

Современные принципы и подходы к распознаванию клинически значимых нарушений гемостаза

Момот А.П.

Алтайский филиал ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр гематологии» МЗ РФ

Лаборатория гематологии ЦНИЛ
Алтайского государственного медицинского университета

г. Барнаул, 6-7 сентября 2017 г.

Типовые варианты критических нарушений в системе гемостаза



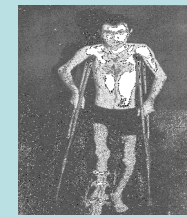
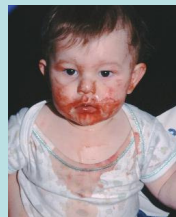
I. ДВС-синдром и его маски (ТТП, ГУС и др.)



II. Тромбозы и тромбоземболии (включая ТЭЛА)



III. Кровотечения при гемофилии, болезни Виллебранда, глубокой тромбоцитопении или выраженной дисфункции тромбоцитов



Современная схема гемостатических реакций

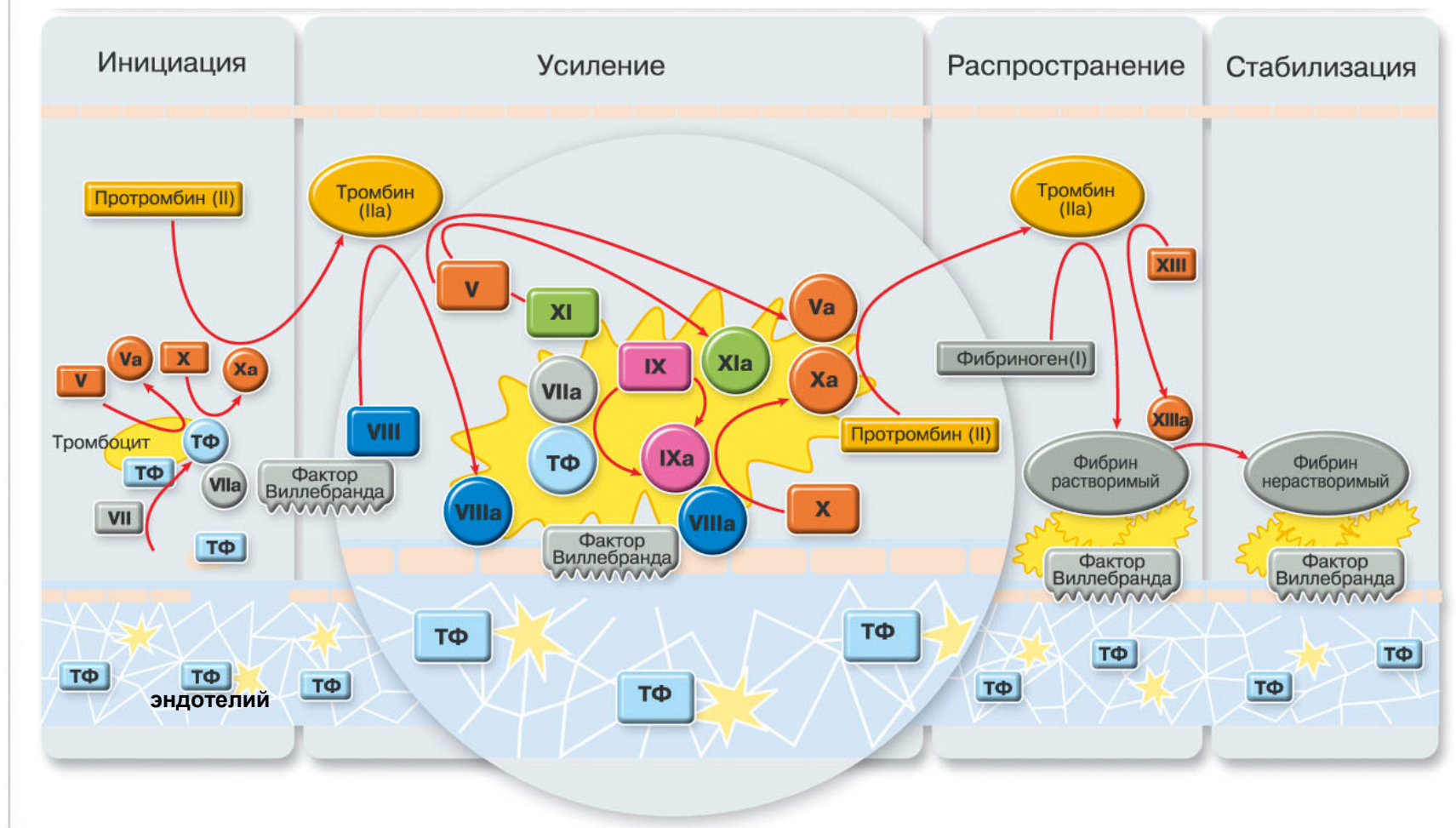
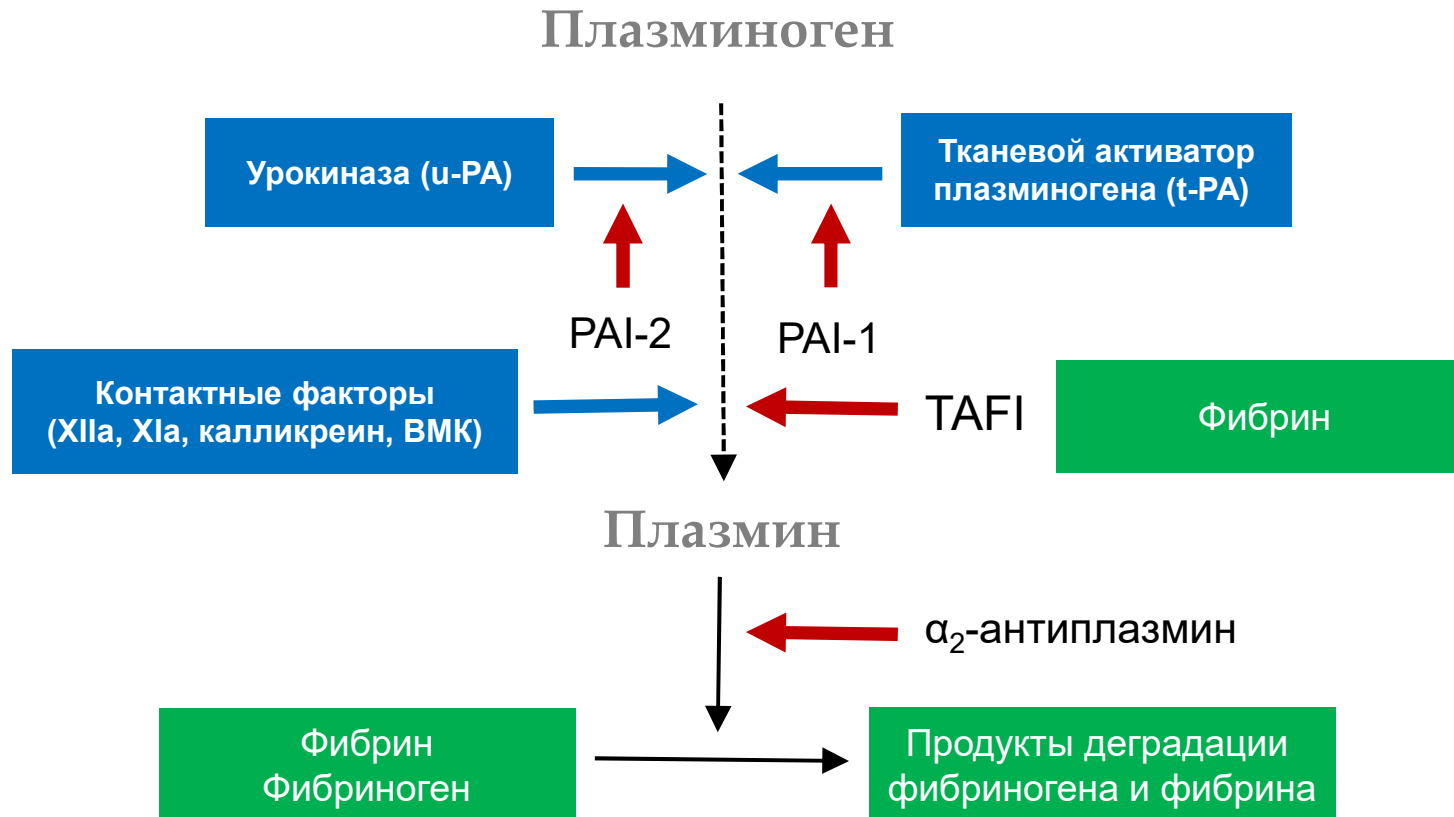


