

Хрестоматійні матеріали
з дисципліни «Методи скринінгових досліджень
гемостазу»
для студентів спеціальності 091 Біологія
освітньої програми «Лабораторна діагностика»
освітнього рівня «Магістр»

ЛЕКЦІЇ

Лекція 1.

Тема: Значення скринінгових методів дослідження гемостазу в діагностиці геморагічних захворювань.

В групу геморагічних захворювань об'єднані синдроми, основним проявом яких є підвищена кровоточивість, зумовлена розладами в системі гемостазу. Враховуючи генез кровоточивості, геморагічні захворювання прийнято ділити на три групи:

1. Коагулопатії (кровоточивість зумовлена розладами в системі зсідання крові або фібринолізу).
2. Тромбоцитопенії і тромбоцитопатії (причиною кровотеч є дефіцит або патологія тромбоцитів).
3. Вазопатії (геморагічні прояви, зв'язані з патологічними змінами будови і функції дрібних судин – артеріол, капілярів, венул).

Такий поділ є відносним, бо в багатьох випадках розлади гемостазу можуть бути зумовлені комбінацією вказаних механізмів (синдром дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові). В кожній з трьох груп виділяють:

1. Геморагічні захворювання спадкові.
2. Геморагічні захворювання набуті.

Коагулопатії, тромбоцитопенії та вазопатії відрізняються клінічною картиною і перебігом процесу. Різною є також лікувальна тактика при цих захворюваннях. При первинному зверненні хворої зокрема в ургентних випадках, важлива загальна орієнтаційна диференціальна діагностика геморагічного синдрому.

Суттєве значення має докладно зібраний анамнез. В першу чергу слід в'яснити початок захворювання та його тривалість. При спадкових геморагічних захворюваннях прояви кровоточивості можуть в'являтися відразу після народження або в ранньому дитинстві, також спостерігатись у рідні хворого. Набуті форми характеризуються нахилом до геморагій у більш пізньому віці. Важливо в'яснити можливий зв'язок виникнення геморагічного синдрому з перенесеними попередньо інфекційними захворюваннями, профілактичними щепленнями, що є характерним для імунних форм тромбоцитопенії. Необхідно також звернути увагу на прийом медикаментів, які можуть зумовити виникнення геморагічного синдрому.

Для диференціації геморагічного синдрому “*sui generis*” від симптоматичних форм важливо в'яснити наявність у хворого інших захворювань, які можуть супроводжуватись або ускладнюватись кровоточивістю.

В диференціальній діагностиці тромбоцитопеній та коагулопатій суттєве значення має характер геморагічних проявів.

Для патології мегакаріоцитарного апарату характерне виникнення на шкірі хворих дрібноточкових петехій та невеликих синяків, спонтанна кровоточивість зі слизових оболонок (носові кровотечі, кровотечі з ясен), а у жінок – рясні і тривалі менструації. Це – так званий “тромбоцитопенічний” або “мікроциркуляторний” тип кровоточивості.

Найчастішими проявами коагулопатій є виникнення обширних гематом, крововиливи в суглоби, тривалі кровотечі після порізів, травм, екстракції зуба, оперативного втручання. Такий тип кровоточивості відомий під назвою “гематомний”.

Точний діагноз геморагічного захворювання може бути встановлений тільки після проведення відповідних лабораторних досліджень.

Лабораторне обстеження хворого починається з проведення декількох простих скринінгових тестів, які можуть бути виконані в кожній лабораторії. В таблиці 6 представлені основні тести і патологія, при якій вони можуть бути порушені.

Аналіз і співставлення скринінгових методик може допомогти в первинній діагностиці геморагічних станів.

Знижена кількість тромбоцитів і продовжений час кровотечі характерні для тромбоцитопенії. Нормальна кількість тромбоцитів і продовжений час кровотечі спостерігаються при хворобі Віллебранда і деяких формах тромбоцитопатії.

При вялопатіях і деяких формах тромбоцитопатії, а також дефіциті фактора XIII, протейну Z і α_2 -антиплазміну скринінгові тести не виявляють відхилень від норми. В таких випадках з метою уточнення діагнозу проводиться ряд досліджень тромбоцитарного та коагуляційного гемостазу.

Таблиця 6. Скринінгові дослідження системи гемостазу і їх інтерпретація

Кількість тромбоцитів	Час кровотечі	Час зсідання крові	Активованій тромбопластиновий час	Протромбінний час плазми	Тромбінний час	Можлива патологія гемостазу
ЗН	П	Н	Н	Н	Н	Тромбоцитопенія
Н	П або Н	Н	Н	Н	Н	Тромбоцитопатія
Н	П	П або Н	П або Н	Н	Н	Хвороба v.Віллебранда
Н	Н	П або Н	П	Н	Н	Дефіцит факторів VIII, IX, XI, XII, дефіцит прекалікрейну або кініногену,
Н	Н	Н	Н	П	Н	Дефіцит фактора VII, комбінований дефіцит вітамін-К-залежних

Н	Н	П або Н	П	п	Н	Дефіцит факторів II, V, X, комбінований дефіцит вітамін-К-залежних факторів
Н	П або Н	П	П	п	П	Афібриногенемія, дисфібриногенемія

Примітка: Н – нормальний; П – подовжений; ЗН – знижена.

Коагулопатії – геморагічні синдроми, зумовлені порушеннями в системі зсідання крові. Ці порушення можуть бути спадковими або набутими.

Спадкові коагулопатії зумовлені дефіцитом одного з компонентів системи коагуляційного гемостазу, в основному, зменшенням синтезу або якісним дефектом в структурі одного з прокоагулянтів.

В групу спадкових коагулопатій об'єднані захворювання, причиною яких є генетично зумовлені порушення активності одного з прокоагулянтів. Зниження активності прокоагулянта може бути зумовлене кількісним зменшенням його синтезу або якісним дефектом в структурі білка даного фактора. При якісному дефекті в структурі протеїну прокоагулянта коагуляційна активність його низька, але сам фактор імунологічними методами виявляється. На основі позитивних імунологічних методів (cross-reacting material) ці випадки характеризують як CRM⁺. При неактивному результаті імунологічних досліджень (відсутність відповідного білка) – як CRM⁺ випадки.

Останнім часом доведено, що деякі відомі коагулопатії не є однорідним захворюванням. В окремих родинах зустрічаються різні молекулярні дефекти одного і того ж прокоагулянта. Найчастішою формою спадкових коагулопатій є гемофілія А. Далі по частоті виявлення – хвороба v.Віллебранда, гемофілія В, гіпопроконвертинемія. Інші форми спадкових коагулопатій спостерігаються дуже рідко.

Лекція 2.

Тема: Судинно-тромбоцитарний гемостаз.

СИСТЕМА ГЕМОСТАЗУ

У фізіологічних умовах система гемостазу забезпечує цілісність судинної стінки та рідкий стан крові в судинному руслі. При пошкодженні стінки судини ця система забезпечує місцеве зсідання крові, а пізніше лізислокалізованого тромбу,

Система гемостазу розглядається як трикомпонентна система:

1. Клітинні та гуморальні компоненти циркулюючої крові;
2. Компоненти судинної стінки;
3. Вазомоторика (G.Muller-Berghaus, 1997).

Ці компоненти між собою взаємозв'язані, в них чітко функціонують механізми позитивного і від'ємного зворотнього зв'язку. Особливо тісно зв'язані між собою інтіма судин і тромбоцити, у зв'язку з чим виникло поняття судинно-тромбоцитарний гемостаз, або первинний гемостаз. Судини і тромбоцити відіграють основну роль в початковій фазі гемостазу, тобто в зупинці кровотечі в зоні мікроциркуляції. Утворення фібринового згустка відбувається дещо пізніше, і тому характеризується як вторинний коагуляційний гемостаз.

ТРОМБОЦИТИ

Тромбоцити – без'ядерні клітини, фрагменти цитоплазми мегакаріоцитів. Неактивовані тромбоцити мають форму диску, діаметром 2,0-4,0 μm і товщиною 0,8-1,2 μm .

Тривалість життя тромбоцита у здорових індивідуумів коливається від 7 до 10 днів. У нормі 2/3 тромбоцитів циркулюють в крові, а 1/3 нагромаджується в селезінці (селезінковий “pooling”). Основним місцем руйнування тромбоцитів є селезінка і печінка, де вони елімінуються ретикуло-ендотеліальною системою (RES). Постійна втрата тромбоцитів компенсується їх утворенням, у зв'язку з чим проходить обмін тромбоцитів. У випадку підвищеного розпаду пластинок посилюється їх утворення.

При дослідженні за допомогою електронного мікроскопа в тромбоциті виділяють 4 регіони:

- зовнішня зона – клітинна мембрана. Зовнішня поверхня цівї мембрани утворена з глікокаліксу, що запобігає адгезії і агрегації тромбоцитів. Середній шар клітинної мембрани представлений фосфоліпідами, в яких розміщені глікопротеїни (GP), що мають властивості рецепторів адгезії та агрегації тромбоцитів. Важливою складовою частиною мембрани є арахідонова кислота, необхідна для синтезу простаноїдів.

- Sol-Gel-зона вміщує три волокнисті системи – субмембранні філяменти, мікротубулі і мікрофіляменти. Субмембранну скелетну систему утворюють спектрин, актин і актинзв'язуючий протеїн.

- зона органел складається з гранул нагромадження, мітохондрій і глікогену. Виділяють 4 типи гранул: α-гранули, δ-гранули, лі-зосоми і мікропероксисоми. α-гранули вміщують тромбоцитарний фактор 4, β-тромбоглобулін, фактор v.Віллебранда, фібро-нектин, вітронектин, тромбоспондін, фактор росту тромбоцитарного походження (PDGF), фактор V, фактор XI, фібриноген, високомолекулярний кініноген, інгібітор активатора плазміно-гену 1 (PAI-1). δ-гранули (у зв'язку з особливо щільним виглядом в електронному мікроскопі їх називають “щільними”) вміщують серотонін, аденілові нуклеотиди, пірофосфати і кальцій. Лізосоми вміщують кислі гідролази. **Мікропероксисоми** – каталази.

- внутрішня мембранна система. В ній виділяють 3 каналікулярні структури. Відкрита каналікулярна система зв'язується з позаклітинним простором через маленькі отвори на поверхні клітини, через які виділяються речовини, що звільняються з гранул нагромадження. Щільна система (DTS) є місцем синтезу простаноїдів.

Роль тромбоцитів у процесі гемостазу. В процесі гемостазу тромбоцити відіграють ряд важливих функцій: 1) підтримують нормальну структуру і функцію мікросудин, непроникливість судинної стінки для еритроцитів; 2) підтримують спазм судин при їх пошкодженні (завдяки виділенню вазоактивних речовин); 3) забезпечують утворення первинного тромбоцитарного тромбу при пошкодженні судин; 4) беруть участь у процесі зсідання крові (служать матрицею для активації прокоагулянтів, тобто прискорюють утворення тромбіну);

5) сприяють загоюванню ран (Б.И.Кузник, В.П.Скипетров, 1974; J.Vermylen і співавт., 1983).

При зниженні кількості тромбоцитів або порушенні їх функції, виникає геморагічний синдром. Значення тромбоцитів для збереження функції та непошкодженості судинної стінки, підтверджується клінічними спостереженнями. При зниженні кількості тромбоцитів менше “критичного числа” підвищується проникливість та ламкість судин, еритроцити виходять в позасудинний простір, що проявляється петехіями та синяками.

Взаємодія між тромбоцитами і ендотелієм є фактично фізіологічним бар'єром між циркулюючою кров'ю і субендотеліальним матраксом.

Тромбоцити забезпечують первинний гемостаз в зоні мікроциркуляції. Це також підтверджується клінічними спостереженнями: у хворих з виразною тромбоцитопенією і при деяких формах тромбоцитопатії значно здовжується час кровотечі (проба Дуке), а у хворих на гемофілію, тобто при значних розладах в системі зсідання крові, час кровотечі у нормі.

Тромбоцити забезпечують утворення первинного тромбоцитарного тромба. Здійснюється цей процес завдяки адгезивно-агрегаційній функції тромбоцитів. Після пошкодження судинної стінки тромбоцити контактують з колагеном, який є основним стимулятором адгезії. Активовані тромбоцити набрякають, утворюють псевдоподії, прикріплюються до субендотеліальних структур. Адгезія тромбоцитів на судинній стінці здійснюється при участі глікопротеїнових рецепторів (GP), розміщених на поверхні тромбоцита

(A.Nurden, J.Caen, 1975; M.Meyer, F.Herrmann, 1983) (рис. 1). В даний час їх ідентифіковано понад 50, але функціональне значення вивчене тільки у 10 (I.Connellan і співавт., 1983) (табл. 1).

GP Ia-комплекс утворює з GP IIa гетеродимерний комплекс і є рецептором до колагену. При відсутності GP Ia стимуляція колагеном не викликає агрегації тромбоцитів.

GP Ib-IX-комплекс. GP Ib є гетеродимером який складається з однієї α - і однієї β -субодиниць, зв'язаних дисульфідним мостиком, GP IX є одноланцюговим поліпептидом. Відома первинна структура GP Iba. В його N-термінальному відділі, знаходиться рецептор для фактора v.Віллебранда. GP Iba, відомий також як тромбоцитарний рецептор.

GP IIb-IIIa-комплекс GP IIb складається з однієї великої α -субодиниці і однієї маленької β -субодиниці, зв'язаних дисульфідним мостиком. GP IIIa є одноланцюговим поліпептидом. GP IIb і GP IIIa утворюють кальцій залежний комплекс, який відносять до родини рецепторів адгезії. GP IIb-IIIa комплекс представляє рецептори для фібриногену, фібронектину, вітронектину і ф. v.Віллебранда.

