«Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации



Кафедра терапии ИПО

**РЕФЕРАТ**

 **тема « Методы обследование гематологических больных»**

Выполнила ординатор второго года обучения

Смирнова Екатерина Александровна

 КРАСНОЯРСК 2020

Оглавление

[Объективное обследование больного 3](#_Toc39428862)

[Лабораторные и инструментальные методы исследования 3](#_Toc39428863)

[Иммунологические методы 11](#_Toc39428864)

[Молекулярно-биологические методы исследования 15](#_Toc39428865)

[Методы исследования гемостаза 18](#_Toc39428866)

[Список литературы 27](#_Toc39428867)

# Объективное обследование больного

1. Общее состояние, питание, цвет кожных покровов, наличие на коже петехий, подкожных кровоизлияний и т. д.

2. Состояние лимфатических узлов.

3. Осмотр полости рта, языка, зева.

4. Пальпация селезёнки, определение ее размеров на спине, на правом боку.

5. Перкуссия селезёнки имеет ограниченное значение используется лишь для ориентировочного определения размеров селезёнки (размеры селезёнки этим методом точно определить невозможно, т. к. селезёнка окружена полыми органами желудок, кишечник). Длинник 6-8 см между (IX и XI рёбрами), ширина 4-6 см (по X ребру).

6. Пальпация живота: наличие регидносги брюшной стенки, определение болезненности и её локализации, опухолевидных образований (лимфоузлов).

# Лабораторные и инструментальные методы исследования

Установление диагноза заболевания крови предполагает исследование клеток крови и органов кроветворения с помощью морфологических, иммунологических, цитогенетических и молекулярно-биологических методов.

 Морфологические методы

Морфологические методы включают цитологические и гистологические исследования. Объектом цитологического исследования является взвесь клеток периферической крови, костного мозга и биологических жидкостей (спинномозговой, плевральной и др.). Основные виды цитологического исследования в гематологии: клинический анализ крови, подсчет миелограммы, цитохимические исследования клеток крови и костного мозга. Материал для цитологического исследования получают при венепункции или пункции костного мозга (аспирационная биопсия). Гистологические исследования — это прежде всего исследование биоптата костного мозга, взятого посредством трепанобиопсии, а также ткани лимфатических узлов, полученной посредством эксцизионной биопсии.

Клинический анализ крови: цель клинического анализа крови — диагностика количественных и качественных изменений клеток крови (эритроцитов, 57 лейкоцитов и тромбоцитов). Количественные и качественные изменения клеток крови могут носить реактивный характер или быть следствием заболевания системы кроветворения. Гематологические анализаторы подразделяются на несколько технологических типов. Наиболее широкое распространение получили два из них: оптические анализаторы, использующие различия в рассеивании света, и апертурно-импедансные счетчики, реагирующие на изменение сопротивления электрическому току. Устройство оптических анализаторов (Technicon, «Bayer Diagnostic») предполагает прохождение клеточного потока через узкий фокусированный световой луч (чаще лазерный). Клетки, проходя через луч света, прерывают его или преломляют, что генерирует электрический импульс, регистрируемый счетным устройством. Рассеивание света изменяется в зависимости от размера, объема и формы клеток. Примером апертурно-импедансных счетчиков являются анализаторы Coulter, Sysmex. Как только единичная клетка проходит через специальное отверстие в тонкой трубке, она меняет сопротивление электрическому току между двумя платиновыми электродами, генерируя электрический импульс. Каждый импульс записывается электронным устройством. Величина импульса пропорциональна объему клеток, что и лежит в основе их дифференциации. Результат подсчета клеток крови выводится на бумагу. Гематологические анализаторы в зависимости от своего класса имеют различия по числу определяемых параметров.

Параметры периферической крови, минимально определяемые автоматическим гематологическим анализатором:

 1. Абсолютное количество в единице объема крови эритроцитов (RBC), тромбоцитов (PLT), лейкоцитов (WBC) и отдельных видов лейкоцитов (гранулоцитов, Gran, лимфоцитов, Lym, моноцитов, Mon) в процентах и абсолютных цифрах.

2. Количество гемоглобина (HGB) в единице объема крови. 3. Эритроцитарные индексы: HCT — гематокрит, MCV — средний объем эритроцита, MCH — среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC — средняя концентрация гемоглобина в эритроците, RDW — распределение эритроцитов по ширине (показатель анизоцитоза эритроцитов).

4. Тромбоцитарные индексы: MPV — средний объем тромбоцитов, PDW — распределение тромбоцитов по ширине (показатель анизоцитоза тромбоцитов). Существуют анализаторы, которые обеспечивают автоматический подсчет в том числе и разновидностей гранулоцитов (незрелых и зрелых нейтрофилов), эозинофилов, базофилов, а также бластных клеток и ретикулоцитов. Автоматический подсчет эритроцитарных и тромбоцитарных индексов является преимуществом анализаторного исследования крови. Индексы эритроцитов — это цифровые характеристики морфологических изменений в клетках при нарушениях эритропоэза различного генеза. Особенно ярко морфологические изменения эритроцитов проявляются в колебаниях эритроцитарных индексов при дефиците железа, протекающем с нарушением синтеза гемоглобина, и при дефиците витамина В12 или фолиевой кислоты, вызывающем нарушения в процессе деления клеток, а также при различных гемолитических анемиях.

