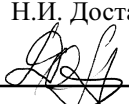


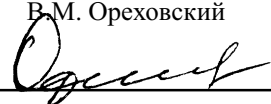
**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

СОГЛАСОВАНО  
Начальник отдела  
науки и внедрения  
Н.И. Доста

  
\_\_\_\_\_  
14 апреля 1999 г.

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель  
министра здравоохранения  
В.М. Ореховский

  
\_\_\_\_\_  
15 апреля 1999 г.  
Регистрационный № 91-9807

**ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПЛАЗМЕННОЙ И КЛЕТОЧНОЙ КОАГУЛЯЦИИ,  
КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ДИФФЕРЕНЦИРОВАННАЯ  
ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ДВС-СИНДРОМА ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ**

**Минск 1999**

**Учреждение-разработчик:** НИИ гематологии и переливания крови МЗ РБ (НИИ ГПК)

**Авторы:** канд. мед. наук В.Е. Иванов, Т.Н. Башманова, К.В. Сальников, проф. Е.П. Иванов, канд. мед. наук В.М. Кучук

**Рецензент:** канд. мед. наук Д.Г. Цвирго

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

## ВВЕДЕНИЕ

Геморрагические и тромботические осложнения, чаще всего связанные с тромбоцитопенией и внутрисосудистым диссеминированным свертыванием крови, осложняют течение гемобластозов и до сих пор нередко определяют исход заболевания.

Острые лейкозы являются клональными системными заболеваниями, характеризующимися неконтролируемой пролиферацией клеток-предшественников гемопоэза. Клинические проявления острого лейкоза являются следствием пролиферации и накопления злокачественных бластных клеток, количественно превышающих условный пороговый рубеж (более 100 млрд), за которым истощаются компенсаторные возможности организма. Основной клинической симптоматики острого лейкоза служат процессы гиперплазии опухолевой ткани (бластная трансформация костного мозга, увеличение лимфатических узлов и паренхиматозных органов, появление опухолевых инфильтратов и т.д.) и признаки подавления нормального кроветворения (анемия, гранулоцитопения, тромбоцитопения).

Как острые, так и хронические лейкозы, в различных своих вариантах, чаще всего сопровождаются развитием диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) крови. Независимо от основной нозологии в патогенезе и развитии ДВС-синдрома имеют значение:

- повреждение эндотелия сосудов;
- внутрисосудистая агрегация тромбоцитов;
- активация свертывания крови (экзогенная и эндогенная);
- истощение системы естественных антикоагулянтов;
- снижение фибринолитической активности;
- относительный избыток ингибиторов фибринолитической активности.

По данным лаборатории клинической гематологии НИИ ГПК (1998), тромбо-геморрагические проявления в 15–80% случаев осложняют течение острых и хронических лейкозов. Среди причин смерти больных острыми лейкозами они составляют 30–95% в зависимости от формы и стадии процесса, а также вида проводимого лечения.

При острых лейкозах диссеминированная активация свертывающего звена гемостаза в большинстве случаев происходит в результате поступления в кровоток прокоагулянтных субстанций из поврежденных тканей (в частности, лейкозных клеток). Длительное сохранение нарушенного баланса между продукцией и потреблением свертывающих факторов в дальнейшем приводит к неизбежному снижению их уровня и развитию кровоточивости. Вместе с тем, почти одновременно происходит активация фибринолитической системы, которая носит защитный характер и направлена против тромботического повреждения системы микроциркуляции и развития тромбогеморрагической дисфункции многих органов и тканей. Факторами риска для развития тромбогеморрагических осложнений также являются лечение цитостатическими препаратами, поражение печени и септическая инфекция.

Клинические проявления и течение, степень тяжести, прогноз и исходы ДВС крови отличаются огромным разнообразием и зависят от механизмов и причин его развития, а также от течения основного заболевания. Различают острую и хроническую; компенсированную и декомпенсированную; латентную, окклюзионно-тромботическую, тромбгеморрагическую и геморрагическую формы ДВС. Однако, несмотря на многообразие и индивидуальность клинических и биохимических изменений, развитие ДВС крови обуславливает закономерное появление определенных клинико-лабораторных синдромов. Результаты экспериментальных и клинических исследований доказано, что развитие ДВС крови укладывается в четыре гемостазиологические фазы (стадии): гиперкоагуляционная, гипер-гипокоагуляционная, гипокоагуляционная и нормокоагуляционная (нормо-гиперкоагуляционная).

Характерными особенностями ДВС-синдрома при острых лейкозах являются: преимущественно острая форма, бурное течение, преобладание геморрагических проявлений, быстрый переход в третью (гипокоагуляционную) фазу.

Поскольку клинические симптомы дисбаланса системы гемостаза наиболее ярко проявляются в III стадии ДВС-синдрома, часто трудно или практически невозможно установить момент начала повышения интенсивности свертывания крови. Это позволяет предполагать, что ДВС встречается значительно чаще, чем регистрируется. Поэтому необходимо разрабатывать новые, общедоступные методы определения состояния компонентов системы свертывания крови, раскрывать диагностическую значимость отдельных лабораторных тестов нарушения системы гемостаза. Многие аспекты ДВС-синдрома, в частности его патогенеза, недостаточно исследованы. В этой связи актуальными представляются вопросы раннего выявления, прогнозирования и патогенетически обоснованной профилактики и коррекции этих осложнений.

В настоящее время в Республике Беларусь начато широкое внедрение автоматических и полуавтоматических гематологических коагулологических и агрегатометрических анализаторов: отечественного коагулометра CGL 2110 и агрегометра AP 2110 (ЗАО «СОЛАР», г. Минск), «FIBRINTIMER» (BEHRING, Германия), «Cormay» (Франция) и др. Эти приборы основаны на турбидиметрическом методе и пригодны для определения всех тестов, заканчивающихся образованием фибринового сгустка.

Для выполнения гемостазиологических тестов на гемокоагулометрах используются стандартные тест-системы, что дает возможность максимально снизить неизбежные технические ошибки, возникающие при ручном исследовании, облегчить и ускорить воспроизведение методов и стандартизировать их.

Поскольку при остром развитии ДВС-синдрома необходим скрининг самых быстрых и достоверных методов, позволяющих в ургентном порядке выявить нарушения гемостаза и своевременно применить патогенетическую терапию, наряду с рутинными методиками, разработанными в 60–70-х гг., целесообразно использовать аппаратные методы исследования коагулологических показателей.

Ниже приведены наиболее информативные тесты, необходимые для выявления нарушений гемостаза при

острых лейкозах, выполнение которых было налажено и стандартизировано в лаборатории клинической гематологии НИИ ГПК в 1997–1998 гг. параллельно на коагулометрах CGL 2110 «СОЛАР» и «FIBRINTIMER» (BEHRING).

## ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

### 1. Определение количества тромбоцитов и гематокрита

Для подсчета тромбоцитов и гематокрита использовался гематологический анализатор «Sysmex» (NE-7000) и «Coulter» (Gen-S, STKS, MAXM), результаты которых тесно коррелировали с данными, полученными при определении количества тромбоцитов по Brecher (1953 г.) с использованием фазово-контрастной приставки и в мазке периферической крови. Причем, данные были высокодостоверны как при нормальном количестве тромбоцитов, так и при тромбоцитопении различной степени тяжести. Кроме того, эти приборы позволили анализировать ряд новых параметров тромбоцитов (MPV, PDW, Pct), которые имеют существенное значение в диагностике.

### 2. Определение уровня фактора Виллебранда в плазме

Основная роль фактора Виллебранда реализуется в реакциях сосудисто-тромбоцитарного взаимодействия на стадиях адгезии и агрегации тромбоцитов, а также в качестве белка-носителя для фактора VIII, обеспечивая ему стабильность в кровотоке и доставку в нужной концентрации к месту повреждения. Фактор Виллебранда является важнейшим маркером альтерации эндотелия и состояния микроциркуляторного гемостаза.

#### 2.1. Определение активности плазменного и тромбоцитарного фактора Виллебранда по ристомицин-агрегации тромбоцитов

Исследования агрегационных свойств тромбоцитов проводились на отечественном агрегометре AP 2110 «СОЛАР».

Принцип метода: основывается на способности антибиотика ристомицина при наличии на мембране тромбоцитов специфических гликопротеиновых рецепторов (ГП Ib-IX) в присутствии фактора Виллебранда вызывать агрегацию тромбоцитов.

Процесс агрегации, индуцируемый добавлением к богатой тромбоцитами исследуемой плазме стандартного количества ристомицина, регистрируется фотометрически по падению ее оптической плотности.

Используются следующие концентрации ристомицина: 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,5 мг/мл. При использовании ристомицина (антибиотика, продуцируемого *Proactinomyces fructiferi* var. *Ristomycini*) минимальная агрегирующая доза (МАД) для здоровых людей — 0,8 мг/мл (существуют данные, что при использовании более активного ристоцетина (продуцируемого *Actinomyces nocardia lurida*) МАД — 0,7 мг/мл).

### Реагенты:

- плазма, богатая тромбоцитами;
- бестромбоцитная плазма;
- ристомидин (ристоцетин).

### Выполнение метода:

Приготовление исследуемой плазмы. Для исключения контактной активации тромбоцитов в работе используется только пластмассовая или силиконовая посуда (кюветы, пробирки, пипетки.) Вначале кровь центрифугируют на малых оборотах (15 мин при 100 g). При этом определяется богатая тромбоцитами плазма, которая отсасывается в пластмассовые пробирки. Затем оставшуюся кровь снова центрифугируют, но уже на более высоких оборотах (15 мин при 2000 g). Образующийся после повторного центрифугирования верхний слой является бестромбоцитной плазмой. Плазма, богатая тромбоцитами (ПБТ), используется для исследования их функциональной активности, бестромбоцитная плазма — для калибровки шкалы оптической плотности прибора и, при необходимости, для разведения ПБТ до стандартного содержания клеток, которое должно составлять  $200\text{--}250 \times 10^9/\text{л}$ . В случае низкого содержания тромбоцитов (менее  $200 \times 10^9/\text{л}$ ) результат исследования не является достоверным.

Работа агрегометра с ПЭВМ. Подготовить ПЭВМ к работе. Следует убедиться в том, что компьютер подключен к агрегометру кабелем (через разъем «RS 232» на задней панели агрегометра). Запустить на ПЭВМ программу анализа агрегационных свойств тромбоцитов AP.EXE согласно документации на программу. Последовательным нажатием кнопки «MODE» выбрать требуемый режим работы агрегометра (AP). Открыть крышку кюветного отделения и установить у него кювету с бестромбоцитной плазмой, закрыть крышку кюветного отделения и нажать кнопку «ZERO». После измерения коэффициента пропускания установленной плазмы в правой части индикатора появится значение 100,0. Вынуть из кюветного отделения кювету с бестромбоцитной плазмой и на ее место установить кювету с ПБТ, опустить в кювету магнитный якорь и закрыть крышку кюветного отделения. Нажать кнопку «START». Произвести запись спонтанной агрегации. При этом программа графически отображает этот процесс в окне графика на экране ПЭВМ. Открыть крышку кюветного отделения, добавить в кювету реагент (индуктор агрегации), закрыть крышку и еще раз нажать на кнопку «START». Срабатывание кнопки подтверждается звуковым сигналом. Программа начнет запись агрегации с выводом агрегационной кривой в окно графика на экране ПЭВМ.

Произвести запись кривой агрегации тромбоцитов. По окончании записи нажать кнопку «STOP» на агрегометре. После этого в программе можно распечатать произведенную запись агрегации и сохранить ее в базе данных.

Замечания по методу: основным недостатком является необходимость количества тромбоцитов у пациента не менее  $150 \times 10^9/\text{л}$ . Существуют методики концентрирования тромбоцитов, однако экспериментальные

исследования, проведенные в клинической лаборатории НИИ ГПК (15 доноров, 45 больных с тромбоцитопенией различной степени тяжести), доказали, что в процессе центрифугирования происходит значительное угнетение функциональной активности тромбоцитов (отсутствие реакции освобождения).

При тромбоцитопении можно использовать методику, основанную на измерении кофакторной активности ристомицина с применением стандартной тромбоцитарной суспензии.

## **2.2. Определение активности фактора Виллебранда в плазме по активности кофактора ристомицина**

Свойство тромбоцитов агрегировать при добавлении ристомицина находится в линейной зависимости от логарифма плазменной концентрации фактора Виллебранда.

### Реагенты:

- стандартная бестромбоцитная плазма (смесь не менее 5 донорских бестромбоцитных плазм);
- исследуемая бестромбоцитная плазма (источник фактора Виллебранда);
- стандартная тромбоцитарная суспензия;
- раствор для хранения (0,2 г ЭДТА, 8,5 г NaCl, 1,0 г азида натрия, до 1000 мл дистиллированной воды);
- ристомицин (ристоцетин).

### Выполнение метода:

Приготовление стандартной тромбоцитарной суспензии: из донорской крови, стабилизированной ЭДТА-формалиновым раствором, готовится бестромбоцитарная плазма; полученный после ее удаления тромбоцитарный осадок дважды отмывается ЭДТА-буферным раствором, pH-7,4 и ресуспендируется в растворе для хранения.

Исследуемую бестромбоцитарную плазму смешивают со стандартной суспензией тромбоцитов до получения концентрации  $200\text{--}250 \times 10^9/\text{л}$ . К полученной смеси добавляют ристомицин (в конечной концентрации 1,0 мг/мл) и измеряют агрегацию тромбоцитов по трем основным показателям (скорость, степень, время агрегации). По калибровочному графику находят активность фактора Виллебранда (%) в плазме, при этом нормальные значения должны быть отработаны внутри каждой лаборатории с учетом используемых реагентов и оборудования.

