


816.15
5250
З.С. Баркаган, А.П. Момот

The background of the cover is a large, abstract, colorful artwork. It features a central white rectangular box containing the title. The artwork itself is composed of various shapes, including circles, triangles, and elongated forms, filled with a dense pattern of small, multi-colored dots. The colors used include red, blue, yellow, green, and orange. The overall composition is vibrant and complex, suggesting a scientific or medical theme.

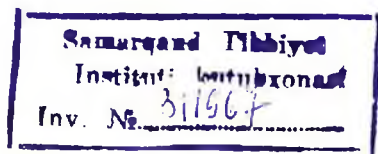
**Д И А Г Н О С Т И К А
И КОНТРОЛИРУЕМАЯ ТЕРАПИЯ
НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА**

Издательство «Ньюдиамед»
Москва - 2001

616.15
Б 250

З.С. Баркаган, А.П. Момот

**Д И А Г Н О С Т И К А
И КОНТРОЛИРУЕМАЯ ТЕРАПИЯ
НАРУШЕНИЙ ГЕМОСТАЗА**



**Издательство «Ньюдиамед»
Москва - 2001**

Баркаган З.С., Момот А.П. - Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Издание 2-е дополненное. - М.: "Ньюдиамед", 2001.- 296 с.

Баркаган Зиновий Соломонович - научный руководитель Федерального Академического центра по патологии системы гемостаза при ЦНИЛ Алтайского медицинского университета, член-корреспондент РАМН, заслуженный деятель науки РФ, профессор.

Момот Андрей Павлович - заведующий лабораторией того же Центра, профессор.

В данном справочном пособии в сжатой и доступной форме представлены данные об основных компонентах и механизмах функционирования системы гемостаза в норме и при наиболее часто встречающихся в практике врача патологических нарушениях в разных звеньях этой системы - при различных видах кровоточивости, ДВС-синдроме, тромбозах и тромбофилических состояниях. Подробно описываются методы лабораторной диагностики и контроля за гемостатической и антитромботической терапией. При этом предпочтение отдается наиболее доступным и, вместе с тем, достаточно информативным методам исследования.

Книга рассчитана на клиницистов, практикующих врачей разных специальностей и врачей-лаборантов, поскольку геморрагии, тромбозы и ДВС-синдромы занимают одно из доминирующих мест в патологии человека.

Издательство «Ньюдиамед»

129110, Москва, Проспект Мира, 36, стр. 1

Лицензия ИД № 00169 от 1 октября 1999 года

Гигиеническое заключение на продукцию № 77.99.1.953.П.323.12.98. от 16.12. 1998 г.

Директор издательства В.А. Буланова

Зам. директора издательства по маркетингу Г.С. Рихард

Компьютерная верстка А.Ю. Буланов

Подписано в печать 20.04.2001 г.

Формат 60X90/16

Объем 18 ½ печ. л.

Отпечатано в типографии ЗАО «Солид»

Заказ

Частичное или полное воспроизведение материала возможно только с разрешения издательства

ISBN 5-88107-043-7

©Ньюдиамед, 2001

СОДЕРЖАНИЕ

ОТ АВТОРОВ.....	7
ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ	8
1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ И МЕТОДАХ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА.....	10
1.1. СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ.....	11
1.1.1. ТРОМБОЦИТЫ И ИХ РОЛЬ В МЕХАНИЗМАХ ГЕМОСТАЗА	12
1.2. КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ	18
1.2.1. Трансформация фибриногена в фибрин	21
1.2.2. Трансформация протромбина в тромбин	24
1.2.3. Начальная фаза свертывания крови	24
1.2.4. Оценка результатов общих коагуляционных тестов	26
1.2.5. Витамин К-зависимые факторы свертывания крови	27
1.2.6. Неферментные факторы свертывания крови.....	29
1.3. ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОАГУЛЯЦИОННОГО КАСКАДА	31
1.4. ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИЕ МЕХАНИЗМЫ	31
1.5. ФИБРИНОЛИТИЧЕСКАЯ (ПЛАЗМИНОВАЯ) СИСТЕМА	32
1.6. МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА	38
1.6.1. Маркеры активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.....	39
1.6.2. Маркеры активации свертывающей системы крови и фибринолиза	40
2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНОГО (ПЕРВИЧНОГО) ГЕМОСТАЗА	45
2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ (ЛОМКОСТИ) МИКРОСОСУДОВ	45
2.1.1. Манжеточная проба М.П. Кончаловского, Румпель-Леёде	45
2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ КРОВОТЕЧЕНИЯ	46
2.2.1. Методика Дьюка (1910).....	46
2.2.2. Методика Борхгревинка-Ваалер (1958).....	47
2.2.3. Метод Айви (1941).....	47
2.2.4. Метод А.С. Шитиковой (1975).....	48
2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ТРОМБОЦИТОВ В КРОВИ.....	49
2.3.1. Микроскопический метод подсчета	49
2.3.2. Определение количества и размера тромбоцитов с помощью автоматических счетчиков крови	50
2.4. ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ	51
2.4.1. Спонтанная агрегация тромбоцитов	51
2.4.2. Исследование индуцированной агрегации тромбоцитов	53
2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА	61
2.5.1. Вариант определения активности на фотоэлектроколориметре	61
2.5.2. Вариант определения активности на агрегометре	65
2.5.3. Определение антигена фактора Виллебранда	66

2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТРАКЦИИ КРОВЯНОГО СГУСТКА	68
3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА	70
3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ (МЕТОДИКА LEE, WHITE)	70
3.2. АУТОКОАГУЛЯЦИОННЫЙ ТЕСТ	73
3.3. КАОЛИНОВОЕ ВРЕМЯ СВЕРТЫВАНИЯ БЕДНОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ	76
3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВАЦИИ ПРОЦЕССА СВЕРТЫВАНИЯ ПЛАЗМЕННЫМИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ	77
3.5. АКТИВИРОВАННОЕ ПАРЦИАЛЬНОЕ (ЧАСТИЧНОЕ) ТРОМБОПЛАСТИНОВОЕ ВРЕМЯ	79
3.6. ПРОТРОМБИНОВОЕ (ТРОМБОПЛАСТИНОВОЕ) ВРЕМЯ	81
3.7. ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ	87
3.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИБРИНОГЕНА В ПЛАЗМЕ	89
3.8.1. Гравиметрический метод (по Р.А. Рутберг)	89
3.8.2. Фотометрический метод	91
3.8.3. Хронометрический метод (по Клауссу)	92
3.9. КОАГУЛЯЦИОННЫЕ ТЕСТЫ С ГЕТЕРОГЕННЫМИ КОАГУЛАЗАМИ	95
3.9.1. Тест с ядом гюрзы обыкновенной (<i>Vipera lebetina turanica</i>) - лебетоксовый тест (ЛЕТ)	95
3.9.2. Тест с ядом эфы многочешуйчатой (<i>Echis multisquamatus</i>) - эхитоксовый тест (ЭХТ)	97
3.9.3. Анцистроновый тест	98
3.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ	99
3.10.1. Дифференциальная диагностика дефицита факторов VIII, IX и XI	99
3.10.2. Унифицированная методика одностадийного количественного определения факторов VIII и IX	101
3.10.3. Определение активности ингибитора к фактору VIII (Kasper, 1975)	105
3.10.4. Количественное определение дефицита факторов VII, X, V и II	108
3.10.5. Определение фактора XIII	110
3.11. Оценка базальной коагулограммы в процессе гепаринотерапии	114
4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ (СОСТАВЛЕНО С УЧАСТИЕМ В.А. МАКАРОВА, Т.Л. ВОЮШИНОЙ, О.Е. НЕВЕДРОВОЙ, Н.Н. ДРОЗД)	117
4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИТРОМБИНА	117
4.1.1. Метод определения прогрессивной активности антитромбина	117
4.1.2. Методы определения гепарин-кофакторной активности антитромбина	120
4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ГЕПАРИНОВ ПО АНТИ-Ха АКТИВНОСТИ	127
4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ, СВЯЗАННОЙ С ПРОТЕИНОМ С	129
4.3.1. Скрининг нарушений в системе протеина С	129
4.3.2. Определение резистентности фактора Va к действию активированного протеина С	131
4.3.3. Методы определения активности протеина С	133
4.3.4. Определение активности протеина S (Wolf et al., 1989; Boyer-Neumann et al., 1990)	137

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ (ПЛАЗМИНОВОЙ) СИСТЕМЫ.....	139
<i>(СОСТАВЛЕНО С УЧАСТИЕМ В.А.МАКАРОВА, Т.Л.ВОЮШИНОЙ, О.Е.НЕВЕДРОВОЙ)</i>	
5.1. СПОНТАННЫЙ ЭУГЛОБУЛИНОВЫЙ ЛИЗИС <i>(ПРИНЦИП KOWARZYK, BULUK, 1954)</i>	<i>139</i>
5.2. СТИМУЛИРОВАННЫЙ ЭУГЛОБУЛИНОВЫЙ ЛИЗИС	140
5.2.1. Эуглобулиновый лизис при активации стрептокиназой.....	141
5.2.2. XIIa-зависимый эуглобулиновый лизис	142
5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА НА ОСНОВЕ ЛИЗИСА СГУСТКА ИЗ РАСТВОРИМОГО ФИБРИНА.....	144
5.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИПЛАЗМИНОВОЙ АКТИВНОСТИ НА ОСНОВЕ ЛИЗИСА СГУСТКА ИЗ РАСТВОРИМОГО ФИБРИНА	147
5.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ХРОМОГЕННОГО СУБСТРАТА.....	149
5.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ α_2 -АНТИПЛАЗМИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ХРОМОГЕННОГО СУБСТРАТА.....	151
5.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА	153
5.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ D-ДИМЕРА	156
5.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ ФИБРИНОГЕНА/ФИБРИНА ПО ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ	158
5.10. ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ ФИБРИНОГЕНА/ФИБРИНА.....	159
6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ВНУТРИСОСУДИСТОЙ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА.....	163
6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МАРКЕРОВ	164
6.1.1. Маркеры активации и истощения тромбоцитарного гемостаза	164
6.1.2. Оценка степени повреждения эритроцитов.....	165
6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА	167
6.2.1. Определение растворимого фибрина (РФ или РФМК).....	167
6.2.2. Определение фибринопептида А	173
6.2.3. Определение других маркеров тромбинемии	175
7. ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ ЗА ГЕМОСТАТИЧЕСКОЙ И АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ.....	178
7.1. КОНТРОЛЬ ЗА ГЕМОСТАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ	178
7.1.1. Определение уровня факторов VIII и IX и их ингибиторов	178
7.1.2. Определение активности плазменного антитромбина	180
7.2. СПОСОБЫ МОНИТОРИРОВАНИЯ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ	181
7.2.1. Контроль за динамикой содержания тромбоцитов в крови и ингибцией их функции.....	182
7.2.2. Контроль терапии антикоагулянтами и мониторинг достижения достаточного их эффекта	183
7.3. МОНИТОРИРОВАНИЕ ДОСТАТОЧНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ АНТИКОАГУЛЯНТАМИ.....	190
7.4. МОНИТОРИНГ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТРОМБОЛИТИКАМИ	191
8. ДИАГНОСТИКА АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА (ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА)	193

8.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА В ГРУППЕ ФОСФОЛИПИДЗАВИСИМЫХ КОАГУЛЯЦИОННЫХ ТЕСТОВ.....	197
8.1.1. I этап. Скрининговые тесты.....	198
8.1.2. II этап. Подтверждающие тесты и индексы.....	202
8.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА ПО ПРОКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЕННЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН.....	208
8.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ (АФА) (ПРИНЦИП HARRIS, 1987).....	212
9. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТРОМБОФИЛИЙ (М.Н.Блинов, С.И.Капустин, В.А.Кобильанская, Л.П.Папаян).....	219
9.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ G ₁₆₉₁ → А ФАКТОРА V (АНОМАЛИЯ ЛЕЙДЕН) В ГЕНЕ КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА V.....	221
9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ G ₂₀₂₁₀ → А В ГЕНЕ ПРОТРОМБИНА.....	225
9.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ C _{677T} А → V В ГЕНЕ МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ (МТГФР) ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ.....	226
10. ОСНОВНЫЕ НАРУШЕНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА.....	229
10.1. ВИДЫ КРОВОТОЧИВОСТИ. ОСНОВНЫЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И СИНДРОМЫ.....	229
10.2. ВИДЫ ТРОМБОФИЛИЙ И ОСНОВЫ ИХ ДИАГНОСТИКИ.....	234
10.3. ОГРАНИЧЕННОЕ И ДИССЕМИНИРОВАННОЕ СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ. ПРЕДТРОМБОЗЫ, ТРОМБОЗЫ, ТРОМБОФИЛИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ, ДВС- СИНДРОМ. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ.....	241
10.3.1. Общие положения.....	241
10.3.2. Особенности локальных и общих сдвигов гемостаза при тромбозах.....	243
10.3.3. Локальное (органное) микротромбообразование.....	244
10.3.4. ДВС-синдром.....	246
10.4. ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ СОВРЕМЕННОЙ НОМЕНКЛАТУРЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ (РАЗДЕЛ: КОАГУЛОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ).....	247
11. ПРИЛОЖЕНИЕ.....	255
11.1. ПРАВИЛА ЗАБОРА КРОВИ И ПОЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	255
11.1.1. Подготовительные процедуры.....	255
11.1.2. Получение крови, ее стабилизация и выделение образцов плазмы.....	256
11.2. ОБРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ.....	261
11.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ РЕАКТИВОВ.....	262
11.4. ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРИИ ГЕМОСТАЗА.....	264
11.5. НАБОРЫ И РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСТАЗА ПРОИЗВОДСТВА ФИРМЫ "ТЕХНОЛОГИЯ-СТАНДАРТ".....	267
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	285

ОТ АВТОРОВ

В данном руководстве, по сравнению с предыдущим, значительно расширен спектр диагностических методик, в том числе основанных на использовании отечественных хромогенных субстратов, в изучении и апробации которых участвовали авторы. Новыми являются также методы молекулярной диагностики ряда тромбофилий. Кроме того, в книгу включены разделы о методах мониторинга антитромботической терапии, патогенезе и контролируемой терапии локальных форм блокады микроциркуляции при деструктивно-воспалительных процессах, а также ряд новых методик, в том числе разработанных отечественными авторами и производителями. В содержании и заглавиях соответствующих разделов указаны авторы или соавторы представленных методик.

Поскольку в данном руководстве большое внимание уделено методам контроля за проводимой терапией и определения достаточности последней, авторы сочли необходимым изменить название представляемой на суд читателя книги.

Авторы заранее благодарят коллег за конструктивные замечания и предложения, которые возникнут при чтении этой книги и практическом использовании содержащихся в ней рекомендаций.

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Исследование системы гемостаза имеет первостепенное значение для диагностики различных видов кровоточивости, тромбоэмболических синдромов, тромбофилических состояний и процессов диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, в том числе при критических состояниях. Динамический контроль за гемостазом необходим также при проведении антитромботической терапии в процессе консервативного и хирургического лечения сердечно-сосудистых заболеваний, ишемий и инфарктов органов, большого числа акушерских осложнений и болезней новорожденных.

Уже этот далеко неполный перечень ситуаций, при которых очень важен контроль за состоянием системы гемостаза, с полной очевидностью свидетельствует о том, что в современных условиях не могут считаться сколько-нибудь полноценным обследование и лечение больных без контроля за состоянием системы гемостаза. Лечебные учреждения, лишённые таких лабораторий, не отвечают требованиям современной медицины, поскольку это обстоятельство делает лечение больных, с различными видами кровоточивости, тромбозами, ДВС-синдромами и терминальными состояниями, эмпирическим, а, зачастую, вообще невозможным, при этом проводимая терапия в ряде случаев либо недостаточна, либо избыточна и опасна, уподобляясь "слепому полету в густом тумане". Если же учесть очень важную роль нарушений гемостаза в патогенезе таких бичей человечества, какими являются атеротромбоз, коронарная болезнь сердца и мозговые инсульты, различного рода терминальные состояния, обменные, иммунные и онкологические заболевания, многие виды патологии матери, плода и новорожденных (от гестозов и фетоплацентарной недостаточности до геморрагической болезни и злокачественной пурпуры новорожденных), то необходимость четкой работы лаборатории гемостаза в составе каждого лечебно-профилактического учреждения, претендующего на современный уровень диагностики и лечения больных, становится совершенно очевидной. Вместе с тем, такая диагностика должна быть оперативной, повсеместно доступной и надежной.

В этом справочном пособии на основе многолетнего опыта работы Федерального центра по диагностике и лечению нарушений гемостаза при Алтайском медицинском университете, как и ряда других аналогичных центров, работающих в контакте с нами, приводятся данные о наиболее важных для диагностики и лечения больных, и, вместе с тем, наиболее доступных методиках исследования разных звеньев системы гемостаза, дается информация о трактовке и диагностическом значении получаемых с их помощью результатов, способах распознавания наиболее распространенных видов патологии, связанных с нарушениями в этой системе.

Следует подчеркнуть, что данное пособие не претендует на полное освещение методик, используемых современной гемостазиологией. Попытка включить огромный арсенал морфологических, функциональных, иммунологических и генетических методик и их модификаций, во всем их разнообразии, неизбежно сделало бы данное руководство "камнем преткновения" даже для достаточно искушенного читателя. К тому же, многие из таких методик мало доступны клиническим лабораториям, недостаточно оперативны, носят преимущественно исследовательский, а не прикладной характер.

Руководствуясь этими соображениями, авторы ограничились описанием наиболее "ходовых" и, вместе с тем, наиболее важных для диагностики и лечения больных методов исследования системы гемостаза, придерживаясь тех их вариантов, которые, при достаточной степени точности и надежности, доступны и близки к стандартам, одобренным Комитетом по стандартизации при Международной Ассоциации по тромбозам и гемостазу и Проблемной комиссией "Патология гемостаза" РАМН.

При отсутствии в отечественной литературе описания тех или иных важных диагностических тестов мы привели стилизованный перевод с инструкций, прилагающихся к соответствующим зарубежным наборам, со ссылкой на фирму-изготовителя.

Почти все предлагаемые методики и диагностические критерии прошли апробацию на многих сотнях больных в нашем Центре.

Авторы надеются, что это пособие окажется полезным подспорьем для врачей-лаборантов и клиницистов, облегчит им ориентировку в различных нарушениях системы гемостаза, в диагностике и эффективном контроле за лечением больных.

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ И МЕТОДАХ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Биологическая система, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение жидкого состояния циркулирующей крови, а с другой, - предупреждение и купирование кровотечений, обозначается как *система гемостаза*. Это двуединство, казалось бы, противоположных, но необходимых для сохранения жизни организма, функций предопределяет сопряженное участие в механизмах гемостаза различных морфологических структур и биохимических процессов, многоступенчатость их взаимодействия, функционирование на всех этапах механизмов самоускорения и самоторможения, активации и инактивации.

Наибольшее значение система гемостаза имеет для поддержания нормального кровотока и, вместе с тем, предупреждения и купирования кровотечений в тонкостенных и легко травмируемых сосудах малого калибра (до 100 мкм в диаметре). Поэтому от совершенства функционирования указанной системы в значительной степени зависят эффективность кровоснабжения тканей, предупреждение и купирование геморрагий, тромбозов, ишемий и инфарктов органов, защита от диссеминации бактерий и токсинов из очагов поражения по организму и т.д. Всем этим определяются важнейшее общебиологическое значение системы гемостаза и весьма существенная роль нарушений в ней в патогенезе подавляющего большинства заболеваний.

Гемостаз осуществляется тремя взаимодействующими между собой функционально-структурными компонентами:

- стенками кровеносных сосудов;
- клетками крови, в первую очередь, - тромбоцитами;
- плазменными ферментными (протеолитическими) системами - свертывающей, плазминовой (фибринолитической), калликреинкининовой и комплемента.

Первыми в ответ на повреждение реагируют кровеносные сосуды и клетки крови (тромбоциты и, отчасти, эритроциты). Именно этой реакции принадлежит ведущая роль в предупреждении и остановке кровотечения из микрососудов. В связи с этим, сосудисто-тромбоцитарная реакция на повреждение обозначается как "первичный гемостаз", а процесс свертывания крови как "вторичный", хотя оба эти механизма взаимно индуцируют друг друга и функционируют на большом отрезке времени сопряженно.

1.1. СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ

В ответ на повреждение микрососуды отвечают спазмом, в результате чего капилляры и вены временно запустевают и кровотечение из них в первые 20-30 с не возникает. Эта вазоконстрикция четко видна капилляроскопически при нанесении укола в ногтевое ложе. Она обусловлена рефлекторным сокращением гладкомышечных клеток сосудов и поддерживается вазоспастическими агентами, секретируемыми эндотелием и тромбоцитами - серотонином, тромбоксаном A_2 и др. При некоторых видах сосудистой патологии (микροангиопатии, телеангиэктазии) эта локальная вазоспастическая реакция отсутствует, что легко выявляется капилляроскопически.

Функция эндотелия. В нормальных условиях эндотелий кровеносных сосудов обладает высокой тромборезистентностью и играет важную роль в поддержании жидкого состояния крови и предупреждении тромбозов. Это свойство эндотелия обеспечивается следующим:

- контактной инертностью внутренней, обращенной в просвет сосуда поверхности этих клеток, из-за чего она не активирует системы гемостаза;
- синтезом мощного ингибитора агрегации тромбоцитов - простагландина I_2 или простаглицлина;
- наличием на цитоплазматической мембране эндотелиальных клеток особого гликопротеина - *тромбомодулина*, связывающего тромбин, благодаря чему последний утрачивает способность вызывать свертывание крови, но сохраняет активирующее действие на систему двух важнейших антикоагулянтов - протеинов С и S;
- высоким содержанием на внутренней поверхности кровеносных сосудов мукополисахаридов и фиксацией на эндотелии комплек-

са "гепарин-антитромбин";

- способностью стимулировать фибринолиз путем синтеза и секреции тканевого активатора плазминогена (ТПА), а также через систему "протеины С+S";
- элиминацией из крови активированных факторов свертывания крови и их метаболитов.

Вместе с тем, эндотелий обладает уникальной способностью менять свой антитромботический потенциал на тромбогенный. Такая трансформация происходит при застое крови, гипоксии, повреждении стенок сосудов физическими и химическими агентами, под влиянием экзо- и эндотоксинов, среди которых главенствующую роль играют бактериальные эндотоксины, иммунные комплексы, антиэндотелиальные и антифосфолипидные антитела, медиаторы воспаления (интерлейкины, фактор некроза опухоли и др.), а также клеточные и плазменные протеазы (эластаза, трипсин, тромбин и др.). Такая же трансформация наблюдается и при метаболических изменениях сосудистой стенки (атеросклероз, диабетическая ангиопатия).

Свойства субэндотелия. При гибели эндотелиальных клеток обнажается субэндотелий, содержащий большое количество коллагена, в контакте с которым происходят активация, адгезия и расплавление тромбоцитов, а также активация системы свертывания крови. Этот процесс реализуется при участии крупномолекулярных гликопротеинов, в первую очередь, фактора Виллебранда, фибронектина и фибриногена. Важная роль указанного механизма подтверждается тем, что при генетически обусловленных дефектах субэндотелия - истончении и обеднении его коллагеном (болезнь Рендю-Ослера, мезенхимальные дисплазии), как и при дефиците фактора Виллебранда, наблюдаются профузные и длительные кровотечения из поврежденных микрососудов.

1.1.1. Тромбоциты и их роль в механизмах гемостаза

Тромбоциты продуцируются в органах кроветворения гигантскими полиплоидными клетками - мегакариоцитами, от цитоплазмы которых они отшнуровываются в виде округлых или овальных плоских дисков диаметром от 2 до 4 мкм. В норме основным источником тромбоцитов служат зрелые, богатые зернистостью, мегакариоциты, но при необходимости интенсивного воспроизводства их (например,

при большой убыли из крови под влиянием антитромбоцитарных антител или при потреблении в процессе массивного свертывания крови) происходит отшнуровка частиц от более молодых клеток мегакариоцитарного ряда, в результате чего в циркуляции появляются крупные с базофильной цитоплазмой и незначительной зернистостью клетки (так называемые "большие голубые пластинки").

Продолжительность жизни тромбоцитов человека составляет 7-10 дней. После выхода из костного мозга они циркулируют в крови и частично депонируются в селезенке и печени (около 20-25% всех клеток), откуда происходит вторичный их выход в кровоток. При гепатоспленомегалиях и портальном синдроме количество депонируемых тромбоцитов может резко возрастать, и содержание этих клеток в крови воротной вены намного превышает их количество в периферической циркуляции (Я.А. Макаревич).

В крови здоровых людей содержится $170-350 \times 10^9$ /л тромбоцитов. Уменьшение их количества ниже 80×10^9 /л способствует появлению кровоточивости, риск которой резко возрастает при уровне ниже 20×10^9 /л, а увеличение выше 800×10^9 /л создает угрозу развития тромбозов. Однако эти цифры условны, поскольку важны качественный состав циркулирующих в крови тромбоцитов, наличие в крови ингибиторов их функции, выраженность нарушений в других звеньях системы гемостаза и т.д. Так, при аутоиммунной тромбоцитопении угроза серьезной кровоточивости часто возникает лишь при содержании этих клеток в крови ниже $10-20 \times 10^9$ /л, тогда как при ДВС-синдроме из-за наличия комплексных нарушений в системе гемостаза тяжелая кровоточивость может существенно усиливаться снижением числа тромбоцитов в крови до $80-100 \times 10^9$ /л.

Участие тромбоцитов в гемостазе определяется следующими их функциями:

- ангиотрофической, т.е. способностью поддерживать нормальную структуру и функцию стенок микрососудов, в том числе жизнеспособность и репарацию эндотелиальных клеток;
- способностью поддерживать спазм поврежденных сосудов путем секреции (высвобождения) вазоактивных веществ - серотонина, катехоламинов, β -тромбомодулина и др., содержащихся в плотных и α -гранулах тромбоцитов;
- способностью образовывать в поврежденном сосуде тромбоцитарную пробку, что обеспечивается процессами адгезии этих клеток к субэндотелию и образованием их агрегатов, т.е. соеди-

нением друг с другом активированных тромбоцитов;

- участием тромбоцитарных факторов в процессе свертывания крови и в регуляции фибринолиза;
- стимуляцией процесса репарации в местах повреждения сосудистой стенки выделяющимся из подвергшихся адгезии тромбоцитов ростовым фактором, который является стимулятором размножения и перемещения гладкомышечных клеток и эндотелия, образования коллагена.

Тромбоцит окружен двухслойной фосфолипидной мембраной, в которую встроены рецепторные гликопротеины (ГП), взаимодействующие со стимуляторами (агонистами) адгезии и агрегации этих клеток. Из мембранных ГП наиболее важны ГП Iв, взаимодействующий с фактором Виллебранда и коллагеном, и ГП IIв/IIIа, связывающиеся с аденозиндифосфатом (АДФ), адреналином и другими агонистами агрегации. В процессе активации тромбоцитов меняются свойства этих рецепторов. Так, например, возрастает способность ГП IIв/IIIа соединяться с фибриногеном с образованием между клетками фибриногеновых и фибриновых мостиков.

К мембране тромбоцита прилегает аморфный белковый слой, имеющий толщину 15-20 нм, получивший название "плазматической атмосферы" или "гликокаликса". Этот слой отличается более высоким, чем в плазме, содержанием ряда белков, в том числе факторов свертывания крови, транспортируемых тромбоцитами в места остановки кровотечения.

Цитоплазматическая мембрана тромбоцитов образует множество проникающих вглубь клетки каналов с наружными выходами в виде узких устьев. В силу этого, "плазматическая атмосфера" не только окружает эти клетки, но и проникает внутрь их, чем тромбоцит уподобляется губке.

Из внутренних органелл тромбоцитов (рис.1) в функциональном отношении наиболее важны система микротрубочек, содержащих сходный с актомиозином сократительный белок и гранулярный аппарат, от которого в значительной степени зависит гемостатическая функция этих клеток. Из этих гранул наиболее важны безбелковые гранулы высокой плотности, содержащие аденозинтрифосфат (АТФ), АДФ, серотонин, катехоламины и другие вещества, необходимые для реализации гемостатической функции тромбоцитов, и белковые α -гранулы, в состав которых входят β -тромбоглобулин, антигепариновый фактор (4-й пластиночный фактор), фактор Вил-

лебранда, фибриноген, фактор V свертывания, ростовой фактор и др. При активации тромбоцитов содержимое этих гранул выходит из клеток (реакция высвобождения) и играет важную роль в процессе агрегации и образования в сосуде гемостатической пробки. При качественных дефектах тромбоцита (тромбоцитопатиях) многие виды кровоточивости обусловлены отсутствием либо нарушением "реакции высвобождения" этих гранул.

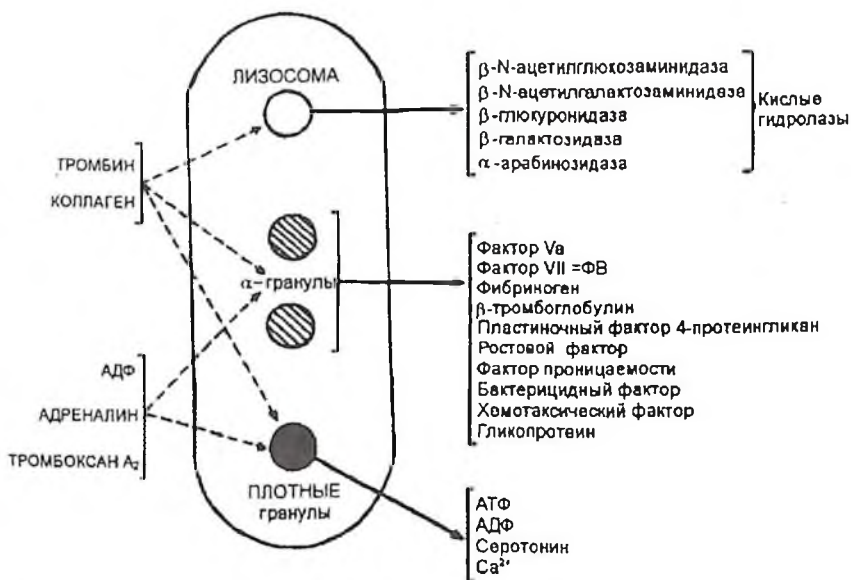


Рис. 1. Состав гранул тромбоцитов и действие на их высвобождение стимуляторов агрегации.

Адгезивно-агрегационная функция тромбоцитов в значительной степени зависит от транспорта ионов кальция в эти клетки, а также от образования из мембранных фосфолипидов арахидоновой кислоты и циклических производных простагландинов (рис.2). При этом, в самих тромбоцитах образуется мощный стимулятор агрегации и ангиоспазма - *тромбоксан A₂*, а в эндотелиальных клетках - антиагрегант и вазодилататор - *простациклин (PGI₂)*. При повреждениях эндотелия в последнем также начинает преобладать образование тромбоксана. Этот дисбаланс между тромбоксаном и про-

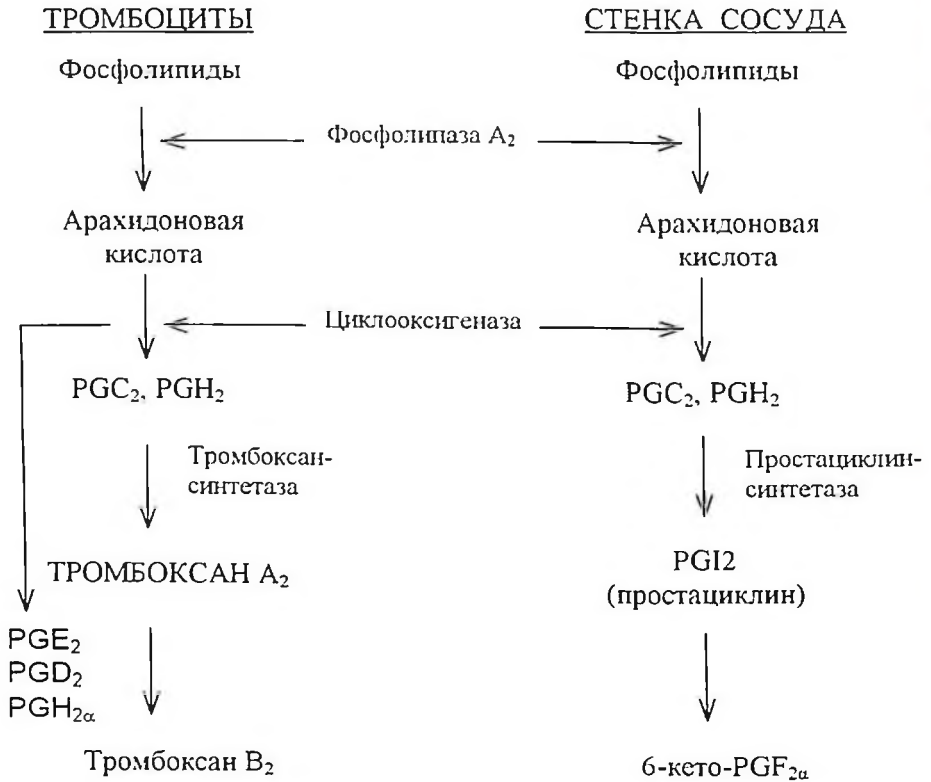


Рис. 2. Схема участия простагландинов в регуляции функции тромбоцитов.

стациклином резко усиливает агрегацию и реакцию высвобождения гранул.

Основными стимуляторами адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов являются турбулентное движение крови в зоне поражения или стенозирования сосудов, коллаген, АДФ, адреналин, тромбоксан A₂, серотонин, а главным кофактором адгезии тромбоцитов к субэндотелию - фактор Виллебранда - мультимерный гликопротеин, входящий в состав комплекса фактора VIII (антигемофильного фактора свертывания). Имеется также ряд плазменных белков и пептидов, являющихся кофакторами или, наоборот, ингибиторами процесса агрегации. Для реализации этого процесса необходимы

также ионы Ca и Mg.

В целом, динамика адгезии и агрегации тромбоцитов схематически суммирована на рис.3.

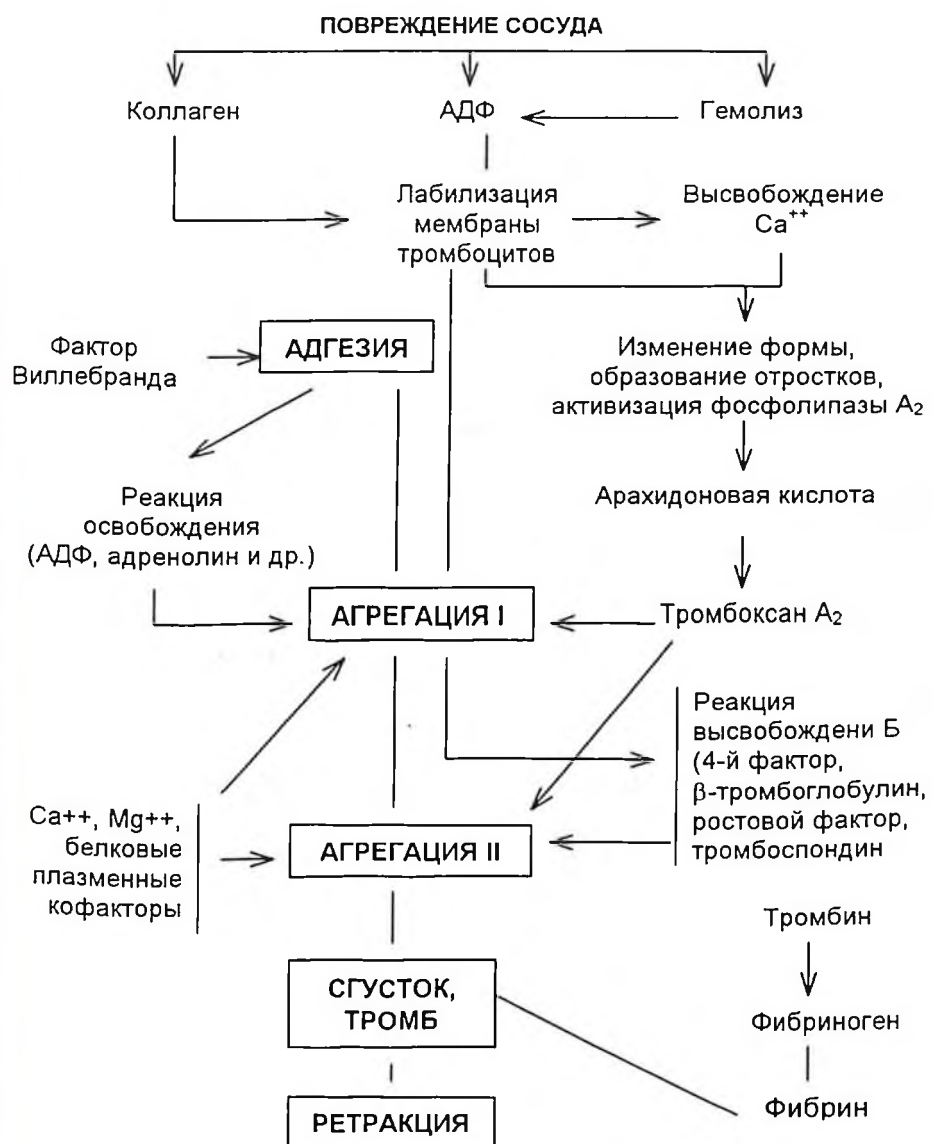


Рис. 3. Схема тромбоцитарного гемостаза.

Регистрация процесса агрегации тромбоцитов осуществляется с помощью специальных приборов - агрегометров. При воздействии малых доз агонистов агрегации (например, адреналина, низких концентраций АДФ) на агрегатограмме регистрируется двойная волна агрегации (рис.4): первая - под влиянием введенного в плазму извне стимулятора, вторая - за счет реакции высвобождения собственных агонистов, содержащихся в гранулах тромбоцитов. Вводимые извне большие дозы агонистов приводят к слиянию первой и второй волн агрегации. При отсутствии в тромбоцитах гранул или нарушении реакции их высвобождения начальная агрегация, вызванная введением извне агониста, сменяется дезагрегацией (рис.5). При отсутствии или блокаде мембранных рецепторов (например, при тромбастении Гланцманна) на агрегатограмме этот процесс вообще не регистрируется.

При значительных нарушениях адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов возрастает время кровотечения из проколов или насечек кожи, что регистрируется с помощью пробы Дьюка, при которой остановка кровотечения происходит через 2-4 мин после прокола кожи стандартным ланцетом у края мочки уха глубиной 3,5 мм но более точно - по определению времени и объема кровотечения из проколов на ладонной поверхности предплечья на фоне венозного стаза, вызванного сдавливанием плеча манжетой для измерения артериального давления (АД) и поддержания давления в ней на уровне 40 мм рт.ст. - проба Айви. В этой пробе остановка кровотечения при нормальной функции тромбоцитов происходит в первые 5-8 мин.

1.2. КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ

Свертывание крови - многоступенчатый (каскадный) ферментный процесс, в котором участвуют белки-протеазы, неферментные белковые акцелераторы процесса и конечный субстратный белок - фибриноген.

Перечень и принятая нумерация основных факторов свертыва-

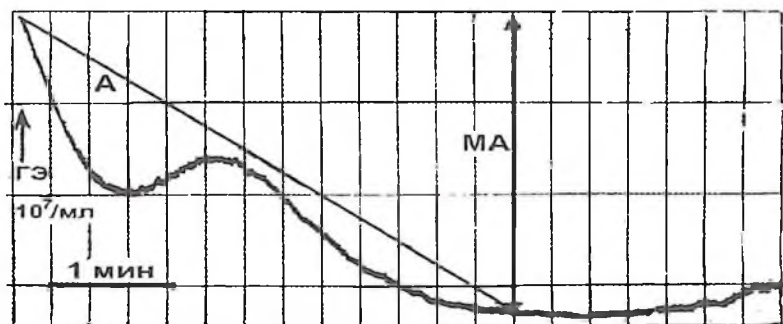


Рис. 4. Двухволновая нормальная агрегатограмма при воздействии слабого агониста.

ния, продолжительность их полужизни в циркуляции после внутривенного введения, а также необходимые для обеспечения гемостаза минимальные концентрации или активность этих белков приведены в табл. 1.

Для обозначения активированных факторов свертывания к их номеру добавляют букву "а", реже - букву "г", если активным действующим началом становится один из фрагментов фактора (например, фактор II - протромбин, фактор IIа - тромбин и т.д.).

Важной особенностью гемокоагуляционного каскада является то, что активация и взаимодействие факторов свертывания крови почти на всех этапах процесса происходят на свободных плазмменных фосфолипидных мембранах (Д.М. Зубаиров, 1977, 1980; А.Ш. Бышевский и др., 1990; F. Jobin, M.P. Esnouf, 1967; H.C. Hemker et al., 1967; J.P. Wu et al., 1993). Такой способностью к фиксации и активации факторов свертывания обладают только обращенные к наруж-



Рис. 5. Нарушение агрегации тромбоцитов, связанное с отсутствием плотных гранул.

Таблица 1

Факторы свертывания крови

Цифровое обозначение	Наиболее принятые наименования	Содержание в плазме		Период полужизни в плазме после внутривенного введения	Минимальный уровень, необходимый для гемостаза
		г/л	% активности		
1	2	3	4	5	6
I	Фибриноген	1,8-4,0	-	4-5 дней	0,8 г/л
II	Протромбин	Около 0,1	80-120	2-4 дня	30%
III	Тканевой тромбопластин	0	0	?	-
V	Ас-глобулин, проакцелерин	Около 0,01	70-150	24-34 ч	10-15%
VII	Проконвертин	Около 0,005	80-120	2-4 ч	5-10%
VIII:C	Антигемофильный глобулин (АГГ)	0,01-0,02	60-250	12-18 ч	20-35%
IX	РТС-фактор, фактор Кристмаса	Около 0,003	70-130	20-30 ч	20-30%
X	Фактор Стюарта-Прауэра	Около 0,01	80-120	48-56 ч	10-20%
XI	РТА-фактор	Около 0,005	70-130	60 ч	?
XII	Фактор Хагемана, контактный фактор	Около 0,03	70-150	50-70 ч	-
XIII	Фибрин-стабилизирующий фактор, плазменная транслугтаминаза	0,01-0,02	70-130	Около 4-5 дней	3-5%
-	Плазменный прекалликреин, фактор Флетчера	Около 0,05	60-150	?	-
-	Высокомолекулярный кининоген (ВМК)*, фактор Фитцджеральда, фактор Фложака, фактор Вильсона*	Около 0,06	80-130	?	-

Примечание. * - кровоточивость не возникает даже при очень глубоком дефиците (менее 1%), но существенно нарушается фибринолиз.

ной стороне мембраны головки отрицательно заряженных фосфолипидов - фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и др. Показано, что ряд видов гиперкоагуляции связан с избытком в плазме крови фосфолипидных мембран, причем удаление последних без каких-либо других воздействий позволяет переводить повышенную свертываемость крови в пониженную (А.Ш. Бышевский и др., 1990; Z.S. Borkagan et al., 1992, 1995).

На рис. 6 (см. вклейку в конце книги) приведена каскадно-комплексная схема свертывания крови, в которой в рамки взяты процессы, реализуемые на фосфолипидных мембранах. Как и другие плазменные протеолитические системы, свертывание крови может функционировать по двум механизмам:

- внутреннему, в котором наблюдается последовательная активация факторов XII, XI, IX+VIII, X+V и II;
- внешнему (быстрому), который запускается поступлением в кровь извне тканевого фактора (фактор III или TF), в состав которого входят апопротеин III и фосфолипид. TF+фактор VIIa образуют активный комплекс, под влиянием которого активируются в присутствии ионов кальция и фосфолипидных мембран X+V и II. Активированный фактор X не только переводит протромбин (фактор II) в тромбин (фактор IIa), но ретроградно активирует комплекс TF-фактор VIIa.

Оба пути, как видно из схемы, замыкаются на факторе X, вслед за чем они смыкаются и вплоть до образования фибрина сливаются в единый поток. Однако внешний и внутренний механизмы начального этапа свертывания крови не обособлены полностью друг от друга. Они взаимодействуют между собой путем взаимной активации факторов XII и VII, VII и IX. При гиперлипидемиях отмечается частичная преактивация фактора VII и этих "мостов", что характерно для ряда предтромботических состояний (З.С. Баркаган и др., 1975, 1989). Кроме того, фактор Xa ретроградно активирует фактор VII в комплексе с TF и Ca^{++} .

Далее будут рассмотрены отдельные этапы процесса свертывания крови и выделены показатели, имеющие наиболее важное клиническое значение.

1.2.1. Трансформация фибриногена в фибрин

Фибриноген (Фг; фактор I) - плазменный глобулярный гликопро-

теин, относящийся к белкам "острой фазы" и определяющий в значительной степени вязкость крови и плазмы, а также интенсивности агрегации тромбоцитов. Поэтому гиперфибриногемия, являющаяся маркером явного или латентно текущего воспалительного процесса, либо наличия опухоли или деструкции тканей (в том числе инфаркта миокарда), сама по себе является фактором высокого тромбогенного риска и нуждается в устранении.

Конечная фаза свертывания крови, как известно, характеризуется трансформацией растворенного в плазме фибриногена в волокна фибрина, которые образуют основной каркас сгустка крови. Принципиальная схема превращения фибриногена в фибрин приведена на рис. 7.

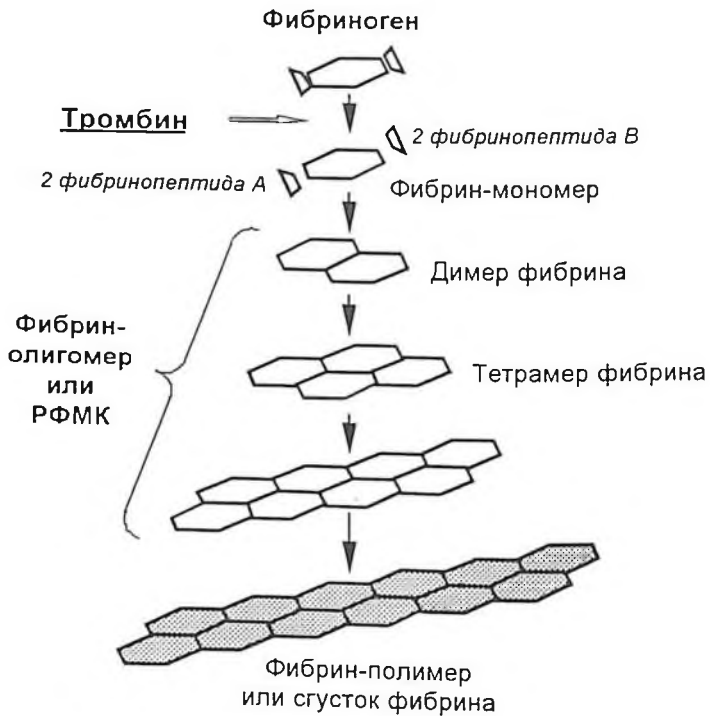


Рис. 7. Принципиальная схема превращения фибриногена в фибрин.

Эта фаза может быть подразделена на следующие три этапа:

Этап 1. Отщепление тромбином от молекулы фибриногена двух фибринопептидов А и двух фибринопептидов В, в результате чего образуются фибрин-мономеры (ФМ) с четырьмя свободными связями. Повышение содержания в плазме фибринопептидов А и В служит маркером активации свертывающей системы крови и тромбинемии.

Этап 2 (неферментный). Процесс полимеризации фибрин-мономеров вначале в димеры, затем - в тетрамеры и более крупные олигомеры, остающиеся еще в растворенном виде, но по мере дальнейшего укрупнения трансформирующиеся в волокна фибрина. Регуляция полимеризации фибрин-мономеров изучена далеко не полностью, но показано, что ряд пептидов и отрицательно заряженных мукополисахаридов (в том числе и гепарин) тормозят этот процесс (Д.М. Зубаиров, 1990; А.Ш. Бышевский и др., 1990).

Этап 3. Образование сгустка фибрина и стабилизация последнего фактором XIIIa, благодаря чему фибрин становится нерастворимым в 5М мочеvine. Активация фактора XIII также осуществляется тромбином (фактором IIa) в присутствии инов Ca.

Конечный этап свертывания в лабораторных условиях воспроизводится тромбиновым тестом, а также пробами с тромбиноподобными ферментами змеиных ядов - анцистроном, рептилазой, арвином и др. Но последние, в отличие от тромбина, отщепляют от фибриногена только пептиды А и не активируют фактор XIII. Удлинение времени свертывания в этих тестах может быть связано с гипофибриногемией, молекулярными аномалиями фибриногена, действием гепарина или других веществ, обладающих антитромбиновым эффектом (гирудин и др.), или больших количеств продуктов фибринолиза (ПДФ). Тесты с коагулазами змеиных ядов не чувствительны к гепарину, но отражают другие, перечисленные выше влияния, что используется в диагностике.

При ДВС-синдромах и тромбозмболиях содержание в плазме фибрин-мономера и олигомеров фибрина, обозначаемых так же, как *"растворимые фибринмономерные комплексы или растворимый фибрин"* (РФМК, РФ), резко возрастает. Их выявление в повышенном количестве имеет важное значение для диагностики тромбинемии и внутрисосудистого свертывания крови. Для этого используются тесты паракоагуляции - этаноловый, протаминасульфатный и наиболее информативный из них - орто-фенантролиновый, позволяю-

ций определять количество РФ в плазме крови (В.А. Елыкомов, А.П. Момот, 1987, А.П. Момот и др., 1996), методы определения фибрин-мономера по агглютинации нагруженных фибриногеном латексных частиц или эритроцитов, либо иммунологически тестами определения концентрации РФ.

1.2.2. Трансформация протромбина в тромбин

Этот процесс реализуется протромбиназным комплексом (см. схему свертывания), в котором активным началом является фактор Ха, а акцелератором процесса - фактор Va. При этом, от протромбина отщепляются фрагменты 1+2, после чего одноцепочная молекула протромбина трансформируется вначале в мейзотромбин, а затем в двухцепочный активный фермент - тромбин (фактор IIa). Активация фактора X на фосфолипидной мембране резко ускоряется Асглобулином (фактором V), который, как и фактор VIII, активируется по механизму обратной связи первыми небольшими дозами тромбина.

1.2.3. Начальная фаза свертывания крови

Как видно из схемы на рис. 6, активация фактора X может осуществляться двумя путями - по внешнему (быстрому) и внутреннему (медленному) механизмам.

Внешний механизм запускается поступлением в кровь тканевого тромбопластина. В лабораторных условиях этот механизм воспроизводится протромбиновым (тромбопластиновым) тестом, при выполнении которого к цитратной плазме добавляют тканевой тромбопластин и хлорид кальция, после чего регистрируют время образования сгустка.

Удлинение протромбинового времени при нормальных показаниях тромбоинового теста (см. выше) может быть обусловлено дефицитом факторов VII, X, V и II, причем нарушение только в этом тесте при нормальных показаниях всех других коагуляционных проб может быть связано только с дефицитом фактора VII.

Тормозится этот процесс ингибитором тканевого пути свертывания, обозначаемого как TFPI, а также наличием в плазме некоторых антифосфолипидных антител (волчаночного антикоагулянта), для чего используется тест с разведенным (ослабленным) тромбопла-

стином.

Внутренний механизм начального этапа свертывания крови реализуется цепной (каскадной) реакцией, в которой, как видно из схемы на рис. 6, последовательно активируются факторы XII, XI, IX и VIII. В отличие от внешнего механизма, в данном процессе не участвуют тканевой тромбопластин и фактор VII. Активация по этому пути инициируется контактом крови (плазмы) с субэндотелием, особенно коллагеном, что ведет к образованию активного "контактного" комплекса, в который входят фактор XIIIa-калликреин-фактор XIa. В пробирочных условиях запуск этого механизма осуществляется контактом крови (плазмы) с чужеродной поверхностью - стеклом, каолином, целитом и др.

Оценивается свертывание по *внутреннему механизму* путем определения общего времени свертывания крови (от момента извлечения ее из сосудистого русла до образования сгустка в пробирке; норма - 5-10 мин), но намного более точно - по активированному частичному (парциальному) тромбопластиновому времени (АЧТВ или АПТВ). В этом тесте усиливаются и стандартизируются контактная (добавлением каолина) и фосфолипидная (добавлением кефалина) активация процесса свертывания (норма при использовании разных реагентов чаще всего - 30-40 с). Этой же цели служит так называемый "аутокоагуляционный тест" (АКТ), отражающий кинетику образования и инактивации тромбина в исследуемой плазме при стандартизированной гемолизатом эритроцитов контактной и фосфолипидной активации процесса свертывания (В.П. Балуда и др., 1980; Л.З. Баркаган, 1993).

Из приведенных данных следует, что с помощью трех указанных выше базисных коагуляционных тестов (тромбинового, протромбинового и АПТВ) можно получить информацию о состоянии всех основных звеньев процесса свертывания крови, определить, в каком из них имеется нарушение у исследуемого больного. Дополняются эти тесты определением содержания фибриногена в исследуемой плазме, для чего лучше пользоваться коагулометрическим методом (по А. Clauss, 1957) либо методом взвешивания подсушенных сгустков по Р.А. Рутберг.

1.2.4. Оценка результатов общих коагуляционных тестов

Все перечисленные исследования, как и последующие определения активности отдельных факторов свертывания крови, могут выполняться как вручную, так и более легко, быстро и точно - на коагулометрах разной конструкции (оптических, механических и др.). При этом важно, чтобы определения выполнялись с помощью высокостандартизированных реагентов, прошедших предварительное тестирование на эталонных образцах плазмы при сравнении с международными эталонами тромбoplastина и факторов свертывания крови.

В табл. 2 приведены данные о том, в каких сочетаниях нарушаются показания базисных коагуляционных тестов при дефиците различных факторов свертывания крови и при действии антикоагулянтов. Анализ их позволяет сделать следующие заключения:

1. Удлинение протромбинового времени (ПВ) при нормальных показаниях АПТВ и тромбинового времени (ТВ) свойственно только дефициту фактора VII.
2. Нарушение показаний АПТВ (АКТ) при нормальных ПВ и ТВ наблюдается только при дефиците или ингибции факторов VIII, IX, XI и XII, а также прекалликреина и высокомолекулярного кининогена. Из этих форм патологии наиболее часты (более 97%) и сопровождаются выраженной кровоточивостью дефицит и/или ингибция факторов VIII и IX, что характерно для гемофилии А и В, а также дефицит фактора Виллебранда, более редко - появление в крови прежде здоровых людей иммунных ингибиторов фактора VIII.
3. Замедление свертывания только в тромбиновом тесте имеет место при дисфибриногемиях и нарушениях полимеризации фибрин-мономеров (в том числе и под влиянием ПДФ).
4. Замедление свертывания как в АПТВ, так и в протромбиновом тесте при нормальном ТВ и уровне фибриногена в плазме более 1,0 г/л наблюдается при дефиците факторов X, V, и II, а также при воздействии не прямых антикоагулянтов (кумаринов, варфарина, фенилина и др.).
5. Нарушение показаний всех трех базисных тестов наблюдается при гепаринотерапии, глубокой гипофибриногемии, воздействии на систему свертывания продуктов фибринолиза, лечения активаторами фибринолиза.

Таблица 2

Показания основных коагуляционных тестов при дефиците разных факторов свертывания крови

Дефицитные факторы и эффекты антикоагулянтов	Замедление свертывания		
	В АПТВ и АКТ	В протромбиновом тесте	В тромбиновом тесте
XII*	+	-	-
XI	+	-	-
Прекалликреин*	+	-	-
BM кининоген*	+	-	-
IX	+	-	-
VIII	+	-	-
Фактор Виллебранда	Часто+	-	-
VII	-	+	-
V	+	+	-
X	+	+	-
II*	+	+	-
I	+	+	+
XIII*	-	-	-
Действие гепарина	+	+	+
Действие кумаринов	+	+	-

Примечание. * - отмечены крайне редкие формы патологии.

Дальнейшая дифференцировка нарушений свертываемости крови проводится с помощью коррекционных проб и тестов смешивания, а также пробами с коагулазами змеиных ядов. В табл. 3-6 представлены данные о принципах, лежащих в основе выполнения этих тестов, чтении их результатов.

1.2.5. Витамин К-зависимые факторы свертывания крови

При многих видах патологии гемостаза наблюдается сопряженный дефицит синтезируемых в гепатоцитах витамин К-зависимых факторов (факторов VII, IX, X и II). Это может быть связано либо с тяжелым поражением паренхимы печени (в этих случаях одновременно выявляются гипоальбуминемия и дефицит фактора V), либо с нарушением γ -карбоксилирования этих факторов под влиянием витамин К-зависимой карбоксилазы. В результате этого не подвергшиеся карбоксилированию факторы свертывания утрачивают способность соединяться с Ca^{++} и участвовать в процессе свертывания крови, но иммунологически они обнаруживаются в крови в нор-

мальном количестве в виде некарбоксилированных и не функционирующих молекул, обозначаемых в литературе аббревиатурой PIVKA. Такое нарушение карбоксилирования витамин К-зависимых факторов свертывания крови со значительно более высоким уровнем в плазме PIVKA наблюдается у новорожденных (с максимальным удлинением протромбинового времени на 3-5-й день после рождения), а также при приеме антикоагулянтов непрямого действия (кумаринов, варфарина, фенилина и др.).

Таблица 3

Компоненты нормальной крови, используемые
в дифференцирующих коагуляционных тестах

Компоненты	Фактор свертывания крови							
	Внутреннего механизма				Внешнего механизма			
	VIII	IX	XI	XII и ПК	VII	X	V	II
Нативная плазма (свежая)	+	+	+	+	+	+	+	+
Адсорбированная плазма ¹	+	-	+	+	-	-	+	-
Сыворотка более 24 ч хранения	-	+	+	+	+	+	-	-
Старая плазма ²	Не используется				+	+	-	+
Профильтрованная плазма ³	То же				-	-	+	+
Свежая плазма цыплят или утят ⁴	+	+	+	-	Не используется			

Примечание. Плюс означает, что фактор имеется, минус - отсутствует.

¹ - Адсорбцию производят либо бария сульфатом из оксалатной плазмы (BaSO_4 - плазма), либо гелем гидроокиси алюминия из цитратной плазмы ($\text{Al}(\text{OH})_3$ -плазма).

² - Предварительно хранится 2-4 дня при $+4^\circ\text{C}$.

³ - Фильтрацию производят через два асбестовых фильтра (фильтры Зейца) - с 20% (верхний фильтр) и 30% (нижний фильтр) содержанием асбеста либо через удвоенный или утроенный соответственно 30 и 20% фильтры.

⁴ - Используется плазма цыплят или утят в возрасте до 3-4 дней.

Помимо указанных выше факторов свертывания крови, в гепатоцитах при участии витамин К-зависимого γ -карбоксилирования синтезируются два важнейших физиологических антикоагулянта - протеины С и S, синтез которых нарушается под влиянием тех же причин, что и синтез факторов VII, X, IX и II. К этой же группе относится протеин Z, функция которого еще точно не определена.

Таблица 4

Тесты, дифференцирующие нарушения внутреннего механизма формирования тромбина (при нормальном тромбиновом и протромбиновом времени)

Добавляемый компонент из нормальной крови	Результаты коррекции			
	I вариант	II вариант	III вариант	IV вариант
Адсорбированная плазма	+	-	+	-
Старая сыворотка	-	+	+	-
Смесь адсорбированной плазмы и сыворотки	+	+	+	-
Диагностическое заключение	Дефицит фактора VIII	Дефицит фактора IX	Дефицит фактора XI или XII	Наличие иммунного ингибитора одного из факторов

Примечание. Плюс означает, что получена нормализация, минус - нормализации нет.

1.2.6. Неферментные факторы свертывания крови

В эту группу, помимо фибриногена, входят два важных акцелератора процесса свертывания крови - факторы VIII и V. Оба они весьма лабильны, плохо сохраняются в донорской плазме при ее инку-

Таблица 5

Тесты, дифференцирующие дефицит фактора II, V и VII+X в протромбиновом тесте (при нормальном тромбиновом времени)

Добавляемый компонент из нормальной крови	Результаты коррекции		
	I вариант	II вариант	III вариант
Адсорбированная плазма (нет факторов II, V, X)	-	-	-
Старая плазма (без фактора V)	+	-	+
Профильтрованная плазма (без факторов VII и X)	-	+	+
Старая сыворотка (без факторов II и V)	+	-	-
Диагностическое заключение	Дефицит факторов VII или X	Дефицит фактора V	Дефицит фактора II

Примечание. Условные обозначения те же, что в табл. 4.

Таблица 6

Результаты одновременного использования двух тестов с ядами змей для разграничения дефицита факторов протромбинового комплекса

Дефицитные факторы	Коагуляционные пробы		
	Протромбиновый тест	С ядом гюрзы или гадюки Рассела	С ядом эфы
VII	Нарушение	Норма	Норма
X и V	Нарушение	Нарушение	Норма
II	Нарушение	Нарушение	Нарушение
<i>При коррекции старой плазмы</i>			
X	Норма	Норма	Норма
V	Нарушение	Нарушение	Норма
<i>При коррекции BaSO₄-плазмы</i>			
X	Нарушение	Нарушение	Норма
V	Норма	Норма	Норма

бации без глубокого замораживания, имеют короткую продолжительность жизни в крови реципиента после трансфузий.

Фактор VIII представлен комплексом белковых молекул, выполняющих в гемостазе различную функцию. В него входят следующие компоненты:

- Фактор VIII:C - коагуляционный компонент фактора, ускоряющий активацию фактора IX, с которым в присутствии Ca⁺⁺ образует комплекс на фосфолипидной матрице. Этот компонент обозначается как "антигемофильный глобулин", поскольку его дефицит лежит в основе гемофилии А. Однако снижение активности фактора VIII:C, связанное с ослаблением стимуляции его синтеза, наблюдается и при ряде форм болезни Виллебранда.
- Фактор Виллебранда (VIII:ФВ) - крупномолекулярный белок, контролирующий тромбоцитарный гемостаз, и необходимый, в частности, для адгезии тромбоцитов к субэндотелию. Вместе с тем, VIII:ФВ является стимулятором синтеза фактора VIII:C, из-за чего при его дефиците или аномалиях содержание в плазме фактора VIII:C часто снижается. Вследствие этих особенностей при дефиците фактора Виллебранда наблюдаются в разных сочетаниях удлинение времени "капиллярного" кровотечения в пробах Дьюка, Айви, А.С. Шитиковой и др., нарушение коллаген-ристомицин-агрегации тромбоцитов и более или менее выраженное снижение активности фактора VIII:C. С фактором VIII:ФВ связан главный антигенный маркер этого фактора, обозначаемый как фактор VIII:Ag. Вторым антигеном этого

фактора является сам белок VIII:C. Поэтому при иммунизации возможно появление двух видов антител к фактору VIII: анти-VIII:C и анти VIII:P:Ag. Имеются данные, что в состав фактора VIII входят еще два компонента, один из которых является низкомолекулярным кофактором белка VIII:C (З.С. Баркаган и др., 1969).

Синтез фактора VIII:C контролируется геном, локализующимся в X-хромосоме, а факторов VIII:ФВ и VIII:P:Ag - в аутосомах (McKusick, 1994; Say, 1995).

Фактор V - синтезируемый гепатоцитами глобулин, акцелерирующий активацию фактора X в протромбиназном комплексе (см. схему свертывания). В отличие от других факторов, синтезируемых гепатоцитами, фактор V не зависит от обеспеченности организма витамином K.

1.3. ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОАГУЛЯЦИОННОГО КАСКАДА

Важной особенностью этого многоступенчатого ферментного процесса является то, что в нем от момента запуска до конечного этапа происходит интенсивное наращивание числа последовательно активируемых молекул. Так, например, одна молекула фактора IXa активирует несколько десятков молекул фактора X, а одна молекула Xa - множество молекул фактора II (протромбина). Поэтому этот процесс может быть уподобен скорее не водопаду (сравнение с последним часто фигурирует в литературе), а камнепаду, при котором сорвавшийся с горы один камень вовлекает в процесс обвала все большее и большее число нижележащих камней.

Как уже указывалось выше, в системе свертывания действуют силы ретроградной активации, примером тому может служить активирующее действие фактора Xa на комплекс "тканевой тромбопластин-фактор VII".

Далее будут рассмотрены и механизмы самоторможения системы.

1.4. ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИЕ МЕХАНИЗМЫ

В системе свертывания крови действуют силы не только самоускорения, но и последующего самоторможения, в силу чего факторы

свертывания крови и их метаболиты приобретают антикоагулянтные свойства. Так, например, фибрин связывает и инактивирует большие количества тромбина и фактора Ха. Тормозят конечный этап свертывания и продукты расщепления фибриногена плазмином (см. раздел 1.5). Точно так же препятствуют свертыванию метафакторы Va и XIa.

Рассматривая эту трансформацию факторов свертывания в вещества, противодействующие гемокоагуляции и тромбообразованию, нельзя не обратить особого внимания на свойство тромбина превращаться из основного фактора свертывания крови в активатора важнейшего противосвертывающего механизма. На уровне организма этот феномен впервые был выявлен и изучен Б.А. Кудряшовым и его школой (1975). Однако один из важнейших молекулярных механизмов этого феномена, обозначаемый в современной литературе как "тромбиновый парадокс" (Griffin, 1995), был расшифрован много позже. Выяснилось, что очень значительная часть тромбина, образующегося при активации свертывающей системы крови, связывается с тромбомодулином сосудистой стенки и утрачивает при этом способность вызывать образование фибрина и активировать фактор XIII. Вместе с тем, такой заблокированный тромбомодулином тромбин сохраняет способность активировать систему важнейших антикоагулянтов - протеинов С и S, вызывать через них активацию фибринолиза. Поэтому тромбин трансформируется в мощный противотромботический агент. В процессе постоянной слабой активации свертывающей системы крови, носящей в организме перманентный характер (Д.М. Зубаиров, 1978), фактически весь образующийся тромбин связывается с тромбомодулином и, не вызывая гемокоагуляции, поддерживает в активном состоянии указанный выше противосвертывающий механизм и жидкое состояние циркулирующей крови (Griffin, 1995; Seligson, 1996).

Важнейшую роль в поддержании жидкого состояния крови играет группа первичных физиологических антикоагулянтов. В табл. 7 показаны основные механизмы их действия.

1.5. ФИБРИНОЛИТИЧЕСКАЯ (ПЛАЗМИНОВАЯ) СИСТЕМА

Ферментная система, вызывающая прогрессирующее асимметричное расщепление фибриногена и фибрина обозначается как фибринолитическая или плазминовая система. Главным действующим

Таблица 7

Основные первичные физиологические антикоагулянты

Наименование антикоагулянта	Механизмы действия
Плазменный анти-тромбин - ПАТ (ранее обозначаемый как антитромбин III) Гепарин	Прогрессивно действующий ингибитор тромбина, фактора Ха и в меньшей степени других ферментных факторов свертывания. Плазменный кофактор гепарина Сульфатированный полисахарид, образующий комплексы с ПАТ, переводящий последний в быстроедействующий антикоагулянт
Кофактор гепарина II	Слабый антикоагулянт, действие которого выявляется в присутствии гепарина после удаления из плазмы ПАТ
Протеин С	Витамин К-зависимая серин-амидаза, инантивирующая факторы VIIIa и Va; эндогенный активатор плазминогена. Активируется тромбином и комплексом "тромбомодулин-тромбин"
Протеин S Тромбомодулин	Витамин К-зависимый кофактор протеина С Гликопротеин, фиксированный на цитоплазматической мембране эндотелия. Связывает и инактивирует тромбин, но не ослабляет его активирующего действия на протеин С
Ингибитор тканевого пути свертывания (TFPI)	Ингибитор комплекса "тканевой фактор - фактор VIIa - фактор Ха - Ca ⁺⁺ "
"Контактные ингибиторы" (фосфолипидный, плацентарный)	Нарушают активацию внутреннего механизма свертывания (комплексы факторов XII и XI)
Антитромбопластины α_2 -макрोगлобулин	Ингибиторы комплекса факторов III - VIIa. Слабый ингибитор тромбина, плазмينا, калликреина
α_1 -антитрипсин I	Ингибитор тромбина, факторов IXa, XIa, XIIa, плазмина
Ингибитор комплементов I (Анти-CI)	То же
Ингибиторы полимеризации фибрин-мономеров	Тормозят образование фибрина

щим началом этой системы является протеолитический фермент - *плазмин*, содержащийся в плазме в виде профермента (плазминогена) в количестве около 0,21 г/л. В циркулирующей крови плазмино-

ген встречается в двух разных формах - в виде интактного глуплазминогена (с NH_2 -терминальной глутаминовой кислотой) и в виде частично подвергшегося протеолизу - лиз-плазминогена, который в 10-20 раз быстрее трансформируется в активный плазмин.

Активация плазминогена, как и свертывания крови, может осуществляться по внешнему и по внутреннему механизму (рис.8).



Рис.8. Основные механизмы функционирования фибринолитической (плазминовой) системы.

К внутреннему механизму относится такая же активация системы комплексом «протеин С-протеин S». Мощным тканевым активатором является урокиназа.

Основными активаторами внешнего механизма являются тканевой эндотелиальный плазминогеновый активатор, на долю которого приходится около 70% общей активаторной активности. Другие активаторы - продуцируемая в юкст-гломерулярном аппарате почек урокиназа и активаторы из других тканей и клеток крови (моноцитов, тромбоцитов и др.).

Внутренняя активация плазминогена частично осуществляется комплексом фактора XIIIa с калликреином (так называемый "XIIIa-зависимый фибринолиз") и частично другими механизмами, в том числе антикоагулянтным комплексом "протеины C+S" (см. раздел 1.4).

Противостоит фибринолизу ингибиторная система, важнейшими компонентами которой являются ингибиторы ТПА, обозначаемые как PAI-1 и PAI-2, антиплазмины (в том числе самый мощный из них - α_2 -антиплазмин) и ингибиторы трансформации плазминогена в плазмин. Более слабым ингибиторным действием обладают α_2 -макроглобулин, CI-эстеразный ингибитор, антитрипсин, плазменный антитромбин и др.

Плазминовая система в значительно большей степени адаптирована к лизису фибрина и растворимых фибрин-мономерных комплексов, чем к лизису фибриногена, но при очень сильной активации этой системы, преодолевающей действие ингибиторов, регистрируются как фибринолиз, так и фибриногенолиз.

В свернувшейся крови здорового человека фибринолиз выражен очень слабо, что связано с высоким содержанием в ней антиплазминов и других ингибиторов этого процесса. О содержании плазминогена в плазме судят по лизису сгустка в так называемой "эуглобулиновой фракции", в процессе получения которой в исследуемом образце фибриновый сгусток отделяется от антиплазминов. В этом тесте полный лизис сгустка происходит за несколько часов. Резкое замедление последнего наблюдается при дефиците (истощении) плазминогена в крови, а ускорение - при естественном (эндогенном) или искусственном (например, при введении стрептокиназы, урокиназы или ТПА) усилении фибринолиза. Однако результаты этого теста зависят от содержания фибриногена в исследуемой плазме.

Более точные результаты дает исследование фибринолиза на пластинах фибрина, очищенного от плазминогена и антиплазминов и на хромогенных субстратах, специфически расщепляемых плазмином.

