 (0.71–1.31)
б ₁ -анти-трипсин (МЕ/мл)	0.90 (0.36–1.44)*	0.94 (0.42–1.46)*	0.76 (0.38–1.12)!	0.81 (0.49–1.13)*!	0.82 (0.48–1.16)*	0.93 (0.55–1.31)
Кофактор гепарина II (МЕ/мл)	0.32 (0.10–0.60)!	0.34 (0.10–0.69)	0.43 (0.15–0.71)	0.61 (0.20–1.11)	0.89 (0.45–1.40)*!	0.96 (0.66–1.26)
Протеин С (МЕ/мл)	0.28 (0.12–0.44)!	0.31 (0.11–0.51)	0.37 (0.15–0.59)!	0.45 (0.23–0.67)!	0.57 (0.31–0.83)	0.96 (0.64–1.28)
Протеин S (МЕ/мл)	0.26 (0.14–0.38)!	0.37 (0.13–0.61)	0.56 (0.22–0.90)	0.76 (0.40–1.12)!	0.82 (0.44–1.20)	0.92 (0.60–1.24)

Активность всех факторов выражена в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл) при условии, что в нормальной контрольной (пулированной) плазме активность факторов составляет 1 МЕ/мл. Вне скобок даны средние показатели, в скобках - минимальные и максимальные результаты 95% обследованных. Для всех показателей у детей исследовалось от 40 до 75 образцов плазмы; * - уровни, достоверно не отличающиеся от таковых у взрослых; ! - уровни, отличные от тех же показателей у доношенных детей (Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12: 95-104).

Приложение

Таблица 6

Референтные уровни результатов исследования компонентов фибринолитической системы у детей первых 6 месяцев жизни

Показатели	1-й день	5-й день	30-й день	90-й день	180-й день	Взрослые
<i>Здоровые доношенные дети</i>						
Плазминоген (МЕ/мл)	1.95 (1.25–2.65)	2.17 (1.41–2.93)	1.98 (1.26–2.70)	2.48 (1.74–3.22)	3.01 (2.21–3.81)	3.36 (2.48–4.24)
Тканевой активатор плазминогена (нг/мл)	9.6 (5.0–18.9)	5.6 (4.0–10.0)*	4.1 (1.0–6.0)*	2.1 (1.0–5.0)*	2.8 (1.0–6.0)*	4.9 (1.4–8.4)
α_2 -антиплазмин (МЕ/мл)	0.85 (0.55–1.15)	1.00 (0.70–1.30)*	1.00 (0.76–1.24)*	1.08 (0.76–1.40)*	1.11 (0.83–1.39)*	1.02 (0.68–1.36)
Ингибитор активатора плазминогена-1 (МЕ/мл)	6.4 (2.0–15.1)	2.3 (0.0–8.1)*	3.4 (0.0–8.8)*	7.2 (1.0–15.3)	8.1 (6.0–13.0)	3.6 (0.0–11.0)
<i>Здоровые недоношенные дети (30–36-я недели гестации)</i>						
Плазминоген (МЕ/мл)	1.70 (1.12–2.48)!	1.91 (1.21–2.61)!	1.81 (1.09–2.53)	2.38 (1.58–3.18)	2.75 (1.91–3.59)!	3.36 (2.48–4.24)
Тканевой активатор плазминогена (нг/мл)	8.48 (3.00–16.70)	3.97 (2.00–6.93)*	4.13 (2.00–7.79)*	3.31 (2.00–5.07)*	3.48 (2.00–5.85)*	4.96 (1.46–8.46)
α_2 -антиплазмин (МЕ/мл)	0.78 (0.40–1.16)	0.81 (0.49–1.13)!	0.89 (0.55–1.23)!	1.06 (0.64–1.48)*	1.15 (0.77–1.53)	1.02 (0.68–1.36)
Ингибитор активатора плазминогена-1 (МЕ/мл)	5.4 (0.0–12.2)*!	2.5 (0.0–7.1)*	4.3 (0.0–10.9)*	4.8 (1.0–11.8)*!	4.9 (1.0–10.2)*!	3.6 (0.0–11.0)

