

АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

Інститут гематології та трансфузіології

На правах рукопису

Семеняка Володимир Іванович

УДК 616 – 005. 1 – 08 + 616 – 07

**ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ РЕПРЕЗЕНТАТИВНОСТІ СКРИНІНГОВОГО
ДОСЛІДЖЕННЯ КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ**

14.01.31 – гематологія та трансфузіологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

доктор медичних наук

Суховій Михайло Вікторович

Київ – 2006

ЗМІСТ

	Сторінки
ЗМІСТ	2
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1 Огляд літератури	12
1.1 Сучасні уявлення про функціонування системи гемостазу	12
1.2 Варіабельність активності гемостатичних реакцій і адаптивні процеси в організмі	20
1.3 Контроль якості лабораторних досліджень	25
1.4 Основні принципи й методи діагностики порушень коагуляційної ланки системи гемостазу	29
РОЗДІЛ 2 Об'єкти, матеріал і методи дослідження	35
2.1 Клініко-лабораторна характеристика пацієнтів	35
2.2 Матеріал дослідження	40
2.3 Методи дослідження	41
2.4 Біологічні реагенти	47
РОЗДІЛ 3 Особливості преаналітичного та постаналітичного етапів виконання скринінгової коагулограми	48
3.1 Створення репрезентативної референтної групи	48
3.2 Середньомолекулярні пептиди – критерій добору осіб у референтну групу	54
3.3 Превентивний аналіз якості різних методів скринінгового дослідження системи коагуляційного гемостазу	57
3.4 Усунення факторів преаналітичного етапу, що знижують репрезентативність дослідження	67
3.5 Створення референтного оцінного індексу скринінгового дослідження коагуляційної ланки системи гемостазу й оцінка його репрезентативності	70

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	84
ВИСНОВКИ	92
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	94
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	96

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

а	– активні фактори згортання;
АКТ	– аутокоагуляційний тест, с;
АПТЧ	– активований парціальний тромбoplastиновий час, с;
АТ III	– антитромбін III;
АЧРП	– активований час рекальцифікації плазми, с;
ДВЗ	– дисеміноване внутрішньосудинне згортання;
ІМТ	– індекс маси тіла по Кетле;
КФ	– концентрація фібриногену, г/л;
МА	– максимальна активність аутокоагулограми, с;
МІЧ	– міжнародний індекс чутливості;
МНВ	– міжнародне нормалізоване відношення;
НПП	– нормальна пул-плазма;
ПАКД	– препарати антикоагулянтної дії;
ПІ	– протромбіновий індекс, %;
ПЗЛ	– практично здорові люди;
ПЧ	– протромбіновий час, с;
ПЧКК	– протромбіновий час капілярної крові, с;
ППКД	– препарати прокоагулянтної дії;
ПТЧ	– парціальний тромбoplastиновий час, с;
ПЧРП	– протромбіновий час розведеної плазми, с;
ПЧЦП	– протромбіновий час цільної плазми, с;
РАСК	– регуляція агрегатного стану крові;
РГ	– референтна група;
РІ	– референтний інтервал;
РОІ	– референтний оціночний індекс;
РПП	– референтна пул-плазма;
РРТУ	– ризик розвитку тромботичних ускладнень;
СКТ	– скринінговий клотинговий тест;
СМП	– середньомолекулярні пептиди;

Т	– тромбопластин;
ТФ	– тканинний фактор;
ТФФЗ	– тромбоцитарний фосфоліпідний фактор З;
ЧРП	– час рекальцифікації плазми, с;
ЧТ	– частковий тромбопластин;
у. о.	– умовні одиниці виміру концентрації СМП;
ФВ	– фактор Віллебранда;
ФВШП	– фактори внутрішнього шляху протромбіназотворення;
ФЗШП	– фактори зовнішнього шляху протромбіназотворення;
As	– показник асиметрії вибірки;
CV	– коефіцієнт варіації;
E	– показник ексцесу вибірки;
m	– похибка середньоарифметичного значення вибірки показників;
M	– середньоарифметичне значення вибірки показників
Me	– медіана вибірки;
Mo	– мода вибірки;
S	– стандартне (середньоквадратичне) відхилення;
t_{As}	– критерій прийнятності показника асиметрії;
t_E	– критерій прийнятності показника ексцесу

ВСТУП

Актуальність теми. Останнім часом зростає кількість захворювань, при яких спостерігаються патологічні зміни системи гемостазу протромботичного або прогеморагічного характеру. Смертність від тромбоемболій становить 40-70% від загальної смертності населення. У Європі частота тромбозів глибоких вен становить 160 випадків на 100 000 населення. У Франції на 55 млн. населення щорічно відзначається 150 000 нових випадків тромбозів глибоких вен нижніх кінцівок, а у США з населенням більш 200 млн., щорічно реєструється близько 600 000 пацієнтів з венозним тромбозом. В Англії 0,9% усіх госпіталізованих умирає від тромбоемболії легеневої артерії [5, 21, 37, 44, 107, 111, 129, 143].

Значною залишається і захворюваність на геморагії. Якщо їхня причина неясна і адекватна терапія неможлива, кровотеча може призвести до тяжких ускладнень, інвалідизації хворого, а в деяких випадках – до смерті пацієнта [1, 2, 77, 122, 126, 149, 200].

Незважаючи на інтенсивні дослідження в галузі гемостазіології, проблема залишається невирішеною та на сьогодні з медичної перетворилася на медико-соціальну.

Диференційна діагностика порушень функціонального стану системи гемостазу за клінічними ознаками має низьку достовірність. Для встановлення діагнозу необхідно проведення низки лабораторних тестів. Актуальним лабораторний контроль є і при проведенні моніторингу за лікуванням препаратами, що впливають на систему гемостазу. Для досліджень системи гемостазу було розроблено ряд лабораторних методів. Широко застосовується двохетапний підхід. Спочатку проводиться скринінг-дослідження окремих ланок реакцій тромбоутворення або тромболізу, а при виявленні змін вивчають активність реакцій ураженої ланки [11, 13, 15, 22, 25, 26, 28, 36, 40, 54, 64, 65, 76, 108, 130, 150, 188].

Лабораторна діагностика пов'язана з труднощами, які значно зменшують репрезентативність аналізу: 1) система гемостазу відзначається

високою варіабельністю – коливання активності окремих компонентів можуть змінюватися в нормі в широких межах під впливом чинників зовнішнього та внутрішнього середовища, а тому одним з основних завдань при діагностиці гемостазіопатій є створення репрезентативних референтних груп для порівняння показників пацієнтів з нормою та визначення типу і характеру перебігу патології [24, 52, 60, 61, 73, 97, 137]; 2) лабораторіями часто приймається норма, що подається у довідниках або пропонується розробниками реагентів і встановлена на зразках крові представників популяції, відмінної від тієї, яка обстежується цією лабораторією; 3) почасти, особи для встановлення референтних інтервалів добираються емпірично, без урахування факторів, що можуть впливати на активність гемостатичних реакцій; 4) методи, які включаються до скринінг-коагулограми, часто мають низьку аналітичну якість, не піддаються стандартизації; активність біологічних реагентів може змінюватися в залежності від виробника та серії випуску, що при передачі результатів із однієї клініки до іншої або зміні серії реагенту, може викликати похибки інтерпретації даних [3, 29, 30, 31, 34, 38, 47, 75, 90, 95, 119, 155, 162].

Висока залежність показників системи гемостазу від факторів зовнішнього середовища й фізіологічного стану організму обстежуваного вимагає ретельного контролю на преаналітичному, аналітичному й постаналітичному етапах лабораторного дослідження. Якщо на аналітичному етапі розроблені вимоги та процедури, що забезпечують максимально-можливе попередження помилок, то на преаналітичному і постаналітичному етапах, з огляду на зазначені вище причини, вимоги до якості не розроблені достатньою мірою. Практично здорові особи в референтну групу підбираються на підставі емпірично сформованих уявлень про здоров'я, без урахування факторів, що впливають на активність системи гемостазу. Серед усіх скринінгових методів дослідження гемостазу лише декілька тестів оцінюється в індексах (визначення протромбінового часу, тромбінового часу), що певною мірою нівелює різницю в активності і якості використовуваних реагентів [3, 47, 75, 95, 99, 101, 113, 114, 116, 163, 176, 177]

Ці, та низка аналогічних проблем є актуальними для вибору сучасних наукових задач.

Таким чином, вимоги до виконання досліджень коагуляційного гемостазу на преаналітичному та післяаналітичному етапах аналітичної процедури не розроблені в достатній мірі, що зменшує репрезентативність скринінгу системи згортання крові. Наведене визначає актуальність проблеми і обґрунтовує вибір теми дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на базі відділення хірургічної гематології та гемостазіології Інституту гематології та трансфузіології АМН України в рамках науково-дослідної роботи „Вивчити етіологічні фактори та ключові патогенетичні механізми виникнення внутрішньосудинного згортання крові” (№ державної реєстрації – 0100U002734, строки виконання – 2000-2005 рр.).

Мета роботи. Підвищити якість аналітичної процедури на преаналітичному та післяаналітичному етапах скринінгового дослідження коагуляційної ланки системи гемостазу.

Задачі дослідження.

1.Сформувати репрезентативну референтну групу для встановлення меж нормальних значень показників скринінгових методів дослідження коагуляційної ланки системи гемостазу.

2.Встановити доцільність використання показника концентрації середньомолекулярних пептидів у сироватці крові як додаткового критерію добору осіб у референтну групу .

3.Провести превентивний аналіз діагностичної цінності і показників якості різних методів скринінгового дослідження коагуляційної ланки системи гемостазу.

4.Визначити оптимальні умови одержання матеріалу для дослідження коагуляційної ланки системи гемостазу.

5.Розробити новий розрахунковий метод оцінки тестів скринінгової коагулограми і вивчити його інформативність при обстеженні хворих з

коагулопатіями.

Об'єкт дослідження. Коагуляційна ланка системи гемостазу

Предмет дослідження. Зміни активності компонентів системи гемостазу у хворих на гемостазіопатії та у здорових осіб, методи скринінгового дослідження системи згортання крові, реагенти, які використовуються при проведенні цих досліджень.

Методи дослідження. Клінічні; клініко-лабораторні; коагулологічні, гематологічні, біохімічні; математичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено дослідження, спрямоване на підвищення діагностичної цінності скринінгової коагулограми. Проведено відбір осіб до референтної групи відповідно до вимог міжнародних організацій по контролю якості лабораторних досліджень, отримано від них біологічний матеріал - кров з урахуванням особливостей функціонування системи гемостазу та встановлено реальні межі референтних інтервалів показників скринінгової коагулограми. Результати, одержані у ході вивчення референтної групи, можуть лягти в основу поглибленого вивчення референтних інтервалів на популяційному рівні і досліджень варіабельності гемостатичних реакцій під впливом факторів зовнішнього та внутрішнього середовища. Встановлена кореляційна залежність між активністю компонентів системи гемостазу та вмістом середньомолекулярних пептидів у сироватці крові, що довело можливість застосування цього маркера ендотоксикації та прихованих патологічних процесів як одного із критеріїв відбору осіб до референтної групи. Вперше був проведений превентивний аналіз методів дослідження коагуляційного гемостазу з позицій доказової медицини, що дозволило визначити оптимальну групу методів для скринінг-коагулограми. Удосконалено післяаналітичний етап досліджень системи гемостазу – запропоновано використання референтного оціночного індексу для поліпшення інтерпретації результатів лабораторних досліджень згортання крові й показана його висока ефективність у пацієнтів із гемостазіопатіями. Розроблений референтний оціночний індекс дозволяє об'єктивно

виявляти зміни гемокоагуляції незалежно від активності використаного реагенту. В цілому проведені дослідження дозволили встановити основні шляхи підвищення репрезентативності скринінг-коагулограми.

Практичне значення одержаних результатів. Встановлення довірчих інтервалів за результатами дослідження осіб референтної групи дозволяє збільшити репрезентативність скринінгового дослідження системи гемостазу, зменшити число діагностичних помилок і в цілому – знизити частоту ускладнень геморагофілій і тромбофілій. Одержані у ході дослідження межі нормальних значень можуть бути використані в лабораторіях, які не мають можливості самостійно формувати референтні групи за умови дотримання вимог щодо якості методів, які використовуються та правил отримання матеріалу для дослідження. Виявлені характеристики репрезентативної референтної групи можуть використовуватися лабораторіями, які обслуговують групи населення, подібні етнічно та за географічними і соціальними умовами до обстежених здорових індивідуумів. Для відбору здорових осіб доцільним є використання методу визначення концентрації середньомолекулярних пептидів. Підвищення цього показника свідчить про непридатність зразків плазми для використання в якості референтних та запобігає необґрунтованому включенню до групи здорових осіб індивідуумів з прихованими патологічними процесами. Оптимізовано підбір методів дослідження системи гемостазу для використання в практиці клініко-діагностичних лабораторій. Удосконалено методологію оцінки абсолютних показників скринінгових клотингових тестів – розроблено референтний оціночний індекс, який дозволяє нівелювати міжсерійну різницю активності реагентів. Доведено, що використання запропонованої системи правил виконання преаналітичного та постаналітичного етапів скринінгової коагулограми дозволяє зменшити величину як систематичної, так і випадкової похибки, що підвищує репрезентативність досліджень.

Результати дисертаційної роботи можуть бути впроваджені в практику клініко-діагностичних лабораторій, лабораторій науково-дослідних

інститутів та інших медичних установ, у яких проводиться визначення активності реакцій гемостазу.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проаналізована наукова література та патентна інформація з проблеми діагностики порушень коагуляційного гемостазу, розроблена програма і методологія роботи, здійснено планування всіх етапів дослідження. Самостійно сформульовані мета та задачі дослідження, виконано підбір осіб до референтної групи та груп хворих з ураженнями системи гемостазу. Автор особисто провів усі подані в дисертаційній роботі лабораторні дослідження. На основі отриманих даних автором проведено аналіз, систематизацію, статистичну обробку і узагальнення отриманих даних, обґрунтовані наукові висновки і практичні рекомендації.

Усі положення, що винесені на захист, розроблені автором особисто.

Апробація результатів роботи. За матеріалами дисертації зроблено доповіді на: семінарі для молодих вчених пам'яті О. Федоровського (Київ, 1998); VI Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (Тернопіль, 2002); міжнародному симпозиуму “Гемостаз: проблеми та перспективи” (Київ, 2002); засіданні Київського міського науково-медичного товариства гематологів та трансфузіологів (Київ, 2003); науково-практичній конференції “Актуальні проблеми тромбозу і порушень гемостазу в клінічній медицині” (Київ, 2003); науково-практичній конференції “Сучасні проблеми трансфузіології” (Харків, 2004); науково-практичному семінарі “Вивчення гемостазу, діагностика, лікування” на базі сьомої міжнародної спеціалізованої виставки “ІНМЕД” (Київ, 2004).

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 10 наукових праць. З них 4 – статті в фахових виданнях, які рекомендовані ВАК України та 4 – тези доповідей.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасні уявлення про функціонування системи гемостазу

Система гемостазу є складовою частиною гомеостазу і являє собою групу біологічних реакцій організму, спрямованих на підтримку крові в рідкому стані. При цьому система гемостазу виконує дві протилежні задачі. По-перше, це максимальне зменшення крововтрати при ушкодженні судин, а по-друге, щонайшвидше відновлення вільної течії крові в цих судинах. Ці функції здійснюються внаслідок просторових, біохімічних, біофізичних і клітинних взаємодій [10, 44, 82, 130, 197].

Умовно компоненти системи гемостазу розділяють на судинно-тромбоцитарні (первинні), коагуляційні (вторинні) і фібринолітичні. Кожний із них вступає в реакцію залежно від типу й концентрації специфічних активаторів та інгібіторів у зоні реалізації своєї функції [11, 63, 82, 123, 160, 167, 180, 187, 197].

Надійна зупинка кровотечі можлива за умови достатньої активності факторів коагуляційного гемостазу. Так, наприклад, при гемофілії показники, що характеризують первинний гемостаз, знаходяться в межах нормальних значень, але розвиваються важкі кровотечі внаслідок дисфункції одного або декількох білків згортання (ф.ф. VIII, IX або XI) [15, 41, 49, 50, 150, 170].

При а- і гіпофібриногенеміях спостерігається мікроциркуляторний тип кровотечі, що пояснюється значенням фібриногену в процесах агрегації тромбоцитів [32, 49, 167, 196, 198].

При гіперактивності коагуляційних протеїнів або при зниженні активності їхніх інгібіторів формується стан організму, що називають тромбофілією [21, 44, 129, 169, 183]. Велика кількість венозних тромбозів, при яких коагуляційний гемостаз відіграє провідну роль, говорить про переважне значення саме цього компонента в тромботворенні [5, 21, 78, 106, 107, 143, 145, 161, 173, 205].

Гемостаз, відповідно до традиційних уявлень, включає три етапи,

тісно пов'язаних між собою [11,82,197].

1 етап. Первинний, мікроциркуляторний, або судинно-тромбоцитарний, гемостаз, у якому основну роль відіграють судини та тромбоцити. Тривалість його складає 3-5 хвилин. Закінчується він утворенням первинного, так званого, білого тромбоцитарного тромбу.

2 етап. Вторинний, макроциркуляторний, або коагуляційний, гемостаз, у якому беруть активну участь плазмові фактори згортання. Ця фаза продовжується 5-10 хвилин і закінчується утворенням фібрину, що скріплює тромбоцитарний згусток, формуючи кінцевий тромб.

3 етап. Фібриноліз, що приводить до розчинення згустку та продовжується до 72 годин.

Судинно-тромбоцитарний гемостаз забезпечує зупинку кровотечі з дрібних судин – артеріол, метаартеріол, прекапілярів, істинних капілярів і венул [44]. Уже в перші секунди після травми судини відбувається адгезія тромбоцитів до ушкодженого ендотелію і колагенових волокон та початкова агрегація пластинок. Процес підсилюється під впливом АДФ, що виділяється з ушкодженої судини і гемолізованих еритроцитів. Адгезії та початковій агрегації тромбоцитів сприяють адсорбція ураженою ділянкою фібриногену, зміна Z-потенціалу. З тромбоцитів виділяються серотонін, адреналін і тромбоцитарний АДФ. Це реакція звільнення першого порядку. АДФ підсилює агрегацію кров'яних пластинок, а серотонін та адреналін – скорочення ушкодженої судинної стінки. Агрегація тромбоцитів наростає під впливом адреналіну, серотоніну й АДФ, а також плазмових іонів кальцію, магнію, фібриногену й інших плазмових факторів. Утворюється конгломерат агрегованих тромбоцитів. Первинна тромбоцитарна пробка прохідна для крові, від неї відриваються тромбоцитарні агрегати. Це фаза зворотної агрегації тромбоцитів. Надалі настає в'язкий метаморфоз: тромбоцити втрачають правильну форму, їхня мембрана потоншується, гранули та мітохондрії виходять назовні, і тромбоцитарна пробка стає непрохідною для крові. Це фаза незворотної агрегації тромбоцитів. З ушкоджених тканин і ендотелію виділяється тканинний фактор і запускається процес тромбінотворення,

що сприяє переходу зворотної агрегації тромбоцитів у незворотну, яка супроводжується реакцією звільнення другого порядку та внаслідок якої з'являються гідролази, АДФ у високій концентрації, збільшується активність вазоактивних речовин (серотонін, адреналін, норадреналін). Формується білий тромбоцитарний тромб.

Таким чином, первинний гемостаз здійснюється в основному клітинними (ендотелієм, тромбоцитами) і судинними факторами. Система згортання крові не включається в повному обсязі. Білий тромбоцитарний тромб, що сформувався після в'язкого метаморфозу та ретракції, стягує краї ушкодженої мікросудини і є непрохідним для крові [35, 44, 53, 130, 160, 168].

Вторинний (макроциркуляторний, коагуляційний) гемостаз забезпечується взаємодією ряду протеїнів, більшість із яких є сериновими протеїназами. Ці білки називають факторами згортання. Процесам згортання протидіє система природних антикоагулянтів. Природні антикоагулянти в організмі розділяють на первинні і вторинні. Первинні синтезуються незалежно від процесу згортання крові й постійно присутні в кровоносному руслі. Вони не впливають на неактивні форми факторів гемостазу. Вторинні антикоагулянти утворюються в процесі згортання крові та фібринолізу.

До природних первинних антикоагулянтів належать: антитромбін III (АТ III), гепарин, альфа₂-макроглобулін, інгібітор комплементу-1, альфа1-антитрипсин, антикефамін та інші.

Активні форми факторів згортання утворюються шляхом часткового протеолізу. У процесі згортання крові виділяють наступні фази: 1) утворення протромбінази; 2) утворення тромбіну; 3) утворення фібрину; 4) післякоагуляційна фаза, ретракція і консолідація кінцевого тромбу.

Протромбіназотворення може відбуватися двома шляхами, які умовно поділяють на внутрішній і зовнішній. Ці шляхи тісно пов'язані між собою.

Внутрішній шлях активації починається з контакту крові з ушкодженою поверхнею. Першочергове значення при цьому має ф. XII, що активується при контакті з негативно зарядженими поверхнями при участі високо-

молекулярного кініногену або під впливом активованого ф. XI. Поверхнями, що активують ф. XII і високомолекулярний кініноген, можуть бути компоненти сполучної тканини судин (колаген, еластин), активовані тромбоцити. На наступному етапі ф. XIa активує ф. IX у присутності Ca^{2+} .

Ф. IXa, з'єднуючись з ф. VIIIa, ФВ і ТФФЗ при участі Ca^{2+} , утворює фермент-кофакторний комплекс, здатний перетворити фактор X в Ха.

Зовнішній (тканинний) шлях активації ініціюється ТФ (ф. III), який потрапляє в кров з ушкоджених тканин та активованих макрофагів. Ф. VIIa, з'єднавшись із ТФ у присутності Ca^{2+} , також може активувати ф. X.

Таким чином, і зовнішнім, і внутрішнім шляхами активується ф. X. Із цього моменту починається загальний шлях згортання. Утворений ф. Ха й активований тромбіном ф. Va, при участі Ca^{2+} , приєднується до ТФФЗ. Такий фермент-кофакторний комплекс називається протромбіназою і перетворює ф. II у ф. IIa (протромбін у тромбін). Основна гемокоагуляційна функція тромбіну – протеолітична активація фібриногену. Після активації тромбіном утворюється мономерний фібрин. Тромбін активує утворення мономерів фібрину з фібриногену й активацію у присутності іонів кальцію ф. XIII – фібринстабілізуючого фактору (фібринази).

Мономери фібрину починають з'єднуватися між собою, утворюють розчинні комплекси (s-фібрин). З ростом маси цих комплексів утворюється фібринполімер – гель волокнисто-сітчастої структури, що є основою тромбу (i-фібрин). Ф. XIIIa утворює зшивки між сусідніми молекулами фібрину, що збільшує резистентність останнього до протеаз, у тому числі – плазміну. Також фактор XIIIa утворює зшивки між фібрином і фібронектином та адгезивними молекулами. Це підсилює взаємодію фібрину з тромбоцитами, іншими форменими елементами крові та з клітинами ендотелію, що сприяє кінцевому формуванню тромбу [10, 11, 16, 44, 53, 65, 70, 82, 123, 160, 167, 197].

В останні роки традиційна схема згортання деякими дослідниками була поставлена під сумнів. Було припущено, що процеси згортання крові *in vivo* і *in vitro* розвиваються по-різному [12, 127]. У результаті ряду досліджень отримані дані про зв'язок між зовнішнім і внутрішнім шляхом згортання

крові в живому організмі [63, 82].

Крім того у ході вивчення ролі клітинних елементів у процесі згортання виявилось, що різні клітини, що несуть ТФ, і тромбоцити, експресують на своїй поверхні рецептори, здатні локалізувати фактори згортання [174, 192].

Встановлення факту локалізації на поверхні тромбоцитів та інших клітин різних факторів коагуляції послужило поштовхом для розробки нової концепції згортання крові [191, 206]. Відповідно до цієї концепції процес згортання являє собою три фази, що перекривають одна одну.

I фаза, ініціація процесу згортання крові, розвивається за рахунок утворення комплексу ТФ:VII, у якому ф.VII перетворюється в VIIa на клітинній поверхні. При цьому від 0,01 до 1% ф.VII постійно знаходиться в організмі у виді VIIa [194, 203].

Вважають, що трансформація ф.VII у ф.VIIa також відбувається під впливом активованого ф.X. Останній утворюється в результаті впливу постійно присутнього в крові ф.VIIa, що утворює комплекс із ТФ. З огляду на те, що ТФ є інтегральним компонентом клітинних мембран, процес згортання локалізується в зоні ушкодження судинного русла. Активований комплекс ТФ:VIIa активує фактори X і IX. Ф. IXa “зісковзує” (slide off) з клітин, що несуть ТФ, і взаємодіє зі специфічним рецептором, який знаходиться на поверхні тромбоцитів. Ф.Xa зі своїм кофактором ф.V на поверхні ТФ-несучих клітин утворює протромбіназу, що перетворює ф. II у ф. IIa. При цьому активація ф.V відбувається за допомогою ф.Xa прямо на поверхні цих клітин. Тромбіну, що утворюється на стадії ініціації, недостатньо для активації фібринотворення, але він сприяє ініціації II фази згортання крові [174, 197].