Наиболее значимые количественные изменения состава периферической крови: Снижение показателей периферической крови:

1. Анемия: у мужчин гемоглобин (HGB) менее 130 г/л; у женщин — 120 г/л.

2. Тромбоцитопения: тромбоцитов (PLТ) менее 150,0×109 /л, тромбоцитопения с высоким риском спонтанных кровотечений — PLТ менее 20,0×109 /л.

3. Нейтропения: абсолютное количество гранулоцитов (Gran) менее 2,5×109 /л. Критериями клинически значимой нейтропении (высокий риск развития инфекционных осложнений) считают уровень гранулоцитов менее 1,5×109 /л, жизнеугрожающей нейтропении (агранулоцитоз) — уровень гранулоцитов менее 0,5×109 /л.

4. Лимфоцитопения: абсолютное количество лимфоцитов (Lym) ниже 1,5×109 /л.

Повышение показателей периферической крови:

1. Эритроцитоз (эритремия): у мужчин эритроцитов (RBC) более 6,5×1012/л, гемоглобин (HGB) более 185 г/л, гематокрит (HCT) выше 52%; у женщин — эритроцитов (RBC) более 5,5×1012/л, гемоглобин (HGB) более 165 г/л, гематокрит (HCT) более 48%.

2. Тромбоцитоз: тромбоцитов более 450,0×109 /л (реактивное состояние или неопластическое — миелопролиферативные новообразования).

3. Абсолютный лимфоцитоз: абсолютное количество лимфоцитов более 5,0×109 /л (первичный абсолютный критерий возможного хронического лимфолейкоза).

4. Абсолютный моноцитоз: моноцитов более 1,0×109 /л (первичный критерий возможного миелопролиферативного заболевания гемопоэза).

 5. Нейтрофилез: гранулоцитов (нейтрофилов палочкоядерных и сегментоядерных) больше 7,5×109 /л (воспалительное состояние, возможно миелопролиферативное заболевание гемопоэза).

6. Эозинофилия: эозинофилов более 1,5×109 /л (паразитарные инфекции, миелопролиферативные новообразования).

Кроме того, в анализе крови могут быть и другие количественные или качественные изменения состава форменных элементов крови.

Самым частым патологическим изменением в анализе крови является анемия. В связи с этим алгоритм оценки полного клинического анализа крови включает следующие этапы:

1) установление наличия анемии и степени ее тяжести;

2) определение морфологического типа анемии;

3) определение регенераторной активности костного мозга;

4) определение отсутствия или наличия количественных изменений тромбоцитов и лейкоцитов с учетом абсолютного количества отдельных видов лейкоцитов, особенно нейтрофилов и лимфоцитов.

 Анализ пунктата костного мозга Материал для цитологического исследования костного мозга получают посредством пункционной (аспирационной) биопсии плоских костей. Наиболее доступными и безопасными для данной манипуляции являются грудина и подвздошные кости.

Пункцию проводят специальной иглой с мандреном. После извлечения последнего осуществляют аспирацию костного мозга шприцем. Костномозговая взвесь включает эритроциты периферической крови, жировую ткань костного мозга, ядросодержащие клетки паренхимы и стромы костного мозга (миелокариоциты и мегакариоциты). Часть полученной взвеси костномозговых клеток используют для подсчета абсолютного количества ядросодержащих клеток костного мозга: миелокариоцитов («миело» — костномозговая, «карио» — ядросодержащая, «цит» — клетка) и мегакариоцитов (предшественники тромбоцитов). Мегакариоциты являются самыми крупными клетками костного мозга, хорошо дифференцируются по размеру и форме при малом увеличении микроскопа. Мегакариоцитов в 1000 раз меньше, чем других ядросодержащих клеток костного мозга. Эти два фактора являются основанием подсчитывать количество мегакариоцитов и миелокариоцитов раздельно. Из оставшейся части костномозговой взвеси делают мазки на предметных стеклах. Мазки с клетками костного мозга фиксируют, окрашивают по Романовскому–Гимзе и исследуют с помощью светового микроскопа с подсчетом миелограммы на 250–500 клеток.

 Миелограмма — процентное содержание различных видов ядросодержащих клеток костного мозга соответствующих рядов (линий) кроветворения. Изучению костного мозга в микроскопе с иммерсионной системой для подсчета миелограммы предшествует просмотр препарата на малом увеличении. Это позволяет установить, на сколько пунктат богат клеточными элементами, определить состояние мегакариоцитарного аппарата, хорошо различимого при малом увеличении, обнаружить скопление клеток, похожих на опухолевые, и пр. Определение процентного клеточного состава костного мозга требует подсчета не менее 250 клеток. В этом случае количество клеток каждого вида умножают на 2 и полученное число делят на 5. При подсчете 500 клеток количество клеток каждого вида делят на 5.

