

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Фармацевтический колледж

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Тема: Анализ показателей гемостаза при диагностике наследственных
коагулопатий.

по специальности: 31.02.03 Лабораторная диагностика

Выполнил: Трямкин Егор Николаевич

Руководитель: Перфильева Галина Владимировна

Рецензент: Пругова Вероника Леонидовна
заведующий клинико-диагностической лабораторией КГБУЗ «Краевая клиническая
больница»

Работа допущена к защите ЦМК «Лабораторных и санитарно-гигиенических
дисциплин»

Протокол № 9 от «28» мая 2018 г

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННЫХ КОАГУЛОПАТИЙ.....	6
1.1 Гемофилия А	6
1.2 Гемофилия В	12
1.3 Дефицит фактора XI.....	12
1.4 Наследственная болезнь Виллебранда	13
1.5 Лабораторная диагностика гемофилии А, В.....	17
1.6 Лабораторная диагностика Болезни Виллебранда.....	18
ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОСТАЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ КОАГУЛОПАТИЙ.....	20
2.1 Материалы и методы исследования.	20
2.2 Результаты исследования.	23
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	25
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	26
ПРИЛОЖЕНИЕ А	28
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	30

ВВЕДЕНИЕ

Гемофилия и болезнь Виллебранда являются наиболее распространенными наследственными геморрагическими диатезами и остаются одной из важных медико-социальных проблем современной гематологии. Особенности клинического течения этих заболеваний значительно снижают качество жизни пациентов и зачастую могут угрожать жизни больных, а развивающиеся осложнения в ряде случаев приводят к ранней стойкой утрате трудоспособности больных.

В целом наследственные коагулопатии встречаются нечасто, а диагностируются еще реже. На это есть две основные причины: низкая распространенность, часто сопряженная с субклиническим течением заболевания (при болезни Виллебранда) и недостаточно развитая система лабораторной диагностики нарушений гемостаза в большинстве регионов нашей страны. Количество больных гемофилией в России составляет чуть более 7,5 тыс. человек, а с болезнью Виллебранда должно быть около 16 тыс. Точная цифра не установлена [7].

Заболеваемость населения Красноярского края гемофилией за период 2012-2016 год, отображена на рисунке 1.

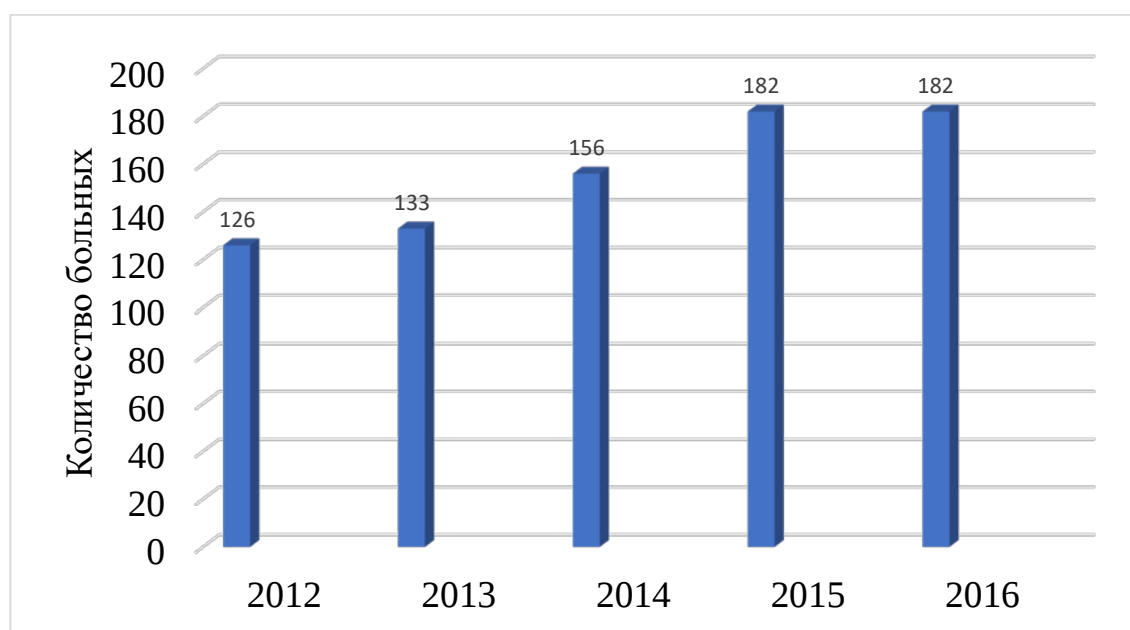


Рисунок 1 - Заболеваемость населения Красноярского края гемофилией.

Среди наследственных геморрагических заболеваний наиболее частой является болезнь Виллебранда, которая в некоторых популяциях встречается с частотой до 1%. Однако классически болезнь Виллебранда не относят к коагулопатиям. Среди наследственных геморрагических коагулопатий наиболее распространены гемофилия А и В гораздо реже встречается дефицит ф. VII

Дефицит других факторов свертывания встречается еще реже, а его распространенность сильно зависит от особенностей популяции [8].

Цель работы: исследование показателей гемостаза при диагностике наследственных коагулопатий.

Задачи:

1. Изучить теоретические основы наследственных коагулопатий, этиологию, патогенез, осложнения, изменение коагулологических показателей.
2. Изучить методы диагностики наследственных коагулопатий.
3. Провести исследования, оценить коагулологические показатели пациентов и степень тяжести течения заболевания.

Объект исследования: пациенты ККБУЗ «Краевая клиническая больница» гематологического отделения

Предмет исследования: показатели гемостаза пациентов.

Методы исследования: изучение и анализ научно-исследовательской и учебной литературы, нормативно-правовой документации; исследование коагулограмм; статистическая обработка результатов.

Материалом для написания дипломной работы учебная литература, научные статьи и работы авторов: Колосков А.В., Косякова Ю.А., Лебедева Е.А.

Структурно дипломная работа состоит из введения, двух глав, заключения и приложений.

Во введении отображена актуальность данной проблемы, также цели и задачи работы.

В первой главе проведен литературный обзор, даны основные понятия об наследственных коагулопатиях, их формах и лабораторной диагностикой.