II фаза - посилення. Тромбоцити адгезують на субендотеліальні структури при ушкодженні цілісності ендотелію й активуються [187]. Цьому сприяють малі кількості тромбіну, що утворився на I фазі. Маючи декілька сайтів зв'язування на тромбоцитарній мембрані, тромбін може селективно активувати різні сигнальні шляхи, що приводить до перебудови плазмалемі кров'яних пластинок. У результаті такої перебудови відбувається експозиція

фосфатидилсерину, стимулюється прокоагулянтна активність і секреція тромбоцитарних гранул. Тромбін, зв'язаний із тромбоцитарним рецептором GPIIb-V-IX може активувати ф. V, що виділяється з тромбоцитарних гранул [168]. Крім тромбіну із цим рецептором може зв'язуватися ФВ. Тромбін і ФВ мають різні зони зв'язування на рецепторі. Тому ці ліганди можуть з'єднуватися з рецептором одночасно. Тромбін приводить до дисоціації комплексу ф. VIII:ФВ. Ф. VIII залишається на поверхні тромбоцита й активується тромбіном, що утворився на стадії ініціації. Крім того, тромбін активує ф. XI [126, 173, 184, 187]. Отже, відповідно до теорії клітина-залежного згортання крові, малі дози тромбіну, що утворилися на стадії ініціації, приводять до активації ф.ф. IX, XI, VIII і V.

III фаза, поширення процесу згортання, починається при досягненні оптимальної активації тромбоцитів. У III фазі на поверхні активованих тромбоцитів відбувається формування теназного та протромбіназного комплексів. Формування теназного комплексу (ф. VIIa:ф. IXa) вимагає активних ф.ф. VIIa й IXa. Ф. IXa утворюється двома шляхами. Перший шлях активації ф. IX – вплив комплексу ТФ:ф. VIIa. Другий і основний – вплив ініціюючих доз тромбіну в присутності активованих тромбоцитів.

Утворення теназного комплексу на поверхні тромбоцитів приводить до додаткової активації ф. X і по своїй швидкості в 50-100 разів перевищує утворення ф. Ха під впливом комплексу ТФ:VIIa. Протромбіназний комплекс, що сформувався на поверхні активованих тромбоцитів ініціює реакцію тромбіноутворення [189, 191, 192].

Клітина-залежна модель згортання крові, у відмінності від традиційної, заперечує наявність контактної активації через ф. XII і високомолекулярний кініноген *in vivo*. У той же час розроблювачі цієї теорії згодні, що *in vitro* процеси гемокоагуляції можуть відбуватися відповідно до традиційної моделі [127]. Таким чином, незалежно від того, яка модель згортання крові істинна (і чи істинні вони обидві), лабораторна діагностика й моніторинг порушень коагуляційної ланки системи гемостазу доцільно проводити, дотримуючи традиційної схеми згортання.

Фібринолітична система плазми складається з плазміногену, плазміну, активаторів плазміногену та відповідних інгібіторів. Активація фібринолітичної системи приводить до утворення плазміну – потужного протеолітичного ферменту, що має різноманітну дію *in vivo*. Попередник плазміну, плазміноген, являє собою глікопротеїн (92 кД), продукований печінкою, еозинофілами і нирками. Плазміногену притаманна спорідненість до лізинових залишків. Особливості структури дозволяють плазміногену зв'язуватися з вільними лізиновими залишками фібрину, альфа₂-антиплазміну, поверхневих рецепторів клітини, структурами позаклітинного матрикса, тромбоспондином, імуноглобулінами та деякими іншими білками.

Активація плазміногену каталізується активаторами і регулюється різними інгібіторами. Останні інактивують як плазмін, так і активатори плазміногену. Активатори плазміногену утворюються або судинною стінкою (внутрішня активація), або тканинами (зовнішня активація). Внутрішній шлях активації включає активацію білків контактної фази: ф. XII, ф. XI, прекалікреїну, високомолекулярного кініногену й калікреїну. Це важливий шлях активації плазміногену, але основним є тканинний (зовнішня активація). Він відбувається в результаті дії тканинного активатора плазміногену, що виділяється ендотеліальними клітинами. Тканинний активатор плазміногену продукується моноцитами, мегакаріоцитами, мезотеліальними клітинами. Ця протеаза циркулює в крові в комплексі зі своїм інгібітором і має високу спорідненість до фібрину. Залежність тканинного активатора плазміногену від фібрину обмежує утворення плазміну зоною акумуляції фібрину. Разом із плазміногеном він зв'язується з фібриновими нитками, після чого каталітична дія тканинного активатора плазміногену на плазміноген багаторазово підсилюється. Плазмін, що утворився, розкладає фібрин, оголюючи нові лізинові залишки, з якими зв'язується інший активатор плазміногену (одноланцюгова урокіназа). Плазмін перетворює урокіназу в активну дволанцюгову, викликаючи подальшу трансформацію плазміногену в плазмін і розчинення фібрину. Основна функція плазміну – розщеплювати фібрин і підтримувати судини в стані, при якому кров може вільно рухатися судиною.

Але плазмін може руйнувати інші субстрати, включаючи фібриноген, ф.V, ф.VIII, ф.X, ф.IX, ФВ і тромбоцитарні глікопротеїни. Він також активує компоненти каскаду комплементу (C1, C3a, C3d, C5). Розщеплення плазміном пептидних зв'язків у фібрині й фібриногені приводить до утворення різних дериватів із меншою молекулярною масою – продуктів деградації або розщеплення фібрину.

Плазмін у кровотоці швидко інактивується природно утворюваними інгібіторами, але плазмін у фібриновому згустку захищений від дії інгібіторів і лізує фібрин локально, тобто у фізіологічних умовах фібриноліз обмежений зоною фібриноутворення (гемостатичною пробкою).

Функції активаторів плазміну й плазміногену модулюються інгібіторами: альфа₂-антиплазміном, альфа₂-макроглобуліном, інгібіторами активатора плазміногену 1, 2, 3, C1-інгібітором, глікопротеїном, багатим гістидином [10, 23, 42, 63, 82, 160, 169, 186].

Таким чином, нормальна функція системи гемостазу – складний багатостадійний процес, сповнений прямих та обернених взаємодій як на молекулярному, так і клітинному рівні. Головним завданням реакцій системи гемостазу є РАСК: підтримка рідкого стану крові; своєчасне відновлення стінок капілярів і судин, ушкоджених у результаті нормального функціонування органів і систем; підтримка на адекватному рівні активності компонентів гемостазу на випадок катастрофи – розриву судини, ушкодження органів і тканин.

Таким чином, за морфологічною структурою система РАСК являє собою комплекс вибірково залучених компонентів, у яких взаємини, незважаючи на їхній протилежний характер, здобувають характер взаємодії для одержання фокусованого корисного результату – створення гемостатичного потенціалу крові. Оптимальний рівень гемостатичного потенціалу програмується в центральній нервовій системі акцептором дії на основі аферентного синтезу. При цьому величина відхилення агрегатного стану крові від необхідного оптимального рівня пускає в хід регулюючі механізми [44]. Вказані аспекти функціонування системи гемостазу сприяють посиленню

варіабельності нормальної та патологічної відповідей організму при дії чинників, що призводять до відхилення гемостатичного балансу. Можливість виникнення патологічних відхилень визначається індивідуальними особливостями організму, який зазнає впливу цих чинників.

1.2 Варіабельність активності гемостатичних реакцій і адаптивні процеси в організмі

Як частина загального гомеостазу організму, реакції гемостазу піддаються впливу великої кількості екзогенних і ендогенних факторів. До таких можна віднести режим фізичних навантажень, характер харчування, особливості конституції організму, стрес та ін. Наявність прихованих форм супутніх захворювань, безконтрольний прийом препаратів, що впливають на систему гемостазу, шкідливі звички (тютюнопаління, зловживання алкоголем, наркозалежність) є додатковою причиною варіабельності реакцій тромботворення та тромболізу.

Підвищення фізичних навантажень приводить до швидкої евакуації факторів згортання з депо збереження (печінка, селезінка, кісткові м'язи). У результаті показники прокоагулянтної активності зростають. У нормі через якийсь час після фізичного навантаження активується антикоагулянтна система. При цьому істотно змінюється і гемореологія [51, 52, 66, 97]. При гіперкоагуляційних станах компенсаторних впливів антикоагулянтної та фібринолітичної систем може бути недостатньо. Тому різко зростає ризик тромботворення [62, 71, 78, 111, 156]. Стрес-фактори призводять до змін у системі гемостазу. Відбувається зниження загального коагуляційного потенціалу. Але при цьому відзначається зменшення активності АТ ІІІ, зростання кількості фібриногену [61]. Зменшується потенційна активність плазміногену та знижується активність Хагеман-залежного фібринолізу, зростає вміст антиплазмінів. У плазмі виявляються розчинні фібрин-мономерні комплекси, підвищується вміст продуктів розпаду фібриногену/фібрину. Такі різноспрямовані зміни системи гемостазу характерні для

ДВЗ-синдрому [27, 89], але ступінь вираженості його проявів корелює з інтенсивністю стресового фактора та здатності організму до адаптації [62, 73, 172].

Подразники однакової інтенсивності і тривалості для різних людей можуть призводити до різних адаптивних реакцій. Головними регуляторами їхнього запуску є центральна нервова і гіпофізарно-наднирникова системи. Залежно від сили подразника в організмі домінують синтоксичні або кататоксичні програми адаптації. Якщо синтоксичні реакції пригноблені, то спостерігається перевага кататоксичних процесів. Це супроводжується порушенням гомеостазу, у тому числі – гемостатичного [24, 25, 52, 66, 67, 68, 110, 195].

До дестабілізації нормальної адаптивної відповіді організму може призводити цілий ряд факторів. У хворих з високим ризиком розвитку тромботичних ускладнень унаслідок тютюнопаління можуть розвиватися різні ознаки ішемії. Це зумовлено судинозвужувальною дією нікотину і його здатністю активувати функцію тромбоцитів [151]. Вживання наркотичних речовин призводить до значного розбалансування систем детоксикації, враження судинного ендотелію і, як наслідок, – підвищення ризику розвитку тромботичних ускладнень [39].

Зміна агрегаційної активності тромбоцитів і коагуляційних реакцій відбувається і під впливом алкоголю. У цьому випадку інтенсивність змін залежить від функціональної здатності детоксикаційних систем організму щодо нейтралізації алкоголю. Виявлено, що у хворих хронічним алкоголізмом II стадії присутні два типи реакцій з боку системи гемостазу. Найбільш поширеною є активація протромботичних взаємодій, менш поширеною – їх інгібіювання. При другому типі у хворих, як правило, спостерігалися супутні функціональні порушення печінки [71, 72, 80].

Варіабельність гемостатичних реакцій залежить також від характеру харчування людини. При різних раціонах харчування можуть спостерігатися тенденції до протромботичного, або антитромботичного станів. Так, було встановлено, що введення в раціон харчування деяких овочів і фруктів

(зокрема, томатів, червоних сортів винограду), продуктів, що містять довголанцюгові ($n=3$) жирні кислоти, приводить до зменшення тромботворного потенціалу крові. Продукти ж з високим вмістом арахідонової кислоти є фактором ризику розвитку тромбозів [19, 199, 212].

В останні роки досить багато уваги приділяється проблемі метаболізму гомоцистеїну. При дефіциті вітамінів B_6 і B_{12} , фолієвої кислоти порушується його переробка, що призводить до значного ризику розвитку тромбозів [175, 204].

Таким чином, характер харчування є одним з факторів, що визначають розкид показників активності різних елементів системи гемостазу серед популяції здорових осіб і серед хворих різними патологіями.

Супутні патології також вносять вклад у посилення варіабельності гемостатичних реакцій. Сьогодні вважається, що не існує жодного захворювання, при якому система гемостазу залишалася б інертною. При цьому зміни можуть бути різної інтенсивності і залежать від здатності організму до адаптації стосовно хвороботворного агента (джерела) [32, 37, 50, 56, 71, 77, 129, 159, 179, 181, 183, 205, 209].

Найвірогідніше, перевага кататоксичних адаптивних реакцій є причиною порушення реакцій системи гемостазу і в осіб, що піддавалися впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища. При цьому, як і при порушеннях гемостазу в алкоголіків, виявлено 2 типи відповіді: підвищення гемостатичного потенціалу і його зниження.

При дії малих доз іонізуючого випромінювання відзначається повільне наростання активності прокоагулянтних і проагрегантних реакцій, поступова активація фібринолітичної системи [20, 43, 61, 67, 73, 157].

При хронічному комплексному впливі різних несприятливих факторів зовнішнього середовища вид адаптивної відповіді з боку системи гемостазу визначається спадковими факторами і дещо розрізняється у дорослих і дітей. Так, у дітей у переважній більшості випадків незалежно від терміну дії патогену, виявляється порушення протромбіносинтетичної функції печінки, відшнурування тромбоцитів, аутоімунні порушення тромбоцитарного

і коагуляційного гемостазу. У дорослих характер відповіді більшою мірою залежить від тривалості перебування в зоні несприятливого впливу. Ультразвукові хвилі, електромагнітні поля спочатку призводять до активації функції тромбоцитів, запуску реакцій протромбіназотворення. Але в наступні періоди відбувається поступове зниження протромботичної активності крові з розвитком стійкої гіпокоагуляції, що може розвиватися на тлі порушення білоксинтетичної функції печінки [43, 73, 85, 112, 132, 148, 164].

Живі організми – енергетично відкриті, здатні до саморегуляції системи, що підкоряються законам детермінованих реакцій та можуть у ході адаптації досягати критичного рівня життєдіяльності. Динамічна рівновага підтримується стабільністю гомеостатичних реакцій, у тому числі гемостазом. Несприятливі умови, у яких може існувати організм, викликають стан гіперкритичності динамічної рівноваги, але це навантаження на адаптаційні системи досить тривалий час компенсується, хоча вже в цьому випадку можна говорити про виникнення адаптаційного синдрому, що виявляється підвищеним споживанням енергії, нагромадженням вільних радикалів, ацидозом [121, 190].

Адаптивні процеси організму, якщо вони відбуваються по кататоксичному типу, призводять до порушення функціонування і руйнування клітин. Вважається, що ендогенними патогенами можуть бути білки цитозолі й органел клітин, інтегральні протеїни мембрани, транспортні білки сироватки крові з афізіологічною конформацією молекули, шаперони (білки теплового шоку – метаболічні компоненти стресу), протеїни з генетично зміненою первинною структурою, імунні (аутоімунні) комплекси. Активні форми кисню також відіграють значну роль у процесах синтоксичних або кататоксичних адаптивних відповідей організму на агент, що впливає. Підвищена продукція вільних радикалів може призводити до незворотних ушкоджень клітинних структур. Активні форми кисню реалізують свій ефект самотійно або через проміжні і кінцеві продукти радикальних реакцій [24, 45, 46, 67, 68, 69, 110, 120, 154, 158]. Вплив ендотоксинів на систему гемостазу вивчено досить добре лише на пізніх стадіях синдрому ендогенної інтоксикації,

коли рівень деструкції вже досить високий. Вплив малих концентрацій ендогенних патогенів на реакції тромботворення й тромболізу на ранніх стадіях ендотоксикозу вивчено недостатньо. Відомо, що деякі короткі пролінмісткі пептиди, що є продуктами деградації білків сполучної тканини, активують функцію протизгортуючої системи і не тільки підвищують фібринолітичний і антикоагулянтний потенціал крові, але й виявляють антитромбоцитарний ефект; також не виключається можливість постійної участі цих пептидів у регуляції згортання крові і фібринолізу [4, 46, 67, 81, 88, 166]. Є дані про залежність ступеня важкості перебігу гемофілії від вмісту молекул середньої маси [125].

Таким чином, на варіабельність показників системи гемостазу впливає ряд факторів ендогенного й екзогенного характеру. Власне, гемостаз, як життєво важлива система організму, підлягає ретельній нозологічній регуляції [48]. Зміна одного параметра веде до відхилення іншого, причому характер змін такий, що сумарна здатність крові до згортання (т. зв. гемостатичний потенціал), при відсутності значимих ушкоджень судини, залишається близьким до нуля [38, 51, 60, 67, 95, 147].

В умовах високої залежності системи гемостазу від ендогенних і екзогенних патогенів гостро постає питання про критерії вибору здорових осіб для встановлення нормальних значень й адекватності існуючих норм для різних методів дослідження системи гемостазу. Границі референтних інтервалів для методів дослідження гемостазу традиційно, визначаються за формулою $L = M \pm 2S$, де L – шукана границя; M – середнє вибірки нормальних значень, S – середньоквадратичне відхилення цієї вибірки [38, 47, 60, 87, 119, 137, 153, 155, 156, 162, 171, 185].

Методики виконання досліджень системи гемостазу вимагають застосування біологічних реагентів. Як правило, різні виробники реагентів для коагулологічних досліджень випускають їх з різною активністю. Разом з тим, активність, а також параметри якості цих реагентів можуть мінятися від серії до серії навіть у того самого виготовлювача.

Таким чином, варіабельність адаптивних відповідей з боку системи

гемостазу, розмаїтість методів її дослідження, використання реагентів з активністю, що „плаває” від серії до серії, підходи до підбору референтних груп фірмами-виробниками, варіабельність методів обробки результатів, зумовлюють необхідність вироблення кожною лабораторією власних референтних границь, створення установи, що займалася б їхнім установленням для лабораторій визначеного регіону, визначення спеціальних для коагулогічних досліджень заходів на етапах аналізу, які б сприяли підвищенню репрезентативності скринінг-коагулограми.

1.3 Контроль якості лабораторних досліджень

Існування проблеми якості лабораторних досліджень було визнано ще в 40-х роках XX століття. До цього часу не існує єдиної концепції її рішення. Вимоги, пропоновані міжнародними організаціями зі стандартизації (Комітет біологічних стандартів ВООЗ, Комітет референтних матеріалів ISO, Наукова оціночна група із сертифікації референтних матеріалів Європейської комісії (і т.ін), певною мірою, відбиті у виданих ними документах: серія ISO 9000 і EN 45000. У країнах Європейського Союзу ці вимоги стали нормативами, що визначають допуск відповідної продукції (устаткування і реагентів) на ринок [9, 59, 94, 98, 104, 114, 144, 176, 177].

Контроль якості лабораторних досліджень розділяють відповідно до етапів лабораторного дослідження на преаналітичний, аналітичний і постаналітичний [87, 178]. Якщо на аналітичному етапі лабораторного аналізу розроблені та широко застосовуються алгоритми й процедури забезпечення якості, то на преаналітичному якості досліджень залишається серйозною проблемою. Найкращим рішенням питання може стати стандартизація преаналітичного етапу, але питання про введення єдиного стандарту пов'язане з великими економічними витратами [74, 99, 113, 140].

Ігнорування при проведенні дослідження незначних, на перший погляд, деталей призводить до перекручення результатів аналізу. Так, терміни доставки зразків у лабораторію лімітовані стабільністю аналітів.

Максимальний термін збереження визначається як період часу, протягом якого забезпечується необхідна стабільність 95% проб. Активність факторів згортання починає змінюватися практично відразу після накладення джгута для одержання зразка. Ці зміни підсилюються після потрапляння крові в пробірку. Але єдиного погляду на терміни збереження крові для гемостазіологічних досліджень не існує. Для досліджень функціональної активності тромбоцитів термін збереження не повинний перевищувати 1 годину. При цьому вважається неприпустимим охолодження зразків. Для коагулологічних досліджень зразки плазми можуть зберігатися на льоді до 2 годин. Притому, що умови збереження різні, проба для гемостазіологічного аналізу відбирається разом із пробами для інших досліджень [17, 29, 30, 83, 87, 100, 101, 138, 152, 178].

Найважливішою складовою аналітичного процесу є метод дослідження. Компонентами оцінки методу є його специфічність, чутливість, перешкодостійкість. На сьогодні поширена система уніфікації методів дослідження, що припускає добір кваліфікованою установою ряду тестів для рядових лабораторій. Більш досконалим підходом є стандартизація методів дослідження. Вона включає встановлення визначених вимог на кожному етапі аналітичної процедури, обов'язкового застосування точних референтних матеріалів із необхідними відтворюваністю і правильністю. Крім того, при стандартизації проводиться розробка критеріїв точності аналітичних результатів: а) за оцінки лабораторних експертів; б) за оцінки клініцистів; в) за досягнутого кращими лабораторіями рівня точності; г) порівняно з біологічною варіацією.

Додатковим аспектом проблеми стандартизації при лабораторних дослідженнях у цілому і при аналізі реакцій гемостазу зокрема є стандартизація типових процедур діагностики й моніторингу досліджуваних порушень. Використання референтних матеріалів, стандартизація методів дослідження й алгоритмів діагностики – засоби забезпечення якості досліджень.

Під якістю аналізу у світовій практиці розуміють його аналітичну вірогідність і своєчасність [7, 8, 29, 30, 31, 34, 55, 58, 90, 94, 98, 103, 104,

108, 115, 142, 152, 211].

Постаналітичний етап включає такі елементи, як інтерпретація отриманих у результаті досліджень абсолютних значень, подачу результатів і, при необхідності, ведення моніторингу стану пацієнта. На жаль, стосовно гемостазіологічних досліджень, постаналітичний етап також нестандартизований. Основною причиною цього є відсутність єдиного стандарту активності біологічних реагентів, розмаїтість методів дослідження і їхніх модифікацій. Впровадження апаратних методик аналізу активності компонентів системи гемостазу також не привело до бажаної стандартизації.

Прийнятність результату дослідження оцінюють при аналізі погрішностей. Аналітичні помилки поділяють на систематичні і випадкові. Систематична помилка, яка визначається за такою властивістю, як правильність, по своїй суті є постійним зрушенням результатів контрольованого дослідження у відношенні до результатів, установлених на більш високому аналітичному рівні. Випадкова погрішність може бути викликана великою кількістю різних факторів, що часто неможливо виділити і врахувати. Величину випадкової помилки оцінюють за допомогою відтворюваності – якості вимірів, що відбиває близькість результатів виміру тієї самої проби. Її мірою є середньоквадратична помилка (S) або коефіцієнт варіації (CV) – S , виражена у відсотках від середнього значення серії досліджень [84, 87, 98].

Вважається, що оцінка випадкової помилки є більш важливим етапом контролю якості, ніж виявлення систематичної помилки [152].

У країнах Європейського Союзу і Сполучених Штатах Америки тривалий час займалися питаннями стандартизації лабораторних досліджень. У США у 1988 р. було видано документ, що регламентує якість досліджень – Clinical Laboratory Improvement Amendment (CLIA-88). Відповідно до CLIA-88 результати досліджень обробляють статистично і порівнюють із прийнятними специфічними величинами помилок (табл. 1.2.1) [211]. На сьогодні в США розроблені й рекомендовані для практики інші документи, що регламентують контроль якості на базі CLIA-88.

У Європі розроблені інші вимоги до методів. Невідтворюваність методу

Таблиця 1.2.1

Критерії прийнятності помилок за CLIA-88

Тип помилки	Критерії
Випадкова	$S_{\text{набл}} < S_A; 2S_{\text{набл}} < TE_A$
Систематична	$(a + bx_c) - x_c < TE_A$
Загальна	$2S_{\text{набл}} + (a + bx_c) - x_c < TE_A$

Примітка. $S_{\text{набл}}$ – стандартне відхилення, зумовлене в повторних (рівнобіжних) дослідженнях; S_A і TE_A – відповідно, прийнятне стандартне відхилення і загальна помилка; x_c – вирішальний рівень концентрації, при якому медична інтерпретація є критичною; a і b – інтерцепт і кут нахилу кривої, які визначаються за допомогою регресивного аналізу порівнянням даних двох методів.

повинна бути менша від 1/2 середньої величини внутрішньоіндивідуальної біологічної варіації або не гірша, ніж показник роботи 20% кращих лабораторій. Неправильність методу повинна бути менша від 1/4 групової (внутрішньо- і міжіндивідуальної) біологічної варіації або 1/16 від показників референтного матеріалу, або менш, аніж подвоєна індивідуальна невідтворюваність. Ці критерії поділені на тимчасові (засновані на показниках якості роботи кращих лабораторій) і пропоновані (засновані на значеннях біологічної варіації) [98, 101, 144].

При порівнянні ефективності рекомендацій Робочої Групи Європейського комітету і CLIA-88 стає очевидним, що на території Європи вимоги до методів більш жорсткі, що різко підвищує якість досліджень.

В Україні оцінка біологічної варіації досить ускладнена, а кількість лабораторій виконуючі дослідження гемостазу на достатньому рівні, встановити складно. Тому для лікувально-діагностичних установ нашої країни, на наш погляд, більш прийнятною є система CLIA, принаймні, на перших етапах створення української системи контролю якості.

Аналіз літератури показав, що коагулологічні дослідження підкоряються всім закономірностям і правилам оцінки якості лабораторного аналізу. Але

багато з методів, застосовуваних для діагностики і моніторингу порушень згортання крові, не є результатом прямого виміру концентрації речовини. Крім того, відсутні методична й інструментальна стандартизація досліджень, відсутні або мають високу вартість контрольні матеріали. Ці чинники значно ускладнюють стандартизацію в коагулології. Тому для підвищення якості лабораторної діагностики у цій сфері медицини більш прийнятним є підхід, що міг би поєднати елементи стандартизації й уніфікації і який можна було б охарактеризувати як систему правил дослідження згортання крові. Нові перспективи в аналізі діяльності лабораторної служби відкривають розробка й використання стандартів обсягу медичної допомоги, здійснюваної в регіонах і спеціалізованих медичних установах [86, 105, 131, 139].