Алгоритм оценки миелограммы:

1. Оценка клеточности пунктата по данным абсолютного количества миелокариоцитов и мегакариоцитов.

2. Определение наличия или отсутствия патологических клеток костного мозга.

 3. Подсчет суммарного количества клеток каждой линии дифференцировки (гранулоцитопоэза, эритропоэза, лимфопоэза, моноцитопоэза).

4. Оценка процентного соотношения клеток гранулоцитопоэза и эритропоэза (индекс «лейко/эритро»).

5. Оценка процентного состава клеток разных стадий дифференцировки внутри каждой из линий (ростков) дифференцировки.

6. Выявление признаков дисплазии кроветворения. Цитохимическое исследование клеток крови и костного мозга имеет большое диагностическое значение в начальной дифференциации бластных клеток при остром лейкозе (миелобласты, монобласты, эритробласты, лимфобласты).

Кроме того, цитохимическая реакция с берлинской лазурью служит способом выявления сидеробластов и сидероцитов — эритрокариоцитов и эритроцитов, содержащих гранулы железа. В случаях наличия в эритрокариоците более 5 гранул железа, радиально расположенных вокруг ядра, эту клетку называют кольцевидным сидеробластом. Кольцевидные сидеробласты — признак перегрузки железом и/или дисплазии эритропоэза.

В основе цитохимии клеток крови и костного мозга лежит использование цветных химических реакций для определения в клетке метаболически активных энзимов (ферментов) и субстратов (веществ). Материалом для исследований служат фиксированные мазки крови и костного мозга. Цитохимическая диагностика острых лейкозов базируется на том, что лейкозные клетки, особенно до начала химиотерапии, сохраняют особенности метаболизма (ферменты и субстраты), присущие их нормальным аналогам. Наибольшее диагностическое значение в цитохимической диагностике имеют ферменты — миелопероксидаза, кислая и щелочная фосфатаза, неспецифические эстеразы, а также субстраты — липиды и углеводы.

Гистологическое исследование костного мозга и лимфоидных органов Образец костного мозга для гистологического исследования забирают посредством трепанобиопсии подвздошных костей с помощью специального инструмента — трепана или одноразовой иглы костномозговой универсальной, позволяющих получить столбик кости. Гистологическое исследование костного мозга дает наиболее информативную картину костномозгового кроветворения. Абсолютным показанием для трепанобиопсии является низкая клеточность пунктата костного мозга. При этом исключают аплазию, метаплазию и дисплазию кроветворения, а также подозрение на опухолевое поражение костного мозга с очаговой инфильтрацией опухолевыми клетками.

В гистологическом препарате костного мозга оценивают:

1) состояние четырех типов тканей: костной, соединительной, жировой (желтый костный мозг) и гемопоэтической, или кроветворной (красный костный мозг);

2) характер клеточного состава кроветворной ткани: полиморфный, мономорфный; наличие патологических клеток (лейкозные бласты, клетки Березовского–Штернберга, метастазы рака в костный мозг и др.);

3) особенности роста, распределения клеток костного мозга, включая признаки дисплазии кроветворения;

 4) характер инфильтративного роста опухолевых клеток гемопоэтического происхождения (диффузная инфильтрация, нодулярная, очаговая, с образованием лимфоидных фолликулов);

5) морфологические признаки опухолевых клеток.

Ткань лимфатических узлов для гистологического исследования получают посредством эксцизионной биопсии лимфатического узла. Гистологическое исследование селезенки становится возможным после оперативного удаления данного органа.

При гистологическом исследовании биоптата лимфатического узла, селезенки оценивают:

1) степень сохранности морфологической структуры органа (или полное исчезновение);

2) характер инфильтративного роста опухолевых клеток гемопоэтического происхождения (диффузная инфильтрация, нодулярная, очаговая, с образованием лимфоидных фолликулов);

3) морфологические признаки опухолевых клеток.

Иммунологические методы

На сегодняшний день существуют три разновидности иммунологических методов исследования:

• радиоиммунологический анализ (РИА);

• иммуноферментный анализ (ИФА);

• метод иммунофенотипирования.

Радиоиммунологический анализ (РИА), Radioimmunoassay (RIA), или изотопный иммунологический анализ, позволяет осуществлять количественное определение биологически активных веществ, меченных радионуклидом, в биологических жидкостях с последующей детекцией их специальным счетчиком — радиоспектрометром.

Иммуноферментный анализ (ИФА), или enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) — лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов и антител. В основе ИФА лежит принцип специфического взаимодействия между антигеном и соответствующим антителом. Выявление образовавшегося комплекса осуществляют с помощью конъюгата, который представляет собой анти-антитело, соединённое с ферментной меткой. На заключительном этапе в присутствии перекиси водорода проходит ферментативная реакция (цветная реакция). Результат ее оценивается спектрофотометрически или визуально. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител. ИФА используется в диагностике ВИЧ, вирусных гепатитов, цитомегаловирусной, герпетической, токсоплазменной и других инфекций. ИФА может быть осуществлен на лунках тест-планшета вручную. Кроме того, в настоящее время широко распространены автоматические ИФА-анализаторы. Они позволяют определять не только маркеры различных инфекций, но и концентрации гормонов, в том числе эритропоэтина, и других метаболитов, участвующих в процессе кроветворения. В частности, это касается определения концентрации в сыворотке крови ферритина (белка, представляющего собой обратимую форму депонирования железа), витамина В12, фолиевой кислоты.