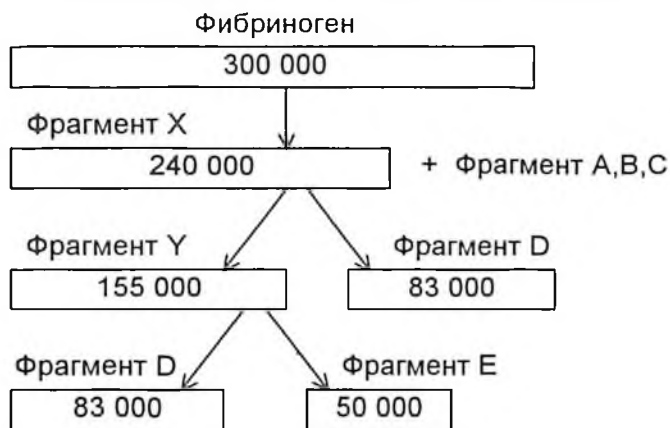
Эуглобулиновый лизис значительно ускоряется эндогенными и экзогенными активаторами фибринолиза. На этом основаны следующие пробы:

- Определение эуглобулинового лизиса в плазме до и после компрессии сосудов плеча 20 мин при давлении, равном диастолическому (проба И.А. Ойвина и С.И. Чекалиной, 1964), либо в течение 3 мин при давлении выше систолического на 10 мм рт.ст (проба В.П. Балуды и соавт., 1987). Пробы отражают поступление из стенок сосудов в кровь ТПА.
- Определение эуглобулинового лизиса после искусственной контактной активации фактора XII каолином. Тест отражает состояние фактора XIIIa-зависимого фибринолиза.
- Определение эуглобулинового лизиса после добавления в кровь (плазму) стрептокиназы и/или урокиназы (см. В.П. Балуда и др. 1980). Если лизис мало ускоряется, то это говорит о дефиците в исследуемой крови плазминогена. В последнем случае добавление к плазме больного нормальной свежемороженой плазмы или раствора плазминогена исправляет дефект лизиса.

Определение плазминогена может осуществляться также на хромогенных субстратах и иммуноферментной методикой. Несовпадение результатов этих тестов позволяет разграничивать дефицит и молекулярные аномалии плазминогена.

Активный плазмин вызывает последовательное асимметричное расщепление фибриногена и фибрина на все более и более мелкие фрагменты, обозначаемые как *продукты деградации фибриногена/фибрина* (ПДФг и ПДФн). Схемы на рис. 9 иллюстрируют эти процессы. Видно, что конечными продуктами расщепления фибриногена являются фрагменты D и E, причем первых вдвое больше, чем вторых. В отличие от этого, при расщеплении поперечно сшитых фактором XIIIa волокон фибрина образуются более крупные фрагменты - димеры D - D, тримеры D - E - D и др. Первые и вторые отличаются друг от друга по своим антигенным свойствам. Поэтому определяя с помощью специфических антител содержание в плазме фрагментов D и D-димеров, можно составить представление о том, в какой степени в исследуемой крови выражен фибринолиз и фибриногенолиз.

Повышенное содержание в плазме D-димера является одним из главных маркеров глобальной активации системы гемостаза, поскольку он отражает как образование фибрина в исследуемой крови



а

б

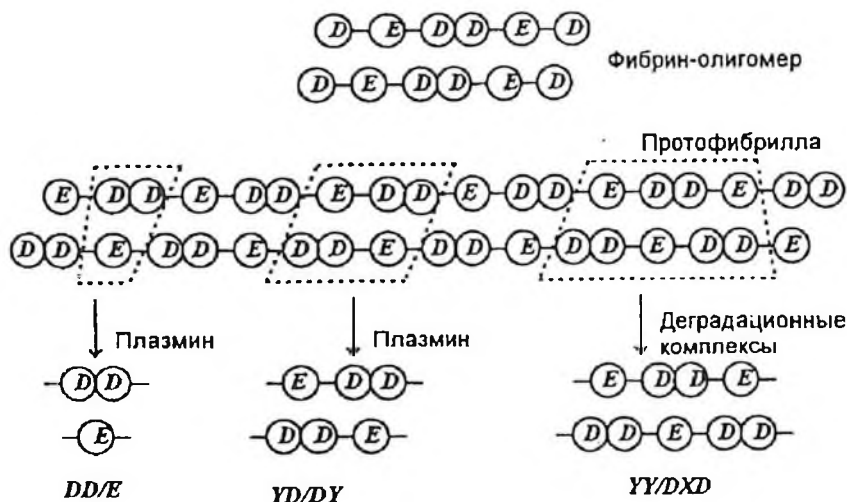


Рис.9. Схема расщепления плазмином фибриногена (а) и фибрина (б).

так и его лизис. Этот маркер является одним из наиболее надежных свидетелей появления тромбов в магистральных сосудах и тромбозмболий.

Таким образом, основными методами исследования плазминовой системы являются определения спонтанного и эуглобулинового лизиса, как в исходном состоянии, так и после стимуляции этого процесса компрессией сосудов, активацией фактора XII в эуглобулиновой фракции и добавлением стрептокиназы или урокиназы, а также определение концентрации в исследуемой плазме ПДФ, в том числе фрагментов D и D-димера.

Об ингибиторной активности судят по тормозящему действию малых количеств плазмы или сыворотки больного на эуглобулиновый лизис, используя для этого метод титрования.

Активность отдельных компонентов фибринолитической системы и ингибиторов оценивают также в тестах с хромогенными субстратами, чувствительными к плазмину и его активаторам, а содержания активаторов и ингибиторов этих компонентов - иммунологически.

1.6. МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

При обсуждении вопроса о том, какие именно признаки говорят о наличии у обследуемого внутрисосудистой активации системы гемостаза следует сразу же оговориться, что нельзя ставить знака равенства между понятиями "гиперкоагуляция" и "тромбофилическое состояние", поскольку очень многие тромбофилии протекают с нормальными или даже сниженными показаниями коагуляционных тестов (так называемые "гипокоагуляционные тромбофилии"), либо с такими нарушениями гемостаза, выявление которых требует использования специальных методик, не включаемых в общую коагулограмму. Так, например, с гипокоагуляцией протекают тромбофилии, обусловленные дефицитом фактора XII и плазменного прекалликрина, дисфибриногемиями, наличием в крови волчаночного антикоагулянта (антифосфолипидный синдром) и ряд других видов этой патологии. В связи с этим, в данном разделе руководства мы рассматриваем лишь те признаки, выявление которых говорит не столько о риске возникновения тромбоза, сколько о том, что у больного в момент обследования уже имеют место внутрисосудистое свертывание крови, агрегация тромбоцитов и тромбообразование. Выявление этих признаков свидетельствует о том, что у обследуемого больного уже реализуется формирование тромбов или диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (ДВС-синдром) и что имеется необходимость в купировании этих процессов. Эф

фективность и достаточность лечения оцениваются не только по клиническим признакам, но по динамике ишемических явлений в органах, по результатам инструментальных исследований (ЭКГ, дуплексное сканирование, магнитно-резонансная томография и др.) и по устранению тех маркеров активации системы гемостаза, которые были выявлены у больного до начала лечения.

В этом отношении исследование динамики признаков активации системы гемостаза приобретает важное клиническое значение. Оно ориентирует врача, в каком звене этой системы наиболее выражен тромбогенный сдвиг, какие методы лечения необходимы для устранения этого сдвига и, наконец, насколько правилен и эффективен выбранный лечащим врачом метод лечения. Учитывается, что при одних видах тромбозов и ишемий органов, как и при лежащих в их основе тромбофилий, преобладает активация тромбоцитарного гемостаза и тромбозы артерий, при других - нарушения коагуляционного гемостаза и венозные тромбозы, при третьих - как коагуляционные, так и тромбоцитарные нарушения

Соответственно и патоморфологически тромбы издавна подразделяются на белые (тромбоцитарные, гиалиновые), локализующиеся преимущественно в артериях, красные или коагуляционные, с преимущественно венозной локализацией, и смешанные - коагуляционно-тромбоцитарные (М. Ферстрате, Ж. Фермилен, 1986 и др.).

1.6.1. Маркеры активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза

Основными лабораторными маркерами повреждения эндотелия кровеносных сосудов до недавнего времени были:

- повышение содержания в плазме крови фактора Виллебранда, который определяют либо функциональным методом по изменению ристомицин-агрегации тромбоцитов, либо иммуноферментным тестом с помощью антител к фактору VIIIР:Аг (Б.Г. Топоров и др., 1990);
- снижение фибринолитического ответа на компрессию сосудов (пробы И.А. Ойвина и С.И. Чекалиной, 1964; В.П. Балуды и др., 1987, 1992; см. раздел 1.5);
- повышение содержания в плазме крови ингибиторов сосудистого активатора плазминогена PAI-1 и PAI-2 (см. раздел 1.5);
- дефицит метаболитов простаглицлина.

В последние годы к этим маркерам добавился еще один очень важный показатель. Оказалось, что при повреждениях эндотелия клеточные мембраны последнего теряют тромбомодулин - белок, связывающий и блокирующий свертывающее действие тромбина (см. раздел 1.4). В результате этого, повышается содержание свободного тромбомодулина в плазме и моче, что определяется иммунологически с помощью антитромбомодулинового моноклонального иммуноглобулина (Amano, Takeyama, Inaba et al., 1992; Karmochkine et al., 1992; Takahashi et al., 1992).

Маркерами активации тромбоцитарного гемостаза служат:

- повышение спонтанной агрегации тромбоцитов, определяемой либо по методике Wu, Ноак (1974), либо по методу Н.И. Тарасовой (см. раздел 2.4.1);
- повышение индуцированной агонистами агрегации тромбоцитов;
- повышение адгезивности и расплывания тромбоцитов на стекле, определяемое либо с помощью сканирующей электронной микроскопии, либо при исследовании в интерференционном контрасте по методу Номарского (Е.Ю. Васильева, 1983, 1992; Е.Ю. Васильева, И.А. Беспалько, 1986; Vasilieva et al., 1984 и др.);
- повышение концентрации в плазме крови компонентов α -гранул тромбоцитов - антигепаринового фактора (фактора 4) или β -тромбоглобулина;
- повышение выделения с мочой стабильного метаболита тромбоксана A_2 - тромбоксана B_2 ;
- укорочение продолжительности жизни аутологических меченых тромбоцитов в циркуляторном русле больного.

От активации тромбоцитарного гемостаза в значительной степени зависят показания современных аппаратных методов определения степени тромбогенного риска (см. раздел 2.2).

1.6.2. Маркеры активации свертывающей системы крови и фибринолиза

Активация свертывающей и фибринолитической системы крови в подавляющем большинстве случаев возникает сопряженно, в связи с чем в плазме крови одновременно возрастает как количество продуктов протеолиза факторов свертывания крови (например, фрагменты протромбина 1+2), так и комплексных соединений "тромбин-

антитромбин", "плазмин-антиплазмин", D-димер (см. раздел 1.4) и др. Однако при некоторых видах тромбофилий эта закономерность может нарушаться. Так, при некоторых дисфибриногемиях снижается образование в процессе свертывания и фибринолиза фибринопептидов и ПДФ, при дефиците и аномалиях плазменного антитромбина - комплексов "тромбин-антитромбин", при дефиците плазминогена - ПДФ и комплексов "плазмин-антиплазмин". Поэтому для выявления внутрисосудистой активации свертывающей и плазминовой систем следует пользоваться не одним, а несколькими маркерами.

Методы распознавания тромбинемии. Под влиянием тромбина от молекул фибриногена отщепляется фибринопептиды А и В, образуются ФМ и их олигомеры, обозначаемые как **растворимые фибрин-мономерные комплексы или растворимый фибрин (РФМК, РФ)**. Выявление в повышенном количестве этих компонентов в плазме крови используется для идентификации тромбинемии.

Фибринопептид А определяют иммунологически (Nossel et al., 1976; Koskum, 1976; Bick, 1985; Eisenberg et al., 1985 и др.), а ФМ - по их способности агглютинировать эритроциты или латексные частицы, нагруженные фибрин-мономерами, либо иммунологически, для чего выпускаются фирменные диагностические наборы.

Имеется ряд экспресс-методов определения повышенного содержания РФМК в плазме с помощью так называемых **"паракоагуляционных тестов"**. Наименее специфичен из этих тестов вышедший в настоящее время из употребления первый из них - определение так называемого «фибриногена В». Из других паракоагуляционных проб наиболее употребительны этаноловый и протаминсульфатный тесты (В.П. Балуда и др., 1980; Bick, 1985). При повышенном содержании РФМК в плазме последние определяются в первом из этих тестов по образованию геля в течение первых 10 мин после добавления 50% этанола, а во втором - образованием белкового преципитата в течение 2 мин после добавления протаминсульфата. По сравнению с этими двумя тестами более информативен и стандартизирован количественный метод определения РФМК с помощью орто-фенантролинового реагента (В.А. Елыкомов, А.П. Момот, 1985; З.С. Баркаган, 1988; В.Г. Лычев, 1993; А.П. Момот и др. 1996). У здоровых людей показания теста с орто-фенантролином составляет 30-40 мг/100 мл, а у больных с тромбозами и ДВС-синдромом они повышаются в 2,5-10 раз. Этой пробой удобно пользоваться для контроля за эффективностью антикоагу-

лянтной терапии. Общим недостатком приведенных тестов является то, что они могут давать ложно отрицательные результаты при глубокой гипофибриногенемии (например, в терминальной фазе острого ДВС синдрома) и ложно положительные результаты при значительной гиперфибриногенемии (выше 7,0 г/л). Поэтому при проведении этих тестов всегда следует одновременно определять содержание в плазме крови фибриногена.

ФМ может определяться количественно иммуноферментной методикой, для чего ФМ с новым антигенным маркером получают из фибрин-фибриногенового комплекса обработкой последнего тиоцианатом и затем используют для получения специфического моноклонального иммуноглобулина. Реагент используется для энзимоммунного определения ФМ. Для этого выпускаются специальные фирменные диагностические наборы (например, "Enzyman-Test FM" фирмы Boehringer Mannheim).

Признаком тромбинемии является также повышение содержания в плазме комплекса "тромбин-антитромбин". В таком комплексе образуется новый антигенный маркер, не свойственный ни тромбину, ни плазменному антитромбину. Определение этого маркера с помощью иммуноферментной методики позволяет количественно определять уровень комплекса "тромбин-антитромбин" в исследуемой плазме. Этот тест сложнее и менее информативен, чем другие методы выявления внутрисосудистой активации свертывающей системы крови (Das et al., 1995 и др.).

Методы выявления активации более ранних этапов свертывания крови. В эту группу входит большая группа маркеров, отражающих наличие в плазме активированных факторов свертывания (факторов VII, X и IX), образование комплексов некоторых из этих факторов с плазменным антитромбином, а также пептидов, которые в процессе протеолиза отщепляются от плазменных факторов свертывания (З.С. Баркаган и др., 1989; Boishlair et al., 1990; D. Berg, L.H. Berg, 1993; Eichinger et al., 1995; Philippou, Lane, 1996 и др.). Из этих методов чаще всего используются определения активированного фактора VII и фрагментов 1+2 протромбина (иммуноферментный тест).

Методы глобальной оценки активации свертывания крови и фибринолиза. Из этой группы методик наиболее информативными и доступными являются определения конечного продукта свертывания крови и фибринолиза - D-димера.

Иммуноферментное определение в плазме или в сыворотке крови D-димера в настоящее время признается одним из лучших скрининг-тестов, определяющих внутрисосудистое свертывание крови (Hunt et al., 1985; Gaffney et al., 1988; Bounameaux et al., 1991; Bounameaux, 1992; Leitha et al., 1991; De Moerloose et al., 1996). Тест используется как очень надежный маркер массивного тромбоза магистральных вен и тромбоэмболий, в том числе в бассейне легочной артерии, ДВС-синдрома и ряда других тромботических процессов, при которых уровень D-димера в плазме превышает в разных тест-системах 250 или 500 нг/мл. В поздние сроки беременности верхняя граница нормы находится на более высоком (примерно на 100 нг/мл) уровне. По снижению этого показателя судят об эффективности проводимой антитромботической терапии.

Легко выполним, но несколько менее надежен полуколичественный латекс-тест определения D-димера в плазме или сыворотке крови, для чего используются диагностикумы фирм Organon Teknica, bioMerieux и др. Выполняется этот тест на планшетах в течение 2-5 мин, что позволяет использовать его для экспресс-диагностики внутрисосудистого свертывания крови.

Контроль за фоновым состоянием системы гемостаза во время проведения гепаринотерапии. У больных с тромбоэмболиями часто приходится исследовать состояние свертывающей системы крови на фоне уже проводящегося лечения нефракционированным или низкомолекулярным гепарином. Определить в этих условиях потенциальную гиперкоагуляцию невозможно, поскольку она маскируется вводимым антикоагулянтом. Для преодоления этой лекарственной маскировки гиперкоагуляции исследование параметров коагулограммы (АПТВ, ПВ, ТВ) следует проводить после нейтрализации или сорбции гепаринов. Такие реагенты выпускаются некоторыми фирмами (Organon Teknica и др.), в том числе и отечественной фирмой Технология-Стандарт (А.П. Момот и др., 1995).

Инструментальные методы определения тромбогенного риска. В этих методиках используются специальные аппараты, которые автоматически регистрируют, как быстро obtурируются тромбами трубки или мембранные фильтры (нативные или покрытые коллагеном, либо коллагеном с адреналином или с АДФ) при пропуске через них исследуемой крови с определенной скоростью сдвига.

Один из таких современных аппаратов - анализатор PFA-100

(фирма Dade Behring) предназначен, в основном, для оценки состояния тромбоцитарного гемостаза и является усовершенствованной моделью ранее предложенного аппарата "Тромбостат 4000" (Mammen, Alohamer, 1995; Kundu et al., 1995). Он регистрирует закупорку апертур в мембранном фильтре, покрытом коллагеном с адреналином или коллагеном с АТФ при пропускании через него цитратной крови. У больных с дисфункцией тромбоцитов время протекания крови увеличено по сравнению с нормальными показателями, у больных с тромбозами - укорочено, но под влиянием аспирина, илопроста и других дезагрегантов оно увеличивается.

Более перспективным нам представляется анализатор тромбоцитарного статуса фирмы Montrose Diagnostics, Англия. В этом аппарате пределяется время закупорки капиллярной трубки в вакуумной системе при стандартизированном пропускании через нее крови исследуемого. В отличие от других систем, в данном аппарате исследуется нативная кровь, к которой не добавляется цитрат, и регистрируется образование тромба как с дополнительной стимуляцией процесса коллагеном, так и без нее. Аппарат позволяет оценивать степень тромбогенности исследуемой крови и состояние фибринолиза, влияние на эти процессы дезагрегантов, антикоагулянтов и тромболитиков (Gorog, Kovacs, 1995).

Не потерял своего значения и такой давно применяемый метод, как тромбозластография, хотя эта открытая система менее стандартизирована, оценивает процесс свертывания в неподвижной крови, не регулирует контактной активации процесса, требует большой затраты времени.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНОГО (ПЕРВИЧНОГО) ГЕМОСТАЗА

2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ (ЛОМКОСТИ) МИКРОСОСУДОВ

2.1.1. Манжеточная проба М.П. Кончаловского, Румпель-Леде

Принцип. Создают венозный стаз путем дозированного сжатия плеча манжетой от аппарата для измерения АД и подсчитывают число образовавшихся петехий в верхней части ладонной поверхности предплечья и локтевого сгиба. Если количество петехий превышает норму, то это говорит о снижении резистентности (повышенной ломкости) микрососудов.

Методика (вариант Borchgrevink, 1971)

Ход определения. На верхней части ладонной поверхности предплечья очерчивают круг диаметром 5 см. На плечо накладывают манжету от аппарата для измерения АД, соединяют ее с манометром и поддерживают в течение 5 мин давление на уровне 90 мм рт. ст. Затем манжету снимают и в течение 5 мин ждут восстановления кровообращения в конечности. После этого подсчитывают число петехий в очерченном круге. Учитывают и появление геморрагий вдоль нижнего края манжеты, которые в норме отсутствуют.

Чтение результатов. В норме число петехий у женщин не превышает 10, при 11-20 петехиях проба считается слабо положительной, при 20-30 петехиях - положительной, при 30 и более - резко положительной. У мужчин петехии в норме не возникают. Возможные причины положительной пробы: тромбоцитопения, тромбоцитопатии, гиповитаминоз С, болезнь Виллебранда, прием антикоагулянтов, гормональные сдвиги у женщин.

2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ КРОВОТЕЧЕНИЯ

2.2.1. Методика Дьюка (1910)

Принцип. Определяется длительность кровотечения из микрососудов кожи, после дозированного ее прокола обычным плоским ланцетом или специальным скарификатором с ограничителем глубины (3,5 мм).

Ход определения. Мочку уха согревают между пальцами в течение 1 мин, протирают спиртом и вновь согревают настольной лампой до полного высыхания спирта. Стерильным ланцетом производят прокол кожи у нижненаружного края мочки уха глубиной в 3,5 мм. Сразу же после прокола включают секундомер, растягивают края ранки не касаясь ее. Выступающие капли крови промокают через каждые 15-30 с фильтровальной бумагой, не прикасаясь ею к ранке. Секундомер останавливают в момент прекращения вытекания крови (мокнутие не учитывается). Для большей точности тест выполняется дважды на обеих мочках ушей.

Чтение результатов. Нормальное время кровотечения не превышает 4 мин. Первые пятна крови на бумаге малы (спазм сосудов), затем они увеличиваются, достигая максимума на 1-2 мин, после чего уменьшаются и исчезают. При резко выраженной тромбоцитопении и тяжелых формах качественной неполноценности тромбоцитов (тромбастения Гланцмана и др.) и, особенно, при болезни Виллебранда, время кровотечения резко удлиняется. Пятна крови достигают очень больших размеров, длительно не уменьшаются, либо волнообразно то уменьшаются, то спонтанно увеличиваются. При гемофилиях время кровотечения остается нормальным или удлиняется лишь слегка, поскольку остановка кровотечений в зоне микроциркуляции обеспечивается, в основном, тромбоцитами, а не свертыванием крови. Но при дефиците факторов протромбинового комплекса, лечении антикоагулянтами и ДВС-синдроме время кровотечения удлиняется.

Следует учитывать, что метод Дьюка недостаточно чувствителен и нередко дает ошибочные результаты (из-за раннего склеивания краев ранки и других причин). При многих тромбоцитопатиях его показания не нарушаются. Поэтому в настоящее время чаще пользуются более чувствительными методами Айви или Борхгревинка-Ваалера.

2.2.2. Методика Борхгревинка-Ваалера (1958)

Принцип. Определяют время и объем кровотечения из поверхностных поперечных насечек кожи (длиной 5-8 мм и глубиной 1 мм) на ладонной поверхности верхней части предплечья в условиях венозного стаза (40 мм рт. ст.).

Ход определения. На плечо накладывают манжету сфигмоманометра и поддерживают в ней давление в 40 мм рт. ст. После обработки кожи спиртом, скарификатором (лезвием, выдвинутым на 1 мм) производят на натянутой коже ладонной поверхности предплечья поперечные надрезы (длина 5-8 мм). Надрезы производят быстро, резким движением. Немедленно включают секундомер. Появляющиеся из ранок капли крови промокают фильтровальной бумагой (не прикасаясь к самой ранке) через каждые 15-30 с. Регистрируют величину и динамику образования пятен крови, время остановки кровотечения.

Чтение результатов. У здоровых людей время кровотечения в тесте обычно не превышает 10 мин (в каждой лаборатории должны устанавливаться свои нормы, так как показания данного теста зависят от конструкции используемого скарификатора и техники нанесения надреза). Учитывают совпадение результатов определений в 2-3 разрезах, ориентируются на максимальный показатель. Причины повышения кровоточивости те же, что и в пробе Дьюка. Тест более чувствителен, чем проба Дьюка, но травматичен.

2.2.3. Метод Айви (1941)

Сходен с методом Борхгревинка-Ваалера, но менее травматичен. Определяют на фоне венозного стаза (манжета, 40 мм рт. ст.) время кровотечения из поперечных проколов кожи скарификатором для взятия крови на ладонной поверхности верхней части предплечья. Для большей точности делают 2-3 прокола. В норме время кровотечения не превышает 5-8 мин. Причины удлинения и увеличения кровоточивости те же, что и в других методах.

2.2.4. Метод А.С.Шитиковой (1975)¹

Принципиально тот же, что и метод Айви, но прокол кожи делается в области концевой фаланги пальца. Учитывают не только время кровотечения, но и объем вытекшей крови (для чего палец погружают в стаканчик с определенным объемом воды, а затем фотометрируют ее, определяя степень окраски воды кровью).

Ход определения. В две пластиковые бакпечатки разового пользования вносят по 5 мл стерильного физиологического (0,9%) раствора хлорида натрия. На плечо накладывают манжету сфигноманометра и поддерживают в ней давление (на протяжении всего времени исследования) 40 мм рт. ст. Обрабатывают спиртом концевую фалангу III или IV пальца, производят укол скарификатором в подушечку концевой фаланги на глубину 3,5 мм и одновременно включают секундомер. Уколотый кончик пальца погружают в верхнюю часть физиологического раствора, наблюдают за вытекающей кровью и в момент полного прекращения кровотечения выключают секундомер. Измерение производят дважды, учитывается наибольшая величина времени кровотечения.

В норме время кровотечения не более 3,5 мин (у мужчин - 70-196 с, у женщин - 87-208 с).

Аппаратные методы

В связи с тем, что определение времени кровотечения *in vivo* недостаточно стандартизировано и выявляет лишь наиболее значительные нарушения микроциркуляторного гемостаза, предложен ряд приборов для учета этого параметра *in vitro*. Чаще других для этого используется фильтрометр PFt-100 фирмы Dade Behring в котором регистрируется скорость блокады микрофильтра агрегатами тромбоцитов при стандартизованном пропускании через него исследуемой крови. Прибор дорог и пока редко используется диагностическими лабораториями.

¹ А.С. Шитикова. Лаборат. дело, 1975. - № 10. - С. 597-602.

2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ТРОМБОЦИТОВ В КРОВИ

2.3.1. Микроскопический метод подсчета

Чаще всего используется метод подсчета тромбоцитов в счетной камере Горяева микроскопией при фазовом контрасте, т.е. с фазовоконтрастной приставкой. Мало точен и не может быть рекомендован метод подсчета тромбоцитов в мазке крови.

В настоящее время все шире используются определение количества тромбоцитов и их распределение по величине (гистограмма) с помощью автоматических счетчиков крови. Эти аппараты точны и позволяют проводить экспресс-диагностику (определения выполняются за 1 мин).

Принцип. Производится подсчет тромбоцитов в камере Горяева с применением в качестве разводящей и гемолизирующей жидкости раствора оксалата аммония. При подсчете используют фазовоконтрастную микроскопию.

Реактивы. 1% раствор оксалата аммония.

Ход определения. Исследование можно проводить как в крови, полученной из пальца, так и в стабилизированной цитратом венозной крови. В последнем случае полученный при подсчете результат умножают на коэффициент 1,1 (учитывают разведение венозной крови раствором цитрата натрия - 9:1).

Разведение крови. Самым удобным и достаточно точным является способ разведения крови в пробирках (не в меланжере). Для этого, в предварительно высушенную чистую силиконированную или пластиковую (полистирол) пробирку пипеткой отмеривают 1,98 мл 1% оксалата аммония и осторожно вносят в нее 0,02 мл крови. В течение 1-2 мин содержимое пробирки тщательно перемешивают без вспенивания. Заполняют две камеры Горяева и на 10-15 мин помещают их для оседания тромбоцитов во влажную камеру (чашку Петри со смоченной фильтровальной бумагой или марлей). В каждой камере подсчитывают тромбоциты в 25 больших квадратах.

Фазовоконтрастная микроскопия проводится при помощи обычного микроскопа, осветителя типа ОИ-19 (или аналогичного) и устройства для наблюдения методом фазового контраста КФ-1 или КФ-4.

Подготовка микроскопа. После установки на микроскопе фазовых объективов и фазового конденсора производят фокусировку

объективов 40х на сетке камеры Горяева. Устанавливают освещение и центрируют изображение фазовой пластинки и кольцевой диафрагмы. Микроскопию проводят с зеленым светофильтром. При работе с фазово-контрастной установкой необходимо пользоваться камерами одного типа, так как фокусировка оптических систем зависит от толщины стекла камеры.

Расчет определения числа тромбоцитов в 1 мкл крови. Среднюю арифметическую величину из двух параллельных определений умножают на 1000 (площадь 25 больших квадратов - 1 мм^2 , высота камеры - 0,1 мм, разведение 1:100; следовательно, количество тромбоцитов должно быть умножено на $1 \times 10 \times 100 = 1000$).

Нормальные пределы колебаний числа тромбоцитов в крови у человека составляют от 170 до $350 \times 10^9/\text{л}$. Ошибка метода $\pm 6,5\%$.

Подсчет тромбоцитов в крови и определение их размера в мазке - важная часть диагностики тромбоцитопений, эссенциальной и полицитемической тромбоцитемии, ДВС-синдрома, тромботической тромбоцитопенической пурпуры и других микротромбоваскулитов, нарушений гемостаза при аутоиммунных формах патологии (СКВ, антифосфолипидном синдроме и др.) и при гепатолиенальном синдроме. При наследственных тромбоцитопатиях наблюдаются формы с микроцитозом (*синдром Вискотта-Олдрича*) и преобладанием гигантских форм кровяных пластинок (*аномалии Бернара-Сулье и Мей-Хегглина*), а также формы без изменения размеров этих клеточных элементов.

2.3.2. Определение количества и размера тромбоцитов с помощью автоматических счетчиков крови

Для этих исследований пригодны любые автоматические счетчики крови - от простейших 9-18-параметровых до высоко технологичных.

В лабораториях авторов высокую информативность и точность показали счетчики фирмы Hoffmann - La Roche, Abbott, Highsell. Во всех случаях кровь стабилизируется в пластиковых пробирках с помощью ЭДТА (трилона Б).

2.4. ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Принцип. Исследуется процесс агрегации в богатой тромбоцитами плазме с добавлением или без добавления индукторов агрегации. В качестве индукторов агрегации используются АДФ, адреналин, коллаген, тромбин, ристомин, арахидоновая кислота и ряд других агентов.

Классическая методика Born основана на фотометрической регистрации процесса агрегации по падению оптической плотности плазмы при соблюдении определенного температурного режима и стандартного перемешивания. Используются различные варианты специальных приборов - агрегометров, для плазмы, соединенные с компьютером и принтером. В последние годы нашли также применение агрегометры, основанные на кондуктометрическом и иных принципах регистрации процесса склеивания тромбоцитов между собой, пригодные для исследования цельной крови.

2.4.1. Спонтанная агрегация тромбоцитов

Существующая методика определения спонтанной агрегации по Wu et Hoak (1974) требует проведения незамедлительной обработки крови при ее заборе, что создает определенные трудности в ее выполнении. Далее приводится простой способ количественной оценки спонтанной агрегации тромбоцитов крови, стабилизированной цитратом натрия в условиях турбулентности¹.

Для взятия крови и ее обработки используются силиконированные или пластиковые (полистирол) пробирки и пипетки. Исследование стабилизированной крови проводится не позднее, чем через 90 мин после забора крови. Для удаления агрегатов используется отстаивание.

Принцип. Спонтанная агрегация оценивается по разнице в числе тромбоцитов в надсадочной части стабилизированной крови после ее встряхивания и последующей фиксации агрегатов тромбоцитов раствором формалина в сравнении с такой же кровью без встряхивания и фиксации.

¹ Тарасова Н.И. В сб. Тромбообразование и патология гемостаза -Томск, 1982. - С. 111-113.

Реактивы. 1. 1% раствор формалина в физиологическом (0,9% растворе) хлорида натрия.

2. 1% раствор оксалата аммония.

Материал для исследования. Цитратная венозная кровь.

Ход определения. В каждую из 2 чистых пробирок вносят по 0,5 мл крови, одна из пробирок встряхивается (на встряхивателе АБУ-1, шейкере S-3 или др.) с частотой 90-100 раз в мин в течение 3 мин. Затем в эту же пробирку добавляют 1,0 мл 1% раствор формалина на физиологическом растворе для фиксации агрегатов. В другую пробирку к 0,5 мл крови добавляют 1,0 мл физиологического раствора хлорида натрия, все тщательно перемешивают и после 25-30-минутного отстаивания подсчитывается количество оставшихся в супернатанте и не осевших в виде агрегатов тромбоцитов.

Для подсчета количества тромбоцитов смешивают 1,98 мл 1% оксалата аммония и 0,02 мл супернатанта (см. раздел 2.3.1), хорошо перемешивают без вспенивания и подсчитывают количество тромбоцитов при фазовом контрасте в двух камерах Горяева (после отстаивания внесенной в них разведенной крови в течение 15-20 мин) в 25 больших квадратах. Расчет спонтанной агрегации тромбоцитов проводят по формуле:

$$\frac{A - B}{A} \times 100.$$

где А - количество тромбоцитов в крови без встряхивания, В - количество тромбоцитов в крови после встряхивания.

Чтение результатов. В норме спонтанная агрегация тромбоцитов в среднем составляет $12,1 \pm 1,4\%$ и не превышает 20%. Ошибка метода равняется $\pm 8\%$, при увеличении числа считаемых квадратов с 50 до 100 последняя снижается до $\pm 3\%$.

Значительное повышение спонтанной агрегации (более 20%) наблюдается у больных с склонностью к тромбозам и инфарктам органов, при облитерирующих заболеваниях артерий, ИБС, тромбозм болиях, связанных с гиперагрегацией тромбоцитов, при тромбофилиях и при большинстве форм ДВС-синдрома, а также при тромбоцитической тромбоцитопенической пурпуре, гемолитико-уремическом синдроме, микроангиопатиях и других видах склонности к тромбозам.

2.4.2. Исследование индуцированной агрегации тромбоцитов

Исследование агрегационной функции тромбоцитов может проводиться визуально, что при достаточной натренированности дает ориентировочную информацию, а также с помощью специальных приборов - агрегометров. Последние подразделяются на оптические (турбидиметрические), регистрирующие агрегацию в богатой тромбоцитами плазме по изменению ее оптической плотности, кондуктометрические, определяющие агрегацию в цельной крови по изменению электропроводности (метод менее стабилен, дает много случайных отклонений) и с помощью люми-агрегометров, позволяющих регистрировать не только процесс агрегации, но и реакцию освобождения из тромбоцитов АДФ, для чего в среду вводят реагирующий с АДФ люциферин-люциферазный реагент (фирмы Sigma или др.). Исследования выполняются на агрегометрах разных конструкций (фирм Chrono-log, Helena Laboratories), в том числе и отечественных (фирмы Биола, Москва и др.).

К ориентировочным (скрининговым) могут быть отнесены два визуальных метода: 1) гемолизат-агрегационный тест по Л.З. Баркагану и соавт. (1983), в котором определяется агрегация в богатой тромбоцитами плазме после добавления к ней разных количеств гемолизата собственных отмытых эритроцитов, являющихся источником АДФ и других стимуляторов агрегации; 2) визуальный метод А.С. Шитиковой (1984), в котором оценивается агрегация в богатой тромбоцитами цитратной плазме после добавления АДФ, коллагена, норадреналина и других агонистов (соотношение крови и 3,8% раствора цитрата натрия 4 : 1). В нашей лаборатории в ряде случаев применяется вариант последней методики, описание которой приведено ниже.

Однако большие преимущества имеет графическая регистрация процесса на агрегометре. В качестве индукторов агрегации (агонистов) используют АДФ в разной концентрации, адреналин, коллаген, арахидоновую кислоту, тромбин и ристомицин. Основными являются определения АДФ-, адреналин-, коллаген- и ристомицин-агрегации. При использовании низких концентраций агонистов определяется тот минимальный их порог, на который реагируют исследуемые тромбоциты. Чем этот порог ниже, тем меньше антиагре-

гационный потенциал исследуемой системы и тем значительнее наклонность тромбоцитов к тромбообразованию. Кроме того, при использовании низких концентраций агонистов часто разделяются первая и вторая волны агрегации, причем вторая волна оценивает реакцию высвобождения эндогенных стимуляторов процесса - выход компонентов плотных и α -гранул, образование тромбосана A_2 . Даже в том случае, когда вторая волна четко не регистрируется (что отчасти зависит от чувствительности прибора), наступление ранней дезагрегации свидетельствует, что процесс не поддерживается эндогенными агонистами, что связано либо с их малым содержанием в тромбоцитах (отсутствием гранул, нарушением образования простагландинов), либо с нарушением реакции высвобождения.

Важное значение имеет изучение агглютинации тромбоцитов под влиянием антибиотика ристоцетина (ристомидина). Этот процесс идет только при наличии в плазме кофактора процесса - фактора Виллебранда (VIII:ФВ), а в тромбоцитах - рецепторов к нему. Под влиянием ристомидина агглютинируют не только живые, но и формализированные тромбоциты, которые не способны реагировать на действие всех других агонистов агрегации. Этим пользуются для количественной оценки содержания и активности VIII:ФВ в плазме больного - определяют агглютинацию формализированных донорских тромбоцитов в разных разведениях плазмы больного (раздел 2.5.). Этот метод очень важен, т.к. необходим для диагностики одного из самых распространенных геморрагических диатезов - болезни Виллебранда.

2.4.2.1. Подбор доз агрегирующих агентов

При использовании различных аппаратов и реактивов для изучения агрегации тромбоцитов следует стандартизировать условия выполнения методики, осуществлять подбор доз агрегирующих агентов, вызывающих максимальную, необратимую двухволновую и пороговую агрегацию. Вторая волна при слабой стимуляции характеризует "реакцию высвобождения", что особенно важно для диагностики тромбоцитопатий, обусловленных отсутствием плотных и α -гранул, либо нарушением реакции высвобождения.

В табл. 8 приведены конечные концентрации разных агрегирующих агентов, в пределах которых целесообразно проводить исследова-

дование (по рекомендации Британской рабочей группы по гемостазу и тромбозам (J. Clin. Pathol. - 1988. - Vol. 41, N 12. - P. 1322-1330). Конкретный подбор необходимых доз агонистов агрегации производится с учетом задач исследования и свойств препаратов, выпускаемых разными фирмами.

Таблица 8

Пределы конечных концентраций стимуляторов агрегации тромбоцитов

Агенты, вызывающие агрегацию	Обычно используемые конечные концентрации
АДФ динатриевая соль (молекулярная масса 471,2)	0,5-10,0 μ M
Адреналин/эпинефрин (молекулярная масса 183,2)	1,0-10,0 μ M
Коллаген	1,0 - 4,0 мг/мл
Арахидоновая кислота (молекулярная масса 304,5)	1,0-2,0 μ M
Тромбин	0,1-0,5 ед/мл
Ристоцетин (ристомин)	0,5-1,2 мг/мл

При отсутствии агрегометра и для первичного скрининга можно использовать следующие простейшие визуальные методики.

2.4.2.2. Гемолизат-агрегационный тест (ГАТ)¹

Принцип. Гемолизат эритроцитов является специфическим "естественным" индуктором агрегации тромбоцитов. В тесте определяют время появления видимых агрегатов тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме после добавления к ней гемолизата в различных концентрациях. Можно производить графическую запись на агрегометре любого типа.

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия.

2. Гемолизат эритроцитов.

3. Физиологический (0,9%) раствор хлорида натрия.

Ход определения. Кровь набирают в силиконированную пробирку, смешивают с цитратом, и отделяют богатую тромбоцитами

¹ Баркаган Л.З., Архипов Б.Ф., Кучерский В.М. Лаборат. дело, 1986. - № 3. - С. 138-142.

плазму, а осадок эритроцитов отмывают дважды 0,9% раствором хлорида натрия в соотношении объемов 1:1, центрифугируя каждый раз 10 мин при 1500 об/мин. После удаления физиологического раствора 0,1 мл отмытых эритроцитов гемолизируют в 1 мл дистиллированной воды. Это разведение является маточным и обозначается как 10^{-1} . Затем из него последовательными разведениями готовят растворы гемолизата от 10^{-2} до 10^{-6} , для чего 0,1 мл каждого предыдущего раствора вносят в заранее приготовленные пробирки с 1,0 мл дистиллированной воды. Рабочими являются растворы 10^{-2} (максимальная доза гемолизата) и 10^{-6} (субпороговая или минимальная доза). Исследуемую богатую тромбоцитами плазму разливают по 0,2 мл в две пробирки. После прогревания образцов в течение 1 мин при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в микротермостате в плазму добавляют 0,05 мл каждого из растворов гемолизата. Немедленно включают секундомер и при постоянном покачивании (важное условие) определяют появление видимых в проходящем свете первых (пылевидных) агрегатов тромбоцитов. Определяют время появления этих агрегатов. Затем отмечают, образуются или нет крупные агрегаты - "хлопья".

Чтение результатов. Показания теста выражают в секундах. При нормальном количестве тромбоцитов время агрегации (ВА) отражает их функциональную активность. Однако, как и при всех других способах регистрации, показания теста существенно зависят от содержания тромбоцитов в плазме. В связи с этим, для правильной оценки необходим пересчет на агрегационную активность одного тромбоцита (ААТ) по формуле:

$$\text{ААТ, \%} = \text{К} / \text{Б} \times 100 \quad ,$$

где К - нормальное количество тромбоцитов, соответствующее полученному времени агрегации (определяется по табл. 9), Б - истинное количество тромбоцитов в исследуемой плазме (подсчитывается в камере Горяева).

Степень активности тромбоцитов в ГАТ оценивают по индексу их активации (ИАТ) по формуле:

$$\text{ИАТ} = \text{К}_c / \text{К}_m \quad ,$$

где K_c - нормальное количество тромбоцитов, соответствующее времени агрегации при использовании субпороговой дозы гемолизата (см. табл. 9), K_m - аналогичный показатель для теста с максимальной дозой гемолизата.

Таблица 9

Зависимость времени агрегации в ГАТ от количества тромбоцитов ($TP \times 10^9/l$) в плазме - нормативные показатели

ВА, с	TP	ВА, с	TP	ВА, с	TP
ГАТ с максимальной дозой гемолизата (разведение 10^{-2})					
6	1850	16	540	33	225
7	1500	17	510	34	220
8	1300	20	420	35	205
9	1100	21	390	36	205
10	1000	22	370	37	192
11	920	28	280	38	184
12	790	29	265	39	176
13	720	30	260	40	167
14	650	31	240	41	160
15	600	32	235		
ГАТ с субпороговой дозой гемолизата (разведение 10^{-5})					
15	2200	33	1000	51	580
16	2100	34	970	52	570
17	2050	35	940	53	560
18	1950	36	900	54	550
19	1900	37	880	55	540
20	1850	38	850	56	525
21	1750	39	820	57	515
22	1650	40	800	58	495
23	1600	41	780	59	485
24	1500	42	750	60	475
25	1400	43	730	65	440
26	1350	44	710	70	400
27	1300	45	690	75	370
28	1225	46	670		
29	1175	47	650		
30	1125	48	630		
31	1100	49	620		
32	1050	50	600		

Пример расчета ААТ и ИАТ: время агрегации в ГАТ при добавлении максимальной дозы гемолизата - 40 с, а субпороговой - 150 с.

Количество тромбоцитов в исследуемой плазме равно $360 \times 10^9/\text{л}$. По табл. 9 находим значения K_m и K_c для полученных сроков наступления агрегации.

Она равна соответственно для 40 с - $167 \times 10^9/\text{л}$ (по ГАТ для максимальной дозы гемолизата) и для 150 с - $135 \times 10^9/\text{л}$ (по ГАТ для минимальной дозы гемолизата (AAT_m)) составит: $AAT_m = 167/360 \times 100 = 46,4\%$.

Для субпороговой дозы гемолизата $AAT_c = 135/360 \times 100 = 37,5\%$.

Индекс активации тромбоцитов в данном примере равен:

$$ИАТ = 135/167 = 0,8.$$

Вариант методики. Процесс агрегации хорошо регистрируется также графически на агрегометре любой конструкции. При индукции агрегации разведением гемолизата 10^{-5} в норме отчетливо регистрируется первая и вторая волны агрегации, что соответствует при визуальном наблюдении появлению сначала пылевидных, а затем агрегатов - хлопьев. При индукции агрегации разведением гемолизата 10^{-2} в норме отчетливо регистрируется только одна волна агрегации, что соответствует появлению пылевидных агрегатов.

Нормативные показатели. Время агрегации при использовании максимальной дозы гемолизата равно в среднем $13,8 \pm 0,5$ с (пределы нормальных показателей 11-17 с); для субпороговой дозы гемолизата - $46,8 \pm 3,4$ с (пределы нормы 40-54 с). Норма AAT_m и AAT_c - $100,0 \pm 2,4\%$ (пределы нормы 80-120%); ИАТ - $0,99 \pm 0,03$ (пределы нормальных колебаний 0,82-1,17).

Чтение результатов. Снижение показателей ГАТ наблюдается при первичных и симптоматических (вторичных) дизагрегационных тромбоцитопатиях, в том числе при формах с нарушением "реакции высвобождения" или "нарушенным пулом хранения". В последнем случае значительно снижается ИАТ. Гиперагрегация характерна для ряда предтромботических состояний, тромбозов, инфарктов органов, васкулитов, атеросклероза.

2.4.2.3. Экспресс-метод визуальной оценки агрегации тромбоцитов (А.С. Шитикова, 1984)

Принцип. При добавлении агрегирующих агентов к богатой тромбоцитами плазме и перемешивании ее развивается агрегация тромбоцитов. Появляющиеся агрегаты в определенный период достигают достаточно больших размеров и могут быть видны невоору-

женным глазом в виде беловатых крупинок. По мере продолжения процесса и увеличения размеров агрегатов отмечается и просветление плазмы - феномен "снежной бури", который развивается в одно и то же время при стандартной оптимальной дозе индуктора агрегации и определенном количестве функционально полноценных тромбоцитов. Снижение агрегирующей активности тромбоцитов сопровождается задержкой времени агрегации, а при их активации "снежная буря" регистрируется раньше, чем у здоровых людей.

Сущность метода состоит в том, что полученную в условиях силиконирования венозную кровь стабилизируют двойным объемом 3,8% раствора цитрата натрия (соотношение: 2,4 мл крови + 0,6 мл стабилизатора), центрифугируют 10 мин при 150g, после чего полученную богатую тромбоцитами плазму наносят по 0,02 мл на предметное стекло и смешивают с таким же объемом агрегирующих агентов - АДФ, тромбином, коллагеном, адреналином, ристомицином. Конечные концентрации агрегирующих агентов в исследуемой плазме должны составлять: АДФ - $0,5 \times 10^{-4}$ М, адреналина (норадреналина) - 0,015%, тромбина - 0,125 ед/мл, ристомицина - 0,8 мг/мл, концентрацию коллагена подбирают опытным путем. Возможно использование как более низких, так и более высоких концентраций агрегирующих агентов.

Смесь богатой тромбоцитами плазмы и агрегирующего агента перемешивают стеклянной палочкой так, чтобы жидкость занимала окружность, примерно, в 2 см. При покачивании круговыми движениями на темном фоне с помощью лупы регистрируют время появления агрегатов в виде "снежной бури". При оценке результата учитывают то, что время агрегации нормальных тромбоцитов зависит от их числа в плазме (табл. 10).

В Алтайском Федеральном академическом центре по патологии системы гемостаза для скрининга применяется следующая модификация выше приведенных способов.

Материал для исследования. Цитратная богатая тромбоцитами плазма крови (см. раздел 11.1.2).

Реактивы. 1. Раствор АДФ (5,0 μ М) или гемолизата эритроцитов (разведение 10-2; см. выше). Может использоваться точно дозируемый в лунках планшета гемолизат из диагностикума "Агрескрин-тест" фирмы Технология-Стандарт.

2. Раствор ристомицина 15 мг/мл.

Ход определения. На обезжиренное сухое предметное стекло наносят 0,1 мл плазмы и 0,1 мл раствора индуктора агрегации.

Таблица 10

Пределы нормальных колебаний времени визуальной агрегации тромбоцитов при различном их содержании в плазме здоровых людей (по А.С. Шитиковой)

Индукторы агрегации, конечная концентрация	Число тромбоцитов в плазме ($\times 10^9/\text{л}$)					Относительная агрегационная активность, %
	400	300	200	100	50	
	Время агрегации, с					
АДФ ($0,5 \times 10^{-4}$ М)	27-37	30-43	37-50	45-62	62-75	86-119
Суспензия коллагена	26-34	27-35	27-36	32-37	35-39	87-117
Ристомицин (0,8 мг/мл)	27-37	31-41	38-50	47-63	56-74	87-117
Норадренолин (0,015%)	74-93	81-95	82-102	-	-	91-111
Тромбин (0,125 ед/мл)	40-52	44-55	48-59	65-85	79-106	89-114

Стеклопалочкой смешивают капли, тотчас включают секундомер. При покачивании стекла в отраженном свете (обязательно использование подсветки для микроскопа типа ОИ-19) визуально учитывают время в секундах от момента смешивания реагентов до агрегации и просветления плазмы (феномена "снежной бури").

Параллельно проводят определение с контрольной нормальной богатой тромбоцитами плазмой.

Чтение результатов. Результат учитывают в секундах. В норме время агрегации с АДФ (или гемолизатом) и ристомицином составляет от 14 до 18 с (табл. 11). Удлинение времени агрегации с АДФ и слабая выраженность процесса (мелкие пылевидные агрегаты) при нормальной ристомицин-агглютинации говорит о наличии дисфункции тромбоцитов, а более быстрое образование крупных агрегатов - о повышенной функции кровяных пластинок. Отсутствие или ослабление ристомицин-агглютинации при нормальной реакции на АДФ (или гемолизат эритроцитов) свидетельствует о возможности болезни или синдрома Виллебранда, реже - аномалии Бернара-Сулье. Нарушение обоих видов агрегации наблюдается при уремии.

Следует учитывать, что все визуальные методы не могут заменить оценки функции тромбоцитов на агрегометре и должны оцениваться лишь как ориентировочные качественные методы.

Таблица 11

Оценка результатов при проведении скрининга на богатой тромбоцитами плазме

Варианты заключения	Время агрегации с АДФ и ристомицином							
	<14 с		14-18 с		19-26 с		>26 с	
	АДФ	Рист	АДФ	Рист	АДФ	Рист	АДФ	Рист
1. Норма			x	x				
2. Качественные нарушения								
А. Гиперагрегация тромбоцитов	x	x						
Б. Тромбоцитопатия со снижением функции тромбоцитов:								
- дизагрегационные				x	x		x	
3. Подозрение на болезнь Виллебранда	x		x			x		x

Примечание. Анализ можно выполнять при количестве тромбоцитов в крови в диапазоне от 150 до 400 × 10⁹/л.

2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА

2.5.1. Вариант определения активности на фотоэлектроколориметре

Принцип. Метод основан на определении влияния фактора Виллебранда (ФВ), содержащегося в исследуемой плазме, на ристоцетин-агрегацию фиксированных формалином тромбоцитов, полученных от здоровых людей. Обработанные раствором формалина тромбоциты сохраняют способность к ристоцетин-агрегации, но не могут агрегировать спонтанно, а также под воздействием известных других индукторов агрегации (АДФ, адреналина, коллагена и др.).

Определения могут быть выполнены на фотоэлектроколориметре или на агрегометре. Мануальные варианты с оценкой агглютинации фиксированных тромбоцитов на стекле (предметном, в пробирке) мало пригодны, так как имеют низкую точность определений.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма крови.

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия.

2. 0,2% раствор динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в 0,9% растворе хлористого натрия (рН 6,4).

3. Фиксирующий раствор: 20 мл свежеприготовленного 40% раствора формалина растворяют в 1000 мл буфера, содержащего 0,2 г динатриевой соли ЭДТА, 9,0 г хлорида натрия, 0,5 г однозамещенного фосфорнокислого калия, 1,1 г двухзамещенного фосфорнокислого натрия (рН 6,4).

4. Отмывочный раствор: соединяют один объем 3,8% цитрата натрия и пять объемов 0,9% хлористого натрия (рН 6,4).

5. Суспендирующий раствор готовится из тех же компонентов, что и отмывочный, но рН доводится до 7,4.

6. Раствор для хранения тромбоцитов: 1,1 г уксуснокислого натрия, 0,2 г динатриевой соли ЭДТА, 9,0 г хлористого натрия растворяют в 1000 мл дистиллированной воды (рН 6,4).

7. Раствор ристомицина: 6 мг ристомицина (продуцент актиномицета *Nocardia lurida*) растворяют в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия (готовится непосредственно перед определениями).

Приготовление фиксированных тромбоцитов. Кровь забирают от 6-10 здоровых людей в силиконированную посуду с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия. Соотношение объемов крови и раствора цитрата - 9:1. Затем кровь центрифугируют при 1500 об/мин (240 г) в течение 6 мин, получают плазму, богатую тромбоцитами. Плазму выдерживают при комнатной температуре (+18...+25°C) в течение 1 часа и еще 1 час при температуре +37°C. Затем ее смешивают с раствором динатриевой соли ЭДТА в соотношении 9:1 и через 2 мин добавляют равный объем **фиксирующего раствора**. Смесь выдерживают при температуре +2...+8°C в течение 1 часа, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость сливают, а тромбоциты ресуспендируют в **отмывочном** растворе в объеме, равном 1/4 объема первоначально взятой плазмы. Ресуспензированные тромбоциты оставляют на 1 час при температуре +2...+8°C. После этого взвесь тром-

боцитов центрифугируют при 1500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают, тромбоциты ресуспендируют в *растворе для хранения* в объеме, равном 1/4 объема первоначально взятой плазмы. Приготовленную таким образом взвесь тромбоцитов разливают по 1,0 мл в силиконированные пробирки и немедленно замораживают при температуре -16...-20°C. При этом тромбоциты могут храниться длительное время (1-2 мес.) без существенного изменения их способности к агглютинации.

Примечание. Фирмой Технология-Стандарт поставляются готовые к применению лиофильно высушенные фиксированные тромбоциты, ристомицин и контрольная плазма, с известным содержанием ФВ.

Ход определения. Фиксированные тромбоциты размораживают, центрифугируют при 1500 об/мин (240 g) в течение 20 мин, надосадочную жидкость сливают, тромбоциты ресуспендируют в 1,0 мл *суспендирующего раствора* (до оптической плотности 1,0). Оптическую плотность измеряют на фотозлектроколориметре при зеленом светофильтре (640 нм) в кювете на 2 мл.

К 1,0 мл приготовленной таким образом рабочей взвеси тромбоцитов добавляют 0,6 мл физиологического (0,9%) раствора хлорида натрия, 0,2 мл разведенной в два раза физиологическим раствором хлорида натрия исследуемой бедной тромбоцитами плазмы и 0,2 мл раствора ристомицина. Регистрируется оптическая плотность (ОП₁), затем смесь переливают в кювету на 5 мл и перемешивают в течение 2 мин с помощью магнитной мешалки. Вновь переносят в кювету на 2 мл и повторно измеряют оптическую плотность (ОП₂). Вычисляют индекс агглютинации (ИА):

$$ИА = \frac{ОП_1 - ОП_2}{ОП_1}$$

Интенсивность перемешивания эмпирически подбирают так, чтобы в контроле концентрация тромбоцитов и ОП₁ была в пределах 0,7-0,8, а ОП₂ - 0,3-0,4.

Активность ФВ (в %) определяют по калибровочной кривой. Если в ходе исследования получены результаты, выходящие за пределы калибровочного графика, то исследуемую плазму перед определением разводят в два раза физиологическим (0,9%) раствором хлорида натрия, а найденное значение ФВ (по калибровочному графику) умножают на 2.

Построение калибровочной кривой. Готовится смесь из 10 образцов нормальной бедной тромбоцитами плазмы, полученной от здоровых людей в возрасте 20-30 лет. Из этой смеси делают разведения в суспензирующем растворе в 2, 4 и 8 раз. Разведение 1:2 принимается за 100% активности ФВ, разведение 1:4 - за 50% и 1:8 - за 25% активности этого фактора. Каждый образец исследуют трижды по описанной выше методике. Вычисляется средняя величина. Калибровочная кривая строится в билогарифмической системе координат (рис. 10). Для каждой вновь приготовленной взвеси фик-

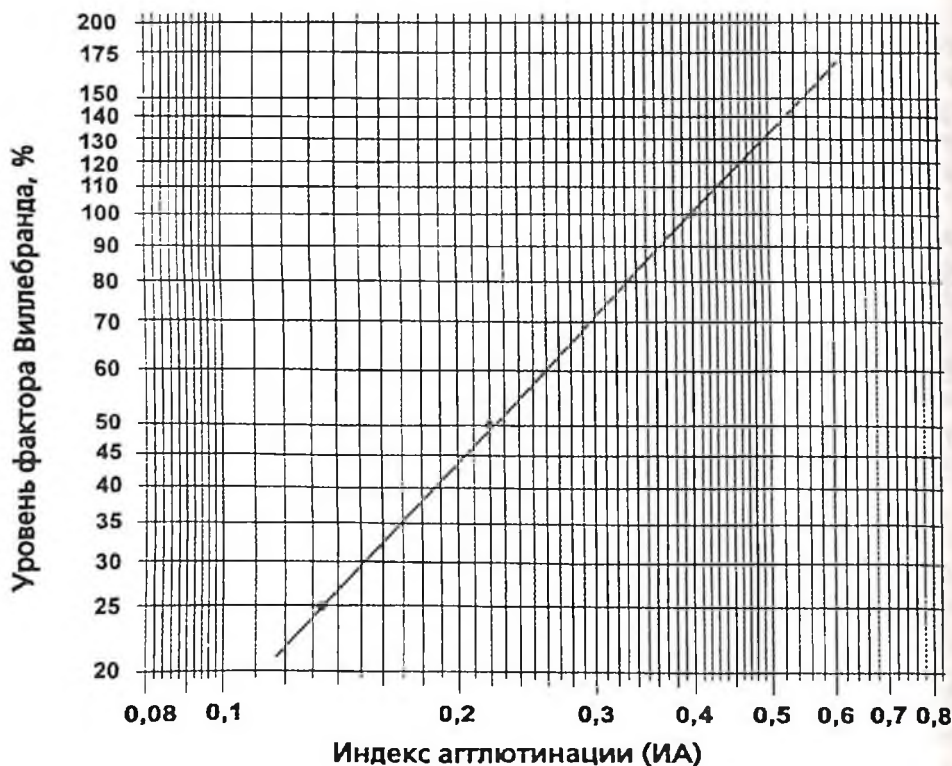


Рис. 10. Система координат и пример построения калибровочной кривой для определения уровня фактора Виллебранда.

сированных тромбоцитов и серии ристомицина строится новая калибровочная кривая.

Чтение результатов. После определения индекса агглютинации у исследуемого (см. выше) по калибровочной кривой находят активность ФВ. Норма в пределах 80-120%. Понижение активности ФВ в плазме характерно для большинства форм болезни Виллебранда. Значительное повышение активности ФВ в плазме наблюдается при острых тромбозах, некоторых тромбофилиях, ДВС-синдроме, поряжениях сосудистой стенки и свидетельствует об усиленном выходе ФВ из эндотелия в кровь. Одновременное определение фактора VIII:С и мультимерности ФВ позволяет дифференцировать разные типы болезни Виллебранда.

2.5.2. Вариант определения активности на агрегометре¹

Данный вариант более приемлем в связи с наиболее экономным расходом на проведение анализа тромбоцитов и ристомицина (при сравнительно меньшем объеме кюветы агрегометра), а также более точен из-за проведения анализа в условиях термостатирования при +37°C.

Реактивы. 1. Лиофилизированные тромбоциты человека во флаконе. Разводятся добавлением 5,1 мл дистиллированной воды и используются в течение рабочего дня. Концентрация тромбоцитов в суспензии составляет около 400×10^9 /л.

2. Стандартная лиофилизированная плазма во флаконе. Содержание ФВ соответствует 100%. Разводится добавлением 0,5 мл дистиллированной воды.

3. Ристоцетин (ристомицин) лиофильно высушенный, во флаконе. Разводится добавлением 0,55 мл цитратного солевого раствора. В результате получают раствор с концентрацией ристоцетина 20 мг/мл.

4. Цитратный солевой раствор, 2 мл во флаконе.

Ход определения. Построение калибровочной кривой. Калибровочную кривую строят непосредственно перед проведением

¹ Приводится по материалам Инструкции к набору для определения фактора Виллебранда на агрегометрах модели 220LA или 230LA. Все производства фирмы Биола, Москва; Ибрагимов О.Б. и др. Клин. лаборат. диагностика. - 1988. - № 3. - С. 13-15.

анализа. Для этого используют стандартную плазму без разведения и разведенную в 2, 5 и 10 раз цитратным солевым раствором. В кювету для агрегометра вносят 0,25 мл суспензии фиксированных тромбоцитов и инкубируют при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин. Затем кювету переносят в измерительное гнездо агрегометра и в нее вносят 0,025 мл (25 мкл) раствора ристоцетина. Через 1 мин включают режим измерения и еще через 1 мин добавляют 0,025 мл (25 мкл) стандартной плазмы (не разведенной). Измерения выполняют также в плазме, разведенной в 2, 5 и 10 раз. Регистрацию проводят в течение 5-15 мин в зависимости от времени агглютинации тромбоцитов. Построение калибровки и последующий расчет активности фактора Виллебранда в исследуемой плазме проводится автоматически с помощью программы AGGRWB (поставляется фирмой Биола в составе программного обеспечения).

Исследование плазмы больного. При определении активности ФВ у больных 0,025 мл стандартной плазмы заменяется на тот же объем неразведенной плазмы пациента. Уровень ФВ в исследуемом образце определяется автоматически с помощью вносимых в память агрегометра калибровочных данных. При необходимости (высокое содержание фактора Виллебранда) для анализа может быть использована разведенная плазма (1:2 или 1:5), а полученный результат умножается соответственно в 2 или 5 раз.

Чтение результатов. Нижняя граница нормальных колебаний уровня ФВ в плазме у здоровых людей по приведенному методу составляет 40%. Все результаты ниже этого показателя свидетельствуют о болезни Виллебранда. См. также раздел "чтение результатов" в выше приведенном варианте метода.

2.5.3. Определение антигена фактора Виллебранда¹

Принцип. Содержание ФВ в плазме может определяться методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), основанного на специфическом взаимодействии антигена с антителом. Принцип метода основан на том, что антитела к ФВ, предварительно адсорбированные на пластиковых планшетах, связывают ФВ из ис-

¹ Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний. Под ред. Н.Н. Петрищева, Л.П. Папаян. С.-Петербург, 1999. - С. 69-72.

следуемого образца плазмы, фиксируя их на планшете. Затем в лунки планшета добавляют моноклональные антитела к ФВ, конъюгированные с пероксидазой - ферментом, который, вступая во взаимодействие со своим субстратом (ортофенилдиамидом), дает окрашивание, выраженность которого пропорциональна уровню ФВ в исследуемом образце.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма крови. Допускается хранение плазмы перед исследованием при температуре минус 20°C в течение 3-4 месяцев.

Реактивы и материалы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия.

2. Буфер А: фосфатно-солевой буфер, pH 7,2 (0,14 М NaCl, 2,5 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄).

3. Буфер В: фосфатно-солевой буфер, pH 7,2 (0,5 М NaCl, 2,5 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄, Tween-20).

4. Буфер С: цитратно-фосфатный буфер, pH 5,0 (3,4 мМ C₆H₈O₇, 6,8 мМ Na₂HPO₄).

5. Поликлональные антитела к ФВ (фирма Dakopatts) в разведении 1:2000 на буфере А.

6. Моноклональные антитела к ФВ человека (разработка лаборатории онкоиммунологии НИИ онкологии и лаборатории свертывания крови РосНИИ гематологии и трансфузиологии, С.-Петербург), конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:2000 на буфере В.

7. Субстрат для выявления активной пероксидазы: 0,05% раствор ортофенилдиамида в буфере С с добавлением перекиси водорода (непосредственно перед использованием) до конечной концентрации 0,0198%.

8. Серная кислота, 3 М раствор.

9. Стандартная нормальная с известным содержанием ФВ или пул донорских бестромбоцитарных плазм от 10-20 доноров.

10. Планшеты 96-луночные для ИФА.

Ход определения. 1. В каждую лунку планшета добавляют по 100 мкл раствора поликлональных антител, инкубируют при +4°C в течение ночи. Проводят трехкратную отмывку лунок от не связавшихся антител с помощью буфера В.

2. Готовят пять последовательных двукратных разведений стандартной нормальной плазмы от 1:25 до 1:400 буфером В. Образцы исследуемой плазмы разводят буфером В в отношении 1:50. По 50 мкл каждого разведения стандартной плазмы и исследуемых проб

помещают в лунки планшета, заполняя таким образом все лунки, кроме 2-6, которые используют в качестве отрицательного контроля, куда вносят только буфер В. Для повышения точности анализа рекомендуется использовать для одного образца две соседние лунки, и при расчете результатов в качестве окончательного значения оптической плотности данной пробы брать усредненный результат из двух показателей.

Затем в каждую лунку добавляют по 50 мкл моноклональных антител, содержащих ферментную метку. Инкубируют в течение 90 мин при $+37^{\circ}\text{C}$, затем проводят пятикратную отмывку лунок планшета от остатков плазмы и не связавшихся антител буфером В.

3. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора субстрата. Реакция окрашивания проходит в темноте при комнатной температуре. Останавливают реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл раствора серной кислоты.

Результат считывают через 10-30 мин после остановки реакции окрашивания на ИФА-фотометре при длине волны 492 нм.

Чтение результатов. Содержание ФВ в плазме выражают в процентах к норме. Определение уровня ФВ проводят с помощью калибровочной кривой, которая строится в билогарифмической системе координат на основании данных оптической плотности, полученных для последовательных двукратных разведений стандартной плазмы. За 100% содержания ФВ условно принимают такое его количество, которое содержится в конечном разведении плазменного стандарта 1:100. Конечные разведения 1:50, 1:200, 1:400 и 1:800 составляют соответственно 200, 50, 25 и 12,5% ФВ. Пределы нормальных колебаний уровня ФВ 58%-166% ($X=98\%$, $S=35,7$).

2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТРАКЦИИ КРОВЯНОГО СГУСТКА

Принцип. Основан на визуальном определении объема отделяемой при ретракции (сжатию фибринового сгустка) сыворотки.

Необходимые материалы. 1. Градуированная центрифужная стеклянная силионированная пробирка с делениями на 0,1 мл.

2. Спиралевидная стеклянная палочка длиной около 12 см с надетой на нее с одного конца пробкой, либо спираль, приготовленная из проволоки, диаметром 1,0-1,5 мм.

Ход определения. Венозную кровь (без стабилизатора) в количестве 5 мл после пункции немедленно помещают в градуирован-

ную центрифужную пробирку. Затем в пробирку осторожно вводят стеклянную палочку, которую устанавливают в вертикальном положении при помощи пробки, закрывающей пробирку.

Пробирку устанавливают на водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и через равные промежутки времени наклоняют до наступления полного свертывания крови. Через 1 час после свертывания крови стеклянную палочку осторожно удаляют вместе со сгустком. Объем оставшейся сыворотки определяют по градуировке на пробирке.

Чтение результатов. Ретракция кровяного сгустка у здоровых людей колеблется в пределах 48-60%. Недостаточная ретракция наблюдается при выраженной тромбоцитопении (менее $30 \times 10^9/\text{л}$), некоторых видах качественной неполноценности кровяных пластинок (уремия, тромбоастения Гланцмана). Ложное уменьшение наблюдается при избытке эритроцитов (полиглобулия, эритремия) и увеличении гематокритного показателя. Ложно завышенная ретракция наблюдается при анемиях и снижении гематокритного показателя. При гипофибриногенемии сгусток мал и это приводит к ложному завышению показателя ретракции (даже в том случае, когда последняя снижена). Диагностическое значение метода относительно невелико.

3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА

3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ (методика Lee, White)

Принцип. Определяют скорость образования сгустка в венозной крови при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ с поправкой на то, что перемешивание крови в пробирке искусственно ускоряет процесс коагуляции. Чаще всего используют двухпробирочный вариант теста, хотя в оригинале определение производится в 3 пробирках.

Реактивы. Не требуются.

Материал для исследования. Кровь без стабилизатора.

Ход определения. Две чистые и сухие пробирки одинакового размера помещают на водяную баню ($+37^{\circ}\text{C}$). Подготавливают к работе два секундомера. Производят венепункцию широкой сухой иглой, под которую подставляют 1-ю пробирку. При появлении крови из иглы включают секундомер. Набирают в 1-ю пробирку около 1 мл крови, затем подставляют под иглу 2-ю пробирку, замечая по секундомеру время поступления в нее первой порции крови. Во 2-ю пробирку набирают то же количество крови, что и в 1-ю. Обе пробирки немедленно помещают на водяную баню ($+37^{\circ}\text{C}$). После этого через каждые 30 с наклоняют 1-ю пробирку на $60-70^{\circ}$ до того момента, пока в ней не произойдет свертывание и кровь при наклоне перестанет перемещаться в пробирке. При этом 2-ю пробирку оставляют неподвижной. После того как по секундомеру отмечено время свертывания крови в 1-й пробирке, начинают наклонять через каждые 30 с 2-ю пробирку и регистрируют время свертывания находящейся в ней крови. В момент полного свертывания выключают секундомер.

Примечание. В трехпробирочном тесте после регистрации свертывания во 2-й пробирке по той же методике следят за свертыванием крови в 3-й пробирке.

Чтение результатов. Интервал времени от момента запуска секундомера (от поступления 1-й порции крови в 1-ю пробирку) до

свертывания крови во 2-й пробирке характеризует общее время спонтанного свертывания венозной крови при контакте со стеклом. Во 2-й пробирке кровь свертывается позже, чем в 1-й, так как до наступления свертывания в 1-й пробирке она остается неподвижной. При прибавлении ко времени свертывания крови в 1-й пробирке дополнительного интервала, отражающего запаздывание процесса во 2-й пробирке, вносится поправка на турбулентное движение крови.

Для большей точности из общего времени свертывания можно вычесть разницу во времени между сроками поступления крови в 1-ю и 2-ю пробирки, хотя такая поправка в большинстве случаев не влияет на конечные результаты исследования.

Пример. Время поступления крови в 1-ю пробирку (начало отсчета времени) - 0 сек, во 2-ю пробирку - 22 с, время свертывания (от начала отсчета): в 1-й пробирке - 5 мин 20 с, во второй пробирке - 8 мин 40 с. Общее время свертывания - 8 мин 40 с, а с поправкой на более позднее поступление крови во 2-ю пробирку: 8 мин 40 с - 22 сек = 8 мин 18 с.

В норме время свертывания: в 1-й пробирке - 5-10 мин, во 2-й пробирке - 8-12 мин. Нормальный суммирующий показатель - 8-12 мин.