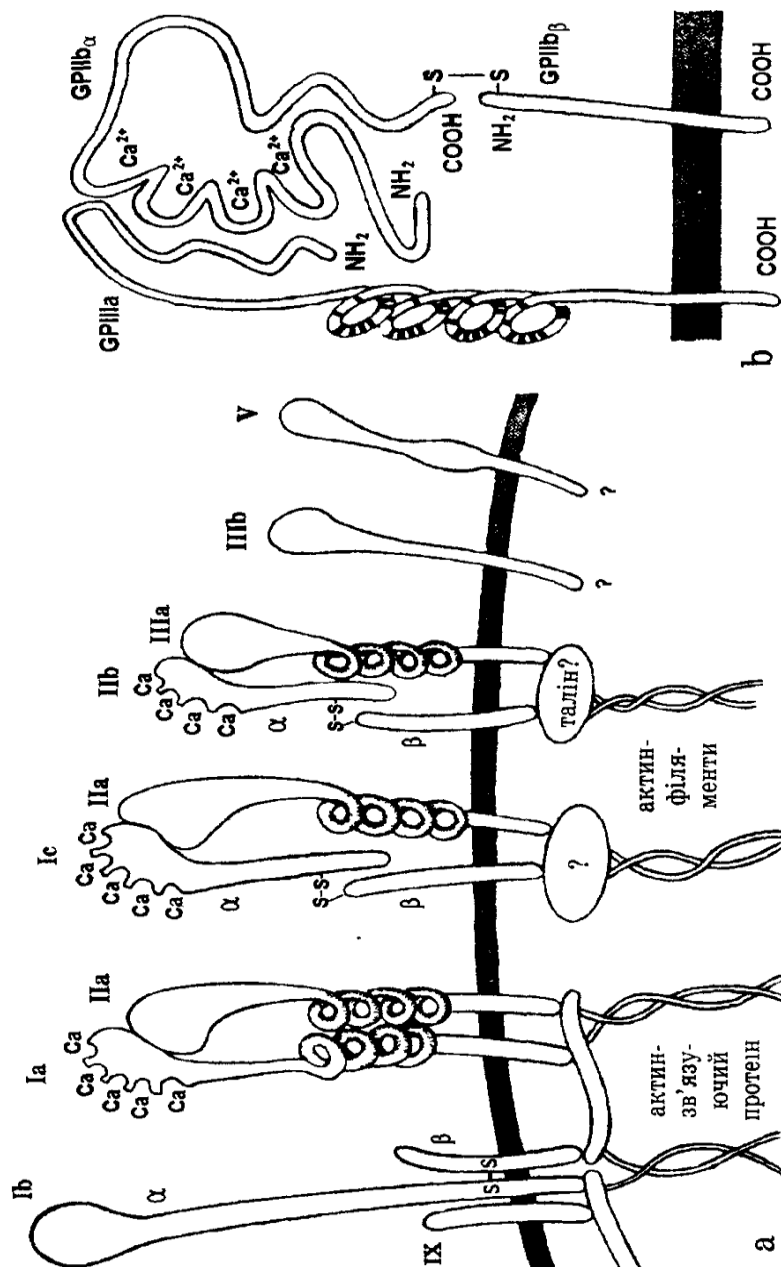


Рис. 1. Схематичне зображення основних глікопротеїнових рецепторів на мембрані тромбоцита. Представлені утворення комплексів між окремими аглікопротеїнами, дисульфідні зв'язки між під одиницями, що зв'язують кальцій, обмінна дія зі структурними протеїнами цитоскелету (а), комплекс GR IIb-IIIa (b)

Таблиця 1

Глікопротеїни тромбоцитарної мембрани (Fitzgerald, Phillips, 1989; Bennet, Shattil, 1990)

GP	CD	Утворення комплексів з:	Інтеракція з цитоскелетом	Функція
Ia	w49b-	Па	+	Колагеновий рецептор
Ib	42b	IX	+	Рецептор ф. v.Віллебранда
Ic	w49f 29	Па	+	Рецептор фібрoneктину
IIb	41	IIIa	+	Рецептор для фібриногену

IIIa	61	IIb	+	Рецептор для ф. v-Вілле-бранда, фібронектину і вітронектину
IV	36	–		Рецептор до тромбоспондину
V		–		Thrombinsubstrat.
IX	42a	Ib	+	Місця зв'язку для медикаментів, антитіл
GMP-140	62	–	–	Зв'язки для нейтрофільних гранулоцитів

Примітка: GP – глікопротеїн, GD – кластери диференціації, GMP – α -гранул мембранний протеїн.

Ці рецептори мають високий афінитет до адгезивних протеїнів субендотелію – колагену, фактора v.Віллебранда, фібриногену, вітронектину, можливо, також до фібронектину та тромбоспондину.

Комплекси GPIb-IX і GPIIb-IIIa мають особливе значення. Вроджений дефект цих комплексів проявляється важким геморагічним діатезом – синдром Бернарда-Сульє, тромбастенія Гланцмана (J.Саен і співавт., 1976).

Паралельно з адгезією відбувається агрегація тромбоцитів – склеювання тромбоцитів між собою. Агрегація зумовлена стимуляцією тромбоцитів відповідними агоністами. Агоністи діють на специфічні рецептори, розміщені на поверхні тромбоцитів і через низку біохімічних реакцій зумовлюють утворення агрегатів і секрецію вмісту тромбоцитарних гранул. Колаген і тромбін характеризуються як “сильні” агоністи тому, що можуть викликати звільнення вмісту гранул без попередньої агрегації. Рецептором для колагену є GP Ia.

Колаген може одночасно запускати агрегацію і секрецію. До тромбіну на поверхні тромбоцитів є декілька рецепторів, серед них GP Ib, можливо і GPV. Інші не ідентифіковані.

АДФ і адреналін характеризуються як “слабі” агоністи. Секреція вмісту гранул при стимуляції цими агоністами може здійснюватись тільки після попередньої агрегації. Адреналін зумовлює агрегацію тромбоцитів через специфічні α -адренергічні рецептори, розташовані на поверхні тромбоцитів. Активация тромбоцитів АДФ також здійснюється через специфічні рецептори.

Важливе значення в процесі агрегації відіграють ендogenous агоністи. Так, при активації тромбоцитів з фосфоліпідного депо звільняється арахідонова кислота. Під дією циклооксигенази з арахідо- ω нової кислоти утворюються циклічні ендопероксиди – простагландини (PGG_2 і PGH_2). З PGH_2 дією тромбосан-синтетази утворюється тромбосан A_2 (TXA_2), який є сильним агрегуючим і судинозвужуючим фактором. При порушенні синтезу тромбосану A_2 виникають розлади функціональної активності тромбоцитів, що клінічне проявляється схильністю до кровотеч (спадкові та набуті тромбоцитопатії).

Агрегація тромбоцитів здійснюється за допомогою GP IIb-IIIa рецептора, який виявляється тільки на тромбоцитах і мегакаріocyтах. Щільність цього

комплекса на тромбоцитах є дуже висока, але дія його Проявляється тільки на активованих тромбоцитах. GP IIb-IIIa комплекс може зв'язуватись з різними лігандами. Після стимуляції активований GP IIb-IIIa комплекс зв'язує фібриноген, який утворює міжтромбоцитарні мостики і таким чином здійснюється контакт тромбоцита з тромбоцитом, тобто агрегація. Агрегати тромбоцитів відкладаються на місці ураження судини і утворюють тромбоцитарний тромб.

Секреторна функція тромбоцитів. У відповідь на адекватне подразнення з гранул тромбоцитів, які пройшли агрегацію, звільняється їх вміст. Цей процес відомий раніше під назвою "реакція звільнення", представляє собою секреторну функцію тромбоцитів, яку слід відрізнити від фармакологічно зумовленого звільнення гранул. Секрецію вмісту гранул накопичення забезпечують контрактильні білки тромбоцитів, зокрема актин (раніше відомий під назвою тром-бостенін). Важливе значення при секреції вмісту гранул мають також мікроканальці.

В тромбоцитах виділяють 4 типи гранул: α -гранули, δ -гранули, лізосоми і мікропероксисоми. Їх вміст представлений на рис. 2.

Спочатку здійснюється секреція α - та δ -гранул. З α -гранул виділяється антигепариновий фактор 4, β -тромбоглобулін, фактор v.Віллебранда, інгібітор активатора плазміногену (PAI-1), мітоген-ний фактор, тромбоспондін та інші. Тромбоспондін після секреції з α -гранул може зв'язуватись на поверхні активованого тромбоцита і утворювати комплексний зв'язок з фібриногеном. Тромбоцитарний фактор 4 має виражену антигепаринову активність. β -тромбоглобулін має дуже слабу антигепаринову дію. Серед білків α -гранул важливе місце займає Тромбоцитарний фібриноген. Вважають, що фібриноген α -гранул тромбоцитів, як і деякі інші білки, є адсорбованим з плазми, хоча механізм цього явища не в'яснений (M.Podolak-Dawidziak, 1993).

З δ -гранул звільняється АДФ, адреналін, норадреналін, серотонін. Пізніше дегранулюють лізосоми, які вміщують лізосомальні ферменти.

Звільнені при секреції вмісту гранул нагромадження речовини посилюють агрегацію і сприяють росту тромбоцитарного тромба. Значення вмісту гранул для нормального перебігу процесу гемостазу підтверджується клінічними спостереженнями: спадкові та набуті дефекти пулу нагромадження супроводжуються геморагічними проявами (J.Caen і співавт., 1979; R.Hardisty і співавт., 1983; H.Holmsen, H.Weiss, 1972; H.Weiss і співавт., 1974; 1979).

Стабілізація тромбоцитарного тромба здійснюється завдяки включенню механізмів зсідання крові. Тромбін утворюється локально на поверхні стимульованих тромбоцитів і пошкоджених ендотеліальних клітин (внутрішній і зовнішній шлях активації системи зсідання крові).

Лекція 3.

Тема: Участь тромбоцитів в реалізації “внутрішнього шляху” зсідання крові.

Тромбоцити відіграють важливу роль в реалізації “внутрішнього” шляху зсідання крові. Фосфоліпіди мембрани тромбоцитів (фосфатидилхолін, фосфатидил-етаноламін, фосфатидилсерин, сфінгомієлін), відомі під назвою Тромбоцитарний фактор 3, розміщені на внутрішній поверхні оболонки клітин. Прокоагуляційну активність, в основному, мають фосфатидилсерин (PS) і фосфатидилетаноламін (PE). Механізми експозиції PS і PE на поверхні клітин виявлені не повністю. Не виявлений також механізм так званого “flip-flop” – переміщення PS і PE на поверхні клітини і участь у цьому процесі амінофосфоліпід транслокази.

Фосфоліпідна мембрана тромбоцитів є матрицею для активації факторів зсідання крові. На ній формується комплекс: фактори IXa-VIIIa-Ca²⁺-фосфоліпіди і протромбіназний комплекс: фактори Xa-Va-Ca -фосфоліпіди, завдяки чому значно прискішується утворення тромбіну. В сфері тромбоцитарного тромбу утворюється висока концентрація тромбіну, який переводить фібриноген у фібрин. Пронизування фібрином тромбоцитарного тромбу забезпечує його стабільність.

Тромбоцити беруть участь в ретракції згустка крові. При цьому контрактильні сили цитоскелету (Актomyosin) передаються на волокна фібрину, зв'язані з поверхнею тромбоцита через комплекс GP IIb-IIIa. У хворих з виразною тромбоцитопенією ретракція згустка крові відсутня.

У нормі тромбоутворення обмежується місцем пошкодження судини. Це досягається різними регуляторними механізмами, зокрема, тромбін активує антиагрегацію, антикоагулянтні і профібринолітичні процеси в інтактному ендотелію поряд з ураженням судини.

Таким чином, значення тромбоцитів у гемостатичному механізмі полягає в їх адгезії, агрегації, секреції і синтезі простагландинів та активації зсідання крові. Вказані процеси знаходяться під контролем регуляторних механізмів. Рівновага між активуючими і гальмуючими процесами здійснюється через позаклітинні сигнали після зв'язування медіатора зі своїм рецептором на поверхні тромбоцита. Ідентифіковані механізми активації і гальмування тромбоцитів?

В регуляції тромбоцитарного гемостазу значну роль відіграють простагландини (S.Monkada, J.Vane, 1979; G.Minno і співавт., 1979). Простагландини (PGG₂, PGH₂) утворюються з арахідонової кислоти під впливом циклооксигеназ. В судинній стінці під дією простагландин-синтетази з них утворюється основний інгібітор агрегації - простагландин (простагландин L₂, PGI₂). PGL₂, простагландин E₁, (PGE₁) і простагландин Dg (PGD₂) після інтерації зі своїм рецептором на поверхні тромбоцита запускають ряд біохімічних реакцій, в результаті чого з аденозинтрифосфату (АТФ) утворюється циклічний аденозин-монофосфат (сАМР). Підвищення

концентрації cAMP в тромбоцитах зумовлює гальмування всіх функцій активованих тромбоцитів.

Зниження синтезу простацикліну в судинній стінці зумовлює підвищену схильність тромбоцитів до агрегації, що сприяє тромбоутворенню.

Лекція 4.

Тема: Коагуляційний гемостаз.

КОАГУЛЯЦІЙНИЙ ГЕМОСТАЗ

Зсідання крові – це складний ферментний процес, в якому беруть участь ряд білків-протеаз і акцелераторів процесу. В основі зсідання лежить перехід розчинного білка фібриногену в нерозчинний фібрин, тобто утворення згустка крові.

Ферментний характер процесу вперше був доведений професором Тартуського університету Шмідтом у 1872 р., а в 1905 р. Р. Morawitz запропонував першу схему зсідання крові.

Пізніше встановлено, що для здійснення гемостазу необхідний ряд факторів зсідання крові, ізольований або комплексний дефіцит яких в клініці проявляється геморагічним діатезом. В 1962 р. Міжнародний комітет номенклатури факторів зсідання запропонував позначити їх римськими цифрами. Сьогодні виділяють 13 основних факторів зсідання крові – прокоагулянтів, які відрізняються між собою різними біохімічними та фізико-хімічними характеристиками (період піврозпаду, термостабільність, стабільність зберігання електрофоретична рухомість, молекулярна вага та інше). Перелік прокоагулянтів та їх характеристику ілюструє таблиця 2.

Синтез багатьох прокоагулянтів здійснюється в печінці. Фактор v. Вільбранда утворюється в стінці судин. Синтез факторів II, VII, IX, X, протеїнів C та S є залежним від вітаміну K. Вказані фактори знаходяться в плазмі в неактивній формі. В судинному руслі в результаті різних обмінних процесів вони використовуються і тому мають різний період піврозпаду. В процесі зсідання крові неактивні попередники факторів переходять в активні форми. Встановлено, що фактори II, VII, IX, X, XI, XII, калікреїноген та білок C є зимогенами серинових протеаз, а їх перехід в активні форми має характер обмеженого протеолізу (Е. Davie і співавт., 1979). Фактори V, VIII, високомолекулярний кініноген, білок S є кофакторами, які пришвидшують окремі етапи активації зсідання. Фібриноген, фактор V, фактор VIII під час зсідання крові зуживаються, а фактори VII, IX, X, XI, XII залишаються в сироватці.

У 1964 р. R. Mc Farlane і незалежно Davie і Ratnoff була запропонована так звана теорія “каскаду”, або “водоспаду”, активації зсідання крові, яка є основою сучасних поглядів на цей процес. Сучасна каскадно-комплексна теорія розглядає зсідання крові як багатоступеневий процес обмеженого протеолізу, в якому послідовно активуються і взаємодіють окремі фактори зсідання і їх комплекси (рис.3).

Виділяють два шляхи активації зсідання крові:

1. Внутрішній (intrinsic system).
2. Зовнішній (extrinsic system).

Внутрішній механізм активації зсідання починається з контакту активації фактора XII. При контакті з від’ємне зарядженою чужою рідною

поверхнею (in vivo – пошкоджений судинний ендотелій, колаген, сульфоновані гліколіпіди клітинних оболонок, активована поверхня тромбоцитів, кристали сечової кислоти; in vitro – скло, метал, каолін та інші) неактивний фактор XII підлягає конформації через відділення одного пептидного зв'язку утворюється дволанцюговий фактор α XIIa. Фактор α XIIa запускає каскад внутрішнього механізму зсідання крові, активуючи фактор XI, а також активує прекалікреїн. Пізніше від фактора α XIIa відділяється фрагмент Hf (Hage man factor fragment) або β XIIa. Останній має низьку здатність до активації зсідання і, в основному, активує фібриноліз та кініногенез.

Для активації зсідання при контакті з негативно зарядженої поверхнею необхідний фактор XII, XI, прекалікреїн і високомолекулярний кініноген (E.Erdos, 1979; A.Kaplan, 1978), хоча основну роль відіграє фактор XII. Він активує зсідання крові, фібриноліз та кініногенез, у зв'язку з чим фактор XII характеризують як універсальний активатор. Активація фактора XII може також здійснюватися шляхом ферментного розщеплення під дією різних протеаз, зокрема плазміну, калікреїну. Активний фактор XII переводить фактор XI і активну форму – XIa, а фактор XIa, в свою чергу, переводить неактивний фактор IX в активний – IXa. Активований фактор IXa зв'язується з фактором VIII, фосфоліпідами тромбоцитів і кальцієм і комплекс, який є прямим активатором фактора X, а фактор X активує перехід протромбіну в тромбін.