Вторая глава представлена практической частью, в которой содержатся план проведения эксперимента, характеристика методов экспериментальной работы, обоснование выбранного метода, основные этапы эксперимента, обработка и анализ результатов опытно-экспериментальной работы.

В заключении содержатся выводы об исследовании.

Приложение содержит описание оборудования и результаты исследования.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННЫХ КОАГУЛОПАТИЙ

1.1 Гемофилия А

Гемофилия А (классическая гемофилия) - геморрагическая коагулопатия, связанная со снижением активности фактора VIII в крови. Выделяют наследственную форму гемофилии, связанную с мутациями гена фактора VIII и приобретенную гемофилию. Наиболее часто встречающаяся форма гемофилии (около 80 % случаев) [5,6].

Ген фактора VIII расположен в X-хромосоме, наследственная гемофилия А - заболевание, сцепленное с полом. Тяжелый врожденный дефицит ф.VIII встречается у лиц мужского пола. Женщины являются носителями гена, но у них очень редко возникают геморрагические проявления, связанные с дефицитом ф.VIII. Девочки могут иметь клинические проявления врожденной гемофилии в нескольких случаях: если обе X-хромосомы с дефектным геном ф.VIII (отец болен гемофилией, а мать является носителем гена гемофилии и передала ей дефектную хромосому); если активна только одна X-хромосома с дефектным геном ф.VIII и других.

Гемофилия А - наиболее распространенная геморрагическая коагулопатия. Встречается, по разным данным, с частотой от 3 до 20 случаев на 100 000 мужского населения. Из них 85 % имеют гемофилию А и 15 % — гемофилию В. У 5-10 % пациентов с гемофилией проблема с дисфункцией белка фактора VIII (качественная недостаточность), а у остальных — с недостаточным количеством производимого фактора VIII (количественный дефицит). Среди тех, кто имеет серьезный дефицит (определяемый как <1 % активности фактора VIII), 45-50 % имеют те же мутации, инверсии внутри гена фактора VIII, что приводит к полной ликвидации производства белка. Тем не менее, обе формы гемофилии могут быть вызваны различными мутациями, и первоначальный диагноз и классификация производится путём измерения

активности белка. Примерно 30% больных не имеют семейной истории болезни, их болезнь предположительно вызвана новой мутацией [18].

В настоящее время существует несколько классификаций гемофилии по степени тяжести. Все они основаны на определении активности ф.VIII в крови. В табл. №2 приведены степени тяжести гемофилии А [4,16].

Помимо приведенной, предложены другие классификации, в которых тяжелая форма диагностируется при уровне фактора до 2 или 3%.

Таблица 1–степени тяжести гемофилии А.

Тяжесть течения	Активность ф.VIII	Возраст появления геморрагических симптомов	Клинические проявления
Тяжелая	1 - 5 %.	До 1 года	Выраженный кожный гемосиндром по гематомному типу, кровоизлияния в мягкие ткани, мышцы, рецидивирующие гемартрозы с поражением нескольких суставов, тяжелые послеоперационные кровотечения
Средняя	5 - 30 %.	Как правило, между 1 и 3 годами	Кожный гемосиндром по гематомному типу, но выражен меньше, кровоизлияния в мягкие ткани и мышцы после значительной травмы, рецидивирующие гемартрозы с поражением 1-2, реже большего количества суставов, кровотечения из слизистых, тяжелые послеоперационные кровотечения.
Легкая	> 30%.	В любом возрасте	Аномально длительные кровотечения после хирургических вмешательств и травм. Другие геморрагические проявления бывают редко.

При тяжелой форме гемофилии А активность ф. VIII в крови практически не меняется в течение жизни. При среднетяжелой - возможны колебания в незначительных пределах, а при легкой форме активность фактора может изменяться, в том числе повышаться, особенно при применении синтетических аналогов вазопрессина.

Самыми ранними признаками заболевания могут быть кровотечения из перевязанной пуповины у новорождённых, кефалогематома, кровоизлияния под кожу. На первом году жизни у детей, страдающих гемофилией, кровотечение может возникнуть во время прорезывания зубов. Заболевание чаще выявляют после года, когда ребёнок начинает ходить, становится более активным, в связи с чем возрастает риск травматизации. Гемофилии свойственен гематомный тип кровоточивости, для которого характерны гемартрозы, гематомы, отсроченные (поздние) кровотечения [8].

- Типичный симптом гемофилии - кровоизлияния в суставы (гемартрозы), очень болезненные и нередко сопровождающиеся высокой лихорадкой. Чаще страдают коленные, локтевые, голеностопные суставы, реже - плечевые, тазобедренные и мелкие суставы кистей и стоп. После первых кровоизлияний кровь в синовиальной полости постепенно рассасывается, функция сустава восстанавливается. При повторных кровоизлияниях образуются фибриновые сгустки, которые откладываются на капсуле сустава и хряще, а затем прорастают соединительной тканью. Полость сустава облитерируется, развивается анкилоз. Кроме гемартрозов при гемофилии возможны кровоизлияния в костную ткань, что приводит к асептическим некрозам, декальцинации костей.

- Для гемофилии характерны обширные кровоизлияния, имеющие тенденцию к распространению; часто возникают гематомы - глубокие межмышечные кровоизлияния. Рассасывание их происходит медленно. Излившаяся кровь долгое время остаётся жидкой, поэтому легко проникает в ткани и вдоль фасций. Гематомы могут быть настолько значительными, что

сдавливают периферические нервные стволы или крупные артерии, вызывая параличи и гангрены. При этом возникают интенсивные боли.

- Гемофилии свойственны продолжительные кровотечения из слизистых оболочек носа, дёсен, полости рта, реже ЖКТ, почек. К тяжёлым кровотечениям могут привести любые медицинские манипуляции, особенно внутримышечные инъекции. Опасны кровотечения из слизистой оболочки гортани, так как они могут привести к возникновению острой непроходимости дыхательных путей, в связи с чем может потребоваться трахеостомия. К длительным кровотечениям приводят экстракция зуба и тонзиллэктомия. Возможны кровоизлияния в головной мозг и мозговые оболочки, приводящие к летальному исходу или тяжёлым поражениям ЦНС.