Время свертывания крови - простейший общий коагуляционный тест, выявляющий у постели больного наиболее грубые нарушения в системе свертывания крови. Удлинение времени свертывания может быть связано с выраженным дефицитом одного или нескольких факторов свертывания либо с избытком в крови антикоагулянтов (гепарина и др.). В наибольшей степени на показаниях теста отражается дефицит факторов, участвующих во внутреннем механизме образования протромбиназы (факторов XII, XI, IX и VIII), а также фибриногена. Однако данная проба выявляет наиболее тяжелые формы такой патологии, поскольку при уровне VIII, IX и других факторов выше 4% нормы время свертывания становится, как правило, нормальным. Поэтому данный тест не пригоден для выявления легких форм гемофилии и для контроля за достаточностью заместительной терапии и предоперационной подготовки больных.

При ДВС-синдроме тест выявляет вначале кратковременную гиперкоагуляцию (немедленное свертывание крови в игле либо на протяжении первой минуты в пробирке), а затем - длительный период гипокоагуляции, вплоть до полной несвертываемости крови. По точности и воспроизводимости этот метод лучше других в своей

группе (в том числе некоторых однопробирочных модификаций методики Ли и Уайта), но по чувствительности намного уступает современным стандартизированным методикам исследования гемокоагуляции (в частности АПТВ или АЧТВ).

Варианты методики. 1. Тест может выполняться и при комнатной температуре (+18...+25°C), но точность и воспроизводимость результатов при этом намного снижается. Нормальное время свертывания при комнатной температуре: в 1-й пробирке 5-10 мин, общее время свертывания 12-16 мин.

2. В литературе встречаются рекомендации применения однопробирочных методов (либо параллельно в двух пробирках, но при их одновременном покачивании, с вычислением средней величины времени свертывания), но они не могут считаться модификацией теста Ли и Уайта, так как в них не учитывается поправка на турбулентное движение крови. Тем не менее, для экспресс-диагностики наиболее тяжелых нарушений гемостаза может быть использована и одна из таких методик.

3. Значительно менее точны микрометоды, в которых используются небольшие количества крови (0,1-0,2 мл), но они удобны для применения в педиатрической практике и в тех случаях, когда у больного не удается получить достаточное количество крови.

Микрометод

Принцип. Определяют время свертывания венозной крови при температуре +37°C. Используют малые количества крови, поправка на перемешивание крови в пробирке не вносится.

Ход определения. Сухой иглой без шприца из локтевой вены берут кровь в две сухие стеклянные пробирки (размером 10 × 1 см), в каждую по 0,1 мл. Первые капли крови выпускают на ватный тампон. Секундомер включают сразу же при поступлении первой порции крови в пробирку. Пробирки с кровью ставят на водяную баню (+37°C). Через 2 мин после включения секундомера, а затем через каждые 30 с пробирки наклоняют на 50-60°. Пока кровь не свернулась, она растекается по стенке пробирки, при наступлении свертывания растекание крови прекращается. В этот момент выключают секундомер.

Время свертывания выражают в минутах по среднему показателю из двух определений (в 1-й и 2-й пробирках).

Чтение результатов. Нормальное время свертывания варьирует в пределах 5-10 мин. При гипокоагуляции оно удлиняется, при гиперкоагуляции - укорачивается.

Тест менее точен, чем классический метод Ли и Уайта, так как малое количество крови контактирует с большой площадью поверхности стекла и не вносится поправка на турбулентное движение крови в пробирке. Однако тест может быть использован для экспресс-диагностики наиболее тяжелых нарушений свертываемости в случаях, когда трудно получить достаточно большие количества крови.

Диагностическое значение теста такое же, как и метода Ли и Уайта.

Макрометод

Принцип. Тот же, что и у предыдущего теста.

Ход определения. Такой же, как и в предыдущем тесте, но в пробирке набирают по 1 мл венозной крови.

Чтение результатов. Нормальные показатели теста 4 мин 55 с - 11 мин 55 с. Толкование результатов то же, что и в других методах исследования общего времени свертывания крови. Тест менее точен, чем классический метод Ли и Уайта, так как в нем не учитывается влияние на процесс свертывания турбулентного движения крови в пробирке при покачивании.

Выполнение теста при комнатной температуре еще более снижает точность и воспроизводимость исследования.

3.2. АУТОКОАГУЛЯЦИОННЫЙ ТЕСТ

Принцип. Аутокоагуляционный тест (АКТ) - стандартизированная методика, отражающая динамику нарастания, а затем угнетения тромбопластин-тромбиновой активности в исследуемой крови. Стандартизация фосфолипидной и контактной активности начальной фазы процесса свертывания крови достигается использованием гемолизата эритроцитов исследуемого.

Материал для исследования. Кровь, стабилизированная цитратом натрия.

Реактивы. Хлорид кальция, 0,222% раствор.

Ход определения. 1. Приготовление гемолизат-кальциевой смеси. Немедленно после взятия кровь стабилизируют цитратом натрия (9:1), после чего 0,3-0,5 мл ее отливают в пробирку для приготовления гемолизат-кальциевой смеси (ГКС). Остальную кровь центрифугу-

гируют при 1500 об/мин в течение 10 мин. Отобранную плазму разливают по 0,2 мл в 10 пробирок и помещают на водяную баню (+37°C). В отдельную пробирку набирают 2,0 мл раствора хлорида кальция. Затем в нее добавляют 0,1 мл оставленной для приготовления ГКС крови и немедленно включают секундомер. Пробирку с этой смесью встряхивают и помещают на водяную баню (+37°C).

2. Выполнение АКТ. В каждую из пробирок с плазмой, находящейся в водяной бане, добавляют по 0,2 мл ГКС через 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин от момента приготовления этой смеси. Во всех случаях определяют время свертывания плазмы. Полученные результаты в секундах переводят в показатель свертывающей активности (в %) по табл. 12.

Учитывают следующие показатели АКТ:

- А - свертывающая активность на 2-й мин инкубации ГКС (норма: $X=15,4\%$; $\sigma=11,8$; $m=2,9$). Этот параметр наиболее изменчив, так как отражает самые начальные этапы образования тромбoplastина и тромбина в ГКС.
- МА - максимальная свертывающая активность (норма: $X=100\%$; $\sigma=5,0$; $m=1,1$).
- T_1 , мин - время достижения 1/2 МА (норма ($X \pm m$): $3,7 \pm 0,2$ мин).
- T_2 , мин - время МА (норма - 10 мин).
- Ф - время снижения тромбопластин-тромбиновой активности до 50% МА.
- ИИТ - индекс инактивации тромбопластина и тромбина. Рассчитывается по отношению МА, в % к свертывающей активности на 60-й мин инкубации (норма: $X=2,1$; $\sigma=0,5$; $m=0,1$).

Чтение результатов. Восходящая часть кривой АКТ (при построении графика) отражает динамику нарастания и максимальную активность тромбопластина и тромбина в исследуемой крови при стандартизированной контактной и фосфолипидной активации процесса свертывания.

Нисходящая часть кривой характеризует скорость и интенсивность инактивации тромбина за счет действия плазменного анти-тромбина и продуктов фибринолиза. Таким образом, АКТ дает представление о состоянии как прокоагулянтного, так и антикоагулянтного звеньев свертывающей системы крови, отражая кинетику обоих процессов.

При дефиците факторов внутреннего механизма образования протромбиназы (XII, XI, IX, VIII), а также X, V и II факторов, как и при

Таблица 12

Перевод результатов АКТ
в показатели коагуляционной активности

Время, с	Показатель, %	Время, с	Показатель, %	Время, с	Показатель, %	Время, с	Показатель, %
7	108	35	36	63	12,5	91	4,4
8	105	36	34	64	11,8	92	4,2
9	103	37	33	65	11,3	93	4,0
10	100	38	31,5	66	10,8	94	3,9
11	93	39	30,5	67	10,5	95	3,7
12	88	40	29,5	68	10,1	96	3,5
13	85	41	28	69	9,8	97	3,4
14	82	42	27,5	70	9,4	98	3,3
15	79	43	26	71	9,0	99	3,2
16	76	44	22,5	72	8,6	100	3,1
17	73	45	24,5	73	8,2	101	3,0
18	70	46	23,5	74	8,0	102	2,8
19	68	47	23	75	7,7	103	2,7
20	65	48	22	76	7,4	104	2,6
21	62	49	21	77	7,2	105	2,5
22	59	50	20,5	78	7,0	106	2,4
23	58	51	19,5	79	6,7	107	2,3
24	56	52	18,5	80	6,5	108	2,2
25	54	53	18,0	81	6,2	109	2,1
26	51	54	17,3	82	6,0	110	2,0
27	49	55	16,5	83	5,8	111	1,9
28	47	56	16,0	84	5,6	112	1,8
29	46	57	15,5	85	5,4	113	1,6
30	44	58	14,8	86	5,2	114	1,5
31	43	59	14,5	87	5,0	115	1,4
32	41	60	13,8	88	4,9	116	1,3
33	39	61	13,5	89	4,7	117	1,2
34	37	62	12,8	90	4,5	118	1,2

избытке быстродействующих антикоагулянтов (гепарина и др.), уменьшаются параметры А и особенно МА, удлиняется время T_1 и T_2 .

При повышенном содержании антитромбинов и значительной активации фибринолиза наблюдается более крутое снижение нисходящей части кривой аутокоагулограммы и увеличивается ИИТ.

Мало отражаются на показаниях теста дефицит фактора VII, участвующего только во внешнем механизме образования протромби-

назы, а также нарушения свертываемости крови, обусловленные дефицитом тромбоцитов.

Варианты методики. Если исследователя интересует лишь величина максимальной тромбопластин-тромбиновой активности крови, то АКТ может выполняться в укороченном варианте, что сокращает время исследования и уменьшает расход крови больного. Так, для выявления гиперкоагуляции достаточно исследовать свертывающую активность - на 4-й, 6-й, 8-й и 10-й мин.

АКТ является в известной мере аналогом АПТВ (АЧТВ), и при выборе методики исследования следует остановиться (с учетом распространенности) на АПТВ. Роль АКТ значительно повышается в педиатрической практике.

3.3. КАОЛИНОВОЕ ВРЕМЯ СВЕРТЫВАНИЯ БЕДНОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Принцип. Определяют время свертывания рекальцифицированной бедной тромбоцитами плазмы в условиях стандартной активации факторов XII и XI каолином.

Реактивы. 1. Взвесь на буфере Михаэлиса или трис-НСI буфере (0,05М, рН 7,4) нефракционированного каолина из расчета 5 мг/мл или "легкой" фракции каолина - 0,25 мг/мл (последняя - производства фирмы Технология-Стандарт).

2. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. А. *Мануальный вариант.* К 0,1 мл исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавляют 0,1 мл взвеси каолина. Пробирку встряхивают и помещают на 3 мин на водяную баню при +37°C. При использовании нефракционированного каолина (5 мг/мл) смесь каждые 10-15 с встряхивают для обеспечения максимальной контактной активации¹. После 3-минутной инкубации к смеси добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до +37°C и включают секундомер. Определяют время свертывания при периодическом (раз в 1-2 с) покачивании пробирки.

¹ Более стабильные результаты дают исследования, проведенные с "легкой" фракцией каолина.

Б. Коагулометрический вариант. В кювету коагулометра вносят 0,1 мл исследуемой плазмы и прогревают ее при +37°C в течение 1 мин. Далее, в кювету добавляют 0,1 мл взвеси "легкого" каолина, и смесь инкубируют 3 мин при +37°C. Затем в нее добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция (имеющего температуру +37°C) и регистрируют время свертывания.

Чтение результатов. Результат выражают в секундах, сравнивая время свертывания контрольной нормальной и исследуемой плазмы. В норме каолиновое время (КВ) в бедной тромбоцитами плазме зависит от характеристик используемого каолина и составляет в случае применения нефракционированного реагента $95,8 \pm 3,7$ с (пределы нормальных колебаний 77-116 с) и при применении "легкой" фракции каолина - $79,0 \pm 2,1$ с (60 - 98 с).

Добавление взвеси каолина - вещества, обладающего высокой контактной активностью, - стандартизирует и ускоряет начальную фазу внутреннего механизма свертывания. При нормальном протромбиновом и тромбиновом времени удлинение КВ отражает дефицит или ингибирование плазменных факторов внутреннего механизма коагуляции (XII, XI, IX и VIII), а также прекалликреина и высокомолекулярного кининогена, либо наличие их ингибиторов. Укорочение КВ характерно для активации этих факторов. Вместе с тем, показания КВ в значительной степени зависят от наличия и активности в плазме фосфолипидных мембран (ПФМ), обладающих прокоагулянтной активностью. Удаление ПФМ из нормальной бедной тромбоцитами плазмы удлиняет КВ в 1,7-1,9 раза. Это позволяет использовать тест для оценки прокоагулянтной активности ПФМ, а также в комплексе с другими фосфолипидзависимыми тестами для выявления эффектов волчаночного антикоагулянта (см. раздел 8).

3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВАЦИИ ПРОЦЕССА СВЕРТЫВАНИЯ ПЛАЗМЕННЫМИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ¹

Принцип. Тест основан на определении каолинового времени свертывания рекальцифицированной бедной тромбоцитами плазмы

¹ Момот А.П., Бишевский К.М. Патент РФ № 20580314 от 10.04.96.

до и после удаления из нее методом микрофльтрации свободных (плазменных) фосфолипидных мембран.

Реактивы и другие расходные материалы. 1. Трис-буфер, 0,05 М, рН 7,4.

2. Взвесь "легкого" каолина (0,25 мг/мл) на трис-НСI буфере.

3. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

4. Фильтр из регенерированной целлюлозы (размер пор 0,2 мкм) фирмы Sartorius (Minisart-RS15) в полипропиленовой оправе в комплекте со шприцами для микрофльтрации или аналогичные фильтры других фирм-производителей.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. 1. Плазму в объеме 0,7-0,8 мл набирают в шприц и пропускают через насадку с помещенным в нее фильтром. В результате получают фильтрованный образец плазмы, освобожденной от коагуляционно активных ПФМ.

2. Измеряют КВ плазмы до и после ее фльтрации. Для этого 0,1 мл плазмы смешивают в пробирке с 0,1 мл взвеси легкого каолина. Пробу помещают на водяную баню (+37°C), через 3 мин добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция (имеющего температуру +37°C), немедленно включают секундомер и измеряют время свертывания в секундах.

Чтение результатов. С учетом КВ в плазме до и после ее фльтрации рассчитывают индекс прокоагулянтной активности ПФМ (X) в % по формуле:

$$X, \% = 10^{3,8(\lg t_b - \lg t_a) + 1},$$

где t_a - КВ до микрофльтрации, t_b - КВ после микрофльтрации.

Нормативные показания теста приведены в табл. 13.

При внутрисосудистом свертывании крови, разрушении клеток крови и эндотелия наблюдаются фазовые изменения содержания ПФМ. В начальном периоде происходит временное снижение активности ПФМ, которое затем сменяется ее повышением в разгар ДВС-синдрома. Особенно значительное повышение активности ПФМ (до 300% и более) наблюдается при септических и травматических ДВС-синдроме и шоке (ожоги, краш-синдром). Снижается активность

Таблица 13

Прокоагулянтная активность плазменных фосфолипидных мембран у здоровых людей

Показатели	X	± SD	± m	Пределы нормальных колебаний (X±1,5σ)
Каолиновое время, с:				
до фильтрации	87,2	11,8	1,2	69,5-104,9
после фильтрации	159,3	23,9	2,4	123,45-195,15
Прокоагулянтная активность ПФМ, %	99,8	18,4	1,8	72,2-127,4

ПФМ при блокаде последних антителами (при антифосфолипидном синдроме)¹.

3.5. АКТИВИРОВАННОЕ ПАРЦИАЛЬНОЕ (ЧАСТИЧНОЕ) ТРОМБОПЛАСТИНОВОЕ ВРЕМЯ

Принцип. Определяют время свертывания рекальцифицированной бедной тромбоцитами плазмы в условиях стандартной контактной (каолин) и фосфолипидной (кефалин) активации.

Реактивы. 1. Трис-буфер, 0,05М (или буфер Михаэлиса), рН 7,3-7,4.

2. АПТВ-реагент получают следующим образом: а) на буфере приготавливается взвесь каолина из расчета 5 мг/мл с использованием нефракционированного каолина или, что лучше, 0,25 мг/мл с легкой фракцией каолина; б) готовят 2-3% эмульсию кефалина в дистиллированной воде; в) взвесь каолина смешивают с эмульсией кефалина в объемном соотношении 30:1².

3. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. А. *Мануальный вариант.* К 0,1 мл исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавляют 0,1 мл АПТВ-реагента. Пробирку встряхивают и помещают на 3 мин на водяную баню при +37°С. При использовании нефракционированного каолина (5 мг/мл)

¹ Момот А.П. и др. Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. - № 8. - С. 20-22.

² Необходимые реагенты входят в состав набора "АПТВ-тест" фирмы Технология-Стандарт.

смесь каждые 10-15 с встряхивают для обеспечения максимальной контактной активации. После 3 мин инкубации к смеси добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до $+37^{\circ}\text{C}$ и включают секундомер. Определяют время свертывания при периодическом (раз в 1-2 с) покачивании пробирки.

Б. Коагулометрический вариант. В кювету коагулометра вносят 0,1 мл исследуемой плазмы и прогревают ее при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мин. Далее, в кювету добавляют 0,1 мл АПТВ-реактента (содержащего легкую фракцию каолина, т.к. нефракционированный каолин в основной своей массе оседает на дно) и смесь инкубируют 3 мин при $+37^{\circ}\text{C}$. Затем в нее добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция (имеющего температуру $+37^{\circ}\text{C}$) и регистрируют время свертывания.

Чтение результатов. Результат выражают в секундах, сравнивая время свертывания контрольной нормальной и исследуемой плазмы. Следует учитывать, что в разных диагностических наборах нормальные значения АПТВ отличаются друг от друга. Чаще всего эти показатели варьируют от 30 до 42 с. Кроме того, имеет значение техника выполнения теста (ручной вариант, на коагулометре). Коагулометрические определения АПТВ обычно короче на несколько секунд определений мануальных.

Возможен также учет результатов в виде индекса АПТВ, как отношения АПТВ в исследуемой плазме к АПТВ в контрольной нормальной плазме.

АПТВ - стандартизированная коагуляционная проба, чувствительная к дефициту всех плазменных факторов свертывания, кроме фактора VII. Тест чувствителен к эффектам экзо- и эндогенных антикоагулянтов. При нормальных показаниях протромбинового и тромбинового времен тест отражает состояние начального этапа внутреннего механизма коагуляции, показывает дефицит факторов XII, XI, IX (при уровне фактора 20% и ниже) или VIII (30% и ниже), а также наличие в плазме крови их ингибиторов, гепарина и др. Во всех этих случаях наблюдается удлинение времени АПТВ. Укорочение АПТВ указывает на гиперкоагуляцию.

На основе АПТВ определяют дефицит факторов внутреннего механизма свертывания (диагностика и дифференциальная диагностика гемофилий) и наличие в крови ингибиторов этих факторов и антикоагулянтов.

Тест используется для контроля за лечением гепарином, но нужно учитывать, что тест-наборы разных фирм обладают неодинаково-

вой чувствительностью к нему, а также то, что гепарины неоднородны по антикоагулянтному эффекту. В связи с этим, желателен предварительный контроль эффектов разных доз используемого гепарина на показатели АПТВ-теста, выполняемого в данной конкретной лаборатории.

Замена кефалина в АПТВ-реагенте особой "люпус"-чувствительной фосфолипидной субстанцией (*Platelin LS* фирмы Organon Текника и др.) позволяет использовать методику определения АПТВ в комплексе с другими пробами для выявления волчаночного антикоагулянта (см. раздел 8.).

Варианты методики. Вместо кефалина в АПТВ-реагенте может быть использован эритрофосфатид (эрилид), полученный из стромы эритроцитов или кефалин растительного происхождения. В диагностических наборах некоторых зарубежных фирм с этой же целью используются искусственно созданные смеси фосфолипидов.

3.6. ПРОТРОМБИНОВОЕ (ТРОМБОПЛАСТИНОВОЕ) ВРЕМЯ

Принцип. Определяется время свертывания рекальцифицированной плазмы (или крови) при добавлении к ней тканевого тромбoplastина определенной активности и чувствительности к дефициту факторов протромбинового комплекса (VII, X, V, II).

Реактивы. Тромбoplastин. Этот реагент должен быть стандартизирован фирмой-изготовителем (по активности и чувствительности) и иметь следующие характеристики:

1. Активность в протромбиновом тесте на контрольной нормальной плазме должна определяться в пределах от 11 до 15 с (в зависимости от техники определения - мануальной или на коагулометре).

2. Препарат тромбoplastина должен быть растворимым, т.е. приготавливаться (без растирания) простым разведением сухого реагента дистиллированной водой или раствором хлорида кальция (0,277%).

3. Тромбoplastин должен иметь на маркировке или в спецификации международный индекс чувствительности (МИЧ или ISI). Последний характеризует степень чувствительности тромбoplastина к дефициту факторов протромбинового комплекса (прежде всего фактора VII) и призван свести к минимуму разнородность результатов определений протромбинового времени при использовании разных

тромбопластинов. Это особенно важно для правильного контроля за лечением непрямыми (оральными) антикоагулянтами. При таком контроле МИЧ используемого тромбопластина должен быть не выше 1,5. Основной перечень доступных в России коммерческих препаратов растворимого тромбопластина приведен далее в табл. 16.

Примечание. Следует отметить также, что использующийся во многих лабораториях нерастворимый (кадаверный) тромбопластин не калиброван по МИЧ, имеет низкую активность (16-20 с) и по многим параметрам не соответствует международным требованиям, предъявляемым к этому реагенту. Ослабленные тромбопластины (в большом разведении) могут использоваться при определении содержания фибриногена по методу Р.А. Рутберг и волчаночного антикоагулянта (см. соответствующие разделы).

В настоящее время стандартизированный растворимый тромбопластин (*Техпластин*) производится фирмой Технология-Стандарт. МИЧ его в разных сериях колеблется от 1,1 до 1,2, при активности на контрольной нормальной плазме 11-15 с. Для получения тромбопластин-кальциевой во флакон перед работой вносят 4,0 мл дистиллированной воды. Один флакон реагента рассчитан на 20 определений, время использования - до 7 суток, в зависимости от температурного режима его хранения. В комплект входит аттестованная контрольная нормальная плазма.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. Предварительно, за 10-20 мин до начала исследования, разведенную (в соответствии с рекомендацией фирмы-изготовителя) тромбопластин-кальциевую смесь помещают на водяную баню при +37°C и оставляют там до окончания работы.

Определение протромбинового времени по Квику.

Исследуемую плазму, в объеме 0,1 мл, прогревают в пробирке на водяной бане (или кювете коагулометра) при +37°C. Через 1 мин добавляют 0,2 мл прогретой до +37°C тромбопластин-кальциевой смеси, включают секундомер или таймер коагулометра и определяют время свертывания.

Аналогично определяют ПВ в контрольной нормальной плазме.

Вариант метода. Определение протромбинового времени в капиллярной крови (по Б.Ф. Архипову, 1982¹). Ниже приводится описание варианта метода на примере использования диагностикума "Тех-

¹ Баркаган Л.З. Нарушение гемостаза у детей. - М.: Медицина, 1993. - 176 с.

пластин-тест (К)", фирмы Технология-Стандарт, адаптированного к капиллярной крови.

Реактивы и расходные материалы. 1. *Техпластин-К* - лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь. Разводится добавлением 5,0 мл дистиллированной воды. МИЧ 1,2.

2. Растворитель для *Техпластина-К*, 10,5 мл.

3. Контрольная нормальная плазма - лиофильно высушенный пул плазмы крови не менее, чем от 20 здоровых людей. Разводится добавлением дистиллированной воды.

4. Цитрат натрия - 10 мл 3,8% раствора.

5. Капилляры Панченкова. Данные капилляры не калиброваны по объему, но ими можно пользоваться для получения необходимого соотношения (9:1) крови с раствором цитрата натрия. При этом общий маркированный рисками объем капилляра составляет, как правило, от 110 до 150 мкл (0,11-0,15 мл).

Материал для исследования. Получение стабилизированной цитратом капиллярной крови.

Капилляр Панченкова промывают 3,8% раствором цитрата натрия. После обработки спиртом и прокола мякоти пальца стерильным скарификатором первую каплю крови удаляют ватным тампоном. В капилляр набирают раствор цитрата натрия до деления «80». Затем в тот же капилляр добирают кровь так, чтобы общий объем жидкости достиг деления «0». Полученную смесь переносят в чистую пробирку. В тот же капилляр повторно набирают кровь до деления «0». В пробирке смешивают обе порции крови, дополнительно перемешивают их пипетированием. В результате получают кровь, стабилизированную 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1.

При значительных изменениях гематокрита (ниже 35% или выше 55%) перерасчитывают необходимое соотношение объемов крови и стабилизатора (см. раздел «Приложение»).

Образцы стабилизированной крови хранят при комнатной температуре, в течение не более 30 мин, желательно в герметично закрытом виде (для предотвращения высыхания). При заборе крови из пальца следует избегать давления на мягкие ткани, поскольку это увеличивает содержание в капиллярной крови тканевой жидкости и влияет на результаты анализа.

Ход определения. Калиброванной пипеткой вносят по 100 мкл (0,1 мл) стабилизированной крови в две кюветы для коагулометра

или в две чистые пробирки (при мануальном определении). Пробу крови исследуемого прогревают в пробирке на водяной бане (или кювете коагулометра) при $+37^{\circ}\text{C}$. Через 1 мин добавляют 0,1 мл прогретой до $+37^{\circ}\text{C}$ тромбопластин-кальциевой смеси, включают секундомер или таймер коагулометра и определяют время свертывания. Точно также определяют ПВ в контрольной нормальной плазме.

Контрольные результаты протромбинового времени получают при исследовании входящей в комплект набора контрольной нормальной плазмы. Для этого 0,1 мл плазмы прогревают в течение 1 мин при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Затем добавляют 0,2 мл прогретой до $+37^{\circ}\text{C}$ тромбопластин-кальциевой смеси, включают секундомер и определяют время свертывания.

Примечание. Определение протромбинового времени в капиллярной крови сопряжено с риском значительных погрешностей на стадии взятия, стабилизации крови и непосредственно анализа, особенно практикуемого в ручном варианте. Для большей точности такие измерения должны выполняться на коагулометре с механическим принципом регистрации результатов, например, коагулометре Тромбостат-2 фирмы Behnk Elektronik.

Чтение результатов. Результат учитывают в секундах и выражают по одному из следующих вариантов:

1. Указывают протромбиновое время в секундах с указанием контрольных значений, полученных при исследовании контрольной нормальной плазмы. Для мануального определения оптимальная активность реактива в норме соответствует 12-15 с, для коагулометров - 11-14 с.

2. В отечественной практике в течение длительного времени использовался расчет протромбинового индекса по следующей формуле:

$$\text{ПИ} = (\text{ПВ}_{\text{контрольной нормальной плазмы}} / \text{ПВ}_{\text{больного}}) \times 100\% .$$

Однако такая методика учета результатов устарела, не соответствует современным требованиям и маскирует активность используемого тромбопластина.

В настоящее время приняты следующие варианты оценки результатов протромбинового (тромбопластинового) теста:

3. Определяют протромбиновое отношение (ПО) по формуле:

$$\text{ПО} = (\text{ПВ}_{\text{больного}} / \text{ПВ}_{\text{контрольной нормальной плазмы}}) .$$

Для различных тромбопластинов ПО в норме составляет 0,7-1,1.

Затем, для учета чувствительности тромбопластина, возводят ПО в степень МИЧ или ISI (указан в маркировке фирмой-изготовителем) и таким образом рассчитывают международное нормализованное отношение (МНО или INR).

Например, протромбиновое время плазмы больного, получающего антикоагулянты - 45 с. Протромбиновое время контрольной нормальной плазмы - 12,7 с. МИЧ (или ISI), указанный в инструкции к тромбопластину - 1,1.

Отсюда МНО для данного больного (табл. 14) = $ПО^{МИЧ} = (45 : 12,7)^{1,1} = 3,54^{1,1} = 3,97$.

Таблица 14

Определение МНО при чувствительности тромбопластина 1,1

ПО	МНО	ПО	МНО	ПО	МНО	ПО	МНО
0,70	0,68	2,60	2,86	4,50	5,23	6,40	7,71
0,80	0,78	2,70	2,98	4,60	5,36	6,50	7,84
0,90	0,89	2,80	3,10	4,70	5,49	6,60	7,97
1,00	1,00	2,90	3,23	4,80	5,62	6,70	8,10
1,10	1,11	3,00	3,35	4,90	5,74	6,80	8,24
1,20	1,22	3,10	3,47	5,00	5,87	6,90	8,37
1,30	1,33	3,20	3,59	5,10	6,00	7,00	8,50
1,40	1,45	3,30	3,72	5,20	6,13	7,10	8,64
1,50	1,56	3,40	3,84	5,30	6,26	7,20	8,77
1,60	1,68	3,50	3,97	5,40	6,39	7,30	8,91
1,70	1,79	3,60	4,09	5,50	6,52	7,40	9,04
1,80	1,91	3,70	4,22	5,60	6,65	7,50	9,17
1,90	2,03	3,80	4,34	5,70	6,78	7,60	9,31
2,00	2,14	3,90	4,47	5,80	6,91	7,70	9,44
2,10	2,26	4,00	4,59	5,90	7,05	7,80	9,58
2,20	2,38	4,10	4,72	6,00	7,18	7,90	9,71
2,30	2,50	4,20	4,85	6,10	7,31	8,00	9,85
2,40	2,62	4,30	4,98	6,20	7,44		
2,50	2,74	4,40	5,10	6,30	7,57		

Нормальное МНО близко к 1,0, и меньше 1,4.

При лечении непрямыми антикоагулянтами МНО поддерживают на различном уровне, в зависимости от клинической ситуации (табл. 15).

Чем выше показатель МНО, тем значительнее полученная гипокоагуляция и тем чаще и опаснее геморрагические осложнения. Принципиально учитывать то, что определение МНО, в сравнении с протромбиновым индексом, позволяет более точно подобрать дозу антикоагулянта и уменьшить риск кровотечений, связанных с его передозировкой.

4. В тех случаях, когда индекс чувствительности тромбопластина не известен, нередко применяется расчет активности факторов протромбинового комплекса (в процентах) по Квику, с использованием калибровочной кривой, построенной по результатам измерения ПВ в разведениях контрольной нормальной плазмы (*описание методики и калибровочная сетка приводятся в инструкциях к соответствующим коммерческим наборам для определения ПВ*).

Таблица 15

**Допустимые пределы МНО у больных, получающих
непрямые антикоагулянты**

Диапазон МНО	Показания для лечения
МНО 2,0-3,0	Профилактика и лечение венозных тромбозов и тромбозмболий
МНО 2,5-3,5	Лечение рецидивирующих и тяжелых тромбозов магистральных вен, эмболии в бассейне легочной артерии (ТЭЛА), имплантация искусственных клапанов сердца

В настоящее время производится большое количество различных тромбопластинов - мозговых человека, кролика, быка и др., плацентарных человека и др. Далеко неполный их перечень приведен в табл. 16).

Необходимо учитывать, что результаты протромбинового теста могут искажаться наличием в крови волчаночного антикоагулянта и других ингибиторов свертывания (гепарин), что нередко затрудняет контроль за эффектом применения кумаринов.

Таблица 16

Перечень вариантов растворимого тромбoplastина
и источников его получения

Наименование тромбoplastина	Фирма-изготовитель	Источник получения	МИЧ (ISI)
Thromborel	Behring, Германия	Плацента человека	-
Simplastin Exel	Organon Teknika, Голландия	Мозг кролика	1,1-1,2
Simplastin Exel S	Голландия		2,0
Ca-tromboplastin	Boehringer Mannheim, Австрия	-	-
Neoplastine	Diagnostica Stago, Франция	-	Низкий
Bovine Thromboplastin	Франция	Мозг быка	Средний
Isimat 1	BioMerieux, Франция	-	1,0-1,1
Thromboplastin	Immuno, Австрия	Мозг кролика	1,2 1,9
DiaPlastin	DiaMed AG, Швейцария	Мозг кролика	1,0-1,1
DiaPlastin E	Швейцария		1,2-1,3
Normotest	Nycomed, Норвегия	Мозг кролика	-
Thrombotest	Норвегия	Мозг быка	1,0-1,1
Nycoplastin		Мозг кролика	1,2-1,3
Тромбoplastин	Ренам, Россия	Мозг кролика	1,5
Техпластин	Технология-Стандарт, Россия	Мозг человека	1,1-1,2
Техпластин (К)	Стандарт, Россия		
Медипластин	Медио+, Россия	Мозг кролика	1,1-1,2

Примечание. МИЧ - международный индекс чувствительности, прочерк - нет данных.

3.7. ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ

Принцип. Определяют время свертывания плазмы под влиянием тромбина (стандартизированного по активности на контрольной нормальной плазме). Тромбиновый тест характеризует течение конечного этапа свертывания крови - скорость превращения фибриногена в фибрин и зависит от содержания фибриногена и ингибиторов, блокирующих действие тромбина, а также самосборку фибрин-мономера.

Реактивы. 1. Трис-буфер, 0,05М (или буфер Михаэлиса, рН 7,3-7,4).
2. Раствор тромбина в буфере активностью 14-16 с. Рабочий раствор реактива готовится в пластиковой или силиконированной пробирке и используется в день исследования. Хранится при комнатной температуре.

Примечание. Разведение тромбина в физиологическом (0,9%) растворе хлорида натрия или его выдержка при +37°C нежелательны, так как при этом быстро снижается активность фермента.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. К 0,2 мл исследуемой плазмы, прогретой на водяной бане при +37°C в течение 1 мин, добавляют 0,2 мл раствора тромбина (который до исследования должен иметь температуру +18...+25°C, не прогревать!). Немедленно включают секундомер и отмечают время свертывания.

Определение проводится мануально или на коагулометре.

Чтение результатов. Результат выражают в секундах, сравнивают время свертывания в контрольной нормальной и исследуемой плазме. В норме ТВ составляет 14-16 с.

Удлинение ТВ может быть обусловлено следующими причинами:

- гипофибриногенемией;
- дисфибриногенемией (молекулярными дефектами фибриногена);
- повышенным содержанием в плазме продуктов деградации фибриногена/фибрина (ПДФ), в т.ч. при фибринолитической терапии;
- присутствием в крови антикоагулянтов прямого действия (гепарина, преимущественно нефракционированного или обычного, гирудина, синтетических антитромбинов и др.).

Полная несвертываемость по тромбиновому тесту наблюдается сразу же после внутривенного введения большой дозы гепарина и в терминальной фазе острого ДВС-синдрома. Благодаря высокой чувствительности ТВ к гепарину методикой иногда пользуются для контроля за гепаринотерапией. Ошибочные результаты могут быть получены при исследовании крови, взятой из сосудистого катетера с гепариновым покрытием. В этом случае необходимо предварительное удаление из плазмы гепарина (см. раздел 3.11).

Примечание. В ряде случаев при определении ТВ используют раствор тромбина, имеющий активность при свертывании контрольной нормальной плазмы 8-10 с или 16-21 с.

3.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИБРИНОГЕНА В ПЛАЗМЕ

Определение фибриногена в плазме крови принадлежит к числу наиболее широко используемых тестов, применяющихся не только при диагностике нарушений гемостаза, но и при распознавании и оценке тяжести воспалительных, иммунных, деструктивных и неопластических процессов, при которых возникает гиперфибриногенемия как острофазовая реакция. Последняя является также фактором повышенного риска развития гипервискозного синдрома, артериальных тромбозов и инфарктов органов.

Снижение концентрации фибриногена наблюдается при катастрофическом и остром ДВС-синдроме, лечении фибринолитиками, а также при врожденных гипо- и дисфибриногенемиях.

Предложено множество различных методов определения содержания фибриногена в плазме, показания которых могут существенно отличаться друг от друга, особенно при значительной гипо- или гиперфибриногенемии.

Далее приводятся наиболее приемлемые и часто применяемые способы определения концентрации фибриногена в плазме.

3.8.1. Гравиметрический метод (по Р.А. Рутберг)

Принцип. Образовавшийся после свертывания плазмы фибрин быстро высушивают и по весу сгустка определяют содержание фибриногена в плазме.

Реактивы. 1. Экстракт тканевого тромбопластина в 0,05 М трис-буфере, (или буфере Михаэлиса), pH 7,3-7,4, для чего навеску сухого тромбопластина (50 мг) помещают в фарфоровую ступку и тщательно растирают в 1,0 мл буфера. Постепенно объем смеси увеличивают добавлением буфера до 5,0 мл. Полученный экстракт центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин, надсадочную жидкость отделяют и используют для анализа. Экстракт тромбопластина хранится при +2...+8°C и может использоваться в течение 3 суток.

2. Хлорид кальция, 5% раствор.

Активность тромбопластина для выполнения методики может быть в пределах 11-20 с.

Примечание. Замена тромбопластина (в смеси с хлоридом кальция) на раствор тромбина (активностью 10-15 с) или использование для получения

фибринового сгустка только 5% раствора хлорида кальция нежелательны и могут привести к ложному занижению результатов определений при ДВС-синдроме и гепаринотерапии.

Материал для исследования. Цитратная богатая или бедная тромбоцитами плазма.

Далее приводится описание метода на примере использования диагностикума "Квик-Фг-тест", фирмы Технология-Стандарт.

Ход определения. К 1,0 мл плазмы в пробирке последовательно добавляют 0,1 мл эмульсии тромбопластина и 0,1 мл 5% раствора хлорида кальция. Смесь инкубируют на водяной бане (+37°C) 10 мин, после чего образовавшийся сгусток переносят на фильтровальную бумагу и высушивают путем сжатия и перемещения сгустка по фильтру. Такое высушивание продолжают до тех пор, пока на фильтре не перестанут определяться следы влаги. Сгусток фибрина выдерживают на открытом воздухе при комнатной температуре (+18...+25°C) в течение 15-20 мин и взвешивают на торзионных весах.

Чтение результатов. При умножении массы фибрина на коэффициент, равный 0,2, рассчитывают содержание фибриногена в плазме в г/л. Данный коэффициент рассчитан только для описанной выше методики определения.

В норме вес фибринового сгустка составляет 10-20 мг, а содержание фибриногена в плазме - в пределах 2,0-4,0 г/л.

Недостатки метода. Ошибки метода могут быть связаны с потерей частиц сгустка в пробирке и на фильтре, недостаточным высушиванием фибрина, что ведет к завышению его массы (ложный сдвиг в сторону гиперфибриногенемии) либо пересушиванием, снижающим вес сгустка (ошибочный сдвиг в сторону гипофибриногенемии). Затруднения возникают также в случае глубокой гипофибриногенемии (например, при остром ДВС-синдроме), когда образуется рыхлый, легко распадающийся на мелкие части сгусток, собрать и взвесить который трудно или невозможно, слабо выраженном свертывании при лечении гепарином или гирудином. Метод не оперативен, требует расхода большого количества крови исследуемого.

Варианты методики. У больных, получающих лечение обычным гепарином, перед выполнением теста следует удалить из плазмы гепарин сорбентом (см. раздел 3.11.). В этом же случае, а также при ДВС-синдроме, когда в крови появляется большое количество ПДФ, можно выполнить методику с заменой тромбопластина-Са ядом

эфы песчаной или многочешуйчатой (*Echis carinatus*, *Echis multisquamatus*) активностью 15-20 с. Вызываемое этими ядами свертывание не ингибируется ни гепарином, ни ПДФ.

3.8.2. Фотометрический метод¹

Принцип. Определяют фотометрическим методом количество фибриногена после его свертывания высоко активным тромбином в смеси с моноиодацетатом. Моноиодуксусная кислота инактивирует фактор ХШ, что делает сгусток растворимым в уксусной кислоте и препятствует включению в него посторонних плазменных белков.

Реактивы. 1. Фосфатный буфер 0,06 М (рН 7,0). Приготавливается следующим образом: смешивают 190 мл 0,5 М KH_2PO_4 (68,045 г на 1 л) и 110 мл 0,5 Н едкого натра. Для работы 20 мл этого основного буферного раствора доводят до объема 100 мл дистиллированной водой.

2. Физиологический (0,9%) раствор хлорида натрия.

3. 0,04 М раствор моноиодуксусной кислоты в 0,06 М фосфатном буфере (40 мг моноиодуксусной кислоты в 5 мл буфера).

4. Тромбин человека или бычий, 50 НИН ед/мл.

5. Уксусная кислота, 1,5% раствор.

Оборудование. Спектрофотометр с измерением оптической плотности в зоне ультрафиолета (280 и 320 нм).

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. В пробирку с 0,2 мл плазмы добавляют 1,6 мл фосфатного буфера и помещают на водяную баню (+37°C). Через несколько мин в смесь вносят 0,1 мл раствора моноиодуксусной кислоты и, спустя 3 мин, добавляют 0,1 мл раствора тромбина. После добавления каждого компонента содержимое пробирки тщательно перемешивают стеклянной палочкой (с шероховатой поверхностью на конце), оставляя ее в пробирке. Полученную смесь инкубируют при +37°C не менее 15 мин (более продолжительная инкубация допускается). Образовавшийся сгусток фибрина извлекают,

¹ Белицер В.А., Варецкая Т.В., Веремеенко К.Н. и др. Методы определения фибриногена и компонентов фибринолиза плазмы крови человека. Методические рекомендации. - Киев, 1983. - 20 с.

наматывая на палочку, и отжимают о стенку пробирки. Сгусток промывают дважды в 50 мл физиологического раствора хлорида натрия. Затем один раз промывают в охлажденной дистиллированной воде. Воду с поверхности сгустка дополнительно удаляют фильтровальной бумагой. Полученный сгусток растворяют при помешивании в 5 мл 1,5% раствора уксусной кислоты при комнатной температуре. Растворение заканчивается за 5 мин. Содержание белка в растворе определяют спектрофотометрически, проводя измерения при 280 и 320 нм. Экстинция устойчива, время измерения может быть выбрано произвольно.

Чтение результатов. Концентрацию фибриногена (X) в исследуемом образце плазмы рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{E_{(280 - 320)} \times 255}{15,067}$$

где $E_{(280 - 320)}$ - разница величин экстинции при 280 и 320 нм, чем достигается необходимая поправка на мутность; 255 - коэффициент для выражения количества фибриногена в г/л при анализе, выполненном с 0,2 мл плазмы; 15,067 - коэффициент экстинции для фибриногена в кислой среде при длине волны 280 нм (E 1% 1 см).

В норме содержание фибриногена, определенное по этому методу, составляет 2,0 - 4,0 г/л.

Достоинства и недостатки метода. Метод имеет удовлетворительную точность определений, не чувствителен к терапевтическим концентрациям гепарина, но требует измерений в ультрафиолетовой зоне спектра, т.е. использования спектрофотометра. Известный недостаток связан также со свойством моноиодацетата вызывать аллергические реакции.

3.8.3. Хронометрический метод (по Клауссу)

Принцип. Определяют время свертывания разведенной цитратной плазмы избытком высокоактивного тромбина. Время свертывания при этом зависит от концентрации фибриногена в плазме, которую определяют по калибровочному графику. Методика выполняется только на коагулометрах.

Реактивы и оборудование. 1. Тромбин человека активностью 100 NIH ед/мл, содержит каолин.

2. Трис-буфер, 0,05 М (или буфер Михаэлиса), рН 7,3-7,4.

3. Стандартная калибровочная плазма с известным содержанием фибриногена.

4. Коагулометр (мануальные варианты методики имеют неудовлетворительную точность определений).

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ниже приводится описание метода на примере использования диагностикума "Фибриноген-тест", фирмы Технология-Стандарт.

Ход определения. Калибровка коагулометра по фибриногену (построение калибровочной кривой). Флакон с лиофильно высушенной калибровочной плазмой растворяют в требуемом количестве дистиллированной воды (в соответствии с инструкцией к набору реагентов). Получают калибровочную плазму с концентрацией фибриногена, равной 2,50 г/л. Делают ее последовательные разведения (табл. 17).

А. Определение времени свертывания разведений калибровочной плазмы

В кювету коагулометра помещают 0,2 мл одного из разведений плазмы и инкубируют при +37°C в течение 1 мин, затем вносят 0,1 мл раствора тромбина, который до исследования хранят при комнатной температуре (+18...+25°), и начинают отсчет времени свертывания. Этим способом исследуют все разведения калибровочной плазмы. Количество фибриногена в г/л в каждой пробе определяют путем умножения концентрации фибриногена в калибровочной плазме на коэффициент пересчета (см табл. 17). Например, если концентрация фибриногена указана равной 2,50 г/л, то для разведения калибровочной плазмы 1:5 концентрация фибриногена оценивается следующим образом: 2,50 г/л × 2,0 = 5,0 г/л. В коагулометр попарно вводятся значения концентрации фибриногена (в разведениях калибровочной плазмы) и соответствующие им времена свертывания.

Б. Определение концентрации фибриногена в исследуемом образце

Перед проведением анализа плазма больного разводится в 10 раз (1+9), для чего 0,2 мл плазмы, взятой в пробирку, смешивают с 1,8 мл буферного раствора. В кювету коагулометра вносят 0,2 мл

разведенной плазмы и инкубируют при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мин, затем вносят 0,1 мл раствора тромбина (имеющего температуру $+18...+25^{\circ}\text{C}$) и определяют время свертывания.

Таблица 17

Схема разведений калибровочной плазмы при определении концентрации фибриногена по хронометрическому методу

№ разведения	Плазма + буфер	Разведение	Коэффициент пересчета	Концентрация фибриногена, г/л
1	0,2 мл + 0,8 мл	1 : 5	2,0	5,0
2	0,5 мл разведения 1 + 0,5 мл	1 : 10	1,0	2,5
3	0,5 мл разведения 2 + 0,5 мл	1 : 20	0,5	1,25
4	0,5 мл разведения 3 + 0,5 мл	1 : 40	0,25	0,625

Примечание. Концентрация фибриногена (г/л) приводится по отношению к плазме, разведенной в 10 раз. Растворы калибровочной плазмы используют для построения калибровочного графика в течение первых 2 ч.

Чтение результатов. Современные коагулометры после введения калибровочных данных рассчитывают концентрацию фибриногена в исследуемой плазме автоматически. Если конструкцией коагулометра не предусмотрен ввод калибровочных данных и, следовательно, нет автоматического расчета результатов, можно воспользоваться калибровочным графиком (рис. 11).

При определении концентрации фибриногена (в разведении плазмы 1:9) и получении результата, близкого к крайним значениям измеряемого диапазона (менее 1,0 г/л или более 6,0 г/л), рекомендуется повторить анализ с другим разведением исследуемого образца плазмы (соответственно 1:4 - при низкой концентрации фибриногена и 1:19 - при высокой). Полученный результат содержания фибриногена соответственно уменьшают или увеличивают в 2 раза.

В норме, концентрация фибриногена в плазме, определенная по хронометрическому методу, составляет 2,0-4,0 г/л.

Примечание. Методика Клаусса имеет высокую точность определений, не чувствительна к гепарину и используется в большинстве зарубежных лабораторий.

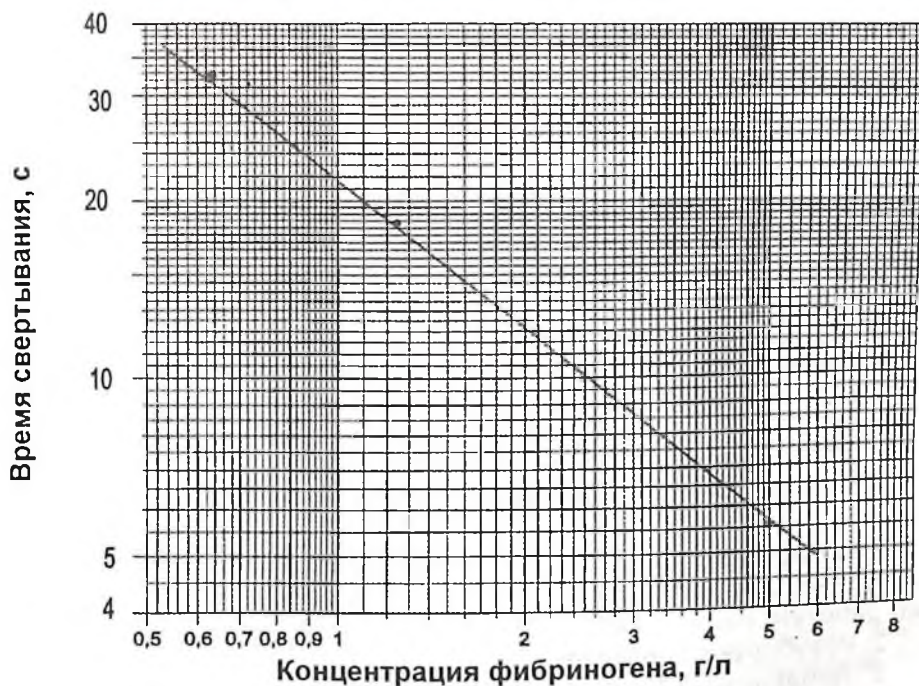


Рис. 11. Система координат и пример построения калибровочной кривой для определения концентрации фибриногена.

3.9. КОАГУЛЯЦИОННЫЕ ТЕСТЫ С ГЕТЕРОГЕННЫМИ КОАГУЛАЗАМИ

3.9.1. Тест с ядом гюрзы обыкновенной (*Vipera lebetina turanica*) - лебетоксовый тест (ЛЕТ)¹

Принцип. Определяют время свертывания плазмы при активации процесса ядом гюрзы, который активирует фактор X в присутствии

¹ См. Диагностика нарушений гемостаза с помощью змеиных ядов. Методические рекомендации МЗ СССР. - М., 1988. З.С. Баркаган, Л.П. Цывкина и др.

ионов кальция и фактора V. Гемокоагулирующее действие яда гюрзы усиливается фосфолипидным компонентом (кефалином или тромбоцитами).

Реактивы. 1. Лебетокс - рабочий раствор яда гюрзы, который получают следующим образом: на дистиллированной воде готовят маточный раствор яда из расчета 10 мг кристаллического вещества на 5 мл воды (2 мг/мл). Маточный раствор оставляют на 1 сутки при +2...+8°C для стабилизации активности (созревания). Из маточного раствора путем последовательных разведений дистиллированной водой готовят рабочие растворы яда гюрзы (до концентрации 0,02 и 0,002 мг/мл). Конкретное разведение змеиного яда с необходимой свертывающей активностью выбирается экспериментальным путем, для чего определяется лебетоксовое время в контрольной нормальной плазме.

2. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. 1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) вносят 0,1 мл исследуемой плазмы и 0,1 мл рабочего раствора лебетокса.

2. Инкубируют 1 мин при +37°C.

3. Добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, имеющего температуру +37°C, включают таймер коагулометра или секундомер и определяют время свертывания.

Аналогичным образом определяют время свертывания в контрольной нормальной плазме.

Чтение результатов. Результат выражают в секундах, сравнивая время свертывания контрольной нормальной и исследуемой плазмы. В норме показатели ЛЕТ колеблются в пределах от 23 до 27 с (25,0±2,0 с).

При совпадении результатов ЛЕТ в исследуемом и контрольном образцах плазмы (разница во времени свертывания не более 3 с) делается заключение об отсутствии дефицита факторов X, V, II и I (фибриногена). Удлинение времени свертывания в указанном тесте в сравнении с контролем более, чем на 3 с, свидетельствует об изолированном или сочетанном дефиците факторов X, V, II или I (фибриногена). При дефиците фактора VII, в отличие от протромбинового теста, время свертывания в ЛЕТ не увеличивается. Гепаринотера-

пия и прием непрямых антикоагулянтов удлиняют время свертывания в ЛЕТ.

Варианты методики. Проба с ослабленным (разведенным в дистиллированной воде до активности 35-55 с) ядом гюрзы используется для выявления волчаночного антикоагулянта при диагностике антифосфолипидного синдрома - АФС (см. раздел 8.1.2.4).

Тест с ядом гюрзы является аналогом используемого за рубежом теста с ядом гадюки Рассела.

3.9.2. Тест с ядом эфы многочешуйчатой (*Echis multisquamatus*) - эхитоксовый тест (ЭХТ)

Принцип. Яд эфы - активатор фактора II (протромбина) под влиянием которого образуется мейзотромбин (*тромбин Em*). Последний, в отличие от обычного α -тромбина, не блокируется гепарином и комплексом "гепарин-антитромбин III", а также способен свертывать не только обычный фибриноген, но и некоторые тромбинрезистентные высокомолекулярные его производные (РФМК), остаточный "сывороточный фибриноген".

Реактивы. На дистиллированной воде готовят маточный раствор яда из расчета 10 мг кристаллического вещества на 5 мл воды (2 мг/мл), оставляют на "дозревание" на 1 сутки при +2...+8°C. Из маточного раствора путем последовательных разведений дистиллированной водой готовят рабочие растворы яда эфы (до концентрации 0,02 и 0,002 мг/мл). Конкретное разведение змеиного яда с необходимой свертывающей активностью выбирается экспериментальным путем, для чего определяется эхитоксовое время в контрольной нормальной плазме.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. 1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) вносят 0,2 мл исследуемой плазмы

2. Инкубируют 1 мин при +37°C.

3. Добавляют 0,2 мл рабочего раствора яда эфы, имеющего комнатную температуру, включают таймер коагулометра или секундомер и определяют время свертывания.

Аналогичным образом определяют время свертывания в контрольной нормальной плазме.

Чтение результатов. Результат выражают в секундах, сравнивая время свертывания контрольной нормальной и исследуемой плазмы. В норме показатели ЭХТ колеблются в пределах от 23 до 27 с ($25,0 \pm 2,0$ с).

При совпадении результатов ЭХТ в исследуемом и контрольном образцах плазмы (разница во времени свертывания не более 3 с) делается заключение об отсутствии дефицита факторов II и I (фибриногена). Удлинение времени свертывания более, чем на 3 с, свидетельствует о дефиците или аномалиях факторов II или I (фибриногена).

Укорочение времени свертывания в ЭХТ свидетельствует о тромбогенном сдвиге в системе гемостаза, угрозе тромботических осложнений. Гепаринотерапия не влияет на показания ЭХТ, в то время как лечение низкомолекулярными гепаринами, непрямыми антикоагулянтами и ингибиторами тромбина (гирудин и др.) удлиняет время свертывания в ЭХТ.

3.9.3. Анцистроновый тест

Принцип. Анцистрон выделяется из яда щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) и представляет собой аналог коагулазы, получаемой из яда змеи *Bothrops atrox*. Анцистрон, так же, как рептилаза, атроксин или батроксобин, запускает свертывание плазмы крови путем превращения фибриногена в фибрин (без участия других факторов гемокоагуляции). От действия тромбина анцистрон отличается тем, что отщепляет от фибриногена только пептиды А, не активирует фактор XIII, а также тем, что эффект анцистрона не блокируется антитромбином III и комплексом "гепарин - антитромбин". Получаемый под его действием фибрин быстро растворяется в 5 М растворе мочевины.

Время свертывания фибриногена плазмы под действием тромбина и анцистрона увеличивается в присутствии продуктов деградации фибриногена/фибрина, при выраженной гипофибриногенемии (менее 1,0 г/л) и качественных дефектах фибриногена. В связи с этим, определение анцистронового времени (в комбинации с тромбиновым тестом) используется для:

- дифференциации причин удлинения тромбинового времени (при лечении анцистроновое время в пределах нормы, тромбиновый

тест удлинён; при увеличении уровня ПДФ удлинено как тромбиновое, так и анцистроновое время);

- контроля за лечением фибринолитиками;
- диагностики наследственных и приобретенных гипо- и дисфибриногенемий.

Реактивы.¹ Анцистрон (лиофильно высушенный), активность эквивалентна 3 NIH ед тромбина. Разводится во флаконе добавлением 1,0 мл дистиллированной воды.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. 1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) вносят 0,2 мл исследуемой плазмы.

2. Инкубируют 1 мин при +37°C.

3. Добавляют 0,2 мл раствора анцистрона, имеющего температуру +37°C, включают таймер коагулометра или секундомер и определяют время свертывания.

Аналогичным образом определяют время свертывания в контрольной нормальной плазме.

Чтение результатов. Результат выражают в секундах, сравнивая время свертывания контрольной нормальной и исследуемой плазмы. В норме показания теста составляют 16-22 с. Совпадение анцистронового времени свертывания в исследуемом и контрольном образцах плазмы говорит об отсутствии дефицита или аномалии фибриногена. Удлинение времени свертывания может быть связано с гипо- или дисфибриногенемией. При гепаринотерапии анцистроновое время не нарушается, но удлиняется под влиянием ПДФ.

3.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ

3.10.1. Дифференциальная диагностика дефицита факторов VIII, IX и XI

Принцип. Все дифференцирующие тесты основаны на принципе коррекции, т.е. на определении того, в какой степени выявленные нарушения коагуляции устраняются или, наоборот, не устраняются

¹ Приводится на основе Инструкции к реагенту "Анцистрон" фирмы Технология-Стандарт.

ингредиентами плазмы с искусственно созданным или естественным (т.е. плазмой, полученной от больных) дефицитом различных факторов свертывания крови.

Данная методика выполняется в тех случаях, когда в плазме больного определяется хорошо выраженное удлинение АПТВ (не обусловленное гепарином - см. раздел 3.11) при нормальном протромбиновом времени. Определяется способность нормальной плазмы, адсорбированной сульфатом бария (дефицитная по фактору IX) и нормальной сыворотки сроком хранения более 24 ч (дефицитная по фактору VIII), полученных от здоровых людей, исправлять показания АПТВ.

Реактивы. 1. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

2. Трис-буфер, 0,05М (или буфер Михаэлиса), рН 7,3-7,4.

3. АПТВ-реагент получают следующим образом: а) на буфере приготавливается взвесь каолина из расчета 5 мг/мл с использованием нефракционированного каолина или, что лучше, 0,25 мг/мл с легкой фракцией каолина; б) готовят 2-3% эмульсию кефалина в дистиллированной воде; в) взвесь каолина смешивают с эмульсией кефалина в объемном соотношении 30:1.

4. $BaSO_4$ -плазма (контрольная нормальная плазма, адсорбированная сульфатом бария). Представляет собой дефицитную по фактору IX плазму, но содержит в достаточном количестве факторы VIII и XI. Приготавливается следующим образом: из цитратной крови путем центрифугирования (см. раздел 11.2) получают 1,0 мл бедной тромбоцитами плазмы. Затем к ней добавляют 100 мг сульфата бария (используется для рентгеноконтрастных исследований) и перемешивают стеклянной палочкой 40 мин на водяной бане при $+37^\circ C$. Смесь центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочный слой ($BaSO_4$ -плазму) снимают и используют в течение рабочего дня.

5. Сыворотка крови здорового человека, предварительно выдержанная при $+37^\circ C$ в течение 24 ч (для полной инактивации в ней тромбина). Представляет собой дефицитную по фактору VIII плазму, но содержит фактор IX. Используется свежеприготовленной.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. Готовят 3 пробирки. В 1-ю вносят 0,05 мл плазмы больного, во 2-ю - 0,05 мл $BaSO_4$ -плазмы и в 3-ю - 0,05 мл сыворотки крови.

В каждую из пробирок добавляют по 0,05 мл плазмы больного. Далее, во всех трех смесях (трех пробирках) определяют АПТВ по следующей методике:

В пробирку к смеси добавляют 0,1 мл АПТВ-реагента. Пробирку встряхивают и помещают на 3 мин на водяную баню при +37°C. При использовании нефракционированного каолина (5 мг/мл) смесь каждые 10-15 с встряхивают для обеспечения максимальной контактной активации. После 3 мин инкубации к смеси добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до +37°C и включают секундомер. Определяют время свертывания при периодическом (раз в 1-2 с) покачивании пробирки.

Чтение результатов. В первой пробирке АПТВ, определенное в плазме больного, должно превышать контрольные значения теста (30-42 с). Если АПТВ нормализуется только во 2-й пробирке, в которую с $BaSO_4$ -плазмой вводят в достаточном количестве фактор VIII, то у больного диагностируется гемофилия А (дефицит фактора VIII). Если нормализации свертывания нет во 2-й пробирке, но есть в 3-й, куда добавлена нормальная сыворотка, содержащая IX фактор, то предполагается наличие гемофилии В (дефицит фактора IX). При гемофилии С (дефиците фактора XI), что бывает гораздо реже, нормализация должна произойти как во 2-й, так и в 3-й пробирке, поскольку XI фактор содержится и в $BaSO_4$ -плазме и в нормальной старой сыворотке.

Методика носит качественный характер и позволяет сориентироваться лишь в варианте имеющейся гемофилии. Для оценки степени тяжести гемофилии выполняют количественное определение дефицита фактора VIII или IX.

3.10.2. Унифицированная методика одностадийного количественного определения факторов VIII и IX¹

Принцип. Исследуют АПТВ разведенной бедной тромбоцитами плазмы больного и разведенной стандартной референтной плазмы, полученной от группы здоровых людей при компенсации возможного снижения всех факторов свертывания, кроме VIII или IX, субстратной плазмой с заведомо известным резко выраженным дефицитом

¹ По результатам исследования рабочей группы Проблемной комиссии РАМН "Патология гемостаза." Гематол. и трансфузиол. - 1991. - N 4. - С. 33-35.

фактора VIII или IX (менее 1%). Содержание дефицитного фактора (в %) в исследуемой плазме определяют по стандартной кривой разведения.

Реактивы. 1. Референтная (бедная тромбоцитами, цитратная) нормальная плазма, полученная из пула плазм 10 здоровых мужчин. Пул-плазму разливают по 1,0 мл в пластиковые пробирки для микропроб или силиконированные флаконы и герметично закупоривают. Хранят при температуре -20°C не более 3 месяцев.

2. Субстратная плазма с глубоким дефицитом (менее 1%) фактора VIII или IX, полученная от больных с тяжелой формой гемофилии. Субстратная плазма с содержанием фактора VIII или IX более 1% или имеющая иммунные ингибиторы факторов свертывания не пригодна. Образцы дефицитной плазмы считаются также пригодными для исследования в качестве реагента, если АПТВ в такой плазме находится в пределах 160-200 с при нормальном протромбиновом времени, т.е. при отсутствии дефицита фактора V и других компонентов, участвующих в процессе свертывания на последующих уровнях коагуляционного каскада.

3. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

4. Трис-буфер, 0,05 М (или буфер Михаэлиса), рН 7,3-7,4.

5. АПТВ-реагент получают следующим образом: а) на буфере приготавливают взвесь каолина из расчета 5 мг/мл с использованием нефракционированного каолина или 0,25 мг/мл с легкой фракцией каолина; б) приготавливают эмульсию кефалина (2-3%) в дистиллированной воде; в) взвесь каолина смешивают с эмульсией кефалина в объемном соотношении 30:1, получая АПТВ-реагент.

Для определения дефицита факторов VIII и IX могут применяться соответствующие фирменные контрольные и субстратные плазмы, а также наборы реагентов для определения АПТВ производства фирм Технология-Стандарт и Ренам (Россия).

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма. Определение активности фактора VIII или IX проводят не позднее, чем через 1 ч после получения исследуемой плазмы.

Ход определения. Предварительно, за 10 мин до начала исследования, пробирки с 0,277% раствором хлорида кальция и АПТВ-реагентом помещают на водяную баню при $+37^{\circ}\text{C}$ и оставляют там до окончания работы. Референтную и субстратную замороженные плазмы оттаивают непосредственно перед началом исследования, помещая микропробирки на 1-2 мин на водяной бане ($+37^{\circ}\text{C}$).

В пробирку последовательно вносят 0,1 мл субстратной плазмы, 0,1 мл исследуемой плазмы, разведенной буфером 1:10 и 0,1 мл АПТВ-реagenta. Перемешивают и помещают на 3 мин на водяную баню (+37°C). При использовании в составе АПТВ-реagenta нефракционированного каолина (5 мг/мл) смесь каждые 30 с встряхивают для обеспечения максимальной контактной активации. Легкая фракция каолина такого перемешивания не требует. По истечении 3 мин в смесь добавляют 0,1 мл 0,277% раствора хлорида кальция, немедленно включают секундомер. Смесь инкубируют на водяной бане еще 30 с и в проходящем свете определяют время образования сгустка при периодическом (раз в 1-2 с) покачивании пробирки. Такое определение проводят в 2 параллельных пробах. По графику в билогарифмической системе координат определяют содержание фактора VIII или IX в исследуемой плазме (в %).

Построение калибровочного графика. Разводят референтную нормальную плазму буфером 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 и 1:160 (табл. 18). Коагуляционную активность в разведении 1:10 принимают за 100%. Концентрация фактора в последующих разведениях соответствует 50, 25, 12,5 и 6,25% от нормы.

При исследовании каждого разведения референтной плазмы 0,1 мл ее смешивают с 0,1 мл субстратной, дефицитной по фактору VIII или IX плазмы, помещают смесь на водяную баню (+37°C). Добавляют к смеси 0,1 мл АПТВ-реagenta. Инкубируют 3 мин при +37°C, затем добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция (+37°C) и включают секундомер. Регистрируют время свертывания в двух параллельных пробах в каждом из разведений. На билогарифмической бумаге строят график разведений, откладывая по оси ординат

Таблица 18

Схема приготовления разведений референтной плазмы для построения калибровочной кривой при определении дефицита факторов VIII или IX

№ раз- ве- дения	Плазма + буфер	Разве- дение	Концентрация фактора, % от нормы
1	0,2 мл + 1,8 мл	1 : 10	100
2	1,0 мл разведения 1 + 1,0 мл	1 : 20	50
3	1,0 мл разведения 2 + 1,0 мл	1 : 40	25
4	1,0 мл разведения 3 + 1,0 мл	1 : 80	12,5
5	1,0 мл разведения 4 + 1,0 мл	1 : 160	6,25

время свертывания в секундах, по оси абсцисс - соответствующие плазменные концентрации фактора VIII или IX. Калибровочный график должен укладываться в прямую линию (рис. 12). Повторные



Рис. 12. Система координат и пример построения калибровочной кривой для определения фактора VIII или IX.

построения графика должны давать линии, параллельные полученной стандартной прямой. Для каждого образца субстратной плазмы строиться новый график, что повышает точность определения.

Определения выполняются на коагулометре или мануально. Ошибка метода в последнем случае составляет $\pm 9,2\%$.

Чтение результатов. Результат выражают в процентном содержании фактора VIII или IX. В норме содержание в плазме фактора VIII (см. табл. 1) колеблется в больших пределах (70-150% и более), но снижается до 5% при легкой форме гемофилии, 2-5% при форме средней тяжести, 1-2% при тяжелой форме и 0-1% при крайне тяжелой форме. Метод используется не только для диагностики и определения тяжести гемофилии, но и для контроля за достаточностью заместительной терапии и предоперационной подготовки больных. Уровень фактора VIII, реже фактора IX, может

снижаться (обычно умеренно) при болезни Виллебранда (больше при III его форме), в результате потребления и инактивации в ходе внутрисосудистого свертывания крови, при наличии в крови иммунного ингибитора фактора VIII или (реже) фактора IX.

3.10.3. Определение активности ингибитора к фактору VIII (Kasper, 1975)

Принцип. Определение активности ингибитора основано на его способности в процессе инкубации с эталонной нормальной смешанной плазмой снижать в ней активность фактора VIII. После 2 ч инкубации определяют остаточную активность (ОА) фактора VIII в разведениях плазмы. При этом находят то разведение, где ОА (по калибровочному графику) находится в пределах от 25 до 75%. Принято, что снижение на 50% активности фактора VIII в эталонной референтной плазме соответствует активности ингибитора, равной 1 Бетесда единице (1 ВЕ).

Реактивы. 1. Дефицитная по VIII фактору плазма с уровнем этого фактора 0-1% и не содержащая ингибитор VIII фактора.

2. Эталонная нормальная плазма или смесь бедной тромбоцитами плазмы от 6-8 здоровых людей (контрольная нормальная плазма), уровень фактора VIII в которой принимается за 100%;

3. Буфер Михаэлиса или трис-НСI буфер (0,05 М), рН 7,3-7,4.

4. АПТВ-реагент получают следующим образом: а) на буфере приготавливается взвесь каолина из расчета 5 мг/мл (с использованием нефракционированного каолина) или 0,25 мг/мл (с легкой фракцией каолина); б) готовят эмульсию кефалина (2-3%) в дистиллированной воде; в) взвесь каолина смешивают с эмульсией кефалина в соотношении 30:1.

5. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Ход определения. 1. Предварительно плазма больного делится на две части, первая из которых не разводится, а другая разводится буфером в пропорции 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 (рис. 13).

2. К неразведенной и каждому образцу разведений плазмы больного, взятых в объеме по 0,2 мл, вносят по 0,2 мл эталонной контрольной плазмы. Отдельно приготавливают смесь из 0,2 мл эталонной контрольной плазмы и 0,2 мл буфера (контроль).

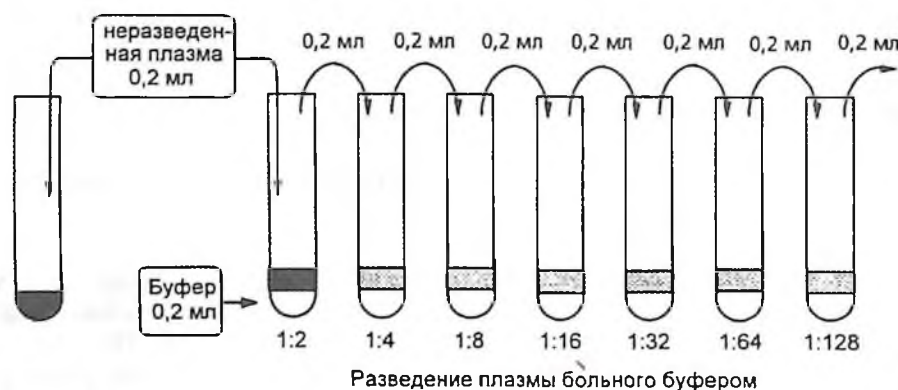


Рис. 13. Схема разведения плазмы больного при определении в ней ингибитора фактора VIII.

3. Все образцы инкубируют на водяной бане (+37°C) 2 ч.
4. Строят калибровочную кривую для определения фактора VIII (см. выше методику количественного определения фактора VIII).
5. Определение количества фактора VIII проводят в смеси неразведенной плазмы больного с эталонной контрольной плазмой, а также в контроле (см. выше п. 2 и 3). Анализ выполняют в соответствии с подразделом "Ход определения" методики количественного определения фактора VIII.
6. Оценку остаточной активности фактора VIII проводят по формуле:

$$OA, \% = \frac{\text{Активность фактора VIII в опыте}}{\text{Активность фактора VIII в контроле}} \times 100$$

Если ОА оказывается менее 25%, то необходимо определить количество фактора VIII в других разведениях плазмы больного, начиная с разведения 1:2 (при такой же предварительной 2-часовой инкубации). При этом ограничиваются исследованием того разведения, в котором ОА фактора VIII находится в пределах 25-75%. По табл. 19, зная точное значение ОА, находят активность ингибитора в единицах Бетесда. Полученный результат в единицах Бетесда умножают на кратность разведения плазмы больного.