Активація зсідання є упорядкованим рядом реакцій, що відбуваються на поверхні клітин, завдяки розпізнаванню рецепторів вільними або зв'язаними з клітинними оболонками лігандами. За даними Д.М.Зубаїрова (1978, 1980) фосфоліпідні мембрани оболонок тромбоцитів та інших клітин відіграють роль матриць, на яких здійснюється активація прокоагулянтів. Крім тромбоцитів поверхнею для утворення активаційних комплексів можуть служити також мембрани гранулоцитів та моноцитів-макрофагів (Р.Тгасу і співавт., 1996). Відомо, що фактори, синтез яких залежить від вітаміну К (II, VII, IX, X) стають біологічно активними тільки після посттрансляційної модифікації, яка полягає в карбоксилюванні залишків глютамінової кислоти в N-кінцевих ділянках уже синтезованих поліпептидних ланцюгів. Вітамін К є необхідним кофактором цього карбоксилювання. Наявність карбоксилюваних залишків глютамінової кислоти, так званих “gla” є обов'язковою умовою для приєднання іонів Ca^{2+} і утворення активаційних комплексів на поверхні фосфоліпідів (N.Sumierhagen і співавт., 1996). Це комплекс IXa-VIIIa-X (теназа), в якому активується фактор X та комплекс Xa-Va-II (протромбіназа), в якому протромбін переходить в тромбін. Фактор V і VIII є кофакторами, що прискішують ці реакції. Важливо, що в цих комплексах фактори IXa і Xa недоступні інактивації плазменними інгібіторами зсідання крові.

Зовнішній шлях зсідання започатковується звільненням тканинного фактора з пошкоджених клітин чи тканин. Активація зсідання по зовнішньому шляху здійснюється також на поверхні клітин. Переоцінюються погляди на тканинний тромбопластин, який раніше вважали ліпопротеїном. Замість терміну “тканинний тромбопластин” в даний час прийнятий термін “тканинний фактор” (Tissue Factor; TE). TF є інтегральним глікопротеїном оболонок

багатьох клітин. ТФ в присутності Ca^{2+} утворює з фактором VII активний комплекс ТФ-VIIa (Е.Сангегег, НrPrydz, 1996; J.Chang, 1996; L.Mohan, S.Rapaport, 1996; E.Tuddenham, 1996). Після зв'язування з ТФ, фактор VII підлягає аутоактивації і активації фактором Ха та трокбіном. В непошкодженій судинній системі ТФ є недоступний для плазми. В тромбоцитах не виявлено ТФ (навіть після їх активації). Клітини ендотелію і лейкоцити, зокрема моноцити, можуть бути стимульовані до синтезу і експресії ТФ цитокінами, ендотоксином, активним компонентом C5a комплекменту.

Зовнішній та внутрішній механізми не є ізольованими, виявлені тісні зв'язки між цими двома шляхами активації зсідання. Так, В.Osterud і S.Rapaport (1977) показали, що комплекс тканинного фактора з фактором VII активує не тільки фактор X, але також і фактор IX. Комплекс XIIa-калікреїн – високомолекулярний кініноген – прискорює активацію фактора VII, а активований фактор VII – активацію факторів IX та XI. Фактору VII надають важливе значення в зсіданні крові. Він є єдиним зимогеном, який у нормі може виявлятися в крові в активній формі. Є ще один шлях активації фактора VII ліпідами і ліпопротеїнами. Ця активація, як і гіперпродукція фактора VII, спостерігається при гіперліпідеміях і корелює зі ступенем тромбогенного ризику. Деякі автори вважають, що збільшення рівня цього фактора є маркером ризику тромбоемболії (J.Morrissey, 1996). При подальшій активації зсідання зовнішній та внутрішній шлях об'єднуються і протікають ідентично. Фактор Ха утворює з фактором 3 тромбоцитів, іонами Ca^{2+} та фактором V активаторний комплекс, який зі значною швидкістю переводить протромбін в *a*-тромбін – основний фермент зсідальної системи крові. Активність комплексу Va-Ха є в 3000 разів вища, ніж активність самого фактора Ха. Встановлено, що активація деяких факторів зсідання на поверхні фосфоліпідів клітин у сотні тисяч разів швидша, ніж в плазмі.

В процесі активації протромбіну від нього послідовно відщеплюються фрагмент I та фрагмент II, в результаті чого одностанцюгова молекула протромбіну трансформується в двостанцюгову молекулу *a*-тромбіну.

Тромбін відщеплює від молекули фібриногену два пептиди А і два пептиди В, в результаті чого утворюються мономери фібрини останні з'єднуються своїми вільними зв'язками спочатку парами, утворюючи димери, а потім з'єднуються в полімери – волокна фібрину (В. Blomback і співавт., 1978). Крім дії на фібриноген, тромбін активує фібринстабілізуючий фактор, підвищує активаційну готовність факторів V та VIII, активує агрегацію тромбоцитів, стимулює утворення простагліцинів в ендотеліальних клітинах.

Фібрин, який утворився під впливом тромбіну, розчиняється і 2% монохлороцтовій кислоті та в 5–7 М сечовині, тому його характеризують як розчинний фібрин S (solubile). Завершується процес зсідання стабілізацією фібрину. Активований тромбіном фактор XIIa забезпечує утворення додаткових дисульфідних зв'язків між окремими ланцюгами фібрину, в результаті чого останній втрачає здатність розчинятись в сечовині і стає нерозчинним фібрином I (insolubile) (L.Lorand і співавт., 1981).

Таким чином, активація зсідання крові *in vivo* представлена рядом реакцій, що здійснюються на поверхні клітин в місці пошкодження стінки судини. Факт, що активація зсідання здійснюється не в циркулюючій плазмі, а на поверхні клітин, має важливе фізіологічне значення – локалізує зсідання там, де воно представляє механізм зупинки кровотечі.

Лекція 5.

Тема: Коагуляційний гемостаз.

Система фібринолізу зумовлює розчинення згустка крові та очищення кровообігу від кінцевих продуктів зсідання. Термін “фібрино геноліз” вживають для характеристики протеолітичної деградації фібриногену.

Основним ферментом системи фібринолізу є плазмін (фібрино-лізин) (Г.В.Андреев, 1979; Т.Astrup, 1978). Профермент плазміну – плазміноген (профібринолізин) є глікопротеїном, що утворюється в печінці і циркулює в крові у формі неактивного проферменту з N-термінальною глутаміною кислотою – глуплазміногену. Подібно до системи зсідання крові активація плазміногену може здійснюватись двома механізмами: а) зовнішнім – з участю тканинного активатора плазміногену (t-PA) і б) внутрішнім – з проактиватором, подібним урокінази (u-PA) (С.Cierniewski, 1994). Це біохімічно і імунологічно різні активатори плазміногену (рис. 4).

Основним джерелом t-PA є клітини ендотелію. Синтезована в клітинах молекула t-PA складається з одного поліпептидного ланцюга (sc-PA), після гідролізу переходить в молекулу, що складається з двох поліпептидних ланцюгів (tc-PA). Обидві форми активують плазміноген ефективно тільки тоді, коли є зв'язані з поверхнею фібрину (М.Нойлаерс і співавт., 1987). В присутності фібрину активація цих ензимів зростає в 200–400 разів. Плазміноген і t-PA адсорбуються на поверхні фібрину і активація плазміногену до плазміну протікає, головним чином, в згустку. Після лізису згустка t-PA інактивується йд-антиплазміном.

Звільнення активаторів з судинного ендотелію та тканин може стимулюватись протеїном С, простагліцином, а також різними факторами, такими як гіпоксія, механічна травма, пошкодження ендотоксином, закупорка судин, фізичне та психічне навантаження, нікотинова кислота, адреналін, норадреналін, брадикінін, деякі анаболічні стероїди та інші. Активатори плазміногену містяться в різних тканинах, в молоці, сечі, жовчі, слині. Значна активаторна активність притаманна венам матки, наднирників, простати, легень, лімфатичних вузлів, щитовидної залози, мозкових оболонок. Клітини деяких злоякісних пухлин (меланоми) можуть продукувати велику кількість активаторів фібринолізу. Лейкоцити містять лізокіназу, яка може локально з них звільнюватись при запальних процесах і активувати фібриноліз.

Внутрішній шлях активації фібринолізу має спільні механізми з активацією системи зсідання крові та калікреїн-кініновою системою. Здійснюється вона через фактор Хагемана. Одноланцюгова молекула проактиватора, подібного до урокінази (Scu-PA), не має протеолітичної активності, лише після гідролізу зв'язку LyS_{158} - LyS_{159} вона переходить в дволанцюгову активну форму (tcu-PA). Здійснюється це при участі факторів, активованих на від'ємно-зарядженій поверхні: FXII і прекалікреїну, а також плазміну.

В результаті гідролізу зв'язку Lys₁₃₅-Lys₁₃₆ в молекулі u-PA утворюється низькомолекулярна урокіназа. В процесі активації FXII при контакті з від'ємно-зарядженою поверхнею від фактора aXIIa відщеплюється так званий фрагмент фактора Хагемана – Hf, або β XIIa, який переводить прекалікреїн в калікреїн, а останній плазміноген – в плазмін. Фрагмент Hf (β XIIa) та фактор XIa можуть також безпосередньо активувати плазміноген.

Як відомо, одним з активаторів плазміногену є урокіназа (G.H.Barlow, 1976). Урокіназа утворюється в нирках і виділяється з сечею, в кров попадає лише незначна її кількість. Враховуючи її специфічність (субстратом дії урокінази є тільки плазміноген), урокіназа широко застосовується в клінічній практиці як препарат фібринолітичної дії. Джерелом для одержання препаратів є сеча або культура клітин ембріональної нирки людини.

Таким чином, пряма активація плазміногену в плазмін здійснюється через урокіназу та тканинний активатор. Перехід плазміногену в плазмін є реакцією обмеженого протеолізу. В процесі активації розриваються два поліпептидні зв'язки в ланцюгу плазміногену, в результаті чого залишається так званий ліз (lys)-плазмін.

Плазмін є ендопептидазою, яка, крім фібрину і фібриногену, перетравлює також деякі інші білкові субстанції: плазменні фактори зсідання крові (V, VIII), складові C₁, C₃, C₅ комплементу, глікопротеїни сполучної тканини, клітинні білки, казеїн, протамін.

На початкових етапах фібринолізу активний плазмін відщеплює від α -ланцюгів фібриногену/фібрину C-кінцеві великі фрагменти. Одночасно від β -ланцюгів відривається N-кінцевий фрагмент, в результаті чого утворюються фрагменти пре-X та X, які ще мають схильність до зсідання під впливом тромбіну.

Пізніше з фрагменту X утворюється мономеричний, так званий ранній фрагмент D та фрагмент Y. В наступній фазі фібринолізу плазмін розділяє фрагмент Y на два макромолекулярні продукти – на фрагменти D і E.

В процесі подальшого фібринолізу утворюються два кінцеві фрагменти D і один E. Макромолекулярні фрагменти X та Y прийнято називати “ранніми” продуктами фібринолізу, а фрагменти D та E – “пізніми” або “кінцевими”.

Вказані продукти деградації фібриногену/фібрину (ПДФ) є біологічно активними: вони проявляють антикоагулянтну дію, утворюючи розчинні комплекси з мономером фібрину, блокують полімеризацію мономеру фібрину.

ПДФ (особливо дрібномолекулярні) гальмують агрегацію тромбоцитів, збільшують активність брадикініну, гістаміну, вазопреси-ІУ, а також самі проявляють активність, подібну до кінінів, тобто підвищують проникливість судинної стінки. ПДФ проявляють активуючу дію на макрофагальну систему, поглинаються ретикулоендотелієм і блокують ретикулоендотеліальну систему. ПДФ відіграють важливу роль в патогенезі кровотеч у хворих з ДВЗ-синдромом.

Виявлено, що фрагмент D стимулює синтез фібриногену, чим пояснюють збільшення рівня фібриногену D плазмі хворих з хронічними формами дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові.

Перетравлювання фібриногену і лізис фібрину можуть здійснюватись також під впливом багатьох протеолітичних ензимів, зокремі під впливом трипсину, хемотрипсину, еластази, папаїну, протеаз із отрут змій та грибів. В гранулоцитах знаходиться еластаза та катепсин G, які, звільняючись із клітин під час зсідання крові та фагоцитозу, зумовлюють лізис фібрину.

Лекція 6.

Тема: Інгібітори зсідання і фібринолізу.

В цю систему об'єднані речовини крові і тканин, які гальмують процеси зсідання крові і фібриноліз. Дія їх спрямована на збереження крові в рідкому стані, обмеження процесів тромбоутворення та надмірного фібринолізу. Ці речовини поділяють на 2 групи:

- а) первинні, які постійно синтезуються і циркулюють в крові;
- б) вторинні, які утворюються в процесі зсідання крові і фібринолізу.

Важливе значення для обмеження активації зсідання мають фізіологічні антикоагулянти, дію яких започатковує поява в циркуляції тромбіну. Фізіологічними антикоагулянтами є тромбомодулін (ТМ), протеїн С (РС) та протеїн S (PS). Тромбомодулін є інтегральним білком багатьох клітин, зокрема, ендотелію мікроциркуляції, тромбоцитів, моноцитів, остеобластів. ТМ – це рецептор для тромбіну на поверхні клітин. Тромбін, приєднаний до ТМ, втрачає здатність до зсідання фібриногену, активації факторів VIII, V, XIII, а також тромбоцитів.

Другим важливим компонентом цієї системи є білок С. Він синтезується в печінці при участі вітаміну К (R.Marlar і співавт., 1981; Ch.Esmon, 1983; E.Mammen, 1984). Активація протеїну С до форми ензиму здійснюється під впливом тромбіну. Здатність тромбіну до активації РС зростає в 1000 разів після зв'язування його з ТМ. Активний РС інактивує фактор Va та Villa і стимулює фібриноліз. Ця реакція здійснюється зі значною швидкістю на поверхні фосфо ліпідів тромбоцитів і ендотелію судин в присутності кофактора – протеїну S.

Синтез протеїну S здійснюється в гепатоцитах і є залежний від вітаміну К. 35-40% PS знаходиться в плазмі у вільному стані, а 60-65% циркулює як неактивний комплекс з білком, що зв'язує C4b компонент комплементу. Активний білок С інактивує також інгібітор активації плазміногену (PAI-I).

Важливе значення в регуляції зсідання крові мають його ендогенні інгібітори, зокрема антитромбіни. Основну роль в інактивації тромбіну відіграють антитромбін III та кофактор II гепарину.

Антитромбін III (АТ III) синтезується в печінці, клітинах ендотелію судин і, можливо, в мегакаріюцитах (J.Tullis, K.Watanabe, 1978; H.Messmore, 1982). В плазмі здорової людини вміст АТ III дорівнює 150-350 mg/dl, а час піврозпаду в кровообігу – 17-26 годин. АТ III – інгібітор широкого спектру дії, він інактивує майже всі фактори зсідання, крім фактора VII. В першу чергу дія АТ III спрямована на інактивацію тромбіну та фактора Ха. АТ III інактивує також фактори XIIa, XIa, IXa, XIa, а в малих кількостях – плазмін, калікреїн та С, систему комплементу. АТ III забезпечує 75% антикоагулянтної активності крові, зв'язування тромбіну АТ III проходить повільно, у зв'язку з чим АТ III характеризують як антитромбін “прогресивний”. Інактивація тромбіну та інших факторів АТ III значно прискішується гепарином. Швидкість цієї реакції зростає в 1000 разів, тому деякі автори називають АТ III кофакторів гепарину.

В дійсності основним інгібітором активованих факторів зсідання є АТ ІІІ, а гепарин відіграє роль його кофактора.