Таким чином, в Україні практично відсутня система стандартизації лабораторних досліджень системи гемостазу. Використання для встановлення границь референтних інтервалів зразків крові представників інших регіонів призводить до порушень трактування лабораторних досліджень. Дотепер не визначені критерії вибору практично здорових осіб серед жителів України. Такий стан лабораторної гемостазіології створює складності в діагностиці й моніторингу порушень системи гемостазу.

1.4 Основні принципи і методи діагностики порушень системи коагуляційного гемостазу

В основі сучасної діагностики порушень вторинного гемостазу лежить визначення функціональних можливостей коагуляційних і антикоагулянтних протеїнів і інших про- й антикоагулянтних речовин. Таке визначення проводять з використанням двох основних типів методів. До 1 групи відносять такі, при виконанні яких застосовуються хромогенні субстрати. Це штучно створені пептиди, послідовність амінокислот у яких подібна до тієї, на котру діє фермент. При впливі ензиму від пептиду відокремлюється барвний фрагмент (у сучасних хромогенних субстратах це p-нітроанілін). За ступенем фарбування визначають активність досліджуваного ензиму.

При застосуванні деяких хромогенних субстратів не у повному обсязі відтворюється специфічність реакції. Останнє відбувається тому, що ферменти згортання є сериновими протеїназами з близькими за своєю амінокислотною структурою зонами впливу в молекулі субстрату. Тому при недостатній специфічності синтетичного реагенту на кінцевий результат може впливати активність ферментів, вивчення яких не є завданням у дослідженні [13, 14, 91, 118, 180, 207].

Іншою, найбільш поширеною групою методів, є тести, що базуються на моделюванні *in vitro* реакцій коагуляції і на визначенні часу утворення або лізису фібринового згустку в цих спеціально створених (модельних) умовах. Перевага таких методів перед іншими – низька вартість при досить високій точності та можливість проведення досліджень без складного лабораторного оснащення [14, 22, 26, 57, 64, 93, 109, 130].

Діагностику порушень коагуляційного гемостазу можна розділити на два етапи: скринінговий та диференційний.

На першому проводять скринінг окремих ланок фібриноутворення. На другому визначають безпосередню активність того або іншого компоненту системи гемостазу. Моніторинг за лікуванням (при встановленому діагнозі) у більшості випадків може базуватися на скринінгових методах. Основний недолік скринінгових тестів полягає в тому, що отримані з їхньою допомогою результати характеризують не функціональний стан окремих білків системи згортання крові, а цілі ланки гемокоагуляції [13, 22, 96, 124, 201, 210].

Здавалося б, першим етапом коагулологічного дослідження повинно стати визначення активності процесів контактної активації. Фактор Хагемана активується при контакті з будь-якою поверхнею, що відрізняється від ендотелію (крім силіконованої або виготовленої зі спеціальних сортів пластику). В основі принципу більшості функціональних методів визначення ступеня активації гемостазу лежить визначення співвідношення між активованим часом згортання і неактивованим. З огляду на низьку частоту вроджених порушень активності фактора XII, його високу здатність

переходити в активований стан, актуальність включення такого дослідження в скринінг-коагулограму є сумнівною.

На наш погляд, на першому етапі дослідження системи гемостазу доцільно відобразити активність протромбіназотворення.

Для скринінгового дослідження протромбіназотворення за зовнішнім механізмом використовують різні модифікації методу визначення протромбінового (тромбопластинового) часу (ПЧ). Найчастіше цей тест застосовується для моніторингу за лікуванням непрямыми антикоагулянтами (антагоністами вітаміну К), але він є обов'язковим і при діагностиці порушень активності реакцій зовнішнього шляху протромбіназотворення [13, 14, 22, 25, 26, 32, 64, 131, 138, 150, 179, 201]. При недостатності вітаміну К або введенні в організм його антагоністів активізується процес гама-карбоксилування попередників факторів II, VII, IX, X, протеїнів С і S. Частина з цих білків, що одержали назву PIVKA (протеїни, що утворюються в присутності інгібіторів вітаміну К) виділяються в кровоток. Вони є неактивними і не можуть виконувати свою функцію [63, 76, 92, 117, 133, 180, 182].

Загальний принцип більшості скринінгових клотингових тестів (СКТ) визначення сумарної активності факторів внутрішнього шляху протромбіназотворення (ФВШП) такий: при достатній кількості іонів кальцію й наявності контактної активації, а також оптимальному вмісті в реагуючій суміші 3-го фосфоліпідного фактора тромбоцитів, *in vitro* моделюється ситуація, аналогічна до тої, яка в організмі людини призводить до протромбіназотворення по внутрішньому шляху з наступним тромбіно- і фібринотворенням. До методів, що можуть охарактеризувати цей процес, відносять визначення часу згортання цільної крові, часу рекальцифікації плазми, активованого часу рекальцифікації плазми, парціального тромбопластинового часу, активованого парціального тромбопластинового часу, а також індексу МА аутокоагулограми й інші, менш поширені в практиці клінічних лабораторій, тести. Принциповою відмінністю цих методів є те, що 3-ій фосфоліпідний фактор походить з різних джерел. У методі визначення часу рекальцифікації плазми (ЧРП) його джерелом є власні тромбоцити

пацієнта. При визначенні парціального тромбoplastинового часу (ПТЧ) і активованого парціального тромбoplastинового часу (АПТЧ) – це штучний аналог 3-го фосфоліпідного фактору тромбоцитів. При проведенні аутокоагуляційного тесту (АКТ) фосфоліпід виділяється в основному з еритроцитарних мембран [14, 22, 64, 83, 96, 124, 130, 150, 188, 207]. Крім того, при визначенні активованого часу рекальцифікації плазми (АЧРП) і АПТЧ використовується штучний ініціатор контактної активації (найбільш часто застосовується легка фракція каоліну або еларгова кислота). При дослідженні активності ФВШП за допомогою методу визначення часу згортання крові, ЧРП або АКТ таким ініціатором виступають поверхні, з якими контактує кров [18, 31, 34, 90, 108, 153].

Для визначення активності одного із найпотужніших антикоагулянтів – антитромбіну III (АТ III) звичайно використовують метод, у який закладено принцип Abildgaard. У його основі – здатність досліджуваної плазми інактивувати тромбін, внесений у реакційну суміш у визначеній дозі. По залишковій активності тромбіну судять про активність АТ III. При ряді спадкових тромбофілій, розвитку гострого синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ), лікуванні L-аспарагіназою, пізніх гестозах, прийомі естрогенних протизаплідних засобів, важких ураженнях печінки активність АТ III може зменшуватися. Крім того, останнє настає під впливом великих доз гепаринів. При дефіциті й деяких аномаліях АТ III, що є плазмовим кофактором гепарину, антикоагулянтний ефект комплексу АТ III + гепарин послабляється. Тому у всіх перерахованих ситуаціях контроль активності АТ III є важливою частиною коагулологічного дослідження [13, 16, 20, 21, 27, 55, 62, 70, 76, 82, 89, 97, 108, 160, 205]. Однак питання про необхідність використання тесту визначення АТ III для скринінгу залишається відкритим. Якщо методи визначення АПТЧ і ПТЧ чутливі до змін активності АТ III, то чи не можна застосувати комплексну оцінку для превентивної характеристики активності цього антикоагулянту?

До функціональних способів визначення вмісту фібриногену в плазмі крові відносять такі, котрі ґрунтуються на реакції перетворення

фібриногену у фібрин під впливом тромбіну (ваговий метод за Рутберг, хронометричний за Клауссом). У практиці застосовується і спосіб оцінки вмісту в плазмі ф.І, що базуються на здатності тромбіноподібних ферментів отрут деяких змій викликати утворення фібрину. При високій відтворюваності і точності тестів із застосуванням отрут, методи, що ґрунтуються на використанні тромбіну, більш поширені в клінічних лабораторіях. Причин цьому може бути дві. Перша – висока вартість комерційних реагентів, а друга – те, що ці діагностикими осаджують ще і продукти деградації фібриногену/фібрину різних рівнів. Інтерес представляє також спектрофотометричний метод дослідження концентрації фібриногену (КФ), розроблений В.А. Беліцером і співавторами (1983). Цей спосіб також ґрунтується на перетворенні фібриногену у фібрин під впливом тромбіну в присутності іонів кальцію. Але в цьому випадку реакція відбувається ще і за участю моноіодацетату, завдяки якому утримувані згустком сироваткові білки елімінують, полегшується наступне розчинення. Незважаючи на дуже високу точність, використання цієї методики визначення КФ в умовах клініко-діагностичної лабораторії не зовсім виправдано. По-перше, з огляду на особливості реактиву для зв'язування плазмового кальцію (3,8% розчин цитрату натрію, що містить 0,2 моля епсилон-амінокапронової кислоти), отримання крові для визначення КФ і інших тестів коагулограми необхідно було б розділити (тобто набирати кров для дослідження вмісту фібриногену в окрему пробірку). Це спричиняє збільшення часу забору крові, що може негативно відбитися на інтенсивності процесів контактної активації. По-друге, обробка проб, порівняно з іншими методами визначення КФ, досить складна [14, 17, 23, 32, 64, 108, 134, 135, 138, 167, 185, 210].

У сучасній клініко-лабораторній діагностиці використовують методи, що відрізняються точністю і відтворюваністю при мінімальній витраті засобів і часу. Але українські стандарти якості [146] рекомендують використовувати методи, далекі від сучасних вимог, у тому числі - час згортання крові, тест генерації тромбопластину, гепариновий час і т.д. Ці методи не тільки виконуються тривалий час, але і не здатні в багатьох випадках до адекватного

відображення станів “норма” і “патологія”. Крім того, одержати референтний матеріал для них або неможливо в принципі, або вкрай важко.

Таким чином, коагулологічні дослідження при різних патологіях стали невід’ємною частиною діагностичного процесу. Впровадження цих методів у клініко-діагностичних лабораторіях відбувалося одночасно з посиленням вивченням самих гемостазіопатій на фоні загальних успіхів біології, хімії, фізики, біохімії, фізіології та патохімії реакцій системи гемостазу. Потік методів коагулологічного дослідження (особливо з винаходом пристроїв типу електроеластограф, електрокоагулограф), буквально, “обвалився” в клініку, нерідко створюючи труднощі в виборі оптимальних тестів та інтерпретації їх значень [171]. Сьогодні перелік функціональних методів дослідження гемокоагуляції досить об’ємний. Усі вони мають свої переваги і недоліки. Багато функціональних тестів, що раніше широко застосовувалися, останнім часом свою діагностичну цінність втратили й у медицині не використовуються.

Таким чином, необхідно зазначити, що лабораторна діагностика порушень системи гемостазу – комплексний процес, але для того, щоб він був максимально ефективним, необхідно раціонально використовувати сили і засоби, проводити правильний вибір методів, що в цілому може вирішити багато питань специфічної діагностики та моніторингу лікування коагулопатій.

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Клініко-лабораторна характеристика пацієнтів

У роботі подано результати дослідження 55 (31,43% від числа обстежених) практично здорових осіб (добровольців-мікродонорів), 51 (29,14% від числа обстежених) хворого з геморагіями і 69 (39,43% від числа обстежених) хворих із тромботичними ускладненнями або високим ризиком їхнього розвитку. Загальна кількість обстежених осіб - 175. Усі хворі лікувалися у відділенні хірургічної гематології і гемостазіології ІГТ АМН України з 1998 по 2002 рр. Клінічна характеристика досліджуваних груп пацієнтів і лікування хворих з порушеннями коагуляційного гемостазу здійснювалися науковими співробітниками відділення хірургічної гематології і гемостазіології ІГТ АМН під керівництвом доктора медичних наук М.В. Суховія.

За характером клінічних проявів хворих поділили на 2 групи. Верифікація порушень коагуляційної ланки системи гемостазу проводилася на підставі ряду анамнестичних і клінічних критеріїв [10, 27, 37, 41, 49, 50, 54, 89, 109, 122, 126, 136, 149, 182, 184, 200, 207, 208].

До I-ї групи були віднесені пацієнти, у яких порушення згортання крові виявлялись на момент обстеження геморагіями. У II-у групу увійшли хворі з розвиненими тромбозами та тромбогеморагіями, а також ті, у яких ризик розвитку тромботичних ускладнень надзвичайно високий.

Пацієнтів I-ї групи додатково розділили на: хворих гемофілією і хворобою Віллебранда (28 чоловік (54,90% від числа пацієнтів I-ї групи)) – підгрупа I₁; гіпофібриногенемією (12 чоловік (23,53% від числа пацієнтів I-ї групи)) – підгрупа I₂; гіпопроконвертинемією (11 чоловік (21,57% від числа пацієнтів I-ї групи)) – підгрупа I₃.

У II-ій групі в результаті поділу за характером клінічних проявів тромбофілії були виділені в окремі підгрупи хворі з гострими тромбофлебітами глибоких і поверхневих вен, яким не проводилося оперативне

втручання, але проводилося лікування прямими антикоагулянтами (30 чоловік (43,48% від числа пацієнтів II-ї групи)) – підгрупа П1; пацієнти з тромбогеморагічним синдромом (10 чоловік (14,49% від числа пацієнтів II-ї групи)) – підгрупа П2; особи з різним ризиком розвитку тромботичних ускладнень (29 чоловік (42,03% від числа пацієнтів II-ї групи)) – підгрупа П3 (рис. 2.1.1, 2.1.2.).

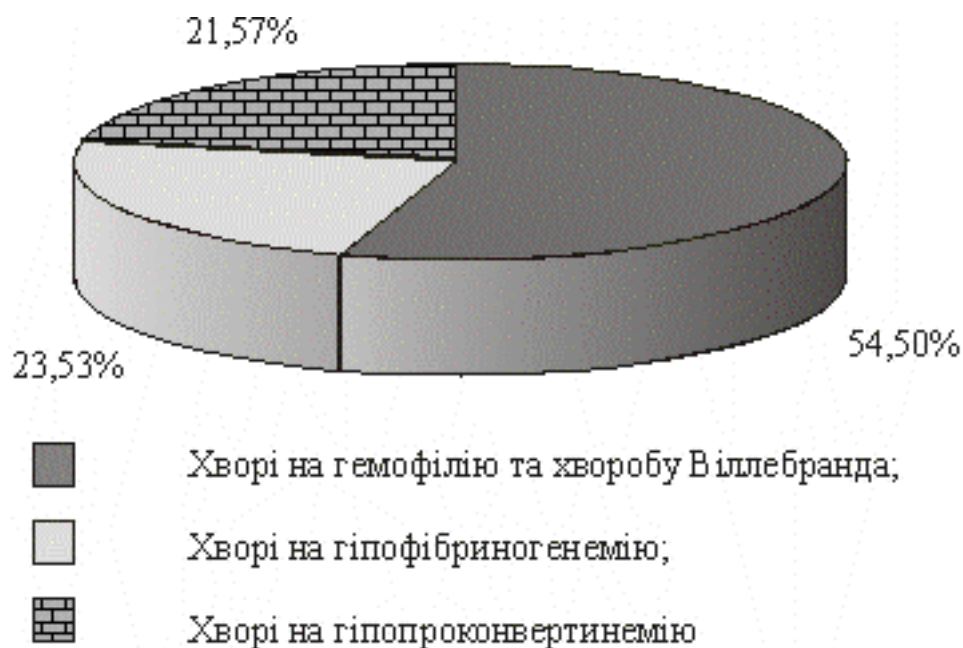


Рис. 2.1.1 Відсоткове співвідношення між підгрупами хворих з геморагіями



Рис. 2.1.2 Відсоткове співвідношення між підгрупами хворих на тромбофілію

Пацієнти підгрупи ІІз залежно від кількості факторів ризику, були розділені на 3 категорії: ^IІІз (1 фактор ризику) – 10 чоловік (34,48% від числа пацієнтів підгрупи ІІз); ^{II}ІІз (2 фактори ризику) – 10 чоловік (34,48% від числа пацієнтів підгрупи ІІз); ^{III}ІІз (3 фактори ризику) – 9 чоловік (31,03% від числа пацієнтів підгрупи ІІз) (рис 2.1.3).

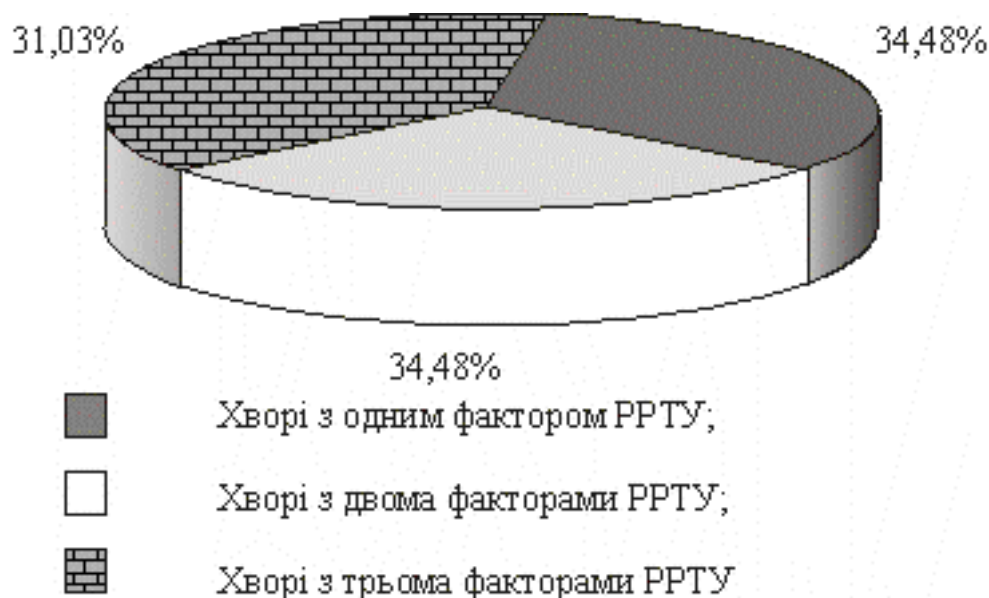


Рис. 2.1.3 Відсоткове співвідношення між пацієнтами з високим ризиком тромботворення

Дослідження системи коагуляційного гемостазу в пацієнтів усіх груп проводилося в динаміці лікування. Для пацієнтів групи І застосовувалися специфічні препарати прокоагулянтної дії, а пацієнтів групи ІІ – антикоагулянтної дії.

Хворі всіх підгруп, крім ІІз, мали потребу в наданні екстреної допомоги та були госпіталізовані за направленням карети швидкої допомоги. У табл. 2.1.1 зазначено характер ускладнень основного захворювання, які були причиною призначення препаратів прокоагулянтної або антикоагулянтної дії.

Курс лікування пацієнтів групи І не перевищував 1 тижня. Хворі підгрупи І₁ одержували кріопреципітат у дозі 10-15 МО/кг маси тіла за добу. Пацієнтам підгрупи І₂ застосовували фібриноген в якості основного лікувального засобу, а хворим підгрупи І₃ – свіжозаморожену плазму. Дослідження проводилися у плановому порядку.

Таблиця 2.1.1

Частота ускладнень порушень системи гемостазу в досліджуваних груп пацієнтів (% від загального числа хворих)

Група	Підгрупа	Основний діагноз	Ускладнення	Кількість
1	2	3	4	5
I	I ₁	Гемофілія	Гемартроз ліктьового суглоба	4,17
			Гемартроз колінного суглоба	10,00
			Гематурія	2,50
		Хвороба Віллебранда	Міжм'язова гематома стегна	1,67
			Профузні носові кровотечі	3,33
			Гемартрози колінних суглобів	1,67
	I ₂	Гіпофібриногенемія	Носові кровотечі	5,00
			Ясневі кровотечі	4,17
			Шлунково-кишкова кровотеча	0,83
	I ₃	Гіпопроконвертинемія	Менорагія	1,67
			Гематурія	3,33
			Гемартрози колінних суглобів	3,33
			Крововилив у порожнину перикарда	0,83
II	II ₁	Гострий тромбофлебіт	Глибоких вен нижніх кінцівок	8,33
			Поверхневих вен нижніх кінцівок	16,67
	II ₂	Політравма	Тромбогеморагії	1,67
		С-г товстого кишківника III-IV ст.		1,67
		С-г шлунка III-IV ст.		2,50

Продовження табл. 2.1.1

1	2	3	4	5
II	II ₂	Стан після великих оперативних утручань	Тромбогеморагії	2,50
	II ₃	Тромбофілія (підвищений РРТУ)	Без клінічних проявів	24,17

при госпіталізації хворого, у середині курсу лікування і по його закінченні, перед випискою.

Пацієнтам підгрупи II₁ застосовували комплексне лікування з включенням антикоагулянтів прямої дії (низькомолекулярних гепаринів) і препаратів реологічної дії. Вивчення коагуляційної ланки гемостазу проводилися протягом курсу лікування через кожні 3 дні з моменту початку терапії. У цьому дослідженні використовувалися дані, отримані до початку терапії антикоагулянтами, через тиждень після початку (у цей період, як правило, відмінялися прямі антикоагулянти) і перед випискою. Хворим із тромбогеморагічним синдромом (підгрупа II₂) застосовували терапію, у котру входили прямі антикоагулянти (гепарин), джерело АТ III (свіжозаморожена плазма), препарати реологічної дії, дезагреганти й інші лікарські засоби. У всіх хворих цієї підгрупи відзначався гострий декомпенсований ДВЗ-синдром. Вони госпіталізувалися у відділення інтенсивної терапії. По закінченні лікування пацієнта переводили у відділення за профілем основного захворювання. Контроль за антикоагулянтною терапією проводився щодня або кілька разів на день протягом усього курсу лікування. У дослідженні використані результати коагулологічного контролю до початку інтенсивної терапії, на 3 добу після початку і після переведення до профільного відділення. Хворі підгрупи II₃ після констатації гіперкоагуляційного синдрому одержували непрямі антикоагулянти у дозах, установлених при індивідуальному підборі. Препарати призначались довічно. У поданому дослідженні використані результати річного моніторингу за терапією непрямыми антикоагулянтами. Призначення здійснювалися науковими співробітниками відділення хірургічної гематології та гемостазіології ІГТ

АМН України під керівництвом д.мед.н. М.В. Суховія.

2.2 Матеріал дослідження

Матеріалом для дослідження була венозна та капілярна кров здорових осіб референтної групи, пацієнтів обох груп до початку лікування й у процесі застосування спеціальних лікарських засобів.

Зв'язування іонів кальцію крові проводилося шляхом її змішування з 3,8% розчином цитрату натрію.

Матеріал, отриманий для досліджень системи гемостазу, був однорідним за своєю консистенцією, без згустків і пухирців повітря. Після центрифугування вибраковувалися проби, в яких плазма крові містила сліди гемолізу або була мутною.

Матеріал від хворих для першого обстеження (до початку лікування препаратами антикоагулянтної або прокоагулянтної дії) одержували при госпіталізації чи першому зверненні хворого до лікувального закладу. В інших випадках венозну кров одержували ранком (з 9 до 10 години) натще шляхом стерильної пункції кубітальної вени самопливом у пластикову пробірку, що вже містила 3,80% розчин цитрату натрію (співвідношення об'ємів визначалось в залежності від показників гематокриту). Кров одержували в умовах регламентованого стазу (манжетка тонометра накладалася на передпліччя, нагнітався тиск 80 мм рт. ст., час стазу не перевищував 3 хв). Кров обережно змішували зі стабілізатором, пробірки маркірували з указівкою прізвища, ініціалів пацієнта, його віку, дати і часу забору, групи обстеження.

Капілярну кров для проведення досліджень системи гемостазу також одержували ранком (з 9 до 10 години) натще з пальця після проколу скарифікатором. Кров набирали в пластиковий капіляр, що вже містив 3,8% розчин цитрату натрію (співвідношення об'ємів кров/стабілізатор 9/1), переносили вміст капіляра в пробірку (висота 10,00 см, внутрішній діаметр 1,00 см), обережно змішували кров і стабілізатор. Пробірки маркірували з

указівкою прізвища, ініціалів пацієнта, його віку, дати і часу забору, групи обстеження.

Кров для дослідження гематокритного числа одержували з м'якоті пальця в одноразовий гепаринізований скляний капіляр.

Для проведення досліджень, при яких не потрібне зв'язування іонів кальцію, кров одержували відповідно до загальноприйнятих методів шляхом стерильної венепункції, у скляні або пластикові пробірки [6].

2.3 Методи дослідження

При проведенні цієї роботи використовували методи дослідження часу рекальцифікації плазми, активованого часу рекальцифікації плазми, парціального тромбопластинового часу, активованого парціального тромбопластинового часу, протромбінового часу. Крім того проводили визначення гематокритного числа, концентрації фібриногену, індексу максимальної активності аутокоагуляційного тесту, активності АТ III. Усі дослідження системи гемостазу починали не пізніше, ніж через 30 хв після одержання матеріалу. Як маркер прихованих запальних та дегенеративно-деструктивних захворювань досліджувалася концентрація середньомолекулярних пептидів. Для обробки отриманих даних використовували методи варіаційної статистики. Нижче подано опис лабораторних методів, використаних у дослідженні табл. 2.3.1.