Иммунофенотипирование — один из методов дифференциации клеток в образцах крови, костного мозга, лимфатических узлов и других органов и тканей. При помощи флюоресцентно меченных моноклональных антител или каких-либо других зондов на основе реакции «антиген–антитело» определяют тип и функциональное состояние клетки по наличию определенного набора клеточных маркеров — рецепторов, антигенов, кластеров дифференцировки (cluster of differentiation antigens, CD) на поверхности или внутри клетки. Флюоресцентную метку, проявляющую состоявшуюся реакцию «антиген–антитело», обнаруживают с помощью специальных приборов — проточного цитофлюориметра или люминесцентного микроскопа. Разработана систематизированная номенклатура маркерных молекул, обозначаемых символом CD (Claster Designation or Claster of Differentiation). Она была предложена для практики в 1982 г. для идентификации и исследования поверхностных мембранных белков лейкоцитов. CD-антигенами (или иначе CD-маркерами) могут быть белки, которые служат рецепторами или лигандами, участвующими во взаимодействии клеток между собой и являющихся компонентами каскада определённых сигнальных путей, а также они могут быть белками, выполняющими другие функции (например, белки клеточной адгезии). Список CD-антигенов, внесённых в номенклатуру, постоянно пополняется и в настоящее время содержит более 320 CD-антигенов и их подтипов. Антитела против клеточных антигенов получают из сыворотки крови животных, иммунизированных интересующим антигеном (поликлональные), или от культуры ткани гибридомы. Гибридому создают слиянием «бессмертных» клеток плазмоцитарной опухоли (миеломы) с активированными интересующим антигеном В-лимфоцитами. Уникальность гибридомного метода состоит в том, что все клетки гибридомы являются потомками одной-единственной клетки и поэтому синтезируют абсолютно идентичные молекулы антител — моноклональные антитела. В настоящее время для иммунофенотипической дифференциации гемопоэтических клеток известно как минимум 166 CD, являющихся дифференцировочными антигенами или маркерами клеточной активации. Метод иммунофенотипирования, или fluorescent antibody techniques, включает две технические разновидности исследований: проточную флюориметрию и иммуногистохимию. Методом проточной иммунофлюоресценции осуществляют иммунофенотипирование лейкоцитов периферической крови, ядросодержащих клеток костного мозга. Методом иммуногистохимии проводят типирование клеток в гистологических препаратах костного мозга, лимфатических узлов, биоптатов органов и тканей. Иммунофенотипирование методом проточной цитофлюориметрии имеет ряд неоспоримых преимуществ благодаря большей точности, скорости, возможности одновременной регистрации нескольких антигенов на одной клетке. Показанием для иммунофенотипирования методом проточной цитофлюориметрии являются прежде всего лимфопролиферативные заболевания и острые лейкозы, сопровождающиеся поражением костного мозга с выходом опухолевых клеток в периферическую кровь, а также врожденные и приобретенные иммунодефициты.

 Иммуногистохимия — метод, сочетающий иммуно- и морфологическую диагностику. Это существенно повышает диагностическую значимость данного вида исследования. В основе иммуногистохимии лежит визуализация и оценка с помощью микроскопа результатов реакции «антиген–антитело» на клетках в срезах биопсированной ткани. В качестве антигена выступают компоненты клеточных структур или межклеточного вещества ткани. Первоначальным способом выявления реакции «антиген–антитело» также была флюоресцирующая метка. Следующий шаг в развитии иммуногистохимии был связан с разработкой антител, меченных не флюорохромами, а ферментами. Для обнаружения места связывания меченных ферментом (пероксидаза или кислая фосфатаза) антител применяют субстрат, который под воздействием ферментных меток образует окрашенные продукты. Преимущество ферментных меток состоит в возможности получения длительно хранящихся гистологических препаратов, в которых результаты иммуногистохимической реакции могут быть оценены с учетом морфологической структуры ткани и отдельных клеток. Принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики, использующих реакцию «антиген–антитело», является структурная специфичность исследования. В реакции оценивают не только наличие сигнала (есть окрашивание или нет) и его силу (интенсивность окрашивания), но и пространственное распределение сигнала в гистологическом препарате (окрашивание мембран клеток, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов).

Иммуногистохимические методы, кроме иммунофенотипирования опухолей кроветворной и лимфоидной тканей, позволяют решать и другие задачи:

• уточнение гистогенеза опухолей;

 • уточнение источника метастазирования;

 • оценка функционального состояния клеток опухоли;

 • определение показаний к иммунотерапии (использованию лекарственных препаратов с антительным механизмом действия);

• диагностика иммунокомплексных и аутоиммунных заболеваний (гломерулопатии, буллезные дерматозы, синдром Гудпасчера и др.);

• поиск инфекционных агентов (токсоплазма, микобактерии, хламидии, вирусы и др.).