При спадковому або набутому дефіциті АТ ІІІ виникає схильність до спонтанних тромбозів – тромбофілія. Можливість тромбоемболічних ускладнень виникає уже при зменшенні рівня АТ ІІІ нижче 70%. При відсутності АТ ІІІ антикоагулянтна дія гепарину не проявляється.

Кофактор ІІ гепарину є глікопротеїном, що синтезується в печінці. Він інактивує тромбін, але не інактивує фактора Ха. Його інгібіторна дія значно пришвидшується гепарином.

Одним з інгібіторів зсідання є протеаза Nexin, виявлена вперше в плаценті та фібробластах. Цей фермент виявлений також в тромбоцитах. Протеаза Nexin інактивує тромбін і урокіназу. Недавно відкриті синтетичні поліуклеотиди, так звані аптамери, що мають антикоагуляційну активність.

Виявлено сильний інгібітор комплексу тканинний фактор – фактор Vila – це інгібітор зовнішнього шляху активації зсідання крові. Цей інгібітор, відомий як Lipoprotein Associated Coagulation Inhibitor (LACI), в 1991 році одержав назву Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). TFPI виявлено в багатьох клітинах – печінці, ендотелію, мегакаріоцитах. В плазмі циркулює TFPI, зв'язаний з ліпопротеїнами і звільняється до кровообігу гепарином. TFPI інактивує комплекс TF-Vila, однак для його дії необхідна наявність фактора X.

α_1 -антитрипсин (α_1 -АТ) є інгібітором широкого спектру дії: гальмує активність тромбіну, плазміну, калікреїну, факторів IXa, X XIIa та інших протеаз. Участь α_1 -АТ в інактивації факторів зсіданн фібринолізу є порівняно незначною.

Відома також група глікопротеїнів, які містяться на поверх більшості клітин, в сполучній тканині, в плазмі – це так звані фібронектини. Ці речовини можуть зв'язуватись з колагеном, фібрином гепарином та поверхнею різних бактерій. Фібронектини гальмують агрегацію тромбоцитів під впливом тромбіну, а також адгезію тромбоцитів до колагену. Вміст фібронектинів знижується при ДВЗ-синдромі.

До “вторинних” інгібіторів відносять продукти ферментної деградації фібриногену/фібрину під впливом плазміну. Вони гальмують агрегацію тромбоцитів, полімеризацію фібрину.

В фізіологічних умовах в момент утворення згустка активуються одночасно механізми, стимулюючі і гальмуючі фібриноліз.

Важливими інгібіторами фібринолітичної системи є α_2 -антиплазмін (α_2 -АР), α_2 -макроглобулін (α_2 -М) та плазміноген-активатор інгібітор (РАІ-І).

α_2 -АР є основним фізіологічним інгібітором плазміну (H.Stomorken і співавт., 1983). Він негайно інактивує вільний плазмін і плазмі. α_2 -АР зв'язується з фібрином за участю фактора XIIIa. Згусток, що утворюється в присутності α_2 -АР, не піддається спонтанному лізису. α_2 -АР гальмує також активність тромбіну, фрагменту фактора XII, III, калікреїну, фактора XIa, в меншій мірі – активності урокінази, фактора Ха. Зниження рівня α_2 -антиплазміну спостерігається при цирозі печінки, ДВЗ-синдромі. При спадковому дефіциті α_2 -АР у гомозиготів виникають важкі кровотечі.

Важливе місце серед інгібіторів, гальмуючих активатори плазміногену, займає PAI-1. Він синтезується клітинами ендотелію, мегакаріоцитами, клітинами печінки, клітинами судин гладкої мускулатури. В тромбоцитах PAI-1 міститься в *a*-гранулах. Встановлено що функціонально і імунологічне він не відрізняється від інгібітора ендотеліальних клітин (М.Комарніські і співавт., 1992). В крові PAI-1 знаходиться в активній формі (невелика кількість) або в комплексі з t-PA чи вітронектином. Експресію PAI-1 в клітинах регулюють глюкокортикоїдні гормони та циклічні нуклеотиди. PAI-1 утворює а активаторами плазміногену незворотні комплекси і тим самим їх інактивує. PAI-1 зв'язується також з фібрином, гепарином. В комплексі з вітронектином може інактивувати тромбін. PAI-1 інактивує t-PA і u-PA.

Фібринолітична активність, в основному, визначається концентрацією t-PA і PAI-1. Звільнений з ендотеліальних клітин t-PA приєднується до їх поверхні, утворюючи комплекси з відповідними рецепторами або з PAI-1, зв'язаним з оболонкою клітин. Вважають, що кількість зв'язаного з оболонкою PAI-1 та t-PA, приєднаного до її рецепторів, характеризують антитромботичну властивість судин. Зміна концентрації PAI-1 суттєво порушує гомеостаз фібринолітичної системи.

Так, у хворих з дефіцитом PAI-1 спостерігається кровоточивість, а при надмірі PAI-1 – схильність до тромбозів. Підвищена концентрація PAI-1 спостерігається при бактеріальних інфекціях, злоякісних пухлинах, тромбозах. Виділення PAI-1 з клітин збільшується під впливом цитокінів (IL-1, IL-6). Виділяють також інгібітор активації плазміногену типу 2 (PAI-2). PAI-2 є глікопротеїном, вперше виявлений в плаценті. Синтезується в моноцитах і макрофагах.

α_2 -макроглобулін утворюється клітинами ендотелію, печінки, а також моноцитами, лімфоцитами та тромбоцитами. α_2 -M є інгібітором різних протеолітичних ензимів. Зі значною швидкістю він реагує з плазміном, дещо повільніше – з тромбіном і повільно – з фактором Ха, калікреїном і урокіназою. Комплекси α_2 -макроглобуліну з ензимами швидко усуваються з кровообігу через ретикуло-ендотеліальну систему. Вважають, що саме це є основним фізіологічним призначенням α_2 -M, хоча його значення повністю не в'яснене. Дефіцит α_2 -M не супроводжується розладами гемостазу.

Гальмуючий вплив на фібриноліз мають також ліпопротеїни, зокрема β -ліпопротеїни.

Лекція 7.

Тема: Скринінгові методи дослідження судинно-тромбоцитарного і коагуляційного гемостазу.

Резистентність капілярів досліджують за допомогою манжетної (симптом жгута) або банкової проб.

Найчастіше застосовують манжетну пробу Кончаловського-Румпеля-Леєде. У нормі після 5-хвилинного стискання плеча манжеткою (тиск 90-100 мм рт. ст.) на долонній поверхні передпліччя і площі діаметром 5 см не повинно утворюватись більше 10 петехій, розмір їх не повинен перевищувати 1 мм. Позитивна проба (знижені резистентність капілярів), як правило, спостерігається при всіх формах тромбоцитопенії, при деяких тромбоцитопатіях, а також при синдромі дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові та передозуванні антикоагулянтів прямої і непрямой дії. Позитивна проба характеризує неповноцінність судин у хворих з вазопатіями, гіпертонічною хворобою, інфекціях, цинзі, ендокринних порушеннях.

Дослідження тривалості капілярної кровотечі. Щоб визначити час кровотечі, застосовують методи Дуке, Айві або метод Борхгревінка-Ваалера. Проба Дуке: після проколу мочки вуха на глибині 3,5-4 мм час кровотечі у нормі становить 3-5 хв. Проба Борхгревінка Ваалера: на фоні штучно створеного венозного стазу (40мм рт. ст.) – на долонній поверхні передпліччя роблять надрізи довжиною 8-10 мм і глибиною 1 мм. У нормі час кровотечі – до 10 хв. При проведенні проби Айві (в умовах венозного стазу наносять ланцетом прокол глибиною 3 мм) норма часу кровотечі становить 8 хв. Два останні методи є більш чутливими, але в практичній медицині найчастіше застосовують метод Дуке.

Здовження часу кровотечі характерне для всіх форм тромбоцитопенії, а також для деяких тромбоцитопатій. Особливо тривалий час кровотечі при хворобі в.Віллебранда, спадковій афібриногенемії, у Лазі гіпокоагуляції гострих форм синдрому дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові. Продовження часу кровотечі буває також при передозуванні антикоагулянтів.

Однак слід відзначити, що в деяких випадках порушення судинно-тромбоцитарного гемостазу згадані проби можуть істотно не відрізнятись від нормальних величин.

Визначення кількості тромбоцитів. Найбільш точним є безпосередній підрахунок тромбоцитів крові за допомогою автоматичного лічильника або у камері з використанням фазово-контрастної приставки.

Поширений метод підрахунку тромбоцитів у мазку крові на певну кількість еритроцитів з наступним перерахунком на 1 л крові (метод Фоніо) є менш точним. Межі коливання числа тромбоцитів у здорових людей $150 \cdot 10^9$ - $450 \cdot 10^9$ /л (Е.П.Іванов, 1983,1991). За даними В.В.Соколова, І.А.Грибової (1972), їх кількість у нормі становить $180 \cdot 10^9$ - $320 \cdot 10^9$ /л.

Гіпертромбоцитоз спостерігається у початкових стадіях мієлопроліферативних процесів, після спленектомії, кровотечі, операцій, а також при деяких

злоякісних пухлинних і запальних процесах (ревматизм, виразковий коліт, туберкульоз тощо). Перехідне збільшення вмісту тромбоцитів може спостерігатись після важкого фізичного навантаження.

Кількість тромбоцитів зменшується при тромбоцитопеніях різного генезу, синдромі дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові, спленомегалії, деяких вірусних і бактеріальних інфекціях, захворюваннях печінки, уремії, серцевій недостатності, гіпер- і гіпотиреозі, при “синіх” вроджених вадах серця і після прийому ряду медикаментів.

Крім підрахунку кількості тромбоцитів, діагностичне значення має також вивчення розміру та форми тромбоцитів у мазку крові (тромбоцитарна формула). У нормі тромбоцити мають звичайно округлу або овальну форму, а діаметр їх коливається від 1,5 до 3 мкм. Збільшення середнього діаметра тромбоцитів спостерігається при їх гіперпродукції за рахунок відокремлення юних форм тромбоцитів (при імунній тромбоцитопенії, гемолітичному кризі, після втрати крові та спленектомії). Гігантські форми тромбоцитів характерні для деяких тромбоцитопатій (Бернара-Сулє, Мея-Хеггліна). Зменшення середнього діаметру тромбоцитів спостерігається при їх гіпопродукції (старі форми тромбоцитів). Мікроформи тромбоцитів характерні д. гіпопластичних станів, синдрому Віскотта-Олдріча, у хворих на раї Анізопойкілоцитоз тромбоцитів спостерігається при імунній тромбоцитопенії, мієлопроліферативних процесах.

При деяких тромбоцитопатіях діагностичне значення має електронно-мікроскопічне вивчення ультраструктури тромбоцитів.

У діагностиці імунної тромбоцитопенії важливе значення має визначення тривалості життя помічених ^{51}Cr або ^{111}In тромбоцитів у периферичній крові. У нормі тривалість півжиття тромбоцитів коливається в межах 4-5 днів. При імунній тромбоцитопенії вона скорочується до 1-2-днів і навіть до кількох годин. Тривалість півжиття тромбоцитів значно скорочується при ДВЗ-синдромі.

Особливе значення у діагностиці окремих форм тромбоцитопатій має вивчення функції тромбоцитів. Найчастіше застосовувані методики:

Дослідження адгезивності (ретенції) тромбоцитів. Описано декілька методів, що характеризують властивість тромбоцитів до прилипання (під час контакту зі склом на скловолоні, міліпорних фільтрах або в рані). Найпоширеніший метод – визначення кількості тромбоцитів, затриманих у колонці зі скляними кульками. У нормі індекс адгезивності (ретенції) дорівнює 20-55%. Зниження адгезивності тромбоцитів спостерігається при хворобі Віллебранда, деяких формах спадкової тромбоцитопатії, мієлопроліферативному син., ромі, уремії.

Дослідження агрегаційної функції тромбоцитів. Простим і доступним для проведення в будь-якій лабораторії є якісний метод – візуальне визначення наявності або відсутності агрегатів тромбоцитів при перемішуванні плазми, що містить тромбоцити, зі стимуляторами агрегації (АДФ, адреналіном, тромбіном, колагеном, арахідоною кислотою, ристоміцином сульфатом). Застосовується також кількісний фотометричний метод з графічною реєстрацією процесу за допомогою агрегометра. Вивчається швидкість і ступінь

зміщення оптичної щільності плазми, що містить тромбоцити, при змішуванні із згаданими вище агрегуючими агентами. Таким чином можна виявити зворотню і незворотню агрегацію тромбоцитів. При дії адреналіну і малих концентрацій АДФ агрегаційна крива має тиш вий двофазний характер. Перша хвиля віддзеркалює безпосередній вплив агоніста на тромбоцити, а друга хвиля виникає в результаті реакції звільнення з щільних гранул тромбоцитів адреналіну, АДФ тромбоксану. Відсутність другої хвилі агрегації вказує на порушення “реакції звільнення” або на наявність дефекту пулу нагромадження. Паралельне застосування різних агоністів допомагає в діагностиці окремих функціональних розладів тромбоцитів.

Значне підвищення АДФ-агрегації тромбоцитів і ослаблення процесу фізіологічної дезагрегації може спостерігатись при захворюваннях з підвищеним тромбогенним ризиком (атеросклероз, цукровий діабет, гіперліпідемія, порушення кровообігу та ін.), тромбоцитозах, а також при гемолізі. Деяке підвищення агрегації тромбоцитів відмічається, як правило, під впливом нікотину і гепарину.

Порушення або відсутність агрегації тромбоцитів спостерігаються при спадкових і набутих тромбоцитопатіях (захворювання крові, печінки, уремія), після прийому ацетилсаліцилової кислоти, а також при гіпертиреозі, синдромі дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові.

Дослідження секреторної функції тромбоцитів. Секрецію вмісту органел нагромадження визначають за допомогою відповідних складних методик, зокрема, імуноензиматичних (ELISA). Важливе значення має визначення концентрації специфічних протеїнів α -гранул – β -тромбоглобуліну (β -TG), тромбоцитарного фактора 4 (PF4). Маркерами секреції δ -гранул є АДФ та АТФ, а також звільнення іонів кальцію та серотоніну. Проведення цих досліджень дозволяє диференціювати окремі форми захворювання пулу нагромадження.

Визначення метаболітів тромбоксану A_2 що утворюються в процесі активації тромбоцитів: тромбоксану B_2 (TxB_2), 11-dehydro TxB_2 і 2,3 dinor TxB_2 , на підставі чого діагностують вроджені і набуті дефекти синтезу простагландинів.

Визначення специфічних компонентів мембрани тромбоцитів. Серед маркерів тромбоцитарних мембран ідентифікують селектин Р, гранулофізин (CD63, $pltgp40$), тромбоспондин, комплекс GP IIb - IIIa. Вивчення структурних і функціональних особливостей мембранних глікопротеїнів за допомогою моноклональних антитіл дозволяє ідентифікувати якісні і кількісні дефекти цих глікопротеїнів при спадкових і набутих тромбоцитопатіях. Вважають, що основне діагностичне значення має визначення концентрації β -TG та PF4, рівень метаболітів TxB_2 , а також проточна цитометрія. М. Musial, 1994).

Визначення 3 фактора тромбоцитів, що характеризує проко-агуляційну активність тромбоцитів.

Контракильну здатність тромбоцитів визначають по ретракції кров'яного згустка. Нормальні показники ретракції коливаються в межах 48-64%. Збільшений об'єм ретрагованої сироватки (несправжнє підвищення ретракції) відмічається при зниженні гематокритного показника (анемія) і рівня

фібриногену. Недостатня тракція кров'яного згустка спостерігається при вираженій тромбозі топенії, деяких формах тромбоцитопатії, а також при еритроцитозі симптоматичних еритроцитозах.