Схема фибринолитических реакций



→ Активация
→ Ингибирование

PAI-1 и PAI-2 – ингибиторы активации плазминогена 1 и 2 типа
ВМК – высокомолекулярный кининоген

Методология клинико-лабораторной диагностики нарушений в системе гемостаза

Принцип № 1. Использование современных методов исследования и соответствующего высокоточного оборудования

Принцип № 2. Соблюдение этапности (последовательности) обследования (первичный скрининг, затем проведение уточняющих методов исследования)

Принцип № 3. Применение интегральных (традиционных и новых) методов исследования при решении неотложных задач в случае возникновения или опасности развития тромбозов или кровотечений

Принцип № 4. Использование фиксированных алгоритмов диагностики с учетом имеющегося анамнеза и получаемых медикаментов (ситуационная диагностика)

Принцип № 5. Учет генетической предрасположенности к нарушениям в системе гемостаза

Принцип № 1. Использование современных методов исследования и соответствующего высокоточного оборудования

- **оценка числа и функции тромбоцитов** (изучение количества, адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов путем микроскопии, а также с использованием гематологических анализаторов и агрегометров);
- **коагуляционные (хронометрические) функциональные методы** (измерение времени образования тромбина или фибрина в различных модификациях мануально или с использованием регистраторов разных конструкций), либо оценка фибринолиза по измерению времени лизиса или растворения фибринового сгустка);
- **амидолитические методы с применением хромогенных субстратов** (определение активности антитромбина III, уровней плазминогена, факторов VIII, X, XIII на фотометрах или автоматических коагулометрах);
- **иммунологические методы** определение уровня искомого антигена (или антител) при антифосфолипидном синдроме, гепарин-индуцированной тромбоцитопении, гипергомоцистеинемии, при измерении D-димеров и др.;
- **генетические методы** (выявление носительства мутации фактор V Лейден, мутации гена фактора II (протромбина), а также ряда полиморфизмов генов ферментов, участвующих в гемостатических реакциях и обмене метионина).



АФС – антифосфолипидный синдром
ГИТ – гепарин-индуцированная тромбоцитопения

**Принцип № 1. Использование современных методов исследования
и соответствующего высокоточного оборудования**

Проблема со стандартизацией ...

Эффективность варфаринотерапии зависит от достижения необходимого уровня МНО

Величина МНО	эффект
Менее 1,3	риск тромбоза
Более 4,5	риск кровотечения

Цель исследования

Сравнительный анализ результатов МНО при мониторингировании антикоагулянтных эффектов варфарина тест-системами отечественного и зарубежного производства

Материалы и методы

В качестве образцов использовали кровь практически здоровых людей (от 20 до 34 лет) и больных с ВТЭО в анамнезе, находящихся в стабильной фазе варфаринотерапии.