Пример. Активность фактора VIII в смеси после 2-х часовой инкубации **неразведенной** плазмы больного с эталонной нормальной плазмой оказалась равной 5%, в то время как активность фактора VIII в контрольном образце (разведенном буфером в 2 раза, см. п. 2 "Ход определения") - 40%. Таким образом, в смеси **неразведенной** плазмы больного с эталонной нормальной плазмой ОА фактора VIII составила $5/40 \times 100\% = 12,5\%$.

В смеси, **предварительно разведенной 1:2** плазмы больного с эталонной плазмой, ОА составила 20%.

В смеси **предварительно разведенной 1:4** плазмы больного с эталонной плазмой, ОА составила 45%.

По табл. 19 ОА фактора VIII, равная 45%, соответствует 1,15 ВЕ. Полученный результат в единицах Бетесда умножают на разведение, т.е. на 4 и получают значение ВЕ, равное 4,6.

Таблица 19

Определение активности ингибитора к фактору VIII

ОА, %	ВЕ	ОА, %	ВЕ	ОА, %	ВЕ
25	2,00	42	1,25	59	0,76
26	1,95	43	1,20	60	0,72
27	1,90	44	1,18	61	0,67
28	1,85	45	1,15	62	0,65
29	1,80	46	1,10	63	0,64
30	1,75	47	1,08	64	0,62
31	1,70	48	1,05	65	0,60
32	1,65	49	1,03	66	0,59
33	1,60	50	1,00	67	0,55
34	1,55	51	0,98	68	0,52
35	1,50	52	0,95	69	0,51
36	1,47	53	0,93	70	0,50
37	1,45	54	0,90	71	0,48
38	1,40	55	0,86	72	0,45
39	1,35	56	0,82	73	0,43
40	1,30	57	0,80	74	0,40
41	1,28	58	0,78	75	0,39

Примечание. Обозначения: ОА - остаточная активность; ВЕ - единица Бетесда.

Чтение результатов. Указанным методом определяют активность ингибитора, который может появляться у больных гемофилией в ряде случаев со значительным нарастанием титра в процессе заместительной терапии. Ингибитор может появляться и у прежде

здоровых людей, особенно при беременности и иммунизации, а также у лиц с иммунными, вирусно-иммунными и лимфопролиферативными заболеваниями. Ингибитор провоцирует кровотечения, резко снижает эффективность заместительной терапии.

3.10.4. Количественное определение дефицита факторов VII, X, V и II¹

Принцип. Дефицит факторов VII, X, V и II проявляется в удлиненном протромбиновом времени. Для диагностики дефицита какого-либо из этих факторов и количественного его определения применяются субстратные плазмы, лишенные VII, X, V или II факторов. В протромбиновом тесте исследуется смесь плазмы больного с субстратной плазмой, имеющей дефицит соответствующего фактора свертывания. При совпадении дефицита фактора в плазме больного и субстратной протромбиновое время остается удлиненным, а если не совпадает, то протромбиновое время резко укорачивается. Содержание дефицитного фактора (в %) в исследуемой плазме определяют по стандартной кривой разведения.

Реактивы. 1. Субстратная плазма с глубоким дефицитом (около 1%) факторов II, V, VII или X, полученная от больных или коммерческая, приготовленная с помощью иммуноадсорбции, лиофилизованная.

2. Контрольная нормальная (бедная тромбоцитами, цитратная) плазма, полученная из пула образцов плазмы 10 здоровых людей.

3. Трис-буфер, 0,05 М (или буфер Михаэлиса), рН 7,3-7,4.

4. Эмульсия тканевого тромбопластина. Приготовление: 50 мг сухого тромбопластина (кадаверного, производства Кировского НИИ-ГиПК или фирмы Технология-Стандарт) помещают в фарфоровую ступку и тщательно растирают в 1,0 мл буфера. Объем смеси увеличивают добавлением буфера до 5,0 мл. Полученную взвесь центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость отделяют и используют для анализа.

5. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

¹ Дифференциальная диагностика дефицита этих факторов может проводиться тестами с ядами змей (см. разделы 1.2.4 и 3.9).

Тромбопластин-кальциевая смесь готовится смешиванием в пробирке равных объемов растворов тромбопластина и хлорида кальция.

Примечание. Последние два реактива (№ 4 и 5) могут быть заменены на растворимый тромбопластин производства фирмы Технология-Стандарт с индексом чувствительности 1,1 или 1,2. Для получения тромбопластин-кальциевой смеси в этом случае во флакон вносят 5,0 мл дистиллированной воды.

Важно учесть, что критерием пригодности разных тромбопластинов является их чувствительность к дефициту факторов протромбинового комплекса, особенно к фактору VII. Удовлетворительной чувствительностью обладают тромбопластины, международный индекс чувствительности (МИЧ или ISI) которых менее 1,4.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. Предварительно, за 10 мин до начала исследования, пробирки с 0,277% раствором хлорида кальция и тромбопластин-кальциевой смесью помещают на водяную баню при +37°C и оставляют там до окончания работы.

В пробирку (или кювету коагулометра) вносят 0,1 мл субстратной плазмы и 0,1 мл исследуемой плазмы, разведенной буфером 1:20. Смесь выдерживают при +37°C в течение 1 мин. По истечении времени инкубации в пробирку добавляют 0,2 мл тромбопластин-кальциевой смеси, немедленно включают секундомер. Определяют время образования фибрина при периодическом (раз в 1-2 с) покачивании пробирки. Такое определение проводят в 2 параллельных пробах. По графику в билогарифмической системе координат определяют содержание фактора II, V, VII или X в исследуемой плазме (в %).

Построение калибровочного графика. Разводят контрольную нормальную плазму буфером в пропорции 1:20, 1:40, 1:200 и 1:2000 (табл. 20). Коагуляционную активность факторов в разведении 1:20 принимают за 100%, а в последующих разведениях - соответственно 50, 10 и 1% от нормы. При исследовании каждого разведения контрольной нормальной плазмы 0,1 мл ее смешивают с 0,1 мл субстратной, дефицитной по фактору VII, X, V или II плазмы, ставят смесь на водяную баню (+37°C). Через 1 мин добавляют 0,2 мл тромбопластин-кальциевой смеси и регистрируют время свертывания. На билогарифмической бумаге строят график разведений, откладывая по оси ординат время свертывания (в сек), по оси абсцисс - соответствующие плазменные концентрации фактора VII, X, V

или II (см. рис. 12). Калибровочный график должен укладываться в прямую линию. Повторные построения графика должны давать линии, параллельные полученной стандартной прямой. Для каждого нового образца субстратной плазмы должен строиться новый график.

Таблица 20

Схема приготовления разведений контрольной нормальной плазмы для построения калибровочной кривой при определении дефицита факторов протромбинового комплекса

№ разведения	Плазма + буфер	Разведение	Активность фактора, % от нормы
1	0,1 мл + 1,9	1 : 20	100
2	1,0 мл разведения 1 + 1,0 мл	1 : 40	50
3	0,4 мл разведения 2 + 1,6 мл	1 : 200	10
4	0,1 мл разведения 3 + 0,9 мл	1 : 2000	1

Чтение результатов. Результат выражают в активности фактора VII, X, V или II (в %). В норме, активность в плазме указанных факторов колеблется в пределах от 70 до 120%.

Метод применяется для:

- диагностики врожденного и приобретенного дефицита факторов VII, X, V или II;
- мониторинга заместительной терапии препаратами крови;
- подробного контроля терапии антикоагулянтами непрямого действия;
- тестирования функции печени при ее заболеваниях.

3.10.5. Определение фактора XIII

3.10.5.1. Методика определения фактора XIII по оценке лизиса фибринового сгустка

Фактор XIII (трансглутаминаза) в активированном, под действием тромбина, состоянии вызывает поперечную сшивку цепей фибрина, стабилизируя, таким образом, фибриновый сгусток. В связи с этим, роль фактора XIII состоит в обеспечении надежного гемостаза при повреждении сосудов, а также успешного заживления раневых поверхностей. Среди методов определения фактора XIII наибольшее

распространение имеет тест оценки лизиса фибринового сгустка, стабилизированного фактором XIII, в мочеvine или монохлоруксусной кислоте и методика с использованием хромогенного субстрата, специфичного по отношению к фактору XIII.

Описание первого из этих методов приведена далее на примере диагностикума "Factor XIII" фирмы Boehringer Mannheim.

Принцип. Разные разведения исследуемого образца плазмы смешивают с высокоочищенным фибриногеном (свободным от фактора XIII) и вызывают свертывание тромбин-кальциевой смесью. К сгусткам фибрина добавляют монохлоруксусную кислоту, способную вызвать быстрый лизис нестабилизированного фибрина. Находят то наименьшее разведение плазмы, где фибриновый сгусток стабилен и не растворяется в течение 5 мин. Параллельно исследуют разведения контрольной нормальной плазмы и также находят наименьшее ее разведение, где сгусток полностью растворился в отмеченный промежуток времени. Сравнивая искомые разведения исследуемой и контрольной плазмы, находят содержание фактора XIII в % к норме.

Реактивы. 1. Фибриноген, очищенный от фактора XIII, лиофилизированный. Разводится дистиллированной водой до концентрации 4,0 г/л.

2. Коагулирующая смесь, содержащая тромбин (5 NIH ед/мл), хлорид кальция и каолин (10 мг/мл). Последний применяется для визуального контрастирования реакции.

3. Монохлоруксусная кислота, 5% раствор.

Кроме того, требуется контрольная нормальная плазма, полученная при смешивании плазмы не менее, чем от 10 здоровых людей, содержание фактора XIII в которой принимается за 100%.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма. Перед исследованием разводится раствором фибриногена в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 и 256 раз.

Определения выполняют со всеми приготовленными разведениями исследуемой и контрольной нормальной плазмы.

Ход определения	Исследуемая плазма	Контрольная нормальная плазма
<i>Пипеткой вносят в стеклянную пробирку:</i>		
1. Одно из разведений плазмы (исследуются все разведения)	0,1 мл	0,1 мл

Продолжение

2. Коагулирующая смесь	0,1 мл	0,1 мл
<i>Перемешивают и инкубируют при температуре 37°C в течение 30 мин, затем вносят монохлоруксусную кислоту.</i>		
3. Монохлоруксусная кислота, 5% р-р	1,0 мл	1,0 мл
<i>Пробирки встряхивают и через 5 мин инкубации при комнатной температуре (+18...+25°C) отмечают растворение сгустка фибрина.</i>		

Чтение результатов. Находят наименьшее разведение исследуемого ($D_{\text{иссл.}}$) и контрольного ($D_{\text{контр.}}$) образцов плазмы, в которых сгусток фибрина полностью растворился. Расчет содержания фактора XIII проводят по формуле:

$$\text{Фактор XIII, \%} = \frac{D_{\text{иссл.}}}{D_{\text{контр.}}} \times 100 .$$

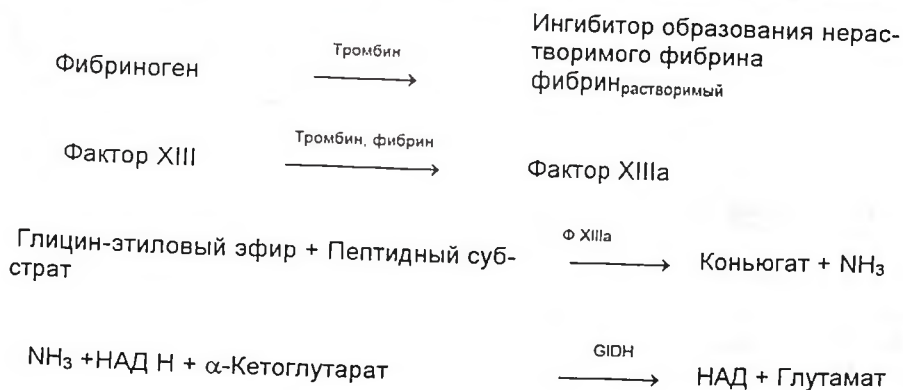
Например, $D_{\text{иссл.}} = 1:16$, $D_{\text{контр.}} = 1:128$; следовательно, содержание фактора XIII = $16/128 \times 100 = 12,5\%$.

В норме, содержание фактора XIII по представленной методике составляет 60-150%.

3.10.5.2. Методика определения фактора XIII с применением хромогенного субстрата¹

Принцип. Фактор XIII в исследуемом образце плазмы активируется тромбин-кальциевой смесью, которая, в то же время, вызывает свертывание фибриногена. При этом коагуляция фибриногена останавливается на уровне образования РФМК (или растворимого фибрина) путем внесения в реагирующую смесь ингибитора полимеризации фибрина. Полученный в результате фактор XIIIa связывает пептидный субстрат с глицин-этиловым эфиром, высвобождая амиак. Последний определяется в ходе ферментативной реакции с α -кетоглутаровой кислотой в присутствии НАД Н. Измеряемым показателем является снижение НАД Н, который определяется фотометрически при длине волны 340 нм.

¹ Описание дано на примере использования диагностикума "Berichrom F XIII" фирмы Dade Behring.



Реактивы. 1. Реагент-активатор. Содержит бычий тромбин (10 НИИ/мл), ингибитор полимеризации фибрина (gly-pro-arg-pro-alamid, 2 г/л), хлорид кальция (1,2 г/л), ингибитор гепарина, буфер ВИСИНЕ (100 ммоль/л) с рН 8,3. Разводится добавлением 5 мл раствора НАДН.

2. Реагент НАДН в концентрации 0,5 г/л. Разводится внесением 5 мл дистиллированной воды.

3. Реагент-детектор. Содержит GIDH (10 МЕ/мл), синтетический пептид в качестве субстрата фактора XIII (2,4 г/л), АДФ, глицин-этиловый эфир (1,4 г/л), α-кетоглутарат (2,7 г/л), альбумин и буфер Нерес (10 ммоль/л) с рН 6,5. Разводится добавлением 5 мл дистиллированной воды.

Непосредственно перед работой приготавливают необходимое количество рабочей смеси реагента путем смешивания одинаковых частей реагента-активатора и реагента-детектора.

Для выполнения исследования необходима также стандартная или контрольная нормальная плазма с известным содержанием фактора XIII или пулированная (взятая не менее, чем от 10 здоровых людей), активность фактора XIII в которой принимается за 100%.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с термостатируемой кюветой. Температура реакции +37°C. Длина волны 340 нм. Ширина оптического пути кюветы 1 см.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения <i>Последовательность операций</i>	Вносимые объемы растворов
<i>Пипеткой вносят в кювету:</i>	
1. Исследуемый образец плазмы	0,1 мл
2. Рабочую смесь реагентов	1,0 мл
<i>Смешивают, включают секундомер и считывают показания поглощения при 340 нм через 5 и 10 мин от начала реакции.</i>	

Чтение результатов. Вычисляют скорость изменения поглощения за 1 мин ($\Delta A/\text{мин}$), которая пропорциональна активности фактора XIII. Результаты могут оцениваться по коэффициенту пересчета (K_n) или исходя из калибровочной кривой, которую строят с использованием серийных разведений стандартной или контрольной нормальной плазмы в физиологическом (0,15 М) растворе хлорида натрия.

Получение коэффициента пересчета:

$$K_n = \frac{\text{Количество фактора XIII в стандартной плазме, \%}}{\Delta A/\text{мин в стандартной плазме}}.$$

Содержание фактора XIII в исследуемом образце плазмы (% от нормы) = $K_n \times \Delta A/\text{мин}$ в исследуемой плазме.

В норме уровень фактора XIII в плазме крови составляет 70-140%. Снижение концентрации фактора XIII в плазме является следствием врожденного дефицита или результатом потребления при внутрисосудистом свертывании крови, например при обширных оперативных вмешательствах. Это может привести к снижению эффективности заживления ран.

3.11. ОЦЕНКА БАЗАЛЬНОЙ КОАГУЛОГРАММЫ В ПРОЦЕССЕ ГЕПАРИНОТЕРАПИИ

В тех случаях, когда в комплексную терапию больных уже включены введения обычного (ОГ) или низкомолекулярных гепаринов (НМГ), либо при получении крови на исследование из гепаринизированных катетеров, возникают существенные трудности в контроле за базисным состоянием параметров гемокоагуляции. В подобных случаях может быть использована методика оценки коагулограммы после удаления из ис-

следуемой крови гепаринов с помощью специально предназначенных для этой цели сорбентов.

Методика сорбции обычного гепарина и НМГ¹

Принцип. Сорбенты гепаринов представляют собой порошок, связывающий на ионообменном принципе гепарин и НМГ. Сорбент водонерастворим, что позволяет удалять его из плазмы вместе со связавшимся с ним гепарином.

Далее приводится описание метода на примере использования набора сорбентов "Гепасорб" фирмы Технология-Стандарт.

Реактивы. 1. Сорбент Гепасорб-1 применяется для удаления из плазмы гепарина при определении ТВ, активности плазменного антитромбина (ПАТ) и концентрации фибриногена.

2. Гепасорб-2 применяется с этой же целью при определении ПВ, АПТВ/АЧТВ и концентрации фибриногена (гравиметрически).

Примечание. Использование Гепасорба-2 при определении каолинового времени бедной тромбоцитами плазмы не допускается.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Методика сорбции. 1. В пробирку к 1,0 мл исследуемой бедной тромбоцитами плазмы добавляют 10 мг сорбента Гепасорб-1 (при определении ТВ, фибриногена и ПАТ) или 20 мг сорбента Гепасорб-2 (при определении АПТВ и ПВ).

2. Содержимое пробирки перемешивают встряхиванием при комнатной температуре в течение 8 мин, исключая образования пены и оседания сорбента на дно пробирки.

3. Смесь центрифугируют при 1500 об/мин в течение 2 мин, плазму отделяют от осадка и исследуют параметры коагулограммы в течение первого часа после сорбции.

Диагностическое значение. Методика позволяет эффективно освобождать плазму крови от гепаринов и правильно оценивать фоновые сдвиги коагулограммы, в том числе определять степень снижения прогрессивной активности ПАТ у больных, получающих гепаринотерапию.

¹ Момот А.П., Соколов Э.А., Цеймах И.Я. Клин. лаборат. диагностика. - 1995. - N 5. - С. 31-34.

Особое значение методика имеет при исследовании больных в процессе лечения тромбозов и тромбозмболий. До настоящего времени сроки этого лечения устанавливаются эмпирически, и часто при раннем прекращении терапии возникают рикошетные тромбозы. С другой стороны, нередко гепарины применяются у подобных больных слишком долго, что не только повышает стоимость лечения, но и способствует развитию осложнений (снижения уровня ПАТ, остеопороза и др.).

Тесты с использованием сорбентов позволяют определять без отмены препаратов, сохраняется ли еще фоновая гиперкоагуляция и облегчают ориентировку врача в необходимых сроках проведения гепаринотерапии. Использование сорбентов гепарина делает возможным также исследование крови, получаемой из гепаринизированных катетеров.

Гипокоагуляция, обусловленная лечением фибринолитиками (стрептазой, авелизином) и гирудином, сорбентами гепарина, не корригируется.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ

4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИТРОМБИНА¹

4.1.1. Метод определения прогрессивной активности антитромбина

Принцип. Метод предназначен для выявления снижения активности (в отсутствии гепарина) плазменного антитромбина. Последнюю (принцип Abildgaard et al.²) определяют по способности исследуемой плазмы инактивировать тромбин, для чего ее предварительно обрабатывают сорбентом гепарина³, затем подвергают тепловой дефибринации и смешивают со стандартным количеством тромбина. После инкубации смеси в ней определяют остаточную коагуляционную активность тромбина. По уровню снижения активности тромбина в процентах от нормы оценивают активность ПАТ в исследуемой плазме.

Реактивы. 1. Трис-НСI буфер 0,05 М, рН 7,4.

2. Раствор тромбина в буфере: 0,2 мл раствора должны свертывать 0,3 мл 0,4% раствора фибриногена за 15-16 с. Рабочий раствор тромбина готовят в пластиковой или силиконированной пробирке, хранят при комнатной температуре (не при +37°C!) и используют в тесте в день исследования.

3. Сорбент гепарина Гепасорб-1 (фирма Технология-Стандарт).

¹ Ранее обозначавшегося как антитромбин III.

² Abildgaard U., Gravem K., Godal H.C. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* - 1970. - vol. 24, N 1/2. - P.224.

³ Момот А.П., Соколов Э.А., Цеймах И.Я. Значение элиминации из плазмы гепарина для оценки коагулограммы и активности антитромбина III. - *Клин. лаборат. диагностика.* - 1995. - N 5. - С. 31.

4. Свежеприготовленный раствор фибриногена в концентрации 3,5-4,0 г/л, который применяют для тестирования остаточной активности тромбина. Допускается замена раствора фибриногена контрольной нормальной бедной тромбоцитами цитратной плазмой, разведенной буфером в два раза.

5. Свежая пулированная цитратная бедная тромбоцитами плазма, полученная от 6-8 здоровых людей, или коммерческая контрольная нормальная плазма, с известной активностью ПАТ, которую используют для построения калибровочной кривой.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Приготовление сорбированной и дефибринированной плазмы

В пробирку, содержащую 1,0 мл исследуемой плазмы, вносят 10 мг сорбента гепарина. Постоянно встряхивая пробирку, перемешивают ее содержимое при комнатной температуре в течение 8 мин, исключая образование пены и осадка на ее дне. После этого, смесь центрифугируют в течение 2 мин при 1000-1500 об/мин. Плазму в надосадке переносят в чистую пробирку и дефибринируют на водяной бане при $+56^{\circ}\text{C}$ в течение 6 мин, после чего вновь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, снимают надосадочную часть и исследуют в течение первых 2 ч.

Ход определения. В пробирку вносят 0,4 мл рабочего раствора тромбина и прогревают его на водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин. Затем добавляют 0,1 мл исследуемой адсорбированной и дефибринированной плазмы, включают секундомер. Через 2 мин (точно!) 0,2 мл смеси переносят в пробирку с 0,3 мл раствора фибриногена (или разведенной контрольной пулированной плазмы), предварительно подогретой до $+37^{\circ}\text{C}$. Немедленно включают секундомер и регистрируют время свертывания.

По калибровочной кривой находят активность ПАТ в %.

Построение калибровочной кривой. Пулированную плазму здоровых людей подвергают дефибринированию, как указано выше. Затем из нее готовят разведения для построения калибровочной кривой в соответствии с табл. 21.

С каждым из разведений определяют время свертывания по указанной выше методике. Все измерения проводят трижды, рассчитывают средний результат. При построении калибровочной кривой по логарифмической оси ординат откладывают время свертывания в

Таблица 21

Схема приготовления разведений пулированной плазмы для построения калибровочной кривой при определении активности ПАТ

Номер разведения	Плазма + буфер	Активность ПАТ, %
1	Плазма без буфера	100
2	0,2 мл + 0,2 мл	50
3	0,1мл + 0,3 мл	25

секундах, по оси абсцисс - активность ПАТ в % в соответствии с указанными выше разведениями. Примерная калибровочная кривая приведена на рис. 14.

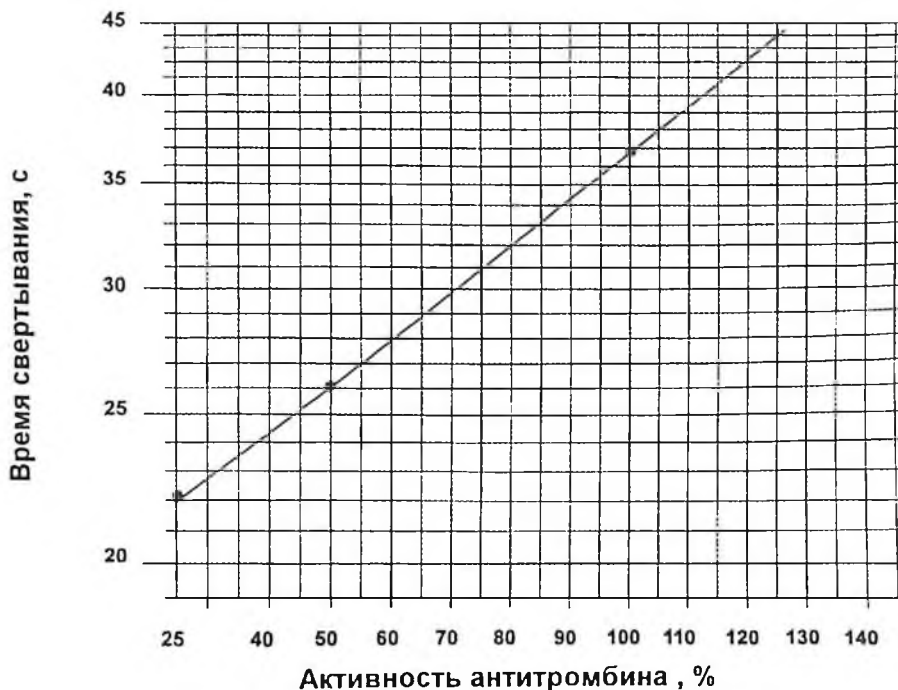


Рис. 14. Система координат и пример построения калибровочной кривой для определения прогрессивной активности плазменного антитромбина.

Калибровочную кривую для одного типа и одной серии тромбина и буфера строят однократно. Периодически контролируют лишь активность рабочего раствора тромбина.

Чтение результатов. В норме прогрессивная активность ПАТ составляет 85-115%. При ряде вариантов наследственной тромбофилии, а также в процессе развития острого ДВС-синдрома, при лечении L-аспарагиназой поздних гестозах, приеме эстрогенных противозачаточных средств, тяжелых поражениях печени, активность ПАТ в плазме часто снижается. Последнее может наступить и при длительном применении больших доз гепарина.

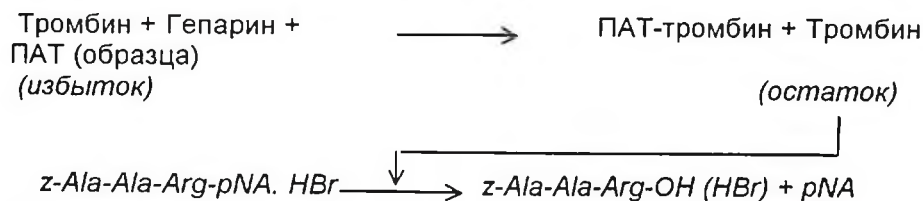
С другой стороны, при дефиците и определенных аномалиях ПАТ, являющегося плазменным кофактором гепарина, антикоагулянтный эффект гепарина ослабляется. Поэтому при всех перечисленных патологических состояниях и лекарственных воздействиях необходим контроль за активностью ПАТ в плазме. Модификация данной методики заключается в том, что по ней можно определять прогрессирующую активность ПАТ не только в обычных условиях, но и во время проведения гепаринотерапии. Гепарин в концентрации до 7,5 ед/мл и фраксипарин в концентрации до 2,0 анти-Ха ед/мл плазмы не влияют на результаты исследования, поскольку удаляются по условиям методики сорбентом гепарина.

4.1.2. Методы определения гепарин-кофакторной активности антитромбина

4.1.2.1. Вариант с использованием хромогенного субстрата

Принцип. Плазменный антитромбин¹ в присутствии гепарина быстро ингибирует α -тромбин. В результате, после внесения тромбин-гепаринового реагента в исследуемую плазму, происходит быстрая инактивация тромбина. Скорость гидролиза нитроанилиновой связи хромогенного субстрата зависит от остаточной активности тромбина после инкубации с исследуемой плазмой. Регистрируют изменение оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 405 нм после добавления уксусной кислоты (в двухточечном варианте для остановки реакции).

¹ Ранее обозначавшийся как антитромбин III.



В зависимости от варианта методики выделяют кинетический и двухточечный методы определения гепарин-кофакторной активности. Далее приводится описание двухточечного варианта на примере использования диагностикума "ХромоТех-Антитромбин" фирмы Технология-Стандарт.

Реактивы. 1. Тромбин человека, 500 NIH ед. Разводится добавлением 10 мл дистиллированной воды. Рабочий раствор тромбина получают дополнительным разведением маточного раствора тромбина растворителем для тромбина в соотношении 1:15.

2. Растворитель для тромбина содержит ϵ -аминокапроновую кислоту, альбумин человека и стабилизаторы.

3. Хромогенный субстрат z-Ala-Ala-Arg-pNA¹. Разводится добавлением 6,0 мл дистиллированной воды.

4. Стандартная плазма с известным содержанием ПАТ.

5. Буфер для разведения образцов плазмы (трис-HCl, 0,1 М, pH 8,2, содержит гепарин и стабилизаторы).

Для выполнения определений дополнительно необходимы: 30% раствор уксусной кислоты и физиологический (0,15 М) раствор хлорида натрия.

Специальное оборудование. Спектрофотометр СФ-26, СФ-46 или аналогичные. Используемая длина волны 405 нм. Требуемая ширина оптического пути кюветы - 1 см. Удобны в использовании и экономичны фотометры с термостатом зарубежных производителей, например, RA-50 (Bayer Diagnostics) или коагулометр со сменными светофильтрами CD 4 (DiaMed AG).

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

¹ Заявка на патент № 2000130498. Воюшина Т.Л., Макаров В.А., Неведрова О.Е., Дрозд Н.Н., Момот А.П. Способ определения активности анти-тромбина III. Приоритет от 6.12.2000.

Перед проведением анализа исследуемую плазму (50 мкл или 0,05 мл) смешивают в пробирке с 50 мкл буфера и 3,0 мл физиологического (0,15 М) раствора хлорида натрия. Приготовление бланк-разведения: 50 мкл буфера + 3,0 мл физиологического (0,15 М) раствора хлорида натрия.

Ход определения <i>Последовательность операций</i>	Исследуемый образец	Контрольные значения активности тромбина (КЗАТ)
<i>Пипеткой вносят в пластиковую или силиконированную пробирку:</i>		
1. Бланк-разведение	-	0,5 мл
2. Разведенную исследуемую плазму	0,5 мл	-
3. Рабочий раствор тромбина	0,5 мл	0,5 мл
<i>Перемешивают и инкубируют при +37°C в течение 180 с</i>		
4. Хромогенный субстрат	0,5 мл	0,5 мл
<i>Через 120 с (точно!) добавляют уксусную кислоту:</i>		
5. Уксусная кислота, 30% раствор	1,0 мл	1,0 мл
<i>Перемешивают и в течение 60 мин в пробах определяют поглощение (А) на длине волны 405 нм против дистиллированной воды.</i>		

Примечание. Объемы смешиваемых реагентов приведены для использования кювет к спектрофотометрам СФ-26 или СФ-46. Для кювет меньшего размера допускается кратное уменьшение этих объемов.

Чтение результатов. Результаты выражают в % к норме. Содержание ПАТ вычисляют по формулам:

$$\text{ПАТ (\%)} = (A_{\text{КЗАТ}} - A_{\text{образца}}) \times \text{ФП}$$

$$\text{ФП, \%} = \frac{\text{ПАТ}_{\text{стандарт-плазмы}} (\%)}{A_{\text{КЗАТ}} - A_{\text{стандарт-плазмы}}}$$

где $A_{\text{КЗАТ}}$ - поглощение (оптическая плотность) в пробе с контрольным значением активности тромбина; $A_{\text{образца}}$ - поглощение (оптическая плотность) в исследуемом образце плазмы больного; ФП - фактор пересчета; $\text{ПАТ}_{\text{стандарт-плазмы}} (\%)$ - известное содержание ПАТ в стандартном образце плазмы; $A_{\text{стандарт-плазмы}}$ - поглощение (оптическая плотность) в стандартном образце плазмы.

В нормальной плазме содержание ПАТ составляет 75-125% от нормы.

Определение гепарин-кофакторной активности ПАТ используют, в основном, для диагностики ДВС-синдрома и дифференциальной диагностики тромбофилий (связанных и не связанных с дефицитом ПАТ), а также для контроля за лечением этих патологических состояний, определением достаточности заместительной терапии.

4.1.2.2. Коагулометрические варианты

Принцип. ПАТ разведенной исследуемой плазмы в присутствии гепарина быстро инактивирует α -тромбин. Это приводит к удлинению времени свертывания, по которому оценивается активность ПАТ образца. Активность ПАТ, выраженную в процентах к норме, находят по специально построенной калибровочной кривой.

Далее приводится описание метода на примере использования диагностикума "Экспресс-Антитромбин-тест" фирмы Технология-Стандарт.

Реактивы. 1. Тромбин человека, 100 NIH ед. Разводится добавлением 4,0 мл дистиллированной воды. Рабочий раствор тромбина получают дополнительным разведением маточного раствора тромбина растворителем для тромбина в соотношении 1:10.

2. Растворитель для тромбина, содержит альбумин человека и стабилизаторы.

3. Фибриноген человека, лиофилизированный. Разводится дистиллированной водой до концентрации 2,5 г/л.

4. Стандартная плазма с известным содержанием ПАТ. Используется для построения калибровочной кривой.

5. Буфер для разведения образцов плазмы (трис-НСl, 0,1 М, рН 8,2, содержит гепарин и стабилизаторы).

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Перед проведением анализа исследуемую плазму (50 мкл или 0,05 мл) смешивают в пробирке с 2,0 мл буфера.

Ход определения. Построение калибровочной кривой.

Для построения калибровочной кривой готовят серию разведений стандартной плазмы в соответствии с табл. 22.

Таблица 22

Схема приготовления разведений стандартной плазмы для построения калибровочной кривой при определении гепарин-кофакторной активности ПАТ

№ разведения	Разведенный стандарт + буфер	Активность ПАТ, %
1	0,05 мл + 2,0 мл	100
2	0,5 мл разведения 1 + 0,5 мл	50
3	Буфер	0

С каждым из образцов (разведений) стандартной плазмы определяют время свертывания по указанной ниже методике.

Определение времени свертывания разведений калибровочной плазмы

В пробирку (или кювету коагулометра) вносят 0,1 мл одного из разведений стандартной плазмы и 0,1 мл раствора тромбина, который до исследования хранят при комнатной температуре (+18...+25°C). Смесь прогревают на водяной бане при +37°C в течение 2 мин. Затем к смеси добавляют 0,1 мл раствора фибриногена, предварительно подогретого до +37°C, включают секундомер или таймер коагулометра и регистрируют время свертывания.

Этим способом исследуют все калибровочные разведения стандартной плазмы. Определения рекомендуется проводить трижды с каждым разведением стандартной плазмы. При построении калибровочной кривой (рис. 15) по оси ординат откладывают время свертывания в секундах, а по оси абсцисс - активность ПАТ (в % к норме - маркирована на стандартной плазме).

Определение активности ПАТ в исследуемом образце

В пробирку (или кювету коагулометра) вносят 0,1 мл разведенной плазмы больного и 0,1 мл раствора тромбина (имеющего комнатную температуру). Смесь прогревают на водяной бане при температуре +37°C в течение 2 мин, после чего к ней добавляют 0,1 мл раствора фибриногена (+37°C), включают секундомер или таймер коагулометра и определяют время свертывания.

Результаты оценивают по калибровочной кривой.

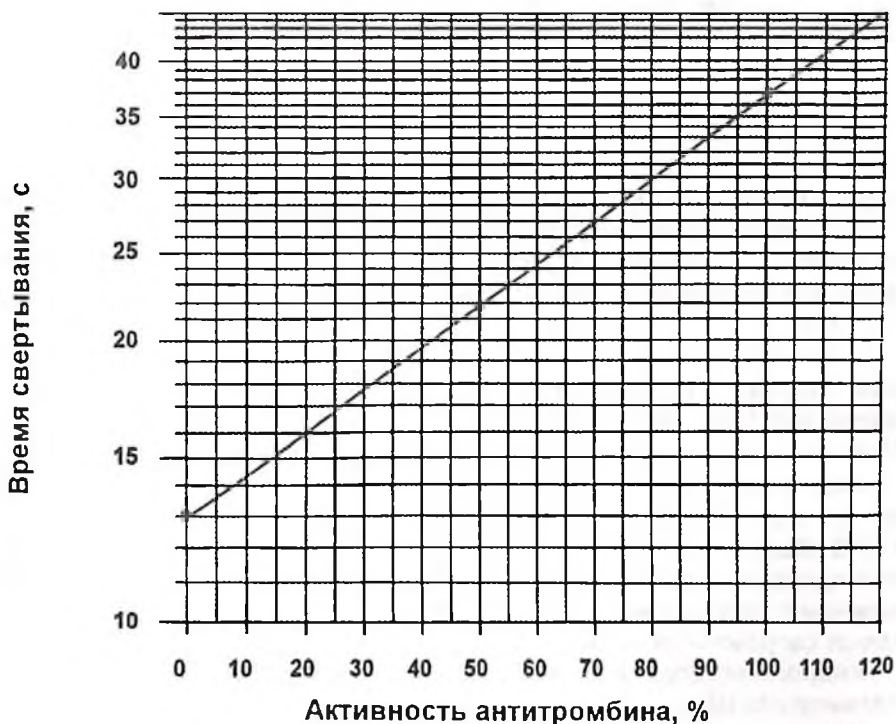


Рис. 15. Система координат и пример построения калибровочной кривой для определения гепарин-кофакторной активности плазменного антитромбина.

Чтение результатов. В норме гепарин-кофакторная активность ПАТ составляет 80-120%. Диагностическая значимость - см. выше.

В Алтайском Федеральном академическом центре по патологии системы гемостаза для скрининга применяется следующий вариант оценки гепарин-кофакторной активности ПАТ.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма крови.

Принцип. При добавлении стандартной дозы гепарина к плазме крови тромбиновое время удлиняется в зависимости от содержания в ней ПАТ и факторов, блокирующих действие гепарина (белки "острой фазы", фосфолипидные мембраны и др.). По

степени удлинения тромбинового времени судят об индивидуальной достаточности антикоагулянтного эффекта гепарина.

Далее приводится описание метода на примере использования диагностикума "Гепарин-тест" фирмы Технология-Стандарт.

Реактивы. 1. Тромбин человека. Разводится добавлением 10 мл физиологического (0,15 М) раствора хлорида натрия. Рабочий раствор тромбина получают разведением маточного раствора тромбина растворителем для тромбина в соотношении 1:17 с тем, чтобы его активность при добавлении к контрольной нормальной плазме (при смешивании равных объемов реагентов) равнялась 15-16 с.

2. Буфер для разведения гепарина (трис-НСI, 0,15 М, рН 7,3-7,4).

3. Гепарин (сухой). Разводится физиологическим (0,15 М) раствором хлорида натрия до концентрации, удлиняющей тромбиновое время свертывания в контрольной нормальной плазме с 15-16 до 65-80 с.

Ход определения. В пробирку (или кювету коагулометра) вносят 0,1 мл контрольной нормальной плазмы и инкубируют 1 мин при +37°C. Затем вносят 0,1 мл рабочего раствора тромбина, который до исследования хранят при комнатной температуре (+18...+25°C), включают секундомер или таймер коагулометра и регистрируют время свертывания, которое должно быть в пределах 65-80 с.

Аналогично определяют время свертывания в контрольной нормальной плазме.

Чтение результатов. По полученным данным рассчитывают индекс антитромбинового резерва плазмы (АРП) по формуле:

$$\text{АРП} = \text{Б/К} \times 100\%,$$

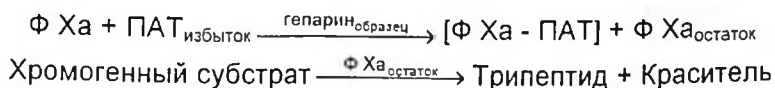
где К – тромбин-гепариновое время свертывания в контрольной нормальной плазме; Б – тот же показатель в плазме больного.

В норме АРП составляет 80-120%. Диагностическое значение имеет снижение АРП, которое может зависеть:

- от снижения уровня ПАТ или уменьшения сродства его к гепарину;
- от избыточного накопления в плазме больного нейтрализующих антикоагулянтное действие гепарина белков "острой фазы" (фибриногена, С-реактивного белка, α_2 -кислого гликопротеина и др.).

4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ГЕПАРИНОВ ПО АНТИ-ХА АКТИВНОСТИ

Принцип. Гепарины усиливают инактивацию фактора Ха и тромбина плазменным антитромбином. При инкубации плазмы, содержащей гепарин, с очищенным фактором Ха часть последнего инактивируется. Остаточную активность фактора Ха определяют по степени гидролиза хромогенного субстрата. Регистрируют изменение оптической плотности (поглощения) на фотометре на длине волны 405 нм после добавления уксусной кислоты (в двухточечном варианте для остановки реакции).



В зависимости от варианта методики выделяют кинетический и двухточечный методы определения остаточной активности фактора Ха. Далее приводится описание двухточечного варианта на примере использования диагностикума "Berichrom Heparin", фирмы Dade Behring.

Реактивы. 1. Хромогенный субстрат Z-D-Leugly-Arg-ANBA-methyl amid. Разводится дистиллированной водой до концентрации 4 ммоль/л.

2. Фактор Ха-реагент, лиофилизированный. Разводится в растворе декстран сульфата, освобождающего гепарин из комплексов с адреналином, фибриногеном и др.

3. Декстран сульфат, лиофилизированный. Разводится дистиллированной водой до концентрации 0,02 г/л.

4. Очищенный ПАТ человека, лиофилизированный. Разводится до концентрации 1 МЕ/мл.

5. Уксусная кислота, 20% раствор.

6. Физиологический (0,15 М) раствор хлорида натрия.

7. Стандартная нормальная плазма или пулированная (взятая не менее, чем от 10 здоровых людей) плазма.

8. Гепарин, используемый в данной ситуации для лечения. Применяется для построения калибровочной кривой.

Специальное оборудование. Спектрофотометр СФ-26, СФ-46 или аналогичные приборы. Используемая длина волны 405 нм. Необходимый оптический путь кюветы - 1 см.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения <i>Последовательность операций</i>	Исследуемый образец	Образец-бланк
<i>Пипеткой вносят в пробирку:</i>		
1. Уксусную кислоту, 20% раствор	-	0,5 мл
2. Исследуемую плазму	0,05 мл	0,05 мл
3. Очищенный ПАТ	0,05 мл	0,05 мл
<i>Перемешивают и инкубируют при температуре +37°C в течение 60 с</i>		
4. Хромогенный субстрат	0,1 мл	0,1 мл
<i>Перемешивают и через 60 с (точно!) в исследуемый образец добавляют уксусную кислоту:</i>		
5. Уксусная кислота, 20% раствор	0,5 мл	-
<i>Перемешивают и в течение 2 ч в пробах определяют поглощение (A) на длине волны 405 нм против образца-бланка.</i>		

Построение калибровочной кривой. Результаты оценивают по калибровочной кривой, которая строится до начала определений с использованием гепарина, применяемого для проведения терапии. Для этого гепарин разводят физиологическим (0,15М) раствором хлорида натрия до 10 МЕ/мл. Затем получают плазму с известным содержанием гепарина, для чего смешивают 0,9 мл стандартной нормальной или пулированной плазмы с 0,1 мл раствора гепарина (10 МЕ/мл).

Титрование НГМ проводится только по их анти-Ха активности, которая у разных препаратов не одинакова. Так, отношение анти-Ха/анти-IIa активностей равно у фраксипарина - 3,1:1, у клексана - 2,7:1, у фрагмина - 2:1 и т.д. Эти показатели служат ориентиром при построении стандартных кривых разведений для определения анти-Ха активности в плазме больного, получающего тот или иной НМГ. У обычного нефракционированного гепарина отношение анти-Ха/анти-IIa чаще всего составляет 1:1.

Образцы, необходимые для построения калибровочной кривой (в диапазоне от 0 до 1 МЕ/мл гепарина), получают в соответствии с табл. 23.

Таблица 23

Схема приготовления образцов плазмы с различным содержанием гепарина для построения калибровочной кривой

Образцы с разной концентрацией гепарина, МЕ/мл	Стандартная нормальная или пулированная плазма, мл	Плазма, содержащая гепарин в концентрации 1,0 МЕ/мл
1,0	0	1,0
0,75	0,25	0,75
0,5	0,5	0,5
0,25	0,75	0,25
0,1	0,9	0,1
0	1,0	0

Чтение результатов. По калибровочному графику определяют концентрацию гепарина в исследуемом образце плазмы.

Выполнение метода позволяет проводить мониторинг антикоагулянтной терапии с использованием препаратов как нефракционированного, так и низкомолекулярного гепарина.

4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ, СВЯЗАННОЙ С ПРОТЕИНОМ С

4.3.1. Скрининг нарушений в системе протеина С

Принцип. Протеин С - синтезируемый в гепатоцитах витамин К-зависимый гликопротеин, циркулирующий в крови в виде профермента. Под действием комплекса тромбин - тромбомодулин (или активатора из змеиного яда, обозначаемого как "протак") протеин С активируется и действует как антикоагулянт, вызывая протеолиз факторов Va и VIIIa в присутствии своего кофактора - протеина S и фосфолипидов. При тромбофилиях нарушения в системе протеина С могут быть обусловлены тремя основными причинами - дефицитом протеина С, дефицитом протеина S или резистентностью фактора Va к действию активированного протеина С. Глобальное из

этих дефектов выполняют в АПТВ (АЧТВ) тесте до и после внесения в плазму активатора протеина С.

Далее приводится описание метода на примере диагностикума "Парус-тест" фирмы Технология-Стандарт (аналога набора реагентов "ProC Global" фирмы Dade Behring).

Реактивы. 1. Активатор протеина С из яда змеи щитомордника *Agkistrodon saxatilis*¹, лиофилизированный. Разводится добавлением 1,0 мл дистиллированной воды.

2. АПТВ-реагент (лиофильно высушенная смесь фосфолипидов и эллаговой кислоты). Разводится добавлением 4,0 мл дистиллированной воды.

3. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

4. Стандартная (контрольная нормальная) плазма.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения.

Исследование стандартной плазмы. 1. В пробирку (или кювету коагулометра), последовательно вносят 0,1 мл АПТВ-реагента, 0,05 мл дистиллированной воды и 0,1 мл стандартной плазмы. Смесь выдерживают при +37°C в течение 5 мин. Затем к смеси добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до +37°C, включают секундомер или таймер коагулометра и регистрируют время свертывания. Результат в секундах обозначают как С₁.

2. В пробирку (или кювету коагулометра), вносят 0,1 мл АПТВ-реагента, 0,05 мл активатора протеина С и 0,1 мл стандартной плазмы. Смесь инкубируют при +37°C в течение 5 мин, после чего добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до +37°C, включают секундомер или таймер коагулометра и измеряют время свертывания. Результат в секундах обозначают как С₂.

Исследование плазмы больного. Выполняется аналогично исследованию стандартной плазмы. Включает в себя определение времени свертывания в секундах в смеси плазмы больного с дис-

¹ Заявка на патент № 2000130028 "Способ получения активатора протеина С" Момот А.П., Ельчанинов В.В., Соколов Э.А., Мамаев А.Н., Коваль А.Д. Приоритет от 30.11.2000.

тиллированной водой - B_1 и в смеси плазмы больного с активатором протеина С - B_2 .

Чтение результатов. В норме C_1 составляет 28-42 с (в зависимости от техники определения), а C_2 превышает 80 с. Если имеются нарушения в системе протеина С удлинение АПТВ (C_2 по сравнению с C_1) выражено в значительно меньшей степени.

По полученным данным рассчитывают нормализованное отношение (НО):

$$\text{НО} = \frac{C_1 \times B_2}{B_1 \times C_2} \times k,$$

где C_1 и C_2 – время свертывания стандартной плазмы с добавлением соответственно дистиллированной воды и активатора протеина С; B_1 и B_2 – время свертывания плазмы больного с добавлением соответственно дистиллированной воды и активатора протеина С; k – нормирующий коэффициент (приведен в паспорте к набору реагентов).

В норме НО превышает 0,7. Все значения НО ниже 0,7 могут быть обусловлены одной из трех причин - дефицитом протеина С, дефицитом протеина S или резистентностью фактора Va к действию активированного протеина С. Для дифференциации этих нарушений оценивают все эти варианты по приводимым ниже методикам.

4.3.2. Определение резистентности фактора Va к действию активированного протеина С

Принцип. Принцип и реактивы те же, что и в методике скрининга нарушений в системе протеина С (см. выше), но для выполнения теста дополнительно требуется дефицитная по фактору V плазма.

Далее приводится описание варианта метода на примере диагностики "Фактор V-PC-тест" фирмы Технология-Стандарт¹.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма. Перед анализом стандартная плазма и образцы плазмы

¹ Патент № 2129282 (Россия). Приоритет от 05.08.96.

больных разводят физиологическим (0,15 М) раствором хлорида натрия в 4 раза, для чего 0,1 мл плазмы смешивают с 0,3 мл физиологического раствора.

Ход определения.

Исследование стандартной плазмы. 1. В кювету коагулометра последовательно вносят 0,05 мл фактор V дефицитной плазмы и 0,05 мл дистиллированной воды. Смесь выдерживают при +37°C в течение 4 мин. Затем к смеси добавляют 0,1 мл разведенной в 4 раза (см. выше) стандартной плазмы и 0,1 мл АПТВ-реагента. Смесь инкубируют при +37°C в течение 3 мин, после чего вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до +37°C, включают таймер коагулометра и регистрируют время свертывания. Результат в секундах обозначают как С₁.

2. В кювету коагулометра последовательно вносят 0,05 мл фактор V дефицитной плазмы и 0,05 мл активатора протеина С. Смесь инкубируют при +37°C в течение 4 мин. Затем к смеси добавляют 0,1 мл разведенной в 4 раза стандартной плазмы и 0,1 мл АПТВ-реагента. Смесь выдерживают при +37°C в течение 3 мин, после чего вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до +37°C, включают таймер коагулометра и регистрируют время свертывания. Результат в секундах обозначают как С₂.

Исследование плазмы больного. Выполняется аналогично исследованию стандартной плазмы. Включает в себя определение времени свертывания в секундах в смеси плазмы больного с дистиллированной водой - Б₁ и в смеси плазмы больного с активатором протеина С - Б₂.

Чтение результатов. В норме С₁ составляет 47-80 с (в зависимости от техники определения), а С₂ превышает 100 с.

Для количественной оценки результатов рассчитывают нормализованное отношение:

$$НО = \frac{С_1 \times Б_2}{Б_1 \times С_2} \times k,$$

где С₁ и С₂ - время свертывания стандартной плазмы с добавлением соответственно дистиллированной воды и активатора протеина С; Б₁ и Б₂ - время свертывания плазмы больного с добавлением соответственно дистиллированной воды и активатора протеина С; k -

нормирующий коэффициент (приведен в паспорте к набору реагентов).

В норме НО превышает 0,8. Все значения НО ниже 0,8 свидетельствуют о резистентности фактора Va к действию активированного протеина С.

Примечание. Ввиду низких значений концентрации фибриногена в анализируемых пробах (смесях) мануальные определения по данному тесту не рекомендуются из-за большого разброса результатов.

4.3.3. Методы определения активности протеина С

4.3.3.1. Коагулометрический вариант (*Martinolli, 1986*)

Принцип. Протеин С в образцах исследуемой плазмы активируют специфическим активатором из яда щитомордника - *Agkistrodon contortrix* ("протаком"). Активированный при этом протеин С вызывает протеолиз факторов Va и VIIIa в дефицитной по протеину С плазме. Последнее приводит к удлинению времени свертывания (в тесте АПТВ), по которому оценивается активность протеина С в исследуемом образце. Активность протеина С, выраженную в процентах к норме, находят по предварительно построенной калибровочной кривой.

Далее приводится описание варианта метода на примере использования диагностикума "*Protein C Reagent coagulometric*" фирмы Dade Behring.

Реактивы. 1. Активатор протеина С, лиофилизированный, разводится добавлением 3,0 мл дистиллированной воды.

2. Плазма, дефицитная по протеину С, лиофилизированная, разводится добавлением 1,0 мл дистиллированной воды.

3. Neothromtin, лиофилизированный - АПТВ-реагент, разводится добавлением 3,0 мл дистиллированной воды.

Кроме того требуются не входящие в состав набора медиаловый буфер (рН 7,6), использующийся для разведения образцов исследуемой и стандартной плазмы и 0,277% раствор хлорида кальция. Для построения калибровочной кривой необходима также стандартная коммерческая или контрольная нормальная плазма с известной активностью протеина С или пулированная (взятая не менее, чем от 10 здоровых людей), активность протеина С в которой принимается за 100%.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Перед проведением анализа исследуемая плазма разводится буфером в 10 раз.

Ход определения. В пробирку (или кювету коагулометра), подогретую до $+37^{\circ}\text{C}$, вносят предварительно прогретые при той же температуре 0,1 мл разведенной (1:10) плазмы, 0,1 мл плазмы, дефицитной по протеину С, 0,1 мл активатора протеина С и 0,1 мл АПТВ-реагента. Смесь выдерживают при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 4 мин. Затем к смеси добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до $+37^{\circ}\text{C}$, включают секундомер или таймер коагулометра и регистрируют время свертывания.

Результаты оцениваются по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой. Приготавливают серию разведений пула контрольной нормальной плазмы или стандартной коммерческой плазмы при помощи мединалового буфера (табл. 24).

Таблица 24

Схема приготовления разведений плазмы для построения калибровочной кривой при определении активности протеина С

№ разведения	Протеин С, %	Разведение	Плазма + буфер
1	200	1 : 5	0,2 мл плазмы + 0,8 мл буфера
2	100	1 : 10	0,1 мл плазмы + 0,9 мл буфера
3	50	1 : 20	0,1 мл плазмы + 1,9 мл буфера
4	20	1 : 50	0,1 мл разведения 1 + 0,9 мл буфера
5	10	1 : 100	0,1 мл разведения 2 + 0,9 мл буфера

С каждым из образцов разведенной плазмы определяют время свертывания по указанной выше методике. При построении калибровочной кривой по логарифмической оси ординат откладывают время свертывания в сек, по логарифмической оси абсцисс - активность протеина С в % в соответствии с указанными в таблице разведениями.

Чтение результатов. В норме активность протеина С составляет 70-140%.

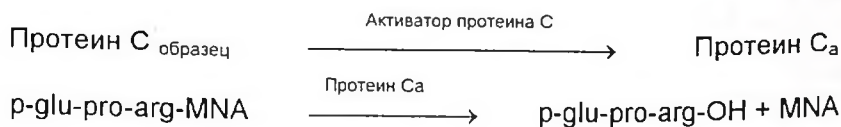
Определение активности протеина С показано в следующих случаях:

- для выявления наследственно обусловленной или приобретенной недостаточности протеина С;
- для проведения мониторинга заместительной терапии концентратами протеина С в случае его наследственного дефицита.

Наследственный дефицит протеина С может приводить к тяжелым тромбозам (тромбофилии). Приобретенная недостаточность протеина С может быть обусловлена дефицитом витамина К, например в результате приема непрямых антикоагулянтов, и наблюдаться при тяжелом поражении печени, остром ДВС-синдроме.

4.3.3.2. Вариант с использованием хромогенного субстрата

Принцип. Протеин С подвергает протеолизу коагуляционные факторы Va и VIIIa. После добавления в исследуемую плазму активатора протеина С ("протака"), образующийся активный протеин С разрушает нитроанилиновую связь хромогенного субстрата, изменяя поглощение на длине волны 405 нм, при этом, скорость гидролиза этой связи зависит от концентрации протеина С.



В зависимости от варианта методики выделяют кинетический и двухточечный методы определения активности протеина С. Далее приводится описание двухточечного варианта на примере использования диагностикума "Berichrom Protein C" фирмы Dade Behring.

Реактивы. 1. Активатор протеина С, лиофилизированный; разводится добавлением 10 мл буфера, содержащего Hepes.

2. Хромогенный субстрат: Pyro-glutamic acid-proline-arginin-methoxy-nitroanilid (p-glu-pro-arg-MNA), лиофилизированный. Разводится дистиллированной водой до концентрации 4 ммоль/л.

3. Раствор буфера Hepes: HEPES (25 ммоль/л), полиэтиленгликоль (2,5 г/л), pH 8,25.

Кроме того, требуется (не входящий в состав набора) 20% раствор уксусной кислоты (для метода оценки по двум точкам). Для выполнения исследования необходима также стандартная коммерческая или контрольная нормальная плазма с известной активностью про-

теина С или пулированная (взятая не менее, чем от 10 здоровых людей), активность протеина С в которой принимается за 100%.

Оборудование. Спектрофотометр СФ-26, СФ-46 или аналогичные. Используемая длина волны 405 нм. Требуемая ширина оптического пути кюветы - 1 см.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения <i>Последовательность операций</i>	Исследуемый образец	Образец-бланк
<i>Пипеткой вносят в пластиковую (силиконированную) пробирку:</i>		
1. Исследуемую плазму	0,1 мл	0,1 мл
2. Активатор протеина С	1,0 мл	-
3. Раствор хлорида натрия, 0,15 М (0,9%)	-	1,0 мл
<i>Перемешивают и инкубируют при температуре +37°С в течение 5 мин</i>		
4. Хромогенный субстрат	0,2 мл	0,2 мл
<i>Немедленно смешивают и одновременно включают секундомер. Через 5 мин добавляют уксусную кислоту:</i>		
5. Уксусная кислота, 20% раствор	1,0 мл	1,0 мл
<i>Перемешивают и в течение 60 мин в пробах определяют поглощение (А) на длине волны 405 нм исследуемого образца против образца-бланка.</i>		

4. Чтение результатов. Результаты выражают в % к норме. Содержание протеина С вычисляют по формуле:

$$\text{Протеин С, \%} = \frac{A_{\text{образца}} \times \text{ПС}_{\text{стандарт-плазмы}} (\%) }{A_{\text{стандарт-плазмы}}}$$

где $A_{\text{стандарт-плазмы}}$ - поглощение (оптическая плотность) в пробе с известным значением активности протеина С; $\text{ПС}_{\text{стандарт-плазмы}} (\%)$ - содержание протеина С в стандартном образце плазмы (значение дается фирмой-производителем); $A_{\text{образца}}$ - поглощение (оптическая плотность) в исследуемом образце плазмы больного.

В нормальной плазме содержание протеина С составляет 70-140%. Значение определения протеина С - см. выше.

Примечание. Важно учитывать, что хромогенный вариант методики определяет суммарную активность протеина С. Коагулометрически же оценивается активность его карбоксилированной части. В связи с этим, результаты коагулометрического и хромогенного методов часто, особенно при лечении непрямыми антикоагулянтами, не совпадают.

4.3.4. Определение активности протеина S (Wolf et al. , 1989; Boyer-Neumann et al., 1990)

Принцип. Протеин S является кофактором активированного протеина С. Анализ тест-системы, содержащей исследуемую плазму, очищенный активный протеин С, субстрат его действия - фактор Va и дефицитную по протеину S плазму, позволяет определить дефицит протеина S в образце исследуемой плазмы.

Содержание протеина S, выраженное в % к норме, находят по предварительно построенной калибровочной кривой.

Ниже приводится описание варианта метода на примере использования набора реагентов "Protein S Clotting-Test" (Boehringer Mannheim, Diagnostica Stago).

Реактивы. 1. Плазма, дефицитная по протеину S, лиофилизированная, разводится добавлением 1,0 мл дистиллированной воды.

2. Активированный протеин С, лиофилизированный, разводится добавлением 1,0 мл дистиллированной воды.

3. Фактор Va, лиофилизированный, разводится добавлением 1,0 мл дистиллированной воды.

Кроме того, требуется (не входящий в состав набора) медулло-буфер, pH 7,35, использующийся для разведения плазмы и 0,277% раствор хлорида кальция. Для построения калибровочной кривой необходима также калибровочная плазма (*Thrombocalibrator plasma*) с известным содержанием протеина S.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Перед проведением анализа 1 объем исследуемой плазмы смешивают с 10 объемами медуллового буфера.

Ход определения. В пробирку (или кювету коагулометра), подогретую до +37°C, вносят предварительно прогретые при той же температуре 0,1 мл разведенной (1:10) исследуемой плазмы, 0,1 мл

плазмы, дефицитной по протеину S, 0,1 мл раствора активированного протеина С и 0,1 мл раствора фактора Va. Смесь выдерживают при +37°C в течение 2 мин. Затем к смеси добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция, предварительно подогретого до +37°C, включают секундомер или таймер коагулометра и регистрируют время свертывания.

Результаты, полученные в сек, переводятся в содержание протеина S в % по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой. Приготавливают серию разведений калибровочной плазмы при помощи мединалового буфера (см. *Инструкцию к набору реагентов*). С каждым из разведений калибровочной плазмы определяют время свертывания по указанной выше методике. При построении калибровочной кривой в билогарифмической системе координат на оси ординат откладывают время свертывания в секундах, на оси абсцисс - содержание протеина S в %, в соответствии с приготовленными разведениями.

Чтение результатов и их толкование. В норме содержание протеина S составляет 65-140%. Снижение содержания протеина S в плазме характерно для тромбофилии, обусловленной нарушением синтеза этого белка. Симптоматические формы дефицита протеина S характерны для К-витаминной недостаточности, действия непрямым антикоагулянтов (кумарины, фенилин), тяжелых поражений печени, острого ДВС-синдрома.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ (ПЛАЗМИНОВОЙ) СИСТЕМЫ

При исследовании системы фибринолиза необходимо учитывать, что плазмин и его активаторы фиксируются в сгустках фибрина (тромбах), где идет интенсивное расщепление субстрата, тогда как в плазме фибринолиз выражен намного слабее из-за блокирования плазмينا α_2 -антиплазмином. Вследствие интенсивной убыли в тромбы и ускорения метаболизма плазминогена и его активаторов при ДВС-синдромах и массивных тромбозах уровень этих компонентов в плазме более или менее значительно снижается. Такое же истощение системы возникает вслед за резкой ее активацией после введения фибринолитиков - стрептокиназы, урокиназы, тканевого активатора плазминогена - ТПА (актилизе, альтеплаза) и др.

5.1. СПОНТАННЫЙ ЗУГЛОБУЛИНОВЫЙ ЛИЗИС (принцип Kowarzyk, Buluk, 1954)

Принцип. При осаждении зуглобулиновой фракции плазмы основные ингибиторы фибринолиза, в частности α_2 -антиплазмин, остаются в надосадочной части и удаляются. Поэтому зуглобулиновый лизис отражает активность фибринолиза в условиях исключения ингибирующего действия антиплазминов. Его скорость отражает, в основном, количество плазминогена и степень его активации в плазме. Определяют время спонтанного лизиса сгустка, получаемого из зуглобулиновой фракции плазмы при добавлении к ней раствора хлорида кальция.

Реактивы. 1. Уксусная кислота, 1% раствор.

2. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

3. Буфер Михаэлиса или Трис-НСI буфер, 0,05 М, рН 7,3-7,4.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. Для получения эуглобулиновой фракции к 8,0 мл дистиллированной воды добавляют 0,15 мл 1% раствора уксусной кислоты и 0,5 мл исследуемой плазмы. После 30-минутного охлаждения смеси в холодильнике при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ эуглобулины осаждают центрифугированием при 1500 об/мин (230 г) в течение 7 мин. Надосадочную жидкость сливают, пробирку осушают опрокидыванием ее на фильтровальную бумагу. Осадок эуглобулинов разводят в 0,5 мл буфера, устанавливают пробирку на водяную баню ($+37^{\circ}\text{C}$). Затем, не вынимая пробирку из бани, добавляют 0,5 мл раствора хлорида кальция, осторожно перемешивают покачиванием пробирки (не встряхивая!) включают секундомер и инкубируют на водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Регистрируют время с момента добавления хлорида кальция до полного растворения сгустка.

Чтение результатов. Результат выражают в минутах. В норме время спонтанного лизиса эуглобулинового сгустка составляет 180-240 мин. Укорочение времени лизиса свидетельствует об активации, а удлинение - об ослаблении фибринолиза. Метод требует учета исходного содержания в плазме фибриногена, т.к. при сниженном его количестве время лизиса укорачивается, что часто ошибочно трактуется как гиперфибринолиз. При гиперфибриногенемии, наоборот, время лизиса удлиняется. Поэтому при значительных отклонениях содержания фибриногена в плазме, а также неполноценной полимеризации фибрина возможно получение ошибочных результатов.

5.2. СТИМУЛИРОВАННЫЙ ЭУГЛОБУЛИНОВЫЙ ЛИЗИС

Принцип. Метод может применяться для изучения потенциальной способности плазминогена к активации при искусственной стимуляции выброса из эндотелия в кровь тканевого активатора плазминогена.

Для этого определяют время спонтанного эуглобулинового лизиса в крови, полученной из вены до и после компрессии сосудов конечности. Венозный стаз осуществляют путем наложения манжеты сфигмоманометра на плечо и поддержания в ней минимального АД (80 мм рт. ст.) в течение 15-20 мин. По истечении этого срока берут вторую порцию крови из локтевой вены той же руки до снятия манжеты и определяют эуглобулиновый лизис. Время лизиса сгустка после венозного стаза укорачивается в норме

в 1,5 - 2 раза, а при недостаточном выходе в кровь ТПА - остается удлинненным.

Варианты методики. В.П.Балуда и М.В.Балуда (1989) предложили проводить это исследование до и после 3-минутного сжатия плеча манжеткой при давлении на 10 мм рт. ст. выше систолического, чем исключается отток крови по глубоким венам и разбавление ТПА.

Преимуществом метода является то, что он не требует двойного прокола вены (иглу в течение 3 мин не извлекают из вены, закрывая ее заглушкой). Недостатки этого варианта методики: более выраженная болезненность, трудности выполнения теста у больных с высоким АД, возможность образования гематомы в зоне прокола.

5.2.1. Эуглобулиновый лизис при активации стрептокиназой

Принцип. Эуглобулиновую фракцию исследуемой плазмы (см. раздел 5.1.), лишенную основных ингибиторов фибринолиза (α_2 -антиплазмина и др.) коагулируют тромбином и определяют время растворения сгустка под влиянием такой концентрации стрептокиназы, которая обеспечивает максимальную активацию плазминогена и его переход в плазмин в кратчайшее время. Методика дает косвенное представление о содержании в плазме плазминогена.

Реактивы. 1. Уксусная кислота, 1% раствор.

2. Буфер Михаэлиса или буфер трис-НСI, 0,05 М, рН 7,3-7,4.

3. Раствор тромбина активностью (при смешивании с контрольной нормальной плазмой в пропорции 1:1) 3-5 с или 50 NIH ед/мл. Высокой активности тромбин используется для избежания неполного свертывания фибриногена и получения неполноценных сгустков, что может исказить результаты исследования (особенно при ДВС-синдроме).

4. Раствор стрептокиназы, 300 МЕ/мл.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. Эуглобулиновую фракцию получают как и в предыдущем методе. Осадок эуглобулинов разводят в 0,5 мл буфера, устанавливают пробирку на водяную баню (+37°). Затем, не вынимая пробирку из бани, добавляют в нее 0,1 мл раствора стрептокиназы и тотчас 0,1 мл раствора тромбина. Включают секундомер и

регистрируют время с момента внесения тромбина до полного растворения сгустка.

Параллельно также исследуют образец контрольной нормальной плазмы.

Чтение результатов. Время лизиса эуглобулинов из исследуемой плазмы сравнивают со средним временем лизиса эуглобулинов, полученным в параллельном исследовании при анализе образцов плазмы здоровых людей. В норме время лизиса эуглобулинов - 75-85 с.

Определяют индекс резерва пламиногена (ИРП) по формуле:

$$\text{ИРП, \%} = \frac{\text{ЛИС}_к}{\text{ЛИС}_и} \times 100,$$

где ЛИС_к - среднее время лизиса эуглобулинов в контроле, ЛИС_и - то же в исследуемом образце. В норме ИРП составляет в среднем 100±10%.

Диагностическое значение. Снижение ИРП свидетельствует об уменьшении уровня или недостаточной активности пламиногена (малой продукции, аномалиях или повышенном его потреблении). Абсолютное снижение уровня пламиногена из-за его потребления и блокады наблюдается при синдромах ДВС, массивных тромбозах, лечении большими дозами тромболитиков. Восстановление резерва пламиногена достигается путем введения в кровоток препаратов пламиногена или содержащих его компонентов крови (в том числе свежезамороженной плазмы, криосупернатанта плазмы и др.).

Таким образом, определение резерва пламиногена имеет значение для диагностики и контролируемого лечения массивных тромбозов, ДВС-синдромов, контроля за лечением тромболитиками.

5.2.2. XIIА-зависимый эуглобулиновый лизис

Принцип. В основу метода¹ положен факт ускорения лизиса эуглобулинов, полученных из обработанной каолином бедной тромбоцитами плазмы.

¹ Еремин Г.Ф., Архипов А.П. В кн.: Система регуляции агрегатного состояния крови в норме и патологии. - М., 1982. - С. 129-132.

Из исследуемой плазмы выделяют зуглобулиновую фракцию, в которой с помощью каолина активирован "мост": "фактор XIIa → калликреин → плазминоген". Определяют время зуглобулинового лизиса при такой активации.

Ниже приводится описание метода на примере использования диагностикума "Фибринолиз-тест" фирмы Технология-Стандарт.

Реактивы. 1. Взвесь каолина (нефракционированного), 5 мг/мл дистиллированной воды.

2. Уксусная кислота, 1% раствор.

3. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

4. Буфер Михаэлиса или трис-HCl буфер, 0,05 М, pH 7,3-7,4.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. К 0,5 мл плазмы добавляют 7,5 мл дистиллированной воды, 0,25 мл взвеси каолина и 0,18 мл раствора уксусной кислоты, смешивают и инкубируют 30 мин на водяной бане при +37°C. Затем смесь центрифугируют 7 мин при 1500 об/мин (230 g). Надосадочную жидкость сливают, пробирку опрокидывают на фильтровальную бумагу и осушают в течение 1 мин. Оставшийся на дне пробирки осадок зуглобулинов разводят внесением 0,5 мл буфера, добавляют 0,5 мл раствора хлорида кальция, осторожно перемешивают покачиванием пробирки (не встряхивая!) и инкубируют на водяной бане при +37°C. Образуется сгусток. Регистрируют время с момента добавления хлорида кальция до полного (при +37°C) растворения сгустка.

Чтение результатов. Нормальный уровень XIIa-зависимого зуглобулинового лизиса (XIIa-ЭЛ) варьирует от 4 до 10 мин (в среднем 7,3 мин).

Замедление лизиса наблюдается за счет снижения уровня или недостаточной активации участвующих в реакции компонентов - фактора XII, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена (ВМК), плазминогена. В связи с высокой лабильностью этой системы, XIIa-ЭЛ может нарушаться при очень многих видах патологии - у большинства больных с тромбозами, при синдроме ДВС, заболеваниях печени, иммунных и иммунокомплексных болезнях и др. При ДВС-синдроме закономерное удлинение времени XIIa-ЭЛ отмечается уже в первой фазе процесса.

Удлинение лизиса (до 30-60 мин и более) чаще всего обусловлено дефицитом плазминогена, реже - фактора XII, плазменного пре-

калликреина или ВМК, либо наличием их ингибиторов, в т.ч. и ПДФ. Для разграничения этих нарушений в систему дополнительно вводят стрептокиназу. При дефиците плазминогена она существенно не ускоряет процесс лизиса, а при дефиците остальных компонентов системы - нормализует его.

5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА НА ОСНОВЕ ЛИЗИСА СГУСТКА ИЗ РАСТВОРИМОГО ФИБРИНА

Принцип. В данном методе¹ субстратом для плазмина служит сгусток фибрина, полученный в результате добавления к плазме специально приготовленного реагента – растворимого фибрина. Определяют время индуцированного стрептокиназой лизиса такого сгустка в разведенной (1:10) плазме, которое отражает содержание в исследуемой плазме плазминогена. Концентрацию плазминогена, выраженную в процентах к норме, находят по предварительно построенной калибровочной кривой.