## **2.3. Определение плазменного уровня фактора Виллебранда методом ELISA (энзимсвязанный иммуносорбентный анализ)**

Для определения использовался «Accerachrom» (Diagnostica Stago, France) — набор иммуноферментного анализа для количественного определения фактора Виллебранда.

Принцип метода: определение основано на принципе «сэндвич»: способности связывать фактор Виллебранда фиксированными на полистироловой поверхности специфическими кроличьими антителами к человеческому фактору Виллебранда. За первой инкубацией следует связывание антител к фактору Виллебранда, конъюгированных с пероксидазой, со свободно циркулирующим антигеном фактора Виллебранда. Затем

определяют активность связанных с пероксидазой антител, используя способность пероксидазы расщеплять хромогенный субстрат дихлорид орто-фенилендиамина в присутствии перекиси водорода.

#### Реагенты:

- реагент 1: алюминиевые пакеты, содержащие 2 полистирольные пластины с 16 лунками с фиксированными специфическими кроличьими антителами к  $F(ab')_2$  — фрагментам человеческого фактора Виллебранда (стабилизированные и герметично упакованные);
- реагент 2: специфические кроличьи антитела к человеческому ФВ, конъюгированные с пероксидазой (лиофильно высушенные и стабилизированные);
- реагент 3а: таблетка, содержащая 2 мг дихлорид орто-фенилендиамина (OPD, 2 HCl);
- реагент 3б: таблетка, содержащая 5 мг гидроперита как источника перекиси водорода. Перед употреблением 2 таблетки OPD и 2 таблетки гидроперита разводятся в 8 мл дистиллированной воды, смесь сохраняет стабильность в течение 1 ч при комнатной температуре;
- реагент 4: 10-х-концентрированный фосфатно-солевой буфер (PBS). Перед разведением 15 мин инкубируется при комнатной температуре, затем 6 мл разводится в 54 мл дистиллированной воды, хранится 2–8°C 15 дней;
- реагент 5: 20-х-концентрированный отмывающий раствор. Разводится 1:20 дистиллированной водой непосредственно перед использованием;
- реагент 6: лиофилизированная человеческая плазма, содержащая приблизительно 100% фактора Виллебранда (калибровочный реагент);
- реагент 7: лиофилизированная человеческая плазма, содержащая определенный уровень фактора Виллебранда (контрольный реагент).

#### Выполнение метода:

50 мкл исследуемой плазмы разводится в 2,5 мл 0,1 моль фосфатно-солевого буфера одновременно с контрольной плазмой — конечное разведение 1:51. Затем полученные разведения в пропорции 1:1 смешиваются с PBS до конечной концентрации 1:102, и по 200 мкл вносится в каждую лунку полистирольной микроплаты. 32-луночная микроплата (реагент 1) инкубируется 2 ч при комнатной температуре, затем производится пятикратная отмывка микроплаты разведенным отмывающим раствором (реагентом 5). Немедленно в соответствующие лунки вносится по 200 мкл реагента 2, предварительно разведенного в 8 мл PBS, и инкубируются при комнатной температуре 2 ч. Затем повторяется пятикратная отмывка микроплаты.

Немедленно в лунки микроплаты добавляется по 200 мкл смеси реагентов 3а и 3б и инкубируются точно 3 мин при комнатной температуре. Затем в каждую лунку вносится кислота, предпочтительнее 3 моль  $H_2SO_4$  50 мкл или 1 моль HCL 100 мкл. Через 10 мин оценивают оптический сигнал при 492 нм на ИФА-ридере. Затем по калибровочному графику находим соответствующее значение плазменного уровня фактора Виллебранда в процентах.



Нормальные показатели: 50–160%.

### **3. Панель тестов, адаптированная к отечественному коагулометру CGL 2110 «СОЛАР»**

#### **3.1. Определение активированного парциального тромбопластинового времени (по Саен) с использованием реактивов BEHRING**

Активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ) является самым чувствительным тестом для оценки внутреннего пути I фазы свертывания крови — протромбиназообразования. АПТВ чувствительно к изменению активности факторов внутренней системы активации (факторов VIII, IX, XI, XII и фактора Флетчера), хотя легкий недостаток (>20–30%) этих факторов на нем не отражается.

##### Принцип метода:

Определяется время свертывания рекальцифицированной плазмы в условиях фосфолипидной активации процесса кефалином. Добавление кефалина исключает нарушения свертываемости тромбоцитарного генеза за счет 3 тромбоцитарного фактора и делает тест особо чувствительным к дефициту плазменных факторов свертывания и к избытку в крови антикоагулянтов. Добавление каолина усиливает и стандартизирует в крови фазу контакта.

##### Реагенты:

- «Pathromtin» (BEHRING, Code No TXB) — парциальный тромбопластин (кефалин);
- суспензия каолина (BEHRING, Code No TXC );
- 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (BEHRING, Code No ORHO).

##### Выполнение метода:

В пробирке смешивают 0,1 мл исследуемой бестромбоцитной плазмы и 0,1 мл реагента «Pathromtin», предварительно разведенного в суспензии каолина (в количестве, указанном на этикетке). Смесь инкубируют 2 мин при 37°C, затем добавляют 0,1 мл раствора хлорида кальция и включают секундомер. Время образования сгустка является АПТВ исследуемой плазмы.

Нормальные показатели: 20–40 с.

#### **3.2. Определение протромбинового времени (по Quick) с использованием реактивов BEHRING**

Протромбиновое время является наиболее чувствительным тестом для оценки образования тромбина. Для получения нормальных результатов протромбинового времени необходимы все факторы I и II фаз свертывания крови, особенно факторы «протромбинового комплекса».

Принцип метода: при избытке тромбопластина с оптимальным содержанием кальция и фибриногена в плазме время образования сгустка зависит от активности факторов протромбинового комплекса (II, VII, IX, X). На

этом основании в реакционную смесь вводят тканевый тромбопластин и хлорид кальция. Источником факторов протромбинового комплекса служит исследуемая плазма. Если в ней снижена активность одного или нескольких факторов протромбинового комплекса, то время образования сгустка в плазме будет замедленно. Если же содержание факторов протромбинового комплекса достаточно для превращения протромбина в тромбин, действие последнего на фибриноген замедляется под влиянием антикоагулянтов (антипротромбинов), в основном гепарина, и при очень низком содержании фибриногена в плазме (ниже 1 г/л).

Реагенты:

- thromborel-S (BEHRING, pack for 8×2 ml, Code No. OUNP) — тканевой тромбопластин с избытком кальция;
- суспензия каолина.

Выполнение метода:

Перед исследованием определяют протромбиновое время стандартной плазмы (ПВ<sub>1</sub>). Для получения стандартной плазмы берут кровь 5 здоровых доноров, стабилизируют 3,8% цитратом натрия в соотношении 1 к 9, центрифугируют 15 мин при 3000 об./мин и смешивают полученную бестромбоцитную плазму. Протромбиновое время (ПВ<sub>2</sub>) стандартной плазмы принимается за 100%. Затем 0,1 мл исследуемой плазмы инкубируют 1 мин при 37°C. Через 1 мин добавляют 0,2 мл препарата thromborel-S, предварительно разведенного дистиллированной водой (для аппарата «FIBRINTIMER» — суспензией каолина) в количестве, указанном на этикетке. Время от момента добавления thromborel-S до образования сгустка соответствует протромбиновому времени и выражается в секундах.