Единицы активности плазминогена исчислялись методом, рекомендованным Комитетом по тромболитическим агентам. Уровень тканевого активатора плазминогена выражался в нанограммах на миллилитр. Активность α_2 -антиплазмина выражалась в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл), при значении активности в контрольной нормальной (пулированной) плазме, равном 1 МЕ/мл. Активность ингибитора активатора плазминогена-1 исчислялась в международных единицах на миллилитр плазмы, где 1 МЕ определялась как количество ИАП-1, которое ингибирует 1 МЕ человеческого одноцепочечного тканевого активатора плазминогена (Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *AmJPediatr Hematol Oncol* 1990; 12: 95-104).

Приложение

Таблица 7
Референтные уровни результатов коагулологических тестов детей от 1 до 16 лет
по сравнению с взрослыми

Тесты	1–5 лет	6–10 лет	11–16 лет	Взрослые
Протромбиновое время (с)	11 (10.6–11.4)	11.1 (10.1–12.1)	11.2 (10.2–12.0)	12 (11.0–14.0)
Протромбиновое время (МНО)	1.0 (0.96–1.04)	1.01 (0.91–1.11)	1.02 (0.93–1.10)	1.10 (1.0–1.3)
АЧТВ (с)	30 (24–36)	31 (26–36)	32 (26–37)	33 (27–40)
Фибриноген (г/л)	2.76 (1.70–4.05)	2.79 (1.57–4.0)	3.0 (1.54–4.48)	2.78 (1.56–4.0)
Время кровотечения (мин)	6 (2.5–10)*	7 (2.5–13)*	5 (3–8)*	4 (1–7)
Фактор II (МЕ/мл)	0.94 (0.71–1.16)*	0.88 (0.67–1.07)	0.83 (0.61–1.04)*	1.08 (0.70–1.46)
Фактор V (МЕ/мл)	1.03 (0.79–1.27)	0.90 (0.63–1.16)*	0.77 (0.55–0.99)*	1.06 (0.62–1.50)
Фактор VII (МЕ/мл)	0.82 (0.55–1.16)	0.85 (0.52–1.20)	0.83 (0.58–1.15)*	1.05 (0.67–1.43)
Фактор VIII (МЕ/мл)	0.90 (0.59–1.42)	0.95 (0.58–1.32)	0.92 (0.53–1.31)	0.99 (0.50–1.49)
vWF (МЕ/мл)	0.82 (0.60–1.20)	0.95 (0.44–1.44)	1.00 (0.46–1.53)	0.92 (0.50–1.58)
Фактор IX (МЕ/мл)	0.73 (0.47–1.04)	0.75 (0.63–0.89)*	0.82 (0.59–1.22)*	1.09 (0.55–1.63)
Фактор X (МЕ/мл)	0.88 (0.58–1.16)	0.75 (0.55–1.01)*	0.79 (0.50–1.17)*	1.06 (0.70–1.52)
Фактор XI (МЕ/мл)	0.97 (0.56–1.50)	0.86 (0.52–1.20)	0.74 (0.50–0.97)	0.97 (0.67–1.27)
Фактор XII (МЕ/мл)	0.93 (0.64–1.29)	0.92 (0.60–1.40)	0.81 (0.34–1.37)*	1.08 (0.52–1.64)
Прекалликреин (МЕ/мл)	0.95 (0.65–1.30)	0.99 (0.66–1.31)	0.99 (0.53–1.45)	1.12 (0.62–1.62)
Высокомолекулярный кининоген (МЕ/мл)	0.98 (0.64–1.32)	0.93 (0.60–1.30)	0.91 (0.63–1.19)	0.92 (0.50–1.36)
Фактор XIIIa (МЕ/мл)	1.08 (0.72–1.43)	1.09 (0.65–1.51)*	0.99 (0.57–1.40)	1.05 (0.55–1.55)
Фактор XIIIb (МЕ/мл)	1.13 (0.69–1.56)	1.16 (0.77–1.54)*	1.02 (0.60–1.43)	0.97 (0.57–1.37)