Далее приводится описание метода на примере использования диагностикума "Экспресс-Фибринолиз-тест" фирмы Технология-Стандарт.

Реактивы. 1. Растворимый фибрин (лиофильно высушенный реагент из плазмы человека), разводится добавлением 2,0 мл дистиллированной воды.

2. Буфер трис-НСI, 0,01 М, рН 7,3-7,4, содержит каолин для контрастирования визуального учета лизиса сгустка.

3. Стрептокиназа (лиофильно высушенная), 5000 МЕ, разводится добавлением 5,0 мл растворителя.

4. Растворитель для стрептокиназы.

5. Стандартная плазма (лиофильно высушенная) с концентрацией плазминогена, равной 100%.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. В пробирку вносят 0,1 мл исследуемой плазмы и выдерживают на водяной бане 1 мин при +37°С. Затем после-

¹ Заявка на патент № 2000120451. Способ определения концентрации плазминогена. Момот А.П., Зяблицкая Н.К., Соколов Э.А. Приоритет от 4.12.2000.

довательно добавляют 0,1 мл раствора стрептокиназы, 0,8 мл буфера (+37°C) и 0,1 мл растворимого фибрина. Немедленно включают секундомер и инкубируют на водяной бане при +37°C. Периодически доставая пробирку из водяной бани (не встряхивая) и плавно наклоняя ее, отмечают время от момента внесения растворимого фибрина до лизиса образовавшегося в ней сгустка.

Примечания. 1. Время от момента добавления к плазме стрептокиназы до внесения растворимого фибрина не должно превышать 15 с.

2. Критерием оценки результата служит распад сгустка на отдельные его фрагменты.

По калибровочной кривой находят содержание плазминогена (в %).

Построение калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой готовят серию разведений стандартной плазмы в соответствии с табл. 25.

Таблица 25

Схема приготовления разведений стандартной плазмы для построения калибровочной кривой при определении содержания плазминогена

№ разведения	Стандартная плазма + буфер	Уровень плазминогена, %
1	Стандартная плазма без буфера	100
2	0,3 мл + 0,1 мл	75
3	0,2 мл + 0,2 мл	50
4	0,1 мл + 0,3 мл	25

С каждым из образцов (разведений) стандартной плазмы определяют время лизиса по указанной выше методике. Все измерения проводят трижды, рассчитывают средний результат. При построении калибровочной кривой в полулогарифмической системе координат по оси ординат откладывают время лизиса в секундах, по оси абсцисс - уровень плазминогена в % в соответствии с указанными выше разведениями. Примерная калибровочная кривая приведена на рис.16.

Чтение результатов. В норме время лизиса фибринового сгустка составляет 48-55 сек ($X=51,2\%$; $\sigma=1,65$; $m=0,34\%$). При этом уровень плазминогена (по калибровочной кривой) варьирует от 86 до 113% ($X=99,8\%$; $\sigma=6,84$; $m=1,39\%$).

Измеряемый диапазон содержания плазминогена по данному методу охватывает пределы от 20 до 130%, что установлено при сопоставлении с амидолитическим методом определения плазминогена.

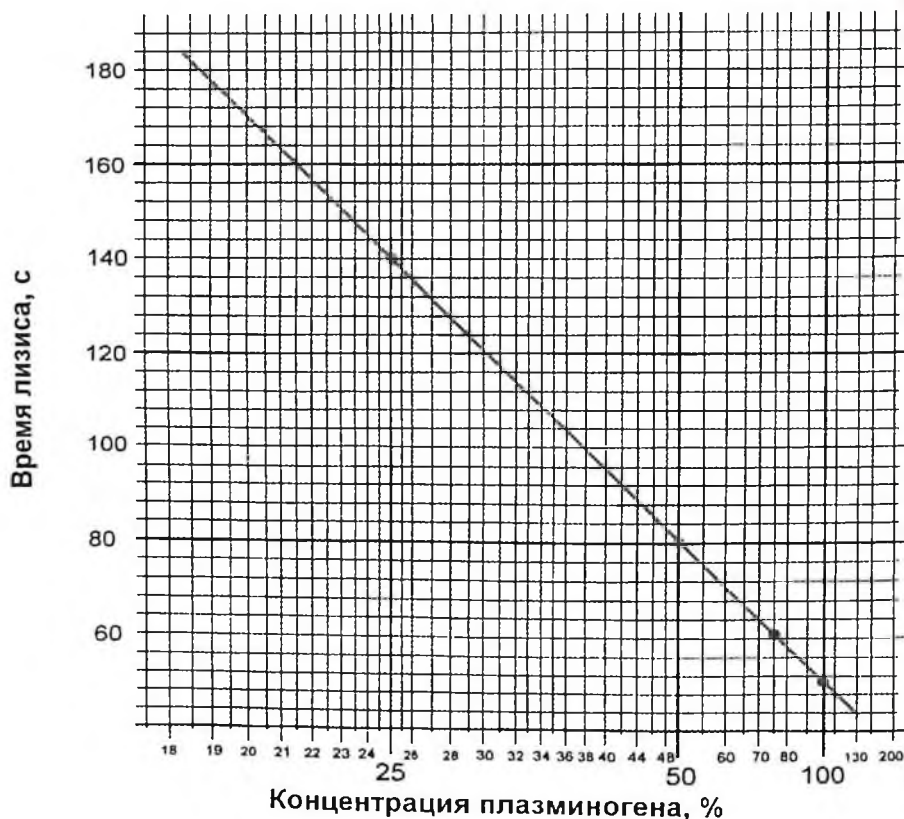


Рис. 16. Система координат и пример построения калибровочной кривой для определения концентрации плазминогена.

При концентрации плазминогена ниже 20% лизис сгустка не происходит. Снижение концентрации плазминогена наблюдается у больных с ДВС-синдромом, при тромбофилиях, связанных с дефицитом или аномалией плазминогена, вслед за введением больших доз тромболитиков.

При сопоставлении результатов определения концентрации пламиногена по данному способу с методикой, основанной на применении хромогенного субстрата (см. раздел 5.5), коэффициент корреляции (r) составил $+0,74$ ($p < 0,005$). Аналогичное сопоставление с ИРП по оценке эглобулинового лизиса при активации стрептокиназой (раздел 5.2.1), выявило r , равный $+0,85$ ($p < 0,001$).

Результаты теста не зависят от уровня фибриногена в исследуемой плазме (в диапазоне от 0,5 до 8,0 г/л).

5.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИПЛАЗМИНОВОЙ АКТИВНОСТИ НА ОСНОВЕ ЛИЗИСА СГУСТКА ИЗ РАСТВОРИМОГО ФИБРИНА

Принцип. В данном оригинальном способе, как и в способе, описанном в разделе 5.3, субстратом для пламина служит гель фибрина, получаемый в результате добавления к плазме специально приготовленного реагента - растворимого фибрина. В двух пробирках определяют время индуцированного стрептокиназой лизиса фибринового сгустка в разведенной (1:10) плазме, которая до внесения в тест-систему растворимого фибрина не инкубировалась (1-я пробирка), либо инкубировалась со стрептокиназой в течение 4 мин при $+37^{\circ}\text{C}$ (2-я пробирка). При инкубации плазмы со стрептокиназой содержащийся в ней пламиноген исследуемого образца плазмы трансформируется в пламин и ингибируется антипламинами. По соотношению времени лизиса инкубированной и не инкубированной со стрептокиназой плазмы, в сравнении с контрольными данными, рассчитывают индекс активности антипламинов.

Ниже приводится описание метода на примере использования диагностикума "*Экспресс-Фибринолиз-тест*" фирмы Технология-Стандарт.

Реактивы и материал для исследования. Те же, что и в способе, приведенном в разделе 5.3.

Ход определения. 1. Определяют время лизиса фибринового сгустка, как описано в разделе 5.3 (пункт "Ход определения"). Результат, полученный в секундах, обозначают как ЛИС_{без инкуб.}.

2. В пробирку вносят 0,1 мл исследуемой плазмы и выдерживают на водяной бане 1 мин при $+37^{\circ}\text{C}$. Затем добавляют 0,1 мл стрептокиназы и дополнительно инкубируют при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 4 мин (точно!). Далее вносят 0,8 мл буфера ($+37^{\circ}\text{C}$) и 0,1 мл растворимого фибрина, немедленно включают секундомер и продолжают инкубацию на водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$. Периодически

извлекая пробирку из водяной бани (не встряхивая) и плавно наклоняя ее, отмечают время от момента внесения растворимого фибрина до лизиса сгустка. Полученный результат обозначают ЛИС_{с инкуб.}

Примечания. 1. Время от момента добавления к плазме буфера до внесения растворимого фибрина не должно превышать 10 с.

2. Критерием оценки результата служит распад сгустка на отдельные его фрагменты.

Аналогично определяют показатели ЛИС_{без инкуб.} и ЛИС_{с инкуб.} в контрольной нормальной плазме.

Чтение результатов. Определяют индекс активности антиплазминов (ИАА) по формулам:

$$\text{ИАА, \%} = \frac{\text{Б}}{\text{К}} \times 100 ;$$

$$\text{Б} = \frac{1}{\text{ЛИС(Б)}_{\text{без инкуб}}} - \frac{1}{\text{ЛИС(Б)}_{\text{с инкуб}}} ; \quad \text{К} = \frac{1}{\text{ЛИС(К)}_{\text{без инкуб}}} - \frac{1}{\text{ЛИС(К)}_{\text{с инкуб}}} ,$$

где, Б - расчетный показатель в плазме больного; К - тот же показатель в контрольной нормальной плазме; ЛИС(Б)_{без инкуб.} - время лизиса плазмы больного без ее инкубации со стрептокиназой, ЛИС(Б)_{с инкуб.} - время лизиса плазмы больного с инкубацией плазмы со стрептокиназой в течение 4 мин, ЛИС(К)_{без инкуб.} - время лизиса контрольной нормальной плазмы без ее инкубации со стрептокиназой, ЛИС(К)_{с инкуб.} - время лизиса плазмы больного с инкубацией плазмы со стрептокиназой в течение 4 мин.

В норме ЛИС(К)_{без инкуб.} - составляет 48-55 с (см. раздел 5.3), а ЛИС(К)_{с инкуб.} - 95-145 с ($X=120,0\%$; $\sigma=25,1$; $m=5,61\%$). Пределы нормальных колебаний ($\pm 1,5\sigma$) индекса активности антиплазминов - 70-120%.

Снижение активности антиплазминов наблюдается вслед за активацией фибринолиза, в т.ч. при ДВС-синдроме, применении фибринолитиков, а также при тяжелом поражении печени. Повышение активности антиплазминов может наблюдаться при злокачественных опухолях и некоторых видах патологии беременности (гестозы), воспалительных процессах, атеросклерозе.

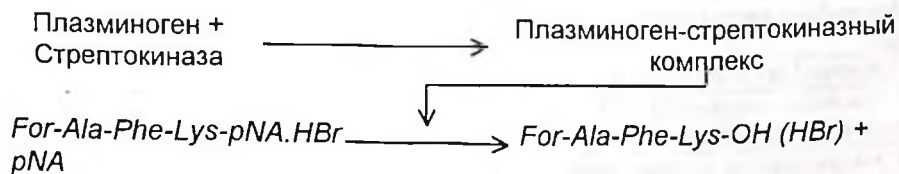
При сопоставлении результатов определения антиплазминов по приведенному способу и методу, основанному на применении хро-

могенного субстрата для оценки α_2 -антиплазмина (см. раздел 5.6), получен коэффициент корреляции (r), равный +0,70 ($p < 0,005$).

Результаты теста не зависят от уровня фибриногена в исследуемой плазме (в диапазоне от 0,5 до 8,0 г/л), но методика не выполняется при концентрации плазминогена в плазме больного ниже 30%.

5.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ХРОМОГЕННОГО СУБСТРАТА

Принцип. При добавлении стрептокиназы к разведенному образцу исследуемой плазмы образуется плазминоген-стрептокиназный комплекс, который обладает способностью расщеплять хромогенный субстрат. Скорость гидролиза нитроанилиновой связи хромогенного субстрата зависит от концентрации в образце плазминогена. Регистрируют изменение оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 405 нм после добавления уксусной кислоты (двухточечный метод).



В зависимости от варианта методики выделяют кинетический и двухточечный методы определения плазминогена. Ниже приводится описание двухточечного варианта на примере использования диагностикума "ХромоТех-Плазминоген" фирмы Технология-Стандарт¹.

Реактивы. 1. Стрептокиназа (лиофильно высушенная), 100 000 ед. Разводится добавлением 6,0 мл буфера.

2. Буфер для разведения стрептокиназы (трис-НСI, 0,05 М, рН 7,4).

¹ Момот А.П., Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Неведрова О.Е., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Ерин Д.Н. Клин. лаборат. диагностика. - 2000. - №3. - С.21-24.

3. Хромогенный субстрат For-Ala-Phe-Lys-pNA.HBr¹. Разводится добавлением 6,0 мл дистиллированной воды.

4. Стандартная плазма с известным содержанием плазминогена.

Для выполнения определений дополнительно необходимы: 35% раствор уксусной кислоты и физиологический (0,15 М) раствор хлорида натрия.

Специальное оборудование. Спектрофотометр СФ-26, СФ-46 или аналогичные. Используемая длина волны 405 нм. Необходимая ширина оптического пути кюветы - 1 см. Удобны в использовании и экономичны фотометры с термостатом зарубежных производителей, например, RA-50 (Bayer Diagnostics) или коагулометр со сменными светофильтрами CD 4 (DiaMed AG).

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Перед проведением анализа 0,05 мл (50 мкл) исследуемой плазмы смешивают в пробирке с 1,0 мл (1000 мкл) буфера.

Ход определения <i>Последовательность операций</i>	Исследуемый образец	Контроль (бланк)
<i>Пипеткой вносят в пробирку:</i>		
1. Физиологический (0,15 М) раствор хлорида натрия	-	0,5 мл
2. Разведенную исследуемую плазму	0,5 мл	-
3. Раствор стрептокиназы	0,5 мл	0,5 мл
<i>Перемешивают и инкубируют при +37°С 10 мин.</i>		
4. Хромогенный субстрат	0,5 мл	0,5 мл
<i>Через 120 с (точно!) добавляют уксусную кислоту:</i>		
5. Уксусная кислота, 35% раствор	0,5 мл	0,5 мл
<i>Перемешивают и в течение 5-10 мин. в пробах определяют поглощение (А) на длине волны 405 нм против бланка.</i>		

Примечание. Объемы смешиваемых реагентов приведены для использования кювет к спектрофотометрам СФ-26 или СФ-46. Для кювет меньшего размера допускается кратное уменьшение этих объемов.

¹ Патент № 2121690 С1 6 G 01 N 33/68, А 61 К 38/03. Способ определения содержания плазминогена и ингибиторов плазмينا в плазме крови. Степанов В.М., Вокушина Т.Л., Терентьева Е.Ю., Мильготина Е.И., Неведрова О.Е., Макаров В.А., Коган А.Е. Приоритет от 16.01.98.

Чтение результатов. Результаты анализа выражают в процентах к норме. Концентрацию плазминогена (С) вычисляют по формулам:

$$C_{\text{исслед образца}} (\%) = (A_{\text{исслед образца}} - A_{\text{бланка}}) \times \text{ФП},$$

$$\text{ФП, \%} = \frac{C_{\text{стандарт-плазмы}} (\%)}{A_{\text{стандарт-плазмы}} - A_{\text{бланка}}},$$

где $A_{\text{исслед образца}}$ - поглощение (оптическая плотность) пробы с исследуемым образцом плазмы; $A_{\text{бланка}}$ - поглощение (оптическая плотность) бланка; ФП - фактор пересчета; $C_{\text{стандарт-плазмы}}$ - концентрация плазминогена в стандартной плазме; $A_{\text{стандарт-плазмы}}$ - поглощение (оптическая плотность) в стандартном образце плазмы.

В нормальной плазме концентрация плазминогена составляет 75-140%.

Линейность при определении количества плазминогена наблюдается в диапазоне от 10 до 150%.

Определение плазминогена используют в процессе ведения больных с ДВС-синдромами, в диагностике тромбофилий, для контроля за лечением тромболитиками (при тромбозах, тромбоемболиях, инфарктах органов).

5.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ α_2 -АНТИПЛАЗМИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ХРОМОГЕННОГО СУБСТРАТА

Принцип. α_2 -антиплазмин (α_2 -АП) является наиболее важным ингибитором фибринолиза, в присутствии которого происходит быстрое формирование необратимого, лишённого активности комплекса "плазмин- α_2 -АП".

Далее приводится описание метода на примере использования диагностикума "Berichrom α_2 -Antiplasmin" фирмы Dade Behring.

Метод основан на определении способности α_2 -АП исследуемого образца плазмы инактивировать добавляемый в плазму очищенный плазмин. Содержание остаточного плазмина определяется по степени гидролиза хромогенного субстрата, специфичного по отношению к этому ферменту.

$$\alpha_2\text{-АП}_{\text{образец}} + \text{плазмин}_{\text{избыток}} = [\alpha_2\text{-АП} - \text{плазмин}] + \text{плазмин}_{\text{остаток}}$$



Реактивы. 1. Плазмин человека, лиофилизированный. Разводится в буфере до концентрации 0,1 СТА Ед/мл.

2. Хромогенный субстрат *D-Norvalylcyclohexylalanil-lysil-p-nitroanilide*. Разводится в дистиллированной воде до концентрации 3 ммоль/л.

3. Раствор буфера: KH_2PO_4 (100 ммоль/л), хлорид натрия (0,15 М г/л), глицерин (250 г/л), pH 7,5

Для выполнения исследования необходима также стандартная или контрольная нормальная плазма с известным содержанием $\alpha_2\text{-АП}$ или пулированная (взятая не менее, чем от 10 здоровых людей), активность $\alpha_2\text{-АП}$ в которой принимается за 100%.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с термостатической кюветой. Температура реакции $+37^\circ\text{C}$. Используемая длина волны 405 нм. Ширина оптического пути кюветы 1 см.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. Предварительно все смешиваемые реагенты подогреваются до температуры $+37^\circ\text{C}$.

Последовательность операций	Исследуемый образец	Контроль (плазмин)
1. Внести в кювету или пробирку:		
исследуемую плазму	20 мкл (0,02 мл)	-
физиологический (0,15 М) раствор хлорида натрия	-	20 мкл (0,02 мл)
раствор плазмينا	1,0 мл	1,0 мл
2. Перемешать и инкубировать при температуре $+37^\circ\text{C}$ в течение 1 мин		
3. Добавить хромогенный субстрат и включить секундомер	0,1 мл	0,1 мл
В течение 30 с учитывают показатели поглощения и одновременно включают секундомер. Спустя 60 и 120 с повторно определяют показатели поглощения.		

Чтение результатов. Вычисляют скорость изменения поглощения за 1 мин ($\Delta A/\text{мин}$), которая пропорциональна активности α_2 -АП. Для этого рассчитывают разницу поглощения при 405 нм между 0 и 60 с инкубации, а также между 60 и 120 с. Определяют среднюю величину из двух показателей $\Delta A/\text{мин}$.

Каждая серия анализов требует не менее одного значения для раствора плазмина ($\Delta A/\text{мин}_{\text{плазмин}}$) и одного референтного значения, определяемого с использованием контрольной нормальной плазмы ($\Delta A/\text{мин}_{\text{контроль}}$) с известным значением α_2 -АП. Эти значения используют для вычисления внутрилабораторного коэффициента пересчета (K_n):

$$K_n = \frac{\text{Содержание } \alpha_2\text{-АП в контрольной нормальной плазме, \%}}{\Delta A/\text{мин}_{\text{плазмин}} - \Delta A/\text{мин}_{\text{контроль}}}$$

Содержание α_2 -АП в исследуемом образце плазмы в % от нормы в дальнейшем вычисляется по формуле:

$$\alpha_2\text{-АП}_{\text{образец}} (\% \text{ от нормы}) = K_n \times (\Delta A/\text{мин}_{\text{плазмин}} - \Delta A/\text{мин}_{\text{образец}})$$

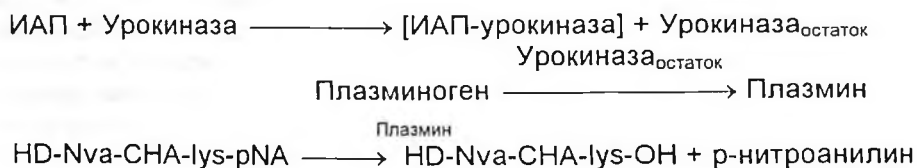
В норме уровень α_2 -АП в плазме крови составляет 80-120%.

Снижение активности α_2 -АП может быть определено при активации фибринолиза, в том числе при ДВС-синдроме или после оперативных вмешательств на органах, содержащих большие количества активаторов плазминогена (аденомэктомия). Кроме того, дефицит α_2 -АП может быть следствием нарушения его синтеза (например, при тяжелом повреждении клеток печени). Избыток α_2 -АП часто выявляется у больных с тромбозами сосудов, ТЭЛА, острым инфарктом миокарда, сепсисе, острых ДВС-синдромах.

5.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА

Принцип. ТПА и урокиназа активируют плазминоген, переводя его в плазмин. Эти активаторы нейтрализуются так называемыми ингибиторами активации плазминогена - ИАП (ИАП-1 и ИАП-2 или PAI-1 и PAI-2). Принцип методики определения ИАП-1 заключается

в оценке его инактивирующего влияния на очищенную урокиназу в исследуемом образце плазмы. Активность остаточной урокиназы определяется по ее способности превращать плазминоген в плазмин. Последний измеряют по способности плазмина расщеплять хромогенный субстрат при длине волны 405 нм.



В зависимости от варианта методики выделяют кинетический и двухточечный методы определения активности ИАП-1. Ниже приводится описание двухточечного варианта на примере использования диагностикума "Berichrom PAI" фирмы Dade Behring Inc.

Реактивы. 1. Урокиназа, лиофилизированная. Разводится до концентрации 5 МЕ/мл.

2. Плазминоген, лиофилизированный. Разводится до концентрации 15 СТА МЕ/мл.

3. Хромогенный субстрат: HD-Norvalyl-cyclohexylalanyl-lysyl-p-nitroanilid (HD-Nva-CHA-lys-pNA). Разводится до концентрации 0,6 ммоль/л.

4. Растворитель для субстрата.

5. Оксидант - хлорамин Т, лиофилизированный, концентрация в рабочем растворе 1,8 г/л.

6. Буфер трис-НСI (100 ммоль/л), рН 8,4.

7. Стандарт S1, лиофилизированный (0,0 Е/мл ИАП).

8. Стандарт S2, лиофилизированный (2,5-4,0 Е/мл ИАП).

9. Контрольная плазма человека, лиофилизированная (2,5-4,0 Е/мл ИАП).

Для выполнения исследования необходима также уксусная кислота, 20% раствор (для метода оценки по двум точкам).

Специальное оборудование. Спектрофотометр СФ-26, СФ-46 или аналогичные. Используемая длина волны 405 нм. Требуемая ширина оптического пути кюветы - 1 см.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения Последовательность операций	Исследуемый образец	Образец- бланк
<i>Пипеткой вносят в пластиковую или силиконированную пробирку:</i>		
1. Исследуемую плаз- му/стандарт	0,05 мл (50 мкл)	0,05 мл (50 мкл)
2. Буфер трис-НСI	-	0,1 мл
3. Раствор урокиназы	0,1 мл	-
<i>Перемешивают и инкубируют при температуре +37°С в течение 5 мин</i>		
4. Раствор плазминогена	0,2 мл	0,2 мл
5. Раствор оксиданта	0,2 мл	0,2 мл
<i>Перемешивают и инкубируют при температуре +37°С в течение 5 мин</i>		
6. Хромогенный субстрат	0,5 мл	0,5 мл
<i>Немедленно смешивают и одновременно включают секундомер. Через 5 мин добавляют уксусную кислоту:</i>		
7. Уксусная кислота, 20% раствор	0,2 мл	0,2 мл
<i>Перемешивают и в течение 2 ч в пробах определяют поглощение (А) на длине волны 405 нм исследуемого образца против образца-бланка.</i>		

Чтение результатов. Результаты оценивают с использованием внутрилабораторного коэффициента пересчета (K_n), который определяют с использованием стандартов ИАП (S1 и S2):

$$K_n = \frac{\text{Активность ИАП}_{S2} \text{ (Е/мл)}}{A_{S1} - A_{S2}}$$

Активность ИАП в исследуемом образце плазмы в % от нормы вычитают по формуле:

$$\text{Активность ИАП}_{\text{образец}} = K_n \times (A_{S1} - A_{\text{образец}}).$$

В норме, активность ИАП в плазме крови находится в диапазоне от 0,3 до 3,5 Ед/мл. Повышение активности ИАП наблюдается у больных с острой тромбоземболией, септициемией, ДВС-синдромом, онкологическими заболеваниями, в послеоперационном периоде и во время беременности, особенно при гестозах. Высокий уровень ак-

тивности ИАП сопряжен с ростом риска развития и рецидивирования инфаркта миокарда, а также послеоперационных тромбозов.

5.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ D-ДИМЕРА

Принцип. Тест основан на способности частиц латекса, покрытых моноклональными антителами к D-димеру (продукту лизиса поперечноштитого фибрина), агглютинировать при смешивании с плазмой крови, содержащей D-димер. Тест проводят с разными разведениями исследуемой плазмы и о количестве D-димера в образце судят по тому наибольшему разведению плазмы, в котором еще выявляется агглютинация. На показания теста не влияет содержание в плазме фибриногена, ранних продуктов фибринолиза (фрагментов X и Y) и фрагментов D и E. Определения D-димера можно проводить также в сыворотке крови и других биологических жидкостях.

Ниже приводится описание методики на примере набора реагентов "FDP-Slides direct" фирмы BioMerieux. Аналогичные наборы выпускаются фирмами Boehringer Mannheim, Immupo и др.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма или сыворотка крови.

Реактивы. 1. Латекс-реагент - взвесь частиц латекса, нагруженных антителами к D-димеру - в контейнере-дозаторе.

2. Положительный контроль - содержит в контейнере-дозаторе раствор D-димера (в концентрации более 500 нг/мл).

3. Отрицательный контроль - раствор, не содержащий D-димера - в контейнере-дозаторе.

4. Глициновый буфер (0,1 М), содержащий хлорид натрия (0,15 М), pH 8,2.

5. Пластины из картона с рабочей поверхностью черного цвета с нанесенными на нее кольцами-ограничителями (лунками).

6. Палочки для перемешивания.

Примечание. Все реагенты находятся в рабочем разведении и снабжены дозаторами.

Ход определения. Качественный вариант. В 3 лунки на пластине вносят по 1 капле положительного контроля (1-я лунка), отрицательного контроля (2-я лунка) или 30 мкл (3-я лунка) исследуемой плазмы. Затем в каждую лунку вносят по 1 капле латекс-реагента и перемешивают содержимое лунок с помощью палочек, входящих в состав набора. Пластину покачивают в течение 2 мин, после чего

определяют наличие агглютинации частиц латекса. В лунке, куда вносился отрицательный контроль, агглютинации не должно быть, а в лунке с положительным контролем, должна отмечаться хорошо видимая агглютинация.

Полуколичественный вариант. При положительном результате пробы в качественном исполнении методики выполняют полуколичественное определение, для чего плазму перед исследованием разводят буфером в 2, 4, 8 и более раз. Все разведения плазмы исследуют по описанной выше методике.

Чтение результатов. В случае наличия агглютинации в лунке, куда была помещена проба исследуемой плазмы, результат расценивают как положительный (концентрация D-димера выше 500 нг/мл). Отсутствие агглютинации в пробе с исследуемой плазмой расценивают как отрицательный результат (концентрация D-димера ниже 500 нг/мл).

В полуколичественном варианте методики находят наибольшее разведение образца плазмы, в котором еще определяется агглютинация частиц латекса. Затем умножают степень разведения образца на чувствительность диагностикума (500 нг/мл), в результате получают искомую концентрацию D-димера.

Уровень D-димера повышается (более 500 нг/мл) при массивном внутрисосудистом свертывании крови (тромбозы магистральных вен, ТЭЛА), при ДВС-синдромах разного генеза. Высокие показания теста наблюдаются и при лечении больных активаторами фибринолиза (стрептокиназой, тканевым активатором плазминогена - ТПА, авелизином и др.), в связи с чем метод используется в комплексе с определением фибриногена для контроля такой терапии.

Количественные варианты определения D-димера. Количественное определение D-димера как маркера тромбинемии имеет более высокое диагностическое значение, поскольку позволяет определять выраженность в совокупности как внутрисосудистого свертывания крови, так и фибринолиза, отслеживать эффективность антитромботической терапии. Вместе с тем, такие определения дорогостоящи, требуют применения специального оборудования (считывающих устройств или определенных типов коагулометров). Например, при использовании рефлектометра *NucoCARD READER II*, достигается определение D-димера в интервале от 0,1 до 20,0 мг/л, с точностью до 0,1 мг/л или 100 нг/мл (при нормальном содержании D-димера - до 0,3 мг/л).

Диагностические наборы для количественной оценки D-димера выпускаются фирмами Nicomed ("NycoCARD[®]"), Roche ("As-serachrom D-Dimer"), Dade Behring. ("BC[®] D-Dimer"), и др.

5.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ ФИБРИНОГЕНА/ФИБРИНА ПО ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ

Принцип. Тест основан на способности частиц латекса, покрытых антителами к продуктам деградации фибриногена/фибрина, агглютинировать при смешивании с сывороткой крови, содержащей ПДФ. Тест проводят с разными разведениями исследуемой сыворотки и о количестве ПДФ в образце судят по тому наибольшему разведению сыворотки, в котором еще выявляется агглютинация.

Ниже приводится описание методики на примере набора реагентов "*FDP-Test*" фирмы Boehringer Mannheim. Близкий по составу и назначению диагностикум "*FDP Plasma*" выпускается фирмой Stago¹.

Материал для исследования. Сыворотка крови.

Реактивы. 1. Латекс-суспензия - взвесь частиц латекса, нагруженных антителами к фрагментам D и E фибриногена.

2. Положительная контрольная сыворотка - 1,0 мл сыворотки, содержащей D и E фрагменты фибриногена.

3. Отрицательная контрольная сыворотка - 1,0 мл сыворотки, не содержащей ПДФ.

4. Глициновый буфер (0,1 М), рН 8,2.

5. Пробирки с крышкой для забора крови и получения сыворотки. Содержат порошок из смеси тромбина, хлористого кальция, апротинина и рептилазы (последняя - для коагуляции фибриногена в образцах крови больных, получающих лечение гепарином).

6. Пластины с нанесенными на нее кольцами-ограничителями (лунками).

7. Палочки для перемешивания.

Получение сыворотки и ее разведений²: Сыворотку получают из цитратной крови следующим образом: в пробирку, входящую в комплект набора, набирают 2,0 мл венозной крови и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Вслед за этим пробирку

¹ Исследуется плазма крови.

² Приводится полуколичественный вариант определений.

центрифугируют 20 мин при 4000 об/мин. Сыворотку разводят в 2, 4, 8, 16 и 32 раза, используя буфер в качестве разводящей жидкости.

Ход определения. В лунки пластины с кольцами-ограничителями, вносят по 1 капле положительного контроля (первая лунка), отрицательного контроля (вторая лунка), а в остальные лунки - по 1 капле исследуемой сыворотки и ее разведений. Затем в каждую лунку добавляют по 1 капле суспензии латекса и перемешивают содержимое лунок с помощью палочек, входящих в состав набора. Пластину покачивают в течение 2 мин, после чего определяют наличие агглютинации латексных частиц. В лунке, куда вносился отрицательный контроль, агглютинации не должно быть, в лунке с положительным контролем должна отмечаться хорошо видимая агглютинация.

Чтение результатов. Находят наибольшее разведение исследуемого образца сыворотки, в котором еще определяется агглютинация частиц латекса. Затем умножают величину найденного разведения на чувствительность диагностикума (2,0 мкг/мл), в результате получают искомую концентрацию ПДФ. Например, агглютинация латексных частиц произошла в разведениях сыворотки 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, а в разведении 1:32 ее уже не было. Зная чувствительность латексного диагностикума, рассчитывают количество ПДФ в исследуемой сыворотке. В данном примере: $16 \times 2,0 \text{ мкг/мл} = 32 \text{ мкг/мл}$.

В норме содержание ПДФ в сыворотке крови по данному методу не превышает 10 мкг/мл.

5.10. ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ ФИБРИНОГЕНА/ФИБРИНА¹

Принцип. Данный метод определения ПДФ использует принцип твердофазного иммуноферментного анализа, в основе которого лежит высоко контактное связывание антител к фибриногену с поверх-

¹ Шелепова Т.М., Рогачева Н.А., Белозерская Г.Г. и соавт. Способ определения фибриногена и продуктов его деградации в крови. Авт. свид. на изобретение № 1709194. Приоритет от 3.04.1989; Макаров В.А., Рогачева Н.А., Шелепова Т.М. и соавт. Определение содержания фибриногена, фибрин-мономерных комплексов, продуктов деградации фибрин-фибриногена и плазминогена в капиллярной крови. Гематол. и трансфузиол., 1990. - № 6. - С.33-34.

ностью полистирола. В последующем, при добавлении в лунки планшета сыворотки больного, присутствующий в ней ПДФ (при исследовании сыворотки) связывается со своими антителами. После инкубации планшет промывают, удаляя несвязавшийся материал. Образовавшийся комплекс "антиген - антитело" выявляют теми же антителами к фибриногену, конъюгированными с ферментом (пероксидазой). Ферментный конъюгат связывается с ПДФ и, таким образом, часть его фиксируется в лунках планшета. Определяют ферментативную активность пероксидазы, связанной с лунками планшета по изменению окраски субстратной смеси.

Далее приводится описание методики, использующейся в наборе реагентов "ИФА-Ф-Ф₂" фирмы НВО Иммунотех (Россия). Набор рассчитан на определение ПДФ в сыворотке крови или фибриногена в плазме. Чувствительность метода - 40 нг/мл.

Реактивы и оборудование. 1. Планшет 96-луночный полистироловый, лунки которого покрыты афинно выделенными кроличьими антителами к фибриногену человека.

2. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР), приготовленный на основе одно- и двухзамещенных фосфатов натрия с добавлением твин-20, рН 7,0, 10 мл. Рабочий раствор готовят разведением 10 мл ФСБР до 200 мл.

3. Твин-20. Рабочий раствор готовят разведением 0,5 мл трин-20 дистиллированной водой до 1 л.

4. Орто-фенилендиамин (хромоген), 4 мг.

5. Антитела к фибриногену (конъюгированы с пероксидазой хрена), лиофильно высушенные. Разводят добавлением 25 мл рабочего ФСБР.

6. Калибровочные образцы сыворотки крови человека с известной концентрацией фибриногена (0 мкг/мл, 5 мкг/мл), лиофильно высушенные. Разводят добавлением 2,0 мл рабочего ФСБР. Далее, методом серийных разведений, в соответствии с инструкцией, готовят дополнительные калибровочные пробы с концентрацией фибриногена 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 и 0,156 мкг/мл.

7. Контрольный образец плазмы с известной концентрацией фибриногена. Разводят добавлением 1,0 мл рабочего ФСБР.

8. Субстратный буферный (цитратный) раствор с добавлением твин-20, рН 4,9. Субстратно-хромогенную смесь готовят следующим образом: Во флакон с субстратным буферным раствором добавляют 10 мл дистиллированной воды. Полученный раствор переносят в

мерный цилиндр и доводят общий объем до 22,5 мл дистиллированной водой. В полученном растворе растворяют 1 таблетку ортофенилендиамин.

9. Тромбин, лиофильно высушенный, 5 мг. Разводится добавлением во флакон с 4,0 мл физиологического (0,9%) раствора хлорида натрия.

10. Серная кислота, 50% раствор, 50 мл.

Для выполнения исследования необходимы вертикальный фотометр для планшетов (типа "Мультискан" или "Униплан") с фильтром на 492 нм, а также автоматические микропипетки со сменными пластиковыми наконечниками, обеспечивающими дозирование растворов от 5 до 1000 мкл.

Материал для исследования. ПДФ определяют в сыворотке крови. Получают ее путем смешивания в пробирке 100 мкл (0,1 мл) цитратной крови с 10 мкл раствора тромбина. Смесь инкубируют 10 мин при комнатной температуре (+18...+25°C), затем сгусток удаляют пинцетом, а 10 мкл сыворотки разводят добавлением 0,99 мл ФСБР.

Допускается хранение отделенной от сгустка сыворотки в течение 2 месяцев при температуре -20°C.

Ход определения. 1. Планшет отмывают, для чего в каждую лунку вносят по 200 мкл отмывающего рабочего раствора твин-20, оставляют на 1-2 мин при комнатной температуре, затем резко поворачивая планшет удаляют содержимое лунок. Процедуру отмывки повторяют три раза.

2. Вносят в лунки планшета в дубликатах калибровочные пробы (КП), начиная с минимальной концентрации фибриногена, контрольную пробу, исследуемые образцы сыворотки по 200 мкл в соответствии со схемой (см. инструкцию к набору реагентов).

3. Планшет закрывают крышкой и выдерживают в течение 1 ч при температуре +37°C.

4. После инкубации удаляют содержимого лунок, планшет повторно отмывают, как описано в п.1.

5. Вносят во все лунки планшета по 200 мкл рабочего раствора конъюгата, используя для этого многоканальную пипетку.

6. Планшет закрывают крышкой и инкубируют в течение 1 ч при температуре +37°C.

7. После этого удаляют содержимого лунок, планшет повторно отмывают, как описано в п.1.

8. Вносят во все лунки планшета по 200 мкл субстратно-хромогенной смеси в той же последовательности, что и конъюгат, используя многоканальную пипетку.

9. Планшет инкубируют в темном месте в течение 20-30 мин при комнатной температуре.

10. Вносят во все лунки планшета по 50 мкл 50% раствора серной кислоты.

В течение 1 ч измеряют оптическую плотность в лунках планшета при длине волны 492 нм.

Построение калибровочной кривой. Калибровочную кривую строят, откладывая по оси абсцисс концентрацию фибриногена в калибровочных пробах, а по оси ординат - соответствующие значения оптической плотности. Высота и угол наклона полученной калибровочной кривой должны соответствовать стандартной, рассчитанной для каждой серии и прилагаемой к набору.

Чтение результатов. Рассчитывают средние арифметические значения показателей оптической плотности контрольного образца и исследуемых образцов сыворотки и по калибровочной кривой определяют искомую концентрацию ПДФ.

В норме, содержание ПДФ в сыворотке крови по данному методу составляет 15-25 мкг/мл. Уровень ПДФ в сыворотке повышается при разных видах внутрисосудистого свертывания крови (тромбозах, тромбозмболиях, ДВС-синдромах) и при лечении фибринолитиками.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ВНУТРИСОСУДИСТОЙ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Выявление активации различных звеньев системы гемостаза имеет исключительно важное значение для распознавания тромбозов и тромбофилических состояний, ДВС-синдромов, тромбоваскулитов и ряда других форм патологии гемостаза.

Вместе с тем, при оценке методов, характеризующих активацию и истощение тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, следует учитывать, что в данном случае, как и при оценке состояния всех других физиологических систем, речь идет о постоянно функционирующей, а не об нулевой инертной системе, в связи с чем при анализе всех сдвигов в этой системе должны учитываться границы нормальных ее параметров подобно тому, как при определении наличия лихорадки учитываются нормальные показатели температуры тела. Это делает бессмысленными всевозможные рассуждения о так называемом перманентном диссеминированном свертывании крови, ибо в физиологических условиях все про- и контра- в этой системе уравновешены, и только при нарушении этого баланса возникают патологические сдвиги¹.

Диагностика ДВС-синдрома, массивных тромбозов и тромбоэмболий в значительной степени базируется на выявлении маркеров активации и истощения различных звеньев системы гемостаза - количества и агрегации тромбоцитов, свидетелей внутрисосудистого свертывания крови и фибринолиза. Необходимо также иметь в виду,

¹ Зубаиров Д.М. Биохимия свертывания крови. - М.: - Медицина, 1978. - 176 с.; Зубаиров Д.М., Литвинов Р.И. Молекулярные маркеры активации гемостаза. Труды проблемной комиссии при Межведомственном Научном Совете по гематологии и трансфузиологии РАМН. "Проблемы физиологии и патологии гемостаза". - Барнаул, 2000. - С.28-34. Баркаган З.С. Общие принципы исследования системы гемостаза и анализ методов выявления внутрисосудистого свертывания крови. Тер. арх. - 1988. - № 5. - С. 104-110.

что задачи экспресс-диагностики требуют применения легко и быстро выполнимых, но вместе с тем достаточно информативных методик, не требующих использования эксклюзивной аппаратуры и мало доступных реагентов. Именно этим мы руководствовались при отборе методик, отражающих внутрисосудистую активацию системы гемостаза.

6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МАРКЕРОВ

6.1.1. Маркеры активации и истощения тромбоцитарного гемостаза

Наиболее информативными и доступными показателями активации тромбоцитов являются: а) потребление и снижение числа тромбоцитов в крови; б) повышение спонтанной агрегации кровяных пластинок, которая выявляется как при микроскопическом исследовании периферической крови, так и при определении спонтанной (вызванной только перемешиванием) их агрегации; в) повышение индуцированной агрегации при воздействии адреналином, АДФ и другими агонистами (см. раздел 2.4).

Выявление гипертромбоцитоза (в пределах от 600 до $1500 \times 10^9/\text{л}$) при наличии полиглобулии или без нее также является признаком высокого тромбогенного риска (см. раздел 10.2).

Кроме того, следует учитывать, что при острых ДВС-синдромах, тромботической тромбоцитопенической пурпуре, гемолитико-уремическом синдроме, антифосфолипидном синдроме, некоторых медикаментозных воздействиях (например, при развитии гепариновой тромботической тромбоцитопении) повышенная склонность к тромбозам может сочетаться со снижением числа тромбоцитов в крови и в этих условиях исследование агрегационной функции кровяных пластинок может давать ложно заниженные результаты.

6.1.2. Оценка степени повреждения эритроцитов¹

Принцип. Одно из постоянных проявлений диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови - фрагментация эритроцитов при прохождении их через заблокированные нитями фибрина микрососуды. Степень повреждения эритроцитов может оцениваться путем подсчета фрагментированных клеток в мазке (в поле зрения), но более быстро, надежно и точно по разделению эритроцитарного пула в градиенте плотности. Метод основан на разделении крови, стабилизированной цитратом натрия в растворе фиколла-верографина с удельной плотностью 1,077. В таком растворе неповрежденные эритроциты оседают на дно, а поврежденные ("облегченные") всплывают и концентрируются в кольце интерфазы, располагающемся между смесью фиколла-верографина и находящимся над ней слоем разведенной плазмы (рис. 17).

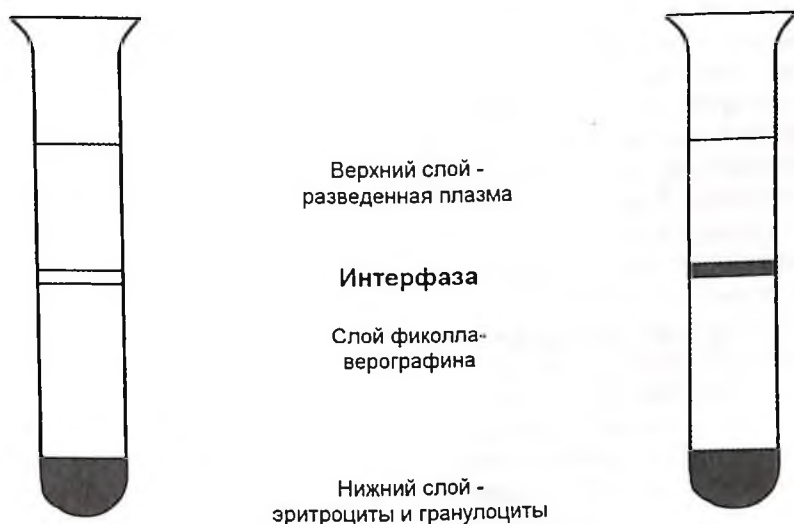


Рис. 17. Расслоение клеток в градиенте плотности.
Левая пробирка - норма, правая - патология.

¹ Баркаган З.С., Тамарин И.В. Оценка степени повреждения эритроцитов при диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови. *Лабора-
т. дело.* - 1988. - N 4. - С. 35-39.

Материал для исследования. Цитратная кровь.

Реактивы и оборудование. 1. Цитрат натрия 3-замещенный, 3,8% раствор.

2. Физиологический (0,9%) раствор хлорида натрия.

3. Уксусная кислота, 3% раствор.

4. Верографин, 36,17% раствор (на дистиллированной воде).

5. Фиколл, 9% раствор (на дистиллированной воде).

6. Ареометр АОН-2 (1000-1080).

Предварительно смешивают 10 частей раствора верографина с 24 частями раствора фиколла. Проверяют ареометром плотность полученного раствора, которая должна равняться 1,077.

Ход определения. 2,0 мл стабилизированной цитратом натрия крови разводят 6,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия и осторожно настилают в центрифужной пробирке на 3,0 мл смеси фиколла с верографинном. Центрифугируют 40 мин при 1500 об/мин, в результате чего происходит разделение смеси на 4 слоя (см. рис. 17).

Чтение результатов. На дно пробирки (нижний слой) оседают клетки, имеющие наибольшую плотность - неповрежденные эритроциты и гранулоциты; над этим осадком располагается средний слой - раствор фиколла-верографина, а над ним - (интерфаза) слой из всплывших клеток - мононуклеаров и тромбоцитов с примесью поврежденных (облегченных) эритроцитов. Еще выше расположен 4-й слой плазмы. В норме интерфаза - белесовато-опалесцирующего цвета и содержит мало эритроцитов. Чем больше в ней эритроцитов, тем более она окрашивается в розовый или красный цвет, что закономерно выявляется при ДВС-синдроме и выраженной гипохромной анемии. Визуально (по цвету интерфазы) проводят **качественную оценку** степени повреждения эритроцитов как положительный или отрицательный результат.

Количественную оценку содержания в интерфазе поврежденных эритроцитов проводят следующим образом. Отбирают пипеткой верхние две трети слоя интерфазы и переносят в другую пробирку. Клетки дважды отмывают 9-кратным объемом физиологического раствора хлорида натрия с центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют, осадок ресуспензируют в 2,0 мл физиологического раствора хлорида натрия и подсчитывают в камере Горяева содержание эритроцитов. Так как клеточная суспензия, кроме эритроцитов, содержит большое количество лейкоцитов, то сначала подсчитывают общее число клеток, а

потом из него вычитают число клеток (лейкоцитов), оставшихся после кислотного гемолиза.

Для общего подсчета клеток 0,1 мл суспензии разводят в 2,0 мл физиологического раствора хлорида натрия, заполняют камеру Горяева и определяют количество клеток в 25 больших квадратах. Затем результат подсчета умножают на 5×10^7 ; полученная цифра соответствует концентрации всех клеток в 1 л суспензии. Для подсчета лейкоцитов 0,1 мл суспензии разводят в 2 мл 3% уксусной кислоты, заполняют камеру Горяева и подсчитывают количество клеток в 25 больших квадратах. Умножая результат на 5×10^7 , определяют концентрацию лейкоцитов в 1 л суспензии. Полученный после вычитания результат соответствует количеству эритроцитов в "интерфазе". При качественной оценке результатов выполнение теста занимает не более 50 мин, при количественной - 90 мин.

Чтение результатов. Нормальное количество "облегченных" эритроцитов, находящихся в интерфазе, колеблется от 0 до $450 \times 10^6/\text{л}$ (в среднем - $275 \pm 67 \times 10^6/\text{л}$). У больных с ДВС-синдромом количество эритроцитов в интерфазе резко возрастает и как минимум превышает средние контрольные показатели в 5 раз, т.е. превышает 1400×10^6 клеток/л. У большинства же больных с ДВС-синдромом количество эритроцитов в интерфазе превышает $4\text{-}5 \times 10^9/\text{л}$, доходя до $2\text{-}4 \times 10^{10}/\text{л}$ и более. При оценке результатов исследования следует учитывать, что количество частично разрушенных ("облегченных") эритроцитов возрастает и при других видах внутрисосудистого гемолиза и гипохромной анемии.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА

6.2.1. Определение растворимого фибрина (РФ или РФМК)

Конечным результатом свертывания крови является, как известно, вызываемая тромбином трансформация фибриногена в фибрин (см. рис. 6 и 7). При ряде форм патологии, характеризующихся внутрисосудистым свертыванием крови (ДВС-синдром, тромбозы, тромбофилии) в крови циркулирует повышенное количество промежуточных продуктов трансформации фибриногена в фибрин - фиб-

рин-мономера и его олигомеров, обозначаемых как растворимый фибрин (РФ) или РФМК.

Определение повышенного количества растворимого фибрина в плазме имеет большое диагностическое значение, поскольку этот белок является маркером тромбинемии и внутрисосудистого свертывания крови.

6.2.1.1. Паракоагуляционные тесты

Для выявления РФМК в клинике традиционно используются паракоагуляционные тесты: этаноловый (ЭТ) и протаминсульфатный (ПСТ)¹. При известных достоинствах они недостаточно информативны, дают ложно положительные результаты при гиперфибриногенемии и ложно отрицательные при гипофибриногенемии. При этом они лишь качественно отражают процесс трансформации фибриногена в фибрин, в связи с чем многие исследователи считают эти тесты устаревшими, выходящими из употребления. Приводимые в справочной литературе количественные и полуколичественные варианты ПСТ мало точны и имеют низкую воспроизводимость из-за различий свойств разных видов протаминсульфата. Кроме того, протаминсульфат связывается с гепарином, в связи с чем у больных, получающих гепаринотерапию, ПСТ зачастую показывает ложно отрицательные результаты. Поэтому описание ПСТ не включено нами в настоящее руководство.

В последние годы разработан и получил широкое распространение паракоагуляционный орто-фенантролиновый тест (ФТ), отражающий содержание растворимого фибрина в плазме и наличие тромбинемии. Гель-хроматографический анализ плазмы наряду с апробацией этого теста во многих лабораториях показал, что ФТ позволяет достаточно надежно не только качественно, но и количественно определять содержание растворимого фибрина в плазме, в том числе в условиях экспресс-диагностики. Это открыло перспективы для более точного учета выраженности внутрисосудистого свертывания и динамического контроля за эффективностью и достаточ-

¹ Ранее применявшийся β -нафтоловый тест (реагент - 1% раствор β -нафтола в 50% этаноле) для определения так называемого "фибриногена Б" вышел из употребления в связи с его малой чувствительностью и специфичностью, произвольной терминологией.

ностью терапии ДВС-синдромов и тромбозов. Сопоставление частоты положительных результатов ФТ с показаниями других паракоагуляционных тестов показало, что на разных стадиях ДВС-синдрома ФТ выявляет РФМК чаще (в 83-100% наблюдений), чем ПСТ (в 76-79%) и ЭТ (в 65-87%). Немаловажно также подчеркнуть, что ФТ более чувствителен, чем ЭТ и ПСТ. Лишь при остро протекающих (катастрофических) формах ДВС-синдрома, с глубокой гипофибриногенемией, изначально высокие показания ФТ могут снижаться, что характерно и для других паракоагуляционных тестов.

6.2.1.1.1. Этаноловый тест (Godal et al., 1971)

Принцип. Появление желеобразной массы (паракоагулята) в плазме через 10 мин после добавления к ней 50% этанола говорит о наличии в ней комплексов фибрин-мономеров с фибриногеном и продуктами его деградации плазмином, т.е. свидетельствует о наличии в плазме активного тромбина.

Материал для исследования. Цитратная богатая тромбоцитами плазма.

Реактивы. 50% этанол (важна точность концентрации, которая должна обязательно проверяться спиртометром). Этанол разводят дистиллированной водой.

Ход определения. Обогащенную тромбоцитами плазму в объеме 0,4 мл смешивают с 0,15 мл 50% раствора этанола, пробирку встряхивают и включают секундомер. Через 10 мин инкубации (при температуре +18...+25°C), слегка наклоняя пробирку, в проходящем свете определяют, появился ли в плазме желеобразный сгусток (не хлопья и не крупнозернистые коагуляты).

Чтение результатов. При наличии в исследуемой плазме комплексов фибрин-мономера с продуктами фибринолиза и фибриногеном под влиянием этанола образуется желеобразный сгусток. Результат читается точно через 10 мин как положительный или отрицательный. Более позднее образование геля и сгустка не учитывают. При выполнении теста при температуре воздуха выше +26°C результат может быть ложно отрицательным, в связи с чем при высокой температуре воздуха в помещении требуется термостатирование на водяной бане.

В период выраженной гипофибриногенемии (менее 0,5 г/л) этаноловый тест может стать отрицательным, при значительной гиперфибриногенемии (свыше 6,0 г/л) - ложно положительным.

6.2.1.1.2. Фенантролиновый тест¹

Принцип. Тест основан на оценке времени появления в исследуемой бедной тромбоцитами цитратной плазме, содержащей РФМК, хлопьев (зерен) фибрина после добавления к ней орто-фенантролина.

Далее приводится описание метода на примере использования диагностикума "РФМК-тест" фирмы Технология-Стандарт.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Плазму исследуют не позже, чем через 1 ч после получения крови, замораживание ее не рекомендуется. Следует обратить особое внимание на правильность забора крови для исследования (см. раздел 11.1.). Погрешности в этой части приводят к активации свертывания и образованию РФМК *in vitro*, что искажает получаемые результаты.

Реактивы. 1. Орто-фенантролина гидрохлорид, 70 мг во флаконе (в планшетном варианте набора реактив расфасован в 96 лунках планшета²). Разводится внесением во флакон 10,0 мл дистиллированной воды. В планшетном варианте набора после надреза и удаления с помощью скарификатора участка пленки над одной из лунок планшета, в лунку вносят 0,25 мл дистиллированной воды (расход раствора орто-фенантролина на один анализ - 0,1 мл).

2. Контроль-минус (лиофилизированная плазма человека, не содержащая РФМК). Разводится добавлением 0,5 мл дистиллированной воды.

¹ Момот А.П., Елькомов В.А., Баркаган З.С. Методика и клиническое значение паракоагуляционного фенантролинового теста. Клиническая лабораторная диагностика. - 1996. - №4. - С.17-20.

Авт. свид. № 1371219, 1987. СССР Способ определения количества растворимого комплекса фибрин-мономера в плазме крови. Приоритет от 26.11.85.

² Патент № 2014002, 1994. РФ Устройство для проведения лабораторных исследований. Приоритет от 8.01.91.

3. Контроль-плюс (лиофилизированная плазма человека, содержащая РФМК). Разводится аналогично плазме (контроль-минус).

Примечание. Контрольные плазмы используются в день разведения и служат для проверки правильности анализа.

Ход определения. При комнатной температуре к 0,1 мл исследуемой плазмы добавляют 0,1 мл раствора орто-фенантролина, немедленно включают секундомер. При непрерывном покачивании пробирки в проходящем свете на темном фоне (осветитель для микроскопа типа ОИ-19 или аналогичный) регистрируют время от момента добавления реагента до начала появления первых хлопьев (зерен) фибрина. Учет проводят на протяжении 150 с.

Чтение результатов. Тест считается положительным, если в плазме в первые 150 с регистрируются хорошо видимые в проходящем свете хлопья или зерна паракоагулята. Отмечают время их появления в секундах и по табл. 26, построенной на основе калибровочного графика, определяют количество РФМК в исследуемой плазме.

Таблица 26

Перевод результатов ФТ (в секундах)
в количественное содержание РФМК в плазме

Время, с	Концентрация РФМК, мг/100 мл	Время, с	Концентрация РФМК, мкг/100 мл
5-6	28,0	21-23	10,0
7	26,0	24-25	9,0
8	24,0	26	8,5
9	22,0	27-28	8,0
10	21,0	29-31	7,5
11	19,0	32-33	7,0
12	17,0	34-36	6,5
13	16,0	37-40	6,0
14	15,0	41-45	5,5
15	14,0	46-54	5,0
16	13,0	55-69	4,5
17-18	12,0	70-87	4,0
19-20	11,0	88-120	3,5
		Свыше 120	3,0

Нормативные показатели. У 94% здоровых людей контрольной группы паракоагуляция в ФТ определяется в интервале от 70 до 150 с или вообще не определяется. Это, по данным табл. 26, соответст-

ует содержанию РФМК от 3,0 до 4,0 мкг/100 мл. В остальных случаях (6% наблюдений) время паракоагуляции в ФТ составляет 52-69 с, что соответствует концентрации РФМК - 4,5-5,0 мкг/100 мл. В среднем, в норме уровень РФМК в плазме составляет $3,38 \pm 0,02$ мкг/100 мл, с пределами нормальных колебаний ($\pm 1,5\sigma$) от 2,72 до 4,03 мкг/100 мл.

Диагностическое значение. ФТ принципиально отличается от этанолового теста и других устаревших паракоагуляционных тестов более высокой чувствительностью (3,0-3,5 мкг/100 мл, в эквиваленте фибрин-мономера) и возможностью количественно оценивать концентрацию растворимого фибрина в плазме (т.е. выявлять тромбинемии) как при диагностике внутрисосудистого свертывания, так и в процессе лечения больных. Тест может применяться для оценки эффективности и достаточности антикоагулянтной терапии по конечному ее результату - ликвидации тромбинемии (см. раздел 7.2).

6.2.1.2. Определение фибрин-мономера по агглютинации нагруженных им эритроцитов

Принцип. Тест основан на способности эритроцитов человека (группа 0, Rh отрицательная), покрытых фибрин-мономером, агглютинировать при смешивании с плазмой крови, содержащей фибрин-мономеры и растворимый фибрин.

Ниже приводится описание метода на примере использования диагностикума "FM-Test" фирмы Diagnostica Stago.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Реактивы. 1. Эритроцитарный реагент - взвесь эритроцитов, нагруженных фибрин-мономером человека. Поставляется в готовом к использованию виде.

2. Положительный контроль - плазма человека, содержащая фибрин-мономер в концентрации более 20 мкг/мл. Разводится добавлением 0,5 мл дистиллированной воды.

3. Отрицательный контроль - раствор, не содержащий фибрин-мономера. Разводится аналогично положительному контролю.

4. Пластина с нанесенными на нее кольцами-ограничителями (лунками).

Ход определения. В 3 пробирки вносят 0,1 мл положительного контроля (1-я пробирка), 0,1 мл отрицательного контроля (2-я про-

бирка), 0,1 мл исследуемой плазмы (3-я пробирка). Затем в каждую пробирку добавляют по 0,05 мл эритроцитарного реагента, пробирки встряхивают, инкубируют 10 мин при 37°C. По истечении времени инкубации содержимое пробирок переносят в лунки планшета. Медленно вращая планшет при комнатной температуре, через 6 мин определяют наличие агглютинации эритроцитов.

В лунке, содержащей отрицательный контроль, агглютинации не должно быть, в лунке, где находился положительный контроль, должна отмечаться хорошо видимая агглютинация.

Чтение результатов. В случае наличия агглютинации в лунке, куда была помещена исследуемая плазма, результат расценивают как положительный (концентрация фибрин-мономера выше 20 мкг/мл). Отсутствие агглютинации в пробе с исследуемой плазмой расценивают как отрицательный результат (концентрация фибрин-мономера ниже 15-20 мкг/мл). Проба качественная и не позволяет определять степень выраженности тромбинемии и ее динамику.

6.2.1.3. Определение растворимого фибрина иммуноферментным методом

В последние годы разработаны и проходят клиническую апробацию диагностические наборы, основанные на иммуноферментном определении так называемого "белка, предшествующего тромбозу" или растворимых полимеров фибрина. Для этого может использоваться тест-система *ABS TrpTM Assay* (American Biogenetic Sciences, Boston, Massachusetts, USA).

6.2.2. Определение фибринопептида А

Фибринопептид А (ФпА) отщепляется от молекулы фибриногена тромбином (см. раздел 1.2.1). В результате этого при тромбинемии количество его в плазме увеличивается. Современные методы определения ФпА основаны на иммуноферментной технике. Ниже приводится описание такой методики на примере использования диагностикума "*ELISA FPA*" фирмы Boehringer Mannheim.

Принцип. Инкубация избыточного количества антител к ФпА с образцом плазмы (или стандартом), содержащим ФпА, приводит к образованию комплексов антиген-антитело, которые осаждаются центрифугированием. Несвязавшиеся антитела остаются в суперна-

танте. Количество остатка таких несвязавшихся антител обратно пропорционально количеству ФпА в образце. Для определения концентрации остаточного количества антител супернатант переносят в кювету с адсорбированным на ней ФпА. Это приводит к образованию фиксированного на стенке кюветы (или лунки планшета) комплекса ФпА-антитело. Затем в кювету вносят анти-IgG-антитела, конъюгированные с пероксидазой (IgG-POD), в результате чего образуется "сэндвич" - комплекс конъюгированных антител с фиксированным комплексом ФпА-антитело. Излишек IgG-POD удаляют промыванием кюветы. При внесении в кювету субстрата (орто-фенилендиамина) и H_2O_2 , пероксидаза комплекса расщепляет субстрат, вследствие чего изменяется оптическая плотность смеси, которую измеряют на спектрофотометре при длине волны 492 нм.

Реактивы. 1. ФпА, 12,5 мкг, лиофильно высушенный. Разводится добавлением 20 мл дистиллированной воды. Раствор используется для нагрузки пластиковой поверхности кювет или лунок планшета антигеном ФпА.

2. Антитела к ФпА, лиофильно высушенные. Разводятся добавлением 10 мл буфера для разведений.

3. Анти-IgG-антитела, конъюгированные с пероксидазой (IgG-POD), лиофильно высушенные. Разводятся добавлением 20 мл буфера для разведений.

4. Субстрат (орто-фенилендиамин), 8,0 мг. Разводится добавлением 20 мл дистиллированной воды с добавлением 10 мкл 30% раствора перекиси водорода.

5. Стандарт ФпА (1,25 мкг), лиофильно высушенный. Разводится добавлением 0,5 мл дистиллированной воды (25 нг/мл). Перед началом исследований получают калибровочные растворы ФпА путем разведения исходного раствора антигена (25 нг/мл) буфером для разведений в 2, 4, 8, 16 и 32 раза.

6. Антикоагулянт, содержащий цитрат натрия, гепарин и аprotинин, 20 мл рабочего раствора во флаконе.

7. Суспензия бентонита (80 мг/мл), 50 мл рабочего раствора.

8. Детергент (Tween 20), 5 мл рабочего 2% раствора.

9. Буфер для разведений концентрированный, 2 × 20 мл. Разводится дистиллированной водой в пропорции 1+9.

10. Буфер для промывки, концентрированный, 2 × 50 мл. Разводится дистиллированной водой в пропорции 1+19.

Для выполнения исследования необходимы также перекись водорода (30%), соляная кислота (1М), пластиковые пробирки для иммуноферментного анализа (NUNC Maxisorb tubes), кюветы с длиной оптического пути 1 см и спектрофотометр для измерения поглощения при 492 нм.

Материал для исследования. Бедная тромбоцитами плазма. Получают из венозной крови на растворе антикоагулянта (входящего в состав тест-системы) по общепринятой методике (см. раздел 11.1). Объем крови, достаточный для исследования, - 2,0 мл. Плазму, сразу же после ее получения, освобождают от фибриногена. С этой целью в пластиковой пробирке смешивают 1,0 мл плазмы и 0,5 мл суспензии бентонита, инкубируют 10 мин при комнатной температуре (+18...+25°C) и центрифугируют 10 мин при 4000-5000 об/мин. Для анализа используют 1,0 мл надосадочной жидкости (супернатанта), которую исследуют в течение 1 ч. Допускается хранение образцов в течение 1 мес при температуре -16...-20 °С.

Непосредственно перед исследованием в 1,0 мл образца добавляют 0,05 мл (50 мкл) раствора детергента (Tween 20). При последующем расчете результатов учитывают, что проба плазмы в результате всех процедур разводится в два раза.

Ход определения. Иммуноферментное определение проводится в соответствии с Инструкцией к диагностикуму.

Чтение результатов. Концентрация антител в образце обратно пропорциональна ферментативной активности пероксидазы. Исходя из этого, уменьшение светопоглощения смеси регистрируется в образцах с повышенным уровнем ФпА. Результаты измерения откладываются на стандартной кривой и определяется концентрация ФпА (с учетом предварительного, до исследования, разведения образца в два раза). Построение калибровочной кривой осуществляют при помощи стандарта с известной концентрацией ФпА. В норме содержание ФпА в плазме ≤ 3 нг/мл. При внутрисосудистом свертывании крови и тромбемии уровень ФпА превышает 3 нг/мл.

6.2.3. Определение других маркеров тромбемии

Одним из наиболее важных маркеров активации свертывающей и фибринолитической систем является определение D-димера, являющегося продуктом лизиса поперечно сшитого фибрина. Методика его оценки приведена в разделе 5.8).

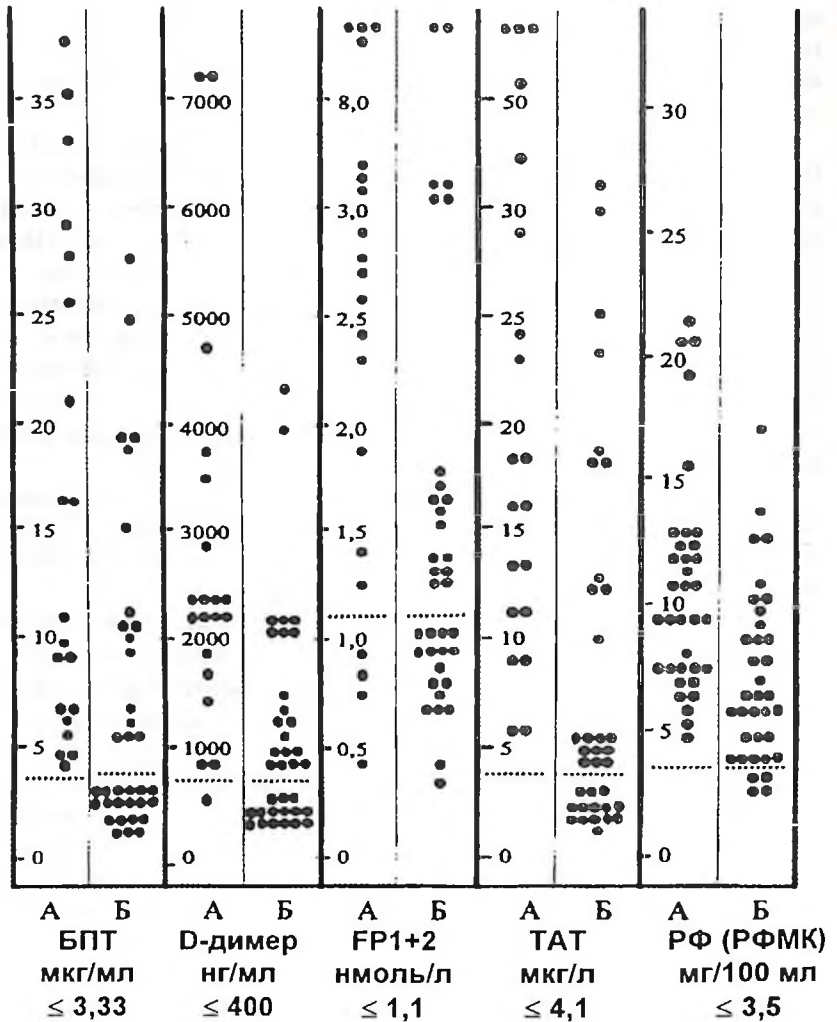


Рис. 18. Маркеры тромбемии у больных с проксимальным тромбозом глубоких вен бедра с ТЭЛА (А) и без ТЭЛА (Б).

БПТ - белок, предшествующий тромбозу (растворимый фибрин, определяемый с помощью моноклональных антител); FP1+2 - фрагмент протромбина 12+2, TAT - тромбин-антитромбиновый комплекс, РФ - растворимый фибрин по орто-фенантролиновому тесту.

В числе других маркеров тромбинемии используются иммуноферментные определения комплекса тромбин-антитромбин и фрагмента протромбина 1+2 (соответствующие диагностикумы *Enzygnost TAT* и *Enzygnost F1+2*; фирма Dade Behring).

Чувствительность и информативность перечисленных методов определения активации внутрисосудистого свертывания крови и выраженности тромбинемии неодинаковы, что связано с длительностью внутрисосудистой циркуляции отдельных маркеров и качественных характеристик методов их определения. В связи с этим, при массивных тромбозах и ТЭЛА показания разных тестов могут не совпадать. Это демонстрирует рис. 18¹, из которого видно, что при больших тромбозах и ТЭЛА, но не при малых формах этой патологии, закономерно повышается уровень D-димера в плазме, тогда как ряд других проб достаточно часто нарушаются и при периферических тромбозах. Все эти данные должны быть учтены при подборе тестов для диагностики и мониторинга методов лечения тромбозов и ДВС-синдромов.

¹ По работе La Capra S. et al. *Blood Coagul. And Fibrinol.* - 2000, Vol. 11, N 4, - P. 371-377, с дополнениями по ФТ (данные авторов).

7. ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ ЗА ГЕМОСТАТИЧЕСКОЙ И АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ

Общие принципы, показания.

Цель использования этих методов - определение действия применяемых лекарственных средств на те звенья системы гемостаза, которые в наибольшей степени реагируют на используемые лечебные воздействия и могут служить контролем за дозировкой лекарственных препаратов. Данные методы подразделяются на следующие две большие группы в зависимости от преследуемой ими цели:

1. С целью предупреждения передозировки препаратов и снижения риска развития геморрагических осложнений.
2. Для мониторинга достаточности применяемых доз препаратов и сроков их введения по оценке степени устранения тромбинообразования и недостаточности тромболитического процесса.

7.1. КОНТРОЛЬ ЗА ГЕМОСТАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ

Данный контроль используется для оценки эффективности лечения тромбоцитопений, гемофилии А и В, болезни Виллебранда и других геморрагических диатезов.

7.1.1. Определение уровня факторов VIII или IX и их ингибиторов

Применяется для контроля достаточности заместительной терапии гемопрепаратами, содержащими дефицитные факторы свертывания - криопреципитатом, концентратами факторов VIII, IX, фактора Виллебранда и других. Расчет необходимых для данного больного доз препаратов определяется тем, до какого уровня необходимо в данной ситуации повысить концентрацию дефицитного фактора в плазме больного.

Необходимый уровень повышения фактора свертывания в плазме больного определяется тяжестью и опасностью кровотечения, уже имеющегося или ожидаемого при хирургических вмешательствах (см. табл. 27).

Таблица 27

Примерные необходимые уровни факторов VIII/IX при разных видах кровоточивости у больных гемофилией

Тип кровотечения или хирургического вмешательства	Терапевтически необходимый уровень факторов VIII или IX в плазме, %
Мелкие: например, кровоизлияния в суставы	20-30
Обширные: внутримышечные, кровотечения в ротовой полости, травма средней тяжести, хирургические вмешательства с низким или умеренным риском кровотечения	30-50
Угрожающие жизни: желудочно-кишечные, внутричерепные, внутриполостные, большие травмы, крупные операции	50-75

Существуют следующие методы расчетов необходимых доз концентратов факторов VIII или IX для предупреждения и купирования кровотечений у больных гемофилией А и В.