Нормальные показатели: нормальное протромбиновое время должно быть в пределах 12–15 с. Протромбиновый индекс (ПТИ) плазмы вычисляют по формуле:

$$\text{ПТИ} = \text{ПВ}_1 / \text{ПВ}_2 \times 100 \%,$$

где ПВ<sub>1</sub> — протромбиновое время стандартной плазмы (плазмы здорового человека), ПВ<sub>2</sub> — протромбиновое время исследуемой плазмы.

Следует заметить, что ПВ стандартной плазмы определяют каждый раз перед работой с новой серией thromborel-S.

### **3.3. Метод определения уровня фибриногена А (по Clauss) с использованием реактивов BEHRING**

Реагенты:

- multifibren-U (BEHRING, pack for 10×2 ml, Code No. OWZG).

Выполнение метода:

0,1 мл исследуемой бестромбоцитной плазмы инкубируем 1 мин при 37°C в гемокоагулометре (BEHRING, «FIBRINTIMER»). Через 1 мин добавляем 0,2 мл препарата multifibren-U, предварительно разведенного дистиллированной водой в количестве, указанном на этикетке. Время от момента добавления multifibren-U до

образования сгустка соответствует тромбиновому времени и выражается в секундах. По калибровочной кривой находим соответствующее тромбиновому времени значение уровня фибриногена А в г/л.

Нормальные показатели: у здоровых людей концентрация фибриногена в плазме колеблется в пределах 2–4 г/л.

#### **3.4. Определение активности антитромбина III с использованием реактивов BEHRING**

Антитромбин III (АТ III) является мощным физиологическим антикоагулянтом. На долю АТ III приходится 75–90% антикоагулянтной активности, период полураспада — 2–3 сут. Синтезируется АТ III в печени и, частично, эндотелием. Действие АТ III усиливается его сосудистым кофактором — протеогепарансульфатом, а в клинических ситуациях — введенным пациенту гепарином. АТ III, связанный с поверхностью эндотелиальных клеток, блокирует активность тромбина, факторов IXa, Xa, XIa, XIIa, за исключением фактора VIIa, связанного в комплексе с тканевым фактором. На неактивированные факторы свертывания АТ III действия не оказывает.

##### Реагенты:

- test-kit (BEHRING, Code No. OSHS):  
antithrombin III Reagent,  
fibrinogen for AT III Reagent;
- трис-буфер, pH-8,0; (BEHRING, Code No. ORKM);
- ацетат-диэтилбарбитуратовый буфер, pH-7,6 (DBA) (BEHRING, Code No ORHW).

##### Выполнение метода:

Приготовление инкубационной смеси: к 0,2 мл исследуемой плазмы, разведенной трис-буфером в соотношении 1:50, добавляется 0,2 мл antithrombin III Reagent, предварительно разведенный дистиллированной водой в количестве, указанном на этикетке. Смесь инкубируется точно 4 мин при 37°C.

К 0,1 мл fibrinogen for AT III Reagent, предварительно разведенному дистиллированной водой, добавляют 0,2 мл DBA-буфера и инкубируют 2 мин при 37°C, затем вводят 0,1 мл инкубационной смеси. Регистрируют время образования сгустка.

Процентное содержание антитромбина III в исследуемой плазме определяется по калибровочной кривой, при этом нормальные значения должны быть отработаны внутри каждой лаборатории.

Нормальные показатели: 80–140%.

#### **3.5. Определение активности протеина С на основе АПТВ с использованием реактивов BEHRING**

Протеин С — витамин К-зависимый гликопротеин, который синтезируется в печени и циркулирует в крови в неактивном виде. Он состоит из тяжелой и легкой цепей, связанных между собой дисульфидной связью. Под действием сформированного на поверхности эндотелиальной клетки комплекса тромбин-тромбомодулин, неактивный протеин С трансформируется в активную форму. Активированный протеин С (АПС) действует как антикоагулянт через протеолиз факторов Va и VIIIa в присутствии своего кофактора протеина S и фосфолипидов. Уровень протеина С, являющегося витамин К-зависимым протеином с коротким периодом полужизни (6–8 ч), снижается раньше

других витамин К-зависимых факторов коагуляции. Это обуславливает транзиторную гиперкоагуляцию и повышение риска тромбообразования.

Принцип метода: для оценки функциональной активности протеина С может быть использован физиологический механизм его действия — инактивация факторов Va и VIIa. Протеин С исследуемой плазмы активируется под действием специфического активатора из яда змеи *Agkistrodon contortrix*. АПС инактивирует факторы Va и VIIa и удлинняет таким образом АПТВ. Избыток всех факторов, кроме протеина С, обеспечивается введением в тест-систему плазмы, дефицитной по протеину С. В таких условиях удлинение АПТВ зависит только от уровня протеина С. Следовательно, в тест-системе оценивается способность протеина С взаимодействовать с протеином S, фосфолипидами, факторами V, VIII и ионами кальция.

#### Реагенты:

- test-kit (BEHRING, Code No. OUUX):
  - protein C Activator — активатор протеина С;
  - neothromtin — каолин-кефалиновый реагент;
  - protein C Deficient Plasma — плазма, дефицитная по протеину С;
- имидазольный буфер (BEHRING, Code No. OQAA);
- 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (BEHRING, Code No. ORHO).

#### Выполнение метода:

К 0,1 мл исследуемой плазмы, разведенной имидазольным буфером в соотношении 1 к 9, добавляется 0,1 мл активатора протеина С, затем — 0,1 мл плазмы, дефицитной по протеину С, в конце — 0,1 мл каолин-кефалинового реагента. Смесь инкубируется 4 мин при 37°C, в нее вводится 0,1 мл хлорида кальция. Регистрируют время образования сгустка.

Процентное содержание протеина С в исследуемой плазме определяется по калибровочной кривой, при этом нормальные значения должны быть отработаны внутри каждой лаборатории.

#### Замечания по методу:

Существуют модификации метода, при которых стандартная и исследуемая плазма разводится не в буфере, а непосредственно в дефицитной по протеину С плазме. Это сокращает время исследования и устраняет влияние на результаты каких-либо других факторов гемокоагуляции в случае патологического снижения их в исследуемой плазме.

На результаты этого исследования могут влиять:

- в случае повышения уровня VIII фактора (повышающийся при беременности, острофазных реакциях, циррозе печени) результаты будут ложносниженными, и, наоборот, при наличии ингибитора к нему,
- такие же результаты будут в присутствии гепарина в плазме в дозе более 1 ЕД/мл.

Нормальные показатели: 70–140%.