Активность всех факторов, кроме фибриногена, выражена в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл) при условии, что в нормальной контрольной (пулированной) плазме активность факторов составляет 1 МЕ/мл. Вне скобок даны средние показатели, в скобках - минимальные и максимальные результаты 95% обследованных. Для всех показателей у детей исследовалось от 20 до 50 образцов плазмы; * - результаты, достоверно отличающиеся от аналогичных у взрослых (Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12: 95-104).

Таблица 8
Референтные уровни результатов исследования ингибиторов свертывания детей от 1 до 16 лет
по сравнению с взрослыми

Ингибиторы	1–5 лет	6–10 лет	11–16 лет	Взрослые
АТIII (МЕ/мл)	1.11 (0.82–1.39)	1.11 (0.90–1.31)	1.05 (0.77–1.32)	1.0 (0.74–1.26)
α_2 -макроглобулин (МЕ/мл)	1.69 (1.14–2.23)*	1.69 (1.28–2.09)*	1.56 (0.98–2.12)*	0.86 (0.52–1.20)
C1-ингибитор эстеразы (МЕ/мл)	1.35 (0.85–1.83)*	1.14 (0.88–1.54)	1.03 (0.68–1.50)	1.0 (0.71–1.31)
α_1 -антитрипсин (МЕ/мл)	0.93 (0.39–1.47)	1.00 (0.69–1.30)	1.01 (0.65–1.37)	0.93 (0.55–1.30)
Кофактор гепарина II (МЕ/мл)	0.88 (0.48–1.28)*	0.86 (0.40–1.32)*	0.91 (0.53–1.29)*	1.08 (0.66–1.26)
Протеин С (МЕ/мл)	0.66 (0.40–0.92)*	0.69 (0.45–0.93)*	0.83 (0.55–1.11)*	0.96 (0.64–1.28)
Протеин S:				
общий (МЕ/мл)	0.86 (0.54–1.18)	0.78 (0.41–1.14)	0.72 (0.52–0.92)	0.81 (0.60–1.13)
свободный (МЕ/мл)	0.45 (0.21–0.69)	0.42 (0.22–0.62)	0.38 (0.26–0.55)	0.45 (0.27–0.61)

Активность всех факторов, кроме фибриногена, выражена в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл) при условии, что в нормальной контрольной (пулированной) плазме активность факторов составляет 1 МЕ/мл, кроме протеина S, активность которого в среднем составляет 0.4 МЕ/мл. Вне скобок даны средние показатели, в скобках - минимальные и максимальные результаты 95% обследованных. Для всех показателей у детей исследовалось от 20 до 30 образцов плазмы; * - результаты, достоверно отличающиеся от аналогичных у взрослых (Andrew M, Vegh P, Johnston M, et al. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80: 1998-2005).

Приложение

Таблица 9

Референтные уровни результатов исследования фибринолитической системы здоровых детей в возрасте от 1 до 16 лет по сравнению с взрослыми

Компоненты системы фибринолиза	1–5 лет	6–10 лет	11–16 лет	Взрослые
Плазминоген (МЕ/мл)	0.98 (0.78–1.18)	0.92 (0.75–1.08)	0.86 (0.68–1.03)*	0.99 (0.77–1.22)
Тканевой активатор плазминогена (нг/мл)	2.15 (1.0–4.5)*	2.42 (1.0–5.0)*	2.16 (1.0–4.0)*	4.90 (1.40–8.40)
α_2 -антиплазмин (МЕ/мл)	1.05 (0.93–1.17)	0.99 (0.89–1.10)	0.98 (0.78–1.18)	1.02 (0.68–1.36)
Ингибитор активатора плазминогена-1 (МЕ/мл)	5.42 (1.0–10.0)	6.79 (2.0–12.0)*	6.07 (2.0–10.0)	3.60 (0–11.0)