- Особенность геморрагического синдрома при гемофилии - отсроченный, поздний характер кровотечений. Обычно они возникают не сразу после травмы, а спустя некоторое время, иногда через 6-12 ч и более, в зависимости от интенсивности травмы и тяжести заболевания; это связано с тем, что первичную остановку кровотечения осуществляют тромбоциты, содержание которых не изменено.

Наиболее значимыми осложнениями гемофилии являются поражение опорно-двигательного аппарата, хроническая постгеморрагическая (железодефицитная) анемия. У пациентов, имевших в анамнезе внутричерепные кровоизлияния, выявляется остаточная неврологическая симптоматика [9].

Основным патогенетическим методом лечения гемофилии А является введение препаратов фактора VIII. Поскольку ф.VII содержится в цельной крови и плазме, это были первые препараты, которые использовали для остановки острых кровотечений. Однако в настоящее время от их использования отказались из-за целого ряда серьезных недостатков. Во-первых, относительно низкое содержание ф.VIII в единице объема не позволяет создать в крови больного активность, достаточную для достижения гемостаза в сложных случаях. Во-вторых, поскольку содержание ф.VIII в каждой

конкретной дозе неизвестно, нельзя точно дозировать препарат. В-третьих, имеется высокий риск инфицирования гемотрансмиссивными инфекциями (гепатитами и ВИЧ). В-четвертых, имеется проблема хранения. Цельная кровь и плазма могут храниться только при температурах ниже -20°C ограниченное время, что исключает их применение вне больницы. В-пятых, при частом применении возрастает число аллергических и анафилактических реакций [21].

Препаратом следующего поколения стал криопреципитат - осажденная при $+4^{\circ}\text{C}$ часть плазмы, содержащая большое количество ф.VIII, фибриногена и ф.XIII. По сравнению с кровью и плазмой криопреципитат содержит большее количество ф.VIII на единицу объема, что позволяет останавливать кровотечения даже при некоторых хирургических вмешательствах. Однако в остальном криопреципитат обладает теми же недостатками. В качестве гемостатического препарата при гемофилии А в развитых странах он практически не применяется.

Революционным шагом стала разработка высокоочищенных препаратов ф.VIII. Это позволило создать препараты с высокой активностью ф.VIII в малом объеме, что решило проблему достижения любой необходимой концентрации ф.VIII в крови реципиента. К тому же разработанные методы удаления вирусов позволили свести на нет риск заражения наиболее значимыми инфекциями, передающимися через кровь, - ВИЧ, гепатитами В и С. Современные препараты концентратов ф.VIII представляют собой лиофилизированный порошок с точно определенной активностью ф.VIII. Препарат может храниться при комнатной температуре до 6 месяцев, а при $+2...+8^{\circ}\text{C}$ - до 2 лет, что позволяет легко использовать его в домашних условиях. Однако такие препараты стоят дорого. Создание концентратов ф.VIII сделало возможным их профилактическое введение для предотвращения кровоизлияний в суставы. В настоящее время разработано четвертое поколение антигемофильных препаратов - концентраты рекомбинантного ф.VIII. При их производстве вообще не применяются компоненты крови человека, что теоретически полностью исключает риск инфицирования

гемотрансмиссивными вирусами. К сожалению, стоимость этих препаратов значительно выше, чем препаратов производных человеческой плазмы.

Современные подходы к лечению гемофилии, с учетом стоимости гемостатических препаратов требуют регулярного контроля состояния гемостаза с обязательным определением активности дефицитного фактора [20].

Наиболее значимым специфическим осложнением терапии препаратами ф.VIII является развитие ингибиторной формы гемофилии. Примерно у 5-20% пациентов с тяжелой формой гемофилии А, получавших препараты ф.VIII, в крови появляются антитела к нему. При высоком титре антител весь вводимый препарат немедленно связывается и выводится из кровотока. Это создает значительные трудности при оказании гемостатической помощи. С практической точки зрения необходимо знать активность развившегося ингибитора. Активность измеряется методом Бетезда в Бетезда единицах (БЕ). При титре ингибитора до 5 БЕ возможно лечение высокими дозами концентрата ф.VIII. При титре более 5 БЕ необходимы другие пути решения проблемы [18].

В настоящее время для оказания гемостатической помощи пациентам с ингибиторной формой гемофилии применяются препараты, позволяющие запустить коагуляционный каскад «ниже» факторов VIII и IX. Наиболее часто применяются препараты FEIBA и NovoSeven.

FEIBA - активированный концентрат факторов протромбинового комплекса. В его состав входят факторы IX, X, VIIa. Его внутривенное введение активирует образование протромбиназного комплекса.

NovoSeven - концентрат рекомбинантного активированного фактора VII. В основе механизма гемостатического действия этого препарата лежит значительная активация первого этапа внешнего каскада, происходящая при контакте ТФ и ф.VIIa. Кроме того, этот препарат в терапевтических концентрациях способен активировать ф.IX и ф.X на мембране активированных тромбоцитов без участия ТФ.

1.2 Гемофилия В

Гемофилия В (дефицит фактора IX, болезнь Кристмаса,) - вид врожденной коагулопатии (врожденного нарушения свертывания крови), наследственное геморрагическое заболевание. В основе данного заболевания лежит мутационное поражение гена коагуляционного фактора IX, который синтезируется и секретируется в кровь из печени. Что в свою очередь обуславливает функциональный дефицит коагуляционного фактора IX; нарушение образование антигемофильного глобулина В.

Частота встречаемости приблизительно 1 на 30 000 мальчиков. Так как клинически она неотличима от гемофилии А, но лечится иначе, решающее значение имеет лабораторная диагностика. Заболевание сцеплено с полом, клинически сходно с гемофилией А [12,13].

Классификация по тяжести аналогична классификации гемофилии А, основана на определении активности фактора IX в крови: тяжелая форма 1 - 5 %, среднетяжелая - 5 - 30 %, легкая форма - >30%. Встречаются врожденные и приобретенные формы. Причина меньшей частоты врожденных и приобретенных форм этого заболевания, возможно, кроется в меньшем размере гена и молекулы ф. IX, чем гена и молекулы ф. VIII По этой же причине, вероятно, частота развития ингибиторных форм гемофилии В также значительно меньше, чем при гемофилии А [4,16].