### **3.6. Определение активности протеина S на основе АПТВ с использованием реактивов BEHRING**

Протеин S является кофактором, стимулирующим антикоагулянтную функцию протеина C. Образуя в присутствии кальция и фосфолипидной поверхности комплекс с АПС, он ускоряет протеолитическую инактивацию факторов Va и VIIIa. Протеин S — витамин K-зависимый белок, который в физиологических условиях циркулирует как в свободной форме, так и в форме связанного в комплекс с C4B протеином. Нормальное соотношение между этими двумя формами составляет 2:3.

Принцип метода: определение функциональной активности протеина S основано на его кофакторной активности, стимулирующей антикоагулянтное действие АПС.

#### Реагенты:

- test-kit (BEHRING, Code No. OQCE):
- protein Ca Reagent — физиологический субстрат активированного протеина C;
- protein S Starting Reagent — активатор из яда гадюки Russell;
- protein S Deficient Plasma — плазма, дефицитная по протеину S;
- 0,025 моль/л раствор хлорида кальция (BEHRING, Code No. ORHO).

#### Выполнение метода:

К 0,05 мл исследуемой плазмы, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1 к 4, добавляется 0,05 мл плазмы, дефицитной по протеину S, затем — 0,1 мл активированного протеина C. Смесь инкубируется 3 мин при 37°C, в нее вводится 0,25 мл Protein S Starting Reagent. Регистрируют время образования сгустка.

Процентное содержание протеина S в исследуемой плазме определяется по калибровочной кривой, при этом нормальные значения должны быть отработаны внутри каждой лаборатории.

Замечания по методу: ложно заниженные результаты могут быть получены при наличии в исследуемой плазме фактора Va, резистентного к АПС, при попадании остатков лейкоцитов и тромбоцитов в плазму, подвергавшуюся замораживанию.

Нормальные показатели: 70–123%.

### **4. Определение количества D-димеров**

D-димеры образуются при распаде поперечно-связанного фибрина под воздействием плазмина. Широко используется полуколичественное определение D-димеров с помощью латексных частиц в плазме, сыворотке и моче.

Для определения количества D-димеров использовался тест-набор FDP-Sidex Direct (BioMeerieux, France, Code No. 73101). В этом наборе моноклональные антитела к D-димеру связаны с латексными частичками и высокоспецифичны только к продуктам деградации фибрина, перекрестно связанного XIII-м фактором. Этот метод позволяет определять концентрации D-димеров, начиная с 500 нг/мл.

### Реактивы:

- фоновые (черные) пластины;
- реагент 1 — анти-D-димер латекс;
- реагент 2 — положительный контроль;
- реагент 3 — отрицательный контроль;
- реагент 4 — глициновый буфер, *pH*-8,2.

### Выполнение метода:

На фоновые пластины наносят по 30 мкл реагента 2, реагента 3 и исследуемой жидкости, затем добавляют по 1 капле реагента 1. В течение 2 мин медленно перемешивают пластиковыми одноразовыми палочками и оценивают результат. При отсутствии агглютинации в исследуемой жидкости — количество D-димеров в образце < 500 нг/мл. Если же агглютинация появилась, исследуемую жидкость разводят в буфере 1:1, добавляют реагент 1 и оценивают результат через 2 мин. При появлении агглютинации — количество D-димеров от 500 до 1000 нг/мл. При необходимости процедуру определения повторяют с разведениями 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и т.д.

Нормальные показатели: < 500 нг/мл.

## **ПАТОГЕНЕЗ, КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ДВС-СИНДРОМА ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ**

**(на модели острого промиелоцитарного лейкоза)**

Наиболее частой онкогематологической нозологией, связанной с тромбгеморрагическими осложнениями, является острый промиелоцитарный лейкоз, поэтому она была выбрана в качестве показательной модели. Затем по убыванию частоты встречаемости идут другие варианты острого миелобластного лейкоза: М4–М7 (с возрастанием зрелости бластных клеток — от миеломонобласта до мегакариобласта), М0–М2 и острый лимфобластный лейкоз (особенно Ph-позитивный).

Ретроспективный анализ клинико-лабораторных характеристик группы пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом (22 больных в период с 1994 по 1998 г.) позволил выявить общие закономерности течения ДВС-синдрома у этих больных и создать алгоритмы механизмов развития, лабораторной диагностики и дифференцированной терапии в зависимости от фазы заболевания.

В период от постановки диагноза до начала химиотерапии у большинства больных острым промиелоцитарным лейкозом мы наблюдали развитие I (гиперкоагуляционно-тромботической) фазы ДВС-синдрома. Основными патогенетическими механизмами развития ДВС в этот период являются: активация свертывания крови (экзогенная и эндогенная), повреждение эндотелия сосудов, внутрисосудистая агрегация тромбоцитов, истощение системы естественных антикоагулянтов (схема 1).

Одним из главных пусковых механизмов активации свертывающей системы крови при данном заболевании является повышенное содержание в незрелых формах миелоидного ряда и выброс в больших количествах в кровотоки прокоагулянтно активных веществ: тканевого тромбопластина, миелопероксидазы,  $\alpha$ -нафтилэстеразы, тканевого фактора, эластазы, катепсинов и др. Немаловажную роль играют цитокины (особенно, IL-1), бактериальные эндотоксины, вирусы и другие экзогенные факторы, появляющиеся в кровотоке при инфекционных осложнениях.

Под воздействием этих агентов и других патофизиологических стимулов (гипоксия, интоксикация) эндотелий, имеющий ряд антитромботических свойств, приобретает тромбогенные свойства. При его повреждении обнажаются субэндотелий, происходит экспрессия адгезивных белков и рецепторов на поверхности клеток, уменьшение генерации простациклина, эндотелина и снижение антиагрегационной активности тромбомодулина. В этой связи в кровотоке появляются маркеры альтерации эндотелия: увеличение плазменного уровня фактора Виллебранда, фактора VIII:C, тканевого тромбопластина, снижение уровня протеина S, антитромбина III, фибронектина и др.

Активация тромбоцитов в эту фазу обусловлена разрушением тромбоцитов, сопровождающимся секрецией агонистов агрегации. Механизмы увеличения агрегационной активности тромбоцитов включают также опухоль-индуцированную тромбиновую генерацию, гиперпродукцию АДФ и активацию метаболизма арахидоновой кислоты. Важную роль в развитии тромботической фазы при ДВС-синдроме играет воздействие растворимых фибрин-мономерных комплексов, провоцирующих освобождение из тромбоцитов АДФ.

У части больных на момент постановки диагноза выявляется специфическое метапластическое поражение печени, вследствие чего нарушается синтез витамин К-зависимых факторов свертывания, естественных антикоагулянтов (в основном, протеина С и S) и ингибиторов фибринолиза. Потребление антитромбина III на образование ТАТ-комплексов в эту фазу происходит в связи с выделением из бластных промиелоцитов гепариноподобных субстанций.

Поскольку активация системы гемостаза продолжается, гиперкоагуляционно-тромботическая фаза ДВС переходит в гипер-гипокоагуляционную, которая при своевременной адекватной коррекции вступает в гипер-нормокоагуляционную фазу. Основное ее отличие от I стадии — начинающееся потребление факторов коагуляции и прогрессирующая тромбоцитопеническая тромбоцитопатия (коагулопатия потребления).