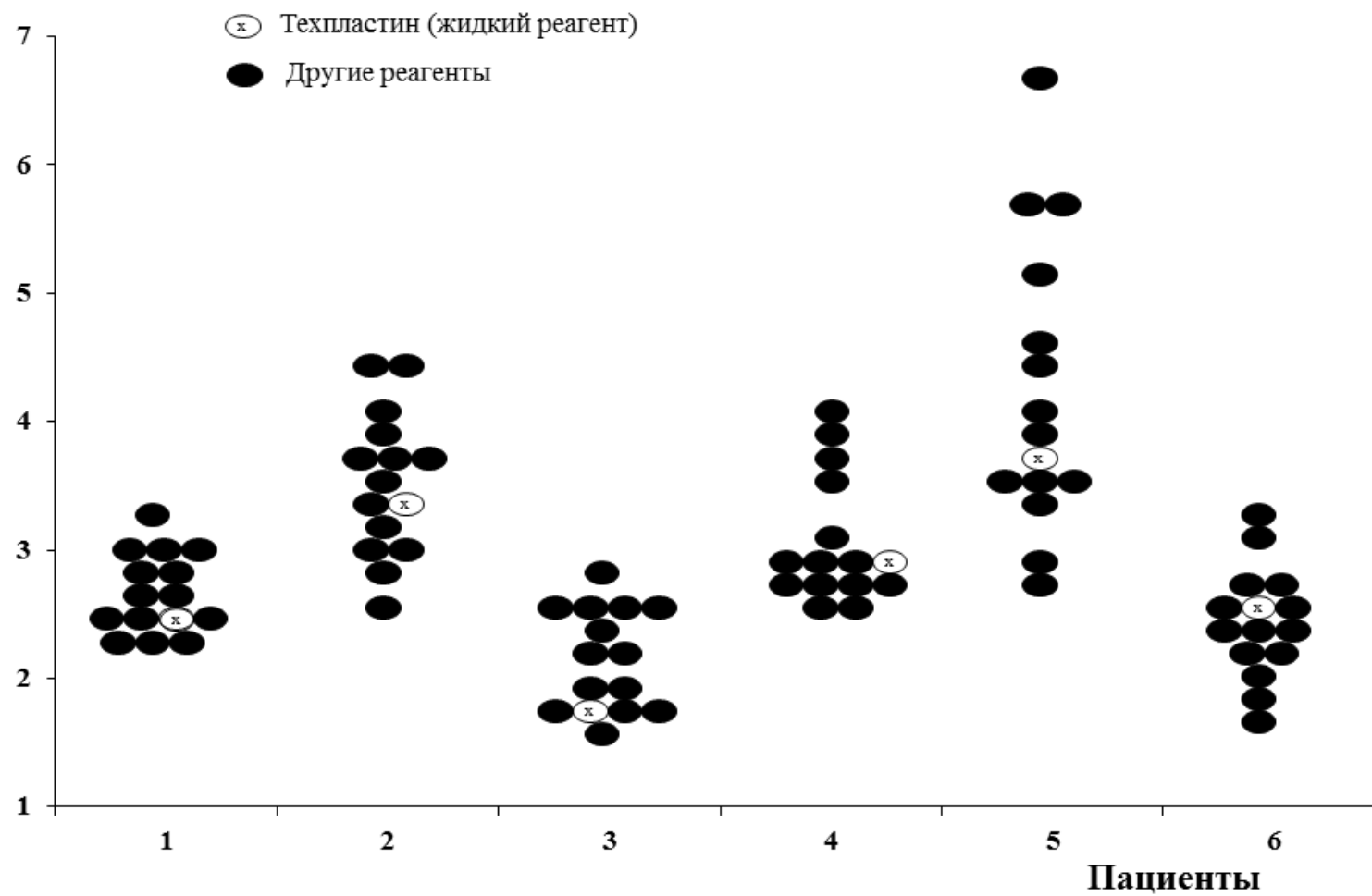
Определение ПВ проводили с использованием полуавтоматического коагулометра Star 4 (Roche) с механическим принципом регистрации сгустка.

Момот А.П., Мамаев А.Н. и соавт., 2016

Перечень исследованных тромбопластинов

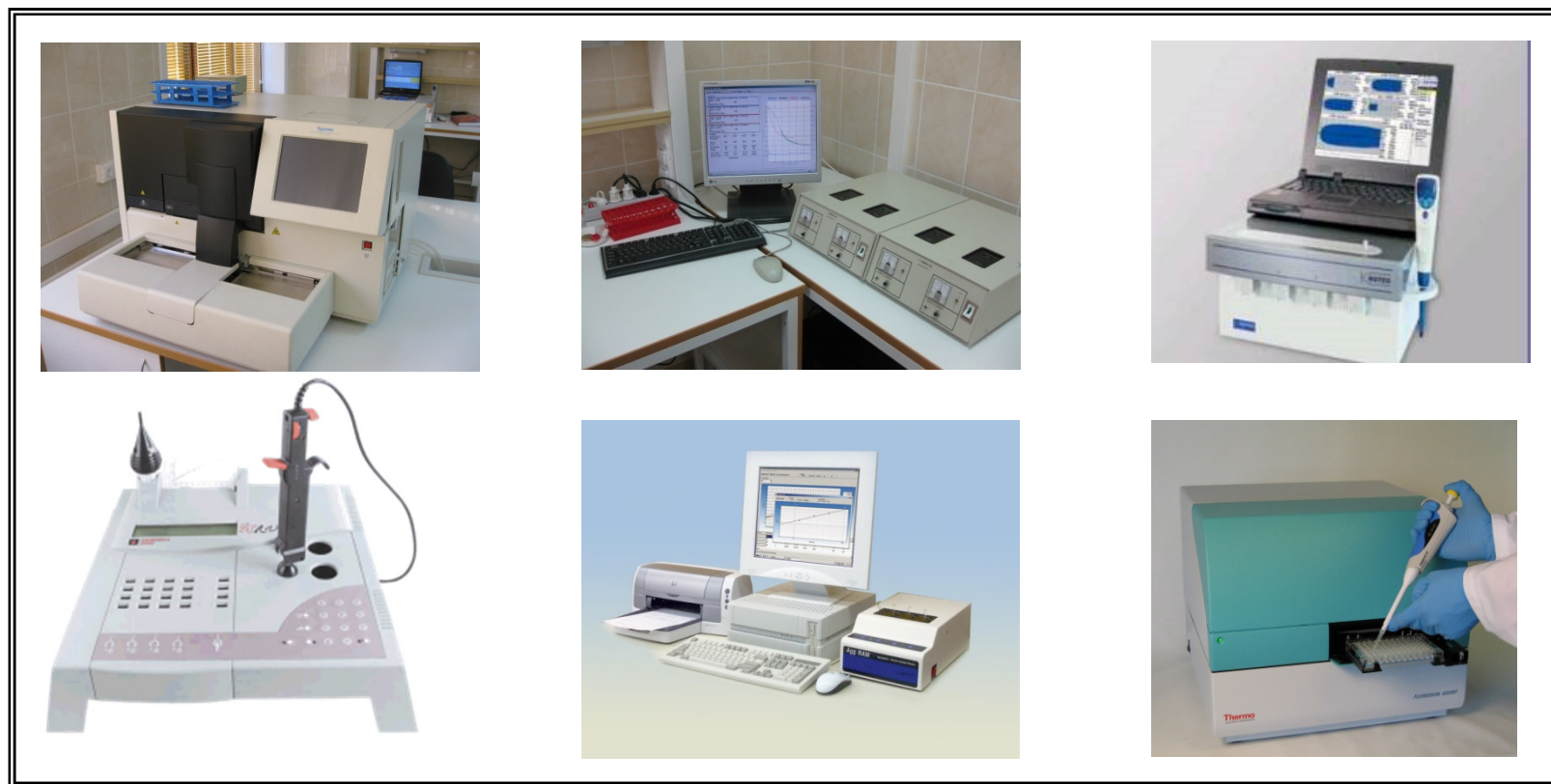
№	Наименование реагентов	МИЧ
1	Dade Innovin, Siemens, (lot-539236)	0,94
2	Neoplastine R 15, Diagnostica Stago (lot - 109991)	0,97
3	Тромбопластин, ЭМКО, серия 130305	1,00
4	Hemosil RecombiPlasTin 2G, Instrumentation Laboratory, (lot-N0821174)	1,03
5	Thromboplastin PT-S-4, Cormay, (лот 208-19)	1,04
6	Medi PT reagent, BioMedica Diagnostics Inc. серия 010U-B265A	1,06
7	Thromborel S, Siemens, (lot-545492)	1,08
8	Техпластин, Технология-Стандарт, серия Д 31248	1,10
9	Тромбопластин-тест (сухой), ГНУ ИФОХ НАН Беларуси, серия 280213	1,10
10	TriniCLOT PT excel S 6 мл, ISI-1,06, Tcoag, (lot –C279014)	1,12
11	HemoStat Thromboplastin-SI, Human, (лот 12016)	1,17
12	Thromboplastin LI, Helena, (лот-21093640)	1,19
13	Ренампластин ПГ 5/1, Ренам, серия 1113	1,20
14	Neoplastine CL Plus 5, Diagnostica Stago (lot - 110240)	1,25
15	Thromboplastin PT-4, Cormay, (лот 20-210)	2,19