Единицы активности плазминогена исчислялись методом, рекомендованным Комитетом по тромболитическим агентам. Уровень тканевого активатора плазминогена выражался в нанограммах на миллилитр. Активность α_2 -антиплазмина выражалась в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл), при значении активности в контрольной нормальной (пулированной) плазме, равном 1 МЕ/мл. Активность ингибитора активатора плазминогена-1 исчислялась в международных единицах на миллилитр плазмы, где 1 МЕ определялась как количество ИАП-1, которое ингибирует 1 МЕ человеческого одноцепочечного тканевого активатора плазминогена (Andrew M, Vegh P, Johnston M, et al. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80: 1998-2005).

БИБЛИОГРАФИЯ

1. *Балу да В, П., Балу да М.В., Гольдберг А. П. и др.* Предтромботическое состояние // Тромбоз и его профилактика. М.-Амстердам: Зеркало-М, 1999.
2. *Баркаган З. С, Момот А.П.* Основы диагностики нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед АО, 1999.
3. *Баркаган З. С, Суханова Г. А.* Геморрагические мезенхимальные дисплазии: основные нарушения в системе гемостаза и принципы их коррекции // Консилиум. 2000. № 6 (16).
4. *Насонов Е.Л., Баранов А.А., Шилкина Н.П.* Васкулиты и васкулопатии. Ярославль: Верхняя Волга, 1999.
5. *Папаян Л.П.* Новое в представлении процесса свертывания крови // Трансфузиология. 2004. Т. 5, № 3.С. 7-22.
6. *Петрищева Н.Н., Папаян Л.П.* Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний: Учебное пособие. СПб., 1999.
7. *Шевченко О.П., Олефиренко Г.А., Червякова Н.В.* Гомоцистеин. М.: Реафарм, 2002.
8. *Шутикова А. С.* Тромбоцитарный гемостаз. СПб.: ГМУ, 2000.
9. *Hemophilia.* Editor E. Berntorp. 2004.
10. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice.* Editors: Robert W. Colman and others. 2001.
11. *Henry J.B.* Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Twentieth Edition. W.B. Saunders Company, 2001.
12. *Kasper Carol K.* Von Willebrand disease. 2004.
13. *Kolde H.-J.* Haemostasis. Physiology, Pathology, Diagnostics. Pentapharm Ltd., Basel, 2001.
14. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood.* Sixth Edition. 2003.
15. *Thomas L.* Clinical Laboratory Diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. TH-Books/Frankfurt/Main, Germany, 1998.
16. *Lutze G.* Useful Facts about Coagulation. Questions/Answers. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 2004.