В течение проведения курса стандартной полихимиотерапии (протокол «7+3») геморрагические проявления усиливаются, так как в результате массовой гибели клеток и цитостатического повреждения эндотелия происходит выброс в кровотоки большого количества гемостатически активных веществ: бластных протеаз, гепариноидов, активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типов, плазминогена.

Повреждение синтетической функции печени усугубляется воздействием химиопрепаратов, прогрессирует истощение гемокоагуляционной, плазминовой систем и естественных антикоагулянтов.

В этой фазе организм еще компенсирует потребляемые в процессе внутрисосудистого свертывания крови факторы свертывания и фибринолиза, и ДВС не всегда проявляется клинически. Именно в это время больной нуждается в ежедневном мониторинге гемостаза.

Своевременно диагностированная гипер-гипокоагуляционная стадия ДВС крови поддается коррекции, однако если процесс протекает остро или недостаточно интенсивно корригируется, фаза II переходит в III гемостазиологическую фазу.

III (гипокоагуляционная) стадия наряду с тяжелейшими нарушениями сосудисто-тромбоцитарного гемостаза отличается многофакторным повреждением плазменного звена. Течение ее усугубляется панцитопенией, наблюдающейся после проведения полихимиотерапии. В клинической картине в этот период доминирует полиорганная недостаточность. Если патологический процесс прогрессирует, декомпенсация гемостаза продолжает усугубляться и приводит к развитию поликомпонентной терминальной гемостазиопатии и летальному исходу.

При своевременном выявлении и проведении дифференцированной патогенетической терапии, восстановлении гемостатического потенциала процесс переходит нормо-гиперкоагуляционную или нормокоагуляционную фазу.

Механизмы развития тромбоцитопении в различные фазы заболевания (схема 2) также имеют некоторые различия: если на момент постановки диагноза тромбоцитопения имеет паранеопластический генез с возможным компонентом потребления или без него, то в постцитостатический период она связана с токсическим угнетением тромбоцитопоэза и повреждением эндотелия в комбинации с ДВС-синдромом.

Соответственно вышеописанной хронологической характеристике развития ДВС-синдрома нами на основе собственного опыта были разработаны варианты типичных гемостазиограмм, характерные для различных моментов времени: на момент установления диагноза (табл. 1), на момент проведения химиотерапии (табл. 2) и в период постцитостатической панцитопении или прогрессии заболевания (табл. 3).

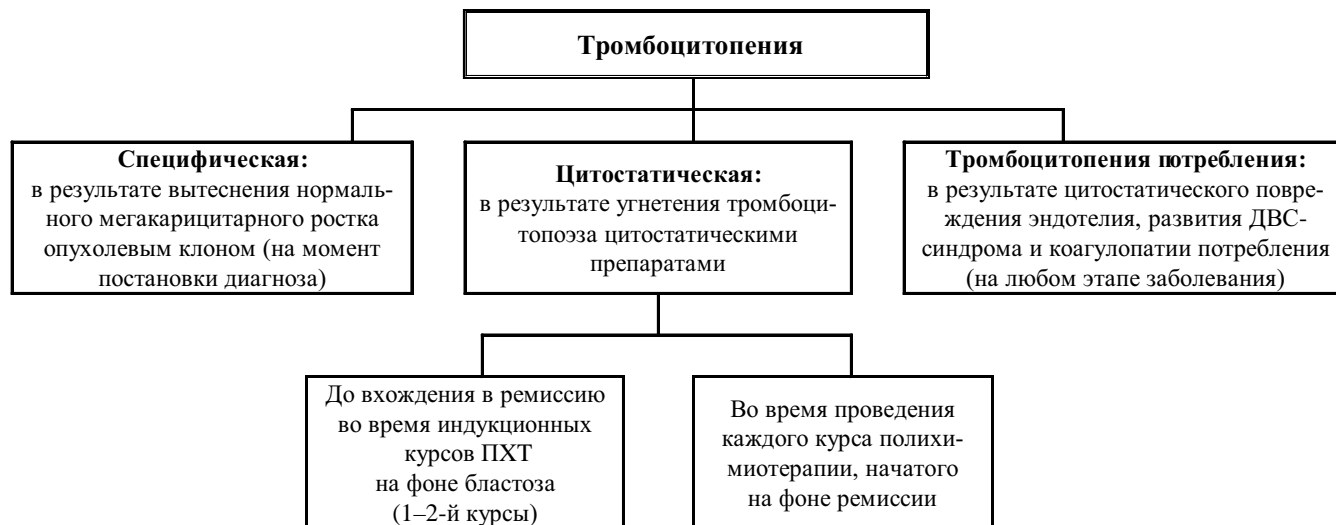
На схеме 3 представлен оптимальный алгоритм мониторинга системы гемостаза в процессе терапии острого лейкоза с наиболее целесообразной частотой проведения тестов.

На схеме 4 представлен алгоритм дифференцированной терапевтической коррекции системы гемостаза в зависимости от фаз заболевания.





*Схема 1. Этиопатогенетические механизмы развития ДВС-синдрома при остром промиелоцитарном лейкозе в зависимости от фазы заболевания*



*Схема 2. Механизмы развития тромбоцитопении при остром промиелоцитарном лейкозе в зависимости от фазы заболевания*