МНО



г. Барнаул, 6-7 сентября 2017 г.

Принцип № 1. Использование современных методов исследования и соответствующего высокоточного оборудования



Принцип № 2. Соблюдение этапности (последовательности) обследования (первичный скрининг, затем применение уточняющих методов исследования)

1 этап обследования

Скрининговые методы исследования системы гемостаза:

- время кровотечения
- количество тромбоцитов в крови
- протромбиновое время (ПВ)
- активированное парциальное/частичное тромбопластиновое время (АПТВ/АЧТВ)
- концентрация фибриногена

Стандартизированные скрининговые коагуляционные (хронометрические) тесты - АПТВ/АЧТВ и протромбиновый

Принцип № 2. Соблюдение этапности (последовательности) обследования (первичный скрининг, затем применение уточняющих методов исследования)

2 этап обследования

Дифференцирующие, уточняющие методы исследования системы гемостаза:

- при оценке функции тромбоцитов, активности фактора Виллебранда, факторов VIII и IX, антитромбина III, компонентов системы протеина C, наличия волчаночного антикоагулянта, активаторов и ингибиторов фибринолитических реакций, уровня D-димеров и ряда других показателей

*Зона ответственности – специализированные лаборатории
диагностики нарушений гемостаза*

Маркеры активации свертывания крови/фибринолиза

- Фибринопептид А
- D-димеры
- Фрагменты протромбина 1+2
- Комплекс тромбин-антитромбин
- Фибрин-мономер

D-димер

- Наиболее детально изученный маркер активации гемостаза и фибринолиза
- Имеется огромное количество клинических исследований, доказывающих диагностическую и прогностическую эффективность
- Разработаны и утверждены уровни принятия решения, например, для исключения венозных тромбоэмболических осложнений
- Удобные и клинически приемлемые методы определения и оборудование, позволяющие быстро получить точный результат

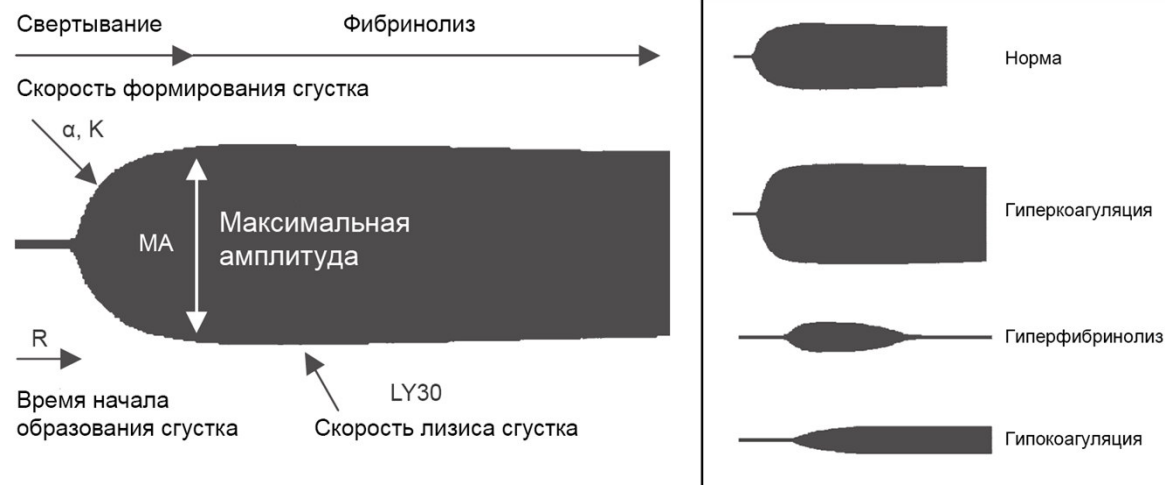
Методы определения D-димера

- **Качественные и полуколичественные тесты** – основаны на визуальной детекции наличия или отсутствия агглютинации частиц латекса или эритроцитов, носителей моноклональных антител. Отличаются низкой чувствительностью и информативностью
- **Количественные тесты:**
 - *на основе ELISA* – высокая чувствительность, длительное и трудоемкое выполнение, дорогостоящи
 - *на основе иммунотурбидиметрии* – наиболее адаптированы к клиническому применению и достаточно информативны

Принцип № 3. Применение интегральных (традиционных и новых) интегральных методов исследования при решении неотложных задач в случае возникновения или опасности развития тромбозов или кровотечений

- **Тромбоэластометрия/тромбоэластография**
- **Тест генерации тромбина (метод калиброванной тромбографии)**
- **Тромбодинамика/Тромбодинамика-4D**
- **Низкочастотная пьезотромбоэластография цельной крови**

• Тромбоэластометрия/тромбоэластография



Тромбоэластометрия базируется на измерении физической прочности сгустка.