Визначення активності ФЗШП.

Визначення протромбінового часу.

Принцип методу визначення протромбінового часу. Принцип методу полягає у тому, що при надлишку тромбопластину, оптимальній концентрації іонів кальцію і фібриногену в плазмі крові час утворення згустку залежить від активності проконвертину, протромбіну і фактора Стюарта-Прауера, а також від активності антикоагулянтів [64, 131, 135].

Визначення протромбінового часу капілярної крові.

– пробірку зі стабілізованою кров'ю поміщали в штативі водяного

Таблиця 2.3.1

Структура методів дослідження

Вид дослідження	Метод дослідження	Мета методу	Джерело
1	2	3	4
Коагулологічні	Протромбіновий час капілярної крові	Дослідження активності факторів зовнішнього шляху протромбіназотворення	[64]
	Протромбіновий час розведеної плазми		
	Протромбіновий час цільної плазми		
	Час рекальцифікації плазми	Дослідження активності факторів внутрішнього шляху протромбіназотворення	[13]
	Активований час рекальцифікації плазми		
	Парціальний тромбопластиновий час		
	Активований парціальний тромбопластиновий час		
	Індекс МА аутокоагулограми		
	Кількість фібриногену за Рутберг		
Активність антитромбіну III за Abildgaard	Визначення активності антикоагулянту		
Гематологічні	Гематокритне число	Скринінг-дослідження реології крові	
Біохімічні	Концентрація середньомолекулярних пептидів.	Визначення вмісту маркера ендотоксикозу	[79]
Статистичні	Порівняння вибірових середніх	Оцінка достовірності різниці між групами	[84; 98]
	Кореляційний аналіз	Встановлення взаємозалежності між процесами	
	Визначення коефіцієнта варіації	Показник відтворюваності лабораторних досліджень	
	Визначення показників асиметрії та ексцесу	Перевірка характеру розподілу	
	Визначення моди та медіани вибірки		

термостата при температурі 37,00°C;

- через 60 с інкубації в пробірку вносили 0,10 мл суспензії тромбопластину і 0,10 мл 0,50% розчину хлориду кальцію і визначали час утворення згустку;

- дослідження виконували у всіх підготовлених пробах, як кінцевий результат враховували середнє значення ПЧКК трьох проб

Визначення протромбінового часу розведеної (1/1) плазми.

- в аглютинаційну пробірку (10,00 см висотою з внутрішнім діаметром 0,70 см) вносили 0,10 мл плазми, багатої тромбоцитами, 0,10 мл 0,90% розчину хлориду натрію і 0,10 мл суспензії тромбопластину;

- суміш інкубували на водяному термостаті 60 с при температурі 37,00°C, вносили 0,10 мл 0,277% розчину хлориду кальцію, відзначали час утворення згустку;

- пробу повторювали тричі, як кінцевий результат враховували середнє значення ПЧРП трьох проб.

Визначення протромбінового часу цільної плазми.

- перед початком дослідження готували тромбопластин-кальцієву суміш (рівні об'єми суспензії тромбопластину і 0,025 М розчину хлориду кальцію змішували і прогрівали при температурі 37,00°C протягом усього терміну дослідження);

- для визначення ПЧЦП в аглютинаційну пробірку (10,00 см висотою з внутрішнім діаметром 0,70 см) вносили 0,10 мл плазми, багатої тромбоцитами;

- прогрівали на водяному термостаті 60 с при температурі 37,00°C, вносили 0,20 мл тромбопластин-кальцієвої суміші, відзначали час утворення згустку;

- пробу повторювали тричі, як кінцевий результат враховували середнє значення ПЧЦП трьох проб.

Визначення активності ФВШП.

Загальний принцип визначення активності ФВШП для використаних СКТ. Принцип методу полягає у тому, що при достатній кількості іонів

кальцію й наявності контактної активації, а також оптимальному вмісті в реагуючій суміші 3-го фосфоліпідного фактора тромбоцитів, *in vitro* моделюється ситуація, аналогічна до тої, яка в організмі людини призводить до протромбіназотворення по внутрішньому шляху з наступним тромбіно- і фібринотворенням.

Визначення часу рекальцифікації плазми (за Н. Bergergof, L. Roka).

– в аглютинаційну пробірку, встановлену в штатив водного термостата при температурі 37,00°C, вносили 0,20 мл 0,277 % розчину хлориду кальцію і 0,10 мл 0,90% розчину хлориду натрію;

– суміш прогрівали 60 с, після чого вносили 0,10 мл плазми, багатой тромбоцитами і відзначали час утворення згустку;

– пробу повторювали тричі, як кінцевий результат враховували середнє значення ЧРП трьох проб.

Визначення активованого часу рекальцифікації плазми.

– в аглютинаційну пробірку, встановлену в штатив водяного термостату при температурі 37,00°C, вносили 0,20 мл 0,277 % розчину хлориду кальцію і 0,10 мл суспензії каоліну в 0,90% розчині хлориду натрію (5,0 мг/мл);

– суміш прогрівали 60 с, вносили 0,10 мл плазми, багатой тромбоцитами, відзначали час утворення згустку;

– пробу повторювали тричі, як кінцевий результат враховували середнє значення АЧРП трьох проб.

Визначення активованого парціального тромбопластинового часу.

–у пробірку вносили 0,10 мл плазми, збідненої тромбоцитами і 0,10 мл каолін-кефалінової суміші;

– пробірку прогрівали протягом 180 с при температурі 37,00°C у штативі термостата, після чого (точно!) через 180 с вносили 0,10 мл 0,337% розчину хлориду кальцію і відзначали час утворення згустку;

– пробу повторювали тричі, як кінцевий результат враховували середнє значення АПТЧ трьох проб.

Визначення індексу максимальної активності аутокоагулограми.

– стабілізовану цитратом натрію кров одержували, як при

дослідженні ЧРП, АЧРП і АПТЧ, але відливали від неї 0,50 мл у пластикову пробірку для використання надалі;

- одержували багату тромбоцитами плазму і розливали її в 5 аглютинаційних пробірок по 0,20 мл;

- у центрифужну пробірку, розміщену в штативі водяного термостату, при температурі 37,00°C для утворення гемолізат-кальцієвої суміші вносили 2,00 мл 0,222% розчину хлориду кальцію і 0,10 мл стабілізованої цитратом натрію крові (відлитої на першому етапі) і відразу ж після цього включали секундомір;

- пробірки з цитратною плазмою розміщали в штативі водяного термостату і через кожні 2 хв від початку інкубації гемолізат-кальцієвої суміші відбирали від неї 0,20 мл, додавали до плазми, відзначали час утворення фібринового згустку;

- пробу виконували в кожній з 5 пробірок;

Визначення концентрації фібриногену за Р.А. Рутберг.

Принцип методу. При надлишку іонів кальцію та тромбіну фібриноген плазми переходить у фібрин, кількість якого пропорційна кількості фібриногену.

- у пробірці послідовно змішували 0,50 мл плазми, збідненої тромбоцитами, 0,05 мл суспензії тромбопластину і 0,05 мл 5,00% розчину хлориду кальцію;

- після струшування пробірку поміщали в штатив водяного термостата при температурі 37,00°C на 10 хв;

- через 15 хв згусток, що утворився, переносили на фільтрувальний папір і віджимали до втрати слідів вологи на фільтрі, після чого згусток поміщали на торсійні ваги і зважували;

- концентрацію фібриногену знаходили за формулою $KФ = 0,20 \cdot m$, де m – виміряна маса фібринового згустку, “0,20” – коефіцієнт перерахунку, що дозволяє визначити КФ плазми в г/л.

- пробу повторювали двічі, як кінцевий результат враховували середнє значення КФ.

Визначення гематокритного числа.

Принцип методу. При центрифугуванні стабілізована гепарином кров розділяється на рідку частину та форменні елементи.

- кров після проколу м'якоті пальця поміщали в гепаринізований гематокритний капіляр;
- готували 2 проби;
- капіляри запаковували з однієї сторони пластиліном і центрифугували 3 хв у гематокритній ультрацентрифузі;
- вимірювали гематокритне число;
- як кінцевий результат враховували середнє значення гематокритного числа обох капілярів.

Визначення активності АТ ІІІ.

Принцип методу (за Abildgaard). У основі принципу визначення активності АТІІІ полягає здатність досліджуваної плазми інактивувати тромбін, внесений у реакційну суміш у визначеній дозі. По залишковій активності тромбіну судять про активність АТ ІІІ.

- у пробірку вносили 0,40 мл робочого розчину тромбіну і прогрівали його на водяному термостаті при 37,00°C протягом 2 хв;
- додавали 0,10 мл досліджуваної адсорбованої і дефібринованої плазми, включали секундомір;
- точно через 2 хв 0,20 мл суміші переносили у пробірку з 0,30 мл розведеної контрольної пулованої плазми, попередньо підігрітої до 37,00°C, негайно включали секундомір, реєстрували час згортання і по каліброваній кривій знаходили активність АТ ІІІ у відсотках;
- пробу повторювали двічі та обраховували середнє значення.

Вміст середньомолекулярних пептидів у сироватці крові.

Принцип методу. Проводиться спектрофотометричне визначення оптичної густини сироватки крові після седиментації великомолекулярних протеїнів трихлороцтовою кислотою.

- до 1,00 мл свіжої сироватки додавали 0,50 мл 15,00% розчину трихлороцтової кислоти, перемішували, центрифугували при 3000 об/хв 30 хв;

- до 0,50 мл супернатанта додавали 4,50 мл дистильованої води, вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 254 нм та 280 нм в кюветі 1 см порівняно з контролем;
- контроль: 0,25 мл 15,00% розчину трихлороцтової кислоти та 4,75 мл дистильованої води.

2.4 Біологічні реагенти

У дослідженні були використані реагенти і реактиви фірм “Технологія-Стандарт” (Росія), “Красная капля” (Беларусь), ЛМК (Львів, Україна), Cor-
matu (Польща). Реактиви готувалися за рекомендаціями виготовлювача.

В дослідженні використовувалися свіжоприготовлені референтні реагенти: нормальна пулована плазма (НПП), виготовлена із суміші плазм 15 практично здорових осіб, БНПП – безтромбоцитна нормальна пул-
плазма (НПП позбавлена тромбоцитів) і зразки утримуючої і неутримуючої
тромбоцити плазми, отримані в осіб референтної групи.

Для визначення активності АТ III готувалася сорбована і дефібрино-
вана плазми:

- у пробірку, що містить 1,00 мл досліджуваної плазми, вносили 10,00 мг сорбенту гепарину „Гепасорб” („Технологія-Стандарт”, (Росія));
- постійно струшуючи пробірку, перемішували її вміст при кімнатній температурі протягом 8 хв, недопускаючи утворення піни й осаду на її дні;
- суміш центрифугували протягом 120 с при 1500 об/хв, супернатант переносили в чисту пробірку і дефібринували у водяному термостаті при 56,00°C протягом 6 хв, після чого знову центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв;
- знімали супернатант і досліджували протягом перших 2 год з моменту отримання.

РОЗДІЛ 3 ОСОБЛИВОСТІ ПРЕАНАЛІТИЧНОГО ТА ПІСЛЯАНАЛІТИЧНОГО ЕТАПІВ ПРОВЕДЕННЯ СКРИНІНГОВОЇ КОАГУЛОГРАМИ

3.1 Створення репрезентативної референтної групи

Визначення референтних інтервалів для таких скринінгових клотингових тестів, як ПЧ, АПТЧ і деяких інших методів має ряд особливостей. По-перше, виявляється не істинний вміст аналіту, а його функціональна спроможність стосовно субстрату. По-друге, активність реагентів, використовуваних для тестування відрізняється в різних виробників і може коливатися від серії до серії. Крім того, на показники коагуляційного гемостазу можуть впливати такі фактори, як інтенсивність фізичних навантажень, характер харчування, циркадні ритми і т. ін. [47, 51, 66, 137, 141]. Випадкову і систематичну помилки, викликані цими факторами, частково нейтралізують при стандартизації забору крові, шляхом добору осіб за віком, фізіологічним статусом, етнічними і соціокультурними особливостями популяції, використанням референтних матеріалів, методів математичного моделювання [98,100,123].

У поданому дослідженні первинний добір мікродонорів для встановлення референтних інтервалів АПТЧ і ПЧ проводився виходячи із визначення статусу “здоров’я”. Відповідно до Статуту ВООЗ, “здоров’я” – це “...стан повного фізичного, духовного і соціального благополуччя...”. З огляду на дані про вплив термінів одержання крові, стресу, підвищеного (або зниженого) фізичного навантаження, деяких інших факторів на реологічні властивості крові і функціональний стан компонентів системи гемостазу, для наступного добору мікродонорів використовувалися обмежуючі критерії (табл. 3.1.1). З використанням вказаних критеріїв було відібрано 58 чоловік, але надалі в трьох із них були виявлені антитіла до вірусу гепатиту “С”. 15 мікродонорів (27,27%) були тютюнокурцями. Остаточна кількість - 55 осіб.

У дослідженні визначалась щільності розподілу осіб, включених у

Таблиця 3.1.1

Фактори, що обмежували включення в референтну групу

Обмежувальний фактор	Причина обмеження	Характер обмеження
1. Наявність тромботичних, або геморагічних проявів в анамнезі	Зміни показників активності компонентів системи гемостазу	Виключення з групи
2. Харчування	Вплив харчування, незбалансованого за тваринними і рослинними компонентами, на реологію крові, біосинтез білків, вміст ліпідів та їх склад	Збалансоване харчування
3. Руховий режим	Зміна реологічних властивостей крові при порушеннях рухового режиму	Виключення осіб з ненормованим фізичним навантаженням
4. Стать	Дисбаланс активності компонентів гемостазу в жінок під час менструації	Забір проб у жінок тільки в середині менструального циклу
5. Шкідливі звички	Вплив на реологію крові і функціональну активність окремих елементів системи гемостазу	Обмеження тютюнопа-ління і вживання алкоголю за 10 днів до забору проб
6. Расова прина-лежність	Розходження по окремим класам імуноглобулінів, концентрації аполіпопротеїнів	Включення представників європеїдної раси
7. Вік	Приховані гемостазіопатії, вікова гіперкоагуляція	Виключення осіб до 25 і старше 45 років

референтну групу за індексом маси тіла (рис. 3.1.1 та 3.1.2).

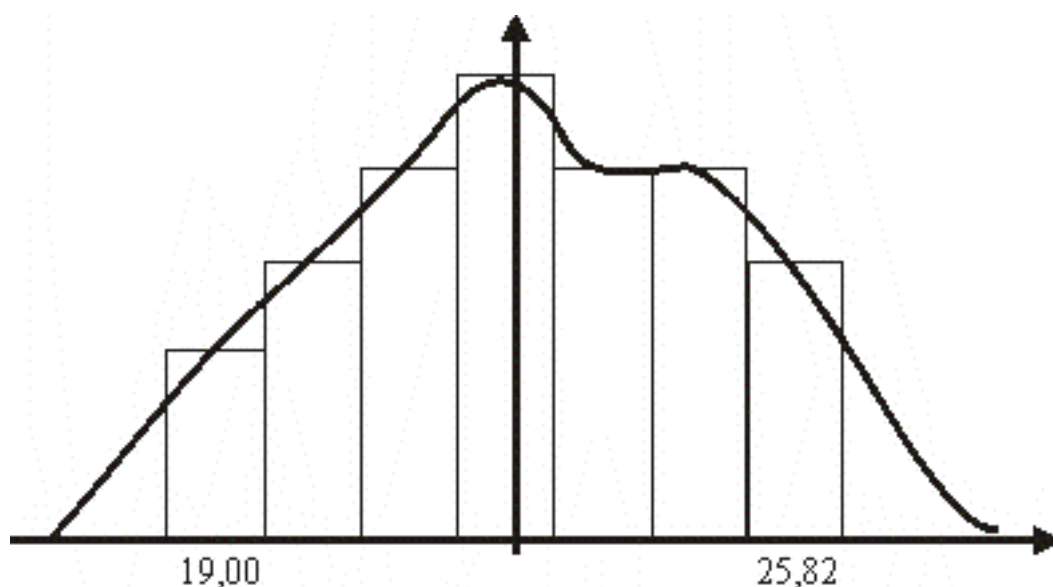


Рис 3.1.1 Щільність розподілу показника індексу маси тіла жінок у референтній групі (n=25)

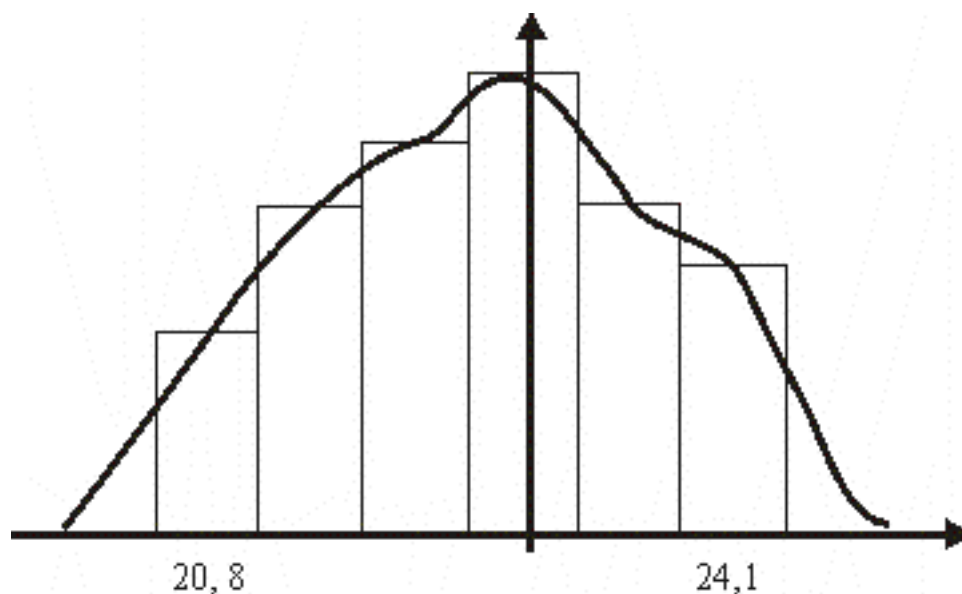


Рис 3.1.2 Щільність розподілу показника індексу маси тіла чоловіків у референтній групі (n=30)

Зменшення або збільшення маси тіла може відбиватися на показниках системи гомеостазу. Граничні значення ІМТ часто зустрічаються в осіб, що можуть бути включені в референтну групу за формальним визначенням статусу «здоров'я». З метою визначення оптимальних характеристик розподілу осіб референтної групи по ІМТ, а також для встановлення можливого характеру розподілу цього параметра в популяції здорових проводилися

дослідження показників асиметрії, ексцесу, моди, медіани та середнього РГ.

Показник As вибірки жінок по ІМТ склав $(-) 0,09$, а E дорівнював $0,88$. При цьому критерій помилки асиметрії $t_{As} < 3$ і критерій помилки ексцесу $t_E < 3$. Mo та Me становили, відповідно, $23,40$ та $23,00$ при середньоарифметичному значенні $22,83 \pm 0,43$. Аналогічні показники в чоловіків були наступними: $As = (-) 0,05$, $E = (-) 0,87$, а $t_{As} < 3$ і $t_E < 3$, $Mo = 20,80$, $Me = 22,39$, $M = 22,38$, $m = 0,17$. Не дивлячись на неспівпадання значень Mo , Me та M , результати дослідження As та E дозволяють припустити, що розподіл досліджуваного показника носить нормальний характер і в генеральній сукупності. При цьому лівостороння асиметрія може бути результатом впливу розповсюджених у немедичному середовищі уявлень про «здорову людину». І у жінок, і у чоловіків спостерігався плосковершинний розподіл досліджуваного показника.

Таким чином, якщо референтні індивідууми добираються за запропонованими правилами вірогідність потрапляння у референтну зону осіб з масою тіла, яка може вплинути на результат дослідження низька. Якщо показники ексцесу і асиметрії розподілу за ІМТ у групі не свідчать на користь нормального розподілу, то таку групу не можна вважати референтною.

Показники асиметрії та ексцесу розподілу за віком осіб референтної групи (рис. 3.1.3), склали, відповідно, $(-) 1,60$ та $(-) 0,87$ при

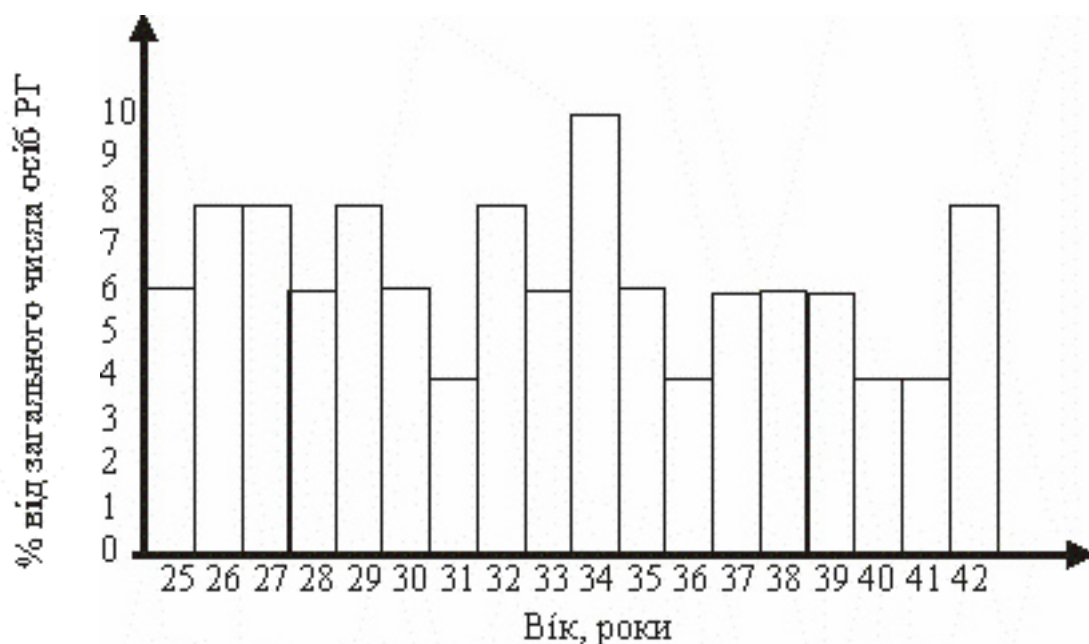


Рис 3.1.3 Щільність розподілу практично здорових людей

$t_{As} > 3$, а $t_E < 3$. При цьому $M = 32,75$ р., $m = 0,66$ р., $Mo = 34,00$ р., $Me = 33,00$ р.. Це вказує, що розподіл за віком осіб у межах референтної групи не підкоряється законові Гаусса-Лапласа. Тобто, при застосуванні обмежуючих критеріїв жорсткий віковий ценз не є обов'язковим.

При аналізі розподілу показників АПТЧ і ПЧ, ($n = 50$) (рис. 3.1.4 та 3.1.5), встановлено, що $As_{АПТЧ} = 0,03$ ($t_{As} < 3$), $E_{АПТВ} = (-) 0,50$ ($t_E < 3$), $M = 39,25$ с, $m = 0,37$ с, $Mo = 40,10$ с, $Me = 38,51$ с. Аналогічні показники для розподілу значень ПЧ склали $0,10$ і $0,50$ ($t_{As} < 3$ і $t_E < 3$), $16,80$ с, $0,16$ с, $17,30$ с, $17,10$ с.