Определение дозы фактора (Ф) VIII.

$$\text{Ожидаемое увеличение } \Phi \text{ VIII (\%)} = \frac{\text{Введенная доза, ед}}{\text{Масса тела (кг)} \times 0,4 \text{ ME/кг}}$$

Пример.
$$\Phi \text{ VIII (\%)} = \frac{840 \text{ ME}}{70 \text{ кг} \times 0,4 \text{ ME/кг}} = 30\%$$

Необходимое количество Ф VIII = масса тела (кг) × желаемое увеличение Ф VIII (%) × 0,4 ME/кг.

Пример. $70 \text{ кг} \times 30\% \times 0,4 \text{ ME/кг} = 840 \text{ ME}$.

Определение дозы фактора IX

$\text{FIX (ME)} = \text{Масса тела (кг)} \times \text{желаемое повышение FIX (\%)} \times 1,2.$

Расчет дозы криопреципитата для замещения дефицита фактора VIII.

По данным Ю.Н. Андреева и других авторов, каждая единица фактора VIII, введенная на 1 кг массы тела больного, повышает концентрацию этого фактора в плазме на 1,3%. Отсюда предлагается следующий расчет необходимой дозы препарата:

$$D = \frac{M \times Y_{\phi}}{1,3},$$

где D - доза криопреципитата, ед.; M - масса тела больного, кг; Y_{ϕ} - заданный уровень фактора VIII.

Используются и другие формулы. Так, по D.Y. Mason, G.I.C. Ingram (1971) дозу препаратов антигемофилического глобулина рассчитывают следующим образом:

$$D = 0,5 M \times NY,$$

где D - необходимая доза; ед, M - масса тела, кг; NY - необходимый уровень фактора в плазме больного (% или ед/100 мл).

По данным M.W. Hilgartner (1974), последняя формула правильна для взрослых с массой тела более 60 кг, тогда как для больных с массой тела меньше 60 кг умножать следует не на 0,5 массы, а на 0,7, а при массе тела меньше 30 кг - на 1,0.

Методики определения факторов VIII и IX, а также их ингибиторов приведены в разделе 3.10.

7.1.2. Определение активности плазменного антитромбина¹

Применяется для контроля достаточности заместительной терапии трансфузиями свежезамороженной плазмы или введениями

¹ Ранее этот физиологический антикоагулянт обозначался как анти-тромбин III.

концентратов этого антикоагулянта. Способы определения активности ПАТ приведены в разделе 4.1.

7.2. СПОСОБЫ МОНИТОРИРОВАНИЯ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Общие принципы, показания

Антикоагулянты и ингибиторы функции тромбоцитов являются, как известно, наиболее часто применяемыми препаратами, используемыми для профилактики и терапии тромбофилических состояний, тромбозов, ишемий и инфарктов органов, ДВС-синдромов. Обширные многоцентровые испытания подтвердили высокую эффективность этих средств и возможность с их помощью улучшать исходы и прогноз многих сосудисто-циркуляторных видов патологии, предупреждать и снижать частоту ряда их осложнений.

Тем не менее, многие стороны рационального использования этих препаратов, их выбор, подбор оптимальных доз и сроков применения все еще решаются зачастую произвольно, эмпирически или стереотипно, без должного обоснования применяемых доз и сроков введения препаратов, а также мониторинга, что, как показывает клинический опыт, ведет к грубым промахам и ошибкам даже при использовании, казалось бы, уже достаточно хорошо апробированных средств. Так, например, применение аспирина, являющегося в кардиологической практике "золотым стандартом", все еще часто проводится без контроля за динамикой функции тромбоцитов и без выявления больных с аспиринорезистентностью, которая обнаруживается почти у каждого четвертого больного¹. Этим, однако, не исключаются другие позитивные воздействия аспирина на атеротромботический процесс, о чем мы писали в ранее изданной монографии².

Не менее важным является контроль за антикоагулянтной и тромболитической терапией, оценкой ее эффективности, достаточности и риска побочных явлений.

¹ Баркаган З.С., Котовщикова Е.Ф. В кн.: Прогресс и проблемы в лечении заболеваний сердца и сосудов. - С.-Петербург, 1997. - С. 7-8.

² М.Я. Ясиновский и др. Салицилаты. - М.: Медицина, 1975.

7.2.1. Контроль за динамикой содержания тромбоцитов в крови и ингибцией их функции

Подсчет тромбоцитов в крови (см. раздел 2.3) используется в процессе лечения тромбоцитопений, гипертромбоцитозов и тромбоцитемий, в том числе при онкогематологических заболеваниях, при диагностике и лечении ДВС-синдромов, тромботической тромбоцитопенической пурпуры и гемолитико-уремического синдрома, гипо- и апластических анемий, а также в процессе лечения цитостатиками и антикоагулянтами (гепаринами). В последнем случае особое значение имеет выявление развития у части больных, получающих гепарины, на 6-14-й дни лечения тромбоцитопении, которая может осложняться тромбозами (так называемая гепариновая тромботическая тромбоцитопения - ГТТ). Это грозное осложнение, наблюдающееся у 1-5% больных, подвергающихся гепаринизации, требует немедленной отмены введений гепарина, перевода больного на другие методы антитромботической терапии. Частота развития ГТТ при лечении нефракционированным гепарином значительно выше, чем при терапии некоторыми НМГ (фраксипарином) и значительно выше у больных с исходными иммунными заболеваниями (при СКВ, АФС и др.), особенно протекающими с изначальным умеренным снижением количества тромбоцитов в крови.

Учитывая возможность развития этого осложнения, мы, как и другие авторы, считаем, что в процессе применения гепаринов необходимы контрольные определения количества тромбоцитов в крови больных на 6-7-й и 10-14-й дни лечения.

Препаратом выбора для продолжения антитромботической терапии при осложнениях, связанных с применением гепаринов и в ряде других случаев, являются гепарин-сульфаты, в частности, сулодексид (Sulodexide или Vessel Due F). Последний оказывает комплексное¹ вазопротекторное действие на стенки кровеносных сосудов, вязкость и содержание липидов в крови, на сосудистую проницаемость и гемодинамику (особенно в микроциркуляторном русле), а также на различные звенья системы гемостаза - свертываемость крови, адгезию и агрегацию тромбоцитов, фибринолиз.

¹ Сулодексид. Механизмы действия и опыт клинического применения. /Под ред. А.М. Светухина и З.С. Баркагана. М., 2000. 124 с.

Для контроля за ингибцией функции тромбоцитов используются методы оценки спонтанной и стимулированной агонистами агрегации тромбоцитов либо их ретенции на мембранах (капиллярах) специальных приборов - см. раздел 2.4.

Из большого числа ингибиторов сосудисто-тромбоцитарного гемостаза наибольшее признание и широкое применение получили, как известно, ингибиторы и блокаторы рецепторов тромбоцитов - тиенопиридины - тиклопидин и клопидогрель (плавикс), а также аксисимаб (РеоПро) и стабильные аналоги простаглицина, в частности вазопростан, - незаменимый препарат при тяжелых диабетических и атеросклеротических облитерирующих ангиопатиях, ишемических язвах и начинающихся гангренах конечностей.

Для контроля за действием различных ингибиторов функции тромбоцитов используются лишь отдельные маркерные тесты. Так, при назначении аспирина достаточным является определение спонтанной и адреналин-агрегации тромбоцитов, при введениях тиенопиридинов (тиклопидин, клопидогрель) - спонтанной и АДФ-агрегации. При этом должны быть учтены неодинаковые сроки наступления эффектов разных препаратов. В частности, действие тиклопидина на агрегацию тромбоцитов проявляется, в основном, лишь после 5-го дня приема этого препарата, в то время как эффект аспирина обнаруживается уже в конце первых суток, а аксисимаба - немедленно после внутривенного введения. Скорость наступления действия клопидогреля зависит от исходной дозы препарата - при ударной дозе (более 150 мг) - обычно сразу же, при стандартной (75 мг/день) - на 2-й день.

7.2.2. Контроль терапии антикоагулянтами и мониторинг достижения достаточного их эффекта

Следует подчеркнуть, что контроль за дозированием антикоагулянтов с целью получения нужного эффекта и предупреждения развития геморрагических осложнений не дает ответа на наиболее важный вопрос: в какой степени удалось в данном конкретном случае с помощью проводимой терапии заблокировать образование в крови тромбина и трансформацию фибриногена в фибрин, предупредить угрозу повторного возникновения и нарастания массы тромбов. Иначе говоря, речь идет о мониторинговании эффективности и достаточности проводимого лечения. Без такого контроля неизбеж-

ны случаи избыточного (по дозам и времени использования) или, наоборот, недостаточного применения антикоагулянтов. В частности, пока весьма произвольно решается вопрос, какова должна быть продолжительность антикоагулянтной профилактики и терапии в посттравматическом и послеоперационном периоде, при онкотромбозах, у людей пожилого возраста и т.д.

Трудности в подборе доз препаратов имеют место при лечении больных с ожирением и отеками, когда нельзя обоснованно пользоваться расчетом доз препаратов на 1 кг массы тела больного, как и при беременности (учитывая задержку жидкости в организме женщин, вес плода и околоплодных вод). С такой же трудностью клиницисты сталкиваются при онкотромбозах с особо высокой тромбинемией, при ДВС-синдромах и у лиц преклонного возраста, особенно с сердечной недостаточностью, артериальной гипертензией, перенесших мозговой инсульт и т.д.. Во всех этих случаях представляется важным мониторинг антикоагулянтной терапии по достигаемому антитромботическому эффекту, основным проявлением которого является **ликвидация тромбинемии**, ибо пока сохраняется тромбинемия, неизбежно поддерживается трансформация фибриногена в фибрин и остается высокий риск прогрессирования тромботического процесса. Ликвидация же тромбинемии исключает дальнейшее развитие коагуляционных тромбов.

Изложенное позволяет нам постулировать положение, согласно которому лечение любыми антикоагулянтами должно проводиться такими дозами препаратов, которые надежно предупреждают и устраняют тромбинемия¹. Соответственно и продолжительность применения антикоагулянтов должна определяться по стабильности ликвидации тромбинемии и устранения угрозы ее рецидивирования.

Наш опыт показывает, что при достижении после назначения гепарина или кумарина рекомендуемых уровней гипокоагуляции, тромбинемия, в силу разных причин, часто не купируется, оставаясь

¹ Баркаган З.С., Момот А.П. К методике индивидуального контроля за достаточностью антикоагулянтной профилактики и терапии. Клиническая лабораторная диагностика. - 1999. - № 10. - С. 46-47; Баркаган З.С., Момот А.П. О мониторинге антикоагулянтной терапии у больных пожилого и старческого возраста. Клиническая геронтология. - 2000. - Т.6, № 3-4. - С. 47-53; Баркаган З.С. и др. Выбор препаратов, подбор доз и мониторинг эффектов антитромботических средств. Проблемы стандартизации в здравоохранении. - 2000. - № 4. - С. 116.

нередко на достаточно высоком уровне, либо устраняется недостаточно устойчиво. С другой стороны, при некоторых тромбофилиях, которым свойственна не гипер-, а гипокоагуляция (антифосфолипидный синдром, дисфибриногемии, дефицит фактора XII и др.), трудно проводить контроль за гепаринотерапией из-за исходного снижения свертываемости крови. Во многих же других случаях расчетные дозы антикоагулянтов бывают избыточными, поскольку тромбинемия купируется при более низких количествах вводимых препаратов и при менее значительной гипокоагуляции, что имеет значение для предупреждения развития геморрагических осложнений. С учетом изложенного, мы, как и ряд других авторов¹ пришли к выводу о необходимости дополнения обычного контроля за антикоагулянтной терапией мониторингом ее достаточности методами определения маркеров тромбинемии (см. раздел 6.2).

А. Контроль за лечением антикоагулянтами непрямого действия (АНД)

Механизм действия АНД состоит в блокаде конечного этапа синтеза (γ -карбоксилирования) витамин К-зависимых факторов (VII, X, IX и II) свертывания, в основном, в клетках печени. Эти препараты действуют как конкурентные ингибиторы витамин К-редуктазы и витамин К-эпоксид редуктазы, ограничивают включение активной формы витамина К в биосинтез факторов свертывания. Под влиянием АНД образуются неактивные белковые молекулы факторов VII, X, IX и II, обозначаемые как PIVKA (Protein Inducted by Vitamin K Absence), не участвующие в процессе свертывания крови. В результате действия АНД возникает гипокоагуляция, препятствующая образованию тромбина, появлению и прогрессированию тромбозов.

В табл. 28 представлены две группы наиболее употребляемых АНД.

¹ Vukovic T., Proidl S., Teufelsbauer H. Et al. Laboratory monitoring of thromboprophylaxis with low molecular weight and standard heparin. *Thromb. Res.* -1992. - Vol. 66. - P. 735-743; Abbate R., Gori A.N., Farsi A. et al. Monitoring of Low-Molecular-Weight Heparins in Cardiovascular Disease. *Amer. J. Cardiol.* - 1998. - Vol. 82 (5B). - P. 33L-36L.

Таблица 28

Перечень основных антикоагулянтов непрямого действия

Кумарины	Индандионы
Пелентан (неодикумарин, дикумарин)	Фенилин (фениндион, фанилин)
Синкумар (аценокумарин)	Омефин
Варфарин (мареван)	
Никумалон (аценокумарин)	

Соединения, принадлежащие к индандионам, устарели и в большинстве стран не используются. В России из этих препаратов применяется лишь фенилин. Намного чаще лечение проводится производными кумарина. Эти препараты отличаются друг от друга дозировками и по скорости влияния на параметры коагулограммы. Практически важно разделять АНД на высоко кумулирующие с большой продолжительностью последействия (синкумар, дикумарин), препараты со средними кумулятивными свойствами (пелентан, неоодикумарин) и быстродействующие АНД (через 10-12 ч от начала приема) с коротким (около двух суток) последействием. В число последних входит оптимальный по своим лечебным свойствам наиболее широко используемый в большинстве стран препарат варфарин.

Основным тестом, используемым для контроля за дозировкой всех АНД является, как известно, протромбиновая (тромбопластиновая) проба. Однако в последние годы существенно пересмотрена методология этого исследования, что оказалось важным как для снижения риска возникновения геморрагических осложнений в процессе лечения, так и для поддержания у больных необходимого уровня гипокоагуляции. Стандартизация метода оказалась необходимой и в связи с неоднородностью используемых в протромбиновом тесте тромбопластинов. Кроме того, анализ отечественной литературы показывает, что лабораторный контроль за эффектами АНД часто осуществляется неправильно, нередко используются нестандартизированные и недостаточно активные тромбопластины. Расчет протромбинового индекса, много лет применявшийся в нашей стране и, к сожалению, часто используемый и поныне, не соответствует международным требованиям и "маскирует" применение тромбопластинов, не пригодных для правильного определения депрессии витамин К-зависимых факторов свертывания. Эти ошибки в совокупности существенно повышают риск как передозировки АНД и

развития у больных геморрагических осложнений, так и недостаточной эффективности используемых препаратов.

При контроле за приемом АНД необходимым является определение протромбинового (тромбопластинового) времени по Квику в соответствии с рекомендациями ВОЗ. В качестве основного реагента в этом тесте, как известно, используется тромбопластин, который должен быть стандартизирован по международному индексу чувствительности - МНО или ISI. Рекомендуемые характеристики тромбопластина, методика определения протромбинового времени и современной оценки результатов теста изложены в разделе 3.6 этого пособия.

Б. Контроль терапии гепаринами

Применение гепарина остается одним из базисных элементов антитромботической терапии и профилактики. Препарат используется также в комплексном лечении ДВС-синдрома, тромбофилий, нарушений микроциркуляции и инфарктов органов.

В группе гепаринов выделяют обычные и низкомолекулярные их виды. Первые представляют собой смесь полисахаридов, имеющих большой диапазон молекулярной массы - от 2000 до 30000 да, тогда как НМГ в большинстве своем - 3000-7000 да. Как ОГ, так и НМГ проявляют свое антитромботическое действие, образуя комплекс с плазменным антитромбином. Но если комплекс гепарин-ПАТ в равной степени инактивирует тромбин (фактор IIa) и фактор Ха, а также слабее другие ферментные факторы свертывания крови, то у НМГ преобладает анти-Ха действие с вариацией отношения анти-Ха/анти-IIa от 3,7-4,1 (у фраксипарина и клексана) до 2,0 (у фрагмина). Чем выше этот показатель, тем более значителен антитромботический эффект и менее выражено антикоагулянтное и геморрагическое действие препарата. Разные НМГ отличаются друг от друга по фармакодинамике и по способности вызывать гепариновую тромботическую тромбоцитопению (наиболее редка она у фраксипарина), а также локальным геморрагическим действием, которое опять же наименее выражено у кальциевой соли НМГ. В табл. 29 приведены основные отличия НМГ от ОГ, имеющие важное значение для клиницистов. Главные из них: 1) НМГ после как внутривенного, так и подкожного введения значительно дольше остаются в циркуляции и соответственно оказывают более продолжительный

анти тромботический эффект, что позволяет ограничиться 1-2-кратным их подкожным введением в сутки; 2) острофазовые белки в значительно меньшей степени связывают и инактивируют НМГ, чем ОГ; 3) профилактические дозы НМГ не требуют лабораторного контроля за дозировкой препарата, что позволяет проводить эту профилактику амбулаторно и на дому, в том числе и без участия медицинского персонала, что делает применение НМГ более доступным и экономичным, несмотря на более высокую стоимость этих препаратов; 4) применение ряда НМГ, особенно надропарина, реже осложняется геморрагиями, гепарин-индуцированной тромботической тромбоцитопенией и остеопорозом, чем при терапии ОГ.

Вместе с тем, следует учитывать, что разные НМГ по ряду характеристик существенно отличаются друг от друга, что связано как с неодинаковыми способами их получения, разным соотношением анти-Ха/анти-IIa активности, так и с содержанием в препарате натрия или кальция.

В целом, ОГ показан в случаях, когда имеется необходимость быстро вызвать гипокоагуляцию крови и купировать образование тромба или блокаду микроциркуляции, устранить опасную для жизни эмболию сосудов (например, ТЭЛА), воспрепятствовать на раннем этапе развитию острого ДВС-синдрома. НМГ применяются чаще и успешнее для профилактики всех видов венозных тромбозов, в том числе у обездвиженных больных (парезы, параличи), при переломах костей и ортопедических операциях, при онкотромбозах и сердечной недостаточности, а также в послеоперационном периоде и при большинстве тромбофилий.

Профилактическое использование НМГ, как указывалось выше, не требует лабораторного контроля, однако лечебное их применение, по аналогии с терапией и профилактикой с помощью ОГ, требует слежения за действием этих препаратов с целью предотвращения избыточного их введения и провокации геморрагических осложнений, а также для мониторингования достижения достаточного эффекта.

Контроль за свертываемостью крови может осуществляться у постели больного. В этом случае определяют время свертывания цельной крови (по Ли-Уайту и др.), которое при лечении должно удлиниться от исходных значений примерно в 1,5-2 раза. Однако этот метод крайне неточен, чреват получением ошибочных результатов.

Более точные результаты дает применение стандартизированных лабораторных методик.

Для такого контроля принято использовать определение активированного парциального тромбопластинового времени (см. раздел 3.5).

Таблица 29

**Сравнительная характеристика обычного
и низкомолекулярных гепаринов**

Показатели	ОГ	НМГ
1. Биодоступность, %	30	90
2. Период полудействия в крови	40-60 мин	3-4,5 ч
3. Продолжительность антитромботического эффекта, ч:		
а) подкожное введение	6-8	24-28
б) внутривенное введение	1,5-3	8-12
4. Отношение эффектов анти-Ха/анти-IIa	1:1	2,0-4,1
5. Зависимость от уровня в плазме АТ-III	++	+
6. Антитромботический эффект в эквивалентных дозах	1,0	3,0
7. Связывание с ПФ-4 тромбоцитов	++++	от (++) до (+)
8. Афинность к фактору Виллебранда, клеткам крови и белкам острой фазы	+++	+
9. Влияние на сосудистую проницаемость	+	-
10. Частота развития вторичной иммунной тромбоцитопении, %	1-4	0,1-2,0
11. Способность повышать сосудистую проницаемость	+	-
12. Частота подкожного введения в сутки:		
а) профилактика	2-3	1
б) лечение	4-6	1-2
13. Трансплацентарный пассаж	Нет	Нет
14. Необходимость лабораторного контроля при введении:		
а) профилактических доз	+	-
б) лечебных доз	+	+
15. Способность вызывать остеопороз	+++	+/-

При профилактическом подкожном введении ОГ (5000-10000, реже 15000 ед/сут в 2-3 приема) оптимальным результатом считается,

если в равном промежутке между двумя инъекциями достигнуто удлинение АПТВ, примерно, в 1,3 раза. При лечебном применении ОГ в виде медленной внутривенной инфузии поддерживают удлинение АПТВ в 1,5-2,5 раза по сравнению со средними показателями теста в контрольной нормальной плазме. Однако при ДВС-синдроме такой контроль мало эффективен, поскольку этот синдром сам по себе приводит к гипокоагуляции крови.

Необходимо также отметить, что АПТВ-реагенты разных фирм имеют неодинаковую чувствительность к гепарину и в разной степени реагируют на его антикоагулянтный эффект. Поэтому при контроле за действием ОГ важно использовать одни и те же диагностические наборы, адаптировать дозы препарата к реагентам, постоянно применяющимся в данной лаборатории.

При лечебном применении НМГ контроль за дозировкой также может осуществляться по АПТВ, однако, учитывая, что НМГ, в отличие от ОГ, обладают преимущественно анти-Ха действием, многие авторы в систему контроля вводят прямой способ оценки анти-Ха активности с использованием хромогенного субстрата (см. раздел 4.2). Вместе с тем, такие наборы дороги и пока мало доступны многим лабораториям, требуют специального оборудования.

7.3. МОНИТОРИРОВАНИЕ ДОСТАТОЧНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ АНТИКОАГУЛЯНТАМИ

Контроль достаточности и необходимой длительности применения всех антикоагулянтов может проводиться путем учета достижения и стабильности устранения у исследуемых больных тромбинемии и маркеров наличия в плазме крови трансформации фибриногена в фибрин. Эти маркеры рассмотрены нами в разделе 6.1. Наиболее простым, общедоступным и легко выполнимым в любых условиях методом определения тромбинемии по разработанному в нашем центре и испытанному более, чем на 10 000 больных методом является количественный орто-фенантролиновый тест, позволяющий выявлять наличие и ликвидацию тромбинемии, контролировать достаточность антикоагулянтной терапии по содержанию в плазме РФ или РФМК (см. разделы 6.2.1.1.2 и 6.1.2). Методика пригодна и для мониторинга эффектов препаратов антитромбинового действия (гирудина и др.).

7.4. МОНИТОРИНГ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТРОМБОЛИТИКАМИ

Тромболитические препараты, вызывающие растворение уже образовавшихся тромбов, применяются с целью ликвидации массивных тромбозов, тромбозмболий (особенно при ТЭЛА), при лечении острого инфаркта миокарда, при острой окклюзии периферических артерий. Основные представители этой группы препаратов приведены в табл. 30.

Клинический эффект тромболитической терапии основан на способности препаратов генерировать плазмин из плазминогена, фиксированного в тромбе и, в меньшей степени, циркулирующего в крови. Плазмин, образующийся в циркуляции, в большей своей части быстро нейтрализуется антиплазминами, тогда как фиксированный на тромбе сохраняет свою тромболитическую активность. Этим объясняется, почему фибринолиз при всех видах внутрисосудистого свертывания крови преобладает над фибриногенолизом. Оба этих процесса могут оцениваться отдельно, поскольку продукты деградации фибрина и фибриногена имеют разные антигенные детерминанты.

Таблица 30

Перечень основных тромболитиков, применяющихся при лечении больных

Препараты	Период полужизни, мин
Стрептокиназа	18-25
Урокиназа	13-20
Тканевой активатор плазминогена (ТПА, актилизе)	2-6
Активатор плазминогена - одноцепочечная урокиназа	5-8
Плазминоген-стрептокиназный активированный комплекс (АПСАК)	70-90

Маркерами действия тромболитиков являются удлинение тромбинового времени свертывания (раздел 3.7), динамика содержания ПДФ и D-димера в плазме (разделы 5.8 и 6.2), уровня в ней фибриногена (раздел 3.8). Желательно также определять уровень плазминогена в плазме (см. раздел 5), поскольку значительное снижение его, исходное или возникающее в процессе тромболитической терапии ведет к ослаблению лечения. В этих случаях необходимо вклю-

чать в терапию внутривенные введения концентрата плазминогена (полученного из крови или рекомбинантного), либо свежезамороженной плазмы, в которой содержатся все компоненты плазминовой системы. Отсюда понятно преимущество препарата АПСАК, включающего в себя как плазминоген, так и стрептокиназу.

К осложнениям тромболитической терапии относятся кровотечения, аллергические реакции, вторичная гиперагрегация тромбоцитов. Кровотечения наблюдаются у 3-40% больных, и частота их возрастает у пациентов, получающих комплексную терапию ингибиторами функции тромбоцитов и тромболитиками, хотя при ОИМ именно эта комбинация наиболее эффективна. Признаком угрозы геморагий являются значительные кровотечения из мест прокола сосудов при проведении инвазивных диагностических или терапевтических процедур. Геморрагический инсульт при тромболитической терапии регистрируется почти у 2% больных, особенно у пожилых людей и гипертоников, а также при наличии в анамнезе патологии сосудов головного мозга, инсультов и преходящих расстройств мозгового кровообращения. Учет этих факторов риска и слежение за динамикой маркеров лизиса фибрина и фибриногена, уровня плазминогена и функции тромбоцитов позволяют оценивать степень активации и истощения плазминовой системы, а также динамику вторичных нарушений гемокоагуляции (по тромбиновому времени) и путем внесения изменений в проводимую терапию снизить опасность развития перечисленных выше осложнений.

8. ДИАГНОСТИКА АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА (ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА)

Под термином "антифосфолипидный синдром" (АФС) объединяется группа аутоиммунных нарушений, характеризующаяся наличием в крови в высоком титре антител к содержащимся в плазме отрицательно заряженным мембранным фосфолипидам - фосфатидилсерину, кардиолипину и др., а также к связанным с этими фосфолипидами гликопротеинам (β_2 -гликопротеину-I аннексину V и/или протромбину). Другой важной характеристикой этого синдрома является нарушение ряда параметров свертываемости крови - развитие гипокоагуляции в различных так называемых фосфолипидзависимых тестах, выполняемых на бедной тромбоцитами плазме (БТП). Эта гипокоагуляция, которая обозначается как наличие в плазме крови волчаночных антикоагулянтов (ВА), устраняется или становится значительно менее выраженной при добавлении к БТП взвеси фосфолипидных мембран, полученных из разрушенных тромбоцитов, либо эритрофосфатида.

Антифосфолипидный синдром является одним из наиболее часто встречающихся видов приобретенной тромбофилии, в связи с чем его распознавание должно включаться в диагностический процесс во всех случаях ранних и особенно рецидивирующих венозных и артериальных тромбозов различной локализации, тромбозмболий, динамических нарушений мозгового кровообращения и ишемических инсультов, в том числе протекающих с синдромами мигрени, нарушениями памяти, парезами, эпи-синдромом, нарушениями зрения и другими церебрально-сосудистыми проявлениями, а также при упорном невынашивании беременности (внутриутробная гибель плода, выкидыши), наличии ливедо, умеренной тромбоцитопении, сочетающейся с тромбозами и ишемическими явлениями, ложно положительной реакцией Вассермана и другими проявлениями. При этом следует учитывать, что наряду с так называемым "первичным антифосфолипидным синдромом" часты случаи его сочетания с

системной красной волчанкой, узелковым периартериитом и другими заболеваниями аутоиммунной природы, а также с вирусными и лимфопролиферативными болезнями, меняющими иммунный статус организма. Эти формы обозначаются как вторичный АФС, и в их симптоматику входят как признаки основного заболевания, так и АФС. К вторичному АФС могут быть отнесены и случаи этой формы патологии, возникающие вследствие ряда лекарственных воздействий, которые трактуются как гаптеновые иммунные антифосфолипидные синдромы.

В процессе многолетних наблюдений более, чем над 800 больными с АФС мы неоднократно сталкивались с рядом типичных ошибок, допускаясь при распознавании этой патологии, в результате чего АФС либо не выявлялся, либо, что наблюдалось несравненно чаще, диагностировался ошибочно у больных, у которых в действительности этого синдрома не было. Среди ошибок в распознавании АФС такая гипердиагностика имела место более, чем в 70% случаев. Анализ этих ошибок показал, что они связаны, в основном, со следующими причинами:

1. Недостаточно полным обследованием больных и применением ограниченного числа рекомендуемых для такой диагностики тестов. Так, диагноз АФС часто ставится лишь на основании одного антикардиолипинового теста без определения антител к другим фосфолипидам и без выявления эффектов так называемых "волчаночных антикоагулянтов". Между тем, известно, что антикардиолипиновый тест, несомненно, являющийся наиболее "ходовым" и стандартизированным, обладает сравнительно низкой специфичностью, поскольку кардиолипин является компонентом лишь мембран внутриклеточных органелл, содержится в большом количестве в плазме здоровых людей, будучи в ней заблокирован другими компонентами (В.А. Саенко, Г.М. Ротт, А.М. Поверенный. Бюл. экспер. биол. мед. - 1989.- № 2. - С. 217) и бывает положительным не только при АФС, но и при других видах патологии. В связи с этим, антикардиолипиновый тест при всей своей высокой стандартности и воспроизводимости должен дополняться другими методами как иммунологической диагностики, так и комплексным определением эффектов ВА. К этому нужно добавить, что антикардиолипиновый тест может считаться положительным лишь при очень высоких его показаниях, превышающих в несколько раз нормальный уровень этих антител. Вместе с тем, необходимо определение при АФС не только анти-

кардиолипидных антител, но и титра антител к другим мембранным фосфолипидам (фосфатидилсерину и др.).

2. Иммунодиагностика АФС, согласно современным рекомендациям, должна включать в себя, помимо определения титра антифосфолипидных антител, принадлежащим к разным классам иммуноглобулинов, исследование антител к некоторым гликопротеинам, фиксированным на фосфолипидных мембранах. Важнейшими из них являются β_2 -гликопротеин-I (β_2 ГП-I), аннексин V и протромбин. Для повышения точности диагностики и уточнения степени тромбогенности иммунного процесса существенное значение имеет определение титра антител хотя бы к одному из этих белков. Наиболее показательным в этом отношении является определение титра антител к (β_2 ГП-I). В настоящее время разрабатываются также методики определения в сыворотке крови титра антител к белково-фосфолипидным неоантигенам.

3. Следует иметь в виду, что и при достаточно полном иммунологическом обследовании значительная часть случаев АФС (по разным данным в пределах 35-60%) остается нераспознанным, если одновременно не определяются в плазме антикоагулянты волчаночного типа. Последние также неоднородны, как и антифосфолипидные антитела, в связи с чем их выявление должно проводиться полным комплексом предложенных для этого методик.

Иначе говоря, подобно тому, как один иммунологический тест не обеспечивает надежного распознавания АФС, выявление эффектов волчаночного антикоагулянта также требует использования полного комплекса предложенных для этого фосфолипидзависимых скрининговых и подтверждающих методик.

Способы выявления и идентификации АВТ

Все включаемые в эту группу исследования выполняются на бедной тромбоцитами плазме. Они состоят из групп скрининговых и подтверждающих коагуляционных тестов, выполняемых либо вручную, либо на коагулометрах современных конструкций, но не на устаревших электрокоагулометрах и не на тромбоэластографах.

Из скрининговых тестов наиболее доступным, но, вместе с тем наименее специфичным является определение каолинового времени свертывания БТП. Наличие ВА может быть заподозрено при удлинении каолинового времени более, чем в 1,25 раза по сравнению

с контролем. Вместе с тем, следует помнить, что многие ВА не влияют на этот показатель и что его нарушение может быть обусловлено не только эффектами ВА, но и другими причинами.

Намного более информативны определения АПТВ (АЧТВ), выполняемые не с обычными, а со специальными фосфолипидными реагентами, высоко чувствительными к действию ВА. Для этого в качестве международных эталонов, признанных золотым стандартом, применяют диагностикумы, содержащие "Platelin LS" фирмы Organon-Текника или "Staclot-LA" фирмы Stago. Многолетние испытания, проводившиеся в нашей лаборатории, подтвердили высокую информативность этих тестов. Под влиянием ВА время свертывания в них удлиняется, по сравнению с эталонной нормальной плазмой, в 1,2 раза и более. Наличие ВА затем уточняется подтверждающими тестами (раздел 8.1).

Особое место в выявлении ВА занимают тесты с фосфолипидзависимыми коагулазами змеиных ядов. За рубежом с этой целью используется определение времени свертывания при добавлении к исследуемой БТП больного и к контрольной нормальной плазме разведенного яда гадюки Расселла. В нашей лаборатории установлено, что с этой же целью может быть использован коагуляционный тест с разведенным ядом среднеазиатской гюрзы (*Vipera lebetina turanica*). В больших сериях исследований, в том числе выполненных в нашем центре, показано, что коагуляционные тесты с фосфолипидзависимыми разведенными змеиными ядами дают высокую корреляцию с показанием пробы с Platelin LS ($r = 0.9$; $P < 0,02$).

Для уточнения специфичности нарушений фосфолипидзависимых тестов используется определение отношения показателей времени свертывания, полученных в этих тестах, к времени свертывания, полученного в тестах с реагентами, не чувствительными к эффектам ВА. Определение этих индексов не только подтверждает то, что нарушение гемокоагуляции у исследуемого больного действительно зависит от эффекта ВА, но и позволяет количественно оценить степень блокады ПФМ, и, что особенно важно, позволяет исключить действие других антикоагулянтов на показания тестов.

В норме указанные индексы варьируют в пределах от 0,8 до 1,2, а у больных с АФС - существенно повышены.

Некоторые виды ВА, отличающиеся высокой тромбогенностью, вызывают значительное замедление свертывания и в коагуляционном тесте с разведенным тканевым тромбопластином. Реагент раз-

водится так, чтобы нормальное протромбиновое время БТП было в пределах 45-55 с. Однако нужно иметь в виду большое разнообразие выпускаемых разными фирмами тканевых тромбопластинов - получение их из разных исходных продуктов, неодинаковую чувствительность к действию ВА и др.

Качественно новым этапом в разработке методов диагностики АФС явилось создание в нашей лаборатории тестов, с помощью которых можно не косвенно, а путем прямого измерения оценивать степень блокады плазменных фосфолипидных мембран. В основе этих методик лежат удаление и перенос ПФМ в процессе микрофльтрации БТП через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, с определением коагуляции до и после микрофльтрации (см. раздел 8.2).

Таким образом, при диагностике АФС наряду с иммунологическими тестами важное значение имеет выявление эффектов волчаночных антикоагулянтов. С этой целью используется группа фосфолипид-зависимых коагуляционных тестов - скрининговых и подтверждающих, причем надежная диагностика обеспечивается только комплексным использованием группы таких тестов. Эти нарушения выявляются на бедной тромбоцитами плазме в тестах, основанных на применении низких концентраций активаторов процесса свертывания крови.

8.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА В ГРУППЕ ФОСФОЛИПИДЗАВИСИМЫХ КОАГУЛЯЦИОННЫХ ТЕСТОВ

Принцип. Определение ВА основано на том, что гипокоагуляция, обусловленная этими ингибиторами свертывания, выявляется фосфолипидзависимыми тестами, не корригируется нормальной бедной тромбоцитами плазмой, но исправляется добавлением к исследуемой плазме фосфолипидных мембран, полученных из разрушенных нормальных тромбоцитов или эритрофосфатида и др.)¹. В связи с этим, используемые для диагностики ВА тесты подразделяются на следующие группы: 1) **скрининговые фосфолипидзависимые,**

¹ Л.П. Цывкина, Г.В. Сердюк, А.Н. Мамаев, А.П. Момот, Е.В. Селиванов Основы диагностики и контролируемой терапии антифосфолипидного синдрома: Методические рекомендации. - Барнаул, 2001/Под ред. З.С. Баркагана.

дающие представление о нарушениях, связанных с эффектами ВА; 2) **подтверждающие**, в которых устанавливается, что гипокоагуляция в тестах первой группы устраняется или значительно корректируется добавлением тромбоцитарных фосфолипидных мембран. В группу подтверждающих включают индексы, основанные на параллельном выполнении и сопоставлении результатов фосфолипидзависимых и фосфолипиднезависимых проб, а также специфические тесты, основанные на учете сдвигов гемокоагуляции до и после удаления из плазмы плазменных фосфолипидных мембран и степени коррекции этих сдвигов добавлением в систему нормальных ПФМ¹. Схема определения ВА представлена на рис. 19.

Материал для исследования. Во всех тестах используется цитратная бедная тромбоцитами плазма. Для получения точных и воспроизводимых результатов особое внимание нужно уделять соблюдению оптимальных условий ее получения (см. раздел 11.1). Исследование гепаринизированной (за исключением способа диагностики, основанного на параллельном использовании люпусчувствительного и люпус-нечувствительного АПТВ-реактанта см. п. 8.1.2.3) или замороженной плазмы не допускается.

Все исследования могут выполняться вручную, но точность диагностики значительно возрастает при определениях на коагулометре. Следует отметить также, что приведенные ниже нормативные показатели тестов носят ориентировочный характер. Нормальные значения должны быть установлены в каждой лаборатории применительно к используемому оборудованию и реагентам.

8.1.1. I этап. Скрининговые тесты

Общей особенностью этих тестов является их высокая чувствительность к действию ВА, но недостаточная специфичность, в связи с тем, что на их показания может влиять дефицит плазменных факторов свертывания, либо наличие ингибиторов последних. Для разграничения этих видов нарушений используются сопоставление фосфолипидзависимых и фосфолипиднезависимых тестов, а так-

¹ А.П. Момот, З.С. Баркаган, А.Н.Мамаев, К.М. Бишевский. Использование элиминации фосфолипидных мембран плазмы для выявления эффектов волчаночного антикоагулянта. Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. - №8. - С. 20-22. Патент РФ № 20580314. Приоритет от 15.03.93.

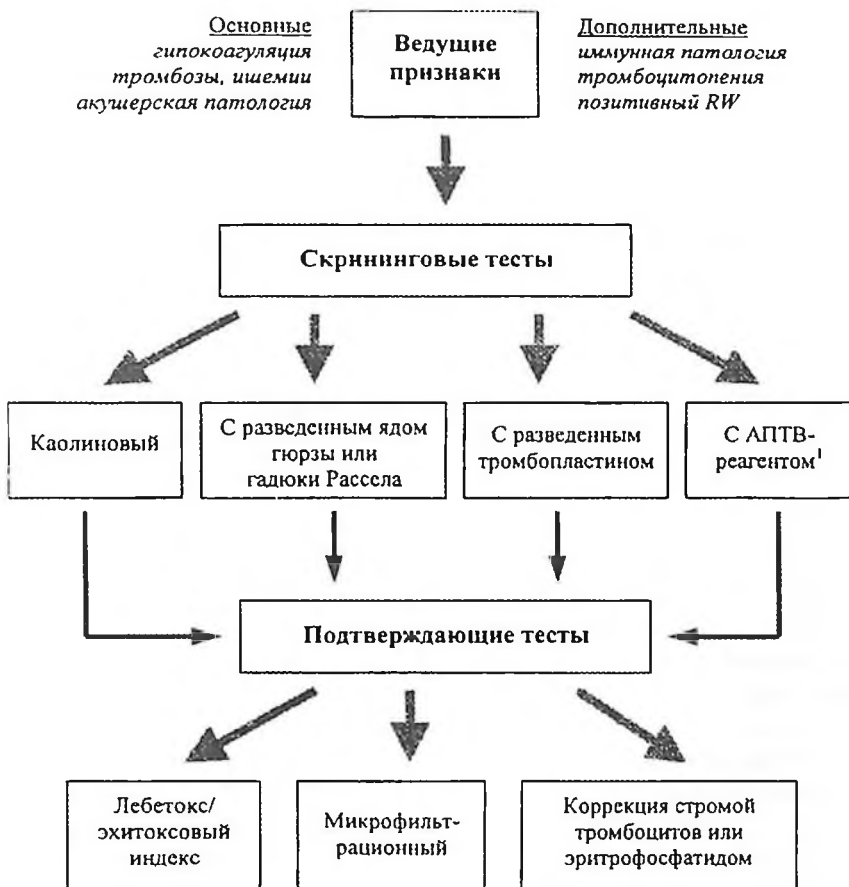


Рис. 19. Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.

¹ - с применением люпус-чувствительных и люпус-нечувствительных АПТВ-реагентов.

же коррекционные пробы (см. далее).

Каолиновое время свертывания БТП

Реактивы. 1. Взвесь легкой фракции каолина (фирмы Технология-Стандарт) на буфере Михаэлиса или трис-НСI буфере (0,05M, рН 7,4) в концентрации 0,25 мг/мл.

2. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Ход определения. Исследуемую плазму в объеме 0,1 мл сме-

шивают с 0,1 мл взвеси легкого каолина и инкубируют 3 мин на водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$. После этого добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция ($+37^{\circ}\text{C}$) и определяют время свертывания.

Аналогичным образом определяют каолиновое время в контрольной нормальной БТП.

Чтение результатов. В норме каолиновое время БТП, измеренное мануально, равно в среднем $88,1 \pm 1,2$ с, с пределами нормальных колебаний ($X \pm 1,5\sigma$) от 75 до 102 с, а при измерении на коагулометре - в среднем $78,1 \pm 1,0$ с, с пределами нормальных колебаний ($X \pm 1,5\sigma$) от 67 до 89 с. Замедление свертывания в каолиновом тесте по сравнению с контролем более, чем в 1,25 раза может быть связано с действием ВА.

АПТВ с реагентом, чувствительным к ВА

Реактивы. 1. АПТВ-реагент - "Platelin LS" фирмы Organon-Teknika, "Staclo-LA" фирмы Stago, "PTT-LS" фирмы Nobis или аналогичные. Разводятся согласно инструкции.

2. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Ход определения. 0,1 мл исследуемой БТП смешивают с 0,1 мл АПТВ-реагента, инкубируют 3 мин при $+37^{\circ}\text{C}$. После этого добавляют 0,1 мл рабочего раствора хлорида кальция ($+37^{\circ}\text{C}$) и определяют время свертывания.

Аналогичным образом определяют время свертывания в контрольной нормальной БТП.

Чтение результатов. В норме АПТВ, измеренное на коагулометре, при использовании реактива *Platelin LS* равно в среднем $32,6 \pm 0,9$ с и колеблется ($X \pm 1,5\sigma$) в диапазоне от 27 до 39 с. Замедление свертывания по сравнению с контролем более, чем в 1,2 раза может быть связано с действием ВА.

Примечание. Этот тест считается одним из наиболее информативных среди ориентировочных для выявления ВА.

Тест с разведенными фосфолипидзависимыми змеиными ядами (гадюки Рассела или гюрзы)

Реактивы. 1. Яд гадюки Рассела (поставщик - Burroughs Wellcome & Co) или др. Реагент может быть заменен реагентом из яда гюрзы - лебетоксом, входящим в состав диагностикума "Люпус-тест" фирмы Технология-Стандарт. Данные коагулазы являются фосфолипидзависимыми активаторами фактора X. Рабочий раствор

лебетокса получают следующим образом: на дистиллированной воде готовят маточный раствор из расчета 10,0 мг сухого вещества на 5 мл воды (2,0 мг/мл). Маточный раствор оставляют на сутки при +2...+8°C для стабилизации активности ("созревания"). Из маточного раствора путем последовательных разведений дистиллированной водой готовят разведения лебетокса с конечной концентрацией от 0,02 до 0,002 мг/мл в зависимости от исходной гемокоагулирующей активности образца яда с тем, чтобы в нормальной плазме время свертывания при мануальном исследовании было в пределах 45-55 с, а при исследовании на коагулометре - 35-45 с.

2. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Ход определения. В пробирку вносят 0,1 мл исследуемой БТП и 0,1 мл рабочего раствора лебетокса. Смесь инкубируют 1 мин при +37°C, затем в нее вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция (+37°C) и регистрируют время свертывания.

Исследование выполняют мануально или на коагулометре. В последнем случае диагностическая ценность теста значительно повышается.

Чтение результатов. Выражают в секундах, сравнивая лебетоксовое время свертывания контрольной нормальной и исследуемой БТП. Замедление свертывания по сравнению с контролем более, чем в 1,15 раза, может быть связано с действием ВА.

Тромбопластиновое время плазмы с "разведенным" тромбопластином

Реактивы. 1. Буфер Михаэлиса или трис-НСI буфер (0,05M, рН 7,4).

2. Тромбопластин мозговой человека (производства Кировского НИИГиПК или фирмы Технология-Стандарт). Разведение тромбопластина - 50 мг сухого вещества помещают в фарфоровую ступку и растирают в 1,0 мл буфера. Постепенно объем смеси увеличивают буфером до 5,0 мл. Взвесь центрифугируют при 1500 об/мин в течение 7 мин и получают в надосадке маточную эмульсию тромбопластина. Для приготовления рабочей эмульсии 0,05 мл маточного раствора смешивают с 5,0 мл буфера (разведение 1:100) и проверяют активность на контрольной нормальной БТП.

3. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Ход определения. 0,1 мл исследуемой БТП инкубируют в течение 1 мин при +37°C с 0,1 мл рабочей эмульсии тромбопластина.

После этого к смеси добавляют 0,1 мл хлорида кальция и определяют время свертывания.

Параллельно определяют данный показатель в контрольной нормальной БТП.

Чтение результатов. В норме тест с "разведенным" тромбопластином дает свертывание в пределах 45-55 с. Все значения, превышающие в 1,2 раза аналогичный показатель в контрольной БТП, считают отклонением от нормы, которое может быть связано с ВА.

8.1.2. II этап. Подтверждающие тесты и индексы

Определения выполняются только в тех тестах, в которых было выявлено замедление свертывания при скрининговом обследовании.

8.1.2.1. Подтверждающие пробы с коррекцией нарушений отмытыми разрушенными тромбоцитами¹

Повторяют удлинненные скрининговые тесты на БТП больного после добавления к ней суспензии разрушенных нормальных тромбоцитов (или эритрофосфатида).

Реактивы. 1. Те же (см. выше).

2. Отмытые и разрушенные тромбоциты человека. Приготавливают следующим образом: стабилизированную 3,8% раствором цитрата натрия кровь (1:9) центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин. В полученной богатой тромбоцитами плазме подсчитывают количество тромбоцитов и доводят их количество с помощью трис-НСI буфера (0,05М, рН 7,4) до уровня 100×10^9 /л. Затем плазму центрифугируют 20 мин при 3000 об/мин. Полученные в осадке тромбоциты дважды отмывают в том же буфере, доводя каждый раз объем буфера до первоначального (с учетом разведения буфером) объема плазмы. Суспензию тромбоцитов замораживают при $-16...-20^\circ\text{C}$ в течение 20-30 мин и размораживают на водяной бане при температуре $+37^\circ\text{C}$. Процедуру замораживания и оттаивания повторяют трижды. Суспензию разрушенных тромбоцитов разливают по флаконам и хранят при температуре $-16...-20^\circ\text{C}$.

¹ Все опытные пробы исследуют параллельно с контрольной нормальной БТП.

Фирма Технология-Стандарт выпускает набор реактивов для определения ВА - "Люпус-тест", в состав которого входит стандартизированный тромбоцитарный реагент - "тромбоцитин".

Каолиновое время свертывания

Ход определения. К 0,05 мл БТП больного добавляют 0,05 мл взвеси тромбоцитов, затем 0,1 мл взвеси каолина. Смесь инкубируют на водяной бане (+37°C) 3 мин, затем в нее вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция (+37°C) и определяют время свертывания.

АПТВ с реагентом, высоко чувствительным к волчаночному антикоагулянту

Ход определения. К 0,05 мл БТП больного добавляют 0,05 мл взвеси тромбоцитов, а затем 0,1 мл АПТВ-реагента, инкубируют 3 мин при +37°C. После этого добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция (+37°C) и определяют время свертывания.

Тест с разведенными фосфолипидзависимыми змеиными ядами

Ход определения. К 0,05 мл БТП больного добавляют 0,05 мл взвеси тромбоцитов, а затем 0,1 мл раствора лебетокса, инкубируют 1 мин при +37°C, затем в пробирку со смесью вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция (+37°C) и регистрируют время свертывания.

Тромбопластиновое время плазмы с "разведенным" тромбопластином

Ход определения. К 0,05 мл БТП больного добавляют 0,05 мл взвеси тромбоцитов, затем 0,1 мл рабочей эмульсии тромбопластина, инкубируют 1 мин при +37°C. После этого к смеси добавляют 0,1 мл хлорида кальция (+37°C) и определяют время свертывания.

Чтение результатов. При наличии ВА в исходно нарушенных коагуляционных тестах при добавлении взвеси разрушенных тромбоцитов происходит выраженная коррекция свертывания БТП.

8.1.2.2. Пробы с добавлением контрольной нормальной БТП¹

Эти пробы проводятся для исключения зависимости выявленной

¹ Все опытные пробы исследуют параллельно с контрольной БТП.

гипокоагуляции от наличия в крови не ВА, а ингибиторов факторов свертывания или их дефицитом. Выполняются повторно с коррекцией те тесты, которые выявили гипокоагуляцию при первичном скрининге (см. пункт 8.1.1)

Реактивы. 1. Те же (п.8.1.1).

2. Свежая цитратная БТП здорового человека.

Рекомендуемая пропорция смешивания контрольной нормальной БТП и плазмы больного - 1+1, ряд авторов применяют соотношение 1+4, для чего в отдельной пробирке 0,1 мл контрольной нормальной БТП смешивают с 0,4 мл БТП больного, а для анализа используют 0,1 мл смеси. Важно при этом, чтобы до выполнения того или иного теста смесь хранилась не более 2-3 мин.

Каолиновое время свертывания

Ход определения. К 0,05 мл контрольной нормальной БТП добавляют 0,05 мл БТП больного с гипокоагуляцией, а затем 0,1 мл взвеси каолина. Смесь инкубируют на водяной бане (+37°C) 3 мин, после чего в нее вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция (+37°C) и определяют время свертывания.

АПТВ с реагентом, высоко чувствительным к волчаночному антикоагулянту

Ход определения. К 0,05 мл контрольной нормальной БТП добавляют 0,05 мл БТП больного с гипокоагуляцией, а затем 0,1 мл АПТВ-реагента, инкубируют 3 мин на водяной бане при +37°C. После этого добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция (+37°C) и определяют время свертывания.

Тест с разведенными фосфолипид-зависимыми змеиными ядами

Ход определения. К 0,05 мл контрольной нормальной БТП добавляют 0,05 мл БТП больного с гипокоагуляцией, а затем 0,1 мл раствора лебетокса, инкубируют 60 с на водяной бане при +37°C, затем в пробирку со смесью вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция (+37°C) и регистрируют время свертывания.

Тромбопластиновое время плазмы с "разведенным" тромбопластином

Ход определения. К 0,05 мл контрольной нормальной БТП добавляют 0,05 мл БТП больного с гипокоагуляцией, а затем 0,1 мл рабочей эмульсии тромбопластина, инкубируют 60 сек на водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$. После этого к смеси добавляют 0,1 мл хлорида кальция ($+37^{\circ}\text{C}$) и определяют время свертывания.

Чтение результатов. При гипокоагуляции, обусловленной ВА, добавление нормальной БТП не нормализует время свертывания. В отличие от этого, при гипокоагуляции, связанной с дефицитом плазменных факторов свертывания, происходит нормализация показаний тестов.

8.1.2.3. Скрининг волчаночного антикоагулянта на основе разной чувствительности к нему АПТВ-реагентов

Принцип. Определение ВА в данном исследовании основано на сравнительной оценке результатов АПТВ-теста, выполненного с двумя реагентами: высокочувствительным к ВА (АПТВ_{ВА+}) и низкочувствительным к ВА (АПТВ_{ВА-})¹.

Наличие в плазме ВА ведет к большему удлинению времени свертывания в тесте с АПТВ_{ВА+}, чем с АПТВ_{ВА-}-реагентом. Это различие не выявляется при других причинах удлинения свертывания, в частности, при дефиците факторов свертывания, наличии их инбиторов, при лечении гепарином (до концентрации гепарина в плазме 0,25 ед/мл) и непрямыми антикоагулянтами. При всех этих ситуациях имеются близкие результаты в АПТВ_{ВА+} и АПТВ_{ВА-}-тестах.

Далее приводится описание метода на примере использования диагностикума "Экспресс-Люпус-тест" фирмы Технология-Стандарт.

Реактивы. 1. АПТВ-реагент с высокой чувствительностью к ВА (АПТВ_{ВА+}-реагент). Поставляется в жидкой форме, готовой к использованию. Сохраняет активность более 1 года при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$.

2. АПТВ_{ВА-}-реагент с низкой чувствительностью к ВА, лиофилизи-

¹ Заявка на патент № 2000126707 "Способ диагностики антифосфолипидного синдрома". Приоритет от 23.10.2000.

рованный. Разводится добавлением 2,5 мл дистиллированной воды.

3. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

4. Плазма, с наличием в ней ВА (сравнительный образец).

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Ход определения. *Этап 1.* В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) вносят 0,1 мл плазмы больного и инкубируют при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ 1 мин, затем добавляют 0,1 мл АПТВ_{ВА+}-реагента и инкубируют дополнительно в течение 3 мин. После этого вносят в смесь 0,1 мл раствора хлорида кальция (предварительно подогретого до $+37^{\circ}\text{C}$), включают секундомер или таймер коагулометра и определяют время свертывания.

Аналогично, с применением АПТВ_{ВА+}-реагента, определяют время свертывания в контрольной нормальной плазме.

Этап 2. В кювету коагулометра или в пробирку вносят 0,1 мл плазмы больного и инкубируют при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ 1 мин, затем добавляют 0,1 мл АПТВ_{ВА-}-реагента и инкубируют смесь дополнительно в течение 3 мин. После этого вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция (предварительно подогретого до $+37^{\circ}\text{C}$) и определяют время свертывания.

Аналогично определяют время свертывания с АПТВ_{ВА-}-реагентом в контрольной нормальной плазме.

Чтение результатов. Вычисляют показатель NR по формулам:

$$R_1 = \frac{t_1}{t_2}; \quad R_2 = \frac{t_3}{t_4}; \quad NR = \frac{R_1}{R_2},$$

где t_1 - время свертывания плазмы больного с реагентом АПТВ_{ВА+};

t_2 - время свертывания контрольной нормальной плазме с реагентом АПТВ_{ВА+};

t_3 - время свертывания плазмы больного с реагентом АПТВ_{ВА-};

t_4 - время свертывания контрольной нормальной плазмы с реагентом АПТВ_{ВА-};

R_1 - показатель удлинения времени свертывания у больного, в сравнении с контролем, в тесте с АПТВ_{ВА+}-реагентом;

R_2 - показатель удлинения времени свертывания у больного, в сравнении с контролем, в тесте с АПТВ_{ВА-}-реагентом;

NR - отношение, которое количественно оценивает гипокоагуляционный эффект ВА.

У здоровых людей и больных с разными видами патологии гемо-

стаза, но без наличия в плазме крови ВА, показатель NR в среднем равен $0,99 \pm 0,02$ ($\sigma = 0,10$), с пределами нормальных колебаний ($\pm 2\sigma$) от 0,79 до 1,19. Диапазон NR от 1,2 до 1,3 является сомнительным результатом и требует повторного исследования и сопоставления с другими тестами. Если NR равен или превышает 1,3, определяют наличие волчаночного антикоагулянта.

8.1.2.4. Определение лебетокс/эхитоксового индекса (аналог текстарин/экаринового индекса)

Принцип. Основано на параллельном выполнении и сопоставлении результатов фосфолипидзависимого (лебетоксового) и фосфолипиднезависимого (эхитоксового) ядовитых тестов.

Определение выполняют лишь в тех случаях, когда при скрининге была выявлена гипокоагуляция в тесте с разведенным ядом гюрзы.

Реактивы. 1. Раствор яда гюрзы (лебетокс), активностью 35-45 с; приготовление - см. п. 8.1.1.

2. Раствор яда эфы (эхитокс). Рабочий раствор этого яда получают следующим образом: на дистиллированной воде готовят маточный раствор яда из расчета 2,0 мг/мл дистиллированной воды. Маточный раствор оставляют на сутки при $+2...+8^{\circ}\text{C}$ для стабилизации ("созревания"). Из маточного раствора путем последовательных разведений дистиллированной водой готовят рабочий раствор эхитокса, добиваясь того, чтобы он вызывал свертывание контрольной нормальной БТП в те же сроки, что и раствор яда гюрзы (35-45 с).

3. Хлорид кальция, 0,277% раствор.

Примечание. Предварительное тестирование разведенных ядов (гюрзы и эфы) следует проводить лишь на свежей цитратной БТП здоровых людей. Лиофилизированные и замороженные образцы контрольной нормальной плазмы для этой цели не пригодны.

А. Определение лебетоксового времени свертывания с разведенным ядом гюрзы

В пробирку вносят 0,1 мл исследуемой БТП и 0,1 мл рабочего раствора лебетокса. Смесь инкубируют 60 с при $+37^{\circ}\text{C}$, затем в нее вносят 0,1 мл раствора хлорида кальция ($+37^{\circ}\text{C}$) и регистрируют время свертывания.

Аналогично измеряют время свертывания в контрольной нормальной БТП.

Б. Определение эхитоксового времени свертывания с разведенным ядом эфы

К 0,1 мл БТП больного, предварительно прогретой на водяной бане (1 мин при $+37^{\circ}\text{C}$), добавляют 0,1 мл раствора эхитокса (имеющего комнатную температуру) и регистрируют время свертывания.

Аналогично измеряют время свертывания в контрольной нормальной БТП.

Чтение результатов. Рассчитывают отношение NR по результатам лебетоксового и эхитоксового тестов по формуле:

$$\text{NR} = \frac{\text{Время свертывания плазмы больного, с}}{\text{Время свертывания контрольной плазмы в том же тесте, с}}$$

Далее рассчитывают лебетокс/эхитоксовое (Л/Э) отношение:

$$\text{Л/Э} = \frac{\text{NR в лебетоксовом тесте}}{\text{NR в эхитоксовом тесте}}$$

В норме индекс Л/Э равен $1,00 \pm 0,1$ при мануальном определении и $1,02 \pm 0,05$ при коагулометрическом.

Средние значения индекса Л/Э у больных с ВА равны $1,49 \pm 0,12$ (при мануальном определении) и $2,06 \pm 0,16$ (при коагулометрическом). Показатели, превышающие 1,15, говорят о наличии в плазме ВА.

8.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА ПО ПРОКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЕННЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Принцип. Тест основан на определении КВ свертывания БТП до и после удаления из нее методом микрофльтрации плазменных фосфолипидных мембран. По этим данным рассчитывают индекс прокоагулянтной активности ПФМ в % (см. методику "Определение активации процесса свертывания плазменными фосфолипидными мембранами" в разделе 3.4). В методе учитывается свойство ВА

снижать прокоагулянтную активность ПФМ.

В норме индекс активности ПФМ составляет в среднем $99,8 \pm 0,9\%$ и варьирует в пределах 72-127 %. У больных с ВА в крови в 83% случаев определяется снижение активности ПФМ в плазме в среднем до 55% (от 0 до 70%), что связано с блокадой коагуляционно активных мембран антифосфолипидными антителами. Более точная диагностика может быть проведена описанным ниже способом.

Определение ВА по угнетению прокоагулянтной активности нормальных плазменных фосфолипидных мембран плазмой больного

Принцип. Внесение в профильтрованную БТП больного нормальных ПФМ сопровождается угнетением прокоагулянтной активности этих мембран антителами. Схема анализа представлена на рис. 20.

Осаждение на фильтре
ФМ из плазмы контроля

Удаление ПФМ из плазмы
больного фильтрацией

Добавление осажденных на фильтре ПФМ
контроля в профильтрованную плазму больного

Инкубация 120 мин

Определение КВ в пробах после инкубации
и расчет остаточной активности ПФМ

Рис. 20. Схема определения волчаночного антикоагулянта

Реактивы и оборудование. 1. Трис-НСI буфер, 0,05М, рН 7.4 (после приготовления пропускается через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм).

2. Каолин (легкая фракция), в концентрации 0,25 мг/мл.

3. 0,025М раствор хлорида кальция.

4. Фильтры с диаметром пор 0,2 мкм "*Minisart-RS15 SM177610Q*" фирмы "Sartorius" (Германия) в полипропиленовой оправе со шприцами для фильтрации.

Приготовление исследуемых образцов плазмы и получение из них ПФМ

Для получения анализируемых проб и их тестирования по каолиновому времени требуется по 2,5 мл БТП контроля и больного, а также три фильтра.

1. *Получение нормальной БТП, лишенной ПФМ.* Фильтруют 1,0 мл нормальной БТП (эту профильтрованную плазму обозначают как проба № 1).

2. *Получение нормальной БТП после возврата в нее собственных ПФМ.* Для этой цели фильтр, который был использован при приготовлении пробы №1 промывают 3,0 мл буфера, а затем переворачивают и пропускают через него 1,0 мл контрольной БТП, вследствие чего происходит возврат осажденных на фильтре ПФМ в ранее профильтрованную плазму (проба № 2 - контрольная).

3. *Получение плазмы больного, лишенной ПФМ.* Для этой цели фильтруют 1,0 мл БТП исследуемого больного через чистый фильтр, удаляя из нее ПФМ (полученная плазма обозначается как проба № 3).

4. *Добавление ПФМ, полученных из контрольной плазмы в профильтрованную плазму больного.* Для этого фильтруют 1,0 мл нормальной БТП через чистый фильтр, чем достигается осаждение ПФМ контроля на фильтре. Для удаления остатков плазмы фильтр, с задержанными на нем ПФМ контроля, промывают 3,0 мл буфера. Затем фильтр переворачивают и смывают с него 1,0 мл плазмы больного фильтрацией нормальные ПФМ. В результате происходит перемещение осажденных на фильтре нормальных ПФМ в профильтрованную плазму больного (проба № 4).

Ход определения. Инкубируют все четыре пробы в течение 120 мин при комнатной температуре (+18...+25°C), а затем определяют КВ свертывания в этих пробах. Для этого 0,1 мл из каждой ис-

следуемой пробы смешивают с 0,1 мл взвеси легкого каолина, инкубируют 3 мин при +37°C, после этого добавляют в смесь 0,1 мл раствора хлорида кальция и регистрируют время свертывания.

1. КВ в пробе №1 обозначают как t_1 .
2. КВ в пробе №2 обозначают как t_2 .
3. КВ в пробе №3 обозначают как t_3 .
4. КВ в пробе №4 обозначают как t_4 .

Чтение результатов. На основе проведенных определений рассчитывают исходную прокоагулянтную активность ПФМ в контрольной плазме (X_1) по формуле¹:

$$X_1, \% = 10^{3,8(\lg t_1 - \lg t_2) + 1}$$

Затем также рассчитывают прокоагулянтную активность контрольных ПФМ (X_2) после их инкубации с плазмой больного по формуле:

$$X_2, \% = 10^{3,8(\lg t_3 - \lg t_4) + 1}$$

Вычисляют остаточную активность контрольных ПФМ в профильтрованной плазме больного по формуле:

$$ОА, \% = \frac{X_2}{X_1} \times 100\%$$

Степень подавления прокоагулянтной активности нормальных ПФМ антителами, содержащимися в плазме больного, соответствует активности волчаночного антикоагулянта в профильтрованной БТП больного. В контрольных исследованиях ОА находится в пределах 85-115%.

Пример. При исследовании по данной методике больного с ВА получены следующие значения КВ:

- 1) в пробе №1 - 152 с (t_1).
- 2) в пробе №2 - 84 с (t_2).

¹ Формула рассчитана на основе калибровочных графиков, полученных при исследовании образцов плазмы с разным уровнем прокоагулянтной активности ПФМ.

3) в пробе №3 - 240 с (t_3).

4) в пробе №4 - 180 с (t_4).

Исходная прокоагулянтная активность ПФМ (X_1) составила:

$$X_1, \% = 10^{3.8(\lg 152 - \lg 84) + 1} = 95\%.$$

Прокоагулянтная активность ПФМ (X_2) контроля после их инкубации с плазмой больного была следующей:

$$X_2, \% = 10^{3.8(\lg 240 - \lg 180) + 1} = 30\%.$$

Остаточная активность ПФМ контроля оказалась равной:

$$OA, \% = \frac{30}{95} \times 100\% = 32\%.$$

Результат: анализ на ВА положительный.

8.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ (АФА) (принцип Harris, 1987)

Определение антител к кардиолипину и фосфатидилсерину, наряду с определением волчаночного антикоагулянта и степени блокады плазменных фосфолипидных мембран, используется для диагностики АФС. Для этого применяют три типа тест-систем:

- определение антикардиолипиновых антител;
- определение антител к фосфатидилсерину;
- определение антител к указанным выше и другим отрицательно заряженным фосфолипидам;
- определение антител к некоторым белкам, связанным с фосфолипидными мембранами (β_2 -гликопротеину I, аннексину V и др.).

АФА могут принадлежать к классам IgG, IgM или, реже, IgA. Основная часть этих антител, показывающая при этом наилучшую корреляцию с клинической картиной АФС, относится к классу IgG. Диагностическое значение определения IgM-антител меньше.

Далее приводится описание методик иммуноферментного определения аутоантител к фосфатидилсерину на примере использования диагностикума "Phosphatidyl Serine Antibodies ELISA IgG/IgM"

фирмы IBL и к кардиолипину (диагностикум "ImmuLisa Anti-Cardiolipin" фирмы IMMCO diagnostics)¹.

Принцип. Метод определения АФА основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа. На поверхности лунок микротитровального планшета иммобилизован антиген - фосфатидилсерин (или кардиолипин). При добавлении в лунки разведенной сыворотки больного (калибраторов и контрольных образцов сыворотки) присутствующие в ней антитела связываются со своим антигеном. После инкубации планшет промывают, удаляя несвязанный материал. Связавшиеся с твердой фазой антитела к фосфатидилсерину определяют, добавляя в лунки меченные пероксидазой антитела против IgG или IgM (в каждом образце необходимо определить оба класса антител)². В результате после инкубации ферментный конъюгат взаимодействует с антителами соответствующего класса, иммобилизованными на твердой фазе. Несвязавшиеся антитела и белки плазмы удаляют промыванием.

В лунки вносят субстрат для пероксидазы - тетраметилбензидин, который в присутствии фермента окрашивается в синий цвет³. Реакцию останавливают добавлением раствора серной кислоты. На вертикальном спектрофотометре измеряют интенсивность окрашивания при длине волны 450 нм⁴. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации антифосфолипидных антител. Результаты выражают в условных ед/мл согласно классификации и стандартов Харриса (используют калибратор).

А. Определение аутоантител к фосфатидилсерину

Реактивы. 1. Ферментный конъюгат. Готовый раствор антител против IgG и IgM, конъюгированных с пероксидазой хрена.

2. Калибраторы на IgG и IgM (маркированы в ед/мл).

3. Контрольные сыворотки (положительная и отрицательная) на

¹ Готовые к использованию наборы для определения антител к кардиолипину и фосфатидилсерину выпускаются также фирмами Stago и Hoffman-la Roche.

² В тест-системе на антикардиолипин используются антитела против IgG, IgM и IgA, конъюгированные с щелочной фосфатазой.

³ При определении антител к кардиолипину субстратом служит паранитрофенилфосфат.

⁴ В соответствии с инструкцией к тест-системе на антикардиолипин измерение проводят при 405 нм.

IgG и IgM, концентрация антител указана в инструкции к набору. Перед использованием сыворотки разводятся в пропорции 1:100 растворителем для образцов.

4. Промывочный буфер, концентрированный. Разводится дистиллированной водой до объема 600 мл.

5. Растворитель для образцов - 2×25 мл, готов к использованию.

6. Субстрат, содержит тетраметилбензидин. Готовый для использования раствор.

7. Останавливающий раствор (0,25М серная кислота). Готовый к использованию раствор.

8. Планшет (микрострипы) - 96 лунок. Каждый из 12 стрипов содержит 8 съемных лунок, покрытых фосфатидилсеринном, выделенным из спинного мозга быка.

Специальное оборудование. Для выполнения исследования необходимы вертикальный фотометр для планшетов (типа "Мульти-скан" или "Униплан") с фильтром на 450 нм, а также автоматические микропипетки со сменными пластиковыми наконечниками, обеспечивающими дозирование растворов от 5 до 1000 мкл. Упрощает исследование использование многоканальных пипеток.

Материал для исследования. Сыворотка крови (должна быть получена не позднее 4 ч от момента забора крови). Допускается хранение отделенной от сгустка сыворотки в течение 72 ч при +2...+8°C или 3 месяца при температуре -20 °С. Повторное оттаивание и замораживание не допускаются.

Ход определения. 1. Калибраторы, контроли и сыворотку больных разводят растворителем в соотношении 1:100.

2. Вносят в соответствующие лунки стрипов планшета по 100 мкл калибратора, разведенных контролей и образцов. В качестве калибратора и положительного раствора используют либо IgG, либо IgM (рекомендуется проводить тест в дубликатах). В одну лунку, по которой устанавливается бланк фотометра, вносят 100 мкл растворителя для образцов. Для каждого класса иммуноглобулинов должна быть предусмотрена своя лунка с бланк-контролем, в которую надо будет добавить соответствующий ферментный конъюгат.

3. Инкубируют 30 мин, при комнатной температуре (+18...+25°C).

4. Планшет переворачивают вверх дном и резким движением вытряхивают из него жидкость, промакивают фильтровальной бумагой. Затем планшет промывают трижды промывочным буфером, удаляют остатки жидкости.

5. Вносят в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата против выбранного класса иммуноглобулинов (анти-IgG или анти-IgM).

6. Инкубируют 15 мин, при комнатной температуре (+18...+25°C).

7. Промывают планшет как в п. 4.

8. Вносят в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата.

9. Инкубируют 15 мин при комнатной температуре.

10. Добавляют в каждую лунку по 50 мкл останавливающего раствора, планшет несколько раз встряхивают для перемешивания содержимого лунок.

В 15-минутный интервал времени после остановки реакции измеряют в лунках оптическую плотность (ОП) на фотометридеридере при 450 нм.

Б. Определение аутоантител к кардиолипину

Реактивы. 1. Конъюгат. Готовый раствор козьих антител против IgG, IgM и IgA человека, конъюгированных с щелочной фосфатазой.

2. Калибратор. Содержит сыворотку человека, позитивную по антителам к кардиолипину (маркирован в ед/мл).

3. Положительный контроль. Содержит сыворотку человека, позитивную по антителам к кардиолипину. Концентрация антител указана на этикетке.

4. Отрицательный контроль.