1.3 Дефицит фактора XI

Дефицит фактора XI (ранее заболевание определялось как гемофилия С) - геморрагическое заболевание, возникающее из-за дефекта гена фактора XI. Дефицит фактора XI передается как аутосомно-рецессивный признак. Это заболевание достаточно часто встречается в популяции евреев-ашкенази, среди которых гомозиготное носительство составляет от 0,1 до 0,3%, а гетерозиготное - от 5,5 до 11%. В других группах людей описаны лишь спорадические случаи.

Клинически дефицит ф.ХІ значительно отличается от гемофилии А и В, вследствие этого термин «гемофилия С» исключен из классификации. У больных с гомозиготной формой заболевания активность ф.ХІ в крови составляет от 0 до 15%, у гетерозиготных носителей - от 25 до 70%.

При дефиците ф.ХІ имеется умеренно выраженный геморрагический синдром в виде большого количества кожных геморрагических элементов, носовых, маточных кровотечений, длительных кровотечений после хирургических вмешательств, кровотечений после удаления зуба или тонзиллэктомии. В каждом конкретном случае трудно предсказать, как больной среагирует на хирургическое вмешательство. Тяжесть геморрагического синдрома может не коррелировать с активностью ф.ХІ в крови. Клинические проявления возникают при остаточной активности ф.ХІ менее 30%, однако возможны минимальные проявления у гетерозиготных носителей с активностью ф.ХІ между 50 и 70%[9]

1.4 Наследственная болезнь Виллебранда

Болезнь Виллебранда (БВ) - геморрагическое заболевание, являющееся следствием качественных или количественных нарушений фактора Виллебранда. Болезнь Виллебранда бывает наследственной или приобретенной. Строго говоря, болезнь Виллебранда нельзя отнести в группу тромбоцитарных нарушений, поскольку тромбоциты при болезни Виллебранда не страдают.

Причиной наследственной болезни Виллебранда является мутация гена фактора Виллебранда (vWF). К настоящему времени показано, что наследственная болезнь Виллебранда является наиболее распространенным геморрагическим заболеванием. Частота носителей дефектного гена vWF в популяции достигает 1:100 человек, но лишь 10-30% из них имеют клинические проявления [17].

В соответствии с общепринятой классификацией (Sadler, 1994) БВ подразделяется на 3 типа, а тип 2 - на 4 подтипа [14,15]:

- 1-й тип - наследственное заболевание с частичным дефицитом фактора Виллебранда в крови и нормальным распределением мультимеров фактора Виллебранда;

- 2-й тип - наследственная патология с качественным изменением фактора Виллебранда. Второй тип под разделяют на 4 подтипа:

- подтип 2А - характеризуется снижением мультимеров фактора Виллебранда большой и средней молекулярной массы;

- подтип 2В - большие мультимеры фактора Виллебранда снижены, увеличена аффинность к тромбоцитарному гликопротеину 1В и снижена аффинность к другим рецепторным гликопротеинам;

- подтип 2М - характеризуется сниженной ристомицин-кофакторной активностью при нормальном количественном и качественном составе мультимеров фактора Виллебранда;

- подтип 2N - качественные варианты фактора Виллебранда со значительным снижением аффинности к ф.VIII (снижен фактор VIII связывающий активность фактора Виллебранда);

- 3-й тип - практическое отсутствие фактора Виллебранда в крови.

Диагностические признаки болезни Виллебранда представлены в таблице 3[17].

Таблица 2 – Клинические особенности и диагностические признаки болезни Виллебранда.

	Частота встречаемости	Клинические особенности	Диагностика
Тип 1	1-30:1000 наиболее распространенный вариант болезни Виллебранда (>70% всех случаев)	Легкие и умеренные признаки кровоточивости: аутосомно-доминантный тип наследования с неполной пенетрантностью (примерно 60%)	Антиген фактора Виллебранда, активность фактора Виллебранда и ф.VIII снижена на пропорционально (20-50%). Все фракции мультимеров представлены пропорционально.
Тип 2А	Приблизительно 10-15% всех клинически значимых случаев болезни Виллебранда	Легкие и умеренные признаки кровоточивости: аутосомно-доминантное, но возможно и аутосомно-	Варибельное снижение антиген фактора Виллебранда, активности фактора Виллебранда и

		рецессивное наследование с более полной пенетрантностью, чем при 1-м типе	ф.VIII, отсутствие высокого и средне молекулярных мультимеров фактора Виллебранда
Тип 2В	Довольно редкий вариант (<5% всех клинически значимых случаев болезни Виллебранда)	Легкие и умеренные признаки кровоточивости: аутосомно-доминантный тип наследования с более полной пенетрантностью, чем при 1-м типе	Возможно снижение антиген фактора Виллебранда и ф.VIII: уменьшение высокомолекулярных мультимеров, положительная агрегация с низкими концентрациями ристоцетина, легкая и умеренная тромбоцитопения
Тип 2М	Редкий тип (единичные описания)	Тяжесть геморрагических расстройств различна: аутосомно-доминантный тип наследования	Вариабельное снижение антиген фактора Виллебранда и ф.VIII. Активность фактора Виллебранда снижена относительно антигена, несмотря на присутствие высокомолекулярных мультимеров фактора Виллебранда
Тип 2N	Встречается редко	Разнообразные по тяжести геморрагические нарушения. Клинические нарушения сходны с нетяжелыми формами гемофилии А. Наследование аутосомное	Активность антиген фактора Виллебранда и фактора Виллебранда различны, часто нормальные. Диспропорционально снижен ф.VIII. Как правило, нормальное распределение мультимеров, снижение или отсутствие фактора VIIIсвязывающий активность фактора Виллебранда
Тип 3	1-5:1000000	Тяжелые геморрагические нарушения, аутосомно-рецессивное наследование	Антиген фактора Виллебранда, активность фактора Виллебранда и ф.VIII значительно снижены или не определяются

Основным клиническим проявлением болезни Виллебранда является повышенная кровоточивость при травмах или патологических процессах. При болезни Виллебранда страдает функция остановки кровотечения,

следовательно, характерны первичные кровотечения, начинающиеся сразу после травмы.