За допомогою вказаних досліджень можна з точністю діагностувати окремі нозологічні форми спадкових і набутих тромбоцитопатій. Більшість із вказаних методик може бути проведена лише в спеціалізованих установах.

ДОСЛІДЖЕННЯ КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ.

До широкої клінічної практики входить ряд базисних методик що характеризують функціональний стан системи зсідання крові цілому. До них належать деякі пробіркові методики та апаратні методи з графічною реєстрацією процесу коагуляції.

До найчастіше застосовуваних методик належить визначення часу зсідання крові. Описано багато методів, однак найбільш відповідає фізіологічним умовам і найзручніший для експрес-діагностики є уніфікований метод визначення часу зсідання крові за Лі-Уайтом (норма 5-10 хв). Цей метод характеризує загальну коагуляційну активність крові. Прискорення часу зсідання крові спостерігається при підвищеній коагуляційній активності її, що буває в післяпологовому періоді, при ряді патологічних процесів (обширні операції, опіки численні переломи), як захисна реакція при кровотечах, обумовлена порушеннями цілісності судин, а також у фазі гіперкоагуляції ДВЗ-синдрому. Продовження часу зсідання крові відмічається при дефіциті одного або кількох прокоагулянтів – спадкові та набуті коагулопатії (значний дефіцит факторів V, VIII, IX, X, XI зсідання крові) наявність у крові інгібіторів прокоагулянтів, передозування гепарину.

Повна відсутність зсідання крові спостерігається при вродженій фібриногенемії, фазі гіпокоагуляції гострих форм синдрому дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові.

Завдяки простоті, доступності й швидкості виконання цей тест рекомендується також в ургентних випадках (післяопераційні та післяпологові кровотечі), для з'ясування генезу кровотечі (порушенні цілісності стінки судин, коагулопатія). Його застосовують для контролю при лікуванні гепарином.

Як правило, цей тест дозволяє виявити лише істотні порушення зсідання крові. Так, час зсідання крові за Лі-Уайтом у хворих на гемофілію продовжується тільки при зниженні концентрації факторів VIII або IX нижче 10%. У зв'язку з цим для оцінки загальної коагуляційної активності крові рекомендується застосовувати стандартизовані методики.

Визначення каолінового часу зсідання крові (норма – 1 хв 10 с – 2 хв). Завдяки стандартизації початкової фази зсідання крові (додавання каоліну) цей тест найбільш чутливий для з'ясування загальної коагуляційної активності крові. Каоліновий час зсідання крові здовжується при надмірній кількості в крові антикоагулянтів або дефіциті факторів, що беруть участь у внутрішньому механізмі зсідання крові (фактори V, VIII, IX, X, XI, XII).

Визначення силіконового часу зсідання крові. З метою зняття контактної активації прокоагулянтів визначають час зсідання крові в пробірці, покритій

силіконом. У нормі він становить 16-20 хв. При прихованій гіперкоагуляції (активація факторів XII і XI, наявність в крові тромбіну, зниження рівня природних антикоагулянтів) час зсідання крові у силіконований пробірці скорочується. Здовження силіконового часу буває при цій же патології, яка супроводжується здовженням часу зсідання крові за Лі-Уайтом.

В деяких лабораторіях досі користуються малоінформативним методом, який також характеризує загальну коагуляційну активність крові, – визначення часу рекальцифікації плазми (норма ВОНО с). При підвищеній коагуляційній активності крові час рекальцифікації прискорений. Подовження часу рекальцифікації плазми спостерігається в тих же випадках, що й подовження часу зсідання крові. Крім того, час рекальцифікації плазми може бути здовженим при вираженій тромбоцитопенії. Цей тест, як і визначення часу зсідання цільної крові, малочутливий, у зв'язку з чим при легких формах коагулопатій не виявляє відхилень від норми.

Високої чутливості цього методу до виявлення дефіциту плазмових факторів зсідання крові (факторів, що беруть участь у внутрішньому механізмі) досягають додаванням кефаліну – парціальний тромбопластиновий час (норма – 60-70 с) або додаванням кефаліну і каоліну – активований парціальний тромбопластиновий час (АПТЧ) (норма – 45-55 с). Цей стандартизований тест високочутливий до дефіциту прокоагулянтів, що беруть участь у внутрішньому механізмі зсідання крові. Продовження АПТЧ спостерігається при Дефіциті факторів V, VIII, IX, X, XI, XII зсідання крові і при надлишку антикоагулянтів.

До специфічних тестів, що характеризують внутрішній механізм зсідання крові, належать тест генерації тромбопластину і Цтокоагуляційний тест.

Тест генерації тромбопластину (Біггс-Дугласа) (R.Bigfe. A.Douglas, 1953) відображає внутрішній механізм утворення трої бопластину. У нормі максимальна активність тромбопластину (7-10) реєструється на 4-й хвилині інкубації. Прискорене утворення тромбі пластину і висока його активність за даними цього тесту свідчать про підвищену коагуляційну активність крові. Порушення генерац тромбопластину (подовжений час його утворення і зниження актиі ності) спостерігається при дефіциті факторів V, VIII, IX, X, XI, X зсідання крові, а також тромбоцитів. На основі даного тесту проводять диференціацію коагулопатій, зумовлених дефіцитом прокоагулянтів, які беруть участь у формуванні внутрішнього механізму зсідання крові.

Депротромбінізована плазма ($BaSO_4$ -плазма) здорової людини містить фактори V, VIII, XI, XII. У сироватці знаходяться VII, IX, X, XI, XII фактори. В активації внутрішнього механізму зсіданн крові беруть участь V, VIII, IX, X, XI, XII фактори. При дефіциті одного (або більше) з них генерація тромбопластину порушується. Проводячи заміну компонентів ($Ba SO_4$ -плазми або сироватки) хворого відповідними компонентами здорової людини, можна виявити, дефіцит якого фактора зумовив коагулопатію, тобто встановити діагноз. Так, генерація тромбопластину при дефіциті фактора VIII (гемофіл А) або V (парагемофілія Оврена) нормалізується заміною плазми хворого у згаданому тесті депротромбінізованою плазмою крові здорові людини. Якщо існує дефіцит фактора IX (гемофілія В) або X (хвороб Стюарт-Прауер),

корекція настає при заміні сироватки крові хворого сироваткою крові здорової людини. При дефіциті фактора XI (гемофілія C) або XII тест нормалізується як додаванням депротромбінізованої плазми, так і сироватки крові здорової людини. У хворих на тромбоцитопенію час генерації тромбопластину у нормі, а активність його значно знижена. Заміна тромбоцитної суспензії хворого з вираженої тромбоцитопенією тромбоцитами здорової людини приводить до нормалізації згаданого тесту. У випадку, коли генерація тромбопластин не нормалізується ні плазмою, ні сироваткою, ні тромбоцитами, слід вважати, що в крові є імунні інгібітори факторів V, VIII, IX або XI зсідання крові.

Аутокоагуляційний тест (АКТ) – це стандартизований тест, коли суспензія тромбоцитів замінюється гемолізатом еритроцитів, у зв'язку з чим кількість тромбоцитів не впливає на показники тесту. За даними АКТ у процентному вираженні викреслюють аутокоагулограму. Висхідна частина кривої АКТ відображає динаміку наростання тромбопластин-тромбінової активності. Низхідна частина кривої характеризує інактивацію тромбіну антикоагулянтами в крові. У нормі максимальна зсідаюча активність (М) становить 100% і досягається на 10-й хвилині інкубації гемолізат-кальцієвої суміші. При дефіциті прокоагулянтів, що беруть участь у внутрішньому механізмі зсідання крові, зменшується активація, при наявності антикоагулянтів прискорюється інактивація.

Цей тест використовують також для диференціальної діагностики гемофілії (табл. 3).

Таблиця 3

Диференціальна діагностика окремих форм гемофілії за допомогою тесту генерації тромбопластину або АКТ

Компонент здорової людини, яким проводиться корекція	Діагноз			
	Гемофілія А	Гемофілія В	Гемофілія С	Дефект Хагемана
Свіжа плазма	+	+	+	+
BaSO ₄ -плазма	+	—	+	+
Сироватка	—	+	+	+

Примітка. + - нормалізація генерації тромбопластину
— відсутність нормалізації генерації тромбопластину.

Корекційні проби проводять на 4-й хвилині інкубації. При дефіциті фактора VIII або V дефект зсідання коригується депротромбінізованою плазмою крові здорової людини. Якщо є дефіцит факторів IX і X, корекція зсідання настає при додаванні сироватки крові здорової людини. В разі дефіциту фактора XI нормалізація показників АКТ спостерігається при додаванні як депротромбінізованої плазми, так і сироватки крові здорової людини. Відсутність корекції згаданими компонентами свідчить про наявність у крові імунного інгібітора до одного з прокоагулянтів.

У хворих на тромбоцитопенію показники АКТ у нормі. Диференціація гемофілій може проводитись також заміною плазми хворого у згаданих тестах (тест генерації тромбопластину, АКТ) заздалегідь заготовленими зразками тест-плазми хворих із значним дефіцитом окремих прокоагулянтів (VIII, IX, X або XI). Діагнозу хворого відповідає тій тест-плазмі, яка не компенсує у нього зсідання крові.

Тест споживання протромбіну дає змогу непрямим способом визначити тромбопластин-тромбінову активність крові (за вмістом а лішкового протромбіну у сироватці крові). Значне скорочення протромбінового часу сироватки спостерігається при гемофілії і тромб цитопенії.

Для характеристики зовнішнього механізму утворення протромбіназної активності і факторів протромбінового комплексу у широкій клінічній практиці застосовують визначення протромбінового чаї плазми. При нормальному вмісті фібриногену протромбіновий час плазми відображає рівень факторів протромбінового комплексу (II, VII, X). У лабораторній практиці застосовують декілька методів (методи Квіка, Туголукова, Лемана). Найчастіше застосовують мето Квіка (норма 12-15 с, залежно від активності тромбопластину). У деяких лабораторіях шляхом складання арифметичної пропорції розраховують протромбіновий індекс (норма 100% \pm 5%), однак користування показниками протромбінового часу є більш точним.

Скорочення протромбіновго часу (високий протромбіновий індекс) спостерігається при високому рівні згаданих прокоагулянтів у плазмі хворого. Слід відзначити, що цей тест не відображає сумарна коагуляційної активності крові, тому використовувати його для оцінки тромбогенної небезпеки не варто.

Подовження протромбінового часу (низький протромбіновий індекс) спостерігається при дефіциті одного (спадкові коагулопатії або декількох із згаданих прокоагулянтів (набуті коагулопатії). Пре тромбіновий час подовжений при ураженнях паренхіми печінки, по рушеннях засвоєння вітаміну К в кишечнику (механічна жовтяниця дисбактеріоз, геморагічна хвороба новонароджених), при лікуванні антикоагулянтами дикумаринової групи, а також при системном амілоїдозі і синдромі дисемінованого внутрішньосудинного зсідання, крові (набутий дефіцит антикоагулянтів протромбінового комплеї су). Широко застосовують цей тест для контролю при лікуванні анти коагулянтами дикумаринової групи.

Значне подовження протромбінового часу плазми є характерною лабораторною ознакою для всієї групи спадкових диспротромбії (дефіцит факторів II, V, VII або X зсідання крові, у зв'язку з чим згаданий тест може бути використаний для диференціації окремих їх форм). Різні форми диспротромбій диференціюють методом корекції протромбінового часу плазми хворого (табл. 4).

При дефіциті протромбіну протромбіновий час плазми хворої нормалізується подаванням плазми здорової людини (депротромбінізована плазма і сироватка крові здорових людей не призводить до нормалізації). Для парагемофілії Оврена (дефіцит фактора V) характерна нормалізація протромбінового часу плазми хворого додаванням віжкої нативної або

депротромбінізованої плазми здорової людини сироватка здорових не нормалізує протромбінового часу Квіка). При дефіциті фактора V також порушується тест генерації тромбопластину, він нормалізується у таких хворих додаванням свіжої депротромбінізованої плазми здорової людини. В разі дефіциту фактора VII нормалізація протромбінового часу плазми хворого настає при додаванні нативної плазми або сироватки крові здорової людини (депротромбінізована плазма не нормалізує часу Квіка).

Таблиця 4

Диференціальна діагностика дефіциту факторів протромбінового комплексу за допомогою тесту Квіка

Компонент здорової людини, яким проводиться корекція	Дефіцит фактора			
	II	V	VII	X
Свіжа плазма	+	+	+	+
BaSO ₄ -плазма	–	+	–	–
Сироватка	–	–	+	+

Примітки. +

– нормалізація протромбінового часу плазми

– відсутність нормалізації тесту.

Аналогічна корекція протромбінового часу плазми хворого нативною плазмою або сироваткою крові здорової людини характерна і для хвороби Стюарт-Прауер. Однак у хворих на цю патологію порушується також генерація тромбопластину. Остання нормалізується заміною сироватки крові хворого у тесті Біггс-Дугласа сироваткою крові здорової людини.

Для оцінки кінцевого етапу зсідання крові звичайно користуються визначенням тромбінового часу, вмісту фібриногену і фактора XIII.

Визначення тромбінового часу. Досліджується час зсідання плазми при додаванні стандартної кількості тромбіну. Нормальні показники становлять 15-18 с (залежно від активності тромбіну). Здовження тромбінового часу спостерігається при патології фібриногену (гіпофібриногенемії, гіперфібриногенемії, аномалії фібриногену), а також при наростанні в крові рівня продуктів деградації фібрину (підвищений фібриноліз, ускладнення тромболітичної терапії). Здовження тромбінового часу характерне для ДВЗ-синдрому. Показники тесту подовжуються, якщо в крові є антитромбін, а також при введенні гепарину (особливо при передозуванні гепарину) (табл.5).

Таблиця 5

Характеристика основних коагуляційних тестів при дефіциті окремих прокоагулянтів

Коагуляційний дефект	Час кровотечі	Протромбіновий час	Активованій парціальний тромбопластиновий час	Тромбіновий час
I	N або ↑	↑	↑	↑
II	N	↑	↑	N

V	N або ↑	↑	↑	N
VII	N або ↑	↑	N	N
VIII	N	N	↑	N
vW фактор	↑	N	N або ↑	N
IX	N	N	↑	N
X	N	↑	↑	
XI	N	N	↑↑	N
Фактори контакту	N	N	↑↑↑	N
XIII	N	N	N	N
Тромбоцитопенії	N	N	N	N
Тромбоцитопатії	↑↑	N	N	N
Захворювання печінки	N	↑	N або ↑	N або ↑ (при важких ураженнях)
Дефіцит вітаміну К, антикоагулянти кумаринової групи	N або ↑ (при вираженому дефіциті)	↑	↑	N
ДВЗ	↑	↑	↑	↑
Гепарин	N	N або ↑	↑	↑↑
Масивні трансфузії	↑	N або ↑	↑	N або ↑

Примітка: N – норма; ↑, ↑↑, ↑↑↑ – значно подовжений.

Крім згаданих вище методик, що застосовуються найчастіше і характеризують загальну коагуляційну активність крові та окремі етапи її зсідання, а також дозволяють диференціювати окремі форми коагулопатій, є ряд методик для кількісного визначення кожного з прокоагулянтів. У широкій клінічній практиці кількісно визначають вміст фібриногену, фактора XIII і антигемофільних факторів. Кількісне визначення решти прокоагулянтів проводиться рідко, в основному, в спеціалізованих лабораторіях.

Лекція 8.

Тема: Скринінгові методи дослідження гемостазу при гемофілії А.