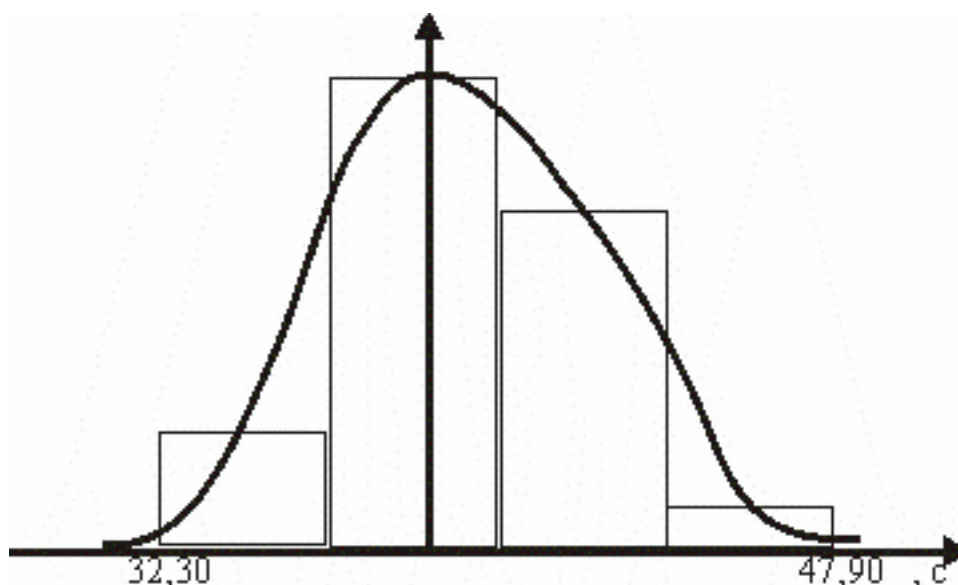


Рис. 3.1.4 Щільність розподілу показників активованого парціального тромбoplastинного часу у практично здорових людей

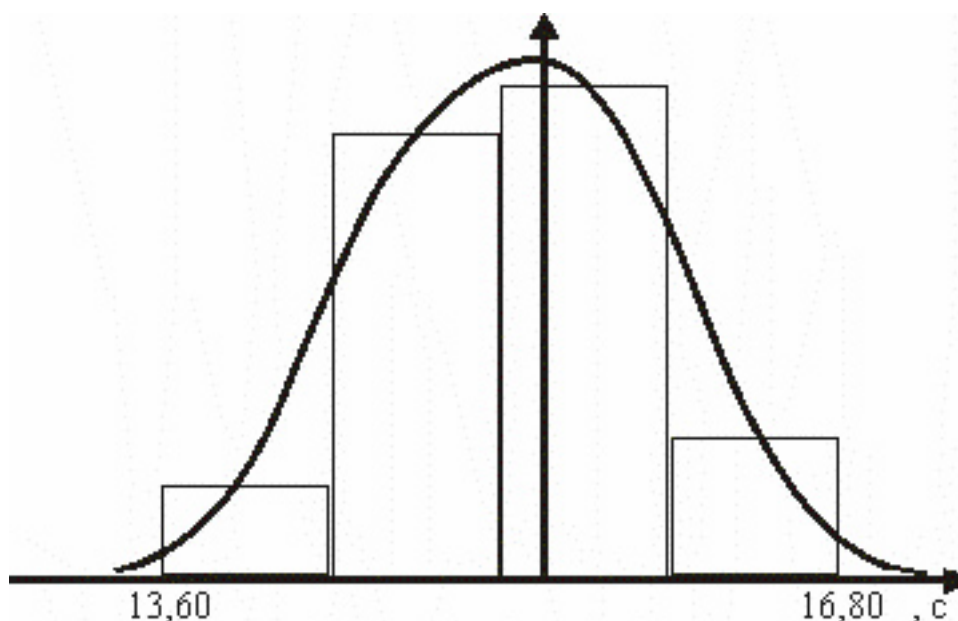


Рис. 3.1.5 Щільність розподілу показників протромбінового часу у практично здорових людей

Розподіл показників АПТЧ є плосковершинним, а ПЧ – крутовершинним. Критичними значеннями для A_s і E при числі спостережень 50 і 5% рівні значимості є точки 0,53 і 0,85 [84]. Емпірично отримані значення асиметрії й ексцесу не перевищують цих значень, що підтверджує висновок про характер розподілу досліджуваних показників у генеральній сукупності.

Реакції коагуляційної ланки системи гемостазу, являючись фермент-субстратними взаємодіями, носять логарифмічний характер. Для виявлення активності досліджуваних компонентів часто будують калібровані криві у системі координат, де зміни, як по осі абсцис, так і по осі ординат відбуваються логарифмічно. Але при цьому розподіл показників ферментної активності у індивідуумів, що ввійшли у вибірку здорових осіб, відповідає закону Гаусса.

Межі норми визначаються як $M \pm 2S$, де M – середнє значення вибірки, S – її середньоквадратичне відхилення, то критичний інтервал – як $M \pm 3S$. При цьому в інтервал $M \pm 2S$ входить 95,4% усіх варіант вибірки, а в межі критичного інтервалу $M \pm 3S$ – 99,7% варіант [155].

Міжграничні значення, так звані показники “сірої зони”, знаходяться в інтервалі від 2 до 3 середньоквадратичних відхилень від середнього значення вибірки. Ця особливість розподілу Гаусса є надзвичайно важливою при діагностиці легких і латентних форм. Потрапляння показника в цей інтервал дозволяє запідозрити наявність захворювання і контролювати зміни досліджуваного параметра у пацієнта при проведенні моніторингування.

За матеріалами цього розділу були опубліковані наступні роботи: Семеняка В.І., Суховий М.В., Томилин В.В. Особенности установления референтных интервалов функциональных методов исследования коагуляционного звена гемостаза // Міжвідомчий збірник “Гематологія і переливання крові” – Харків, 2004 – Вип. 32. – С.276-282; Суховий М.В., Семеняка В.І., Авер’янов Є.В., Томілін В.В., Мороз А.А. Підбір донорів для отримання плазми з низькою активністю фактору VIII зсідання крові // Сучасні проблеми гематології та трансфузіології: Матеріали семінару для молодих вчених пам’яті О. Федоровського. – Київ: Інститут гематології та трансфузіології АМН України, 1998. – С. 42.

3.2 Середньомолекулярні пептиди – критерій добору осіб у референтну групу

Одним із критеріїв активності кататоксичних адаптивних процесів в організмі є концентрація СМП. Стандартний підхід до лабораторної діагностики синдрому ендогенної інтоксикації заснований на визначенні токсемії - виходу в кров із локального вогнища ураження токсинів, що викликають генералізацію процесу і як наслідок – підвищення концентрації сечовини, білірубину, креатиніну й інших з'єднань. Тільки при локалізації первинного патологічного вогнища в печінці й нирках ці речовини характеризують початкову стадію ендогенної інтоксикації. В інших випадках збільшення їхнього вмісту свідчить про розвиток нирково-печінкової недостатності, що виникає на пізніх стадіях інтоксикації організму. Вплив цих продуктів білкового розпаду на процеси згортання на ранніх етапах розвитку синдрому ендогенної інтоксикації вивчений недостатньо.

Було проведено вивчення взаємозалежності між концентрацією СМП і активністю деяких компонентів коагуляційної ланки гемостазу у пацієнтів з ризиком розвитку тромботичних ускладнень (підгрупа Із) і у здорових осіб (табл. 3.2.1). Чим вищою була концентрація СМП, тим більше виявлялися відхилення від норми показників гемокоагуляції. У пацієнтів з низьким ризиком розвитку тромботичних ускладнень концентрація СМП протягом усього періоду дослідження була близькою до верхньої границі РІ.

Аналіз тенденцій до зменшення концентрації СМП в залежності від числа факторів ризику показав, що в осіб, у яких схильність до тромботичних ускладнень не виявлялася, цей показник ендотоксикозу повинний знаходитися в межах нормальних величин. Дійсно, у групі осіб, відібраних за первинним визначенням статусу “здоров’я” (n=58) концентрація СМП становила $(0,112 \pm 0,003)$ у.о. Але в трьох з мікродонорів було зафіксовано деяке підвищення досліджуваного показника. При більш докладному обстеженні у двох виявилися антитіла до вірусу гепатиту “С”, а в одного – антитіла до вірусу гепатиту “С” і сечосолевий діатез, що протікав

Таблиця 3.2.1

Динаміка варіювання показників активованого парціального тромбoplastинового часу, протромбінового часу цільної плазми, концентрації фібриногену і середньомолекулярних пептидів у пацієнтів групи ІІз, n = 29 (референтні інтервали АПТЧ – 34,6-43,9 с; ПЧЦП – 17,6-19,2 с; КФ – 2-4 г/л; СМП (при довжині хвилі 253 нм) – 0- 0,275 у.о.)

Період обстеження	Категорія Тест	^I ІІз (n=10)	^{II} ІІз (n=10)	^{III} ІІз (n=9)
I квартал	АПТЧ	28,30 ± 3,61 *°	25,10 ± 2,54	23,60 ± 2,31
	ПЧЦП	18,20 ± 0,21°	18,30 ± 0,24°	16,10 ± 0,31
	КФ	2,45 ± 0,27°	2,41 ± 0,23°	2,30 ± 0,17
	СМП	0,245 ± ± 0,011 *°	0,347 ± ± 0,003°	0,423 ± ± 0,003
II квартал	АПТЧ	29,40 ± 2,74 *°	24,70 ± 2,59	24,40 ± 1,82
	ПЧЦП	17,70 ± 0,38 *°	16,20 ± 0,28	15,70 ± 0,39
	КФ	2,55 ± 0,29 *	2,62 ± 0,21	2,36 ± 0,23
	СМП	0,271 ± ± 0,003 *°	0,311 ± ± 0,004°	0,398 ± ± 0,004
III квартал	АПТЧ	27,20 ± 2,37	25,30 ± 3,14	24,60 ± 2,22
	ПЧЦП	18,40 ± 0,37 *°	17,10 ± 0,47°	15,80 ± 0,42
	КФ	2,75 ± 0,12°	2,34 ± 0,33	2,19 ± 0,59
	СМП	0,278 ± ± 0,002 *°	0,357 ± ± 0,002°	0,428 ± ± 0,002
IV квартал	АПТЧ	26,10 ± 2,52 *°	23,10 ± 1,21	23,00 ± 0,94
	ПЧЦП	18,40 ± 0,11 *°	17,20 ± 0,57 *°	15,30 ± 0,18
	КФ	2,50 ± 0,14 *	2,29 ± 0,18°	2,52 ± ± 0,22
	СМП	0,277 ± ± 0,004 *°	0,328 ± ± 0,005 *°	0,426 ± ± 0,003

Примітки: * різниця достовірна стосовно категорії ^{II}ІІз; ° різниця достовірна стосовно категорії ^{III}ІІз.

практично без клінічної симптоматики. Такі проби вибраковувалися. В остаточному підсумку, середня концентрація СМП у сироватці осіб, включених у РГ, становила $(0,108 \pm 0,003)$ у.о.

Також проводилося дослідження кореляційної залежності між показниками коагуляційної ланки системи гемостазу і концентрацією СМП та ризиком розвитку тромботичних ускладнень (табл. 3.2.2).

Таблиця 3.3.2

**Модулі коефіцієнтів кореляції між деякими показниками
коагуляційної ланки системи гемостазу і концентрацією
середньомолекулярних пептидів у хворих підгрупи Із, (n=29)**

Показник \ Період обстеження	I квартал	II квартал	III квартал	IV квартал
АПТЧ	0,99	0,78	0,97	0,78
ПЧ	0,80	0,88	0,98	1,00
КФ	0,95	0,84	0,97	0,93

Виходячи з отриманих даних можна припустити, що активність реакцій протромбіназотворення збільшується з підвищенням кількості факторів ризику розвитку внутрішньосудинного згортання крові і концентрації СМП, а КФ - зменшується.

Безсимптомне протікання деяких захворювань створює масу проблем, зв'язаних з їх діагностикою. При розвитку кататоксичних адаптивних реакцій біологічно активні токсини призводять до активації тих, або інших механізмів тромботворення й тромболізу. Формується варіабельність клінічних варіантів плину тих самих гемостазіопатій. Крім того, розкид значень окремих тестів коагулограми від нижньої до верхньої межі нормальних значень протягом дня може бути присутнім і у практично здорових осіб. Визначення концентрації середньомолекулярних пептидів може стати ефективним скринінговим методом виявлення прихованих патологій в осіб, що формально відповідають статусові "здоров'я".

За матеріалами цього розділу були опубліковані наступні роботи:

Суховій М.В., Стариков А.В., Семеняка В.І., Авер'янов Є.В., Гаврилюк О.І., Баронська Л.В., Демидюк П.Ф. Залежність між рівнем ендогенної інтоксикації та активністю компонентів коагуляційного гемостазу в осіб із підвищеним ризиком тромботворення // Міжвідомчий збірник “Гематологія і переливання крові”. – Київ, 2002 – Вип. 31. – С.113-117; Семеняка В., Авер'янов Є., Томілін В., Бурнаєва С., Лозян І., Баронська Л. Залежність між рівнем ендогенної інтоксикації та активністю компонентів системи гемостазу // VI Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих учених: Матеріали конгресу. – Тернопіль: Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського, 2002. – С. 245.; Суховій М.В., Ющенко П.В., Семеняка В.І., Томілін В.В., Авер'янов Є.В., Бурнаєва С.В., Гаврилюк О.І. Клініко-лабораторні особливості синдрому ендогенної інтоксикації у пацієнтів з тромбофлебитами поверхневих вен нижніх кінцівок // Актуальні проблеми тромбозу і порушень гемостазу в клінічній медицині: Матеріали науково-практичної конференції – Київ: 2003. – С. 95.

3.3 Превентивний аналіз якості різних методів скринінгового дослідження системи коагуляційного гемостазу

Серед усіх порушень системи гемостазу особливе місце займають захворювання, що виникають як наслідок порушень активності ФВШП .

Визначення активності ФВШП – одна з важливих частин коагулологічного дослідження. Велика кількість СКТ визначення активності протромбіназоутворення за внутрішнім шляхом зовсім не означає, що включення їх усіх у коагулограму поліпшить діагностику й моніторинг гемостазіопатій. Для оптимізації коагулологічних досліджень необхідно використовувати стандартний комплекс діагностично цінних тестів [171]. Діагностично цінними є методи, що відповідають вимогам якості і дозволяють чітко розділити два діаметрально протилежні стани пацієнта – “здоров'я” і “хвороба”. Об'єктивну інформацію, отриману за результатами лабораторних тестів, порівнюють з референтними

інтервалами. Тому на першому етапі дослідження проводилося визначення відмінностей між референтними інтервалами тестів ЧРП, АЧРП, АПТЧ і параметра МА АКТ, відомих з літературних джерел [13,14,64] та існуючих у реальних умовах лабораторії при використанні реагентів виробників, які працюють на ринку України (табл. 3.3.1).

Таблиця 3.3.1

Границі нормальних значень основних скринінгових клотингових тестів, с (n=55)

Тест \ Границя	ЧРП	АЧРП	АПТЧ	МА АКТ
Нижня	68,43	59,75	34,64	14,10
Верхня	107,65	67,90	43,92	18,63

Порівняльний аналіз існуючих референтних інтервалів лабораторних тестів проводився багатьма дослідниками. Особливо інтенсифікувалися ці вишукування в останні десятиліття, коли вимоги до якості аналізу значно зросли. Отримані дані показали крайню варіабельність, аж до повної розбіжності, референтних інтервалів. Упровадження нових апаратів і розширення спектра застосовуваних реагентів ставить за обов'язок лабораторії постачати клініцистів реальними референтними границями, що відповідають популяції, що обслуговується лікувальною установою. Деякі варіанти рішення проблеми базуються на принципах відходу від використання стандартної формули і уведенні нових методів оцінки показників.

Щодо отриманих у ході дослідження даних, то, як відомо з літературних даних, границями нормальних значень для методу ЧРП традиційно вважається 60-120 с. Розроблювачі цього методу (Bergergof H. D., Rosa L., 1954) при дослідженні плазми 40 практично здорових осіб установили референтний інтервал у межах від 84 до 122 с. Нормальні значення для інших тестів, які були отримані в клініці хірургічної гематології і гемостазіології ІГТ АМН України, також відрізнялися від тих, що приведені в спеціальній літературі. Так, для АЧРП нормальними вважаються значення 60-70 с,

для АПТЧ (за даними розроблювачів тест-набору АПТЧ-тест фірми „Технологія- Стандарт”, (Росія) - 35-45 с, а для параметра МА аутокоагуляційного тесту (по даними розроблювачів методу Berkarda B., Derman U., Ako-kan G. (1964)) - 8,4-16,4 с (показники АКТ подані в секундах і відображають час утворення згустку в реакційній суміші). Виявлені розбіжності можуть бути викликані деякими відмінностями в методичних підходах до контролю якості на різних етапах аналізу. Крім того, з позицій епідеміології нормальними значеннями вважаються такі, що отримані на достатньому популяційному матеріалі. Дані, отримані на невеликих вибірках, мають відносну вірогідність. Але, якщо відомо, що розподіл досліджуваних величин носить у популяції нормальний характер, можна використовувати і вибірку з відносно невеликої кількості спостережень, але не меншої від 40 [47,155].

Отримані дані свідчать про необхідність проведення превентивного контролю якості кожного методу для кожної лабораторії й обов'язкового тестування всіх серій реактивів з використанням референтних матеріалів. Зменшення розсіювання показників АЧРП порівняно з ЧРП може свідчити про те, що результати дослідження ЧРП залежать від контактної активації. Ще більшою мірою зменшує розсіювання введення в реакційну суміш аналога ФФТЗ у тесті АПТЧ. Рівень розсіювання і визначає значення верхньої і нижньої границь референтного інтервалу. На перший погляд, при досить великому розкиді нормальних значень біля середнього (особливо ЧРП), відхилення на кілька секунд не може мати клінічного значення. Але реакції системи коагуляційного гемостазу, переважно, є взаємодіями ензимів зі специфічними для них субстратами і носять логарифмічний характер. Так, наростання активності ФВШП із 25,00% до 100,00% (рис. 3.3.1) відповідає скороченню часу фібринотворення в пробірці з модельною сумішшю на 29 с, а підвищення зі 100,00 % до 200,00 % - відповідає скороченню часу усього на 5 с (значення часу згортання для активності ФВШП 200,00 % устанавлювалися графічно). Це говорить про те, що при дослідженні активності ФВШП, особливо при гіперкоагуляції, коли гемостаз гіперактивований,

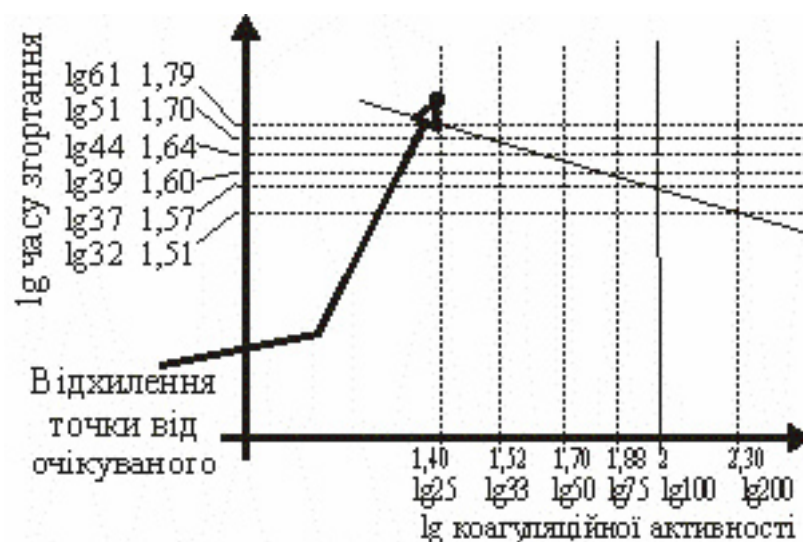


Рис. 3.3.1 Калібрувальна крива для визначення активності АПТЧ

зміни часу згортання навіть на кілька секунд, можуть мати визначальне значення. Для каліброваних кривих, що будуються для скринінгового визначення активності факторів згортання крові, характерна висока залежність отриманих показників від умісту фібриногену. Так, з рис 3.3.1 видно, що при розведенні НПП 1/4 спостерігається деяке відхилення отриманих точок від очікуваних значень.

Дослідження активності ФВШП різних категорій хворих за допомогою основних скринінгових клотингових тестів (табл. 3.3.2),

Таблиця 3.3.2

Коагуляційна активність факторів внутрішнього шляху протромбіназотворення в осіб референтної групи і хворих підгруп І₁ і ІІ за даними різних методів, с, $M \pm m$

Тест \ Група	ЧРП	АЧРП	АПТЧ	МА АКТ
РГ (n=55)	88,01±1,32	63,81±0,28	39,25±0,31	16,34±0,15
Підгрупа І ₁ (n=28)	122,18±5,13	97,05±0,34	56,72±0,82	111,98±2,30
Підгрупа ІІ ₁ (n=30)	64,64±1,89	57,26±0,52	33,58±0,18	12,71±0,36

Примітка. Різниця між показниками в групах була достовірною ($p < 0,001$)

показало, що індекс МА АКТ досить чутливий до зниження активності ФВШП але модою вибірки в підгрупі І₁ є число 120 – максимальний час, що може реєструватися при проведенні аутокоагулограми. Цей факт свідчить про те, що при виконанні тесту при певному рівні активності ФВШП у модельної гемолізат-кальцієвої суміші + плазма фібринотворний потенціал недостатній для формування повноцінного згустку навіть у тих випадках, коли проявів спонтанної кровоточивості не спостерігається (наприклад, у хворих з гемофілією середнього ступеня важкості).

З огляду на те, що середні значення в підгрупах І₁ і І₂ вірогідно відрізнялися від нормальних, кожен із зазначених у таблиці 3.3.2 тестів міг би використовуватися для визначення активності ФВШП. Але при дослідженні частоти потрапляння в нормальні межі завідомо патологічних значень було встановлено, що найчастіше реєструються як нормальні показники ЧРП у хворих підгрупи І₁ (табл. 3.3.3).

Таблиця 3.3.3

**Частота нормальних показників при визначенні активності ФВШП
різними методами серед хворих підгруп І₁ і І₂, %**

Тест / Підгрупа	ЧРП	АЧРП	АПТЧ	МА АКТ
Підгрупа І ₁ (n=28)	33,33	3,33	0,00	0,00
Підгрупа І ₂ (n=30)	20,00	10,00	6,67	16,67

Для інших тестів саме результати дослідження в підгрупі І₁ рідше всього потрапляли в зону референтних значень. Можливо, це зв'язано з відсутністю для тесту ЧРП стандартизації за контактною активацією і вмістом ФФТЗ. На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що методи визначення активності ФВШП не завжди дублюють один-одного. Тому апріорне включення в коагулограму тестів, що ніби можуть замінити більш дорогі або трудомісткі способи дослідження (але діагностично

більш цінні), невиправдане. Створення системи тестів для коагуляційного скринінгу повинне супроводжуватися превентивним контролем методів і контролем якості всіх серій реагентів.

Для скринінг-дослідження зовнішнього шляху протромбіназотворення використовують метод визначення протромбінового часу.

Зміни в тесті визначення ПЧ відображають варіації активності вітамін-К-залежних факторів згортання крові, фактора V і вмісту фібриногену і використовуються для скринінгового вивчення коагуляційного гемостазу при терапії антикоагулянтами прямої і непрямой дії, дефіциті факторів протромбінового комплексу, захворюваннях печінки, дефіциті вітаміну К, діагностиці гіперкоагуляційних станів [75,109,133].

Після застосування непрямих антикоагулянтів найбільш швидко знижується активність проконвертину (19% за годину). Активність факторів Крістмаса і Стюарта-Прауера зменшується на 2% за годину, а протромбіну – на 1% за годину [133].

Сьогодні в клінічних установах України використовується кілька методів визначення протромбінового часу. Вони відрізняються за типом використовуваного матеріалу (венозна або капілярна кров), способом одержання матеріалу (венепункція або прокол м'якоті пальця), підготовкою до дослідження (центрифугування зразків крові, розведення плазми) і деякими іншими параметрами.

Крім того, існує не менше трьох основних способів оцінки ПЧ. Так, для подачі показника у відсотках активності досліджуваних компонентів використовують калібровану криву, побудовану на основі ряду розведень контрольної плазми. Інший метод – подача у виді протромбінового індексу (ПІ). При цьому використовують наступну формулу:

$$ПІ = ПЧ_{\text{контрольної плазми}} \cdot 100\% / ПЧ_{\text{досліджуваної плазми}}.$$

Ці два способи оцінки залежать від активності і чутливості тромбопластинів, що використовуються.

Третій спосіб інтерпретації досліджень протромбінового часу з метою стандартизації було запропоновано для використання в 1983 році ВООЗ.

У його основі лежить наявність лінійної залежності між логарифмами значень протромбінового часу, визначеного за допомогою різних тромбопластинів. Результат дослідження ПЧ, відповідно до рекомендації ВООЗ, повинний виражатися в одиницях міжнародного нормалізованого відношення.

$$\text{МНВ} = (\text{ПЧ}_{\text{досліджуваної плазми}} / \text{ПЧ}_{\text{контрольної плазми}})^{\text{МІЧ}},$$

де МІЧ – міжнародний індекс чутливості [14].

Усі зазначені способи оцінки базуються на визначенні часу утворення згустку. Зміни цієї фізичної величини при проведенні досліджень визначають аналітичну якість досліджень протромбінового часу.

При дослідженні ПЧ причиною помилок можуть бути неякісно підготовані реактиви і реагенти, погане калібрування приладів, порушення умов обробки проби, а при мануальному виконанні тесту - швидкість реєстрації лаборантом фібринового згустку.

Для запобігання помилок при проведенні дослідження особлива увага приділялася дотриманню при заборі крові співвідношення стабілізатор/кров, термінам збереження зразків біоматеріалу до початку дослідження, режиму центрифугування і термостатування проб, максимальному зменшенню ступеня контактної активації матеріалу до початку дослідження.

Визначити відтворюваність (ступінь збігу результатів повторних вимірів тієї самої проби) для методу ПЧКК практично неможливо. Це зв'язано з тим, що методика виключає одержання достатньої кількості біоматеріалу або створення пула для проведення ряду досліджень. Визначення правильності дослідження (тобто близькості до “0” систематичної помилки) неможливо, тому що для цього метода відсутні референтні матеріали. Тому для тесту визначення ПЧКК проводилося установлення кореляційної відповідності [178] результатів показникам ПЧРП і ПЧЦП у здорових осіб (таб. 3.3.4).

Коефіцієнт кореляції між значеннями протромбінового часу розведеної плазми і протромбінового часу цільної плазми становить 0,72. Т.ч.