Небольшое количество крови (обычно около 0,4 мл) помещается в кювету, которая совершает медленные вращательные колебания на 4,5°.

В камеру помещается стержень датчика и добавляются активаторы свертывания.

Когда в кювете формируется сгусток, стержень начинает вращаться вместе со сгустком. Амплитуда отклонения стержня регистрируется как функция времени.

Основные численные параметры тромбоэластограммы TEG® (слева) и примеры ее внешнего вида в случае различных отклонений в системе свертывания (справа)

- **Тест генерации тромбина (метод калиброванной тромбографии)**

Принцип теста генерации тромбина

заключается в измерении количества тромбина (в nM), который образуется при рекальцификации цитратной плазмы в присутствии фиксированной концентрации тканевого фактора (TF) и флюорогенного субстрата

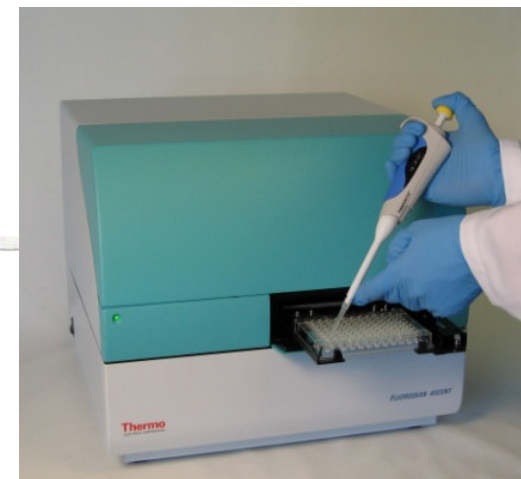
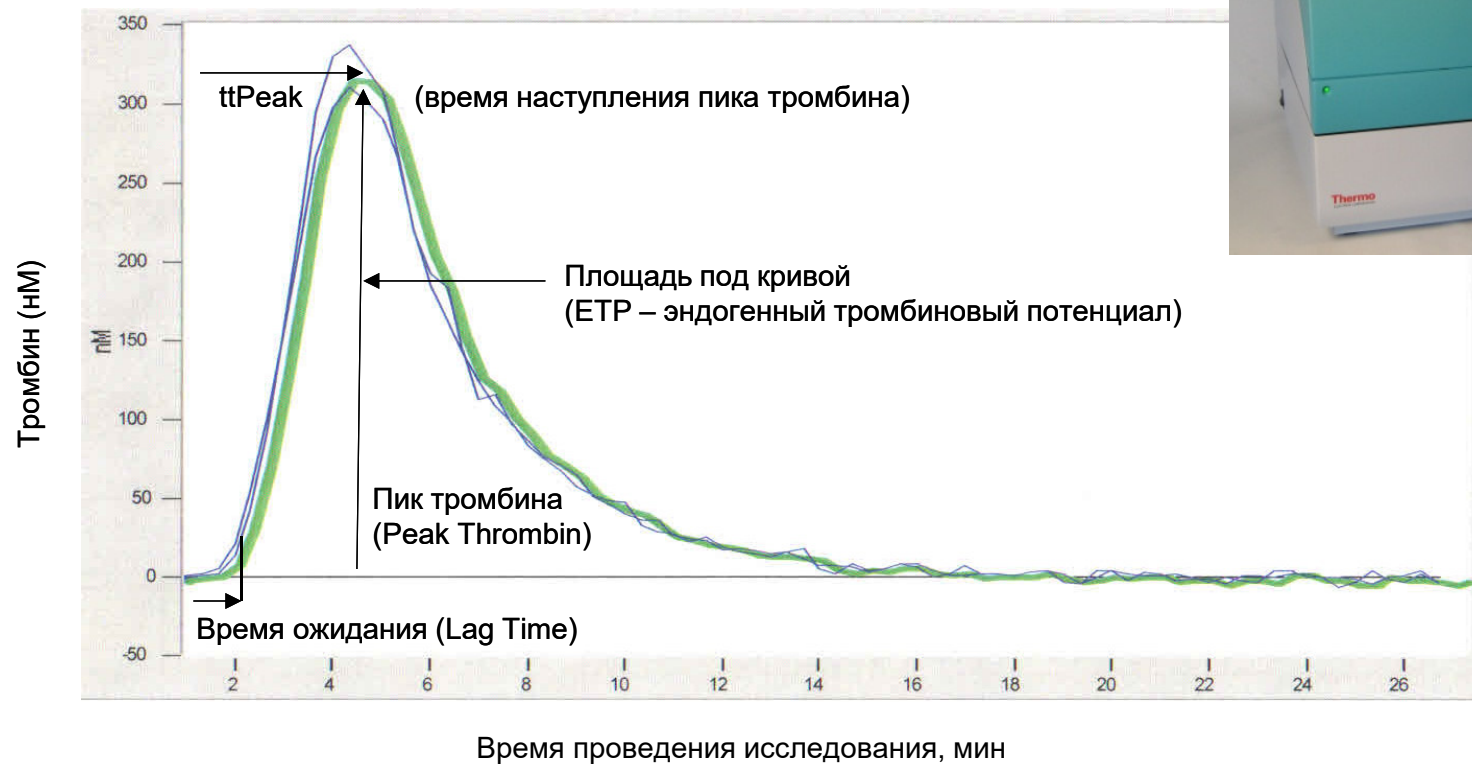
Hemker H.C. et al. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system // Thromb Haemost. - 2006. – V. 96, № 5. - P. 553-561.



Конрад Хемкер



- **Тест генерации тромбина (метод калиброванной тромбографии)**



- **Тест генерации тромбина (метод калиброванной тромбографии)**

Тромбофилии
и факторы тромбогенного
риска

- ✚ мутации FV Leiden, протромбина, полиморфизм генов PAI-1, MTGFR, MTR, MTRR, FI, ITGA2- α 2, ITGB3-b и др.
- ✚ сахарный диабет, гипер- и дислипидемии, рак, варикозная болезнь, легочная и сердечная недостаточность, АФС, полиглобулия, инфекция, прием L-аспарагиназы, травма, операция, гиподинамия, ожирение, прием эстрогенов ...