Содержание

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3	РОЛЬ ЛЕЙКОЦИТОВ В ГЕМОСТАЗЕ	38
ВВЕДЕНИЕ	5	Участие нейтрофилов в пристеночном	
ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА	6	тромбообразовании	38
Общее представление о гемостазе,		Участие моноцитов в свертывании крови	39
гемостатический баланс	6	ПЛАЗМЕННЫЕ БЕЛКИ ГЕМОСТАЗА.....	41
СОСУДИСТАЯ СТЕНКА.....	8	Система свертывания плазмы	42
Структура и функции сосудистой стенки	8	Витамин-К-зависимые белки	44
Эндотелий.....	9	Неферментные активаторы свертывания	
Характеристика эндотелиального покрова.....	9	крови	44
Антикоагулянтная активность интактного		Классический коагуляционный каскад	
эндотелия	10	активации тромбина.....	44
Гликокаликс	10	Внешний путь образования протромбиназы.....	45
Контроль активности тромбоцитов	11	Внутренний путь образования	
Молекулярный каскад образования		протромбиназы. Факторы	
простаглицина и тромбоксана	12	контактной активации.....	46
Тромбомодулин	13	Конечный этап свертывания плазмы -	
Прокоагулянтная роль эндотелия, регуляция		образование фибринового сгустка.....	48
сосудистого тонуса	15	Тромбин.....	48
Роль эндотелия в регуляции сосудистого		Фактор XIII.....	49
тонуса.....	15	Фибриноген. Формирование	
Субэндотелий	17	гемостатического тромба.....	49
Тканевой фактор.....	18	Роль кофакторов и микроокружения	
Коллаген.....	18	в процессе свертывания крови.....	51
ТРОМБОЦИТЫ	20	Роль кальция в гемостатических реакциях.....	51
Тромбоцитопоз.....	20	Ингибиторы системы свертывания плазмы	
Жизненный цикл тромбоцитов	21	крови.....	52
Структура тромбоцитов	22	Ингибиторы ферментов системы гемостаза.....	52
Мембрана и цитоскелет тромбоцитов	23	Антитромбин и гепарин	53
Рецепторы мембраны тромбоцитов.....	24	Комплекс тромбин-антитромбин	54
Рецепторы для высокомолекулярных		Кофактор гепарина II.....	54
белков	25	С1-ингибитор	54
Интегрины	25	α_2 -макроглобулин.....	54
Рецепторы для физиологических		Ингибиторы коферментов	55
стимуляторов.....	27	Система протеина С	55
Органеллы тромбоцитов	27	Протеин С.....	55
Тромбоцитарные факторы	28	Протеин S.....	56
Антигепариновый фактор тромбоцитов		С4-связывающий протеин	56
(фактор 4 тромбоцитов, ф.4, PF4)	28	Ингибиторы активных комплексов	57
β -тромбоглобулин (β -TG, β -TG).....	28	СИСТЕМА ФИБРИНОЛИЗА	59
Фактор роста тромбоцитов (PDGF)	29	Компоненты фибринолиза.....	59
Фибриноген.....	29	Плазминоген	60
Фактор V.....	29	Активатор плазминогена тканевого типа	60
Фактор XIII.....	29	Урокиназный активатор плазминогена	61
Функция тромбоцитов	30	Другие активаторы плазминогена	61
Адгезия тромбоцитов	30	Механизм активации фибринолиза	61
Молекулы адгезии.....	31	Внутренний путь активации фибринолиза.....	62
Активация тромбоцитов.....	34	Внешний путь активации фибринолиза	62
Агрегация тромбоцитов	36	Ингибиторы фибринолиза	63
Ретракция сгустка крови.....	37	α_2 -антиплазмин, α_2 -макроглобулин,	
		α_2 -антитрипсин.....	63