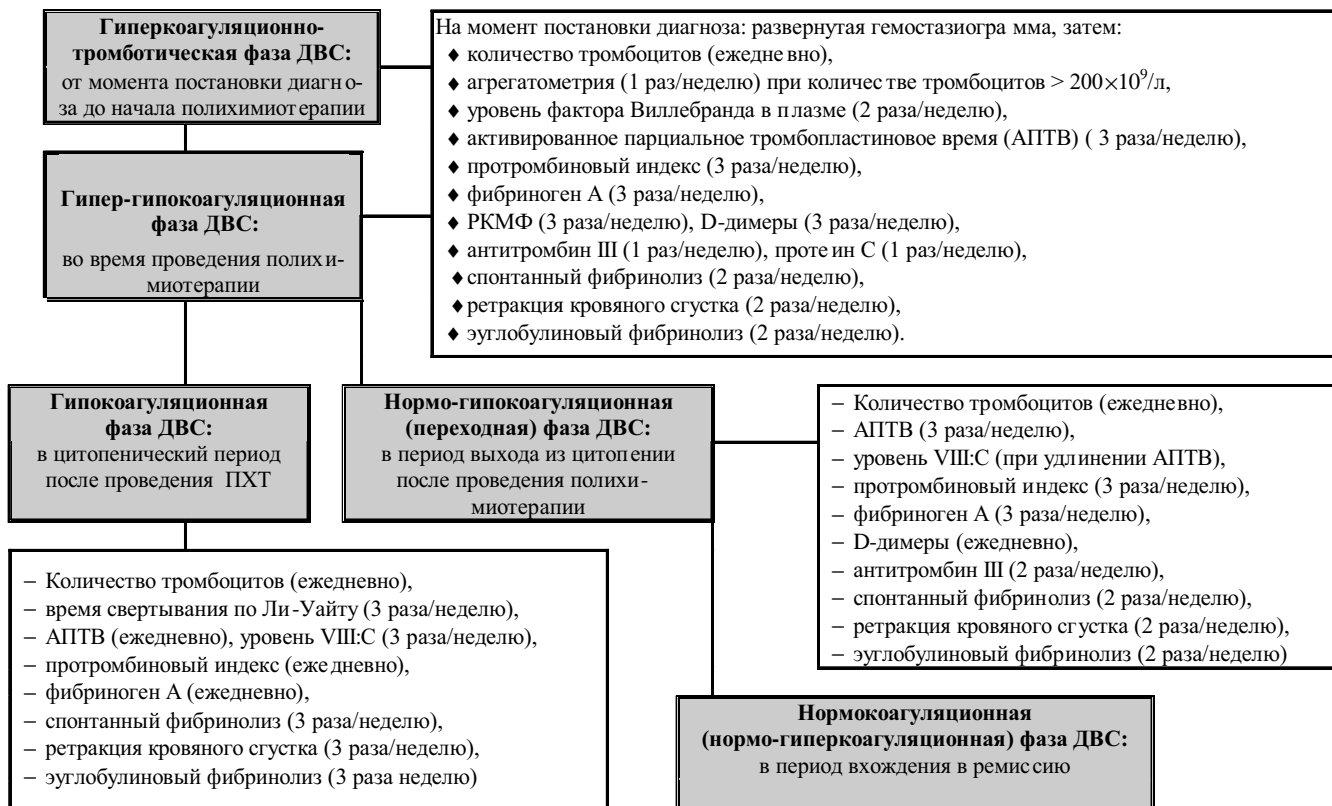


Схема 3. Лабораторная диагностика ДВС-синдрома при остром промиелоцитарном лейкозе в зависимости от фазы заболевания

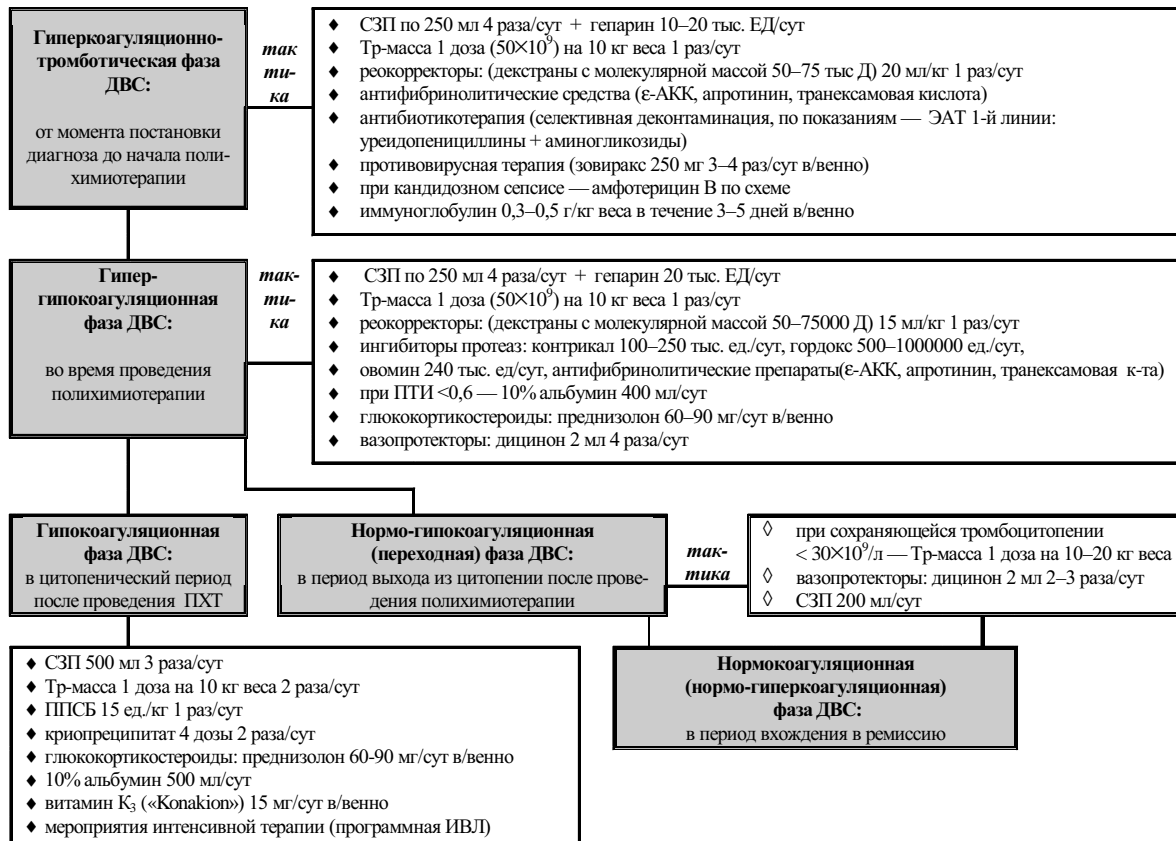


Схема 4. Коррекция ДВС-синдрома при остром промиелоцитарном лейкозе в зависимости от фазы заболевания

Таблица 1

*Типичная гемостазиограмма на момент установления диагноза: Острый промиелоцитарный лейкоз*

Гемостазиологические тесты	Норма	Типичные показатели	Патогенетические механизмы
1	2	3	4
Количество тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	150–450	50 (30–100)	В 90% случаев наблюдается тромбоцитопения с выраженным геморрагическим синдромом вследствие вытеснения нормального мегакариоцитопоэза опухолевым клоном, потребления тромбоцитов.
Уровень фактора Виллебранда в плазме, %	70–160	130 (100–160)	Повышение секреции фактора Виллебранда: из телец Weibel-Palade эндотелиоцитов вследствие их альтерации и из плотных гранул при разрушении тромбоцитов.
Активированное парциальное тромбопластиновое время, с	35–45	31 (28–34)	Укорочение времени свертывания крови в результате высвобождения прокоагулянтно активных субстанций из бластных промиелоцитов и истощения антикоагулянтной системы.
Уровень VIII:C, %	50–200	150 % (120– 180)	Повышение секреции VIII фактора вследствие альтерации эндотелия, нарушения синтеза протеинов С и S.
Протромбиновый индекс	0,9–1,1	0,8 (0,7–0,9)	Тенденция к снижению ПТИ обусловлена потреблением факторов свертывания и снижением синтетической функции печени.