Таблиця 3.3.4

**Коефіцієнти кореляції між показниками протромбінового часу
капілярної крові і протромбінового часу розведеної плазми, і
протромбінового часу цільної плазми, n = 55**

Протромбіновий час розведеної плазми	-0,30
Протромбіновий час цільної плазми	-0,17

результати дослідження протромбінового часу венозної крові значною мірою відповідають один одному.

Відсутність достовірної кореляції ПЧКК стосовно двох інших методів дослідження ПЧ може бути результатом впливу клітин крові на процес згортання, а також труднощами стандартизації глибини проколу м'якоті пальця, і відповідно, кількості тканинного тромбопластину, що при цьому виділяється. Не виключено, що ТФ додатково активує проконвертин *in vivo* ще до змішування зі стабілізатором і призводить до значного скорочення часу фібринотворення *in vitro* (нижня границя референтного інтервалу для ПЧКК становила 8,3 с, а для ПЧРП – 17,5 с, ПЧЦП – 15,0 с).

При визначенні відтворюваності ПЧРП та ПЧЦП враховували стандартне відхилення (S), коефіцієнт варіації (CV), попереджувальний інтервал (2S) і критичний інтервал (3S) (табл. 3.3.5). Проводилося 50 досліджень РПП.

Показники відтворюваності методів визначення ПЧРП та ПЧЦП відповідали рекомендованим Міжнародною федерацією клінічної хімії [152]. Відповідно до цих рекомендацій і ПЧРП, і ПЧЦП можна використовувати в клінічній практиці при достатній якості тромбопластину. Необхідно відзначити, що при виконанні тестів бажаним є використання електронних секундомірів (якщо вони пройшли метрологічну експертизу) у зв'язку з поганим калібруванням механічних секундомірів, традиційно встановлюваних на термостатах ТПС. При мануальному визначенні ПЧ відхилення в декілька десятків секунди мають істотне значення для встановлення аналітичних характеристик методу.

Таблиця 3.3.5

Показники відтворюваності методів визначення протромбінового часу розведеної і цільної нормальної пул-плазми (n=50)

Показник \ Метод	Протромбіновий час розведеної плазми	Протромбіновий час цільної плазми
Стандартне відхилення, с	0,75	0,45
Коефіцієнт варіації, %	3,90	2,90
Попереджувальний інтервал, с	1,50	0,90
Критичний інтервал, с	2,25	1,35

Розведення досліджуваної плазми в тесті ПЧРП знижує активність факторів протромбінового комплексу. У результаті відбувається зсув результатів дослідження від атестованих для цієї серії тромбопластину при використанні РПП. Для тесту визначення ПЧЦП такий зсув значно менший (рис. 3.3.2 та 3.3.3).



Рис 3.3.2 Правильність і відтворюваність значень для методу визначення протромбінового часу розведеної плазми

Різниця між середніми значеннями для тестів ПЧРП і ПЧЦП становила 3,61 с і була високодостовірною ($p < 0,001$).

Таким чином, погрішність, викликана розведенням, суттєво впливає на результат дослідження. Необхідно відзначити, що відтворюваність

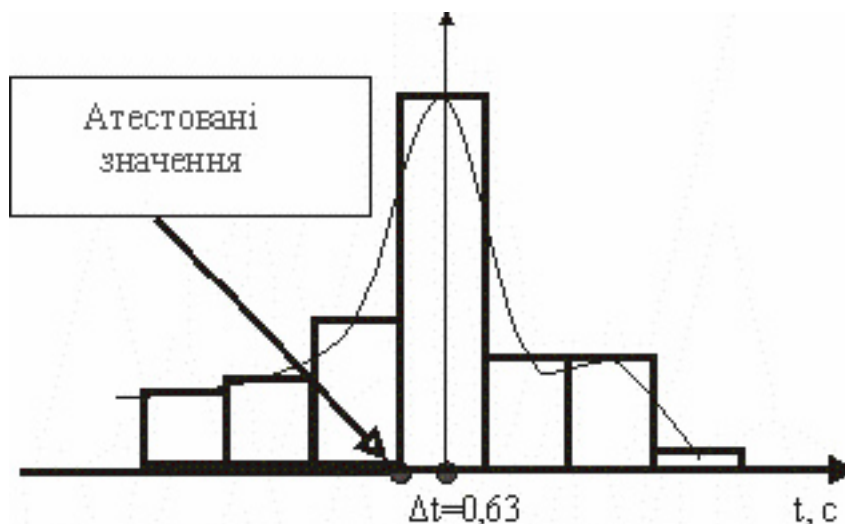


Рис 3.3.3 Правильність і відтворюваність значень для методу визначення протромбінового часу цільної плазми

є більш важливою характеристикою, ніж правильність дослідження, особливо для скринінгових тестів. Наявність систематичної погрішності лише ускладнює інтерпретацію результату дослідження, у той час як випадкова погрішність може абсолютно спотворити дані аналізу.

Для встановлення чутливості методів визначення ПЧРП та ПЧЦП до змін концентрації й активності коагуляційних білків проводили вивчення показників протромбінового часу при розведенні РПП та НПП (табл. 3.3.6).

Таблиця 3.3.6

**Показники протромбінового часу при розведенні контрольних плазм,
с, $M \pm m$**

Метод	ПЧРП		ПЧЦП	
Розведення	РПП	НПП	РПП	НПП
Цільна, або визначено методикою	18,41±0,05	18,92±0,10	15,00±0,03	15,22±0,07
1/1	29,44±0,21	31,32±0,32	18,37±0,04	19,03±0,81
1/4	51,42±1,38	58,37±1,72	29,46±0,32	32,32±0,94
1/8	понад 180		53,10±1,21	60,14±1,48

Додаткове розведення плазми при визначенні ПЧРП знижує реальну активність коагуляційних білків і концентрацію фібриногену в реакційній суміші (вихідна концентрація фібриногену для РПП – 3,00 г/л, для НПП – 2,70 г/л). Це приводить до скривлення каліброваної кривої для ПЧРП уже при розведенні 1/4. Для методу визначення ПЧЦП такий зсув спостерігався лише при розведенні 1/8. У пацієнтів, перебіг захворювання яких може супроводжуватися гіпофібриногенемією, використання тесту визначення ПЧРП недоцільне і може приводити до помилок трактування результатів.

Отже, з огляду на те, що дослідження ПЧ - один з найпоширеніших і інформативних скринінгових тестів для визначення активності коагуляційного гемостазу, оцінка якості трьох основних модифікацій методу його визначення є досить актуальною. Введення в практику клінічних лабораторій України єдиної методики дослідження ПЧ значно полегшить роботу клініцистів при діагностиці і проведенні моніторингу терапії порушень коагуляційної ланки гемостазу.

За матеріалами цього розділу були опубліковані наступні роботи: Семеняка В.И., Суховий М.В. Исследование основных показателей качества различных методов определения протромбинового времени // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2003. – №2. – С.35-39.; Суховий М.В., Семеняка В.І. Діагностична ефективність різних методів скринінгового дослідження активності факторів внутрішнього шляху протромбіназотворення при гемостазіопатіях // Літопис травматології та ортопедії. – 2003. – № 3-4. – С.61-65.

3.4 Усунення факторів преаналітичного етапу, що знижують репрезентативність дослідження

Для подолання проблем, що виникають на преаналітичному етапі, необхідно вирішити питання, зв'язані з різними факторами. До них відносять, насамперед, статус обстежуваного пацієнта (діагностичні, лікувальні процедури, включаючи прийняті пацієнтом лікарські засоби,

час доби, дієтичний режим, ступінь фізичної активності, тютюнопаління), умови отримання біопроби (натще або після прийому їжі, положення тіла і тривалість накладення джгута на плече при взятті проби венозної крові, точне дотримання часу забору) , умови первинної обробки й збереження проби до її передачі в лабораторію (антикоагулянти, центрифугування, температура і под.). Для запобігання впливу порушень виконання аналізу на преаналітичному етапі тестування на досліджувані коагулологічні показники були розроблені спеціальні рекомендації з добору осіб для одержання референтного матеріалу та забору матеріалу в пацієнтів.

Особливості одержання крові для проведення досліджень коагуляційної ланки системи гемостазу при проведенні діагностики порушень згортання крові у хворих і у практично здорових осіб.

1. Обстежуваній особі рекомендували протягом трьох днів перед дослідженням утримуватися від вживання алкоголю і тютюнопаління.

2. За 3 дні до здачі крові необхідно виключити з раціону жирну їжу та не вживати велику кількість рідини.

3. Якщо протягом двох тижнів перед дослідженням застосовувалися препарати, що мають антигемостатичний або активуючий гемостаз ефект, (наприклад, нестероїдні протизапальні, гормональні (у тому числі пероральні протизаплідні засоби), препарати, що впливають на реологію крові, ферментативні лікарські засоби й под.), то результати таких досліджень вважаються такими, достовірність яких сумнівна, і призначається повторне обстеження.

4. Протягом доби перед здачею аналізу необхідно по можливості дотримувати режиму з нормованими фізичними навантаженнями. У день здачі крові для дослідження системи гемостазу повинні бути виключені ситуації, що провокують психоемоційний стрес і підвищені фізичні навантаження.

6. При проведенні моніторингу за лікуванням пацієнтові рекомендувалося дотримуватися всіх вищевикладених пунктів, крім 3-го (якщо препарати відповідали призначенню лікаря).

7. При підготовці пацієнта до дослідження враховуються расові,

релігійні й етичні особливості способу життя пацієнта.

8. Кров для досліджень системи гемостазу забирається ранком, у період з 900 до 1000. Якщо з об'єктивних причин виникає необхідність одержати проби крові в інший час, то обов'язково рекомендується повторне дослідження в зазначений часовий проміжок.

9. Кров набирається натще шляхом стерильної пункції вени ліктьового вигину самопливом у пластикову пробірку, що вже містить необхідну кількість 3,8% розчину цитрату натрію або у гепаринізовані капіляри при визначенні гематокриту. Допускається використання тільки силіконованих або пластикових пробірок що не змочуються.

10. Кров набирається в умовах регламентованого стазу: манжетку тонометра накладають на передпліччя, нагнітають тиск до 80 мм рт. ст. і утримують до закінчення забору крові, але не більше 3 хв.

11. При змішуванні крові з цитратом натрію не допускається утворення пухирців повітря.

12. Дослідження повинне починатися не пізніше, ніж через 30 хвилин після одержання крові. Якщо період часу більший, ніж 30 хвилин, такі проби аналізуються з рекомендацією повторного дослідження. У тих випадках, коли матеріал зберігається до початку дослідження більше 2 годин, він вибраковується.

Для вивчення впливу порушення цих правил (табл. 3.4.1) кров

Таблиця 3.4.1

**Вплив преаналітичного етапу на якість результатів скринінгових
клотингових тестів контрольній групі, n=14**

Тест	Протромбіновий час цільної плазми		Активованій парціальний протромбіновий час	
	Забір крові відповідно до рекомендацій	Традиційний забір крові	Забір крові відповідно до рекомендацій	Традиційний забір крові
Одержання Показник				
S, з	1,00	1,21	2,00	3,80
CV, %	5,80	7,40	4,80	9,60

набиралася в 14 здорових осіб у лабораторії клініки хірургічної гематології і гемостазіології ІГТ АМН України з дотриманням запропонованих рекомендацій і в хірургічному відділенні в тих умовах, що дотримуються звичайно при заборі проб для коагулологічних досліджень. Дослідження проводилися з допомогою тестів визначення АПТЧ і ПЧЦП, як найбільш чутливих до різних факторів преаналітичного етапу серед скринінгових клотингових тестів.

Було встановлено, що для тесту ПЧЦП стандартне відхилення і коефіцієнт варіації при рекомендованому заборі були в 1,3 рази менш, ніж при традиційному способі одержання крові, а для АПТЧ - майже в 2 рази. Таким чином, дотримання розроблених правил дозволяє значно зменшити випадкову помилку дослідження.

За матеріалами цього розділу була опублікована наступна робота: Суховій М.В., Ющенко П.В., Томілін В.В., Семеняка В.І. Термін проведення лабораторних тестів за наявності легких та латентних форм коагулопатій і тромбоцитопатій // Актуальні проблеми тромбозу і порушень гемостазу в клінічній медицині: Матеріали науково-практичної конференції – К., 2003. – С. 97.

3.5 Створення референтного оцінного індексу скринінгового дослідження коагуляційної ланки системи гемостазу і оцінка його репрезентативності

Для подолання проблем, пов'язаних із використанням тромбопластинів з різною активністю розроблено кілька оціночних індексів (протромбіновий індекс, міжнародне нормалізоване відношення й т. ін.). Тим часом, у статистиці часто використовуються нормалізовані значення, що визначають ступінь відхилення варіанти вибірки від середнього значення вибірки. Визначення проводять за формулою $N=(x_i-\mu)/\sigma$, де x_i – значення варіанти, μ – середнє вибірки, σ – стандартне відхилення вибірки. Нами запропоновано при проведенні лабораторних досліджень

визначати ступінь відхилення показника стосовно референтного інтервалу за формулою $ROI = (x_i - M)/nS$, де x_i – показник хворого, M – середнє арифметичне вибірки нормальних значень, n – коефіцієнт, який використовується при обчисленні границь норми для даного тесту. Для АПТЧ і ПЧ для зручності оцінки напрямку реакції значення ROI множаться на (мінус)1. Границями норми для ROI є значення від (мінус) 1 до 1.

Установлено, що ROI ПЧ (табл. 3.5.1) практично не змінювався

Таблиця 3.5.1

Способи оцінки протромбінового часу при застосуванні тромбопластинів різних виробників у осіб референтної групи і у підгрупах І2 і І3, $M \pm m$

Група	Референтна група n=50		Підгрупа І2 (до лікування) n=11		Підгрупа І3 (під час лікування) n=29	
Оцінка Реагент	ПЧ, с	ROI	ПЧ, с	ROI	ПЧ, с	ROI
T1	16,81±0,22	0,00±0,08	30,87±0,74	-5,83±0,27	22,72±0,39	-2,44±0,22
T2	14,10±0,29	0,01±0,09	18,22±0,41	-5,69±0,18	15,92±0,21	-2,44±0,11
T3	18,72±0,3	0,00±0,08	49,04±0,9	-5,82±0,41	32,41±0,62	-2,28±0,26

Примітка. Різниця активності Т достовірна між усіма типами реагенту.

при використанні різних Т у хворих І2 і І3 підгруп і осіб РГ, тобто був незалежний від властивостей реагенту. При цьому ROI адекватно відображав зміни активності дефіцитних факторів при різних порушеннях гемостазу. Деякі коливання ROI зв'язані, швидше за все, зі ступенем відтворюваності, характерної для використаного в роботі обладнання.

Аналогічно дослідженням змін ПЧ і ROI ПЧ проводилося дослідження АПТЧ і ROI АПТЧ із використанням часткових тромбопластинів різних виробників (таб. 3.5.2). Як і ROI ПЧ, ROI АПТЧ практично не змінювався при різних показниках активності і дисперсії, властивій тому або іншому частковому тромбопластинові.

Таблиця 3.5.2

Способи оцінки активованого парціального протромбінового часу при застосуванні часткових тромбoplastинів різних виробників у осіб референтної групи і у підгрупах І₁ і ІІ₂, $M \pm m$

Група	РГ n=50		Підгрупа І ₁ (до лікування) n=28		Підгрупа ІІ ₁ (після лікування) n=30	
Оцінка Реагент	АПТЧ,с	POI	АПТЧ,с	POI	АПТЧ,с	POI
ЧТ1	39,32±0,42	0,00±0,08	56,52±0,59	-3,20±0,05	33,68±0,11	1,11±0,02
ЧТ2	30,09±0,31	0,00±0,09	43,91±0,47	-3,18±0,02	25,52±0,12	1,11±0,02

Примітка. Різниця активності ЧТ достовірна між усіма типами реагенту

Для вивчення здатності POI до відображення змін активності факторів згортання при застосуванні реагентів різних виготовлювачів при моніторингу терапії антикоагулянтами непрямої дії досліджувалися зміни POI ПЧ у пацієнтів підгрупи ІІ₃ (таб. 3.5.3).

Таблиця 3.5.3

Динаміка змін протромбінового часу та референтного оціночного індексу протромбінового часу в пацієнтів підгрупи ІІ₃ при терапії непрямыми антикоагулянтами, $M \pm m$

Період дослідження Метод оцінки	До лікування (n=29)	У процесі лікування (6 тижнів) (n=27)	У процесі лікування (12 тижнів) (n=29)
ПЧ, с	14,32±0,1	23,11±0,5	22,72±0,4
POI ПЧ	1,00±0,04	-2,60±0,11	-2,41±0,12

Динаміка змін досліджуваних показників у цілому відповідала даним літератури, присвяченої питанням антикоагулянтної терапії [13, 117].

Здатність абсолютних показників до відображення змінам активності факторів протромбінового комплексу була нижчою, ніж у РОІ ПЧ. Так, показник ПЧ, що відзначався через 6 тижнів після початку лікування, був більшим від початкового рівня на 61,54%, а РОІ в аналогічний період спостереження зменшувався на 160%. Через 12 тижнів після початку терапії різниця з попереднім періодом спостереження становила для ПЧ 1,73%, а для РОІ ПЧ 7,69%.

Аналізуючи динаміку змін абсолютних показників АПТЧ і РОІ цього тесту (таб. 3.5.4) необхідно відзначити, що вона відбиває інтенсивність прокоагулянтної (підгрупа І₁) і антикоагулянтної (підгрупа ІІ₁) терапії [92].

Таблиця 3.5.4

Динаміка змін активованого парціального тромбoplastинового часу та референтного оціночного індексу цього тесту у пацієнтів підгруп І₁ та ІІ₁ при застосуванні препаратів, що впливають на гемостаз, $M \pm m$

Період лікування	До лікування		В період лікування		Після лікування	
Оцінка Підгрупа	АПТЧ, с	РОІ АПТЧ	АПТЧ, с	РОІ АПТЧ	АПТЧ, с	РОІ АПТЧ
І ₁	56,51±0,59 n=28	-3,22±0,09 n=28	50,52±0,74 n=28	-2,12±0,08 n=28	49,8±0,4 n=27	-1,95±0,1 n=27
ІІ ₁	33,64±0,21 n=30	1,08±0,03 n=30	38,91±0,51 n=30	0,09±0,01 n=30	39,64±0,53 n=28	-0,04±0,01 n=28

Під час лікування показник АПТЧ, вимірюваний в абсолютних значеннях, у підгрупі І₁ змінився на 10,62%, а в наступному – ще на 1,39%. РОІ АПТЧ при цьому змінювався більш виразно: збільшившись на 34,38% і 7,14% відповідно. У пацієнтів, що одержувала препарати антикоагулянтної дії (підгрупа ІІ₁), час згортання в тесті АПТЧ збільшувався на 15,78% у період лікування і, додатково, на 1,8% у перші терміни після його закінчення.

Значення POI зменшувалися стосовно початкових, відповідно, на 92,98% і в наступному – ще на 12,38%.

Такі зміни POI порівняно зі змінами абсолютних значень дозволяють поліпшити якість моніторингу за терапією ППКД та ПАКД.

Факторами, здатними впливати на результати POI є: неправильний підбір мікродонорів для встановлення границь референтних інтервалів; помилки при заборі крові; недостатня кількість практично здорових осіб, що ввійшли в референтну групу. Порухення вимог зі встановлення границь референтних інтервалів ведуть не тільки до неправильного розрахунку пропонованого індексу, але й до інших помилок інтерпретації результатів дослідження, тому що зі збільшенням середньоквадратичного відхилення досліджуваних показників зростає випадкова помилка.

Таким чином, уведення POI як одного з обов'язкових параметрів для оцінки результатів скринінгових клотингових тестів буде сприяти стандартизації досліджень системи гемостазу та методів їхньої інтерпретації.

При проведенні моніторингу за лікуванням хворих на гемостазіопатії було встановлено, що між показниками АПТЧ і ПЧ цих груп існує певна кореляційна залежність (табл. 3.5.5).

Таблиця 3.5.5

**Кореляційна залежність показників активованого парціального
тромбопластинового часу і протромбінового часу в
досліджуваних групах**

РГ (n=55)	Підгрупа					
	I ₁ (n=28)	I ₂ (n=12)	I ₃ (n=11)	II ₁ (n=30)	II ₂ (n=10)	II ₃ (n=29)
-0,3	-0,11*	0,92	-0,22*	0,27*	0,61	0,49

Примітка. * кореляція недостовірна.

Коефіцієнт кореляції був позитивним у тих пацієнтів, у яких ураження системи гемостазу пов'язано з порушенням активності на етапах

коагуляції, що ініціюються після включення фактора Стюарта-Прауера (підгрупа І2 і всі підгрупи ІІ групи). Недостовірною кореляція між показниками АПТЧ і ПЧ була у пацієнтів з ізольованим порушенням активності внутрішнього або зовнішнього механізмів гемокоагуляції. Досить незначно, але вірогідно, корелювали досліджувані показники у ПЗЛ.

Можна припустити, що в нормально функціонуючому організмі існують компенсаторні механізми, що приводять до різноспрямованих коливань у межах нормальних значень активності ФВШП і ФЗШП. З метою визначення цих змін та для моніторингу лікування препаратами прокоагулянтної й антикоагулянтної дії за допомогою РОІ нами була розроблена спеціальна моніторингова карта (рис 3.5.1). За допомогою цієї карти були оцінені характерні зміни РОІ тестів визначення АПТЧ, ПЧ, КФ і Нt у пацієнтів з різними порушеннями системи гемостазу в процесі лікування препаратами прокоагулянтної й антикоагулянтної дії.

Інститут гематології та трансфузіології АМН України									
ПІБ									
Діагноз									
Показники	Призначення лікаря								

Рис. 3.5.1 Зразок моніторингової карти для оцінки результатів лікування з допомогою РОІ

Важливою умовою розробки стандартизованих схем моніторингу

захворювання є суворе дотримання правил преаналітичного аналітичного і постаналітичного етапів аналізу. Останній включає, крім іншого, подачу лабораторних даних лікареві. При цьому в лабораторії здійснюється обробка абсолютних значень вимірів, занесення їх у бланк аналізу. Але, як показує практика, для вивчення системи гемостазу необхідні спостереження за змінами активності або концентрації аналіту в динаміці. Саме для таких спостережень призначена розроблена моніторингова карта.

Далі подано зміни тестів визначення АПТЧ, ПЧ, КФ і Нt при застосуванні розроблених принципів ведення преаналітичного та постаналітичного етапів у процесі терапії препаратами прокоагулянтної й антикоагулянтної дії. Результат дослідження показаний на моніторингових картах із зазначенням ROI.

У пацієнтів підгрупи Іп (рис. 3.5.2) різко подовжується час згортання в тесті АПТЧ. [1, 15, 126, 140, 173].

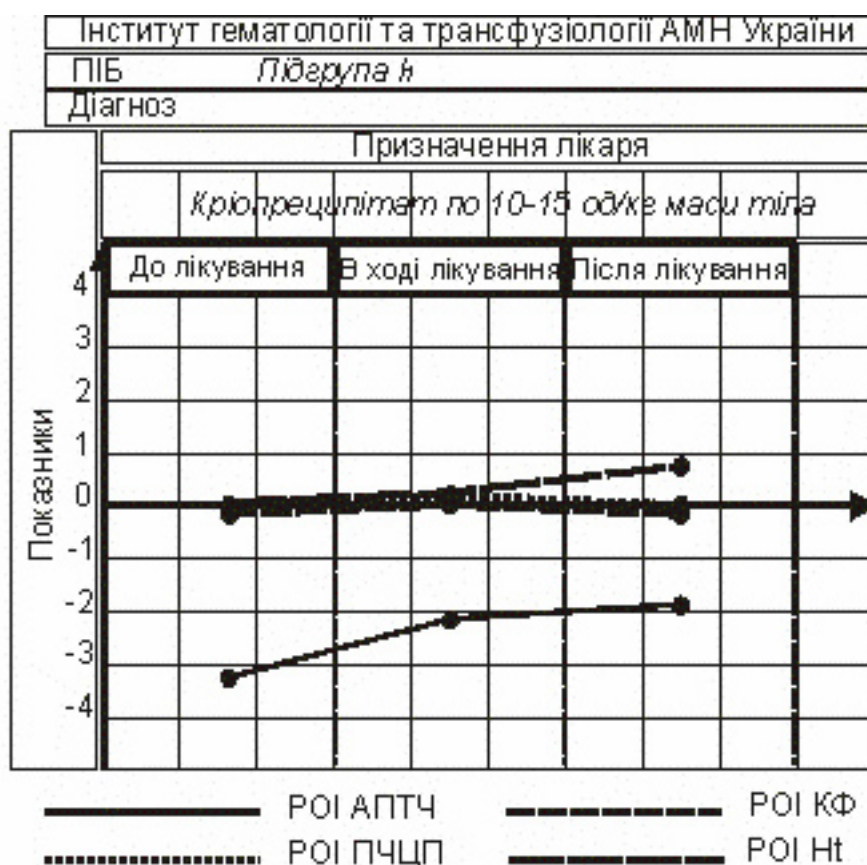


Рис. 3.5.2 Моніторинг лікування хворих з порушенням внутрішнього шляху протромбіноутворення

У пацієнтів із хворобою Віллебранда значення АПТЧ, як правило, коливаються на верхній межі референтного інтервалу (РОІ АПТ біля (-)1). Але у пацієнтів з III типом хвороби Віллебранда виявлялося значне зниження цього показника, простежувалася клінічна картина, подібна до важкої форми гемофілії “А”. РОІ АПТЧ у цих пацієнтів також був знижений.