Содержание

Ингибиторы тканевого активатора плазминогена (РАI)	64
Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАFI)	64
Другие элементы системы фибринолиза	64
Лизис фибринового сгустка. Продукты деградации фибрина/фибриногена и D-димеры	65
Плазмин-независимый фибринолиз	66
РЕОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕМОСТАЗА	67
Особенности реологии крови	67
Функция тромбоцитов в различных гемодинамических условиях	68
Влияние сил потока крови на процесс коагуляции... ..	69
Гемодинамическое воздействие на функцию сосудистой стенки	69
СОВРЕМЕННАЯ ТЕОРИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ	71
Каскадно-матричная теория свертывания крови	72
ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ И ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСТАЗА У ПЛОДОВ, НОВОРОЖДЕННЫХ И ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА	75
Тромбоциты	75
Антикоагулянтные свойства сосудистой стенки	76
Коагуляционное звено гемостаза	76
ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ И ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСТАЗА У ЖЕНЩИН ПРИ МЕНСТРУАЦИИ И БЕРЕМЕННОСТИ	79
Менструальные кровотечения	79
Изменения гемостаза при беременности	79
ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА В КДЛ	81
Общие подходы	81
Преаналитический этап	82
Взятие крови	82
Капиллярная кровь	82
Венозная кровь	83
Положение тела	85
Влияние физической нагрузки и эмоционального стресса	85
Влияние пищи на показатели гемостаза	85
Интерферирующие лекарственные препараты	86
Подбор антикоагулянтов	87
Сыворотка	89
Хранение и центрифугирование	89
Проверка исследуемых образцов перед выполнением тестов	90
Тесты для оценки сосудистого и тромбоцитарного компонентов гемостаза	90
Время кровотечения	90
Динамический анализ функции тромбоцитов	91
Тромбоцитарные показатели	92
Число тромбоцитов (Platelets, PL, PLT)	92
Средний объем тромбоцита (MP V)	92
Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (PDW)	92
Тромбоцитокрит (PCT)	93
Агрегация тромбоцитов	93
Агрегация с АДФ	94
Агрегация с адреналином	94
Агрегация с тромбином	94
Агрегация с арахидонатом	95
Исследования агрегации тромбоцитов в образцах цельной крови	96
Тромбоэластография	97
Молекулярно-биологические методы	99
Методические основы лабораторной оценки плазменного гемостаза	99
Коагуляционные методы	99
Ручные методы	99
Автоматизированные коагулометры	100
Механические коагулометры	101
Опτικο-механические коагулометры	101
Турбидиметрические коагулометры	101
Нефелометрические коагулометры	102
Амидолитические методы с использованием хромогенных и флуорогенных субстратов	104
Иммунохимические методы	106
Латекс-агглютинация	106
Метод ELISA	106
Радиальная иммунодиффузия	107
«Ракетный» иммуноэлектрофорез	107
Скрининговые тесты оценки плазменного звена гемостаза	107
Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)	109
Лабораторные условия, влияющие на АЧТВ	109
Диагностическое значение АЧТВ	ПО
Выявление дефицита факторов с использованием принципа заменных проб	111
Использование А ЧТВ для выявления волчаночного антикоагулянта	112
Использование А ЧТВ для контроля гепаринотерапии	113
Контроль за лечением низкомолекулярным фракционированным гепарином	113
Контроль лечения гирудинном	114
Скрининговый тест на основе А ЧТВ для оценки антикоагулянтной активности протеина С	115
Протромбиновое время	115
Протромбиновый тест (ПТ) по Квику	116
Протромбиновое время, выраженное через международное нормализованное отношение (МНО)	117
Контроль за лечением непрямыми антикоагулянтами	117
Ограничения использования МНО	117
Интерпретация результатов	117
Выявление дефицита факторов с использованием принципа заменных проб в тесте ПВ	117
Тромбиновое время	118
Рептилазное время (батроксобиновое время)	119
Отдельные факторы гемостаза	120
Референтные диапазоны содержания факторов ..	120
Принцип дифференцирования истинного дефицита факторов и действия ингибиторов	122