 Молекулярно-биологические методы исследования

Развитие и использование молекулярно-биологических методов исследования (МБИ) в практической гематологии явилось логичным итогом изучения патогенеза опухолей кроветворной ткани. Закономерным результатом хромосомной аномалии является образование онкогена, а следствием его деятельности — синтез онкопротеина, непосредственно реализующего механизм онкогенеза на уровне биохимических, а точнее, молекулярно-биологических процессов жизнедеятельности клетки. Обнаружение онкогена, онкопротеина в популяции клеток костного мозга или периферической крови имеет важное диагностическое значение.

Использование МБИ на этапе первичной диагностики опухолевого заболевания позволяет определять специфические мутации генов в случаях минимальных клинических проявлений посредством исследования периферической крови, не подвергая пациента пункции костного мозга. Прежде всего, это касается случаев диагностики хронических миелопролиферативных заболеваний на ранних стадиях развития, манифестирующих нейтрофильным лейкоцитозом с небольшим левым сдвигом (появлением молодых форм нейтрофилов в периферической крови), тромбоцитозом. Отличием от реактивных изменений в этих случаях становится обнаружение онкогена BRCABL1, специфичного для хронического миелолейкоза Ph-позитивного, или онкогена JAK-2, специфичного для семейства Ph-негативных миелопролиферативных неоплазий (первичного миелофиброза, истинной полицитемии и эссенциальной тромбоцитемии). Быстрое получение результата МБИ по сравнению с цитогенетикой в метафазных пластинках крайне важно и при диагностике острых лейкозов, когда с позиции морфологических методов исследования диагноз сомнений не вызывает, но выявление специфической цитогенетической аномалии определяет характер химиотерапии. В частности, речь идет об остром промиелоцитарном лейкозе и онкогене PMLRARA, наличие которого служит основанием для использования лекарственного препарата трансретиноевой кислоты (весанойда), коренным образом меняющего прогноз заболевания. Наибольшее значение МБИ в диагностике онкогематологических заболеваний связано с возможностью детекции таких количеств опухолевых клеток в организме, которые не могут быть выявлены ни морфологическими, ни цитогенетическими методами, а именно — в диагностике минимальной остаточной болезни или молекулярного рецидива опухоли. МБИ — основа мониторинга пациентов после достижения гематологической, цитогенетической ремиссии заболевания.

В число методов МБИ на сегодняшний день входят 4 основные разновидности:

• блоттинг РНК (гибридизация) — нозерн-блоттинг;

• блоттинг ДНК (гибридизация) — саузерн-блоттинг;

• FISH-гибридизация; • полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Первые две методики не получили широкого распространения в практике клинической гематологии.

FISH-гибридизация — флюоресценция в месте гибридизации хромосом. Метод позволяет идентифицировать с помощью флюоресцирующих молекул хромосомные аберрации в ядрах клеток, находящихся вне митотического цикла, т.е. в неделящихся клетках. Данный метод является своего рода мостиком от цитогенетического исследования к молекулярно-биологическому. Идентификация (метка) определенного участка ДНК в геноме клетки осуществляется посредством его гибридизации со специальной комплементарной, меченной флюоресцентным веществом, последовательностью ДНК, называемой зондом. Флюоресцентные зонды имеют различные цвета. Зондами желтого и синего цвета метят участки ДНК хромосом 9 и 21. Появление зеленого «сливного» цвета свидетельствует о наличии онкогена BCRABL1 (продукта слияния участков этих хромосом).

FISH-гибридизацию применяют для изучения клеток периферической крови, костного мозга, биоптатов опухоли, плаценты, эмбриональных тканей, амниотической жидкости без предварительной их фиксации для выявления количественных и качественных хромосомных аберраций. Меченные флюоресцентными метками специфические ДНК-зонды гибридизуются с хромосомной ДНК как на метафазных, так и в интерфазных препаратах. Одновременно можно использовать множественные зонды к разным локусам ДНК. FISH-гибридизация является чувствительным методом для идентификации хромосомных аберраций при количествах лейкозных клеток менее 109 , обеспечивая при этом быстрый анализ большого (>500) числа клеток. Метод обладает высокой точностью для идентификации неизвестных фрагментов хромосомной ДНК.

Методы исследования гемостаза

При лабораторных исследованиях гемостаза следует:

1) забирать кровь с минимальным использованием жгута, недопустимо взятие крови шприцем или из подключичного катетера;

2) соблюдать этапность: первый этап — скрининговые тесты, второй — пробы, позволяющие уточнить диагноз;

3) проводить повторное обследование для подтверждения результата в случае выявления серьезных нарушений в системе гемостаза;

 4) интерпретировать результаты с учетом возможного влияния принимаемых лекарственных средств и других воздействий.