Не дивлячись на наявність певної компенсаторної реакції ФЗШП на зниження активності ФВШП, навіть при значному подовженні АПТЧ, РОІ ПЧЦП не перевищував верхнього критичного інтервалу. Тобто, якщо внаслідок спадкових чи інших причин активність одного з компонентів системи гемостазу значно зменшена, повна компенсація не настає. Причиною цього може бути вплив відповідних інгібіторів надлишкової коагуляційної активності.

СКТ визначення АПТЧ і ПЧ дуже чутливі стосовно зменшення КФ. У хворих підгрупи І₂ (рис 3.5.3).

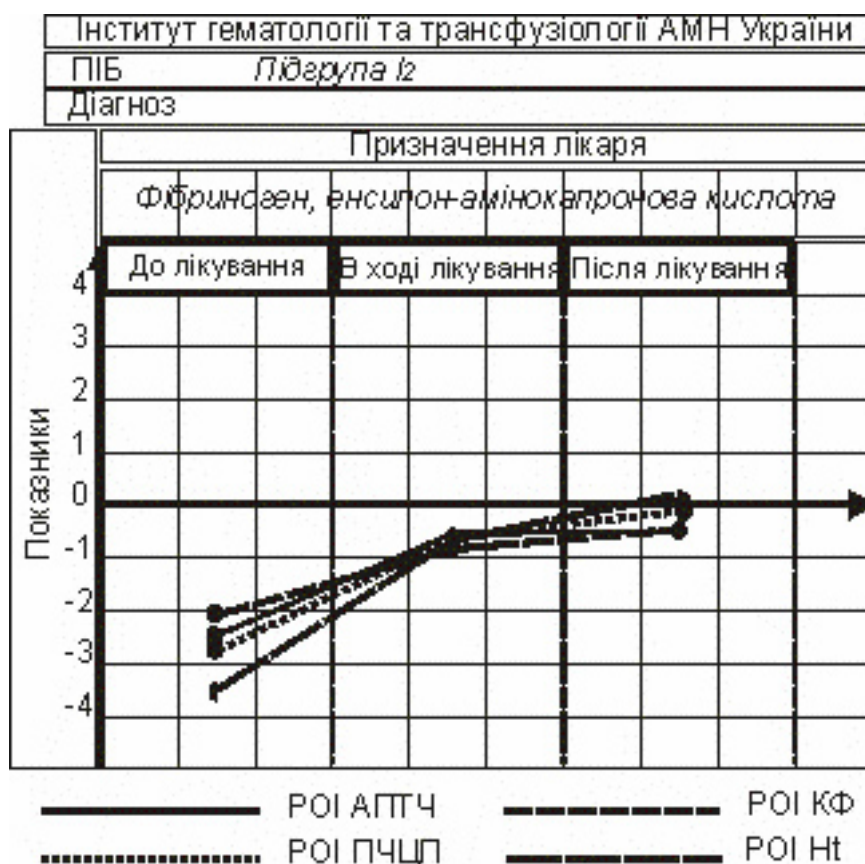


Рис. 3.5.3 Моніторинг лікування хворих з гіпофібриногенемією

У цих пацієнтів до початку лікування спостерігалось зниження гематокритного числа, що могло бути зумовлено зменшенням кількості еритроцитів внаслідок кровотечі. При правильно встановленому діагнозі стандартна терапія, що включає введення фібриногену, швидко приводила до зупинки кровотеч.

Характеристика змін коагулограми у хворих з гіпопроконвертинемією (підгрупа Із) при лікуванні свіжозамороженою плазмою показана на рис. 3.5.4.

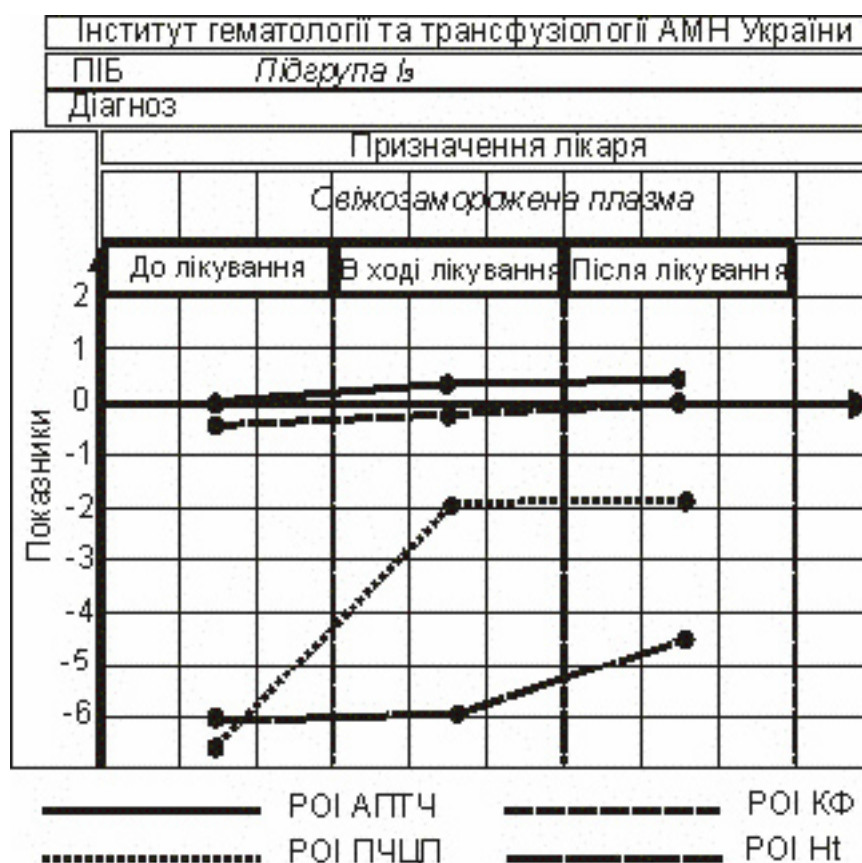


Рис. 3.5.4 Моніторинг лікування хворих з гіпопроконвертинемією

Важкі форми гіпопроконвертинемії характеризуються клінічною картиною, яка подібна гемофілії. Однак істотною відмінністю є часті кровотечі зі слизових, порожнинні крововиливи. При аналізі коагулограми в першу чергу звертали на себе увагу показники ПЧ і ROI ПЧ, що свідчили про значне зменшення активності ФЗШП. Часті і масивні кровотечі можуть приводити до значного зменшення гематокритного числа. Важливим моментом верифікації і моніторингу за лікуванням гіпопроконвертинемії була диференціація з функціональними

порушеннями печінки або зі станами, що супроводжуються присутністю в крові антагоністів вітаміну К, а також порушеннями його метаболізму.

При тромбофлебитах глибоких вен (підгрупа II₁) коливання РОІ аналізованих тестів набували значення від (-)1 до (+)2 (рис. 3.5.5).

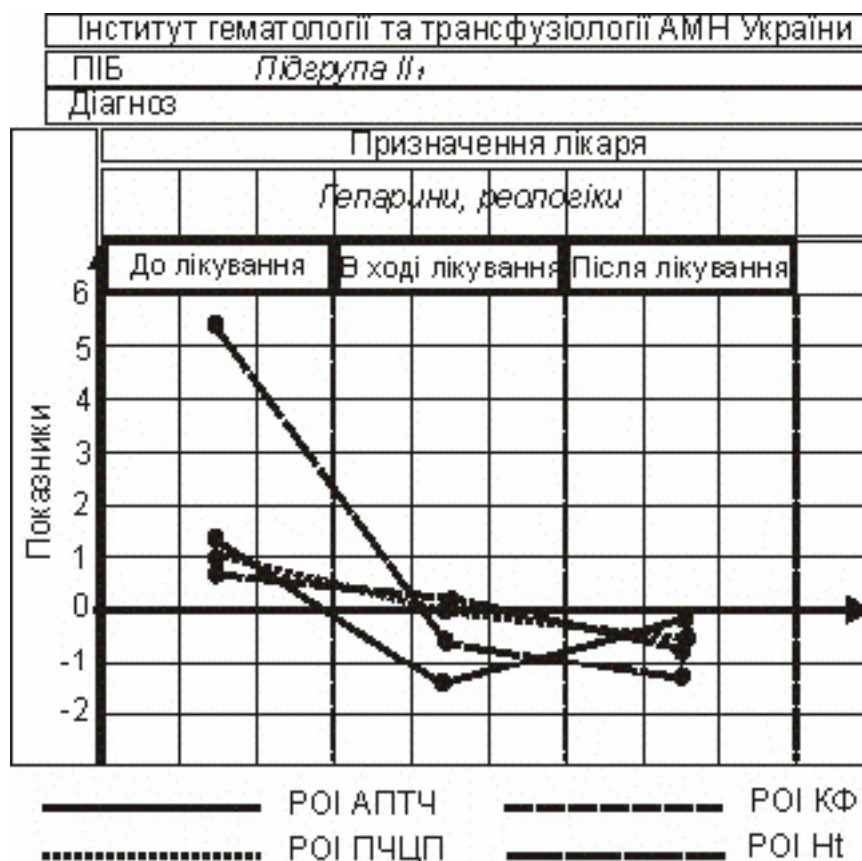


Рис. 3.5.5 Моніторинг лікування хворих з тромбофлебитами вен нижніх кінцівок

У більшості випадків (82% від усіх обстежених хворих підгрупи II₂) спостерігалось збільшення РОІ всіх СКТ.

Одним з напрямків терапії пацієнтів з тромбофлебитами вен нижніх кінцівок є зменшення активності прокоагулянтних компонентів системи гемостазу та збільшення інтенсивності антикоагулянтних реакцій згортання крові. Поставлена мета відповідно до сучасних уявлень про лікування тромбофілії і її ускладнень досягалася застосуванням препаратів антикоагулянтної дії, а також за допомогою керованої гемодилуції. Основним лікарським засобом був гепарин, що і зумовило зменшення активності показників АПТЧ та ПЧ [5,76,106,143,145,159,205].

Терапію проводили таким чином, щоб показники АПТЧ коливалися в межах верхнього критичного інтервалу (вважається, що АПТЧ найкраще відображає динаміку згортання крові при лікуванні гепарином). РОІ АПТЧ у пацієнтів підгрупи ІІ становив (мінус) $1,25 \pm 0,012$ у процесі лікування, а перед випискою, після скасування ПАКД, збільшувався до (мінус) $0,50 \pm 0,003$.

Якщо зменшення РОІ АПТЧ і РОІ ПЧ певною мірою можуть бути наслідком антикоагулянтної дії гепаринів, то зниження РОІ КФ і РОІ Нt, очевидно, є наслідком застосування рефортану або реополіглюкіна.

Для встановлення відповідності між змінами показників скринінг-коагулограми та збільшенням активності АТ ІІІ проводилося дослідження його активності та РОІ. Стосовно загального коагуляційного потенціалу збільшення активності антитромбіну ІІІ говорить про зменшення коагуляційного потенціалу, а зменшення - про більшу схильність пацієнта до тромботворення. Тому РОІ АТ ІІІ обчислювався, як і РОІ АПТЧ та РОІ ПЧЦП. У таблиці 3.6.2 представлені коефіцієнти кореляції між показниками РОІ АТ ІІІ і РОІ скринінгових тестів, що входять у коагулограму. Коефіцієнти кореляції були високими та достовірними. Отже, збільшення активності антитромбіну ІІІ у процесі лікування супроводжується зниженням активності прокоагулянтних реакцій, що чітко реєструється РОІ.

Таблиця 3.5.6

Коефіцієнти кореляції РОІ АТ ІІІ і РОІ тестів скринінгової коагулограми в динаміці антитромботичного лікування в пацієнтів підгрупи ІІІ (n=30)

АПТЧ	ПЧЦП	КФ	Нt
0,98	0,91	0,92	0,98

У пацієнтів із тромбофлебитами, що знаходилися під нашим спостереженням, клінічні прояви тромбофілії обмежувалися розвитком тромбів поверхневих або глибоких вен нижніх кінцівок. При цьому не

наставало клінічно значущого виснаження прокоагулянтних і антикоагулянтних ресурсів організму хворого.

У хворих підгрупи П2 розвивалася коагулопатія “споживання”, що супроводжувалася клінічною симптоматикою органної або поліорганної недостатності, що у комплексі з характерними лабораторними ознаками свідчило про розвиток синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання. На малюнку 3.5.6 представлені зміни POI тестів скринінгової коагулограми в пацієнтів підгрупи П2.

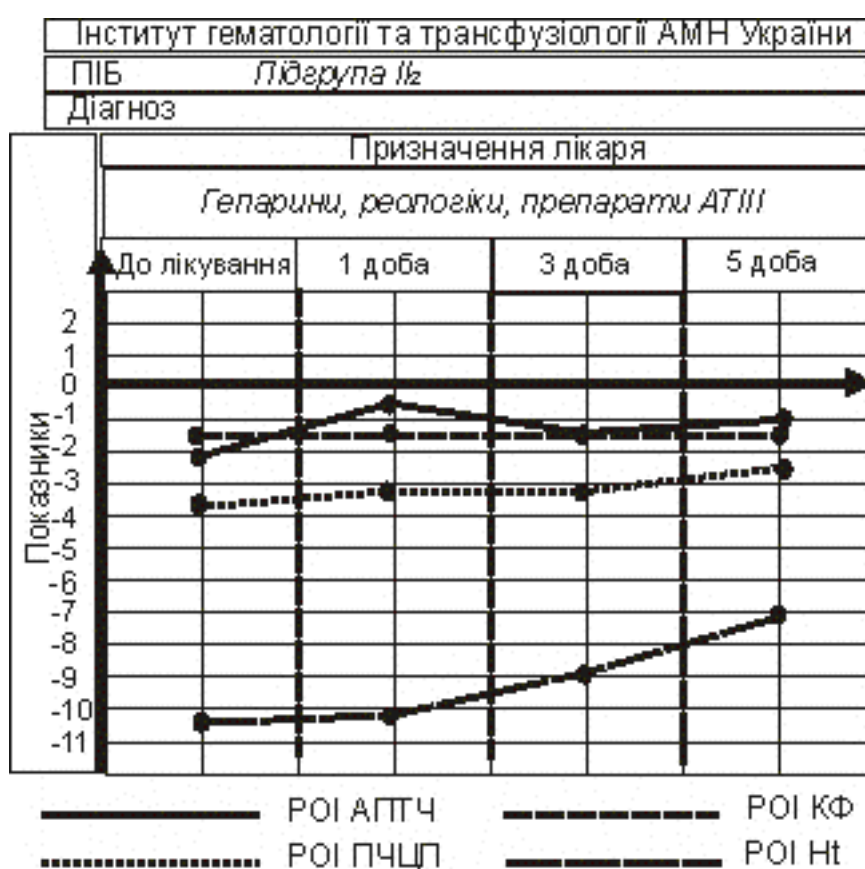


Рис. 3.5.6 Моніторинг лікування хворих з тромбеморрагічним синдромом

Дослідження системи згортання крові проводилися в цих пацієнтів два-три рази на день протягом усього періоду їхнього перебування у відділенні інтенсивної терапії. Однак основними (контрольними) вважалися ті, що виконувалися відповідно до розроблених нами правил одержання матеріалу для аналізу. Практично у всіх пацієнтів на момент першого дослідження вже сформувалася значна гіпокоагуляція. Відповідно до уявлень про

патогенетичну роль прокоагулянтних і антикоагулянтних ланок системи гемостазу в патогенезі ДВЗ хворим призначалися прямі антикоагулянти в комплексі із свіжозамороженою плазмою. Але основним напрямком лікування таких пацієнтів було усунення першопричини, що викликала тромбогеморагії.

Найбільшою мірою стосовно норми змінювалися показники ROI Ht. Саме цей показник піддавався корекції найшвидше в процесі проведеного лікування.

У хворих підгрупи ІІз тромбофілія встановлювалася в результаті аналізу клініко-анамнестичних і лабораторних даних. На рис. 3.5.7 представлено динаміку змін ROI тестів скринінгової коагулограми у хворих з високим РРТУ.

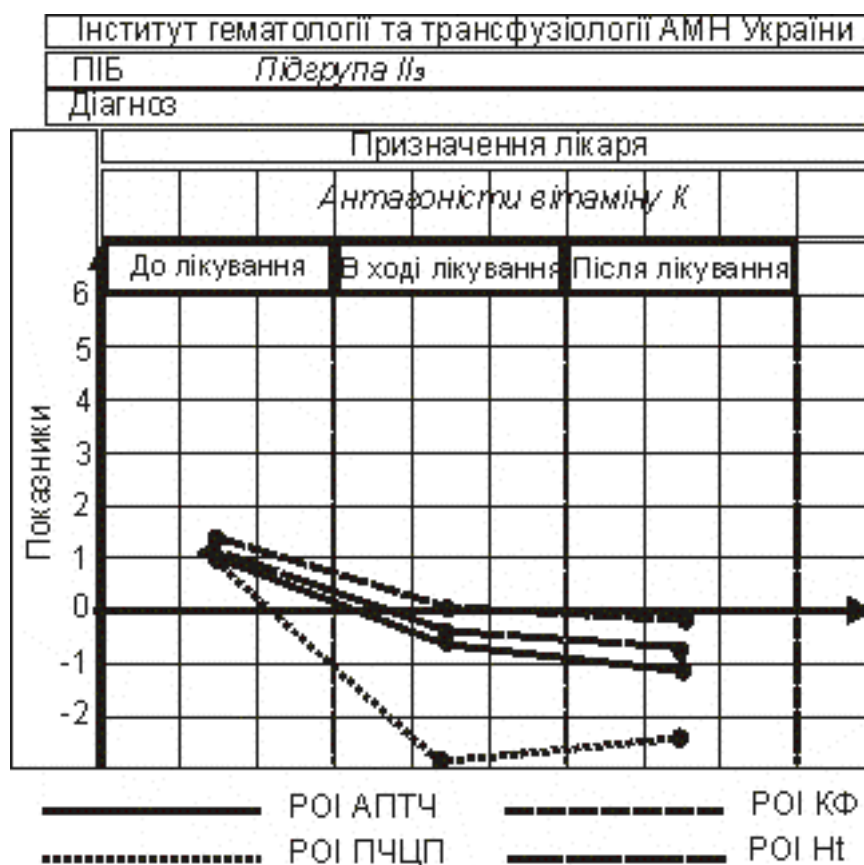


Рис. 3.5.7 Моніторинг лікування хворих з гіперкоагуляційним синдромом

При застосуванні антикоагулянтів непрямої дії найбільш істотно знижувалися показники ROI ПЧ. При моніторингу лікування цими

препаратами оцінний індекс підтримували в межах від (-)2 до (-)3. Зниження величини POI інших тестів зумовлено різними причинами. Для ФВШП це також може бути наслідком застосування антагоністів вітаміну К, а для POI КФ, очевидно, лікуванням тромбонебезпечного захворювання.

Таким чином, скринінгове лабораторне дослідження з використанням POI дозволяє підтвердити або спростувати припущення лікаря про характер і інтенсивність порушень системи згортання крові. Необхідно підкреслити, що скринінгова коагулограма не дозволяє однозначно встановити діагноз, але дає можливість правильно зорієнтувати подальший лабораторний пошук при гемостазіопатіях, тому що відбиває активність усіх ланок гемокоагуляції.

За матеріалами, які подані у цьому розділі була опублікована робота: Семеняка В.І. Новий розрахунковий індекс для оцінки показників протромбінового часу та активованого парціального тромбопластинового часу // Лабораторна діагностика. – 2004. – №3. – С.50-55.; 6. Стариков А.В., Суховий М.В., Семеняка В.И. Мониторинг лечения геморагических осложнений в практике отделений интенсивной терапии // Збірник наукових праць співробітників КМАПО ім. П.Л. Шупика. – Київ, 2004. – Вип. 13. – Кн.6. – С.202-208.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Підхід «апріорі» стосовно скринінгового дослідження згортання крові все частіше виявляє свою неспроможність в умовах зростаючих вимог до якості лабораторних досліджень. Нерідко навчальні посібники і методичні рекомендації включають перелік методів дослідження і їхніх модифікацій, не зупиняючись докладно на критеріях вибору того або іншого тесту. Між тим, якщо стосовно аналітичного етапу дослідження існують розроблені процедури і технології дослідження, то проведення преаналітичного і післяаналітичного етапу залежить від багатьох факторів, що іноді неможливо виділити окремо. Недостатній контроль на цих етапах - одна з основних причин аналітичної погрішності.

До преаналітичного етапу дослідження відносять превентивний контроль якості використовуваних методів, установлення границь нормальних значень, тестування реактивів і реагентів на відповідність референтним зразкам, тестування використовуваного устаткування, а також ряд процедур, що знаходяться, як правило, поза віданням персоналу лабораторії. Це підготовка хворих до забору крові, умови одержання матеріалу, терміни й умови зберігання до початку дослідження і т. ін.

Постаналітичний етап є складним далеко не для всіх лабораторних методів дослідження. Але при аналізі змін гемокоагуляції використовуються реактиви та реагенти з активністю, що змінюється залежно від виробника, мають різні параметрами якості. Тому в гемостазіології поширене використання індексованих показників, що дозволяють підвищити якість інтерпретації досліджуваних змін.

Для системи гемостазу, що має високу варіабельність щодо впливу чинників внутрішнього і зовнішнього середовища, характерні зміни границь нормальних значень навіть протягом одного дня. Крім того, референтні границі залежать від характеру харчування, що переважає в тому або іншому регіоні, географічного розташування цього регіону, інших

факторів. Тому одним із завдань, поставлених у цьому дослідженні, було оцінити основні характеристики референтної групи, підбіраної з жителів м. Києва, за такими основними критеріями, маса тіла, вік, характер розподілу основних показників системи гемостазу і, в цілому, встановити відповідність осіб референтної групи визначенню “здорова людина”.

Для встановлення характеристик вибірки окрім таких статистичних показників, як середньоарифметичне, мода та медіана використовувалися показники ексцесу й асиметрії. Показник As вибірки жінок по ІМТ склав (-) 0,09, а E дорівнював 0,88. При цьому критерій помилки асиметрії $t_{As} < 3$ і критерій помилки ексцесу $t_E < 3$. Mo та Me склали, відповідно, 23,40 та 23,00 при середньоарифметичному значенні $22,83 \pm 0,43$. Аналогічні показники в чоловіків були наступними: $As = (-) 0,05$, $E = (-) 0,87$, а $t_{As} < 3$ і $t_E < 3$, $Mo = 20,80$, $Me = 22,39$, $M = 22,38$, $m = 0,17$. Незважаючи на неспівпадання значень Mo , Me та M , результати дослідження As та E дозволяють припустити, що розподіл досліджуваного показника носить нормальний характер в генеральній сукупності. І у жінок, і у чоловіків спостерігався плосковершинний розподіл досліджуваного показника.

Показники асиметрії та ексцесу розподілу за віком осіб референтної групи, склали, відповідно, (-) 1,60 та (-) 0,87. При цьому $t_{As} > 3$, а $t_E < 3$. При цьому $M = 32,75$ р., $m = 0,66$ р., $Mo = 34,00$ р., $Me = 33,00$ р.. Це вказує, що розподіл за віком осіб у межах референтної групи не підкоряється закону Гаусса-Лапласа. Тобто, при застосуванні обмежуючих критеріїв жорсткий віковий ценз не є обов'язковим.

При аналізі розподілу показників АПТЧ і ПЧ, ($n=50$), встановлено, що $As_{АПТЧ} = 0,03$ ($t_{As} < 3$), $E_{АПТВ} = (-) 0,50$ ($t_E < 3$), $M = 39,25$ с, $m = 0,37$ с, $Mo = 40,10$ с, $Me = 38,51$ с. Аналогічні показники для розподілу значень ПЧ склали 0,10 і 0,50 ($t_{As} < 3$ і $t_E < 3$), 16,80 с, 0,16 с, 17,30 с, 17,10 с. Критичними значеннями для As і E при кількості спостережень 50 і 5% рівні значимості є точки 0,53 і 0,85, а отже емпірично отримані значення асиметрії й ексцесу не перевершують цих значень, що підтверджує зроблений висновок про характер розподілу досліджуваних показників у

генеральній сукупності.

Таким чином, при підборі осіб у референтну групу можна рекомендувати використання встановлених характеристик розподілу.

Крім того, у результаті проведених досліджень був установлений загальний критерій оцінки придатності зразків крові осіб, що формально відповідають статусові “здоровий”. Ним виявився такий параметр, як концентрація середньомолекулярних пептидів, що є одним з показників активності кататоксичних адаптивних реакцій. та універсальним маркером ендотоксикозу. До СМП відносять пептидні компоненти з молекулярною масою 500-5000 Д. СМП у плазмі переважно належать до водорозчинних з'єднань. Інша частина токсинів з гідрофобними властивостями, що мають високу спорідненість з біологічними структурами, знаходиться в плазмі практично у зв'язаному стані у вигляді комплексу з альбуміном і ліпопротеїнами низької щільності. Сорбцію гідрофільних токсинів альбуміном і ліпопротеїнами низької щільності можна розглядати як важливий механізм детоксикації організму, що забезпечує багаторазове зниження вільної концентрації токсинів і їхню доставку в печінку для інактивації та наступної елімінації. Особливе значення цей аспект набуває для низько- і середньомолекулярних токсинів, на які не реагує імунна система внаслідок відсутності їх імуногенності [33, 45, 46, 69, 79, 81, 88, 128, 158, 165]. Ендотоксичні субстанції виявляються при розвитку будь-яких патологічних процесів на ранніх стадіях перебігу захворювання. Тому збільшення їх концентрації без виявлення клінічних проявів захворювання говорить про можливість прихованих патологій.