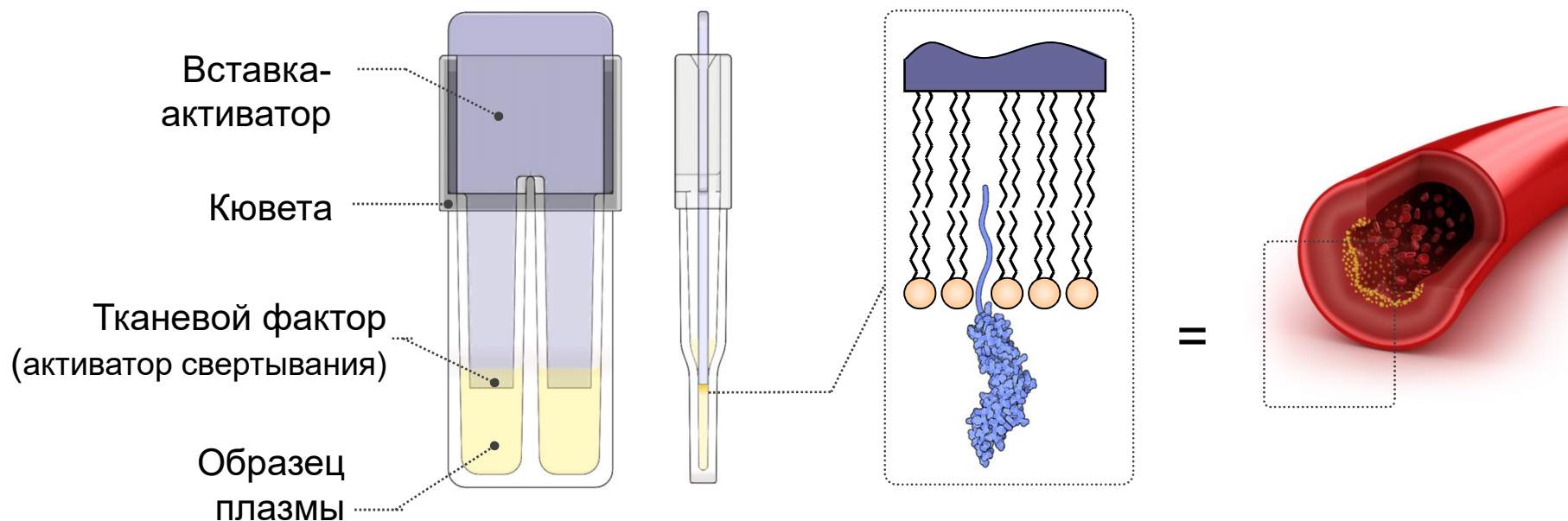
**Результат – усиление
образования тромбина в плазме крови**

- **Тромбодинамика (отечественная разработка)**

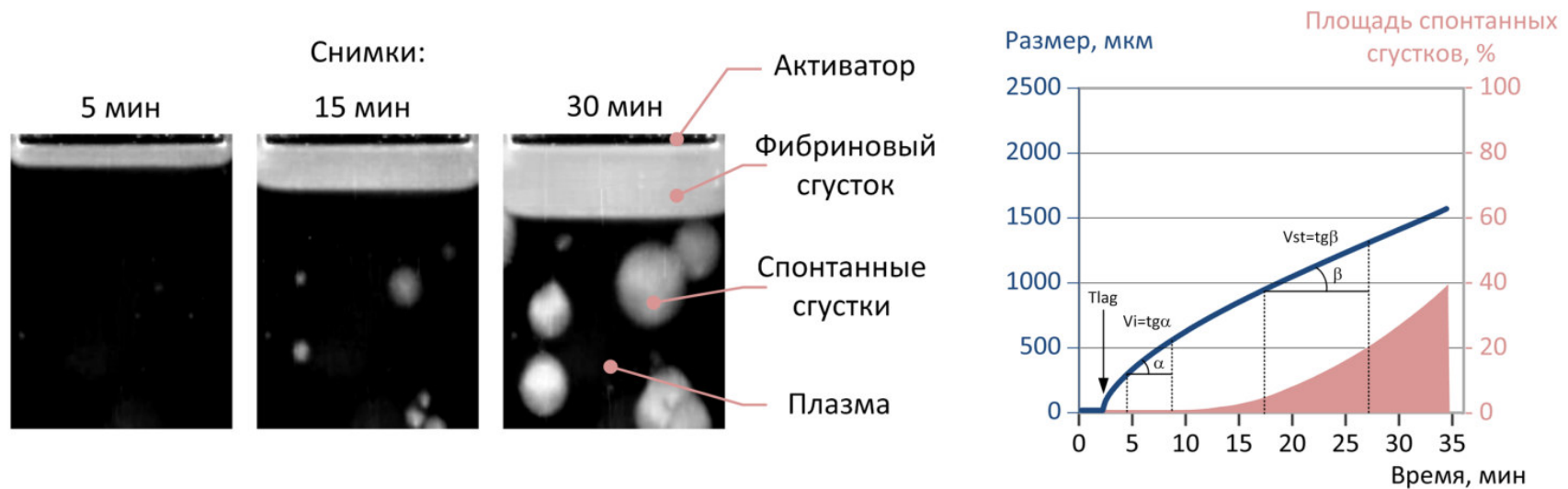


Анализатор тромбодинамики Т2-Т

В тесте тромбодинамика имитируется повреждение стенки сосуда и регистрируется процесс роста фибринового сгустка от локализованного активатора свертывания.