5. Промывочный буфер (фосфатно-солевой, pH 7,4), концентрированный. Разводится дистиллированной водой до 1 л.

6. Буфер для разведения проб, 60 мл готового к применению раствора.

7. Субстрат для щелочной фосфатазы - пара-нитрофенилфосфат. Готовый к применению раствор.

8. Стоп-реагент. Готов к использованию. 9. Планшет плоскодонный 96-луночный. Каждый из 12 стрипов содержит 8 съемных лунок, покрытых антигеном - кардиолипином.

Требуемые материалы и оборудование, не входящие в состав тест-системы, - см. аналогичный раздел выше.

Материал для исследования. Бедная тромбоцитами плазма или сыворотка крови (должны быть получены не позднее 4 ч от момента забора крови). Допускается хранение плазмы и отделенной от сгустка сыворотки в течение 72 ч при +2...+8°C или 3 месяца при температуре -20 °C. Повторное оттаивание и замораживание не до-

пускаются. Пробы с гемолизом, гиперлипидемией и микробно загрязненные не исследуются.

Ход определения. 1. Калибраторы, контроли и исследуемые образцы от больных разводят буфером для разведения в соотношении 1:101. Для этого смешивают 5 мкл контроля или исследуемого образца с 500 мкл буфера.

2. Вносят в соответствующие лунки стрипов планшета по 100 мкл разведенных (1:101) калибратора, положительного и отрицательного контролей и образцов от больных.

3. Инкубируют 30 мин (± 5 мин) при комнатной температуре.

4. Планшет промывают 3 раза промывочным буфером.

5. Вносят в каждую лунку по 100 мкл конъюгата против выбранного класса иммуноглобулинов (анти-IgG, анти-IgM или анти-IgA).

6. Инкубируют 30 мин (± 5 мин) при комнатной температуре.

7. Промывают планшет, как в п. 4.

8. Вносят в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата.

9. Инкубируют 30 мин (± 5 мин) при комнатной температуре.

10. Добавляют в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента.

В течение 1 ч после добавления стап-реагента в лунках измеряют оптическую плотность на фотометре-ридере при 405 нм, установив нулевое значение по лунке с реагентным контролем.

Чтение результатов. А. При определении антител к фосфатидилсерину. Результаты для IgG- и IgM-антител к фосфатидилсерину подсчитываются отдельно. Для каждого образца сыворотки, контроля и калибратора вычисляют средние значения ОП₄₅₀ в двух параллельных лунках за вычетом значения бланк-контроля. Концентрацию антител к фосфатидилсерину (в ед/мл) в образце сыворотки рассчитывают по формуле:

$$\text{Конц. образца (ед/мл)} = \frac{\text{Конц. калибр. (ед/мл)} \times \text{ОП}_{450} \text{ образца или контроля}}{\text{ОП}_{450} \text{ калибр.}}$$

Концентрации калибраторов, например, IgG 60 усл. ед/мл, IgM 60 усл. ед/мл. Ориентировочные значения нормы и патологии (рекомендуемые фирмой-изготовителем тест-системы) приведены в табл. 31.

Б. При определении антител к кардиолипину. Результаты для определения IgG-, IgM- и IgA-антител к кардиолипину также оцениваются отдельно. Концентрацию данных антител (в ед/мл) в об-

разце рассчитывают по формуле:

$$\text{Конц. образца (ед/мл)} = \frac{\text{ОП}_{405} \text{ образца или контроля}}{\text{ОП}_{405} \text{ калибр.} \times \text{Конц. калибр. (ед/мл)}}$$

Таблица 31

Критерии оценки результатов определения антител к фосфатидилсерину

Класс иммуноглобулинов	Отрицательный	Низкий положительный	Средний положительный	Высокий положительный
IgG, ед/мл	< 25	25-35	36-50	≥ 51
IgM, ед/мл	< 25	25-35	36-50	≥ 51

Примерные значения нормы и патологии (рекомендуемые фирмой-изготовителем тест-системы) приведены в табл. 32.

Таблица 32

Критерии оценки результатов определения антител к кардиолипину

Класс иммуноглобулинов	Отрицательный результат	Положительный результат
IgG, ед/мл	< 19	> 19
IgM, ед/мл	< 10	> 10
IgA, ед/мл	< 15	> 15

Приведенные в табл. 31 и 32 значения нельзя использовать для расчетов, они служат лишь в качестве ориентировочного руководства. В каждой лаборатории должен быть установлен свой собственный диапазон нормальных значений, зависящий от тестируемой популяции.

Обязательным является тестирование по всем изотипам АФА, а также проведение дополнительного тестирования на ревматоидный фактор, так как он может мешать определению АФА. Если на фоне клинических признаков заболевания тест на АФА дает отрицательный результат, то необходимо провести исследование на наличие в плазме волчаночного антикоагулянта (см. раздел 8.1.). Результаты определения антифосфолипидных антител могут считаться положительными лишь при их повышении в два и более раза по сравнению

с верхней границей нормы. Кроме того, должно быть учтено, что антикардиолипиновые антитела всегда имеются в сыворотке крови здоровых людей, где они заблокированы гистонами (А.М. Поверенный, 1986; D. Abakushin, A.M. Poverenny, 1996)¹. Поэтому ложно положительный тест на кардиолипины может быть связан с недостаточным количеством данных белков в сыворотке крови (В.А. Саенко и др., 1989)².

¹ Поверенный А.М. Иммунология, 1986. - № 6. - С. 86.

² Саенко В.А., Ротт Г.М. Поверенный А.М. Бюл. exper. биол. и мед., 1989. - N2. - С. 217-219.

9. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТРОМБОФИЛИЙ¹

Диагностика тромбофилий базируется как на развернутом функциональном исследовании системы гемостаза, включая использование иммуноферментных, амидолитических методик, так и на выявлении молекулярных маркеров тех мутаций, которые лежат в основе этих видов патологии (см. раздел 10.2). Данные исследования очень важны и являются ключевыми при диагностике тех тромбофилий, которые протекают без значительных нарушений функции тех или иных звеньев системы гемостаза например, при аномалиях протромбина и факторов VII и VIII. Они важны также для разграничения генетически обусловленных и вторичных (симптоматических) форм этой патологии, в частности, наследственной и приобретенной резистентности к активированному протеину С.

Одной из наиболее встречаемых форм генетически обусловленных тромбофилий является резистентность фактора Va к активированному протеину С (APC-R). Частота ее среди больных с венозными тромбозами в разных странах варьирует от 11 до 52%, наиболее часто - у европейского населения. Генетический дефект, лежащий в основе APC-R, связан точечной мутацией гена, кодирующего фактор V - заменой в молекуле фактора V аргинина глутамином в положении 506 (аномалия Лейден) или аргинина треонином в положении 306 (форма Кембридж). Данная мутация затрагивает один из трех участков фактора V, в которых он расщепляется активированным протеином С (APC). В результате активированная форма фактора V становится относительно устойчивой к APC и сохраняет свои прокоагулянтные свойства, способствуя большей, чем в норме, продукции тромбина.

Аномалия протромбина обусловлена точечной мутацией его гена с заменой глутамина аргинином в положении 20210. Это недавно

¹ По материалам, представленным проф. М.Н. Блиновым, С.И. Капустиным, В.А. Кобилянкой и проф. Л.П. Папаян.

выявленный дефект, частота которого в популяции человека еще мало изучена. В отличие от аномалии Лейден, при которой резистентность фактора Va к активированному протеину С может быть определена и коагуляционными методами (см. раздел 4.3.2), аномалия протромбина документируется лишь молекулярным тестированием (ПЦР).

Гомоцистеин - аминокислота, образующаяся из метионина. Метаболизм гомоцистеина включает реметилирование в метионин и транссульфатирование в цистеин. В реметилировании участвуют 3 фермента: метионинсинтетаза, 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза и бетаин-метионинметилтрансфераза. При транссульфировании гомоцистеин трансформируется в цистатионин посредством цистатионинсинтетазы. В плазме гомоцистеин находится как в свободной форме, так и связанным с белком. Нормальная концентрация гомоцистеина в плазме крови составляет 6-14 мкмоль/л.

Гипергомоцистеинемия является независимым фактором риска тромботических инсультов, инфаркта миокарда, облитерации периферических сосудов.

Увеличение содержания гомоцистеина (гипергомоцистеинемия и гомоцистеинурия) определяется различными методами: аминокислотным анализом, газовой и ионообменной хроматографией, радиоиммунным анализом и газовой масспектрометрией, жидкостной хроматографией с флюоресцентной детекцией. Кроме того, эти исследования проводятся при пищевой нагрузке метионином - 0,1 г/кг массы тела (или 3,8 г на 1 м² поверхности тела). При гипергомоцистеинемии такая нагрузка дает более значительное и длительное повышение уровня гомоцистеина в крови. Частота гипергомоцистеинемии составляет 1 на 200 000 населения, но варьирует от 1 на 40 000 в Новом Южном Уэльсе до 1 на 1 000 000 в Японии.

Одним из наиболее частых причин наследственной гипергомоцистеинемии является дефект реметилирования - появление мутантной формы метилентетрагидрофолатредуктазы.

В настоящем разделе приведены методы молекулярно-генетического определения мутаций в генах фактора V, протромбина и метилентетрагидрофолатредуктазы при гипергомоцистеинемии, обуславливающих состояние тромбофилии.

9.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ A₅₀₆ → G ФАКТОРА V (АНОМАЛИЯ ЛЕЙДЕН) В ГЕНЕ КООГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА V¹

Принцип. Один из праймеров ("правый"), используемых для амплификации участка гена, в котором локализуется искомая мутация, сконструирован таким образом, что ампликон мутировавшего аллеля содержит «сайт узнавания» для рестриктазы Hind III, тогда как ампликон нормального аллеля не имеет этого сайта. После обработки образующегося в результате проведения ПЦР амплификата рестриктазой Hind III продукты рестрикции фракционируют в полиакриламидном геле. При отсутствии мутации FV Лейден амплификат сохраняет свой первоначальный размер (241 п.н.), при наличии мутации в обоих аллелях (гомозигота по мутации FV Лейден) амплификат рестрицируется на два фрагмента размерами в 210 п.н. и 31 п.н., причем последний не удается визуализировать на геле из-за его небольшого размера.

У гетерозигот на геле выявляются два бэнда - один размером 241 п.н. (за счет нормального аллеля) и второй - размером 210 п.н. (за счет мутировавшего аллеля).

Реактивы.² 1. Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ) фирма Сибэнзим, Новосибирск.

2. Термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза) фирма Биомастер, Москва.

3. Рестриктазы Hind III и Hinf I /поставляются в комплекте с буферным раствором/ фирма Сибэнзим, Новосибирск.

4. Трис (Sigma, США, кат. № T1503 или Serva, Германия, кат. № 37178).

5. Твин-20 (Sigma, кат. № P1379 или Serva, кат. № 37470).

6. Додецилсульфат натрия (Sigma, кат. № L4509 или Serva, кат. № 20760).

7. Динатриевая соль ЭДТА (Sigma, кат. № ED2SS или Serva, кат. № 11280).

8. Акриламид (Sigma, кат. № A8887 или Serva, кат. № 10675).

¹ Gandrille S. et al. Blood Coagulation and Fibrinolysis. - 1995. - Vol. 6. - P.245-248.

² Праймеры для тестирования и сопутствующие реактивы поставляются фирмой Силекс (Москва) или фирмами Сибэнзим и Медиген (Новосибирск).

9. Бис-акриламид (Sigma, кат. №M7279 или Serva, кат. №29196).
10. ТЕМЕД (Sigma, кат. № T9281 или Serva, кат. № 35925).
11. Протеиназа К (Sigma, кат. № P6556 или Serva, кат. № 33752).
12. Праймеры (олигонуклеотиды) для постановки ПЦР (Силекс, Москва).
13. Бромистый этидий (Sigma, кат. № E8751 или Serva, кат. № 21238).
14. Соли: хлористый магний, хлористый натрий, сульфат аммония (квалификации х.ч. или чда.).

Приготовление растворов. Все растворы готовятся на деионизованной или бидистиллированной воде.

1. [10x] буфер для ПЦР: 166 мМ сульфат аммония, 670 мМ Tris-HCl (рН 8.8 при +25°C), 0,25% (v/v) Tween-20.
2. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) - 1 мМ раствор.
3. Хлорид магния (MgCl₂) - 25 мМ раствор.
4. Праймеры для проведения ПЦР:
Праймер 1: 5'- TCAGGCAGGAACAACCCAT-3' - 5 мкМ раствор;
Праймер 2: 5' - GGTTACTTCAAGGACAAAATACCTGTAAAGCT-3' - 5 мкМ раствор.
5. Раствор бромистого этидия - 1 мкг/ мл.

Материал для исследования. Объектом исследования является ДНК, выделяемая из лейкоцитов периферической крови.

Методика выделения ДНК

Венозную кровь обследуемого в количестве 3-5 мл, взятую на ЭДТА-Na₂ (в конечной концентрации 0,15-0,2%), помещают в морозильник (-20⁰ С), где хранят в замороженном состоянии в течение 4-8 недель до начала процедуры выделения ДНК.

После размораживания крови при комнатной температуре к ней добавляют 3 объема бидистиллированной воды, предварительно охлажденной до температуры +4⁰С, пробу тщательно перемешивают и через 30 с центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин. Супернатант осторожно сливают, а к лейкоцитарному осадку добавляют 2,5 мл лизирующего буфера (10 мМ Трис-НСl буфер, рН 8,0; 2 мМ ЭДТА; 0,4 М NaCl, 0,5% додецилсульфат натрия, 100 мкг/мл протеиназы К), и осадок тщательно суспендируют многократным пипетированием. Пробу помещают в термостат (+37⁰ С) на 18-20 ч (этот этап можно продлить до 48 ч). После охлаждения пробы до комнатной температуры к ней добавляют 0,8 мл насыщенного рас-

твора хлорида натрия, и содержимое пробирки интенсивно перемешивают в течение 30 с. Затем пробу центрифугируют при комнатной температуре в течение 20 мин при 5000 об/мин, после чего супернатант аккуратно (не затрагивая верхнюю пленку и плотный осадок) переносят в чистый химический стакан (или бакпечатку). ДНК из супернатанта осаждают добавлением 5,0 мл этилового спирта (имеющего комнатную температуру) с последующим наматываем нитей ДНК на стеклянную палочку. ДНК подсушивают на воздухе при комнатной температуре в течение 10-15 мин и затем растворяют в 200 мкл бидистиллированной воды в пробирке типа "Эппендорф". ДНК растворяется достаточно медленно (1-2 суток при температуре +4°C), но при необходимости этот процесс можно сократить до 2,5-3 ч при повышении температуры до +65°C.

Концентрацию ДНК в полученном растворе определяют спектрофотометрически, исходя из того, что поглощение (E_{260}) раствора двухспиральной ДНК в концентрации 50 мкг/мл равно 1,0. Обычно из 2-5 мл крови (при нормальном уровне лейкоцитов) удается выделить от 100 до 500 мкг ДНК, которая может храниться при температуре -20°C до 5 лет без потери качества.

Помимо применяемого авторами так называемого "солевого" метода получения геномной ДНК, имеется много других способов выделения ДНК из клеток. Часто для депротенинизации ДНК применяют фенольно-хлороформную обработку клеточного лизата. Предложены и принципиально иные методы (в том числе и экспресс-методы) изоляции ДНК, позволяющие в течение 30-40 мин выделить из 50-100 мкл крови ДНК в количестве, достаточном для постановки до 100 ПЦР. В настоящее время рядом отечественных и зарубежных фирм выпускаются коммерческие тест-системы для ускоренного выделения ДНК из цельной крови или клеток.

Ход определения.

Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Протокол проведения ПЦР.

1. В пробирку "Эппендорф" объемом 0,5 мл, в которой будет проводиться ПЦР, добавляют следующие реактивы (из расчета на 1 пробу):

Вода бидистиллированная	-	4,5 мкл
[10x] буфер для ПЦР	-	1,5 мкл
MgCl ₂	-	1,0 мкл
DNTP	-	3,0 мкл

Праймер 1	-	1,5	мкл
Праймер 2	-	1,5	мкл
Тaq-полимераза	-	0,2	мкл
ДНК (50-100 нг)	-	2,0	мкл
Конечный объем реакционной смеси - 15,2 мкл			

2. Сверху аккуратно наслаивают минеральное масло.

3. Пробы устанавливают в термоциклер и проводят ПЦР в следующем режиме:

+94°C	-	3 мин	
+55°C	-	1 мин	1 цикл
+72°C	-	1 мин	
+94°C	-	1 мин	
+55°C	-	1 мин	35 циклов
+72°C	-	1 мин	

После прохождения последнего цикла пробы инкубируют в течение 5 мин при +72°C.

Анализ продуктов ПЦР. Перед проведением реакции рестрикции необходимо убедиться в том, что ПЦР прошла нормально и амплификат образовался в достаточном количестве. Для этого 2,5-3,0 мкл ПЦР-продукта анализируют методом электрофореза в 2% агарозном минигеле. Электрофорез ведут в течение 15-20 мин, пока маркерный краситель (бромфеноловый синий) не мигрирует на 1,5-2,0 см от линии старта. Затем гель окрашивают в растворе бромистого этидия и просматривают на трансиллюминаторе. При обнаружении четкого бэнда амплификата, свидетельствующего о том, что ПЦР прошла, проводят реакцию рестрикции. Для этого в пробирку с оставшимся ПЦР-продуктом добавляют 8,0 мкл смеси, содержащей 5,7 мкл бидистиллированной воды, 2,0 мкл [10x] буфера для Hind III и 0,3 мкл рестриктазы Hind III (40 ед/мкл).

Пробу инкубируют 16-20 ч (в течение ночи) при +37°C, после чего анализируют методом электрофореза в 6% полиакриламидном геле (в лунку наносят весь объем пробы - 20 мкл). В качестве маркера длин фрагментов ДНК используют ДНК плазмиды рUC19, рестрицированная ферментом Msp I. Продолжительность электрофореза зависит от типа используемого аппарата. Для получения достаточного разделения фрагментов необходимо, чтобы маркерный краситель продвинулся на 8-10 см от линии старта.

После окончания электрофореза гель окрашивают раствором бромистого этидия и просматривают на трансиллюминаторе (с последующим фотографированием).

Чтение результатов. Нормальному аллелю гена фактора V соответствует амплификат размером 241 п.н., мутированному - 210 п.н.

9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ G₂₀₂₁₀ → A В ГЕНЕ ПРОТРОМБИНА¹

Принцип метода. Один из праймеров ("правый"), использующихся для амплификации участка гена (фрагмент экзона 14 и 3'-нетранслируемый регион), в котором локализуется искомая мутация, сконструирован таким образом, что ампликон мутировавшего аллеля содержит "сайт узнавания" для рестриктазы Hind III, тогда как ампликон нормального аллеля не имеет этого сайта. После обработки образующегося в результате проведения ПЦР ампликата рестриктазой Hind III продукты рестрикции фракционируют в агарозном геле. При отсутствии мутации в гене протромбина ампликат сохраняет свой первоначальный размер (345 п.н.), при наличии мутации в обоих аллелях (гомозигота по мутации G₂₀₂₁₀ → A) ампликат рестрицируется на два фрагмента размерами в 322 п.н. и 23 п.н., причем последний не удастся визуализировать на геле из-за его небольшого размера.

У гетерозигот на геле выявляются два бэнда - один размером 345 п.н. (за счет нормального аллеля) и второй - размером 322 п.н. (за счет мутировавшего аллеля).

Реактивы. Те же, что в разделе 9.1 за исключением того, что в качестве праймеров в реакции используются следующие олигонуклеотиды:

Праймер 1: 5'- TCTAGAAACAGTTGCCTGGC- 3'.

Праймер 2: 5'- ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC- 3'.

Материал для исследования. Тот же, что в разделе 9.1.

Ход определения.

Проведение ПЦР

ПЦР проводится так же, как описано выше для детекции мутации "FV Лейден" (раздел 9.1).

¹ Poort S.R. et al. Blood. - 1996. - Vol. 88, N 10. - P. 3698-3703.

Анализ продуктов ПЦР. Перед проведением реакции рестрикции необходимо убедиться в том, что ПЦР прошла нормально и амплификат образовался в достаточном количестве. Для этого 2,5-3,0 мкл ПЦР-продукта анализируют электрофорезом в 2% агарозном минигеле. Электрофорез ведут в течение 15-20 мин, пока маркерный краситель (бромфеноловый синий) не мигрирует на 1,5-2,0 см от линии старта. Затем гель окрашивают в растворе бромистого этидия и просматривают на трансиллюминаторе. При обнаружении четкого бэнда амплификата, свидетельствующего о том, что ПЦР прошла, проводят реакцию рестрикции. Для этого в пробирку с оставшимся ПЦР-продуктом добавляют 8,0 мкл смеси, содержащей 5,7 мкл бидистиллированной воды, 2,0 мкл [10x] буфера для Hind III и 0,3 мкл рестриктазы Hind III (40 ед/мкл).

Пробу инкубируют 16-20 ч (ночь) при температуре +37°C, после чего анализируют электрофорезом в 2% агарозном геле (в лунку вносят 10 мкл пробы), в течение которого маркерный краситель (бромфеноловый синий) должен мигрировать на 8-10 см от линии старта. В качестве маркера длин фрагментов ДНК используется ДНК плазмиды pUC19, рестрицированная ферментом Msp I.

После окончания электрофореза гель окрашивают раствором бромистого этидия и просматривают на трансиллюминаторе (с последующим фотографированием).

Чтение результатов. Нормальному аллелю гена протромбина соответствует амплификат размером 345 п.н., мутированному - 322 п.н.

9.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ C_{677T} A → V В ГЕНЕ МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТ РЕДУКТАЗЫ (МТГФР)¹ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Принцип метода. Ампликон исследуемого фрагмента ДНК мутантного аллеля приобретает "сайт узнавания" для рестриктазы Hinf I, тогда как в ампликоне нормального аллеля он отсутствует. После обработки образующегося в ходе ПЦР амплификата рестрик-

¹ Arruda V.R. et al. Thrombosis and Haemostasis. - 1997. - Vol. 77, N 5. - P. 818-821; Frost P. et al. Nat. Genet. - 1995. - Vol. 10. - P. 111.

тазой Hinf I продукты рестрикции фракционируют в полиакриламидном геле. При отсутствии мутации C_{677T} амплификат сохраняет свой первоначальный размер (198 п.н.), при наличии мутации в обоих аллелях амплификат рестрицируется на два фрагмента - 175 п.н. и 23 п.н., причем последний не визуализируется в геле из-за его небольшого размера.

У гетерозигот на геле выявляются два бэнда - один размером 198 п.н. за счет нормального аллеля и второй (размером 175 п.н.) - за счет мутантного аллеля.

Реактивы. Те же, что в разделе 9.1. за исключением того, что в качестве праймеров в реакции используются следующие олигонуклеотиды:

Праймер 1: 5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA- 3'.

Праймер 2: 5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG- 3'.

Материал для исследования. Тот же, что в разделе 9.1.

Ход определения.

Проведение ПЦР.

ПЦР проводится так же, как описано выше для детекции мутации "FV Лейден" (раздел 9.1).

Анализ продуктов ПЦР. Перед проведением реакции рестрикции необходимо убедиться в том, что ПЦР прошла нормально и амплификат образовался в достаточном количестве. Для этого 2,5-3,0 мкл ПЦР-продукта анализируют электрофорезом в 2% агарозном минигеле. Электрофорез ведут в течение 15-20 мин, пока маркерный краситель (бромфеноловый синий) не мигрирует на 1,5-2,0 см от линии старта. Затем гель окрашивают в растворе бромистого этидия и просматривают на трансиллюминаторе. При обнаружении четкого бэнда амплификата, свидетельствующего о том, что ПЦР прошла, проводят реакцию рестрикции. Для этого в пробирку с оставшимся ПЦР-продуктом добавляют 8,0 мкл смеси, содержащей 5,7 мкл бидистиллированной воды, 2,0 мкл [10x] буфера для Hinf I и 0,3 мкл рестриктазы Hinf I (40 ед/мкл). Пробу инкубируют 16-20 часов (ночь) при температуре +37°C, после чего анализируют электрофорезом в 6% полиакриламидном геле (в лунку наносят весь объем пробы - 20 мкл). В качестве маркера длин фрагментов ДНК используется ДНК плазмиды pUC19, рестрицированная ферментом Msp I. Продолжительность электрофореза зависит от типа используемого аппарата. Для получения достаточного разделения фраг-

ментов необходимо, чтобы маркерный краситель продвинулся на 8-10 см от линии старта.

После окончания электрофореза гель окрашивают раствором бромистого этидия и просматривают на трансиллюминаторе (с последующим фотографированием).

Чтение результатов. Нормальному аллелю гена МТГФР соответствует амплификат размером 198 п.н., мутированному - 175 п.н.

Описанные выше методы определения мутаций апробированы авторами представленного материала при обследовании более 200 человек и зарекомендовали себя как вполне надежные, чувствительные и воспроизводимые.

Литература.

1. Капустин С.И., Кобылянская В.А., Блинов М.Н., Папаян Л.П., Каргин В.Д. ПЦР для выявления мутации $G^{1691} \rightarrow A$ в гене коагуляционного фактора V с целью дифференциальной диагностики АПС-резистентности при венозном тромбозе. Вестник службы крови России. - 1998. - N 3. - С. 26-28.
2. Kapustin S., Kobilyanskaya V., Saltykova N., Kargin V., Papayan L., Blinov M. Genetic determinants of deep-vein thrombosis and its complications in North-Western Russia. Haematologica. - 1999. - Vol. 84 (ENA-4 Abstract Book). - P. 43 (abstract PO-0182).
3. Капустин С.И., Шмелева В.М., Салтыкова Н.Б., Паншина А.М. Роль генодиагностики при венозном тромбозе. Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии (материалы научно-практической конференции). - СПб, 2000. - С. 191.
4. Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C. A single point mutation in the gene for factor V as a major risk factor for venous thrombosis. In: Hypercoagulable States. Ed. M.J. Seghatchian, M.M. Samama, S.P. Hecker. - CRC Press. Boca Raton e.a. 1996. - P. 365-373.
5. Palareti G., Legnani C., Coccheri S. Hyperhomocysteinemia and Vascular Disease. In: Hypercoagulable States. Ed. M.J. Seghatchian, M.M. Samama, S.P. Hecker. - CRC Press. Boca Raton e.a. 1996. - P. 395-407.

10. ОСНОВНЫЕ НАРУШЕНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

10.1. ВИДЫ КРОВОТОЧИВОСТИ. ОСНОВНЫЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И СИНДРОМЫ

Классификация типов кровоточивости¹ по З.С. Баркагану (1975)

1. Микроциркуляторный (петехиально-пятнистый).
2. Гематомный.
3. Смешанный.
4. Васкулитно-пурпурный.
5. Ангиоматозный.

Классификация тромбоцитопатий и дисфункций тромбоцитов по З.С. Баркагану (1988)²

А. Наследственные и врожденные формы

I. Основные патогенетические группы.

1. Связанные с мембранными аномалиями (все варианты тромастении Гланцмана, эссенциальная атромбия, аномалия Бернара-Сулье и др.).
2. Внутриклеточные аномалии:
 - а) болезни недостаточного пула хранения:
 - дефицит плотных (безбелковых) гранул (болезнь Хержманского-Пудлака, Тар-синдром и др.);
 - дефицит α -гранул (белковых) - синдром серых тромбоцитов и др.;

¹ З.С. Баркаган. Исследование системы гемостаза в клинике. Барнаул, 1975.

² З.С. Баркаган. Геморрагические заболевания и синдромы М., 1988. - С. 96.

б) нарушения реакции высвобождения гранул и их компонентов:

- дефицит циклооксигеназы;
- дефицит тромбоксан-синтетазы;
- другие патогенетические формы.

3. Смешанные тромбоцитарные нарушения (аномалии Мея-Хегглина, Вискотта-Олдрича и др.).

4. Дисфункции плазменного генеза:

- а) дефицит и аномалии фактора Виллебранда (см. классификацию болезни Виллебранда);
- б) афибриногенемия;
- в) другие плазменные нарушения (синдром Бартера и др.).

5. Нарушения взаимодействия с коллагеном и субэндотелием:

- а) болезнь Виллебранда;
- б) аномалии коллагена - болезнь Элерса-Данло и другие мезенхимальные дисплазии.

II. Функционально-морфологические разновидности.

1. Формы с преимущественным нарушением агрегационной функции (дизагрегационные) и сохраненной реакцией высвобождения:

- а) с развернутым нарушением агрегационной функции:
 - тромбоцитоастения (тромбостения) Гланцмана I и II типов (молекулярный маркер: отсутствие в мембране гликопротеина с мол. массой 135 кДа);
 - формы с ослаблением реакции на тромбоксан А₂;
 - другие формы;
- б) парциальные дизагрегационные тромбоцитопатии;
 - с изолированным нарушением коллаген-агрегации без макроцитоза и других нарушений;
 - аномалии Мея-Хегглина;
 - формы с изолированным нарушением АДФ- и (или) тромбин-агрегации;
 - аномалия Пирсон-Стоба;
 - при наследственной афибриногенемии;
 - другие формы.

2. Формы с нарушением высвобождения и отсутствием второй волны агрегации - аспириноподобный синдром, эссенциальная атромбия II типа и др.

3. Болезни недостаточного пула хранения (дефицит гранул и их компонентов) с отсутствием второй волны агрегации:

а) с недостатком плотных телец I типа и их компонентов - АДФ, серотонина, адреналина:

- с альбинизмом (синдром Хержманского-Пудлака и др.);
- с аплазией лучевой кости;
- при синдроме Чедиака-Хигаси;
- формы без альбинизма и аномалий скелета;

б) с недостатком плотных телец II типа [α -гранул и их компонентов - фактора 4 (антигепаринового) и его носителя, β -тромбоглобулина, ростового фактора] - синдром серых тромбоцитов и др.;

в) с изолированным нарушением хранения лизосом и кислых гидролаз (?).

4. Формы с преимущественным нарушением адгезии тромбоцитов к коллагену и стеклу (без закономерного нарушения физиологических видов агрегации):

4.1. Формы с нарушенной ристомицин-агрегацией;

а) плазменного генеза - болезнь Виллебранда (основная форма, обусловленная парезом синтеза фактора Виллебранда, и некоторые аномальные формы);

б) диспластического тромбоцитарного генеза - макроцитарная тромбоцитодистрофия Бернара-Сулье, тромбоцитарный псевдовиллебрандовский синдром;

в) плазменно-пластиночного генеза - синдром Виллебранда - Юргенса, III тип болезни Виллебранда;

4.2. Формы с нормальной ристомицин-агрегацией:

а) некоторые молекулярные варианты болезни Виллебранда;

б) формы с изолированным нарушением адгезии тромбоцитов к коллагену.

5. Формы с дефицитом и снижением доступности фактора 3 (без существенного нарушения адгезивно-агрегационной функции):

1) с генетически обусловленным дефицитом фактора 3 - врожденные дефицитные тромбопатии по Боуе и Овену;

2) с нарушением доступности (освобождения) фактора 3 при адгезии и агрегации - функциональные тромбопатии по Боуе и Овену.

6. Сложные аномалии и дисфункции тромбоцитов, сочетающиеся с другими генетическими дефектами:

1) при иммунных нарушениях - синдром Вискотта-Олдрича (с микротромбоцитопенией);

2) при ферментопатиях - гликогенозы I и II типа и др.;

- 3) при дисплазиях соединительной ткани (синдром Элерса-Данло, Марфана и др.);
- 4) при врожденных пороках сердца (см. также формы 1 и 3а).
7. Недостаточно идентифицированные формы:
 - 1) средиземноморская макротромбоцитопатическая тромбоцитопения с врожденным нефритом и глухотой;
 - 2) тромбоцитопеническая тромбоцитоастения;
 - 3) другие формы.

Б. Приобретенные тромбоцитопатии

1. При гемобластозах:
 - а) дизагрегационные гипорегенеративные;
 - б) формы потребления (при развитии ДВС-синдрома);
 - в) смешанного типа.
2. При миелопролиферативных заболеваниях и эссенциальной тромбоцитемии.
3. При В₁₂-дефицитной анемии.
4. При уремии (нарушение адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов - ААФТ, доступности фактора 3, реже - ретракции сгустка).
5. При ДВС-синдроме и активации фибринолиза - быстрое потребление тромбоцитов и блокада их функции продуктами деградации фибриногена и фибрина.
6. При циррозах, опухолях и паразитарных заболеваниях (нарушения ААФТ вследствие метаболических нарушений, секвестрации тромбоцитов в портальной системе, потребления их при развитии ДВС-синдрома).
7. Блокада тромбоцитов макро- и парапротеинами (миеломная болезнь, болезнь Вальденстрема, моно- и поликлоновые гаммапатии и др.).
8. При цинге (нарушение АДФ-агрегации).
9. При гормональных нарушениях - гипо- и дистиреозах, гипостроении и др.
10. Лекарственные и токсигенные (при лечении нестероидными противовоспалительными средствами, ацетилсалициловой кислотой, пиразолоновыми производными, бутазолидинами, бруфеном, индометацином, (-адреноблокаторами, дипиридамолом, большими дозами папаверина и некоторыми антибиотиками - карбенициллином, пенициллином, транквилизаторами, мочегонными препаратами, нитрофуранами, антигистаминами, цитостатиками и

рофуранами, антигистаминами, цитостатиками и др. средствами), после приема алкоголя.

11. При лучевой болезни.
12. При массивных гемотрансфузиях, инфузиях реополиглюкина.
13. При больших тромбозах и гигантских ангиомах (тромбоцитопатия потребления).

Классификация болезни Виллебранда

(Международный Комитет по стандартизации и ассоциация по тромбозам и гемостазу)

Тип I. Частичный количественный дефицит фактора Виллебранда

1. Доминантное наследование (семейный анамнез).
2. Кровоточивость смешанного типа; при порезах, удалении зубов, меноррагии.
3. Время кровотечения удлинено или нормально.
4. Одинаковое снижение ФВ:Ркоф (кофактора) и ФВ:Раг (антигена).
5. Возможное умеренное снижение фактора VIII:С.
6. Частое сочетание с мезинхимальными дисплазиями.
7. Нормальная мультимерность ФВ:Ркоф.
8. Нормальное связывание с тромбоцитами.

Тип II. Качественные дефекты ФВ

Тип II А.

1. Диспропорциональная низкая активность ФВ:Ркоф по сравнению с ФВ:Аг (антигеном фактора Виллебранда).
2. Доминантное наследование, связанное с точечной мутацией домена А2 (717-909).
3. Сниженная афинность ФВ к тромбоцитам.
4. Отсутствие гемостатически активных больших мультимеров ФВ (анализ мультимерности на геле).

Тип II В. Высокое содержание в плазме ФВ с нарушением его взаимодействия с тромбоцитами и снижением содержания тромбоцитов в крови.

1. Низкая ристомидин-агрегация на пороговые (малые) дозы препарата (как при тромбоцитарном варианте или псевдобользни Виллебранда).

2. Тромбоцитопения перемежающаяся, усиливающаяся при лечении десмопрессином (DDAVP, адиуретином SD), стрессе, инфекции, беременности.

3. Уровень ФВ:Аг нередко снижен.

4. Часто снижены в плазме мультимеры ФВ (разделение на геле).

Тип II M (мультимерный тип). Включает варианты, при которых связывание ФВ с тромбоцитами нарушено, но в плазме содержатся в нормальном количестве все варианты его мультимеров.

Лабораторные признаки те же, что и при типе 2 А, но соотношение мультимеров ФВ в плазме нормальное и имеются большие мультимеры, но нарушено их связывание с тромбоцитами.

Тип II N. Количество ФВ нормально, но нарушено связывание его с фактором VIII:С, со значительным снижением уровнем последнего в плазме. Из-за этого часто ошибочно ставится диагноз легкой формы гемофилии.

Диагноз:

1. Аутосомно-рецессивное исследование

2. Нарушение связывания ФВ с VIII:С.

3. Заместительная терапия фактором VIII:С недостаточно результативна.

Тип III. Рecessивное нарушение, при котором ФВ и его антиген в плазме не определяются (т.е. отсутствует как VIII:Rкоф, так и ФВ:Аг), удлинено АПТВ.

Родители больного могут быть фенотипически нормальными или иметь кровоточивость как при болезни Виллебранда I типа.

10.2. ВИДЫ ТРОМБОФИЛИЙ И ОСНОВЫ ИХ ДИАГНОСТИКИ

Термином «тромбофилии» обозначаются все наследственные (генетически обусловленные) и приобретенные нарушения гемостаза, которым свойственна предрасположенность к раннему появлению и рецидивированию тромбозов и облитераций кровеносных сосудов. Различные виды тромбофилии отличаются по патогенезу и локализации развивающегося тромбоза. Например, гемореологические и сосудисто-тромбоцитарные формы, а также метаболические (при диабете, атеросклерозе, гипергомоцистеинемии) сопровождаются преимущественно артериальными тромбозами. Дефицит же протеинов С и S, антитромбина III приводит чаще к венозным тром-

бозам. Разной локализации тромбозы наблюдаются при антифосфолипидном синдроме.

В настоящее время выделено большое число первичных (генетически обусловленных) и вторичных (приобретенных, симптоматических) тромбофилий, диагностика и дифференциация которых принципиально важна, поскольку разные виды этой патологии, несмотря на сходные клинические проявления, требуют применения совершенно разных подходов к их профилактике и лечению.

Последние годы обогатились значительным методическим вооружением клинической гемостазиологии, расшифровкой механизмов и разработкой точных методов распознавания многих тромбофилий, в том числе и недавно выявленных. Возникла необходимость дальнейшего усовершенствования их классификации.

С этой целью может быть использована предложенная ранее одним из нас (З.С.Баркаган)¹ и одобренная Президиумом РАМН в 1996 г. номенклатура этих видов патологии¹. Вместе с тем следует особо подчеркнуть, что термин "тромбофилия" не должен заменяться, терминами "гиперкоагуляционное состояние" или "гиперкоагуляционный синдром", поскольку многие виды тромбофилии характеризуются не повышением свертываемости крови, а ее снижением (при дисфибриногенемиях, дефиците фактора XII, антифосфолипидном синдроме и др.), либо нарушениями не в гемокоагуляции, а в других звеньях системы гемостаза.

Классификация основных видов гематогенных тромбофилий по З.С.Баркагану (1996) с дополнениями

Основные варианты

Методы выявления

1. Гемореологические формы

- | | |
|--|--|
| 1.1. Полиглобулии, полицитемии, синдромы повышенной вязкости крови | Определение числа эритроцитов, тромбоцитов в крови, их спонтанной агрегации; гематокритного показателя (повышение), СОЭ (замедление) |
| 1.2. Гемоглобинопатии, протекающие со снижением деформируемости | Определение формы, среднего объема, деформируемости |

¹ Проблемы гематол. и перелив. крови. - 1996. - № 3. - С. 5-15.

руемости эритроцитов

эритроцитов, их гистограммы на счетчиках клеток крови, типа Нб, гемолиза

1.3. Формы, связанные с гипер-вискозностью плазмы (парапротеинемии, гиперфибриногенемии)

Вискозиметрия плазмы и сывотки, определение уровня фибриногена, парапротеинов, криоглобулинов, тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов

2. Формы обусловленные нарушениями сосудисто-тромбоцитарного гемостаза

2.1. Тромбоцитемии и гипер-тромбоцитозы (первичные, симптоматические, в том числе неопластические)

Определение числа тромбоцитов в крови их гистограммы и оценка агрегации.

2.2. Формы с повышенной спонтанной агрегацией и адгезивностью тромбоцитов и/или с повышенной чувствительностью к агонистам агрегации (коллагену, АДФ, адреналину, арахидоновой кислоте), в том числе «синдром вязких тромбоцитов»

Определение стимулированной и спонтанной агрегации тромбоцитов

2.3. Формы, связанные с гиперпродукцией и повышенной мультимерностью фактора Виллебранда, а также снижением антиагрегантного потенциала плазмы - тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (болезнь Мошковиц), микроангиопатическая гемолитическая анемия и др.

Определение ристомицин-агрегации, уровня фактора Виллебранда в плазме и связанного с ним антигена, мультимерности ФВ (см. также п.2.2.)

3. Формы, связанные с дефицитом и/или аномалиями первичных физиологических антикоагулянтов

3.1. Антитромбина III

Определение активности и антигена АТ-III, его сродства к гепарину. Определение протеинов С и S (общего и свободного)

3.2. Протеина С

3.3. Протеина S (?)

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 3.4. Тромбомодулина | Определение свободного тромбомодулина |
| 3.5. Ингибитора внешнего пути активации свертывания крови (TFPI) | Определение TFPI |
| 3.6. Избыток ингибитора протеина С | Определение ингибитора протеина С |
| 3.7. Дефицит кофактора II гепарина | Определение кофактора II гепарина |
| 3.8. Избыток богатого гистидином гликопротеина (БГГП) - ингибитора комплекса «плазменный антитромбин-гепарин» | Определение уровня в сыворотке БГГП |

4. Формы, связанные с дефицитом или аномалиями

плазменных факторов свертывания крови и фибринолиза

- | | |
|--|---|
| 4.1. Аномалии фактора V, резистентность к активированному протеину С | Тест резистентности к активированному протеину С. Определение аномалий гена фактора V: Лейденовская форма (Arg506Gln), форма Кембридж (Arg306Thr) |
| 4.2. Аномалии фактора V, резистентность к активированному протеину С | Генетическое исследование мутации (протромбин 20210 G (A)) |
| 4.3. Тромбогенные дисфибриногенемии | Тромбиновое и анцистроновое (рептилазовое) время свертывания; уровень пептидов А и В; хроматография фибриногена; определение лизиса фибрина; определение скорости полимеризации фибрин-мономера |
| 4.4. Дефицит и/или аномалии плазминогена | Ослабление всех видов фибринолиза, устраняемые добавлением в плазму плазминогена |
| 4.5. Дефицит и нарушения высвобождения тканевого активатора плазминогена (ТПА) | Ослабление активации зуглобулинового фибринолиза при проведении манжеточной пробы |
| 4.6. Высокий уровень ингибито- | Определение ТПА, PAI-I и PAI- |

ров ТПА (РАI-I, РАI-2)

4.7. Редкие формы (дефицит фактора XII, плазменного прекалликреина, высокомолекулярного кининогена)

2, α 2-антиплазмина

Гипокоагуляция в АПТВ и депрессия XIIa-зависимого фибринолиза; снижение активности фактора XII + снижение активности и уровня антигенов соответствующих компонентов системы

5. Формы, связанные с повышением уровня и недостаточной инактивацией факторов свертывания

5.1. Повышение уровня и активности комплекса "тканевый фактор + фактор VIIa + фактор Xa + Ca⁺⁺", включая симптоматические формы при гестозах, гиперлипидемиях, атеросклерозе, висцеральных видах рака

Определение содержания и активной формы фактора VII в плазме

5.2. Повышение уровня фактора VIII

Определение активности фактора VIII в плазме (активность более 170%)

5.3. Гиперфибриногенемия (см. п. 1.3.)

Определение содержания фибриногена в плазме, вязкости плазмы, СОЭ

6. Аутоиммунные и инфекционно-иммунные тромбофилии

6.1. Антифосфолипидный синдром (АФС)

Определение волчаночного антикоагулянта (ВА) коагуляционными фосфолипид-зависимыми методами и тестом с микрофльтрацией плазмы; антифосфолипидных антител, антител к β_2 ГП-1, аннексину V, фактору II и к мембранным гликопротеинам тромбоцитов

6.1.1. Первичный АФС

6.1.2. Вторичный АФС при системных иммунных заболеваниях и опухолях

- формы с антителами к β_2 ГП-1, аннексину V, протромбину и др.
- формы с резистентностью к протеину С (см. п. 4.1)

То же + определение резистентности к протеину С

6.2. При болезни и синдроме Бехчета

По критериям диагностики болезни Бехчета + развернутое

- исследование гемостаза (по разделам II-IV).
- 6.3. При иммунных тромбоваску-
литах
6.3.2. Лекарственные формы, в
том числе гепариновая тромбо-
цитическая тромбоцитопения (см.
раздел IX)
6.4. При инфекционно-иммунных
заболеваниях
6.4.1. Тромбогеморрагические
лихорадки
6.4.2. Гемолитикоуремический
синдром
6.4.3. При бактериальном эндо-
кардите, сепсисе
7. **Паранеопластические**
формы (синдром Труссо и др.)
8. **Метаболические формы с комплексом нарушений в разных звеньях системы гемостаза**
- 8.1. Диабет, диабетическая ангиопатия (см. также п. 2.2.; 5.1.)
8.2. Гиперлипидемии: врожденные, симптоматические (см. также п. 5.1.)
8.3. Гипергомоцистеинемия (гомоцистеинурия): а) генетически обусловленная (ранняя) и б) приобретенная симптоматическая (поздняя)
8.4. Гиперурикемия (наследственная, вторичная)
- Учет динамики количества тромбоцитов в крови на 6-й и 12-14-й дни после начала лечения гепарином или другими препаратами
- Учет динамики количества тромбоцитов в крови на 6-й и 12-й дни после начала лечения гепарином или другими препаратами
- Выявление основного заболевания
- Диагностика основных метаболических нарушений; развернутое исследование коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза.
- Определение уровня гомоцистеина в плазме крови и в суточной моче. Определение мутаций MTHFR¹. Проба с нагрузкой метионином. Определение уровня мочевой кислоты в сыворотке крови

¹ MTHFR – мутация 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (C677T, Arg→Val).

9. Ятрогенные (в том числе медикаментозные) формы

9.1. При катетеризации сосудов, стентировании и шунтировании сосудов, протезировании клапанов сердца, имплантации кавальных фильтров, тромбэктомии

9.2. Медикаментозные формы

9.2.1. При приеме эстрагенных контрацептивов

9.2.2. Формы, обусловленные гемостатической терапией - концентратами факторов протромбинового комплекса, десмопрессина и др.

9.2.3. Формы, вызванные приемом антикоагулянтов:

- гепарин-индуцированная тромботическая тромбоцитопения (ГИТ)
- кумариновые тромботические некрозы кожи

Развитие тромбоцитопении на 6-14 день лечения, а затем - тромбозов.

Наличие причинного фактора + дефицит протеина С или резистентность фактора Va к активированному протеину С

9.2.4. Тромбозы при лечении ингибиторами фибринолиза

9.3. При трансплантации костного мозга (печеночная веноокклюзионная болезнь)

9.4. Тромбозы при гемотерапии онкологических заболеваний

10. Тромбозы смешанного генеза¹

¹ Установлено, что при комбинации в разных сочетаниях тромбогенных факторов, перечисленных в пунктах 1-9, частота тромбозов значительно превышает те показатели, которые обнаруживаются при каждом из видов этой патологии в отдельности.

Следует отметить, что частота и значение для клиники различных видов тромбофилий неодинакова. Так, например, гемореологические формы, резистентность фактора Va к протеину С, гипергомоцистеинемия, которая наблюдается у 1/3-1/2 части всех больных с облитерирующим атеросклерозом, диабетом II типа и коронарной болезнью сердца, антифосфолипидный синдром и некоторые другие формы очень часты и их выявление должно быть систематическим. Другие же формы более редки и имеют меньшее клиническое значение (например, дефицит протеина S).

Особая патогенность свойственна смешанным видам тромбофилий, которые далеко нередки в клинической практике. Их наличие говорит о том, что обследование больных тромбофилиями должно быть комплексным и что лечащие врачи, выявившие подобное нарушение в одном из звеньев системы гемостаза, не должны на этом успокаиваться и продолжать поиск в других частях этой системы.

10.3. ОГРАНИЧЕННОЕ И ДИССЕМИНИРОВАННОЕ СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ. ПРЕДТРОМБОЗЫ, ТРОМБОЗЫ, ТРОМБОФИЛИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ, ДВС-СИНДРОМ. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

10.3.1. Общие положения

Система гемостаза - постоянно функционирующая многокомпонентная система, в которой поддерживаются в динамическом равновесии процессы активации и ингибиции как в клеточном (эндотелиально-тромбоцитарном), так и в ферментных звеньях (свертывание крови, фибринолиз) этой системы (Б.А. Кудряшов, А.А. Маркосян, Д.М. Зубаиров и др.). В частности, установлено, что и в здоровом организме постоянно происходит как умеренная активация тромбоцитов, уравниваемая на определенном уровне антиагрегантным потенциалом эндотелия и плазменными ингибиторами этих клеточных элементов, так и постоянное (фоновое) свертывание крови. Поэтому и при идеальной норме имеются спонтанная активация и агрегация тромбоцитов (см. раздел 2) и минимальная трансформация фибриногена в фибрин (см. раздел 6). Из сказанного следует, что по всем параметрам системы гемостаза следует разграничивать нормальные и патологические показатели. Без такого разграничения

(например, при стрессе) легко впасть в логическую ошибку и считать, что в физиологических условиях уже имеется ДВС-синдром.

Необходимо также подчеркнуть и то, что нормативные параметры системы гемостаза могут быть неодинаковыми у лиц разного возраста, пола, расовой принадлежности и при тех или иных особенностях исходного состояния организма (фаз менструального цикла, наличия беременности и т.д.), а также от климато-географических условий, особенностей труда, питания и т.д. Поэтому приводимые в справочных изданиях, в том числе и в этой книге, усредненные нормативы каждого из определений могут быть приняты лишь как базисные, нуждающиеся в уточнении в каждом конкретном исследовании путем обследования адекватных лиц контрольной группы. Только в таких условиях можно избежать необоснованной диагностики гиперкоагуляционных, ДВС и других синдромов. К сожалению, специальная литература пока пересыщена такими домыслами и ошибочными диагнозами. Нам представляется, что значительная часть таких ошибок могла бы быть устранена при достаточном учете клинических проявлений заболевания, тщательном сопоставлении его симптоматики и лабораторных показателей. Это заставляет нас еще раз подчеркнуть необходимость во всех случаях систематического сопоставления клинических данных и результатов лабораторного исследования системы гемостаза, постулировать практическую бесполезность однотипного исследования какой-либо "стандартной" коагулограммы у больных с разными видами патологии. К такому выводу мы пришли более 25 лет назад¹ и в последующие годы многократно убеждались в правильности этого положения.

При таком подходе лаборатория освобождается от выполнения множества практически бесполезных исследований и при этом одновременно обеспечивается действительно необходимая, более оперативная и экономичная диагностика.

¹ Баркаган З.С. Исследование системы гемостаза в клинике. - Барнаул, 1975.

10.3.2. Особенности локальных и общих сдвигов гемостаза при тромбоэмболиях

В зоне тромбообразования обычно выявляются признаки снижения тромборезистентности эндотелия, в том числе ослабление тромболизиса (низкая активность ТАП и высокий уровень PAI-1), активация тромбоцитов, тромбинемия и высокий уровень растворимого фибрина (или РФМК). По мере удаления от очага тромбообразования эти сдвиги становятся менее выраженными как в связи с разбавлением маркеров тромбообразования, так и снижением их образования в отдаленных от места поражения участках, что схематично показано на рис. 21.

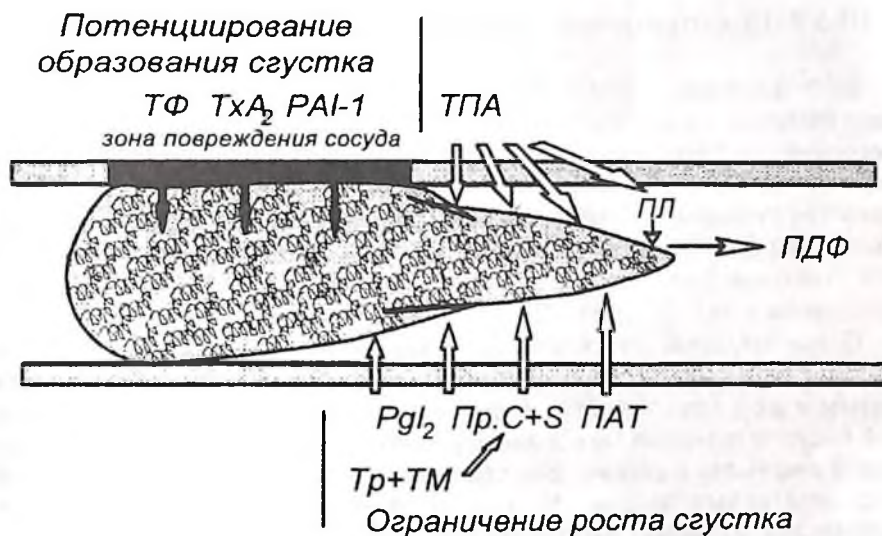


Рис. 21. Схема действия факторов, способствующих и ограничивающих (локализирующих) образование тромба.

Обозначения: ТФ - тканевой фактор, ТхА₂ - тромбоксан А₂, ТПА - тканевой активатор пламиногена, PAI-1 - ингибитор ТПА, ПЛ - пламиноген, ТМ - тромбомодулин, Тр - тромбин, Пр. С+S - белки С и S, ПАТ - плазменный антитромбин.

Вместе с тем, в местах эмболизации сосудов обычно выявляется новое значительное нарастание этих показателей. Тем не менее при массивных тромбозах магистральных сосудов наблюдается повы-

шенной уровень маркеров внутрисосудистого свертывания крови и в общем кровотоке. Графики на рис. 18, дополненные нашими данными по фенантролиновому тесту, демонстрируют, с какой частотой обнаруживаются нарушения в разных маркерных тестах при венозных тромбозах и при развитии ТЭЛА. При ТЭЛА эти анализы могут существенно дополнять информацию, получаемую с помощью ЭКГ, сцинтиграфии легких и другими методами, а также отражать, в какой степени применяемая антитромботическая терапия позволяет подавить тромбоэмболический процесс.

Особенно следует подчеркнуть роль фибринолитической (плазминовой) системы в ограничении тромбообразования, вследствие чего рост тромбов постепенно замедляется и процесс стабилизируется, не трансформируясь во всеобщее свертывание крови.

10.3.3. Локальное (органное) микротромбообразование

Этот феномен, детально изученный в нашем центре, является закономерной защитной (барьерной) реакцией организма на воспалительно-деструктивные процессы. Он характеризуется тем, что в достаточно большой зоне вокруг таких очагов происходит блокада микроциркуляции за счет тромбирования сосудов малого калибра. Указанная блокада микроциркуляции четко документируется изотопной сцинтиграфией органа с помощью макроальбумина, меченого технецием или I131 (рис. 22).

Положительной стороной этой защитной реакции является то, что при блокаде микроциркуляции повреждающих агент (микроорганизмы и др.) локализуются в очагах поражения и снижается угроза его распространения по организму - метастазирование, переход очаговой инфекции в сепсис. Вместе с тем, эта защитная реакция имеет ряд негативных сторон: 1) она часто выключает из метаболизма чрезмерно большую непораженную часть органа, способствуя вторичному развитию ишемического, а затем и ревазуляризационного синдромов; 2) блокада микроциркуляции препятствует проникновению антибиотиков и противовоспалительных средств в очаги поражения, снижая их концентрацию и способствуя развитию антибиотикоустойчивости микрофлоры; 3) феномен локальной блокады микроциркуляции создает угрозу трансформации этого процесса в ДВС-синдром с развитием полиорганной недостаточности (см. ниже). По всем этим причинам в современную терапию очаговых деструктив-

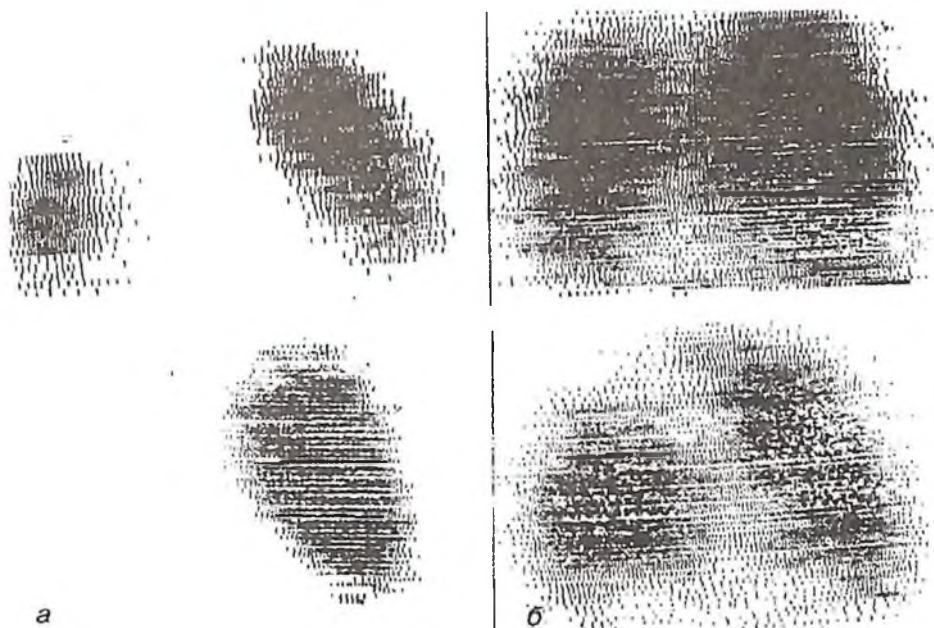


Рис. 22. Сканограммы легких больных с гнойно-гангренозными процессами в легких.
 Обозначения: а – до лечения; б – после деблокады микроциркуляции.

но-воспалительных процессов включают антитромботические препараты (гепарины и др.), в совокупности с трансфузиями свежезамороженной плазмы или ее криосупернатантной фракции, антипротеазы. Установлено, что это позволяет значительно повысить общую эффективность лечения воспалительно-деструктивных процессов¹. Использование методов лабораторного контроля за эффективностью и достаточностью такого лечения (см. раздел 7.) позволяет индивидуализировать проводимую терапию при практически полном

¹ Шойхет Я.Н., Баркаган З.С., Роцев И.П. и др. В кн.: Проблемы физиологии и патологии системы гемостаза. Труды проблемной комиссии РАМН, Барнаул, 2000, С. 143-145; Баркаган З.С., Шойхет Я.Н., Бобоходжаев М.М. Проблемы гематологии и переливания крови. - 2000. - № 2. - С. 47-52; те же авторы. Российские медицинские вести. - № 3. - 2000. - С. 33-36; Баркаган З.С. в сб.: Сибирская кардиология. - Красноярск, 2000. - С. 6-14.

устранении сколько-нибудь серьезных осложнений.

10.3.4. ДВС-синдром

Многочисленные формы ДВС-синдрома подразделяются по генезу на следующие виды:

1. Инфекционно-септические.
 2. Первично асептические¹.
- 2.1. Связанные с деструкцией клеток, тканей и органов (ожоги, синдром сдавления, острый внутрисосудистый гемолиз, эмболия околоплодными водами, внутриутробная гибель плода и др.).
- 2.2. Неопластические (опухоли, лейкозы и др.).
- 2.3. Токсогенные, связанные с поступлением в организм экзогенных коагулаз.
- 2.4. При больших кровопотерях.

По течению различают:

1. Острый ДВС-синдром, включая молниеносную (катастрофическую) форму.
2. Подострый.
3. Хронический и рецидивирующий (с длительным периодом гиперкоагуляции и/или гиперагрегации тромбоцитов), в том числе при хронических воспалительных и воспалительно-деструктивных процессах, хроническом гемолизе.

Комплекс методов диагностики ДВС-синдрома

Лабораторная диагностика:

1. Определение клеточных маркеров:
 - подсчет количества тромбоцитов в крови;
 - определение спонтанной агрегации тромбоцитов;
 - оценка фрагментации эритроцитов.
2. Показания общих коагуляционных тестов (АПТВ, протромбиновый и тромбиновый тесты, содержание в плазме фибриногена).
3. Выявление признаков тромбинемии и активации фибринолиза - увеличения содержания РФ и других маркеров.

¹ Часто наблюдается трансформация в инфекционно-септические формы (см. *Materia Medica*. - 1997. - № 1/13. - С. 5-14).

Дополнительные методы:

- определение плазменного антитромбина;
- определение плазминогена.

Клинические маркеры:

- наличие этиологических факторов (см. выше);
- наличие полиорганной недостаточности и/или блокады микроциркуляции в нескольких органах;
- наличие геморрагий разной локализации (не всегда)

10.4. ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ СОВРЕМЕННОЙ НОМЕНКЛАТУРЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ (РАЗДЕЛ: КОАГУЛОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

РАЗДЕЛ 5.0. КОАГУЛОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ¹

5.1. СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ (ПЕРВИЧ- НЫЙ ГЕМОСТАЗ)

- Тромбоциты (2.2.2.).
- количество тромбоцитов (2.2.2.1.).
- Морфологическая характеристика тромбоцитов (в мазках крови), в том числе, определение размера (микро, макротромбоциты, гигантские формы) (2.2.2.2.).
- Средний объем тромбоцитов (MPV) (2.2.2.4.).
- Показатель анизоцитоза тромбоцитов (PDW) (2.2.2.5.).
- Графическое распределение тромбоцитов по величине, гистограмма (2.2.2.6.).

5.1.1. Рецепторы тромбоцитов IIb/IIIa, Ib.

5.1.2. ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ.

5.1.2.1. Фактор 3 тромбоцитов по его доступности в богатой и бедной тромбоцитами плазме.

5.1.2.2. Фактор 4 тромбоцитов (антигепариновый).

5.1.2.3. Бета-тромбоглобулин.

5.1.2.4. Тромбоспондин.

- Фибронектин плазмы крови (4.1.4.4.).

¹ Управление качеством клинических лабораторных исследований. Под ред. В.В. Миньшикова. М.: Лабпресс. - 2000. - С. 104-109.

- 5.1.2.5. Лейкоцитарный фактор агрегации тромбоцитов (FAT).
- 5.1.2.6. Серотонин тромбоцитов.
- 5.1.2.7. Фибронектин тромбоцитов.
- 5.1.3. ФАКТОР ВИЛЛЕБРАНДА И ТРОМБОМОДУЛИН.
- 5.1.3.1. Активность фактора Виллебранда (по ристомицин-агрегации тромбоцитов).
- 5.1.3.2. Антиген фактора Виллебранда.
- 5.1.3.3. Мультимерность фактора Виллебранда.
- 5.1.3.4. Связывание фактора Виллебранда с тромбоцитами и фактором VIII.
- 5.1.3.5. Тромбомодулин плазмы.
- 5.1.3.6. Другие факторы тромбоцитов.
- 5.1.4. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ.
- 5.1.4.1. Время кровотечения.
- 5.1.4.2. Резистентность (ломкость) микрососудов (проба Кончаловского-Румпель-Леде).
- Адгезия тромбоцитов (2.2.2.3.).
- 5.1.4.3. Ретенция тромбоцитов.
- 5.1.4.4. Агрегация тромбоцитов.
- 5.1.4.4.1. Спонтанная агрегация тромбоцитов.
- 5.1.4.4.2. Количество агрегатов тромбоцитов в крови.
- 5.1.4.4.3. Агрегация тромбоцитов с применением агонистов: АДФ, коллагена, адреналина, ристоцетина (ристомицина), арахидоновой кислоты, кальций ионофора, серотонина, тромбина, фибрин-мономера, лейкоцитарного фактора агрегации тромбоцитов (FAT).
- 5.1.4.5. Ретракция сгустка.
- 5.1.4.6. Продолжительность (длительность) жизни тромбоцитов в циркуляции.
- Антитела к тромбоцитам (6.5.5.).
- 5.1.4.7. Антитела к гликопротеинам IIb/IIIa.

5.2. КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ

- 5.2.1. СКРИНИНГОВЫЕ (ОРИЕНТИРОВОЧНЫЕ) ТЕСТЫ.
- 5.2.1.1. Время свертывания нестабилизированной крови.
- 5.2.1.2. Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧТВ, АПТВ).
- 5.2.1.3. Каолиновое время бедной тромбоцитами плазмы.
- 5.2.1.4. Каолиновое время богатой тромбоцитами плазмы (активированное время рекальцификации).

5.2.1.5. Кефалиновое время бедной тромбоцитами плазмы (частичное тромбопластиновое время).

5.2.1.6. Прокоагулянтная активность плазменных фосфолипидных мембран (по каолиновому времени бедной тромбоцитами плазмы до и после микрофльтрации).

5.2.1.7. Протромбиновое (тромбопластиновое) время в крови или плазме.

5.2.1.8. Аутокоагуляционный тест.

5.2.1.9. Время свертывания плазмы при активации фактора X лебтоксом (коагулаза яда гюрзы) или ядом гадюки Рассела.

5.2.1.10. Время свертывания плазмы при активации фактора II эхитоксом (коагулаза яда эфы).

5.2.1.11. Тромбиновое время.

5.2.1.12. Рептилазовое время (тест с коагулазой яда щитомордника обыкновенного или коагулазой яда змеи ботрокс - "ботроксклотазой").

- Фибриноген (фактор I) в плазме крови (4.1.5.7.), фибриноген-антиген.

5.2.2. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ТЕСТЫ.

5.2.2.1. Дифференциальная диагностика дефицита факторов VII, X, V или II с использованием комплекса тестов с коагулазами ядов змей (эфы и гюрзы) и протромбинового теста.

5.2.2.2. Факторы свертывания VII, X, V или II по протромбиновому тесту с использованием дефицитных плазм.

5.2.2.3. Антигены факторов свертывания VII, X, V или II.

5.2.2.4. Дифференциальная диагностика дефицита факторов VIII, IX и XI по АПТВ с использованием адсорбированной бариером, профильтрованной, "старой" плазмы и сыворотки крови.

5.2.2.5. Факторы свертывания VIII, IX, XI или XII по АПТВ с использованием дефицитных плазм.

5.2.2.6. Антигены факторов свертывания VIII, IX, XI или XII.

5.2.2.7. Ингибиторы фактора VIII или IX.

5.2.2.8. Некарбокситированные факторы VII, X и II (PIVKA).

5.2.2.9. Резистентность фактора Va к активированному протеину C (аномалия фактора V Лейден).

5.2.2.10. Аномалия фактора Va Лейден (ПЦР-анализ).

5.2.2.11. Аномалия фактора II (ПЦР-анализ).

5.2.2.12. Фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор).

5.2.2.13. Прекалликреин:

- Активность прекалликреина.
- Антиген прекалликреина.
- 5.2.2.14. Высокмолекулярный кининоген (ВМК):
- активность ВМК.
- антиген ВМК.

5.3. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ АНТИКОАГУЛЯНТЫ

5.3.1. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АНТИКОАГУЛЯНТЫ.

5.3.1.1. Антитромбин III:

- прогрессивная активность антитромбина III.
- гепарин-кофакторная активность.
- антиген антитромбина III.

5.3.1.2. Кофактор гепарина II.

5.3.1.3. Скрининг нарушений в системе протеинов C+S (Глобальный тест, Парус-тест).

5.3.1.4. Протеин С:

- активность протеина С.
- антиген протеина С.

5.3.1.5. Протеин S.

- активность протеина S.
- антиген протеина S (общего и свободного).

5.3.1.6. Антиген ингибитора тканевого пути свертывания (TFPI).

5.3.1.7. Альфа-2-макроглобулин.

- Альфа-1-антитрипсин (4.1.5.4.).

5.3.1.8. C1-ингибитор.

5.3.1.9. Ингибитор активности фактора Ха в плазме.

5.3.1.10. Тромбин-гепариновое время (скрининговый тест).

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ АНТИКОАГУЛЯНТЫ.

5.3.2.1. Антикоагулянты волчаночного типа.

5.3.2.1.1. Фосфолипид-зависимые коагуляционные тесты (первичный скрининг):

- АПТВ с люпус-чувствительным кефалином.
- каолиновое время бедной тромбоцитами плазмы (5.2.1.3.).
- протромбиновое время с разведенным (ослабленным) тромбопластином.
- тесты с разведенными (ослабленными) ядами гюрзы или гадюки Рассела.

5.3.2.1.2. Подтверждающие тесты:

- по коррекции разрушенными тромбоцитами (или гексагональными фосфолипидами) гипокоагуляции в тестах, перечисленных в 5.3.2.1.1.

- по добавлению нормальной бедной тромбоцитами плазмы (коррекция дефицита факторов свертывания).

5.3.2.1.3. Степень ингибции волчаночным антикоагулянтом активности плазменных фосфолипидных мембран.

5.3.2.1.4. Антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам.

- антитела к фосфатидилсерину (IgG,M) (6.6.1.3.).

- антитела к кардиолипину (IgG,M) (6.6.1.2.).

- антитела к бетта2-гликопротеину I (IgG,M).

- антитела к аннексину V.

5.4. ПЛАЗМИНОВАЯ (ФИБРИНОЛИТИЧЕСКАЯ) СИСТЕМА

5.4.1. СКРИНИНГОВЫЕ ТЕСТЫ.

5.4.1.1. Спонтанный эуглобулиновый лизис.

5.4.1.2. Стимулированный эуглобулиновый лизис:

- при активации стрептокиназой.

фактором XIIIa-калликреином.

манжеточной пробой (до и после дозированной компрессии сосудов конечности).

- Концентрация фибриногена в плазме крови (4.1.5.7.).

- Тромбиновое время (5.2.1.1.).

- Рептилазовое время (5.2.1.12.).

5.4.2. КОМПОНЕНТЫ ПЛАЗМИНОВОЙ (ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ) СИСТЕМЫ И ПРОДУКТЫ ФИБРИНОЛИЗА.

5.4.2.1. Плазмин.

5.4.2.2. Плазминоген.

- Активность плазминогена.

- Антиген плазминогена.

- Плазменный прекалликреин плазмы (5.2.2.13.)

- Высокомолекулярный кининоген (ВМК) (5.2.2.14.).

5.4.2.3. Антиген тканевого активатора плазминогена (t PA).

5.4.2.4. Антиген комплекса плазмин-антиплазмин (РАР).

5.4.2.5. Продукты деградации фибриногена (фрагменты D).

5.4.2.6. Продукты деградации фибрина (D-димер).

5.4.2.7. Продукты деградации фибриногена/фибрина (ПДФ).

5.4.2.8. Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) и ранние продукты деградации фибриногена (ПДФ).

5.4.2.9. Альфа-2-антиплазмин:

- активность альфа-2-антиплазмина.
- антиген альфа-2-антиплазмина.

5.4.2.10. Ингибитор активатора плазминогена I (PAI I):

- активность PAI I.
- антиген PAI I. 5.4.2.10.

5.4.2.11. Ингибитор активатора плазминогена 2 (PAI 2):

- активность PAI 2.
- антиген PAI 2.
- Альфа-2-макроглобулин в плазме (5.3.1.7.).
- Альфа-1-антитрипсин в плазме (4.1.5.4.).
- С1 - ингибитор (5.3.1.8.).

5.5. МАРКЕРЫ ВНУТРИСОСУДИСТОЙ АКТИВАЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА**5.5.1. Антиген фрагментов протромбина 1+2 (F1+2).****5.5.2. Антиген комплекса тромбин-антитромбин III (ТАТ).****5.5.3. Производные фибриногена в плазме и сыворотке крови.****5.5.3.1. Антиген фибринопептида А в плазме.****5.5.3.2. Фибрин-мономер в плазме.**

- Продукты деградации фибриногена/фибрина (ПДФ) (5.4.2.7.).
- Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) в плазме по паракоагуляционным тестам (5.4.2.8.).
- D-димер в плазме и в сыворотке крови.
- РФМК и ранние ПДФ в сыворотке крови (5.4.2.8.).
- Фактор 4 тромбоцитов в плазме (5.1.2.2.).
- β-тромбомодулин в плазме (5.1.2.4.).