Характер и тяжесть геморрагического синдрома при болезни Виллебранда зависят от формы заболевания. В целом можно условно выделить три варианта:

1 вариант - геморрагический синдром по микроциркуляторному типу характерен для 1, 2А, 2В, 2М типов болезни Виллебранда. Типичными являются кожный гемосиндром в виде экхимозов, петехий, кровотечения из травмированных слизистых оболочек, длительные кровотечения из лунок, удаленных или выпавших зубов, носовые кровотечения, маточные кровотечения у девочек после начала менструаций, интра- и послеоперационные кровотечения, желудочно-кишечные кровотечения и кровотечения из мочевых путей. Менее характерны кровотечения из мест инъекций и гематомы тканей после различных травм.

2 вариант - выраженный геморрагический синдром по смешанному (гематомному и микроциркуляторному) типу. Этот вариант характерен для больных тяжелыми формами 1-го и 3-го типов болезни Виллебранда, клинически напоминает гемофилию. Первые проявления могут отмечаться в период новорожденности: кожный гемосиндром, гематомы и кровотечения из мест инъекций. У детей и подростков возникают гематомы мягких тканей, кровотечения при травмах слизистой рта, смене зубов, кровотечения из ран кожи и слизистых, носовые, кишечные кровотечения, кровотечения из мочевых путей. После начала менструаций у девочек нередки маточные кровотечения. Кровоизлияния в суставы, так же, как и при гемофилии, могут начаться на первом году жизни. Эти больные страдают от интра- и послеоперационных кровотечений.

3 вариант - Клиническая картина сходна с таковой у больных гемофилией А с аналогичным уровнем фактора VIII: гематомный тип кровоточивости, редко сопровождающийся поражением суставов. Для этого варианта болезни Виллебранда характерен кожный гемосиндром в виде гематом, отсроченные

(возникающие через несколько часов или дней после наступления травмы) кровотечения при травмах и после операций. Могут возникать посттравматические гематомы мягких тканей [19].

1.5 Лабораторная диагностика гемофилии А, В

Коагулограмма при гемофилии А, В:

- Диагностический алгоритм гемофилии представлен в таблице 4
- На первом этапе выполняются скрининговые тесты: время кровотечения, ПВ, АЧТВ, фибриноген, количество тромбоцитов
- На втором этапе выполняются уточняющие тесты: ф.VIII:С, ф.IX, ристоцетин кофакторная активность, ф.VII, -X, -II [20].

Таблица 3–Диагностический алгоритм выявления гемофилии.

	Гемофилия А	Гемофилия В
Время кровотечения	Норма	Норма
ПВ	Норма	Норма
АЧТВ	Удлинено	Удлинено (редко нормальное)
Фибриноген	Норма	Норма
Количество тромбоцитов	Норма	Норма
Уточняющие тесты		
ф.VIII:С	Снижен	Норма
ф.IX	Норма	Снижен
Ристоцетин кофакторная активность	Норма	Норма
ф.VII, -X, -II	Норма	Норма

1.6 Лабораторная диагностика Болезни Виллебранда.

Диагностика болезни Виллебранда основана на анализе анамнестических, клинических и лабораторных данных[19].

Диагностические критерии болезни Виллебранда:

- Типичный геморрагический синдром.
- Признаки снижения специфической активности фактора Виллебранда: ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда, коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда, фактор VIII связывающая активность фактора Виллебранда.
- Для типа 2В типична положительная реакция агрегации тромбоцитов при использовании в качестве индуктора ристоцетина в низкой концентрации.

Дифференциальный диагноз болезни Виллебранда представлен в таблице

Таблица 4 - Диагностические показатели болезни Виллебранда.

Тесты	Типы болезни Виллебранда		
	типы 1, 3, 2А, 2М	тип 2В	тип 2N
1	2	3	4
Время кровотечения	Н/↑	Н/↑	Чаще Н
АЧТВ	Н/↑	Н/↑	↑
ПВ	Н	Н	Н
Количество тромбоцитов	Н	↓, может повышаться до нормы	Н
Коллаген-связывающая активность фактора Виллебранда	↓	↓, реже Н	Н/↓
Антиген	↓ (кроме типа 2М)	Н/↓	Н/↓

фактора Виллебранда			
ф.VIII	↓ (кроме типа 2М)	Н/↓ (кроме типа 2М)	↓
Агрегация с АДФ, коллагеном, адреналином	Н	Н	Н
Агрегация с ристоцетином	↓/Н	↓/Н	Как правило, Н
Кровоточи- вость	По микроцирку- ляторному или смешанному типу	По микроциркулярно му типу	По гематомному типу
Наследование	А-Д с неполной пенетрантностью (для 3 типа А-Р)	А-Д с неполной пенетрантностью	А-Д с неполной пенетрантностью

ф.VIII - фактор коагуляции VIII, А-Д - аутосомно-доминантное, А-Р - аутосомно-рецессивное.

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОСТАЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ КОАГУЛОПАТИЙ.

2.1 Материалы и методы исследования.

Практическая часть исследования выполнена на базе КГБУЗ «Красноярская краевая клиническая больница» г.Красноярска. Мною были изучены и проанализированы учебно-методические пособия, истории болезни пациентов, сбор анамнеза и обследование выбранной группы пациентов.

В исследование включены пациенты, гематологического отделения Красноярской краевой клинической больницы, с подозрением на наследственные коагулопатии (Приложение Б).

Мною были проанализированы результаты исследования 20 пациентов КГБУЗ, с подозрением на наследственные коагулопатии, из которых: 9 мужчин, 11 женщин от 18 до 87 лет. (Рисунок 2).