1	2	3	4
Фибриноген А, г/л	2–4	2,7 (0,8–5,7)	У большинства больных отмечается уменьшение уровня фибриногена А в результате его потребления, снижения синтетической функции печени и повышенной фибринолитической активности. При инфекционных осложнениях может встречаться повышение уровня фибриногена А.
Фибриноген В (РКМФ), г/л	0	1,6 (0–3,2)	Появление в кровотоке продуктов деградации фибриногена у большинства пациентов обусловлено повышенной фибринолитической активностью в результате высвобождения протеаз из бластных промиелоцитов.
D-димеры, нг/мл	< 500	>1000	
Антитромбин III, %	80–140	70 (50–90)	Потребление антитромбина III на образование ТАТ-комплексов (тромбин-антитромбин) при выделении гепариноподобных субстанций из промиелоцитов.
Протеин С, %	70–140	51 (48–54)	Снижение синтетической функции печени, потребление на инактивацию активных факторов свертывания (Va и VIIa).
Спонтанный фибринолиз, %	10–20	49 (34–64)	Активация фибринолиза промиелоцитарными протеазами.
Ретракция кровяного сгустка, %	60–80	79 (70–88)	На начальном этапе отмечается тенденция к увеличению ретракции кровяного сгустка вследствие выделения из активированных разрушающихся тромбоцитов тромбостенина (6-й тромбоцитарный фактор) и тромбоспондина (из α-гранул, моноцитов и макрофагов) с последующим снижением вследствие тромбоцитопении.
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	150–210	205 (180–230)	Активация с последующим резким угнетением из-за потребления плазминогена и относительного увеличения антиплазминов.

*Типичная гемостазиограмма на момент проведения химиотерапии при остром промиелоцитарном лейкозе*

Гемостазиологические тесты	Норма	Типичные показатели	Патогенетические механизмы
1	2	3	4
Количество тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	150–450	45 (10–80)	Тромбоцитопения с генерализованным геморрагическим синдромом вследствие угнетения количества и функций тромбоцитов цитостатиками, потребления, вызванного высвобождением биологически активных веществ при массивной гибели клеток.
Уровень фактора Виллебранда в плазме, %	70–160	125 (90–165)	Повышение секреции фактора Виллебранда: из телец Weible-Palade эндотелиоцитов вследствие их альтерации (в основном, под воздействием цитостатической терапии) и из плотных гранул при разрушении тромбоцитов.
Активированное парциальное тромбопластиновое время, с	35–45	42 (36–48)	В большинстве случаев отмечается удлинение времени свертывания крови в результате цитостатического угнетения синтетической функции печени и потребления факторов свертывания крови.
Уровень VIII:C, %	50–200	90 (70–110)	
Протромбиновый индекс	0,9–1,1	0,7 (0,6–0,8)	Снижение ПТИ на фоне полихимиотерапии обусловлено потреблением факторов свертывания и снижением синтетической функции печени.

1	2	3	4
Фибриноген А, г/л	2–4	2,2 (0,7–3,5)	У большинства отмечается уменьшение уровня фибриногена А в результате его потребления, снижения синтетической функции печени и повышенной секреции активаторов вторичного фибринолиза — плазминогена, активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типа.
Фибриноген В (РКМФ), г/л	0	1,4 (0–2,3)	Активация каскадных протеолитических реакций плазминовой системы (первичного и вторичного фибринолиза).
D-димеры, нг/мл	< 500	>1500	
Антитромбин III, %	80–140	68 (61–95)	Потребление антитромбина III на образование ТАТ-комплексов (тромбин-антитромбин) при выделении гепариноподобных субстанций из промиелоцитов, на инактивацию плазминовой системы.
Протеин С, %	70–140	62 (58–64)	Снижение синтетической функции печени, потребление на инактивацию факторов свертывания (Va и VIIa).
Спонтанный фибринолиз, %	10–20	41 (18–64)	Активация каскадных протеолитических реакций плазминовой системы (первичного и вторичного фибринолиза).
Ретракция кровяного сгустка, %	60–80	42 (9–74)	Отмечается тенденция к снижению ретракции кровяного сгустка вследствие антиполимеризационного действия ПДФ, угнетения адгезивно-агрегационных свойств тромбоцитов.
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	150–210	160 (140–180)	Угнетение из-за потребления плазминогена и относительного увеличения антиплазминов.



*Типичная гемостазиограмма в период постцитостатической панцитопении или прогрессии заболевания*

Гемостазиологические тесты	Норма	Типичные показатели	Патогенетические механизмы
Количество тромбоцитов, $\times 10^9$ л	150–450	< 20 (0–20)	Тромбоцитопения с генерализованным геморрагическим синдромом вследствие угнетения мегакариопоэза, количества и функций тромбоцитов цитостатической терапией, потребления при развитии постцитостатической тромбоцитической тромбоцитопенической микроангиопатии
Уровень фактора Виллебранда в плазме, %	70–160	55 (15–95)	Снижение уровня фактора Виллебранда вследствие истощения запасов в тельцах Weible-Palade эндотелиоцитов; угнетения синтеза вследствие глубокого повреждения эндотелия как эндогенными, так и экзогенными факторами (микротромбозы и некроз сосудистой стенки, цитостатические агенты, бактериальные и вирусные экзо- и эндотоксины)
Активированное парциальное тромбопластиновое время, с	35–45	48 (40–56)	Значительное удлинение времени свертывания крови в результате высвобождения прокоагулянтно активных субстанций из бластных промиелоцитов, цитостатического угнетения синтетической функции печени и потребления факторов свертывания
Уровень VIII С, %	50–200	63 (40–85)	
Протромбиновый индекс	0,9–1,1	0,65 (0,55–0,75)	Снижение ПТИ обусловлено снижением синтетической функции печени и потреблением факторов свертывания
Фибриноген А, г/л	2–4	2,2 (0,7–3,5)	У большинства пациентов отмечается уменьшение уровня фибриногена А в результате его потребления, снижения синтетической функции печени и повышенной фибринолитической активности
Фибриноген В (РКМФ), г/л	0	1,9 (0–2,3)	Обусловлено повышенной фибринолитической активностью, высвобождением протеаз из бластных промиелоцитов секреции активаторов фибринолиза эндотелием — плазминогена, активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типа
Д-димеры, нг/мл	< 500	> 1500	

Окончание таблицы

<b>Гемостазиологические тесты</b>	<b>Норма</b>	<b>Типичные показатели</b>	<b>Патогенетические механизмы</b>
Атитромбин III, %	80–120	70% (50–90%)	Потребление антитромбина III на образование ТАТ-комплексов (тромбин–антитромбин) при выделении гепариноподобных субстанций из промиелоцитов
Протеин С, %	70–140	71% (58–85%)	Снижение синтетической функции печени, потребление на инактивацию факторов свертывания (Va и VIIIa)
Спонтанный фибринолиз, %	10–20	49% (34–64%)	Активация фибринолиза промиелоцитарными протеазами, повреждение эндотелия, неконтролируемая активация каскадных протеолитических реакций плазминовой системы
Ретракция кровяного сгустка, %	60–80	79% (70–88%)	Снижение вследствие антиполимеризационного действия ПДФ, угнетения функциональных свойств тромбоцитов
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	150–210	238 (190–286)	Активация фибринолиза промиелоцитарными протеазами, повреждение эндотелия, потребления плазминогена и относительного избытка антиплазминов