- **Тромбодинамика (отечественная разработка)**



Фотографии роста фибринового сгустка (слева) и зависимость размера фибринового сгустка и площади спонтанных сгустков от времени (справа)

- Низкочастотная пьезотромбоэластография

Аппаратно-программный
комплекс
АРП-01М «Меднорд»



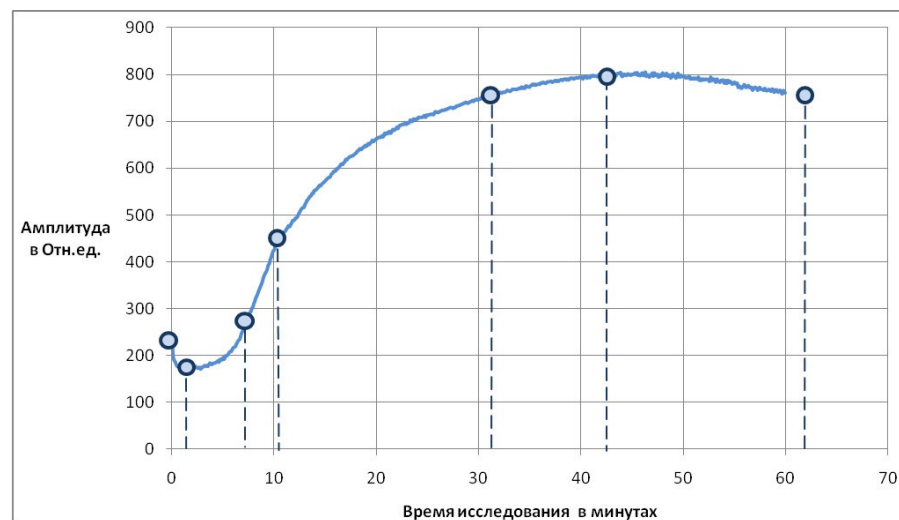
Портативное устройство для экспресс-оценки состояния системы гемостаза в цельной крови. Исследуется около 0,4 мл цельной крови с нанесением образца в течение 10 сек.

Принцип измерения:
контактная кондуктометрия
с применением разовых
датчиков

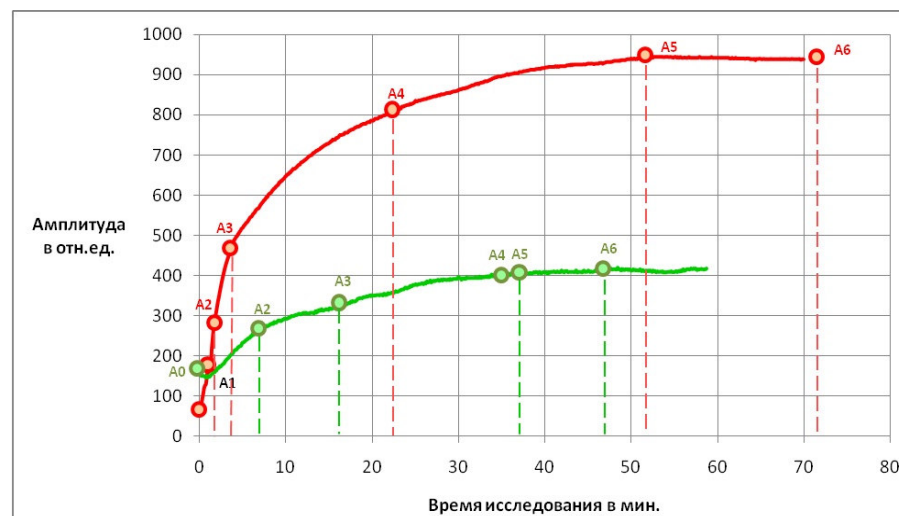


- Низкочастотная пьезотромбоэластография

Пример графика исследования
здорового добровольца



Пример графика исследования
пациента с **гиперкоагуляцией** и
гипокоагуляцией

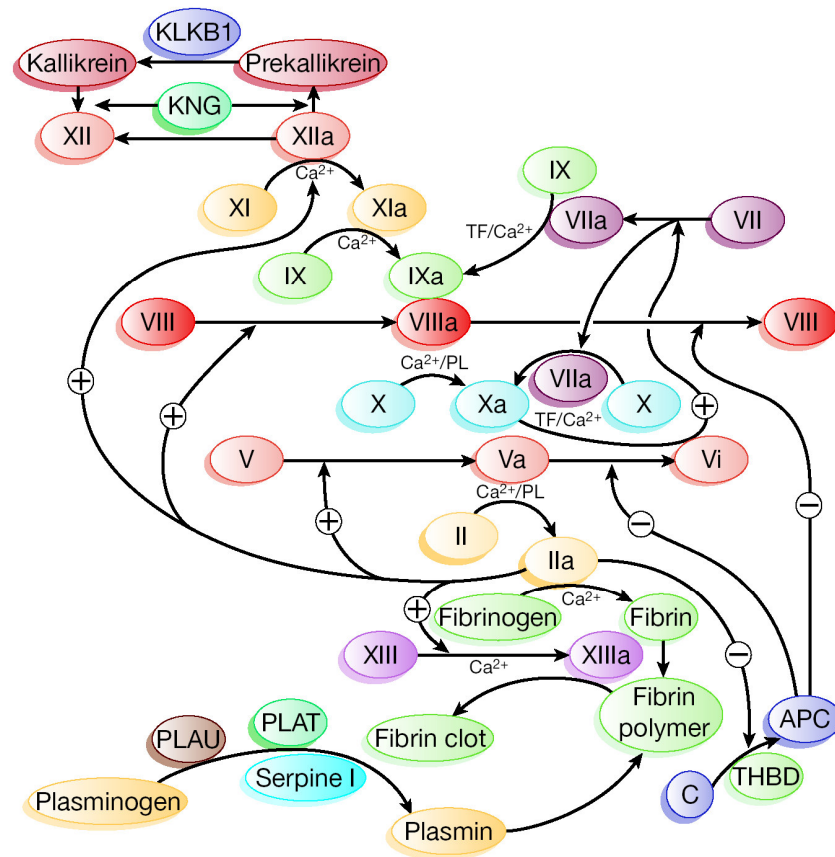


Принцип № 4. Использование фиксированных алгоритмов диагностики с учетом анамнеза и получаемых медикаментов (ситуационная диагностика)



ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии

Принцип № 5. Учет генетической предрасположенности к нарушениям в системе гемостаза



Риск тромбоза при ряде мутаций и полиморфизмов генов белков – участников системы гемостаза



Принцип № 5. Учет генетической предрасположенности к нарушениям в системе гемостаза