 Исследование сосудисто- тромбоцитарного гемостаза

Время кровотечения. Это время от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови. Оно фиксируется посредством промокания раны фильтровальной бумагой или калориметрически по цвету жидкости, куда поступает вытекающая из пальца кровь. В норме время кровотечения составляет 3–10 мин. Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов и взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой, но не выявляет всех тромбоцитарных нарушений. Этот скрининговый тест позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного генеза, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки.

Исследование агрегации тромбоцитов как оценка их функциональной активности. Для исследования используют физиологические индукторы агрегации тромбоцитов: тромбин, адреналин, АДФ, коллаген; или специальные индукторы, такие как ристомицин. Наиболее часто изучают АДФ-, адреналин-, коллаген- и ристомицин-индуцированную агрегацию тромбоцитов с графической регистрацией процесса на агрегометре. Основными параметрами агрегатограммы являются степень агрегации (в процентах) и время агрегации (в минутах). Повышение агрегационной активности тромбоцитов характерно для претромботических состояний, тромбозов, атеросклероза, васкулитов, возможно при беременности. Снижение агрегационной активности тромбоцитов наблюдают при первичных и симптоматических тромбоцитопатиях, при лечении антиагрегантами.

Исследование коагуляционного (плазменного) гемостаза

 Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Термин «частичный тромбопластин» означает, что реактив содержит только фосфолипиды, в нем нет тканевого фактора. Метод используется как тест для оценки внутреннего механизма свертывания крови, прежде всего скрининга на дефицит факторов VIII или IX (гемофилия А и В), волчаночного антикоагулянта и слежения за антикоагулянтным действием гепаринов. Каждая лаборатория определяет свой нормальный диапазон АЧТВ с учетом используемых реактивов. Укорочение АЧТВ (активация внутреннего механизма свертывания) обнаруживают при тромбозах, тромбоэмболиях, ДВСсиндроме (гиперкоагуляционная фаза), иногда при нормально протекающей беременности. Удлинение АЧТВ имеет место при большом спектре патологических состояний. Прежде всего это дефицит факторов внутреннего пути свертывания: VIII (гемофилия А), IX (гемофилия В), XI, XII при нормальных результатах протромбинового теста; дефицит факторов II, V, X в случае сопутствующей гипокоагуляции в протромбиновом тесте; дефицит фактора Виллебранда, терапия обычным, нефракционированным гепарином, лечение антикоагулянтами непрямого действия, ДВС-синдром (потребление факторов свертывания в фазу гипокоагуляции), переливания реополиглюкина, препаратов гидроксиэтилкрахмала (инфукол, валекам, НЕS), наличие волчаночного антикоагулянта, мутация фактора IX, дефекты при получении крови для исследования (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера).

Протромбиновое время (по Квику), МНО.

Протромбиновое время (ПТВ) — тест для оценки внешнего механизма свертывания крови. ПТВ обычно используется для определения активности фактора VII, контроля за лечением непрямыми антикоагулянтами, при скрининге системы гемостаза, а также для количественной оценки фибриногена в автоматических коагулометрах. Каждая лаборатория определяет свой нормальный диапазон ПТВ с учетом используемых реактивов. Укорочение ПТВ свидетельствует об активации внешнего механизма свертывания — при ДВС-синдроме, в последние недели беременности, при приеме пероральных контрацептивов, лечении концентратами факторов протромбинового комплекса (Фейба), НовоСевен и др. Удлинение ПТВ имеет место при дефиците или аномалии факторов протромбинового комплекса (VII, X, V, II), в случаях приема антикоагулянтов непрямого действия (варфарин), при болезнях печени и желчевыводящей системы, лечении нефракционированным гепарином (тест реагирует лишь на сравнительно высокие концентрации антикоагулянта, примерно от 0,5 МЕ/мл крови и выше), ДВС-синдроме (потребление факторов свертывания в переходную фазу и фазу гипокоагуляции), на фоне переливаний реополиглюкина, препаратов гидроксиэтилкрахмала (инфукол, валекам), при наличии в крови волчаночного антикоагулянта (возможно), дефектах взятия крови для исследования (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера).

МНО (Международное нормализованное отношение), латинская аббревиатура — INR (International Normalized Ratio) — дополнительный способ представления результатов протромбинового теста. Рекомендован комитетом экспертов ВОЗ и другими международными организациями по стандартизации в гематологии для контроля терапии непрямыми антикоагулянтами. МНО — это отношение ПТВ пациента к ПТВ нормальной плазмы в степени международного индекса чувствительности (МИЧ). МИЧ — коррекционный фактор, специфичный для каждой партии реактивов, рассчитанный на основании стандартов ВОЗ для тромбопластина. МНО — математическая коррекция, при помощи которой производится стандартизация ПТВ, что позволяет сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях. МНО и протромбин по Квику коррелируют отрицательно: снижение протромбина по Квику соответствует повышению МНО. В норме МНО приближается к 1. Терапевтический диапазон МНО 2–3 на фоне терапии непрямыми антикоагулянтами обеспечивает профилактику тромбоза без увеличения риска кровотечения.