Содержание

Определение фибриногена	123	Обеспечение качества лабораторной	
<i>Определение по Клауссу</i>	123	оценки системы гемостаза	147
<i>Турбидиметрический метод</i>	123	Стандартные образцы (калибраторы).....	147
<i>Иммунохимические методы</i>	123	<i>Стандарты ВОЗ</i>	148
<i>Интерпретация результатов</i>	124	Внутрилабораторный контроль качества.....	148
Определение фактора Виллебранда (vWF)	124	Внелабораторный контроль качества	149
Определение фактора X с использованием		ПАТОЛОГИЯ ГЕМОСТАЗА	150
хромогенного субстрата	125	Задачи лабораторной службы при ведении	
Определение фактора VIII с использованием		пациентов с подозрением на нарушения	
хромогенного субстрата	125	системы гемостаза.....	152
Определение фактора VII с использованием		Врожденные геморрагические заболевания	152
хромогенного субстрата	126	Наследственные геморрагические	
Определение протромбина (фактора II)		коагулопатии.....	152
с использованием хромогенного субстрата.....	127	<i>Гемофилия А</i>	153
Определение фактора XIII.....	127	<i>Гемофилия В</i>	158
<i>Фотометрический метод</i>	128	<i>Дефицит фактора XI</i>	158
<i>Инкорпорирующий метод</i>	128	<i>Врожденный дефицит фактора VII</i>	
Тесты для определения гепарина.....	129	(<i>гипопротромбинемия</i>)	159
<i>Определение гепарина с помощью</i>		<i>Дефицит фактора X</i>	
<i>хромогенных субстратов</i>	129	(<i>болезнь Стюарта-Прауэра</i>)	159
<i>Определение гепарина с помощью</i>		<i>Дефицит фактора V</i>	
<i>коагуляционных методов</i>	129	(<i>гипопротромбинемия, или парагемофилия</i>) ...	160
<i>Преаналитические факторы, влияющие на</i>		<i>Дефицит фактора II</i>	
<i>результаты определения</i>		(<i>гипопротромбинемия</i>).....	161
<i>гепарина</i>	130	<i>Афибриногенемия, гипофибриногенемия</i>	
Методы для определения резистентности к		<i>и дисфибриногенемия</i>	161
активированному протеину С, активности		<i>Дефицит факторов контактной активации</i>	162
протеина S, антитромбина,		<i>Комбинированный врожденный дефицит</i>	
антифосфолипидных антител	130	<i>факторов свертывания</i>	162
<i>Резистентность к протеину С</i>	130	Врожденные нарушения функции	
<i>Тест резистентности фактора Va к АПС</i>		тромбоцитов	163
<i>на основе модифицированного АЧТВ</i>	131	Наследственная болезнь Виллебранда.....	166
<i>Тест для диагностики фактора V Лейден</i>	131	<i>Классификация и патогенез</i>	
<i>Определение протеина С</i>	132	<i>болезни Виллебранда</i>	166
<i>Определение протеина S</i>	134	<i>Псевдобользнь Виллебранда</i>	166
<i>Определение антитромбина</i>	135	<i>Клиническая характеристика</i>	
<i>Лабораторная диагностика</i>		<i>болезни Виллебранда</i>	167
<i>антифосфолипидного синдрома</i>		<i>Лабораторная диагностика</i>	
<i>и волчаночного антикоагулянта</i>	136	<i>болезни Виллебранда</i>	168
<i>Определение антифосфолипидных</i>		<i>Алгоритм диагностики</i>	
<i>антител (АФА)</i>	137	<i>болезни Виллебранда</i>	170
Тесты для исследования фибринолитической		<i>Соотношение активности</i>	
системы.....	138	<i>фактора Виллебранда и группы крови</i>	170
<i>Спонтанный эуглобулиновый лизис</i>	138	<i>Лечение болезни Виллебранда</i>	171
<i>Определение плазминогена</i>	139	Приобретенные геморрагические заболевания	173
<i>Определение α_2-антиплазмина</i>	139	Приобретенные нарушения	
<i>Определение ингибитора активатора</i>		тромбоцитарного звена.....	173
<i>плазминогена типа I (PAI-1)</i>	140	<i>Тромб цитопении</i>	173
<i>Определение тканевого активатора</i>		<i>Иммунная тромбоцитопеническая</i>	
<i>плазминогена (t-PA)</i>	141	<i>пурпура (ИТП)</i>	174
Тесты активации свертывания крови.....	142	<i>Неонатальная аллоиммунная</i>	
<i>Определение D-димеров</i>	142	<i>тромбоцитопения</i>	175
<i>Продукты деградации</i>		<i>Гаптеновые (гетероиммунные)</i>	
<i>фибрина/фибриногена (ПДФ)</i>	143	<i>тромб цитопении</i>	175
<i>Тромбин-антитромбиновый</i>		<i>Тромбоцитопения, вызванная гепарином</i>	175
<i>комплекс (ТАТ)</i>	143	Приобретенный дефицит факторов	
<i>Фрагменты протромбина F1+2</i>	143	свертывания крови	177
<i>Фибринопептид А (ФПА, FPA)</i>	144	<i>Развитие специфического ингибитора</i>	177
<i>Растворимые фибрин-мономерные</i>		<i>Приобретенный ингибитор к фактору VIII</i>	
<i>комплексы (РФМК)</i>	145	(<i>приобретенная гемофилия А</i>)	177
<i>Паракоагуляционные тесты</i>	145	<i>Приобретенный ингибитор к ф. IX</i>	178