Гемофілія є спадковим захворюванням, зумовленим дефіцитом або молекулярними аномаліями одного з прокоагулянтів, які беруть участь в активації зсідання крові “по внутрішньому механізму”. Підвищена кровоточивість серед чоловіків відома ще до нашої ери, однак як окреме захворювання описана в 1803 році Otto в Філадельфії. Назву “гемофілія” це захворювання одержало в 1828 році (von Norff). Неоднорідність гемофілії була зауважена вперше в 1947 році (Pawtowski). В 1952 році виділено дві форми гемофілії: гемофілію А, зумовлену дефіцитом фактора VIII зсідання крові (антигемофільного глобуліну А) та гемофілію В, зумовлену дефіцитом фактора IX (плазмового компоненту тромбопластину) (R.Biggs і співавт., 1953). До гемофілії відносять також дефіцит фактора XI зсідання крові (плазмового попередника тромбопластину, РТА), виділяючи її як гемофілію С або хворобу Розенталя. Найчастішою формою є гемофілія А (87-94% хворих з загального числа хворих на гемофілію). Гемофілія В зустрічається значно рідше (6-13% випадків), гемофілія С – вкрай рідко (1-2% випадків). Гемофілія спостерігається з частотою 1:16000 населення (S.Lopaciuk, 1995). \

ГЕМОФІЛІЯ А

(Гемофілія А – спадкова коагулопатія, зумовлена дефіцитом або молекулярною аномалією фактора VIII зсідання крові.

Патогенез. Антигемофільний глобулін А (фактор VIII) циркулює в крові у вигляді великого білкового комплексу.

Прокоагулянтна активність фактора VIII характеризується як FVIII:C і є асоційована з макромолекулярним транспортним протеїном (FVIII R:Ag). Останній вміщує також фактору v.Віллебранда (FVIII:vWF). Низькомолекулярний компонент активності фактора VIII:C можна визначити кількісно імунологічними методиками, його характеризують як FVIII:C_{Ag}. Звичайно у хворих на гемофілію А паралельно знижується активність FVIII:C і FVIII:C_{Ag}, такі форми, захворювання визначаються як гемофілія А (або CRM), У хворих на гемофілію А (антигенеративну) спостерігається парез синтезу фактора VIII (справжній дефіцит фактора VIII). Приблизно у 10% хворих при зниженні активності FVIII:C рівень антигенного маркера FVIII:C_{Ag} нормальний – такі випадки характеризуються як гемофілія А (або CRM⁺), антигенпозитивна. У циркулюючій крові таких хворих знаходиться аномальний антигемофільний глобулін, який не може здійснювати свою функцію. Ген, відповідальний за гемофілію А, локалізується в довгому плечі X-хромосоми (Xq28).

Гемофілія А успадковується по рецесивному, зчепленому з X-хромосомою типу, у зв'язку з чим хворіють тільки чоловіки. Жінки, успадковуючи X-хромосому від батька-гемофіліка і одну X-хромосому від здорової матері, є кондукторами гемофілії. Таким чином, всі сини від батька-

гемофіліка народжуються здоровими, а всі доньки є кондукторами (переносниками) гемофілії. Сини жінок-кондукторів гемофілії можуть успадкувати від матері здорову Х-хромосому, в і випадках вони народжуються здоровими і не передають захворював нащадкам. Теоретично половина синів від жінок-кондукторів гемофілії може одержати від матері Х-хромосому з геном гемофілії і хворіти на гемофілію. Подібна ситуація з успадкуванням гена гемофілії спостерігається також у дочок матері-кондуктора гемофілії. Вони однаково можуть бути або не бути гетерозиготними носіями гена гемофілії (рис.5). У жінок-кондукторів гемофілії, як правило, геморагічних проявів нема, хоча рівень фактора VIII у них знижений. У виключних випадках на гемофілію можуть хворіти жінки. Така ситуація може виникнути тоді, коли батько хворіє на гемофілію, а мати є її кондуктором. За даними літератури приблизно в 30% випадків гемофілія виявляється спорадично.

Клініка. Клінічно гемофілія А характеризується рясними та тривалими кровотечами при порізах, травмах, крововиливами в суглоби, виникненням міжм'язевих та внутрім'язевих гематом. Важкість морагічного синдрому залежить від ступеня дефіциту фактора VIII:С.

В залежності від рівня F VIII:С виділяють:

1. Важку форму захворювання – рівень FVIII:С < 1%.
2. Форму середньої важкості – рівень FVIII:С – 1- 5%.
3. Легку форму захворювання – рівень FVIII:С – 5-15%.

Деякі автори додатково виділяють ще “приховану” форму субгемофілію з рівнем FVIII:С 15-50%.

Слід відмітити, що рівень фактора VIII в плазмі хворого на гемофілію залишається стабільним протягом всього життя. Винятком хвороба Нексаторна, описана в 1975 році як генетичний варіант гемофілії А (O.Ratnoff, J.Lewis, 1975). У хворих з даним варіантом захворювання активність VIII:С змінюється, а зужиття протромбіну постійно порушене.

Гемофілія виявляється, як правило, в дитячому віці. В рідкісних випадках підвищена кровоточивість може виявитися при перерізанні пуповини. Звичайно перші симптоми захворювання проявляються підвищеною кровоточивістю при дрібних травмах слизові (надрид вуждечки язика, прикушування язика, травматизація слизових оболонок гострими предметами), виникненням великих гематом при падінні дитини, а пізніше – гемартрозів.

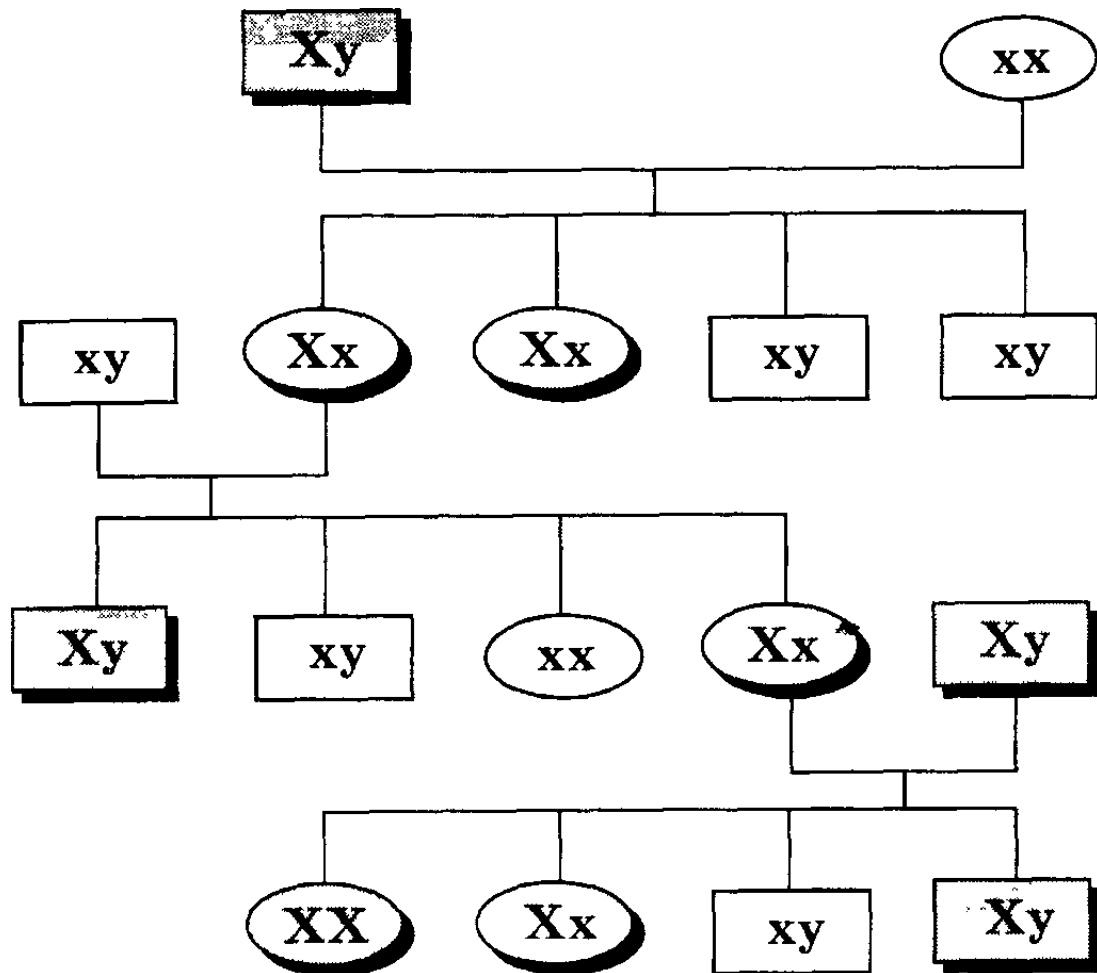


Рис.5. Характер успадкування гемофілії. Примітки.
 x – нормальна хромосома X
 X – змінена хромосома X
 Xy XX – хворі на гемофілію; Xx – кондуктори гемофілії.

Інколи (головним чином, при легких формах гемофілії) захворювання виявляється в юнацькому або в дорілому віці.

Перебіг захворювання характеризується періодами підвищеної кровоточивості, які чергуються з проміжками відносної клінічної ремісії.

Одним з характерних проявів гемофілії є крововиливи у великі суглоби кінцівок, найчастіше в колінні, рідше – ліктьові, гомілково-ступеневі, плечові, кульшові.

Звичайно виникнення гемартрозу пов'язане з травмою, хоча травма у більшості випадків буває незначною (незручний рух, перенапруження) і неадекватною до величини крововиливу.

Виникнення гострого гемартрозу характеризується різкими артралгіями, суглоб збільшується в об'ємі, контури його згладжуються. Шкіра над суглобом гіперемована, напружена, гаряча. Найменші рухи, а також пальпація суглобу різко болючі. Часто відмічається балотування надколінника. При значних

гемартрозах порушується загальний стан хворого: підвищується температура тіла, ШОЕ, може виникнути нейтрофільний лейкоцитоз.

При правильному і своєчасному лікуванні перший гострий і мартроз може повністю розсмоктатися, не залишаючи суттєвих зм але повторні крововиливи частіше бувають в цей же суглоб, що а мовлене морфологічною перебудовою та вторинними запальний змінами тканин суглобу. В результаті рецидивуючих гострих гемартрозів розвивається хронічний геморагічно-деструктивний остеоартроз: суглоб збільшується в об'ємі, деформується, рухомість його обмежена, настає атрофія та слабкість м'язів кінцівки. Крім вказаних уражень суглобів, З.С.Баркаган (1970) виділяє у хворих на гемофілію вторинний ревматоїдний синдром імунного генезу. Цей синдром характеризується болями, скутістю і деформацією дрібних суглобів кистей та стоп, не уражених крововиливами.

Важкість ураження суглобового апарату залежить від частоти гострих гемартрозів та правильності їх лікування. Саме патологія суглобів найчастіше є причиною інвалідизації хворих на гемофілію.

Для гемофілії характерним є також утворення великих підшкірних, внутрішньом'язевих гематом – гематомний тип кровоточивості. Дрібні синяки та петехіальні висипання у хворих на гемофілію не спостерігаються. Гематоми у цих хворих виникають переважно після травми (напруження, удар), яка найчастіше неадекватна величині гематоми. Гематоми можуть виникати в будь-якій ділянці тіла (частіше в кінцівках, на тулубі), їх локалізація й обумовлює клінічні прояви. Першим симптомом гематоми є біль, інтенсивність якого залежить від об'єму гематоми та ураження нервових волокон. Шкіра над гематомою напружена, в перші дні колір її може бути незмінним. При великих гематомах пальпується пухлинний утвір, може спостерігатися флюктуація. Пізніше кров проникає в підшкірну клітковину, починається імбібіція шкіри кров'ю і утворюються великі синьо-фіолетові синяки, які з часом змінюють забарвлення на зелено-жовте. Інколи такий синяк займає цілу кінцівку або значну частину спини, грудної клітки чи живота.

Лекція 9.

Тема: Скринінгові методи дослідження гемостазу при гемофілії В.

Гемофілія В – спадкова коагулопатія, зумовлена дефіцитом або молекулярними аномаліями фактора IX зсідання крові (антигемо-фільного глобуліну В, фактора Крістмаса, плазменного компоненту тромбопластину). Гемофілія В виділена як окрема форма гемофілії в 1952 році R.Biggs і співавт. Описано декілька генетично-молекулярних варіантів гемофілії В.

Патогенез. Зниження активності фактора IX зсідання крові може бути зумовлене порушеннями його синтезу або молекулярними аномаліями.

Виділено форми захворювання, при яких знижена коагуляційна активність фактора IX корелює зі зниженням вмісту його антигену, тобто спостерігається парез синтезу фактора IX – це гемофілія В (CRM). В інших хворих при низькій коагуляційній активності фактора IX вміст його антигену нормальний, тобто продукується аномальний фактор IX. Цю форму гемофілії характеризують як гемофілію В⁺ (CRM⁺). Описані також форми, при яких спостерігається низька коагуляційна активність фактора IX з поміркованим (50%) зниженням вмісту його антигену – це гемофілія В_{RA} (CRM^R) та ряд інших аномалій. Так, описані форми гемофілії В, при яких продовжується протромбіновий час плазми хворого при застосуванні тромбопластину бика (при застосуванні людського тромбопластину протромбіновий час плазми у нормі). Даний варіант захворювання характеризують як гемофілія В^M. Серед різних варіантів гемофілії В (тип Алабама, тип Ейнтховен та інші) виділяють гемофілію В_{лейден}, яка характеризується зростанням активності фактора IX з віком – після 15 років і відповідно зменшенням геморагічних проявів (E.Briet і співавт., 1982). Гемофілія В зустрічається в 50% випадків, всі інші форми спостерігаються значно рідше. В таблиці 11 описані варіанти гемофілії В за С.Kasper і співавт. (1977) та V.Parekh і співавт. (1978).

Гемофілія В успадковується за рецесивним зчепленням з Х-хромосою типом. Ген, відповідальний за гемофілію В, локалізується в довгому плечі Х-хромосоми (Xq27).

Клініка. Клінічні симптоми захворювання, перебіг, ускладнення у хворих на гемофілію В є такі ж, як і при гемофілії А. Виділяють також важку форму захворювання з рівнем фактора IX <1% норми, форму середньої важкості з рівнем фактора IX 1-5% норми, легку форму, коли рівень фактора IX вище 5%, та приховану форму (рівень фактора IX 25-50% норми).

Діагностика. Форма гемофілії може бути встановлена тільки на основі лабораторних досліджень. У хворих на гемофілію В продовжений час зсідання крові та час рекальцифікації плазми (при важких формах та формах середньої важкості), завжди продовжений активований парціальний тромбопластиновий час (каолін-кефаліновий час), знижена коагуляційна активність в АКТ та порушений тест генерації тромбопластину, порушене також зужиття протромбіну в процесі зсідання крові. Кількість тромбоцитів, час кровотечі, протромбіновий час плазми (при застосуванні людського або кролячого

тромбопластину) у нормі. Диференціація форми гемофілії проводиться за допомогою корекційних тестів на базі АКТ або тесту генерації тромбопластину. У хворих на гемофілію В дефект зсідання коригується додаванням сироватки здорової людини, а не депротромбінізованої плазми. Завершується діагностика кількісним визначенням фактора ІХ.

Лекція 10.

Тема: Скринінгові методи дослідження гемостазу при хворобі Віллебранда.