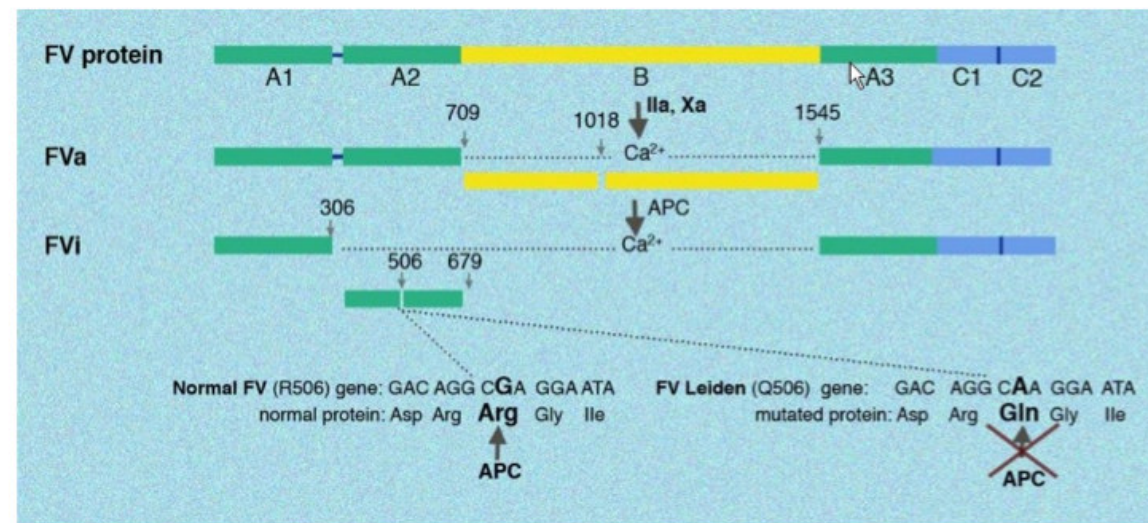
Оценка носительства полиморфизмов генов - участников гемостатических реакций и метаболизма метионина

- Мутация фактора V Лейден (R506Q G>A, rs6025)
- Мутация фактора II протромбина (G20210A G>A, rs1799963)
- Полиморфизм фактора VII свертывания крови (G10976A G>A, rs6046)
- Полиморфизм фактора XIII свертывания крови (G9T G>T, rs5985)
- Полиморфизм FGB-фибриногена (фактор I свертывания крови) (G-455A rs1800790)
- Полиморфизм ингибитора активатора плазминогена I типа (-675 5G/4G, rs1799889)
- Полиморфизм ITGB3-b интегрин (тромбоцитарный рецептор фибриногена, GpIIb) (T1565C rs5918)
- Полиморфизм метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR (A223V C677T rs1801133)
- Полиморфизм метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR (E429A A1298C rs1801131)
- Полиморфизм MTR (B12-зависимая метионин-синтаза) (A2756G rs1805087)
- Полиморфизм MTRR (метионин-синтаза редуктаза) (A66G rs1801394)

Принцип № 5. Учет генетической предрасположенности к нарушениям в системе гемостаза

Мутация
фактор V
Лейден

R506Q G>A

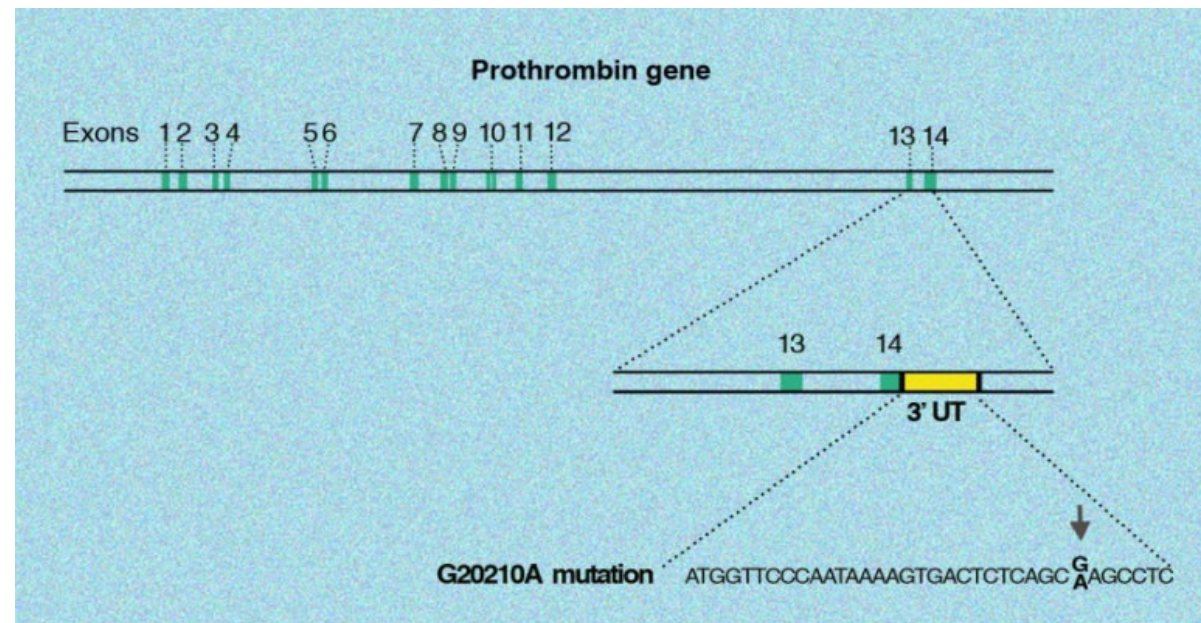


Мутация фактор V Лейден приводит к резистентности фактора Va к активированному протеину С в результате чего частично утрачивается антикоагулянтная защита от внутрисосудистого свертывания крови

Принцип № 5. Учет генетической предрасположенности к нарушениям в системе гемостаза

Мутация
протромбина
(фактора II)

G20210A G>A



Аномалия протромбина документируется лишь генетическим тестированием, хотя этот вид патологии и ассоциируется с увеличением содержания протромбина в крови

Принцип № 5. Учет генетической предрасположенности к нарушениям в системе гемостаза

Мутация фактор V Лейден —→ резистентность фактора Va к активированному протеину C

Полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена 1 типа —→ повышение активности этого ингибитора

Полиморфизм генов ферментов, участвующих в метаболизме метионина —→ повышение уровня гомоцистеина в сыворотке крови

Генотип и лабораторно проявленный фенотип, что важнее?

Все не просто,
но интересно ...



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!