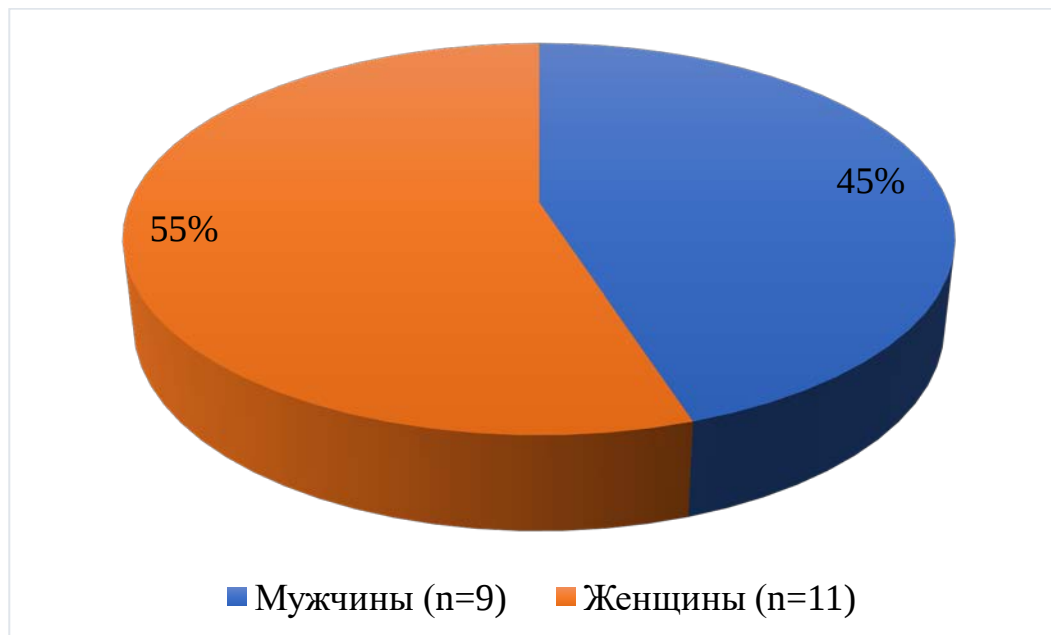


Рисунок 2 – Распределение обследованных пациентов по полу.

Материалом для исследования служила плазма центрифугированной венозной крови. Кровь для исследования гемостаза забирают утром натощак по

прошествии не менее 8 ч после последнего приема пищи. Важно, чтобы взятие венозной крови проводилось в спокойном состоянии, поэтому перед венепункцией пациенту рекомендуют посидеть в течение 20-30 мин. Для получения надежных результатов при исследовании тромбоцитарного гемостаза за день до сдачи анализа пациенту следует избегать стрессов, физических нагрузок, смены режима дня и изменений в питании, приема алкоголя.

При взятии и подготовке образцов крови для исследования гемостаза следует применять меры для предупреждения активации тромбоцитов и коагуляционных реакций. Для образцов крови нельзя использовать обычные стеклянные пробирки, поскольку стекло активирует коагуляцию и сорбирует коагуляционные факторы. Используют пластиковые пробирки, однако различные сорта пластика также разнятся по способности активировать коагуляционные реакции.

Хорошие результаты дает использование вакуумных систем для взятия крови, содержащих забуференный 3,2% раствор цитрата натрия (буферизация чаще достигается добавкой лимонной кислоты). Цветовая кодировка по ISO/DIS 6710 для вакуумных систем, содержащих цитрат натрия, предусматривает светло-голубой цвет.

Необходимо чтобы функция тромбоцитарного и коагуляционного звена гемостаза была исследована в течение 2 ч после взятия крови у пациента.

Коагуляционное звено гемостаза оценивали по следующим показателям: активированному частичному тромбопластиновому времени, агрегации тромбоцитов с АДФ и ристомидином, активности ф. VIII, IX, антитромбина-III, фактора активности Виллебранда и его антигенов.

Коагулологические исследования у лиц с подозрением на наследственную коагулопатию проводили в два этапа:

На первом этапе проводили коагулологический скрининг, включающий подсчет количества тромбоцитов, определение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), протромбинового времени (ПВ),

тромбинового времени (ТВ), концентрации фибриногена – клоттинговым методом.

На втором этапе исследовали тест коррекции (коррекция АЧТВ при смешивании плазмы пациента с нормальной плазмой), определение активности FVIII, FIX, vWF – иммунологическими методами. Для подтверждения болезни Виллебранда проводили определение агрегации тромбоцитов с ристомисином - турбидиметрическим методом Борна.

Измерения показателей коагуляционного гемостаза проводились на автоматических коагулометрах ACL TOP 700, фирмы «InstrumentationLaboratory», клоттинговым методом (приложение А), для работы анализаторов использовались реагенты этой же фирмы.

Для интерпретации полученных данных использовали следующие диагностические критерии:

Таблица 5 – Показатели коагулограммы в норме.

Показатель коагулограммы	Нормальные значения
АЧТВ	28-40с.
ПВ по Квику	70-120%
ТВ	14-17с.
Фибриноген	2-4 г/л
Количество тромбоцитов	150-400*10 ⁹ л
Агрегация тромбоцитов: с АДФ	40-60%
с коллагеном	70-94%
с ристомисином	55-100%
Фактор Виллебранда, антиген vWFAg	60-150%
Активность VIII фактора	66-170%
Активность IX фактора	60-150%

2.2 Результаты исследования.

На первом этапе исследования у 20 (100%) пациентов обнаружено удлинение АЧТВ у 100% пациентов при нормальных показателях протромбинового и тромбинового времени и количества тромбоцитов.

На втором этапе определяли активность FVIII, FIX, vWF. Определение активности факторов проводится тем больным, у которых выявлено удлинение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Снижение активности FVIII отмечено у 13 пациентов, что составило 65%. Снижение активности FIX не было отмечено. Снижение активности vWF отмечено у 10 пациентов, что составило 50%.