 Тромбиновое время (ТВ) — третий по значимости базисный коагуляционный тест. Характеризует конечный этап процесса свертывания — превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина. На него влияет концентрация фибриногена в плазме и наличие продуктов деградации фибрина. Референсные значения ТВ: 18–24 с. Укорочение ТВ характерно для гиперфибриногенемии (фибриноген 6,0 г/л и выше), начальной (гиперкоагуляционной) фазы острого и подострого ДВС-синдрома. Удлинение ТВ имеет место при гепаринотерапии обычным гепарином (тест реагирует на сравнительно низкие концентрации антикоагулянта, приблизительно от 0,05 МЕ/мл крови), гипофибриногенемии (фибриноген ниже 1,0 г/л) в случаях развития острого ДВС-синдрома и при тромболитической терапии (стрептокиназа, актилизе и др.), несоблюдении правил забора крови (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера).

 Концентрация фибриногена в плазме. Количественное определение фибриногена по методу Клаусса является базисным тестом исследования гемостаза. Образование фибрина и его стабилизация представляют собой финальный этап формирования тромба, при котором растворимый фибриноген превращается в нерастворимый фибрин под действием тромбина и фактора XIII. Фибриноген — острофазовый белок. Печень синтезирует 2—5 г фибриногена в день, время полувыведения фибриногена из крови составляет около 4 дней. Концентрация его может превышать 10 г/л при тяжелых бактериальных инфекциях, при травме и тромбозе. К значительному росту фибриногена приводят заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром), коллагенозы (ревматоидный артрит, узелковый периартериит), пароксизмальная ночная гемоглобинурия, новообразования (рак легкого). Повышение уровня фибриногена в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями предшествует развитию инфаркта миокарда и инсульта. Корреляция между уровнем фибриногена и развитием этих осложнений особенно четко прослеживается у пациентов молодого и среднего возраста. Определение уровня фибриногена — наиболее чувствительный тест для выявления бессимптомных стадий заболевания периферических артериальных сосудов. Нормальные значения фибриногена: 2,75–3,65 г/л. Снижение концентрации фибриногена происходит при остром ДВС-синдроме, дисфибриногенемии. Повышение концентрации фибриногена имеет место при инфекционных, воспалительных и аутоиммунных процессах, подостром и хроническом ДВС-синдроме, нормально протекающей беременности. Исследование факторов свертывания проводят в случаях необъяснимого удлинения АЧТВ или ПТВ при дооперационном скрининге на основе модифицированных тестов АЧТВ или ПТВ с реактивом плазмы, имеющим дефицит исследуемого фактора. Оценку фактора XIII необходимо выполнять при наличии у пациента необъяснимых кровотечений при нормальных значениях АЧТВ и ПТВ. Нормальный диапазон для большинства факторов 70–130%. 2.5.4.

П р о т е и н С. Его определяют иммунохимическим, коагуляционным методами и методом с хромогенным субстратом. Протеин С инактивирует Vа и VIII только в комплексе с протеином S, поэтому их содержание желательно оценивать в совокупности. В норме уровень протеина С составляет от 70 до 140%. Повышение его может иметь место во время беременности. Наследственный гомозиготный дефицит протеина С или аномалии протеина С приводят к массивному тромбозу (фульминантная пурпура) у новорожденных. Гетерозиготный дефицит протеина С предрасполагает к тромбозу. Приобретенное снижение активности фактора может иметь место при заболеваниях печени с нарушением ее функции, ДВС-синдроме, нефротическом синдроме, синдроме острой дыхательной недостаточности, менингококковом сепсисе, гемодиализе, лечении L-аспарагиназой, лечении непрямыми антикоагулянтами (дефицит витамина К), в послеродовом и послеоперационном периодах.

Протеин S (витамин-К-зависимый белок) является кофактором активированного протеина С. Определение протеина S возможно коагуляционным и иммунохимическим способами. Концентрация протеина S в норме составляет 20–25 нг/мл. Описаны случаи как функционального, так и количественного дефицита протеина S. Уменьшение содержания (активности) протеина S может быть врожденным (наследственным), а также приобретенным в результате заболевания печени с нарушением ее функции, ДВС-синдрома, нефротического синдрома, системной красной волчанки, лечения L-аспарагиназой, лечения непрямыми антикоагулянтами, приема эстрогенов (пероральных контрацептивов), беременности, в послеродовом периоде, из-за наличия аутоантител к протеину S.