**5.6. КОНТРОЛЬ ЗА АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ТЕРАПИЕЙ
КОНТРОЛЬ ЗА ЛЕЧЕНИЕМ НЕПРЯМЫМИ АНТИКОАГУЛЯНТАМИ.**

- Протромбиновое (тромбопластиновое) время в крови или плазме, выраженное с учетом международного индекса чувствительности тромбопластина (МИЧ) (5.2.1.7.).
- Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧТВ, АПТВ) в плазме (5.2.1.2.).
- Скрининг нарушений в системе протеинов С+S (Глобальный тест, Парус-тест) (5.3.1.3.).

КОНТРОЛЬ ЗА ЛЕЧЕНИЕМ НЕФРАКЦИОНИРОВАННЫМИ ГЕПАРИНАМИ.

- Время свертывания цельной крови (5.2.1.1.).
- Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) в плазме с реактивом, аттестованным по чувствительности к гепарину (5.2.1.2.).
- АПТВ в плазме до и после сорбции из нее гепарина сорбентом (Гепасорб-2).
- Тромбиновое время плазмы (5.2.1.11.).
- Тромбиновое время плазмы до и после сорбции из нее гепарина сорбентом (Гепасорб-1).
- Антитромбин III (5.3.1.1.):
- прогрессивная активность антитромбина III в плазме после сорбции из нее гепарина сорбентом (Гепасорб-1);
- гепарин-кофакторная активность (коагуляционный и амидолитический варианты).
- Тромбин-гепариновое время в бедной тромбоцитами плазме (5.3.1.10.).
- Динамика содержания растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме в процессе лечения (5.4.2.8.).
- Количество тромбоцитов в крови через 5-6 и 14 дней от начала терапии (2.2.2.1.).

КОНТРОЛЬ ЗА ЛЕЧЕНИЕМ ПРЕПАРАТАМИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГЕПАРИНА.

- Ингибитор активности фактора Ха в плазме (5.3.1.9.).
- Динамика содержания растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме в процессе лечения (5.4.2.8.).
- Количество тромбоцитов в крови через 5-6 и 14 дней от начала терапии (2.2.2.1.).

КОНТРОЛЬ ЗА ЛЕЧЕНИЕМ ГИРУДИНОМ И ЕГО ПРЕПАРАТАМИ.

- АЧТВ(АПТВ) (5.2.1.2.).
- Тромбиновое время (5,2.1.11.).
- D-димер (5.4.2.6.).

КОНТРОЛЬ ЗА ТЕРАПИЕЙ ФИБРИНОЛИТИКАМИ.

- Плазминоген (5.4.2.2.).
- Фибриноген (4.1.5.7.).
- Фрагменты D и D-димер (5.4.2.5.; 5.4.2.6.).
- Тканевый активатор плазминогена (t PA).
- Альфа-2-антиплазмин (5.4.2.9.).

- Ингибитор активатора плазминогена I (РАI I) (5.4.2.11.)
- КОНТРОЛЬ ЗА ЛЕЧЕНИЕМ АНТИАГРЕГАНТАМИ ТРОМБОЦИТОВ.
- Агрегация тромбоцитов с применением агонистов АДФ и адреналина (5.1.4.4.3.).
- Количество агрегатов тромбоцитов в крови (5.1.4.4.2.).
- Спонтанная агрегация тромбоцитов (5.1.4.4.1.).

5.7. КОМПЛЕКС МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И КОНТРОЛЯ ЗА ЛЕЧЕНИЕМ ДВС-СИНДРОМА

ОБЩИЕ КОАГУЛЯЦИОННЫЕ ТЕСТЫ.

- Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧТВ, АПТВ) (5.2.1.2.).
- Протромбиновое (тромбопластиновое) время (5.2.1.7.).
- Тромбиновое время (5.2.1.11.).
- Фибриноген в плазме (4.1.5.7.).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ

- Антитромбин III (5.3.1.1.).
- Протеин С (5.3.1.4.).
- Маркеры внутрисосудистой активации свертывания крови и фибринолиза (см. раздел 5.5.).
- Клеточные маркеры.
- Фрагментация эритроцитов (в мазке или в градиенте плотности фиколл/верографин) (2.2.1.6.).
- Количество тромбоцитов в крови (2.2.2.1.).
- Спонтанная агрегация тромбоцитов (5.1.4.4.1.).

11. ПРИЛОЖЕНИЕ

Точность и информативность лабораторного исследования системы гемостаза зависят от соблюдения целого ряда условий. К ним относятся:

- выполнение правил забора крови, получения плазмы и их хранения до исследования;
- качество используемых реактивов и посуды;
- учет назначения больным медикаментов, влияющих на исследуемые параметры;
- уровень квалификации сотрудников лаборатории, выбор оптимальных методик (схем) обследования и ряд других.

В данном разделе изложены общие рекомендации по организации работы лаборатории гемостаза.

11.1. ПРАВИЛА ЗАБОРА КРОВИ И ПОЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1.1. Подготовительные процедуры

Хорошо отмытые от детергента и высушенные стеклянные пробирки (15×150 мм) и другую посуду разделяют на две части, одну из которых силиконизируют.

Для силиконирования пробирок (флаконов, стеклянных пипеток с мерным объемом 0,1-5 мл) 10% раствор силикона (ПМС-400, ПМС-500) в хлороформе переливают из пробирки в пробирку, которые затем опрокидывают на 5-10 мин на фильтровальную бумагу для удаления излишков раствора. Силиконирование пипеток проводят с помощью резиновой груши, одеваемой на нерабочий конец пипетки. При этом раствором силикона заполняют лишь градуированную часть пипетки. Процедуру силиконирования желательно выполнять в вытяжном шкафу. Посуду ополаскивают дистиллированной водой и сушат в вертикальном положении (для удаления излишков сили-

кона) в течение 2-3 ч при температуре +180...+200°С.

Силиконированная посуда обрабатывается после использования аналогично несиликонированной, но отмывается, сушится и маркируется отдельно. Повторная обработка силиконом требуется после 2-3-кратного использования пробирок.

Силиконированную посуду рекомендуется применять для:

- забора, хранения и центрифугирования крови;
- хранения богатой и бедной тромбоцитами плазмы до исследования;
- хранения раствора тромбина;
- определения количества и оценки функции тромбоцитов (адгезия, агрегация);
- оценки коагуляционных тестов в условиях низкой контактной активации фактора XII.

Иглы обрабатываются этим же раствором, но после ополаскивания дистиллированной водой и стерилизации требуют промывания стерильным раствором стабилизатора непосредственно перед венепункцией.

В последнее время получили широкое распространение пластиковые пробирки и полуавтоматические пипетки. Им следует отдавать предпочтение, поскольку они не нуждаются в силиконировании, лучше калиброваны и легко маркируются. В нашей лаборатории на протяжении последних лет для этих целей успешно используются полистироловые центрифужные градуированные пробирки "Elkay Eireann" (Финляндия, кат. № 00L-2087-ООР), объемом 15 мл, с завинчивающейся крышкой, подходящие к штативам и центрифугам отечественного производства.

11.1.2. Получение крови, ее стабилизация и выделение образцов плазмы

Кровь берут утром натощак из локтевой вены силиконированной иглой с широким просветом без шприца (самотеком). Допустимо лишь кратковременное наложение жгута. Использование шприца недопустимо из-за активации тромбоцитов и факторов свертывания крови турбулентным движением крови и ее смешивания с воздухом (вспенивания). В некоторых клинических ситуациях (например, при шоке) извлечение крови из локтевой вены затруднительно из-за низкого давления. Попытки при этом медленно набрать кровь с помо-

щью шприца часто заканчиваются неудачей - кровь свертывается. В таких случаях можно прибегнуть к забору крови из катетера (подключичного), однако следует помнить о возможности загрязнения такой крови гепарином (см. также раздел 3.11).

Кровь смешивают с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. На этом этапе могут быть допущены три ошибки. Первая из них - ошибка точности и правильности приготовления раствора стабилизатора. Весьма важно учесть, что трехзамещенный 5,5-водный цитрат натрия готовится в концентрации 3,8% (0,11 М), а 2-водный - в концентрации 3,2%. Хранение раствора цитрата допускается в течение 1 недели при +2...+8°C. Более длительное хранение приводит к бактериальному загрязнению и снижению концентрации цитрата натрия. Вторая - принятое соотношение крови с раствором стабилизатора (9:1) правильно лишь при нормальном гематокритном показателе, в связи с тем, что раствор цитрата остается в плазме и не проникает в клетки крови. Поэтому при высоком гематокрите (свыше 70%) в плазме крови создается избыточная концентрация цитрата, приводящая к "ложной" гипокоагуляции. Напротив, при снижении гематокрита (ниже 35%), например, при анемии, обнаруживается "ложная" гиперкоагуляция и кровь при ее смешивании с цитратом в отношении 9:1 может свернуться в пробирке еще до исследования. Перерасчет объема стабилизатора в соответствии с показателем гематокрита (табл. 33) позволяет избежать этой ошибки.

Таблица 33

Соотношение объемов 3,8% раствора цитрата натрия и крови в зависимости от величины гематокрита

Показатель гематокрита, %	Объем антикоагулянта, мл	Объем крови, мл
20-21	1,4	8,6
22-27	1,3	8,7
28-33	1,2	8,8
34-39	1,1	8,9
40-45	1,0	9,0
46-51	0,9	9,1
52-57	0,8	9,2
58-60	0,7	9,3
Более 65	0,5	9,5

Примечание. Следует учитывать, что у здоровых новорожденных (до 5 дня) в условиях физиологической полиглобулии гематокритный показатель составляет 55-60%.

Третья ошибка - одной из наиболее частых погрешностей при заборе 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 чистым фрагментом полиэтиленовой пленки и 2-3 раза медленно перевернуть (не встряхивая).

Стабилизированную кровь до центрифугирования (в том числе и в процессе транспортировки) хранят при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 1 ч. Транспортировка крови на большие расстояния и ее частое встряхивание искажают результаты исследования.

Важен также входной контроль проб крови, выполняющийся лаборантом. Он включает в себя:

а) проверку маркировки с обязательным указанием времени забора крови, регистрацию проб;

б) контроль правильности и достаточности полученного объема крови по метке на пробирке, соответствие стабилизатора гематокристу. Последний легко определяется автоматическим счетчиком крови или на гематокритной центрифуге;

в) контроль на возможное спонтанное свертывание крови, который проводят, медленно наклоняя пробирку в горизонтальной плоскости. Стабилизированная кровь не должна иметь сгустков и плотных образований. Кровь со сгустками и гемолизом не исследуется!

Особое внимание должно быть уделено правильному заполнению направления на исследование, с указанием клинической ситуации и цели обследования. От этого во многом зависят выбор методик и правильность оценки получаемых результатов. Необходимым является заполнение следующих граф:

- *Ф.И.О., возраст больного, номер страхового полиса.*
- *Наименование лечебного учреждения и отделения, где находится больной.*
- *Фамилия, инициалы и телефон лечащего врача.*
- *Время забора крови и направления на исследование.*
- *Клинический диагноз (или ситуация), цель обследования.*
- *Наличие геморрагических (носовых, маточных и др. кровотечения) и (или) тромботических проявлений, шока, полиорганной недостаточности, травмы (ожоговой и др.).*
- *Отметка о проводимом лечении, влияющем на параметры ге-*

мостаза (аспирин, дезагреганты, антикоагулянты, тромболитики, ингибиторы фибринолиза, гормональные контрацептивы, декстраны, полиглобулины, гемо- и плазмотрансфузии и др.), их дозировка и сроки последнего введения.

Для получения богатой или бедной тромбоцитами плазмы кровь последовательно центрифугируют. При этом важно для результатов анализа соблюдать режим центрифугирования.

Получение плазмы, богатой тромбоцитами

Стабилизированную кровь после уравнивания пробирок центрифугируют при 1000 об/мин (140-160 g) в течение 5-7 мин. Более значительное ускорение (!) приводит к обеднению плазмы тромбоцитами, искажает результаты при определении количества и функции тромбоцитов в плазме. Поэтому для получения необходимых результатов следует уточнять число об/мин в соответствии с радиусом ротора конкретной центрифуги (рис. 23). Плазму без взмучивания отсасывают с помощью силиконированной или полуавтоматической пипетки с пластиковым наконечником и переносят в другую пробирку для исследования или повторного центрифугирования с целью получения бедной тромбоцитами плазмы.

Богатая тромбоцитами плазма замораживанию не подлежит.

Получение плазмы, бедной тромбоцитами

Богатую тромбоцитами плазму центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200-1400 g) в течение 15 мин. При более слабом ускорении в плазме остается значительная часть тромбоцитов, которые обуславливают недостоверность исследования каолинового времени свертывания бедной тромбоцитами плазмы (в том числе при определении прокоагулянтной активности плазменных фосфолипидных мембран), определений волчаночного антикоагулянта, в тестах с коагулазами ядов гюрзы и гадюки Рассела и в других тестах.

В ряде случаев, для проведения исследований по сокращенной схеме (определение ПВ, ТВ, АПТВ, концентрации фибриногена) допустимо центрифугирование для получения бедной тромбоцитами плазмы непосредственно из крови - при 3000-4000 об/мин (1200-1400 g) в течение 15 мин.

Центрифугирование проводят при комнатной температуре. Обогащенную и бедную тромбоцитами плазму хранят в тех же условиях

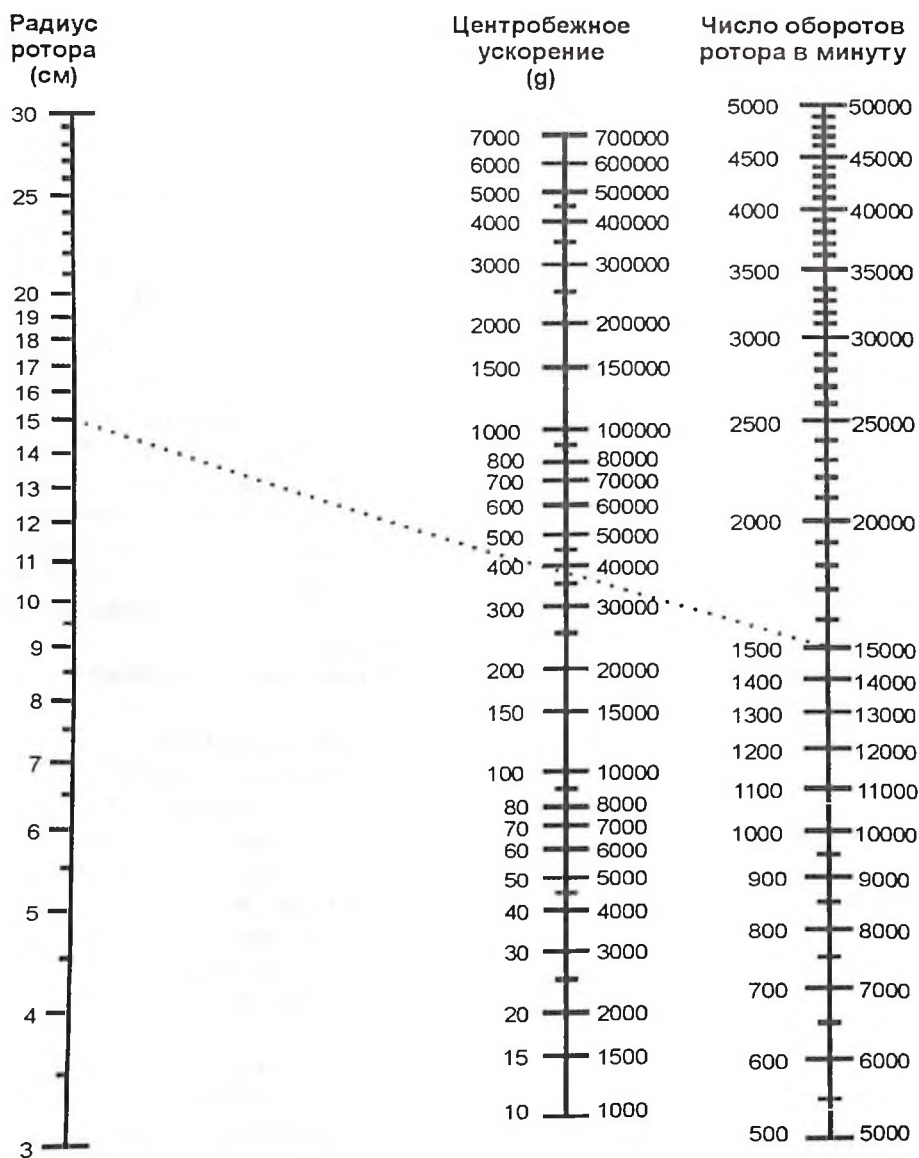


Рис. 23. Номограмма для определения режима центрифугирования.

(+18...+25°C) в стеклянных силиконированных или пластиковых пробирках (предпочтительный материал - полистирол) и исследуют в течение первых 1-2 часов от времени получения.

При исследовании крови больных, получающих лечение гепарином, а также при анализе крови, полученной при помощи катетера, БТП для исследования ряда параметров коагулограммы обрабатывается сорбентами гепарина (см. раздел 3.11).

11.2. ОБРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ

Точность и воспроизводимость коагуляционных исследований в большой степени зависят от чистоты лабораторной посуды и правильной ее обработки. Последовательность такой обработки следующая. Кровь и ее компоненты сливают в специальную емкость и засыпают хлорамином или хлорной известью в пропорции 5:1, перемешивают и выдерживают 1 ч. Посуду (стеклянную и пластиковую) замачивают с заполнением всех полостей в 4% растворе перекиси водорода на 1,5 ч и более, после чего ее споласкивают в проточной водопроводной воде. Дополнительную механическую очистку от остатков крови и реактивов проводят в 4% растворе перекиси водорода, содержащем 0,5% моющего состава (порошки "Астра", "Биос", "Лотос" и др.), при температуре раствора около +50°C.

Примечание. Определенной проблемой является необходимость во многих случаях предусмотреть повторное использование "одноразовых" кювет для коагулометра. Использование для их промывки смеси H_2O_2 с моющим составом (детергентом) дает, по нашему опыту, неудовлетворительный результат. После такой обработки и при повторном использовании кювет снижаются точность и воспроизводимость анализов. Если же ограничиться промывкой только лишь 4% перекисью водорода, кюветы могут быть использованы повторно.

Далее посуда последовательно промывается в водопроводной и дистиллированной воде. Стеклопосуда сушится в течение 2-3 ч при температуре выше +120°C в сухожаровом шкафу, а пластиковая (пробирки, кюветы, наконечники пипеток) - при температуре +40...+45°C в суховоздушном термостате. Силиконированная посуда обрабатывается так же, но отдельно от несиликонированной. Однажды силиконированную посуду не следует пытаться очистить от силикона и использовать в качестве несиликонированной. Монослой силикона на емкости стеклянных микропипеток (0,1-0,2 мл) существенно не сказывается. Ни в коем случае не следует обрабатывать

посуду солями хромпика, поскольку хром прочно фиксируется на стекле и даже в очень небольших количествах ингибирует ряд ферментов, искажая результаты определений.

Посуда (пробирки, пипетки), контактировавшие со змеиными ядами, требуют обработки, сушки и складирования отдельно от остальной посуды. Обработка рабочих поверхностей коагулометров после работы с ядовыми реагентами проводится 70% раствором этилового спирта.

11.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ РЕАКТИВОВ

Буфер Михаэлиса (вероналовый), pH 7,35

Готовят раствор А - 7,36 г ацетата натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) и 7,36 г вероната натрия растворить в 250 мл дистиллированной воды;

Приготовление буфера:

раствор А	250 мл,
4,25% раствор NaCl	200 мл,
0,1 М раствор HCl	217 мл,
дистиллированная вода	683 мл.

Трис-буфер, 0,05М

Готовят два исходных раствора. Раствор А: 12,1 г трис (трис-гидроксиметил-аминометан) разводят дистиллированной водой, объем доводят до 1 л; раствор Б: 0,1 М HCl. Заданную величину pH получают, руководствуясь табл. 34.

Таблица 34

Составные компоненты трис-HCl буфера

pH	Добавка NaCl, г	Объем смешиваемых растворов, мл:	
		А	Б
7,2	6,41	500	442
7,4	6,58	500	414
7,6	6,76	500	384
7,8	7,00	500	326
8,0	7,43	500	268
8,2	7,71	500	220
8,4	8,03	500	166
8,6	8,28	500	122

Добавляют дистиллированную воду до общего объема 1,0 л.

Примечание. Свойства трис-буфера, в отличие от буфера Михаэлиса, существенно зависят от температуры: с повышением температуры на 1°C рН буфера снижается, примерно, на 0,02-0,03. Это нужно учитывать, поскольку коагуляционные исследования проводятся при $+37^{\circ}\text{C}$.

Все разводящие и буферные растворы хранятся в темноте на холоде ($+2...+8^{\circ}\text{C}$) в плотно закупоренной посуде.

Раствор хлорида кальция

Следует обратить особое внимание на правильность приготовления и хранения этого одного из наиболее лабильных реактивов, с изменением свойств которого часто связаны ошибки определений. Для приготовления растворов используется только тщательно высушенный (!) химически чистый хлорид кальция в неповрежденной заводской упаковке.

Следует помнить, что хлорид кальция - активный сорбент, обладающий высокой гигроскопичностью. Он сорбирует многие вещества (пары кислот, щелочей, металлической ртути и др.), которые существенно изменяют его способность участвовать в свертывании крови. Это приводит к неправильному приготовлению навески и к ошибкам определения.

Учитывая перечисленные особенности препарата, необходимо: 1) хранить сухой CaCl_2 в герметически закрытой упаковке отдельно от других реактивов; 2) перед приготовлением навески прокалывать реактив в чистом фарфоровом тигле и затем досушивать в сушильном шкафу при температуре около $+200^{\circ}\text{C}$ до постоянного веса; 3) раствор готовить сразу после прокалывания; 4) хранить рабочий раствор реактива в сосуде с плотно притертой пробкой при $+2...+8^{\circ}\text{C}$; 5) необходимую для работы часть раствора отливать от основного количества, а оставшуюся часть немедленно закрывать. Остатки рабочего раствора выливать, а не сливать с основной его частью; 6) не пользоваться для приготовления раствора ампулированным хлористым кальцием для инъекций (!); 7) обновлять раствор не реже 1 раза в неделю; 8) каждый вновь приготовленный раствор тестировать на нормальной плазме. Для тестирования пользоваться стандартизированными пробами - АПТВ, каолиновым временем свертывания бедной тромбоцитами плазмы. Если результаты контрольных тестов выходят за пределы нормы, то раствор CaCl_2 должен быть заменен.

Как правило в тестах используется раствор CaCl_2 М/40 или 0,025М. Для его приготовления 277 мг прокаленного препарата растворяют в 100 мл дистиллированной воды, либо 1,110 г вещества

растворяют в 400 мл воды. Этот раствор обозначают как 0,277%. В аутокоагуляционном тесте и родственных с ним методиках используется раствор M/50 или 0,222% CaCl_2 .

11.4. ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРИИ ГЕМОСТАЗА

Для выполнения приведенных выше методик лаборатория гемостаза должна быть оснащена следующим оборудованием (см. также приказ МЗ РФ № 380 от 25.12.97 г.): 1. Мойками для обработки силиконированной и несиликонированной посуды. 2. Сушильными шкафами. 3. Холодильником бытовым и низкотемпературным. 4. Центрифугами. 5. Весами для уравнивания пробирок. 6. Погружными термостатами с прозрачными стенками для исследования гемокоагуляции. 7. Автоматическим счетчиком клеток крови. 8. Агрегометром (анализатором агрегации тромбоцитов). 9. Коагулометром. 10. Программируемым фотометром для биохимических исследований с термостатируемой проточной и сменной кюветами. 11. Полуавтоматическими пипетками на 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 мл. 12. Весами аналитическими и торсионными. 13. Осветительными приборами (например, осветителями для микроскопа типа ОИ-19). Использование дополнительной подсветки облегчает и уточняет (при мануальных исследованиях) регистрацию времени свертывания, образования преципитатов паракоагулята, лизиса сгустка и др. 14. Секундомерами.

Приводим неполный перечень специального, доступного в настоящее время и апробированного оборудования.

АГРЕГОМЕТРЫ

Научно-производственная фирма Биола, Москва, Россия

Лазерный анализатор агрегации тромбоцитов, 2-канальный. Может эксплуатироваться самостоятельно и с подключением к компьютеру. В последнем случае распечатывается кривая агрегации и получаемые данные могут архивироваться. Модели: LA 230, LA 230-2, LA 220. Позволяет изучать агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови, определять уровень фактора Виллебранда (модель LA 230-2), подсчитывать число тромбоцитов в плазме, оп-

ределять средний радиус агрегатов тромбоцитов.

Фирма Chrono-log, США

Представляет широкий спектр агрегометров "Хронолог" (26 наименований), отличающихся по принципу регистрации результатов (в том числе импедансный - позволяет проводить исследование в цитратной крови), количеству каналов регистрации (от 1 до 4). Эксплуатируются самостоятельно и с подключением к компьютеру. Последние модели (позволяющие проводить исследование на крови) - 591 (1-канальный) и 592 (2-канальный).

Фирма Helena Laboratories, Франция

Агрегометр Pacts-4 - высокопроизводительный 4-канальный фотометр, снабженный компьютером, цветным дисплеем и др. Предназначен для исследования агрегации тромбоцитов в плазме крови, определения фактора Виллебранда, работы с хромогенными субстратами. Регистрация результатов в видимом диапазоне спектра (405 и 650 нм).

КОАГУЛОМЕТРЫ

АО МЕЛТ, Россия

Анализатор крови коагулологический ВС-10. Основан на механическом (шариковом) принципе регистрации результатов. Коагулометр 10-канальный и состоит из регистрирующего блока, блока термостата и дозатора шариков. Время образования фибрина регистрируется автоматически с помощью встроенных электронных секундомеров.

АО ЮНИМЕД, Россия

Коагулометр ЭМКО-02. Использует оптический или механический принцип регистрации результатов, двухканальный, программируемый.

Фирма Behnk Electronik, Германия

Производит весь спектр коагулометров вплоть до полных автоматов.

Модели: Коагулятор - 1-канальный и 2-канальный, результат в секундах, считывается с табло на приборе. Предусмотрен анализ как плазмы, так и крови.

Коагуляторы CM - 2-канальный, 4-канальный и 8-канальный, результат в секундах может считываться с табло, к прибору присоединяется пересчетное устройство (СМС), в этом случае результат после пересчета печатается принтером. Оптический принцип регистрации предусматривает исследование плазмы.

Тромбостат - 1-канальный и 2-канальный. Простой, удобный коагулометр с механическим принципом регистрации результатов. Для исследования крови и плазмы.

Коагулометры CL - 4-канальный и 8-канальный, пересчетное устройство и принтер встроены в прибор. Механический принцип работы. Предусматривает возможность исследования цитратной крови.

Тромболайзер TLR - полный автомат в комплекте с компьютером (3 варианта - в зависимости от производительности и возможности выполнять хромогенные и иммунологические методы анализа).

Фирма Organon Teknika, Голландия

Производит весь спектр коагулометров, включая "Coag-a-Mate XM" - 4-канальный коагулометр, отличающийся высокой производительностью и чувствительностью благодаря чисто оптическому принципу регистрации результатов.

Фирма DiaMed, Швейцария

Модели: 2-канальный (CD-2) и 4-канальный (CD-4) коагулометры с оптическим принципом регистрации результатов.

CD-4 является программируемым фотооптическим устройством со сменными светофильтрами (до 15 длин волн), что позволяет выполнять полный спектр не только клоттинговых тестов, но и тестов, основанных на использовании хромогенных субстратов, а также определение D-димера. Конструкция прибора допускает анализ микропроб плазмы (50 мкл).

Фирма Hoffman-La Roche., Швейцария

Модели: Полуавтоматический 4-канальный (Start 4) и автоматический (STS Compact) коагулометры с оптико-механическим принципом регистрации результатов.

Фирма Amelung, Германия

Модели: 1-, 4- и 10-канальные коагулометры (KC-1A, KC-4A, KC-10A) с механическим (шариковым) принципом определения.

ДРУГОЕ ОБОРУДОВАНИЕ (АО "ДЕТСТОМ-1")

Термостат TW-2, Россия

Применяется для исследования гемокоагуляции. Диапазон поддерживаемых температур от +20°C до +60°C, точность $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Имеет бесшумное устройство для перемешивания подогреваемой воды, подсветку и два электронных секундомера. Более удобен, чем термостат для исследований гемокоагуляции ТПС.

Миницентрифуга СМ-6, Россия

Улучшенный аналог центрифуги ОПН-3. Имеет три фиксированные скорости вращения - 1000, 1500 и 2750 об/мин, ускорение до 1900 g. Емкость ротора - 12 пробирок длиной до 150 мм и диаметром до 17 мм.

**11.5. НАБОРЫ И РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ГЕМОСТАЗА ПРОИЗВОДСТВА
ФИРМЫ ТЕХНОЛОГИЯ-СТАНДАРТ**

Лицензия МЗ РФ № 42/2000-1268-В

г. Барнаул, а/я 3603; тел. (385-2) 260-501, 260-653, 36-44-57, факс 266-868. E-mail: standart@ab.ru

Фирмой выпускается наиболее полный в Российской Федерации набор диагностикумов и стандартизированных реагентов для исследова-

дования системы гемостаза. Тест-системы пригодны как для мануальных определений, так и для выполнения анализов на коагулометрах разных конструкций. В их число входят оригинальные реагенты и тест-системы, предназначенные для диагностики тромбофилий, в том числе обусловленных нарушениями в системе протеина С, волчаночным антикоагулянтом и др.

ОБЩИЕ ПАРАМЕТРЫ КОАГУЛОГРАММЫ

Протромбиновое время

Техпластин-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для оценки протромбинового времени в плазме крови со стандартизированным по Международному индексу чувствительности (МИЧ) тромбопластином. МИЧ в разных сериях Техпластина 1,1 или 1,2. Комплект набора включает контрольную нормальную плазму. Применяется для тестирования факторов протромбинового комплекса и контроля за лечением аннтикоагулянтами непрямого действия. Определение проводят на коагулометре или мануально.

Состав набора. 1. Техпластин – лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь, на 2 или 5 мл дистиллированной воды - 4 фл. 2. Контрольная плазма (лиофилизированная) - 1 фл. Варианты комплектации набора предусматривают выполнение 40 или 100 определений протромбинового времени.

Нормативные показатели. В норме протромбиновое время составляет при измерении на коагулометре 11-14 с, мануально – 12-15 с.

Техпластин-тест (К)

Назначение. Набор реагентов предназначен для оценки протромбинового времени в капиллярной крови со стандартизированным по МИЧ тромбопластином (1,1 или 1,2). Комплект набора включает контрольную нормальную плазму. Применяется для тестирования факторов протромбинового комплекса и контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия. Определение проводят на коагулометре с механическим принципом регистрации результа-

тов или вручную.

Состав набора. 1. Техпластин – лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь, на 5 мл дистиллированной воды - 2 фл. 2. Растворитель для Техпластина – 1 фл. 3. Контрольная плазма (лиофилизированная) - 1 фл. 4. Цитрат натрия – 1 фл.

Набор рассчитан на 25 двойных определений протромбинового времени.

Нормативные показатели. В норме протромбиновое время составляет при измерении на коагулометре 11-14 с, вручную – 12-15 с.

Тканевый тромбопластин

Назначение. Не стандартизирован по МИЧ. Предназначен для определения протромбинового времени и концентрации фибриногена (по Рутберг).

Фасовка. Флакон содержит 1,0 г лиофилизированного кадаверного тромбопластина. Активность в протромбиновом тесте 15-17 с.

Квик-Фг-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для выполнения протромбинового времени и определения концентрации фибриногена гравиметрически (по Рутберг).

Состав набора. 1. Тромбопластин кадаверный человека (лиофильно высушенный), 1 г - 2 фл. 2. Хлорид кальция (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%), 20 мл - 3 фл. 3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл - 2 фл.

Набор рассчитан на параллельное проведение 400 анализов по определению протромбинового времени и концентрации фибриногена.

Примечание. Набор ориентирован на лаборатории, не использующие в своей работе коагулометр. Применение набора позволяет значительно повысить точность определения концентрации фибриногена по Рутберг.

Нормативные показатели. В норме протромбиновое время составляет 15-17 с, а концентрация фибриногена 2,0-4,0 г/л.

Активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время (АПТВ/АЧТВ)

АПТВ/АЧТВ-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для определения активированного парциального (частичного) тромбопластинового времени, активированного времени рекальцификации (АВР) или каолинового времени в ручном варианте или с помощью коагулометров разных конструкций.

Состав набора на 100 определений: 1. Кефалин (лиофильно высушенный) - 2 фл. 2. Каолин - легкая фракция (концентрированная суспензия 40:1) - 1 фл. 3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М) - 1 фл. 4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М) - 1 фл.

Состав набора на 500 определений: 1. Кефалин (лиофильно высушенный) - 2 фл. 2. Каолин - легкая фракция (концентрированная суспензия 200:1) - 1 фл. 3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М) - 1 фл. 4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%) - 1 фл.

Нормативные показатели. В норме АПТВ составляет при измерении на коагулометре 28-38 с, мануально - 32-42 с.

АПТВ(АЧТВ)-ЕI-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для определения АПТВ/АЧТВ. Особенность заключается в использовании вместо каолина оптически более прозрачной эллаговой кислоты, а также простоте приготовления рабочих растворов реагентов.

Состав набора: 1. АПТВ-реагент (лиофилизированная смесь фосфолипидов и эллаговой кислоты) - 4 фл. 2. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%) - 1 фл.

Набор рассчитан на 100 определений.

Нормативные показатели. 32-42 с.

Кефалин

Назначение. Кефалин применяют в методах оценки внутреннего пути свертывания крови, в т.ч. при определении АПТВ/АЧТВ.

Фасовка. Флакон содержит 30 мг лиофильно высушенного кефалина.

Каолин (легкая фракция)

Назначение. Каолин применяют при определении АПТВ и каолинового времени свертывания.

Состав комплекта. 1. Каолин - легкая фракция (концентрированная суспензия 200:1) - 1 фл. 2. Растворитель для каолина (концентрированный раствор 20:1) - 1 фл.

Тромбиновое (анцистроновое) время

Тромбо-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для определения тромбинового времени при диагностике нарушений конечного этапа свертывания.

Состав набора на 50 определений. 1. Тромбин человека (активность 6-8 NIH ед/флакон) - 4 фл. 2. Контрольная плазма лиофильно высушенная - 1 фл.

Состав набора на 400 определений. 1. Тромбин человека (активность 500 NIH ед) - 1 фл. 2. Стандарт-плазма лиофильно высушенная - 2 фл. 3. Буфер трис-HCl (концентрированный 20:1 раствор, 1 M) - 1 фл.

Нормативные показатели. В норме тромбиновое время составляет 14-17 с.

Тромбин

Назначение. Тромбин используют для определения тромбинового времени, активности антитромбина III, концентрации фибриногена, оценки зуглобулинового лизиса, индуцируемого стрептокиназой и др.

Фасовка. Флакон содержит 500 ед.NIH лиофилизированного тромбина человека и необходимые стабилизаторы. Маточный раствор тромбина (50 ед.NIH/мл) сохраняет активность при +2...+8°C 1 мес, при -20°C - до 2 мес.

Анцистрон

Назначение. Анцистрон - очищенная коагулаза, полученная из яда змеи *Agkistrodon halys halys*. Данный фермент, как и рептилаза, используется для оценки конечного этапа свертывания.

Фасовка. Флакон содержит коагулазу, активность которой при разведении эквивалентна 3-4 ед. NIH тромбина.

Фибриноген

Фибриноген-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для быстрого количественного определения содержания фибриногена в плазме крови (хронометрически по Клауссу). Определения проводят только на коагулометре.

Состав набора. 1. Тромбин человека (активность 500 NIH ед) - 2 фл. 2. Растворитель для тромбина - 1 фл. 3. Стандарт-плазма с известным содержанием фибриногена - 1 фл. 4. Буфер трис-HCl (концентрированный 20:1 раствор, 1 М) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 100 определений.

Нормативные показатели. В норме концентрация фибриногена составляет 2,0-4,0 г/л.

Квик-Фг-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для выполнения протромбинового времени и определения концентрации фибриногена гравиметрически (по Рутберг).

См. также выше раздел «Протромбиновое время»

Фибрин-мономер (маркер тромбинемии)

РФМК-тест

Назначение. Набор реагентов РФМК-тест предназначен для количественного определения в плазме крови растворимого фибрина или растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), яв-

ляющихся маркерами внутрисосудистого свертывания крови при тромбозах, тромбоземболиях, ДВС-синдромах различного генеза с помощью фенантролинового реагента. В отличие от этанолового и протаминсульфатного тестов фенантролиновая проба, благодаря количественному выражению результатов и простоте постановки, позволяет проводить динамический контроль за содержанием РФМК в плазме по ходу заболевания и в процессе лечения.

Принцип метода. Основан на определении времени появления в плазме зерен (паракоагулята) фибрина после добавления к ней раствора фенантролина. Это время тем короче, чем выше концентрация в плазме РФМК. Время выполнения теста - около 3 мин.

Состав набора. 1. О-фенантролина гидрохлорид - 2 фл. (в планшетном варианте набора реактив расфасован в 96 лунках планшета). 2. Контроль-минус (лиофилизированная плазма человека, не содержащая РФМК), - 1 фл. 3. Контроль-плюс (лиофилизированная плазма человека, содержащая РФМК), - 1 фл.

Набор рассчитан на 200 определений.

Примечание. Два варианта комплектации набора РФМК-тест предусмотрены для лабораторий с разной диагностической нагрузкой. Планшетный вариант позволяет использовать набор на протяжении всего срока его хранения (24 мес). При фасовке фенантролина во флаконах, время использования набора - до 1,5 мес.

Нормативные показатели. В норме содержание РФМК в плазме составляет 3,0-4,0 мг/100 мл.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АНТИКОАГУЛЯНТЫ

Экспресс-Антитромбин-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для оценки снижения гепарин-кофакторной активности антитромбина III (ПАТ - плазменного антитромбина) при диагностике врожденного или приобретенного дефицита этого антикоагулянта, выявлении ДВС-синдрома и контроля за его лечением с применением гепарина и препаратов плазмы крови. Определение проводят на коагулометре или мануально.

Состав набора. 1. Тромбин человека (активность 100 НИН ед) - 1 фл. 2. Контрольная плазма лиофильно высушенная (для построения калибровки) - 1 фл. 3. Фибриноген человека (лиофильно высу-

шенный) - 6 фл. 4. Растворитель для тромбина (концентрированный 10:1 раствор) - 1 фл. 5. Буфер для разведения плазмы (концентрированный 25:1 раствор) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 120 определений.

Нормативные показатели. В норме активность ПАТ по данному методу составляет 80-120%.

Антитромбин-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для оценки снижения прогрессивной активности антитромбина III (ПАТ - плазменного антитромбина). Определение проводят на коагулометре или мануально.

Состав набора. 1. Тромбин человека (активность 500 NIH ед) - 1 фл. 2. Стандарт-плазма лиофильно высушенная (для построения калибровки) - 1 фл. 3. Сорбент гепарина (Гепасорб-1) - 1 фл. 4. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 100 определений.

Нормативные показатели. В норме активность ПАТ по данному методу составляет 85-115%.

ХромоТех-антитромбин

Назначение. Набор реагентов предназначен для определения количества (в процентах от нормы) плазменного антитромбина (ПАТ), на основе гидролиза хромогенного субстрата (по двухточечному методу).

Состав набора. 1. Тромбин человека (активность 500 NIH ед) - 1 фл. 2. Контрольная плазма с известным содержанием ПАТ (лиофильно высушенная) - 1 фл. 3. Хромогенный субстрат (лиофильно высушенный) - 1 фл. 4. Растворитель для тромбина - 1 фл. 5. Буфер для разведения плазмы (трис-НСI, 0,1 М), содержащий гепарин - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 30-300 определений (в зависимости от объема измерительной кюветы), измерение проводится при длине волны 405 нм.

Нормативные показатели. В норме активность ПАТ по данному методу составляет 75-125%.

Гепарин-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для определения тромбин-гепаринового времени свертывания (ТГВС) при оценке чувствительности тромбинового времени свертывания к гепарину.

Состав набора. 1. Тромбин человека (активность 500 NIH ед) - 1 фл. 2. Гепарин (сухой) - 1 фл. 3. Буфер трис-HCl (концентрированный 20:1 раствор, 1 M) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 100 определений (в зависимости от объема измерительной кюветы).

Нормативные показатели. В норме активность ПАТ по данному методу составляет 75-125%.

Парус-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для скрининга нарушений в системе протеина С. Тест определяет сочетанный или изолированный дефицит протеинов С, S, а также резистентность V фактора к протеину С.

Принцип метода. Определяют АПТВ до и после внесения в плазму активатора протеина С. Определение проводят на коагулометре или мануально.

Состав набора. 1. Активатор протеина С (лиофилизированный) - 2 фл. 2. АПТВ-реагент (лиофилизированная смесь фосфолипидов и эллаговой кислоты) - 2 фл. 3. Стандарт-плазма (лиофильно высушенная) - 2 фл. 4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 30-40 определений.

Нормативные показатели. При активации протеина С АПТВ в норме удлинняется как минимум в 2,1 раза. Нарушения в системе протеина С сопровождаются более слабым удлинением АПТВ. Рассчитывается нормализованное отношение. НО в норме превышает 0,7. Все значения НО ниже 0,7 свидетельствуют о нарушениях в системе протеина С.

Фактор V-PC-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для определения резистентности фактора Va к активированному протеину С.

Принцип метода. В результате добавления активатора протеина С к смеси нормальной и дефицитной по фактору V плазмы, происходит удлинение времени свертывания в АПТВ. При резистентности фактора Va к действию протеина С (в смеси плазмы больного и дефицитной по фактору V плазмы) удлинение времени свертывания выражено в меньшей степени.

Определение проводят на коагулометре или мануально.

Состав набора. 1. Активатор протеина С (лиофилизированный) - 2 фл. 2. АПТВ-реагент (лиофилизированная смесь фосфолипидов и эллаговой кислоты) - 2 фл. 3. Стандарт-плазма (лиофильно высушенная) - 2 фл. 4. Дефицитная по фактору V плазма (лиофильно высушенная) - 4 фл. 5. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 30-40 определений.

Нормативные показатели. Рассчитывается нормализованное отношение (НО) по показаниям АПТВ в контроле и у больного. НО в норме превышает 0,8. Все значения НО ниже 0,8 свидетельствуют о резистентности фактора Va к активированному протеину С.

ВОЛЧАНОЧНЫЙ АНТИКОАГУЛЯНТ

Экспресс-Люпус-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для скрининга антикоагулянтов волчаночного типа (ВА или люпус-антикоагулянта).

Принцип метода. Определение ВА основано на сравнительной оценке в плазме больного АПТВ с двумя реагентами: высокочувствительным к ВА (АПТВ_{ВА+}) и низкочувствительным (АПТВ_{ВА-}). Наличие в плазме ВА ведет к сравнительно большему удлинению времени свертывания в тесте с АПТВ_{ВА+}, чем с АПТВ_{ВА-}-реагентом. Это различие не выявляется при других причинах удлинения свертывания в АПТВ-тесте. Определение проводят на коагулометре или мануально.

Состав набора. 1. АПТВ-реагент с высокой чувствительностью к ВА - 1 фл. 2. АПТВ-реагент с низкой чувствительностью к ВА - 2 фл. 3. Контрольная плазма, положительная на ВА (лиофильно высушенная) - 1 фл. 4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%) - 1 фл.

Набор рассчитан на исследование 50 образцов плазмы крови.

Люпус-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для выявления волчаночного антикоагулянта (ВА) по каолиновому времени бедной тромбоцитами плазмы, протромбиновому времени с разведенным тромбопластином и лебетоксовому тесту.

Состав набора. 1. Каолин (суспензия легкого каолина, 0,25 мг/мл) - 1 фл. 2. Тромбопластин (лиофильно высушенный), 1 г - 1 фл. 3. Лебетокс (высушенная фракция яда гюрзы) - 1 фл. 4. Тромбоцитин (лиофильно высушенный препарат отмытых и разрушенных тромбоцитов человека) - 2 фл. 5. Растворитель для тромбопластина и тромбоцитина (концентрированный 20:1 раствор) - 1 фл. 6. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%) - 1 фл.

Набор рассчитан на исследование 100 образцов плазмы крови.

ФИБРИНОЛИЗ

Экспресс-Фибринолиз-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для оценки состояния фибринолитической системы при диагностике и контроле за лечением тромбозов и ДВС-синдромов по следующим методикам: 1. Определение концентрации плазминогена. 2. Определение индекса антиплазминовой активности.

Состав набора. 1. Растворимый фибрин (лиофильно высушенный реагент из плазмы человека) - 4 фл. 2. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М) - 1 фл. 3. Стрептокиназа (лиофильно высушенная), 5000 МЕ - 2 фл. 4. Растворитель для стрептокиназы - 1 фл. 5. Стандартная плазма для построения калибровочной кривой (лиофильно высушенная) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 80 определений по одному из приведенных тестов или исследование 40 образцов плазмы крови по двум методикам.

Нормативные показатели. В норме концентрация плазминогена по данному методу составляет 85-115%, а индекс антиплазминовой активности - 70-120%.

Фибринолиз-тест

Назначение. Набор реагентов предназначен для исследования XIIIa-калликреин-зависимого, спонтанного и индуцированного эуглобулинового фибринолиза.

Состав набора. 1. Каолин (сухой) - 1 фл. 2. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М) - 1 фл. 3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М) - 1 фл. 4. Уксусная кислота (10% раствор) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 400 определений по одному из описанных тестов.

Примечание. Препараты стрептокиназы и тромбина, необходимые для оценки эуглобулинового лизиса, индуцируемого стрептокиназой, могут быть заказаны дополнительно.

Нормативные показатели. В норме время спонтанного эуглобулинового лизиса составляет 180-240 мин, XIIIa-калликреин-зависимого лизиса - 4-10 мин и индуцированного стрептокиназой эуглобулинового лизиса - 75-85 сек. Время спонтанного лизиса эуглобулинового сгустка после венозного стаза (наложения манжеты) укорачивается у здоровых людей в 1,5 - 2 раза.

ХромоТех-плазминоген

Назначение. Набор реагентов предназначен для определения количества (в процентах от нормы) основного компонента фибринолитической системы - плазминогена, на основе гидролиза хромогенного субстрата (по двухточечному методу). Определение плазминогена используют для диагностики ДВС-синдрома, тромбофилий, выявления нарушений фибринолиза; контроля лечения тромболитическими препаратами.

Состав набора. 1. Хромогенный субстрат (лиофильно высушенный) - 2 фл. 2. Стрептокиназа, 100.000 МЕ (лиофильно высушенная) - 2 фл. 3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1, 1 М) - 1 фл. 4. Контрольная плазма с известным содержанием плазминогена (лиофильно высушенная) - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение 30-300 определений (в зависимости от объема измерительной кюветы), измерение проводится при длине волны 405 нм.

Нормативные показатели. В норме концентрация плазми-

ногена составляет 75-140%.

Стрептокиназа

Назначение. Применяется для активации пламиногена в методах оценки фибринолитической активности. Комплект рассчитан ориентировочно на 150-200 определений.

Состав комплекта. 1. Стрептокиназа (5000 МЕ) - 1 фл. 2. Растворитель для стрептокиназы - 1 фл.

ФУНКЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ

Агрескрин-тест

Назначение. Агрескрин-тест предназначен для экспресс-оценки нарушений тромбоцитарного гемостаза. Использование набора позволяет определить визуально, имеются ли грубые нарушения содержания тромбоцитов и их агрегации.

Состав набора. 1. Универсальный индуктор агрегации - гемолизат эритроцитов (расфасован, высушен и герметизирован в 96 лунках планшета) - 1 планшет; 2. Стеклопалочка для размешивания - 1 шт.

Набор рассчитан на 500 определений. Планшетный вариант фасовки позволяет использовать набор на протяжении всего срока его хранения (18 мес).

Нормативные показатели. В норме время агрегации в плазме, определяемое на стекле, составляет 14-18 сек, при количестве тромбоцитов в крови 150-400^г/л.

АДФ

Назначение. Применяется в качестве индуктора агрегации тромбоцитов при записи агрегатограмм. Используется для диагностики врожденных и приобретенных нарушений тромбоцитарного гемостаза и контроля за действием антиагрегантов.

Состав комплекта. 1. АДФ (лиофильно высушенный) - 2 фл. 2. Растворитель для АДФ - 2 фл.

Адреналин

Назначение. Диагностика тромбоцитопатий и контроль за лечением дезагрегантами.

Состав комплекта. 1. Адреналин (эпинефрин) - 1 фл. темного стекла. 2. Растворитель для адреналина - 1 фл.

Коллаген

Назначение. Диагностика тромбоцитопатий.

Состав комплекта. 1. Коллаген (лиофильно высушенный) - 1 фл. 2. Растворитель для коллагена - 1 фл.

Ристомицин

Назначение. Применяется в качестве индуктора агглютинации тромбоцитов. Используется для диагностики врожденных и приобретенных нарушений тромбоцитарного гемостаза, обусловленных дефицитом фактора Виллебранда.

Состав комплекта. 1. Ристомицин (лиофильно высушенный) - 1 фл. 2. Растворитель для ристомицина - 1 фл.

Тромбоциты человека

Назначение. Применяются для диагностики болезни Виллебранда.

Состав комплекта. 1. Тромбоциты человека (лиофильно высушенные) - во фл.

КОНТРОЛЬНЫЕ ПЛАЗМЫ

РНП-плазма. Референтная нормальная пулированная плазма

Представляет собой смесь бедной тромбоцитами цитратной плазмы, полученной не менее, чем от 20 здоровых людей.

Назначение. Применяется для стандартизации биологических реактивов, использующихся в различных тестах при исследовании системы гемостаза, для получения контрольных результатов, а также при оценке качества анализов. РНП-плазма используется в каче-

стве контроля в следующих тестах: протромбиновое время, АПТВ, тромбиновое время, определение концентрации фибриногена (кинетический и гравиметрический метод).

Фасовка. Флакон содержит 1,0 мл лиофильно высушенной РНП-плазмы.

Патоплазма. Патологическая плазма

Представляет собой специально обработанную бедную тромбоцитами цитратную плазму.

Назначение. Применяется для проведения контроля качества анализов при исследовании системы гемостаза. Используется в следующих тестах: протромбиновое время, АПТВ, определение концентрации фибриногена (кинетический и гравиметрический метод).

Фасовка. Флакон содержит 2,0 мл лиофильно высушенной плазмы.

Дефицитная по фактору VIII плазма

Представляет собой плазму с уровнем фактора VIII не более 1% и с отсутствием ингибитора к нему.

Назначение. Применяется для определения уровня фактора VIII у больных при диагностике гемофилии А и болезни Виллебранда, контроле за эффективностью лечения криопреципитатом или концентратами фактора VIII.

Фасовка. Флакон содержит 1,0 мл лиофильно высушенной плазмы.

Плазма, резистентная к протеину С

Представляет собой плазму с резистентностью фактора Va к активированному протеину С.

Назначение. Применяется в качестве контрольного материала при определении нарушений в системе протеина С.

Фасовка. Флакон содержит 1,0 мл лиофильно высушенной плазмы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

Хлорид кальция

Назначение. Раствор хлорида кальция (0,277%) применяют в методах оценки времени свертывания стабилизированной цитратом плазмы крови (выполнении протромбинового теста, каолинового времени АПТВ и др.).

Фасовка. Флакон содержит 10 мл концентрированного (20:1, 5,54%) раствора хлорида кальция. При его разведении получают 200 мл 0,277% (0,025 М) раствора.

Трис-буфер

Назначение. Применяется в различных методах исследования системы гемостаза.

Фасовка. Флакон содержит буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл.

После разведения до объема 200 мл рабочий раствор буфера (0,05 М) имеет рН 7,3-7,4 при температуре +37°C.

Фибриноген человека

Назначение. Фибриноген является субстратом для тромбина. Реагент применяется в различных методах исследования системы гемостаза.

Фасовка. Флакон содержит лиофильно высушенный фибриноген, концентрация которого при разведении составляет 2,5-3,0 г/л. Концентрация коагулирующего белка не менее 90%.

Лебетокс

Назначение. Активатор фактора X. Применяется для дифференциальной диагностики дефицита факторов X, V, II, диагностики волчаночного антикоагулянта.

Фасовка. Флакон содержит коагулазу яда гюрзы. Рассчитан на 100 определений лебетоксового теста.

Эхитокс

Назначение. Активатор фактора II. Применяется для дифференциальной диагностики дефицита факторов X, V, II и фибриногена, выявления "скрытой" гиперкоагуляции, в т.ч. во время проведения гепаринотерапии и в III стадии ДВС-синдрома.

Фасовка. Флакон содержит коагулазу яда эфы. Рассчитан на 100 определений эхитоксового теста.

ГЕПАСОРБ

Назначение. Набор реагентов Гепасорб предназначен для проведения сорбции гепарина *in vitro* из плазмы крови больных, получающих этот антикоагулянт, с последующим определением в обработанной плазме АПТВ, протромбинового (ПВ) и тромбинового (ТВ) времени свертывания, прогрессивной активности антитромбина III (АТ III) и концентрации фибриногена.

Принцип метода. Основан на способности сорбентов связывать в плазме крови гепарин путем образования нерастворимого комплекса "сорбент-гепарин", который удаляется последующим центрифугированием. Сорбент Гепасорб-1 используется для удаления гепарина из плазмы только при определении ТВ, концентрации фибриногена и активности АТ III. Сорбент Гепасорб-2 применяется для удаления гепарина из плазмы только при оценке АПТВ и ПВ, а также при определении концентрации фибриногена. Время, затрачиваемое на сорбцию гепарина - около 10 мин.

Состав набора. 1. Сорбент Гепасорб-1, 1,0 г - 1 фл.; 2. Сорбент Гепасорб-2, 2,0 г - 1 фл.

Набор рассчитан на проведение сорбции гепарина каждым из сорбентов в 100 мл плазмы. Расход сорбентов на 1 мл плазмы: 10 мг реактива Гепасорб-1 или 20 мг реактива Гепасорб-2.

Цитрат натрия

Назначение. Применяется при получении и стабилизации крови для исследования системы гемостаза.

Фасовка. Флакон содержит лимоннокислый натрий 3-замещенный в расчете на 50 мл 3,8% раствора.

Силикон

Назначение. Применяется в виде 10% раствора в хлороформе для снижения контактной активности стекла лабораторной посуды.

Фасовка. Флакон содержит 10 мл силикона на 100 мл рабочего раствора.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААТ	- агрегационная активность тромбоцитов
АДФ	- аденозиндифосфат
АГГ	- антигемофильный глобулин
АКТ	- аутокоагуляционный тест
АНД	- антикоагулянты непрямого действия
АПТВ (АЧТВ)	- активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время
АТФ	- аденозинтрифосфат
АФА	- антифосфолипидные антитела
АФС	- антифосфолипидный синдром
БТП	- бедная тромбоцитами плазма
ВU	- единица Бетесда
ВА	- волчаночный антикоагулянт
ВМК	- высокомолекулярный кининоген
ГАТ	- гемолизат-агрегационный тест
ГКС	- гидролизат-кальциевая смесь
ГП	- гликопротеин
ДВС-синдром	- синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови
ИАП (РАI)	- ингибитор активации плазминогена
ИАТ	- индекс активации тромбоцитов
ИРП	- индекс резерва плазминогена
ИФА	- иммуноферментный анализ
КВ	- каолиновое время бедной тромбоцитами плазмы
МНО (INR)	- международное нормализованное отношение
МИЧ (ISI)	- международный индекс чувствительности тромбопластина
НМГ	- низкомолекулярные гепарины
ОА	- остаточная активность

ПАТ	- плазменный антитромбин
ПДФ	- продукты деградации фибриногена
ПВ	- протромбиновое время
ПО	- протромбиновое отношение
ПСТ	- протамин-сульфатный тест
ПФМ	- плазменные фосфолипидные мембраны
PIVKA	- некарбоксилированные и нефункционирующие формы витамин К-зависимых факторов свертывания крови
РФМК	- растворимые фибрин-мономерные комплексы
ТВ	- тромбиновое время
ТСС	- тест склеивания стафилококков
ТПА	- тканевой активатор плазминогена
ТФ	- тканевой фактор
ТФPI	- ингибитор тканевого пути свертывания
ТЭЛА	- тромбоэмболия легочной артерии
Фг	- фибриноген
ФВ (VIII:ФВ)	- фактор Виллебранда
ФСБР	- фосфатно-солевой буферный раствор
ФТ	- орто-фенантролиновый тест
ЭДТА	- этилендиамин тетрауксусная кислота
ЭТ	- этаноловый тест

Представляет в России двух- и четырехканальный
коагулометры CD-2 и CD-4



- все возможные коагулометрические тесты
- четырехкратная экономия реагентов и плазмы
- результаты могут быть рассчитаны в любых единицах
- данные калибровки сохраняются в памяти микропроцессора

Представительство ДияМед АГ (Швейцария): ДияМед-Восток

107370 Москва, Бойцовая, 27, офис 322 т/ф (095) 169-01-27
(095) 196-01-83

Фракси парин®

(НАДРОПАРИН
КАЛЬЦИЯ)



**Лечение
тромбоза
глубоких вен**

**Эффективный контроль и лечение
тромбоэмболических осложнений**

**Более безопасный, чем
нефракционированный гепарин**

Удобство и простота в применении

**Наиболее изученный низкомолекулярный
гепарин в практике российских врачей**



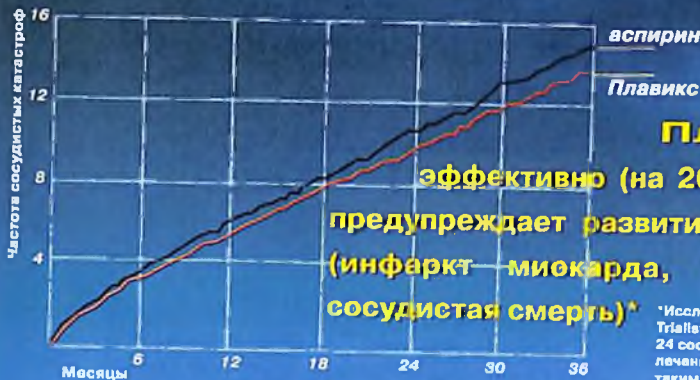
sanofi

103045 Москва
Последний переулок, 23/3
Телефон: (095) 721-14-00
Факс: (095) 721-14-11

ПРОРЫВ В АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ

Плавикс®

КЛОПИДОГРЕЛЬ БИСУЛЬФАТ



Плавикс
эффективно (на 26% больше чем аспирин)
предупреждает развитие сосудистых катастроф
(инфаркт миокарда, ишемический инсульт,
сосудистая смерть)*

*Исследование CAPRIE и мета-анализ Antiplatelet Trialists Collaboration: Плавикс предупреждает 24 сосудистых осложнения на 1000 пациентов, леченных в течение года, в то время как аспирин – 19; таким образом различие составляет 26%.



ПРОМИКС

поставка
сервис
консультации

все для лабораторий

ГЕМОСТАЗ

БИОХИМИЯ

ИФА

ПЦР

КЛИНИЧЕСКАЯ
ЛАБОРАТОРИЯ

БАКЛАБОРАТОРИЯ

1- и 2-канальные
коагулометры серии
THROMBOSTAT

1-, 2-, 4-канальные
коагулометры серии
THROMBOTIMER

4-канальные
коагулометры серии
COAGULOMETER CL

Автоматические
коагулометры серии
THROMBOLYZER

Определение показателей:

- время рекальсификации
- активированное время рекальсификации
- кефалиновое время
- АПТВ
- тромбиновое время
- протромбиновое время
- уровень фибриногена
- факторы I, II, III, IV, VII, VIII, IX, X, XI, XII

Надежное оборудование от

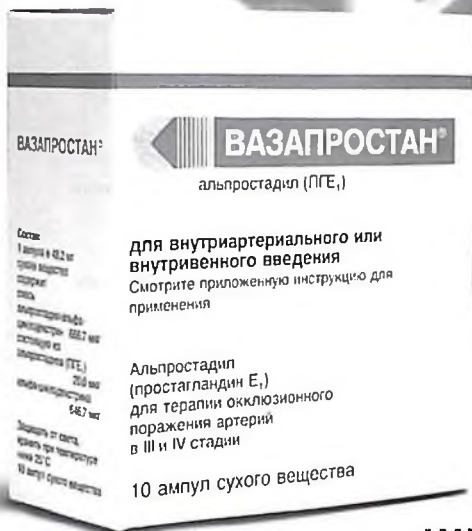
ВЕНК ELEKTRONIK

доступные цены и
сервисную поддержку
гарантирует **ПРОМИКС**

ВЕ
Венк Elektronik

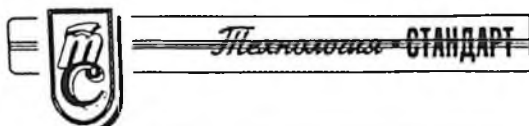
Т/ф: (3832) 36-01-66, 32-80-26, 32-28-53
630117 Новосибирск, а/я 197, Ул. Арбузова, 6
Поликлиника, оф. 4-6, ООО "ПРОМИКС".
www.promix.ru E-mail: promix@promix.ru
Лицензия № 42/99-584-0689

ДЛЯ ТЕРАПИИ ОККЛЮЗИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ АРТЕРИЙ



ШВАРЦ
ФАРМА

Москва 119048 ул. Усачева, д. 33/2, стр. 5
Тел.: 933-02-82 (многоканальный). Факс: 933-02-83



ФИРМА "ТЕХНОЛОГИЯ-СТАНДАРТ" (Барнаул) специализируется на изготовлении и поставке реагентов и наборов для оценки системы гемостаза. Постоянно в ассортименте более 40 наименований продукции.

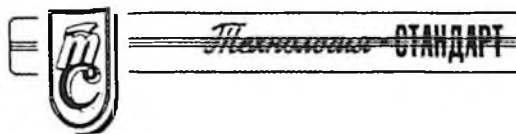
ВЫПУСКАЕМЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ НАБОРЫ

Метод исследования/Тест-система

- АПТВ (АЧТВ) / АПТВ-тест
- Тромбиновый тест/ Тромбо-тест
- Протромбиновый тест/ Техпластин-тест
- Содержание фибриногена/ Фибриноген-тест
- Определение растворимого фибрина (РФМК)/ РФМК-тест
- Определение антитромбина III/ Антитромбин-тест
- Скрининг нарушений в системе протеина С/ Парус-тест
- Определение резистентности фактора V к активированному протеину С/ Фактор V-PC-тест
- Определение волчаночного антикоагулянта/ Люпус-тест
- Набор сорбентов для исследования гепаринизированной плазмы крови/ ГЕПА-СОРБ
- Исследование XIII-зависимого фибринолиза/ Фибринолиз-тест
- Определение плазминогена (на основе использования хромогенного субстрата)/ ХромоТех-Плазминоген
- Экспресс-оценка функции тромбоцитов/ Агрескрин-тест
- Определение индуцированной агрегации тромбоцитов/ АДФ, коллаген, адреналин, ристомицин
- Реагенты для контроля качества анализов/ нормальная и патологическая плазмы
- Прочие реагенты/ стрептокиназа, эхитокс, лебетокс, трис-буфер, цитрат натрия, хлорид кальция и др.

Особенности производимых наборов

- ✓ наиболее широкий в России и странах СНГ спектр отечественной продукции для оценки патологии гемостаза;
- ✓ возможность использования любого набора на протяжении олительного срока;
- ✓ обеспечение продукции справочными и методическими материалами;
- ✓ широкая апробация в ведущих клиниках и лабораториях России.
- ✓ конкурентноспособные цены при высоком качестве продукции;
- ✓ возможность выбора наборов с необходимым количеством определений;
- ✓ адаптация к имеющимся на рынке коагулометрам и агрегометрам (фирм МЕЛТ, ЮНИМЕД, БИОЛА, МИЦАР, СОЛАР, Behnk Elektronik, DiaMed, Organon Teknika, Amelung, Hospitex, Chrono-log, Helena;



**N
E
W**

С 2001 года организован выпуск следующих оригинальных наборов, предназначенных для экспресс-диагностики:

- Набор для определения антитромбина III (упрощенный коагулометрический вариант);
- Набор для определения антитромбина III (на основе использования оригинального хромогенного субстрата);
- Набор для определения волчаночного антикоагулянта (упрощенный скрининговый вариант);
- Набор для оценки состояния фибринолитической системы (плазминоген, активность антиплазминов, состояния гиперфибринолиза);
- Набор для диагностики дисфибриногенемий и других нарушений конечного этапа свертывания.

Более подробную информацию можно получить по адресу:

656055 Россия, г. Барнаул, а/я 3603.

тел. : (385-2) 36-44-57, 26-06-53;

т/факс: (385-2) 26-68-68, 36-44-57.

E-mail: standart@ab.ru

Web-страница: <http://www.ab.ru/~standart>

Комфортное дозирование с высокой точностью

- Легкие пипетки уменьшают усталость лаборанта
- Уникальный механизм удалителя наконечников уменьшает прилагаемые усилия для удаления наконечника на 50 %
- Прекрасная конструкция повышает эффективность работы, особенно с многоканальными пипетками

Пипетки Finnpipe[®] - Ваш надежный партнер для дозирования жидких реагентов

Пипетки Finnpipe Digital объединяют в себе эргономический дизайн, прекрасные характеристики и высокое качество исполнения, что помогает достигать наилучших результатов в современных лабораториях.

Усовершенствованная эргономическая конструкция для лабораторий, выполняющих большое количество рутинных операций
Модель Finnpipe Digital имеет усовершенствованную эргономику пипетки для современных лабораторий, выполняющих большое количество рутинных исследований, что уменьшает напряжение и стресс при работе. Округлая рукоятка, модифицированный захват и большой дисплей обеспечивают более высокий комфорт и эффективность.

Другие преимущества пипеток Finnpipe Digital

- **Механизм супервыталкивания**
Механизм супервыталкивания в каждой пипетке Finnpipe Digital гарантирует высокую точность дозирования микрообъемов.
- **Отдельный удалитель наконечника**
Отдельное расположение удалителя наконечников от поршня защищает от случайного удаления наконечника.
- **Полностью автоклавируемые пипетки для абсолютной стерильности**
Абсолютная стерильность и отсутствие перекрестной контаминации гарантируется.

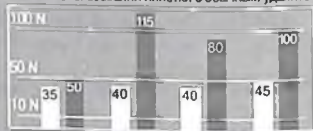
Thermo Labsystems

ЗАО «Термо Лабсистемс»
198095, г. Санкт-Петербург,
ул. Швецова, 41
Тел.: (812) 325 8045, 252 3411
Факс: (812) 186 1194
E-mail: mailbox.spb@thermobio.com

Представительство Thermo Labsystems
117275, г. Москва,
ул. Профсоюзная, 57, оф. 714
Тел.: (095) 755 9045, 332 0768
Факс: (095) 755 9046
E-mail: labsystems.moscow@thermobio.com



□ Усилие, необходимое для удаления наконечника, при использовании пипетки Finnpipe Digital
■ Усилие, необходимое для удаления наконечника, при использовании пипетки с обычным удалителем наконечника



1-кан. пипетка 200 мкл
8-кан. пипетка 300 мкл
12-кан. пипетка 300 мкл
1-кан. пипетка 10 мкл

Прекрасная эффективность для многоканальных пипеток

Усовершенствованный передаточный механизм уменьшает усилие, необходимое для удаления наконечников, на 50 %. Это особенно повышает эффективность при использовании многоканальных пипеток.



ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
Альфа Вассерман, Италия

ВЕССЕЛ ДУЭ Ф[®]

сулодексид

**Эффективное лечение и профилактика
заболеваний сосудов, связанных с
повышенным риском тромбообразования**

защита / восстановление
функции и целостности
эндотелия

регуляция / улучшение
реологических свойств крови
снижение фибриногена и
триглицеридов

предупреждение тромбоза
на артериальном и венозном
уровнях



VESSEL

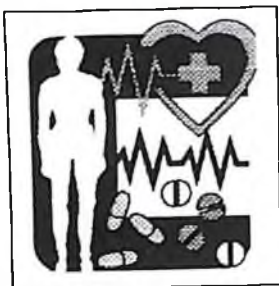
DUE F[®]

Sulodexide

CSL LTD
"Си Эс Си" Лтд.

г. Москва, Каширское ш., 24
Дом Ученых ОНЦ РАМН, 2 этаж, к. А
Тел.: (095) 324-9230, 324-9640
Факс: (095) 324-9140, 324-5508

г. Санкт-Петербург
Малоохтинский пр-т, 92
Тел.: (812) 444-0143
Факс: (812) 444-2036



ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ

«НПО «МедиоЛаб»

ПРОИЗВОДИТ РЕАКТИВЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСТАЗА

Коагуляционный гемостаз

- Протромбиновое время
- АЧТВ
- Тромбиновое время
- Фибриноген
- РФМК

Физиологические антикоагулянты

- Антитромбин III (фотометрический набор)
- Протеин С (фотометрический набор)

Фибринолитическая активность крови

- D-димер

Контрольные материалы

- Контрольная нормальная плазма
- «Квик-плазма» - набор плазм для калибровки протромбинового времени

ПРЕДЛАГАЕТ К ПРОДАЖЕ

- Все виды тромбоцитарных агрегометров фирм «Солар», «Биола», «Chropolog» (США)
- Полуавтоматические и автоматические коагулометры производства фирмы «Behnk Elektronik» (Германия)
- Отечественные двухканальные коагулометры
- Приборы для исследования физических свойств крови (Россия)
- Электролитные анализаторы производства фирмы «MEDICA» (США) (по низким ценам)

Оборудование для аптек и фармацевтической промышленности фирмы «SANYO» (Япония)

- морозильники -35-85°С объемами от 138 до 700 л
- холодильники для хранения лекарственных препаратов и препаратов крови
- CO₂-инкубаторы, сухожаровые шкафы
- камеры ускоренного старения лекарств (фармацевтическая стабильность)

125124, г. Москва, ул. Правды, д. 8, корп. 45,
Телефон/факс: 945-42-08, 945-42-09. E-mail: medio@caravan.ru



А/О ЮНИМЕД

ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРИБОРЫ И РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА



ЛАЗЕРНЫЙ АНАЛИЗАТОР
АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ
БИОЛА



АНАЛИЗАТОР
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОСТАЗА
МИНИЛАБ 701

А/О ЮНИМЕД ☒ 129301 Москва, ул. Касаткина, 3
☎ Тел.: (095) 935-8650 (многоканальный)
Факс: (095) 187-3840
☐ E-mail: office@unimedao.ru <http://www.unimedao.ru>

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВАС

ISBN 5-88107-043-7



9 785881 070434 >