Для подтверждения болезни Виллебранда у пациентов со сниженной активностью vWF определяли агрегацию тромбоцитов с ристомидином. Снижение ристомидина отмечено у 10 пациентов, что составило 50%

Таким образом, гемофилия А выявлена у 3 пациентов, что составило 15%, болезнь Виллебранда у 10 пациентов (50%), у остальных пациентов диагноз наследственной коагулопатии не подтвердился. (Рисунок 3)

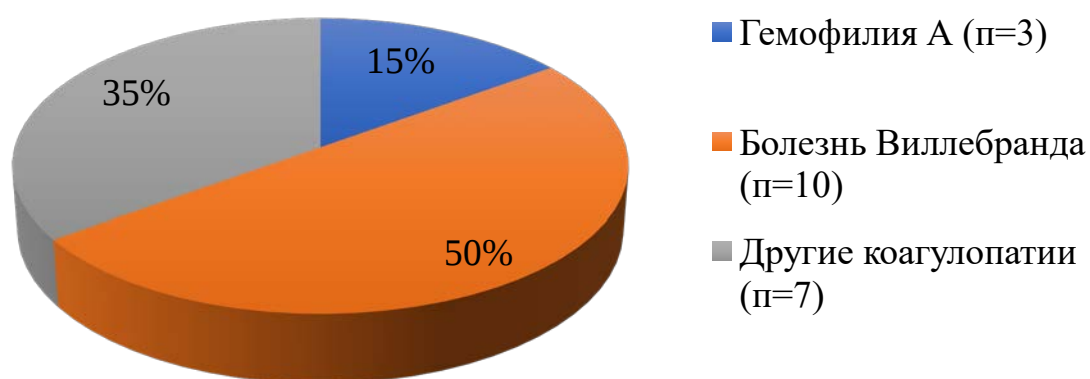


Рисунок 3 – Выявленные наследственные коагулопатии.

Тяжесть клинического течения заболевания в значительной степени зависит от снижения уровня фактора VIII, что позволяет подразделять заболевание внутри типов следующим образом:

- Тяжелая форма - уровень фактора VIII 1 - 5 %.
- Среднетяжелая форма - уровень фактора VIII 5 - 30 %.
- Легкая форма - уровень фактора VIII > 30%.

Распределение больных по форме и тяжести заболевания представлено в таблице №7

Таблица 6 - Распределение больных по форме и тяжести заболевания

Форма коагулопатии	Тяжесть заболевания			
	тяжелая	среднетяжелая	легкая	Всего
Гемофилия А	2 (15.3%)	1 (7.7%)	-	23%
Болезнь Виллебранда	-	10 (77%)	-	77%

Тяжелое течение коагулопатии отмечено у 2 пациентов (15%), средняя степень тяжести отмечена у 11 пациентов – 85% , легкой степени тяжести не выявлено(рисунок 4).

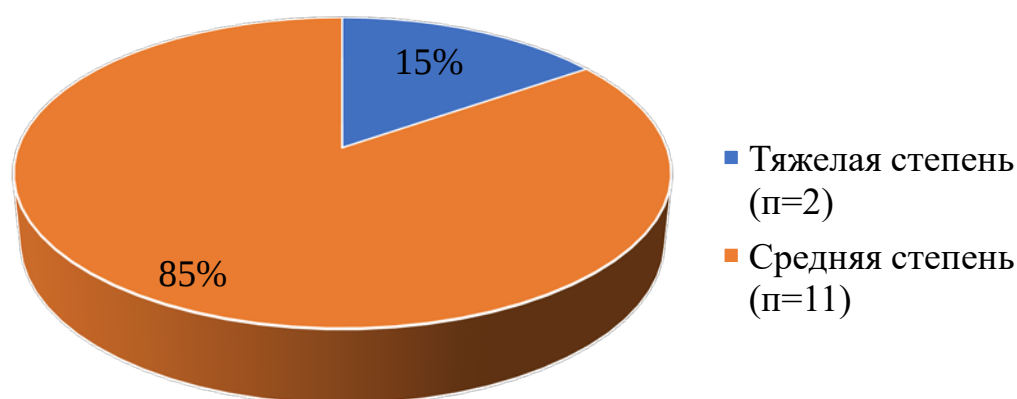


Рисунок 4 – Степень тяжести выявленных коагулопатий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. В ходе работы, мною были изучены теоретические основы наследственных коагулопатий: этиология, патогенез, осложнения, лечение и лабораторная диагностика.
2. Методы диагностики наследственных коагулопатий включают в себя: первичный скрининг (ПВ, ТВ, АЧТВ, фибриноген, АТ III) с использованием клоттинговых методов, определение активности факторов VIII, IX, vWF - иммунологическими методами, выявление ингибиторов к FVIII, FIX, vWF и их титр – методом Бетезда, определение активности тромбоцитов с ристомицином– турбидиметрическим методом Борна.
3. В ходе исследований 20 пациентов с подозрением на наследственную коагулопатию, гемофилия А выявлена у 15% пациентов, болезнь Виллебранда у 50% пациентов, у остальных пациентов диагноз наследственной коагулопатии не подтвердился. Тяжелое течение коагулопатии отмечено у 15% пациентов, средней степени тяжести отмечено 85% пациентов, легкой степени тяжести не выявлено.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган, З.С. Геморрагические заболевания и синдромы/ З.С Баркаган. – М.: Медицина, 2012. – С.216-234.
2. Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С Баркаган, А.П Момот – М.: Ньюдиамед, 2011.-С.70-117.
3. Бломбек Марнгарнета. Нарушение свертываемости крови. Практические рекомендации по диагностике и лечению/ Бломбек Марнгарнета – М.: Медицинская литература, 2014. – 203 с.
4. Васильев, С.А. Лабораторные методы в диагностике геморрагических состояний/ С.А Васильев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. - N9. –С. 17.
5. Гемофилия (ГОСТ Р 52600. 3 - 2013). М.: НЬЮДИАМЕД, 2013. - 197 с.
6. Джесси Рассел. Гемофилия / Джесси Рассел — М.: VSD, 2012.- 92с.
7. Ивашкина, Е. П. Частота врожденных заболеваний системы гемостаза / Е. П. Ивашкина, С. И. Ворожцова, С. В. Игнатьев // Гематология и трансфузиология. М.: Конгресс гематологов России, 2012. - N3. - С. 49.
8. Косякова, Ю.А. Лабораторные критерии для оценки прогноза кровотечений у больных гемофилией / Ю.А Косякова, И.Л.Давыдкин, Н.И.Гергель// Клиническая лабораторная диагностика. - 2012. N9. - С. 70.
9. Косякова, Ю.А. Характер осложнений при гемофилии и болезни Виллебранда / Ю.А.Косякова // Аспирантский вестник Поволжья. - 2013.N3,4. - С. 54-59.
10. Косякова,Ю.А.Факторы риска развития осложнений при гемофилии / Ю.А Косякова, И.Л.Давыдкин, Н.И.Гергель// Вестник РУДН. - 2011.N4. - С. 441-444.
11. Кузник, Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии /Б.И.Кузник - М.: Экспресс-издательство, 2010. - 826 с.