Антитромбин III. Для определения активности антитромбина III (АТ III) чаще всего используют метод с применением хромогенного субстрата. АТ III расщепляет субстрат, в результате образуется окрашенный продукт, количество которого зависит от исходной активности АТ III. Существуют также иммунохимические и коагуляционные методы. Тест применяют для мониторинга лечения гепарином. Длительная гепаринотерапия может приводить к снижению активности АТ III в плазме. Лечение высокими дозами гепарина, особенно нефракционированного, приводит к транзиторному снижению АТ III по механизму потребления, особенно у больных с тяжелой патологией, при критических состояниях, ДВС-синдроме, сепсисе, злокачественных опухолях. У новорожденных содержание АТ III составляет около 50% и достигает уровня взрослых к 6 месяцам. Нормальный диапазон АТ III: 75–125%. Снижение содержания (активности) АТ III может быть врожденным (наследственным) дефицитом или аномалией (снижение активности или чувствительности к гепарину); приобретенным при заболеваниях печени (опухоли, цирроз, алкогольный гепатит), нефротическом синдроме (протеинурия свыше 5 г/л), карциноме легких, ДВС-синдроме, множественных травмах, тяжелых родах, гестозах, приеме эстрогенов (пероральных контрацептивов), кортикостероидов, лечении L-аспарагиназой. Увеличение содержания (активности) АТ III наблюдают во время менструации, при острых вирусных гепатитах, холестазе, приеме анаболических стероидов, лечении непрямыми антикоагулянтами.

Исследования фибринолитической системы

 Время лизиса эуглобулиновых сгустков / ХIIа зависимый фибринолиз — важнейший базисный метод исследования системы фибринолиза. Он позволяет оценить состояние внутреннего и внешнего механизмов образования плазминогена. Метод заключается в определении времени спонтанного лизиса сгустка, образующегося из эуглобулиновой фракции бестромбоцитной плазмы при добавлении к ней раствора хлорида кальция. Метод оценки эуглобулинового лизиса требует исходного наличия в плазме фибриногена. При отклонениях содержания фибриногена, а также при неполноценной полимеризации фибрина возможно получение ошибочных результатов. Укорочение времени лизиса (активация фибринолиза) наблюдают при уменьшении концентрации фибриногена — гипо- и дисфибриногенемии; увеличение времени лизиса (угнетение фибринолиза) — при гиперфибриногенемии. В связи с ориентировочным характером и недостаточной специфичностью в последнее время вместо теста спонтанного лизиса эуглобулинового сгустка используют определение отдельных факторов фибринолиза, в первую очередь плазминогена.

Плазминоген и тканевой активатор плазминогена (ТАП). Определение количества плазминогена основано на гидролизе хромогенного субстрата. Тест используют для диагностики ДВС-синдрома и тромбофилий, выявления нарушений фибринолиза, контроля лечения фибринолитическими препаратами при тромбозах, тромбоэмболиях, инфарктах. Дефицит плазминогена — крайне редкое событие, чаще встречается дефицит тканевого активатора плазминогена (ТАП). Дефицит ТАП является одним из потенциальных факторов риска тромбоза, хотя клинически это подтверждается не всегда. ТАП освобождается в кровоток из эндотелиальных клеток сосудистой стенки при стрессовых воздействиях на нее.

Тесты активации свертывания крови (паракоагуляции) D-димеры — специфические продукты деградации фибрина, входящие в состав тромба. Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием плазмина и некоторых неспецифических фибринолитиков. Концентрация D-димеров в сыворотке пропорциональна активности фибринолиза и количеству лизируемого фибрина. Этот тест позволяет судить об интенсивности процессов образования и разрушения фибриновых сгустков. Нормальное содержание D-димера: 33,5–727,5 нг/мл. Повышение уровня D-димеров в крови происходит при венозных тромбозах, атеротромбозе, тромбоэмболии легочной артерии, ДВС-синдроме, других состояниях с повышенным образованием фибрина, после операций, особенно при большом операционном поле. D

Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК). При активации свертывания крови (ДВС, тромбозы, тромбофилии) происходит расширение пула фибриногена, в результате чего увеличивается количество растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК). Качественное и количественное определение РФМК проводится с помощью ортофенантролинового теста. Гепаринотерапия с содержанием гепарина в плазме крови до 10 ед./мл не влияет на результаты теста. Нормальные значения РФМК по ортофенантролиновому тесту — до 4,0 мг%. Повышение РКФМ возникает при активации внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром, тромбоз глубоких вен, эмболия легочной артерии), возможно при лечении антикоагулянтами.

Рентгенологическое исследование

С помощью R-логического исследования можно определить увеличение лимфатических узлов средостения (ХЛС, ЛС, ЛГМ), изменение костей (очаги десструкций, компрессии при миеломной болезни, разрушение костей при лимфосаркоме, уплотнение костей при остеомиелосклерозе).

Ультразвуковая диагностика. Позволяет выявить увеличение, консистенцию селезёнки; увеличенные внутрибрюшные лимфоузлы

# Список литературы

1. Рукавицын О.А., Гематология : национальное руководство [Электронный ресурс] / под ред. О. А. Рукавицына - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2017. - 784 с. - ISBN 978-5-9704-4199-2 –
2. Внутренние болезни: гематология: учебное пособие для аудиторной работы студентов 6 курса по специальности 060101 – лечебное дело / сост.: Кузнецова Е.Ю., Тимофеева Л.Н. – Красноярск: типография КрасГМУ, 2010 – 114 с.
3. Волкова, С.А. Основы клинической гематологии: учебное пособие / С.А. Вол кова, Н.Н. Боровков. — Н. Новгород: Издательство Нижегородской гос. медицинской академии, 2013. — 400 с.