Содержание

<i>Ингибитор к фактору Виллебранда (приобретенная болезнь Виллебранда, приобретенный синдром Виллебранда)</i>	178
<i>Приобретенный ингибитор к фактору V.....</i>	178
<i>Приобретенные ингибиторы к протромбину, факторам VII и X</i>	178
<i>Приобретенный дефицит витамина K</i>	179
<i>Лечение антикоагулянтами непрямого действия, отравление антагонистами витамина K</i>	179
<i>Гепариноподобные антикоагулянты</i>	180
<i>Заболевания печени</i>	180
<i>Системный фибринолиз.....</i>	180
<i>Геморрагические мезенхимальные дисплазии</i>	181
<i>Нарушения структуры коллагена.....</i>	182
<i>Кровотечения, связанные с массивной кровопотерей.....</i>	182
<i>Нарушения гемостаза, связанные с патологией почек</i>	183
<i>Амилоидоз.....</i>	183
Тромботические заболевания	184
<i>Тромбоцитоз</i>	184
<i>Тромбофилии. Общее представление.....</i>	184
<i>Патогенез тромбофилии.....</i>	184
<i>Лабораторные тесты при тромбофилии</i>	185
Маркеры тромбоцитопении.....	186
<i>Мутация фактора V (ф. V Лейден, Leiden)</i>	186
<i>Дефицит протеина C</i>	187
<i>Дефицит протеина S.....</i>	188
<i>Мутация протромбина 20210A.....</i>	189
<i>Дефицит антитромбина.....</i>	189
<i>Гипергомоцистеинемия.....</i>	190
<i>Гиперлипопротеинемия (a).....</i>	192
<i>Высокая активность фактора VIII и фактора Виллебранда</i>	193
<i>Дисфибриногенемия.....</i>	193
<i>Другие врожденные аномалии, предрасполагающие к патологическому тромбообразованию.....</i>	193
Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз при действии факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний	194
<i>Тромбоатерогенез</i>	194
<i>Катетеры центральных вен.....</i>	195
<i>Антифосфолипидный синдром и волчаночный антикоагулянт</i>	195
<i>Приобретенные состояния, предрасполагающие к развитию тромбозов. Аутоиммунные заболевания</i>	197
<i>Злокачественные заболевания</i>	197
<i>Нефротический синдром</i>	198
<i>Прием оральных контрацептивов.....</i>	198
<i>Инфекции</i>	198
<i>Гипофибринолиз.....</i>	199
<i>Лечение тромбозов.....</i>	199
<i>Прямые антикоагулянты. Гепарин.....</i>	199
<i>Терапия оральными (непрямыми) антикоагулянтами.....</i>	199
<i>Фибринолитическая терапия.....</i>	203
Вторичные комплексные нарушения гемостаза.....	204
ДВС-синдром	204
<i>Этиология и патогенез ДВС</i>	204
<i>Виды ДВС-синдрома.....</i>	206
<i>Тромбоцитарно-сосудистый гемостаз при ДВС-синдроме</i>	207
<i>Плазменный гемостаз при ДВС-синдроме</i>	208
<i>Диагностика ДВС-синдрома</i>	209
Локализованное внутрисосудистое свертывание крови (ЛВС)	210
<i>Сахарный диабет</i>	210
<i>Повышенное артериальное давление и гемодинамическое напряжение сдвига.....</i>	211
<i>Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитико-уремический синдром</i>	211
<i>Приобретенные нарушения гемостаза, ассоциированные с парапротеинемиями</i>	212
Приобретенные нарушения гемостаза у новорожденных и детей первого полугодия жизни	213
<i>Геморрагическая болезнь новорожденных</i>	213
<i>ДВС-синдром</i>	214
<i>Тромбоцитопении.....</i>	214
<i>Тромбозы у новорожденных детей.....</i>	214
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	216
БИБЛИОГРАФИЯ	223