12. Мамаев, А. Н. Коагулопатии/ А. Н. Мамаев - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2012. – 268 с.
13. Момот, А.П. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики/ А.П.Момот – М.:СП.б, 2010.
14. Момот, А. П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики / А. П. Момот– М.: СП.б, 2010.
15. Лихачева, Е.А. Научно-практические рекомендации по лечению болезни Виллебранда / Е.А. Лихачева, Т.Ю.Полянская, В.Ю.Зоренко – М.:ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 44 с.
16. Ладлем, К.А. Геморрагические заболевания и синдромы/ К.А.Ладлем, Грин Дэвид. – М.: Практическая медицина, 2014. – 141 с.
17. Колосков, А.В. Болезнь Виллебранда [Электронный ресурс] / А.В. Колосков – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/v/bolezni-villebrand-1> - Загл. с экрана.
18. Косякова, Ю.А. Особенности системы гемостаза при гемофилии [Электронный ресурс]/ Косякова Ю.А – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/v/osobennosti-sistemy-gemostaza-pri-gemofilii>- Загл. с экрана.
19. Лисуков, И.А. Диагностика и лечение болезни Виллебранда [Электронный ресурс]/ И.А.Лисуков – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/v/diagnostika-i-lechenie-bolezni-villebrand-1>- Загл. с экрана.
20. Портнов, А.А. Гемофилия [Электронный ресурс] / А.А.Портнов – Режим доступа: https://ilive.com.ua/health/gemofiliya_107331i15937.html- Загл. с экрана.
21. Соболева, В.Н. Гемофилия: клинический пример и современные подходы к лечению [Электронный ресурс] / Соболева В.Н – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/gemofiliya-klinicheskiy-primer-i-sovremennye-podhody-k-lecheniyu>- Загл. с экрана.

Автоматический коагулометр ACL TOP 700.



ACL TOP 700 это высокопроизводительная современная система для оценки параметров коагуляции с максимальной автоматизацией процесса и широкими исследовательскими возможностями.

Коагулометр ACL TOP 700 оптимален для лабораторий с большим потоком по гемостазу – до 250 проб в день и более. Возможна единовременная загрузка до 60 флаконов реагентов и 120 пробирок на борт анализатора. Коагулометр ACL TOP 700 обладает следующими преимуществами:

- произвольная загрузка любых реагентов и пробирок во время рабочей сессии;
- высокая производительность - 360 ПВ тестов в час;
- результат ПВ за 3 минуты;

-нет существенного снижения производительности при переходе к специальным тестам;

- замена кювет и промывок в процессе работы;
- исследование срочной пробирки в любое время в любой позиции;
- возможность круглосуточной работы;
- минимальное автоматизированное ежедневное обслуживание;
- русифицированное меню;
- удобство интеграции с ЛИС;
- возможность анализа коагуляционных кривых;
- автоматический контроль качества с построением графиков;

Исследовательская панель анализатора ACL TOP 700 позволяет проводить полную диагностику системы плазменного гемостаза.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Результаты исследования пациентов ККБ с подозрением на наследственные коагулопатии (2012-2017г.г)

№	пол	возр аст	АЧТВ	ПВ	фибр иног ен	АТ III	ТВ	Tr	Агрегация тромбоцитов			Активн ость vFW	WF:Ag	Активн ость FVIII	Активн ость FIX
									АДФ	Колла ген	Ристомин				
НОРМЫ			28,0- 40,0 с	70- 120 %	2-4 г/л	80- 120%	14- 17с	150- 400* 10 ⁹ л	40- 60%	70- 94%	55-100%	60- 150%	66- 170%	60- 150%	60- 150%
1	Жен	38	50,6↑	118	2,65	95	14	250	52	73	24↓	47,1↓	45↓	13.9↓	84
2	Жен	27	78,6↑	84	3	86	14	242	81↑	75	54↓	38,7↓	34,60↓	12↓	102
3	Муж	78	53,9↑	72	3,53	86	15	215	76↑	70	48↓	18↓	28↓	10.1↓	96
4	Жен	38	44,6↑	112	2,73	122↑	15	244	61↑	75	49↓	10↓	47,3↓	14.6↓	85
5	Жен	38	42,4↑	11↓	2,55	96	14	257	88↑	90	30↓	5↓	51↓	15↓	89
6	Муж	22	42,5↑	85	2,79	90	14	239	79↑	66↓	54↓	46,7↓	44,7↓	13.7↓	81
7	Муж	78	53, ↑	72	3,53	86	15	215	76↑	70	50↓	18↓	28↓	11.4↓	92
8	Жен	27	48,6↑	84	3,00	100	14	242	81↑	75	54↓	38,7↓	34,6↓	12.3↓	99
9	Жен	38	40,6↑	118	2,65	95	14	356	52	73	24↓	49,4↓	45↓	14.9↓	73

10	Муж	30	52,6↑	84	2,90	86	15	257	79↑	75	24↓	47↓	40↓	14↓	101
11	Муж	20	52.1	105	2,60	86	15	189	85↑	85	88	70	85	6↓	77
12	Муж	63	52.6	121↑	3,30	87	15	246	86↑	89	69	91	103	1,2↓	80
13	Муж	35	95.3	148↑	3.48	119	15	213	57	74	74	84	79	1,5↓	78
14	Муж	40	48,0↑	110	2,63	56↓	16	254	65↑	71	90	60	100	105	98
15	Жен	22	46,0↑	89	4,00	85	14	277	60↑	76	100	47↓	90	89	107
16	Жен	28	54,2↑	100	3,90	79↓	14	249	70↑	81	56	46↓	98	96	86
17	Жен	37	47,1↑	122↑	2,61	130	16	225	69↑	79	76	109	150	139	109
18	Жен	35	50,2↑	112	2,50	112	14	252	72↑	83	93	65	110	109	87
19	Муж	25	54,6↑	131	3,10	76↓	15	353	81↑	90	103	96	125	117	92
20	Жен	27	44,7↑	89	2,74	139	14	230	79↑	89	88	80	133	124	90