ХВОРОБА von ВІЛЛЕБРАНДА

Захворювання зумовлене порушенням синтезу або якісними ав маліями аутосомних •компонентів фактора VIII – фактора v.Віллебранда (VIII:vWF) і зв'язаного з ним антигена (vWF:Ag). Як окрема захворювання цей геморагічний діатез вперше описаний в 1926 році von Віллебрандом у мешканців Аландських островів і відомий в літі ратурі під різними назвами: спадкова псевдогемофілія, ангіогемофілія, конституційна тромбоцитопатія. Захворювання не є однорідна геморагічним діатезом, є багато варіантів цієї патології (Z.Rugger T.Zimmerman, 1987; Z.Ruggeri, 1994).

Патогенез. Фактор v.Віллебранда (кофактор ристоцетину) є глікопротеїном, який синтезується в ендотелії судин та мегакаріоцитах. З мегакаріоцитів фактор vW поступає в тромбоцити, де зберігається в а-гранулах. Основна кількість фактора vW синтезується в клітинах ендотелію, звідки поступає в циркуляцію, субендотеліальний матрикс і частинно зберігається в самих ендотеліальних клітинах (в тільцях Weibel-Palade). В плазмі здорової людини фактор vW представлений мульмерами різної молекулярної маси. Фактор v.Віллебранда сприяє адгезії та агрегації тромбоцитів шляхом зв'язування з рецепторами тромбоцитарної мембрани – глікопротеїном Ib на стадії адгезії та глікопротеїнами комплексу IIb-IIIa на стадії агрегації. Цей фактор забезпечує адгезію тромбоцитів до волокон колагену субендотеліальних структур судинної стінки при пошкодженні ендотелію та агрегацію тромбоцитів. Дефіцит v.WF є причиною розладів первинного гемостазу, що проявляється продовженням часу кровотечі у цих хворих.

Крім розладів судинно-тромбоцитарного гемостазу у хворих на хворобу v.Віллебранда спостерігаються розлади коагуляційного гемостазу, зумовлені дефіцитом фактора VIII:C зсідання крові. Фактор v.Віллебранда утворює білковий комплекс з фактором VIII:C, у зв'язку з чим настає своєрідна стабілізація останнього. При відсутності фактора v.Віллебранда фактор VIII:C стає доступним для протеолізу і, не дивлячись на його достатній синтез, активність фактора VIII:C в плазмі знижується. Ген, відповідальний за хворобу v-Віллебранда, локалізується в короткому плечі хромосоми 12 (12p12-ter).

Хвороба v.Віллебранда успадковується по аутосомно-домінантному типу, хворіють як чоловіки, так і жінки. Деякі варіанти захворювання можуть успадковуватися по аутосомно-рецесивному типу.

В даний час виділяють три основні форми (типи) хвороби v.Віллебранда: I, II, III. Серед I та II типу описано 28 підтипів.

Останнім часом Міжнародним комітетом тромбозів і гемостазу затверджена нова класифікація хвороби v.Віллебранда, запропонована Sadler в 1994 році (табл. 12).

Нова таблиця класифікації хвороби v.Віллебранда

Тип (підтип)	Характеристика
Тип 1	Помірний кількісний дефіцит фактора v.Віллебранда
Тип 2	Якісний дефект фактора v.Віллебранда
2A	Надмірний протеоліз, дефект звільнення
2B	Збільшена спорідненість фактора v.Віллебранда до GPIb
2M	Знижена спорідненість фактора v.Віллебранда до GPIb
2N	Знижена спорідненість мультимерів фактора v.Віллебранда до фактора VIII
Тип 3	Важкий кількісний дефіцит фактора v-Віллебранда

Окремі варіанти захворювання відрізняються складом та вмістом плазменних або тромбоцитарних мультимерів vWF, вмістом тромбоцитарного та плазменного антигену v.Віллебранда, активністю тромбоцитарного та плазменного кофактора ристоцетину та іншим (табл.13).

Таблиця 13

Характеристика основних форм хвороби v.Віллебранда

Тип хвороби	Час кровотечі	VIII:C	vWF:Ag	R:Cof	Мультимери vWF	Тп успадкування
I	Продовжений або нормальний	↓	↓	↓	Зменшено рівномірно вміст всіх мультимерів	Аутосомно-домінантний
II	Продовжений	↓N	↓N	↓	Відсутність, або зменшений вміст макромолекулярних мультимерів	Аутосомно-домінантний або рецесивний
III	Продовжений	↓↓	↓↓	↓↓	Відсутність або сліди всіх мультимерів	Аутосомно-рецесивний або домінантний

Примітка:

VIII:C – прокоагулянтна активність FVIII
vWF:Ag – антиген фактора v.Віллебранда
R:Cof – активність кофактора ристоцетину
↓ – активність помірно зменшена
↓ N – активність зменшена або нормальна
↓↓ – активність значно зменшена

Найчастіше зустрічається 1 тип хвороби v.Віллебранда, так званий класичний тип (приблизно у 75% хворих). Ретроспективно встановлено, що саме даний варіант захворювання спостерігався у інших, описаних v.Віллебрандом, пацієнтів.

I тип хвороби v.Віллебранда характеризується однаковим ступенем зниження активності фактора v.Віллебранда, зв'язаного з ним антигену та

прокоагуляційної активності фактора VIII, рівномірним зниженням вмісту всіх мультимерів фактора v.Віллебранда при незмінній їх електрофоретичній характеристиці. Час кровотечі при цій формі захворювання продовжений або нормальний.

Для II типу захворювання характерне зниження активності фактора v.Віллебранда при незначно зменшених або навіть нормальних показниках вмісту антигену v.Віллебранда та прокоагуляційної активності фактора VIII. Відзначається знижений вміст макромолекулярних мультимерів фактора v.Віллебранда, час кровотечі здовжений функціональний дефект фактора v.Віллебранда при підтипі 2A, 2B 2M проявляється розладами процесів адгезії тромбоцитів до місця ураження судинної стінки, а при підтипі 2N – розладами утворення комплексів фактор v.Віллебранда – фактор VIII.

При III типі захворювання активність фактора v.Віллебранда та вміст його антигену значно знижені ($< 5\%$ норми), прокоагуляційна активність фактора VIII $< 15\%$ норми. Значно продовжений час кровотечі, різко знижений вміст всіх мультимерів фактора v.Віллебранда. Диференціація окремих типів захворювання має значення для вибору лікувальної тактики.

Клініка. Для хвороби v.Віллебранда характерний мікроциркуляторно-гематомний тип кровоточивості. В залежності від варіанту захворювання в окремих хворих може переважати мікрвциркуляторний або гематомний характер геморагічних проявів. Інтенсивність геморагічного синдрому в окремих хворих різна: від легких форм до надзвичайно важких. У значній частини хворих захворювання протікає приховано і не всі його форми діагностуються, тому деякі дослідники вважають, що хвороба v.Віллебранда зустрічається частіше, ніж гемофілія.

Важкі форми захворювання проявляються уже в перші роки життя. Характерними є кровотечі зі слизових оболонок, носові кровотечі, а у жінок – рясні, тривалі місячні. Шкірні геморагії частіше характеризуються невеликими синяками і лише при важкому протіканні захворювання можуть виникати більші гематоми. Рідко захворювання ускладнюється шлунково-кишковою кровотечею і гематурією. Одним з характерних проявів захворювання є значні і тривалі кровотечі з ран після навіть незначних травм та операцій (екстракції зубів).

У хворих на хворобу v.Віллебранда кровотеча починається відразу після травми (у хворих на гемофілію – через певний час).

Під час вагітності вміст фактора v.Віллебранда зростає, тому у деяких жінок при пологах не виникає загрозливих для життя кровотеч, але у частини хворих пологи ускладнюються важкими, тривалими кровотечами. Крововиливи у суглоби спостерігаються лише при значному зниженні рівня фактора VIII :C. У таких хворих переважає гематомний тип кровоточивості.

Описані випадки набутого синдрому v.Віллебранда, зокрема при аутоімунних захворюваннях, коли виявляються антитіла проти фактора v.Віллебранда.

Діагноз. У зв'язку з варіабельністю окремих варіантів хвороби v.Віллебранда діагностика даного захворювання не завжди буває легкою. Слід

підкреслити, що для остаточного діагнозу хвороби v.Віллебранда лабораторне обстеження хворого необхідно проводити декілька разів.

Для переважної більшості варіантів захворювання типовим значне здовження часу кровотечі при нормальній кількості тромбоцитів і не змінній ретракції згустка крові, зниження адгезії тромбоцитів до колагену та сполучної тканини, а також зниження рістоцетії агрегації тромбоцитів (агрегація при застосуванні АДФ, тромбіну інших агоністів – у нормі).

Важливою лабораторною ознакою хвороби v.Віллебранда є зниження коагуляційної активності фактора VIII (VIII:C). Зміни коагулограми характерні для гемофілії А: суттєве діагностичне значення N продовження парціального тромбопластинового часу з кефаліном порушення АКТ і тесту генерації тромбопластину. Дефект зсідання крові в цих тестах коригується депротромбінізованою плазмою здорової людини. Порушення функції тромбоцитів у хворих на хворобу v.Віллебранда також нормалізується після додавання плазми здорової людини.

Кількісне визначення фактора v.Віллебранда свідчить про його зниження. Діагноз типу I хвороби v.Віллебранда можна встановити лише на основі дослідження всіх активностей комплексу VIII/vWF (VIII:C, vWF:Ag, кофактор рістоцетину). Визначення кофактора тоцетину (vWF) має важливе значення для діагностики типу II ці захворювання. Виділення окремих підтипів хвороби v.Віллебранда проводиться за допомогою імуноелектрофоретичного аналізу мультимерів vWF.

Для ДНК-діагностики хвороби v.Віллебранда використовують методи виявлення поліморфізму довжини рестриктних фрагментів в гені фактора v.Віллебранда. Для проведення сімейного аналізу на більш інформативне вивчення варіабельного числа тандемних прямих АТСТ-повторів VNTR в інтроні 40-го гену (А.Синха и соавт., 1996).

Диференціальний діагноз слід проводити з гемофілією А, набутими формами синдрому v.Віллебранда, тромбоцитопатією Бернард Сульє, а також псевдосиндромом v.Віллебранда (легка форма геморагічного діатезу, зумовлена патологією тромбоцитів, які мають на своїй поверхні рецептори, легко доступні для великих мультимерів vWF, У зв'язку з чим кількість останніх в плазмі значно зменшується).

Лікування. Субституційну терапію проводять у випадку кровотечі, при підготовці до оперативного лікування, в післяоперційному періоді, при пологах.

З гемостатичною метою хворим на хворобу v.Віллебранда вводять очищені концентрати фактора v.Віллебранда: Facteur Wille-brand, CKTS (E.Berntop, 1994), а при їх відсутності – кріопреципітат або свіжозаморожену плазму. Свіжозаморожену плазму вводять з розрахунку 15 мл/кг маси, кріопреципітат – з розрахунку 15 од/кг маси.

Період піврозпаду фактора v.Віллебранда дорівнює приблизно 19 годинам. Динаміка коагуляційної частини фактора VIII у хворих на хворобу v.Віллебранда після трансфузії відповідних препаратів відрізняється від динаміки у хворих на гемофілію А.

При хворобі v.Віллебранда безпосередньо після введення свіжозамороженої плазми або кріопреципітату швидко підвищується активність фактора VIII:C (перша хвиля підвищення активності зумовлена введенням фактора VIII з препаратом крові), пізніше активність фактора VIII дещо знижується, що пов'язане з розпадом введеного фактора. Після цього починається друга хвиля підвищення коагуляційної активності фактора VIII:C, зумовлена синтезом його в організмі від впливом фактора v.Віллебранда. Максимум коагуляційної активності фактора VIII спостерігається в кінці першої доби після трансфузії, пізніше активність його поступово знижується. Корекція часу кровотечі є дещо коротшою. Р.Манніссі (1994) вважає найбільш ефективним сумісне введення кріопреципітату та концентрату тромбоцитів.

Враховуючи динаміку компонентів введеного ззовні фактора VIII в організмі реципієнта, повторні “підтримуючі” введення свіжозамороженої плазми або кріопреципітату при кровотечах можна проводити один раз на добу. При перевазі порушень судинно-тромбоцитарного гемостазу трансфузії вказаних препаратів слід проводити 2 рази на Добу з інтервалом 12 год (Л.П.Папаян, 1996). Слід відмітити, що введення очищених препаратів фактора VIII хворим на хворобу у.Вілле-бранда малоефективне тому, що вони не містять великих мультимерів фактора у.Віллебранда (vWF), хоча J.Scharrer і співавт. (1994) відзначають ефективність у цих хворих концентрату FVIII – Haemate HS. Принципи трансфузійної терапії не відрізняються від лікування гемофілії. у випадку планової операції перше введення вказаних препаратів рекомендується провести за добу до операції, а у випадку пологів – при перших проявах пологової діяльності з розрахунком на синтез фактора VIII в організмі. В післяопераційному періоді концентрацію фактора VIII необхідно утримувати на рівні вище 50%.

Рясні менструальні кровотечі є показанням для застосування контрацептивних препаратів (інфекундин, местранол), Е-АКК. У деяких хворих з важкою формою захворювання при тривалих масивних менструаціях, які приводять до важкої анемізації, обґрунтована рентгенівська стерилізація (особливо, при наявності антитіл до фактора VIII).

При легких формах захворювання гемостатичний ефект може спостерігатися при застосуванні Е-АКК в дозі 0,2 г/кг маси на добу. У хворих з легкими формами хвороби v-Віллебранда I типу ефективно також застосування десмопресину (DDAVP). Препарат вводять дожи-льно в дозі 0,3 μ г/кг маси в 50 мл фізрозчину протягом 15-30 хвилин один раз на добу. Ефективність DDAVP у хворих на I тип хвороби v-Віллебранда зумовлена тим, що при даному варіанті захворювання спостерігається кількісний дефіцит фактора vW. без порушення його структури. DDAVP стимулює виділення з гранул зберігання ендотеліальних клітин і тромбоцитів функціонально повноцінного фактора vW. Ефективність препарату обмежена 3 днями, у зв'язку з вичерпанням фактора vW. з місць збереження і необхідністю часу на синтез його поповнення. DDAVP можна застосовувати також інтрана-зально за допомогою спеціального пульверизатора (J.Luscher, 1994), Одночасно з DDAVP призначають антифібринолітичні препарати (DDAVP стимулює фібриноліз). У хворих з

важкими формами захворювання, зокрема при типі III хвороби v.Віллебранда, десмопресин неефективний, а у випадках підтипу IIВ може зумовити тромбоцитопенію.

Рідко спостерігається утворення антитіл проти vWF. У випадку кровотеч у таких хворих з ефектом застосовували рекомбінантний фактор Vila (N.Ciavarella і співавт., 1996).

Лекція 11.

Тема: Скринінгові методи дослідження гемостазу при тромбоцитопеніях.

Патологія мегакаріоцитарного апарату

Причиною кровотеч можуть бути:

1. Кількісні зміни тромбоцитів – тромбоцитопенії.
2. Якісні зміни тромбоцитів – тромбоцитопатії.

При деяких захворюваннях спостерігається комбінація цих двох механізмів, тобто при зниженій кількості тромбоцитів виявляється ще й їх функціональна неповноцінність [5, 39, 40, 41, 42, 44].

Розглянемо тромбоцитопенії, які зустрічаються найчастіше.

Тромбоцитопенії, зумовлені дією хімічних речовин та медикаментів, які гальмують утворення тромбоцитів

Тромбоцитопенія може розвинутиися при різних ендогенних та екзогенних інтоксикаціях, отруєнні деякими речовинами. Загальновідома тромбоцитопенія, зумовлена токсичним впливом на мегакаріоцити тіазидових сечогінних. Кількість тромбоцитів у таких випадках знижується поступово, в кістковому мозку зменшена кількість мегакаріоцитів. Крім безпосереднього токсичного впливу цих медикаментів на мегакаріоцити, дискутується також імовірність утворення антитромбоцитарних антитіл [5].

Описані випадки тромбоцитопенії у новонароджених, матері яких під час вагітності приймали тіазидові сечогінні. Через 2-3 тижні після народження кількість тромбоцитів у таких дітей нормалізується.

Тромбоцитопенія є частим ускладненням хронічного алкоголізму. Кількість мегакаріоцитів у кістковому мозку хворих може бути зниженою або нормальною. Механізм дії алкоголю на мегакаріоцитарний апарат не в'яснений. Під впливом алкоголю можуть також виникати функціональні зміни тромбоцитів та скорочуватись час їх життя. Після припинення вживання алкоголю кількість тромбоцитів повертається до норми протягом перших 3 тижнів [5].

Тромбоцитопенії, зумовлені вірусними інфекціями

Причиною тромбоцитопенії може бути ураження мегакаріоцитарного апарату вірусами [5].

Показано, що деякі віруси можуть підлягати реплікації в мегакаріоцитах, в результаті чого в мегакаріоцитах виникають дегенеративні зміни. Такий механізм виникнення тромбоцитопенії спостерігається при інфекційному мононуклеозі, Епштейн-Бар-вірусній інфекції, вітрянці, цитомегаловірусній інфекції, епідемічному паротиті, краснусі.

Однією з причин тромбоцитопенії новонароджених може бути саме таке ураження мегакаріоцитів вірусами (краснуха новонароджених, зараження цитомегаловірусом).

Аутоімунні тромбоцитопенії

Аутоімунна тромбоцитопенічна пурпура (АІТП) характеризується як гострий, або хронічний геморагічний діатез з ізольованим дефіцитом тромбоцитів та мікроциркуляторним типом кровоточивості.

Вперше АІТП описав Р.Werlhof у 1735 році у 10-річної дівчинки. Пізніше це захворювання одержало назву “хвороба Верльгофа”. В даний час аутоімунні форми тромбоцитопенії, причину аутоагресії при яких встановити не вдається, об’єднані під загальною назвою “ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура” (ІТП). Виділяють гострі та хронічні форми захворювання [5].

Гостра аутоімунна тромбоцитопенічна пурпура

Гостра аутоімунна тромбоцитопенічна пурпура – це захворювання переважно дитячого віку. Найчастіше спостерігається у віковій групі 2-9 років. Хлопчики та дівчатка хворіють з однаковою частотою У 60-80% випадків перед виникненням АІТП передує вірусна інфекція верхніх дихальних шляхів або травного тракту. Частіше тромбоцитопенія виявляється через 2-21 днів після перенесеного інфекційного захворювання. Приблизно в 10% випадків виникнення АІТП пов’язують з вірусом вітряної віспи, Епштейн-Бар-вірусом, а також іншими вірусними інфекціями. Описані випадки АІТП після профілактичних щеплень, імунотерапії БЦЖ [5].

Гостра АІТП в дорослому віці зустрічається рідкоЛише в окремих хворих перед виникненням АІТП вдається виявити перенесене інфекційне захворювання. Частіше тромбоцитопенічний синдром розвивається серед повного здоров’я у людей старших вікових груп.

Прояви. Захворювання починається гостро проявами загального геморагічного діатезу мікроциркуляторного типу. На шкірі з’являються дрібно-точкові петехії, невеликі синяки, геморагічні висипання на слизовій оболонці ротової порожнини. Характерні кровотечі зі слизових оболонок: носові кровотечі, кровотечі з ясен. Інтенсивність геморагічного синдрому залежить від ступеня дефіциту тромбоцитів. У важких випадках можуть бути кровотечі з травного тракту, ниркові кровотечі. Внутрішньочерепні крововиливи у дітей спостерігаються дуже рідко – менше, ніж в 1% випадків, головним чином у дітей, віком понад 10 років.

Прогноз захворювання, особливо, у дітей, звичайно сприятливий. Через декілька днів після лікування інтенсивність геморагічного синдрому зменшується, хоча тромбоцитопенія утримується. У 80-90% хворих в середньому через 4-16 тижнів настає спонтанневилікування. В деяких випадках тромбоцитопенія утримується до 12 місяців. За даними літератури приблизно у 10% випадків захворювання переходить в хронічну форму [5].

Хронічна аутоімунна тромбоцитопенічна пурпура (ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура)

Хронічні форми аутоімунної тромбоцитопенії (тривалістю більше 6 місяців), причину аутоагресії при яких вияснити не вдається, прийнято називати ідіопатичною тромбоцитопенічною пурпурою ІТП) [5].

Причина ІТП до цього часу не в'ясна. Зв'язати початок ІТП з будь-яким іншим захворюванням не вдається, хоча у деяких хворих, особливо, у дітей, в анамнезі можна виявити вірусну, рідше бактеріальну інфекцію, перенесену 4-6 тижнів перед маніфестацією геморагічного синдрому, або недавно проведене профілактичне щеплення.

Часто захворювання починається у період статевого дозрівання, однак ІТП може проявитися в кожному віці. Хворіють переважно жінки. Захворюваність ІТП серед жінок в 3-4 рази вища порівняно з чоловіками. Частіше захворювання починається поступово і має хронічно-рецидивуючий або затяжний характер.

Розвиток. Захворювання зумовлене посиленням і прискореним руйнуванням тромбоцитів внаслідок дії аутоантитіл, спрямованих проти власних тромбоцитів.

Деякі автори вважають, що у виникненні ІТП мають значення гормональні фактори, зокрема, естрогени. Для підтвердження цієї думки приводять факти, що ІТП частіше починається у жінок у період статевого дозрівання, під час вагітності або в клімактеричному періоді [5].

Прояви. Основними клінічними симптомами є кровотечі зі слизових оболонок та петехіальні висипання на шкірі. Кровоточивість при ІТП має мікроциркуляторний характер. Геморагічні висипання на шкірі виникають, переважно, без конкретних причин. Характерні для тромбоцитопенії дрібно-точкові петехії та невеликі синяки. Екхімози частіше локалізуються на передній поверхні тулуба, верхніх та нижніх кінцівках. В місцях ін'єкцій утворюються крововиливи більших розмірів. Великі гематоми, типові для коагулопатій, при ІТП не бувають. Найбільш характерні для ІТП профузні кровотечі з носа, з ясен, а у жінок – тривалі та рясні менструації [5].

Імунна тромбоцитопенія при ВІЛ-інфекції

У 3-9% всіх ВІЛ-інфікованих пацієнтів виникає типова імунна тромбоцитопенія. Дискутуються наступні патогенетичні механізми: 1) пряма дія вірусу на мегакаріоцити; 2) пошкодження тромбоцитів циркулюючими імунними комплексами, природа яких до цього часу не ідентифікована; 3) утворення специфічних до тромбоцитів аутоантитіл проти різних чітко неідентифікованих антигенів.

Тромбоцитопенія, асоційована з ВІЛ-інфекцією, частіше спостерігається у новонароджених від ВІЛ-позитивних матерів та у дітей раннього віку. У дорослих АІТП частіше виявляється серед ВІЛ-позитивних пацієнтів групи ризику. Значне зниження кількості тромбоцитів (менше $30 \cdot 10^9/\text{л}$) і відповідно прояви геморагічного діатезу спостерігаються приблизно у третини хворих на АІТП, асоційованої з ВІЛ-інфекцією. У більшості хворих кількість тромбоцитів вище критичного числа. Можуть спостерігатись тривалі спонтанні ремісії. Особливо важкий клінічний перебіг тромбоцитопенії спостерігається у хворих на гемофілію, інфікованих ВІЛ [5].

Тромбоцитопенії при інфекційних захворюваннях

Однією з причин розвитку тромбоцитопенії, особливо у дітей, є інфекційні захворювання. Тромбоцитопенія може виникнути при малярії, віспі, черевному та висипному тифі, корі, скарлатині, дифтерії, сепсисі, інфекційному мононуклеозі, бруцельозі, лейшманіозі, грипі, сифілісі, туберкульозі, інфекційних захворюваннях верхніх дихальних шляхів та інших. У деяких хворих тромбоцитопенія може розвинути як ускладнення профілактичних щеплень [5].

Розвиток. Можливі два механізми утворення антитіл: 1) антитіла утворюються проти чужого антигена, фіксованого на поверхні тромбоцитів хворого. Це так звана “гаптенова” тромбоцитопенія (гетероімунна тромбоцитопенія). В даному випадку роль гаптена відіграє вірус або мікроб, фіксований на поверхні тромбоцита; 2) під дією вірусу або мікроба змінюється антигенна структура тромбоцитів, що веде до утворення антитіл проти власних тромбоцитів (аутоімунна тромбоцитопенія).

Прояви. У більшості хворих симптоми кровоточивості проявляються на початкових стадіях інфекційного захворювання. Частота ускладнення тромбоцитопенією не завжди співпадає з важкістю основного процесу. Деколи при доволі легкому протіканні інфекційного захворювання виникає важка тромбоцитопенія.

Геморагічний синдром проявляється гостро і характеризується кровоточивістю мікроциркуляторного типу, притаманною тромбоцитопенічному синдрому. Геморагічне ускладнення, звичайно, перебігає бурхливо з інтенсивною кровоточивістю.

В окремих випадках тромбоцитопенія може розвинути через деякий час після перенесеного інфекційного захворювання – це так звані післяінфекційні тромбоцитопенії. Виникнення їх співпадає з періодом, необхідним для нагромадження імунних антитіл – тобто через 10-14 днів після перенесеної інфекції.

Інколи у період захворювання може спостерігатись незначне збільшення лімфатичних вузлів, селезінки. Тривалість геморагічного синдрому – переважно 2-4 тижні. Виздоровлення супроводжується нормалізацією кількості тромбоцитів [5].

Медикаментозні імунні тромбоцитопенії

Деякі медикаменти (хінін, хінідин, седормід, пірамідон, сульфаніламідні препарати, саліцилати, барбітурати, стрептоміцин, препарати миш'яку, золота, фуросемід та інші) можуть бути причиною виникнення імунної тромбоцитопенії [5].

Розвиток. Чому у деяких людей вказані медикаменти викликають утворення антитромбоцитарних антитіл, а у інших ні, питання до цього часу не вияснене. Відомі два механізми утворення антитіл:

1. Медикамент у цих випадках відіграє роль гаптена. З'єднуючись з білком мембрани тромбоцита, він набуває властивість антигена, завдяки чому в організмі утворюються антитіла і в результаті реакції антиген-антитіло

тромбоцити руйнуються. Антитіла, які утворюються при вказаному механізмі, називають “медикаментозалежними”, вони діють тільки при наявності медикаменту або його метаболітів. Це так званий “гаптеновий” тип тромбоцитопенії (гетероімунна форма). При блокуванні тромбоцитів медикаментозалежними антитілами і активації системи комплементу вони швидко руйнуються.

2. Медикамент або його метаболіти змінюють поверхню тромбоцита так, що вона “розпізнається” імунною системою як чужа, у зв’язку з чим імунна система відповідає утворенням антитіл. Це так званий “аутоімунний” тип тромбоцитопенії. Аутоантитіла зв’язуються переважно без активації комплементу і зумовлюють більш повільне руйнування тромбоцитів – екстравазальний фагоцитоз [5].

Тромбоцитопенія не виникає після першого прийому медикаменту, для утворення антитіл необхідний певний час. Попередня сенсibilізація може протікати по-різному: деколи для утворення антитіл достатньо 1-2 прийоми медикаменту або близьких за хімічною структурою препаратів, в інших випадках сенсibilізація виникає після тривалого багаторазового прийому деяких ліків.

Прояви. Захворювання починається гостро. У хворих з “гаптеновим типом” тромбоцитопенії протягом короткого часу після прийому медикаменту можуть появиться дрощі, підвищення температури тіла, а в перші 6-24 години виникають петехії, крововиливи та кровотечі. При “аутоімунному” механізмі тромбоцитопенії прихований період може тривати декілька днів. Перебіг захворювання гострий. Клініка характерна для тромбоцитопенії кожного генезу. Важкість геморагічного синдрому залежить від дози та тривалості прийому медикаменту. Характерно, що після відміни ліків симптоми кровоточивості швидко зменшуються. Число тромбоцитів відновлюється поступово з повною нормалізацією на 7-10-ий день. При “аутоімунних формах” відновлення числа тромбоцитів може тривати декілька тижнів. Вилікування повне, але повторний прийом даного медикамента або його аналога викликає рецидив захворювання [5].

Лекція 12.

Тема: Скринінгові методи дослідження гемостазу при тромбоцитопатіях.

Тромбоцитопатії

Тромбоцитопатії – це група геморагічних синдромів, зумовлених спадковою або набутою якісною неповноцінністю або дисфункцією тромбоцитів [5].

При спадкових тромбоцитопатіях підвищена кровоточивість виявляється з раннього дитинства, захворювання протікає з періодами загострення та періодами відносного клінічного затишшя. Часто вдається виявити підвищену кровоточивість у членів родини хворого. Важливе значення має також відсутність у пацієнта захворювань, які перебігають з симптоматичною тромбоцитопатією, а також заперечення хворого щодо прийому медикаментів за останній час. Спадкові тромбоцитопатії спостерігаються рідко.

Порівняно невелика тривалість геморагічного діатезу або гострий початок його, наявність у пацієнта захворювання, яке перебігає з симптоматичною тромбоцитопатією, а також прийом медикаментів є підставою запідозрити набуту тромбоцитопатію.

Прояви. Симптоматичні тромбоцитопатії характеризуються кровоточивістю мікроциркуляторного типу. Найчастіше спостерігаються кровотечі з носа, ясен, маткові кровотечі (рясні та тривалі менструації), геморагічні висипання на шкірі, які виникають, переважно, без суттєвих причин у вигляді дрібноточкових петехій та невеликих синяків. Рідко можуть виникати шлункові та ниркові кровотечі, а також підвищена кровоточивість при порізах та оперативних втручаннях (екстракція зубів, тонзилектомія).

Медикаментозні тромбоцитопатії

На особливу увагу заслуговують медикаментозні тромбоцитопатії у зв'язку з тим, що вони можуть бути причиною важких кровотеч, особливо, якщо генез їх не є встановленим, і хворий продовжує приймати даний медикамент. Кількість медикаментів, які можуть впливати на обмін речовин тромбоцитів і викликати суттєві дефекти їх функції, велика. В залежності від домінуючого ефекту медикаменту ці тромбоцитопатії поділяють на окремі групи [5].

1. Інгібітори обміну арахідонової кислоти:

а) інгібітори фосфоліпаз (антималарійний препарат хінакрин, деякі стероїдні гормони в високих дозах, зокрема, гідрокортизон);

б) інгібітори циклооксигенази (всі нестероїдні протизапальні середники – ацетилсаліцилова кислота, індометацин, бутадіон, ібупрофен, напроксен та інші).

Найчастіше зустрічається кровоточивість, зумовлена прийомом ацетилсаліцилової кислоти (АСК). Порушення функції тромбоцитів настає уже через 2 години після прийому аспірину і утримується протягом 6-10 днів після його

відміни (тобто протягом життя циркулюючих у період прийому АСК тромбоцитів).

2. Збільшення концентрації цАМФ в тромбоцитах може здійснюватись: шляхом гальмування деградації цАМФ інгібіторами фосфодіестерази, до яких належать дипіридабол (курантил, персантин), теофілін, еуфілін, папаверин та інші. Вказані препарати гальмують адгезію тромбоцитів до скла та субендотелію.

3. Антибіотики.

Високі дози антибіотиків пеніцилінового ряду, зокрема, карбеніцилін, можуть привести до продовження часу кровотечі, гальмування агрегаційної та секреторної функції тромбоцитів [5].