Іншим завданням дослідження було визначення найбільш діагностично точних методів скринінг-аналізу та моніторингу перебігу коагулопатій.

З метою визначення найбільш ефективного методу скринінгового дослідження протромбіназотворення проводився контроль якості різних модифікацій ПЧ і методів визначення активності ФВШП. Показники ПЧ можуть відхилятися від нормальних при зниженні концентрації фібриногену крові, гіперактивності природних антикоагулянтів, особливо стимульованих

препаратами гепарину, при введенні антагоністів вітаміну К, вродженому дефіциті активності факторів протромбінового комплексу [13, 28, 32, 83, 124, 135, 136, 194, 210]. Найбільш ефективною для досліджень ФВШП виявилася модифікація визначення ПЧ ПЧЦП. Коефіцієнт варіації цієї модифікації виявився найменшим серед усіх досліджених різновидів методу визначення протромбінового часу (2,90%). Дослідження ПЧ капілярної крові неприпустиме, оскільки не відбиває істинної активності ФВШП унаслідок викиду в скляний капіляр з рани тканинного фактора, кількість і активність якого неможливо врахувати при проведенні дослідження.

Для встановлення оптимального методу визначення активності ФВШП проводився контроль якості основних СКТ, використовуваних з цією метою в практиці клінічних лабораторій. СКТ, що визначають активність ФВШП, змінюються при порушеннях функціонування ф.ф. II, IIa, X, зниженні концентрації або молекулярній неповноцінності ф. I, зменшенні активності ф. XIII, але в основному вони використовуються для визначення активності ф.ф. VIII, IX, XI. Крім того, перераховані методи контролю факторів згортання чутливі до антикоагулянтів, особливо прямої дії [15, 20, 22, 28, 54, 65, 76, 96, 108, 112, 138, 182, 193].

Установлено, що найбільш оптимальними є показники якості методу визначення АПТЧ. Крім того результати, отримані за допомогою цього методу найбільше точно відповідають клінічному перебігу захворювань у хворих усіх досліджуваних груп.

У результаті проведеного дослідження встановлено, що на показники якості різних методів дослідження ФВШП впливає, у першу чергу, ступінь контактної активації. Чим більше стандартизований тест по контактній активації, тим менша дисперсія його показників.

Безальтернативність на цей час гравіметричного методу визначення фібриногену (за Рутберг) зумовлена низькою оснащеністю клінічних лабораторій України спеціальною коагулометричною технікою та якісними реагентами. Необхідно відзначити, що правильне виконання тесту Рутберг забезпечує достатню для клініциста інформацію. Крім того, метод

вирізняється порівняно високими показниками якості, а отже, його можна ефективно використовувати в клініці. Введення в мінімальну коагулограму визначення гематокритного числа, одного з основних методів дослідження реологічних властивостей крові, пов'язане з тим, що зміни гемореології сприяють розвитку коагулопатій геморагічного або тромбофілічного характеру.

За результатами проведених досліджень основних показників якості методів визначення активності складових системи гемостазу, що мають значення для формування коагуляційного потенціалу, була запропонована система скринінгової діагностики і моніторингу порушень згортання крові, що включає такі тести:

- визначення активованого парціального тромбопластинового часу;
- визначення протромбінового часу цільної плазми;
- визначення концентрації фібриногену в плазмі гравіметричним методом (за Рутберг);
- визначення гематокритного числа капілярної крові.

Більшість дослідників також схиляється до того, що число методів скринінг-коагулограми доцільно обмежити. Але кількість тестів, що рекомендуються, коливається у досить широких межах [22, 25, 26, 28, 40, 44, 83, 96, 109, 135, 138, 150, 201, 202]. Необхідність такого обмеження пов'язана з тим, що при проведенні досліджень системи гемостазу лаборантами часто здійснюється свідоме дублювання результатів досліджуваних параметрів за допомогою різних методів. Але таке “підстрахування” зумовлено тим, що багато методів дослідження не стандартизовані. Таким чином затягується час дослідження, що негативно відбивається на його якості та ефективності наступного лікування. Крім того, значно збільшується витрата реагентів. Відповідно до сучасної концепції лабораторної діагностики поряд з якістю дослідження визначальними факторами вибору методу є вартість і тривалість виконання [58, 74, 86, 105, 114].

Для з'ясування впливу особливостей преаналітичного етапу на якість основних СКТ проводилося дослідження коефіцієнтів варіації показників ПЗЛ при заборі крові з дотриманням розроблених нами вимог і без них. Вважається, що ретельний контроль аналітичних і преаналітичних умов і статистична обробка результатів досліджень, з урахуванням вимог міжнародних організацій з контролю якості значною мірою поліпшують порівнянність референтних інтервалів [3, 38, 47, 95, 155].

Було встановлено, що недотримання вимог по стандартизації преаналітичного етапу веде до значного збільшення коефіцієнта варіації, а отже, знижує якість дослідження. Відповідно до запропонованих вимог підготовка пацієнта до дослідження показників системи гемостазу - процес, що вимагає декількох днів. У день забору крові пацієнт повинний знаходитися в стані психофізичного спокою. Важливим моментом є умови одержання крові. Найкращою якість лабораторних тестів була при заборі крові з кубітальної вени самопливом в умовах регламентованого стазу.

Ще один аспект преаналітичного етапу – встановлення границь референтних інтервалів. Оптимальним варіантом є визначення біологічної варіації досліджуваної ознаки, але такий підхід зв'язаний з масштабними епідеміологічними дослідженнями, проведення яких для гемостазіологічних параметрів може виявитися нерентабельним.

Розмаїтість реагентів для досліджень системи гемостазу, кожний з яких може мати різну активність стосовно референтної плазми, вимагає створення системи контролю референтних значень [17, 47, 75, 98, 155, 185, 204] і тому міжнародними організаціями з контролю якості приділяється велика увага референтним матеріалам. Крім того, властивості біологічних реагентів значно залежать від умов одержання, збереження, транспортування й використання [9, 17, 87, 94, 100, 102, 103, 104, 108, 114, 144, 153, 176, 177, 178, 211]. У зв'язку з цим варіювання референтних границь характерно для багатьох СКТ.

В ході проведених досліджень було встановлено, що референтні інтервали, подані в спеціальній літературі для СКТ часто не відповідають тим, що характерні для популяції, яку обслуговує лабораторія. Це може призводити до суттєвих похибок трактування отриманих даних та призначення неадекватного лікування.

Для полегшення трактування результатів дослідження на постаналітичному етапі запропонований новий розрахунковий референтний індекс. До сьогоднішнього дня практика універсалізації результатів дослідження використовувалася лише при трактуванні змін протромбінового часу. Існуючі способи оцінки являють собою відношення між показниками ПЧ пацієнта і середнім нормальним значенням (ПІ, МНВ, нормалізоване відношення). Запропоновано універсальний спосіб оцінки лабораторних досліджень, що ґрунтується на тому, що кожен показник, отриманий у результаті виконання тесту, можна трактувати як середньоквадратичне відхилення, узятє з визначеним коефіцієнтом. Найближчим аналогом у статистичних дослідженнях є визначення нормалізованих значень вибірки. Референтний розрахунковий індекс (ROI) визначає відстань між отриманим значенням і середнім для вибірки нормальних значень. Формула розрахунку оцінного індексу виведена таким чином, що границями референтних інтервалів є значення $(-)\cdot 1$ і $(+)\cdot 1$. Для оцінки тестів, значення яких зменшуються зі зростанням активності аналіту, отримана величина множиться на $(-)\cdot 1$.

Запропонований ROI можна використовувати не тільки для оцінки СКТ, але і всякого тесту, якщо аналізована величина має нормальний розподіл у досліджуваній вибірці.

У результаті проведених досліджень установлено, що на величину ROI практично не впливає ні активність реагенту, ні рівень дисперсії, що характерна для цього реагенту, якщо число ПЗЛ постійно. Єдиним фактором, що може істотно впливати на показники ROI, є неякісне виконання тесту – недостатня кількість осіб референтної групи (або їхній неправильний підбір) і погрішності при виконанні методики.

Було встановлено, що між показниками ПЧ і АПТЧ спостерігається певна кореляційна залежність. При порушенні на етапах тромбіно- і фібринотворення ця кореляція достовірна і для підгрупи І₂ коефіцієнт кореляції становив 0,92. При порушеннях активності ФВШП або ФЗШП (підгрупи І₁ і І₃) кореляційна залежність була недостовірною. Отже, при нормальному вмісті фібриногену й одночасно, зміні показників ПЧ і тестів, що визначають активність ФВШП, можна говорити про порушення активності факторів X, V або II та/або їхніх інгібіторів.

Для проведення моніторингу порушень коагуляційного гемостазу нами була розроблена карта моніторингу за показниками РОІ. Перевагою ведення карт РОІ є їхня наочність, а також те, що незалежно від використовуваних величин і одиниць виміру на моніторинговій карті можна відбити і співвіднести зміни декількох показників гемостазу або інших тестів, якщо в цьому існує необхідність.

Таким чином, використання розробленої системи контролю виконання досліджень на преаналітичному та постаналітичному етапах дозволяє зменшити систематичну і випадкову помилку лабораторного дослідження, оптимізувати первинну діагностику коагулопатій і моніторинг їхнього перебігу як у період ремісії, так і при лікуванні препаратами, здатними прямо або опосередковано змінювати коагуляційну активність прокоагулянтних і антикоагулянтних ланок системи згортання крові. Виконання розробленої системи проведення скринінг-коагулограми дозволяє підвищити репрезентативність цього дослідження, збільшити його можливості щодо відображення істинної активності компонентів коагуляційної ланки системи гемостазу.

ВИСНОВКИ

1. У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та розбір причин низької репрезентативності скринінгових досліджень коагуляційного гемостазу та визначено концептуальний шлях вирішення цієї проблеми, який полягає у підвищенні якості аналітичної процедури на всіх етапах виконання аналізу. Запропоновано способи підвищення діагностичної цінності скринінгового дослідження коагуляційної ланки системи гемостазу, які включають удосконалення методології формування репрезентативної референтної групи, вибір оптимальних засобів діагностики та інтерпретації отриманих результатів.

2. Показано, що добір осіб у референтну групу повинен проводитись виходячи з визначення статусу “здоров’я”, з використанням обмежуючих критеріїв, пов’язаних із наявністю гемостазіопатій в анамнезі, характером харчування, руховим режимом, статтю, шкідливими звичками, етнічною приналежністю, віком. Встановлено, що розподіл показників індексу маси тіла та досліджуваних показників коагулограми у референтній вибірці здорових індивідуумів підпорядковується закону Гаусса-Лапласа, а розподіл за віком не підпорядковується.

3. Доведено, що для підвищення достовірності результатів досліджень коагуляційної ланки системи гемостазу лабораторії повинні самостійно проводити встановлення меж нормальних значень досліджуваних показників на представниках популяції здорових осіб, які обстежуються в цій лабораторії.

4. Встановлено кореляційну залежність між показниками активності процесів гемокоагуляції та концентрацію середньомолекулярних пептидів при збільшенні ступеня ризику розвитку ускладнень з боку системи гемостазу, що свідчить про доцільність використання досліджуваного маркеру ендотоксикозу як критерію відбору здорових індивідуумів до референтної групи.

5. Доведено, що заміна методу скринінг-коагулограми, який має

високу діагностичну цінність декількома тестами з низькою діагностичною цінністю приводить до зниження репрезентативності дослідження.

6. Визначено умови спеціальної підготовки пацієнта на преаналітичному етапі та отримання матеріалу дослідження, які мінімізують можливий вплив на систему гемостазу факторів внутрішнього і зовнішнього середовища, сприяють підвищенню репрезентативності кінцевого результату аналізу.

7. Показана доцільність застосування розробленого методу оцінки показників тестів скринінгової коагулограми - референтний оціночний індекс. Доведено інформативність індексу при діагностиці та моніторингу перебігу гемостазіопатій; його незалежність від активності реагентів.

8. Аргументована необхідність модернізації підходів до досліджень системи гемостазу яка полягає у введенні стандартів виконання преаналітичного та постаналітичного етапів аналітичної процедури в лабораторіях всіх рівнів. Основними вимогами таких стандартів має бути дотримання єдиних правил формування референтної групи, вибору методів дослідження та їх інтерпретації.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Первинний добір практично здорових осіб проводиться відповідно до загальноприйнятого статусу “здоров’я”. При доборі осіб у референтну групу необхідно враховувати критерії, пов’язані з наявністю тромботичних, геморагічних проявів в анамнезі, характером харчування, руховим режимом, статтю, шкідливими звичками, етнічною приналежністю, віком, характером розподілу показників гемостазу. Для перевірки відповідності розподілу закону Гаусса можна використовувати показники ексцесу та асиметрії. Якщо спостерігається відхилення значень скринінгових клотингових тестів від гауссіани, це вказує на неадекватність підбору референтної групи. Для скринінгових клотингових методів дослідження коагуляційної ланки системи гемостазу (крім методу визначення часу рекальцифікації плазми) референтний інтервал визначається як $M \pm 2S$. Для результатів дослідження часу рекальцифікації плазми межі референтного інтервалу визначаються як $M \pm 1,96S$.

2. Для виявлення прихованих патологій, що можуть впливати на активність компонентів коагуляційного гемостазу та зменшувати репрезентативність референтної групи і довірчих інтервалів рекомендується використовувати дослідження середньомолекулярних пептидів. Підвищенні концентрації цього маркера ендотоксикозу в сироватці крові обстежуваного пацієнта є аргументом на користь виключення із референтної групи.

3. Для покращення діагностики і моніторингу порушень коагуляційного гемостазу рекомендується використовувати величину критичного інтервалу (від $2S$ до $3S$ від середнього). Вхідження значення в цей інтервал свідчить про високу ймовірність латентної форми захворювання. Якщо значення тестів перебувають за межами інтервалу $M \pm 3S$, то вірогідність того, що вони є нормальними, низька.

4. Для поліпшення інтерпретації результатів дослідження тестів, у яких використовуються реагенти з активністю, що змінюється,

рекомендується використовувати референтний оцінний індекс, що розроблений на основі методу визначення нормалізованих значень. При проведенні лабораторних досліджень установлюється ступінь відхилення показника стосовно до референтного інтервалу за формулою $POI = R = (x_i - M)/nS$, де x_i – показник хворого, M – середнє арифметичне вибірки нормальних значень, n – коефіцієнт, який використовується при обчисленні границь норми для даного тесту. Для АПТЧ і ПЧ для зручності оцінки напрямку реакції значення R множаться на $(-)$ 1 $((-)$ 1 $R=POI$. Границями норми для POI є значення від $(-)$ 1 до $(+)$ 1.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Андреев Ю.Н. Гемофилия на рубеже двух столетий // Гематология и трансфузиология. – 2002. – №3. – С. 3–4.
2. Андреева Т.А., Ханина Т.М., Гарезина О.В., Залепухина О.Э. Особенности течения гемофилии у лиц пожилого возраста // Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии: Материалы XXI Росийської конференції. – СПб., 1995. – С. 138–139.
3. Атанасов Н., Влайкова Е., Клисурова В., Кацарова С. Референтные границы и доверительные интервалы 23 клинико-химических показателей // Лабораторное дело. – 1988. – №11. – С. 70–73.
4. Ашмарин И.П., Пасторова В.Е., Ляпина В.А. Влияние простейших пролинсодержащих пептидов на функциональную активность противосвёртывающей системы и первичного гемостаза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1998. – №5. – С. 496–499.
5. Баешко А.А., Шорох Г.П., Молочко М.Я., Климович В.В., Шейд А.А. Послеоперационный тромбоз глубоких вен нижних конечностей и эмболия легочной артерии: предрасполагающие факторы и уровни риска развития // Хирургия. – 1999. – №3. – С. 52–58.
6. Базарнова М.А., Морозова В.Т. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике: Навч. посіб – К.: Вид-во „Вища школа. Головное издательство”, 1988. – 318 с.
7. Балаховский И.С., Лотц А.П. Повседневный контроль качества в клинико-биохимических лабораториях с помощью критерия χ^2 // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №5. – С. 50–53.
8. Балаховский И.С. Оценка правильности клинических лабораторных анализов без использования контрольных материалов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №9. – С. 40.
9. Балаховський І.С. Комплексна оцінка правильності результатів медичних лабораторних досліджень // Лабораторна діагностика. – 2002. – №4. – С. 49–59.

10. Баркаган З.С. Введение в клиническую гемостазиология: Монографія – М.: Ньюдиамед АО. – 1998. – 56с.
11. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы: Монографія – М.: Медицина, 1988. – 528 с.
12. Баркаган З.С., Кузник Б.И. О целесообразности модификации современной схемы свёртывания крови // Терапевтический архив. – 1990. – С. 81–86.
13. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза: Монографія – М.: Ньюдиамед АО, 2001 – 296 с.
14. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы диагностики нарушений гемостаза: Монографія – М.: Ньюдиамед АО, 1999. – 215 с.
15. Бебешко В.Г., Бруслова Е.М. Диагностика и лечение гемофилии на современном этапе. // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2003. – №2(3). – С. 44–48.
16. Белицер В.А., Мусликовская А.А., Платонова Т.Н., Ена Я.М. Анти-тромбин III. Функциональная роль и методы определения // Вопросы медицинской химии. – 1987. – №4. – С.8–15.
17. Берковский А.Л. Разработка методов получения биологически активных соединений для диагностики системы гемостаза: Автореф. дис...к-та біол. наук. – М., 2000. – 26с.
18. Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Качалова Н.Д., Простакова Т.М., Козлов А.А. Тест АЧТВ с элларговой кислотой. // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – №8. – С.18–20.
19. Бобылёва Т.А., Вавилова Т.В., Глущенко Г.В. Состояние свёртывающей системы и липидного спектра у больных с безболевым ишемией миокарда // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №9. – С.43.
20. Бокарев И.Н. Диссеминированное и постоянное распространённое внутрисосудистое свёртывание крови. Синдром ДВС и понятие ПВС // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – №1. – С. 78–81.
21. Бокарев И.Н., Щепоткин Б.М., Ена Я.М. Внутрисосудистое свёртывание крови: Монографія. – К.: Вища школа, 1989. – 240 с.
22. Бокарев И.Н. Лабораторные методы исследования свёртывания крови

при обследовании больных в амбулаторных условиях // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001 – №9. – С.16.

23. Братчик А.М. Клинические проблемы фибринолиза: Монографія – Київ: Здоров'я. – 1993. – 344 с.

24. Букарева Л.В., Плющ О.П., Вдовин В.В. и др. Хронобиологические исследования течения наследственных коагулопатий на фоне геомагнитных изменений в Москве // Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии: Матеріали XXI Російської конференції. – СПб., 1995. – С. 194–195.

25. Васильев С.А. Коагулогический контроль экстремальных состояний в гематологии // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997 – №5. – С.21.

26. Васильев С.А. Лабораторные методы в диагностике геморрагических состояний // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001 – №9. – С.17.

27. Виговська Я.І. Дисеміноване внутрішньосудинне згортання крові // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2002. – №3. – С.60–65.

28. Виговська Я.І. Діагностика та лікування спадкових коагулопатій: Методичні рекомендації. – Львів: 1997. – 15 с.

29. Владимирова С.Г., Тарасова Л.Н., Савиных Е.Ю. Оценка качества реактивов, применяемых для определения активности факторов VIII и IX // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: Сборник научных трудов к 70-летию НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Республики Беларусь в 2-х томах: Матеріали V з'їзду гематологів і трансфузіологів Республіки Беларусь – Мінськ: Стринко, 2003. – Т.1. – С. 25–27.

30. Владимирова С.Г., Тарасова Л.Н., Савиных Е.Ю., Платонова Г.К. Воспроизводимость одностадийных методов определения активности факторов VIII и IX в пробирочном и аппаратном исполнении // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2002. – №1 – С. 188.

31. Владимирова С.Г., Тарасова С.Н., Савиных Е.Ю., Платонова Г.К. Влияние активаторов, применяемых в тесте АЧТВ, на его результаты в пробирочном и аппаратном исполнении // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002.

– №2. – С.38–40.

32. Возіанова Ж.І., Шкурба А. В., Печінка А.М. Порівняльне діагностичне значення біохімічних показників для раннього розпізнавання фульмінантної форми вірусних гепатитів // Лабораторна діагностика. – 2002. – № 2 – С.3–8.

33. Гаврилов В.Б., Бидула М.М., Фурманчук Д.А., Конев С.В., Алейникова О.В. Оценка интоксикации организма по нарушению баланса между накоплением и связыванием токсинов в плазме крови // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – №2. – С.13–17.

34. Гайда Г.З., Довганик З.В., Логінський В.Є., Паробецька І.М., Черпак О.М., Вус М.М., Орлова Л.В. Вивчення критерію відтворюваності аналітичної якості тест-наборів для визначення деяких гемостазіологічних показників // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5-6 листопада 2002 р.) – .К.: Знання України, 2002. – Вип. 31. – С.172–176.

35. Гайдукова С.М., Видиборець С.В., Байдурын С.А., Глушко Н.Л., Попович Ю.Ю. Сучасні уявлення про тромбоцитарну ланку гемостазу, структуру та функції тромбоцитів // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5-6 листопада 2002 р.) – .К.: Знання України, 2002. – Вип. 31. – С.8–13

36. Гайдукова С.М., Видиборець С.В., Байдурын С.А.. Структура неонатальних тромбоцитопеній та їх лабораторна діагностика // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5-6 листопада 2002 р.) – .К.: „Знання України”, 2002. – Вип. 31. – С.3–8.

37. Гематологические синдромы в общей клинической практике: Монографія / К.М. Абдулкадыров, О.А. Рукавицын, Е.Р. Шилова и др. – СПб.: ЭЛБИ, 1999. – 128 с.

38. Генкин А.А., Эммануэль В.Л.. К проблеме референтных величин // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №6. – С.71–72.

39. Герич І.Д., Барвінська А.С., Стояновський І.В. Ризик розвитку венозних

тромбозів і емболій у хірургічних пацієнтів – ін'єкційних наркоманів // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27-28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С.42–44.

40. Гирич В.Н., Дзюблик И.В., Благодатный В.Н. Диагностика и предотвращение развития геморрагического синдрома: Методичні рекомендації МОЗ України – К., 1992. – 15 с.

41. Гойда Н.Г., Данова М.П., Новак В.Л. Актуальні проблеми лікування гемофілії в Україні. // Український журнал гематології та трансфузіології – 2003. – № 2(3). – С. 5–9.

42. Гриненко Т.В. Альфа₂-антиплазмін інгібує процес активації плазміногена тканинним активатором на фібрині // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27-28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С.49–50.

43. Грицай Н.М., Литвиненко Н.В. До питання про патогенез геморагічного синдрому при дисциркуляторній енцефалопатії у ліквідаторів наслідків аварії на Чорнобильській АЕС // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27-28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С.47–48.

44. Грицюк А.И., Амосова Е.Н., Грицюк И.А.; Практическая гемостазиология: Монографія. – К.: Здоров'я, 1994. – 225 с.

45. Громашевская Л.Л. „Средние молекулы” как один из показателей „метаболической интоксикации” в организме // Лабораторная диагностика. – 1997. – № 1. – С. 11–16.

46. Громашевская Л.Л. Биохимическое исследование при гепатите С: решённые и нерешённые вопросы // Лабораторная диагностика. – 1998. – №3. – С. 3–9.

47. Громашевська Л.Л. Про норми біохімічних показників: поняття залежності від методів дослідження та інших факторів // Лабораторна діагностика. – 2001. – №2. – С.61–62.

48. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавание патологических процессов: Монографія – М.: Медицина, 1978. – 296 с.
49. Гусева С.А., Вознюк В.П., Бальшин М.Д. Болезни системы крови: Монографія. – К.: Логос. – 2001. – 542 с.
50. Гусева С.А., Дубкова А.Г., Вознюк В.П. Наследственные и приобретённые гематологические синдромы в клинической практике. – К.: Логос. – 2000. – 206 с.
51. Гущина А.Г., Муравьёв А.В., Шаечкина И.К., Гущина Г.М. Гемореологический статус организма в условиях нормального изменения сосудистого русла // Физиология человека. – 2001. – № 4. – 82–84.
52. Данилов И.П. Влияние физической нагрузки и малых доз адреналина на уровень VIII фактора // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: Сборник научных трудов к 70-летию НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Республики Беларусь в 2-х томах: Матеріали V з'їзду гематологів і трансфузіологів Республіки Беларусь. – Мінськ: Стринко, 2003. – Т.1. – С. 42–44.
53. Дзісь Є. Основи гемостазіології. Частина I. Загальні питання: Методичні рекомендації. – Львів: 2002. – 36 с.
54. Дзісь Є.І., Томашевська О.Я. Гемостазіологічні підходи до діагностики тромботичних ускладнень // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали I Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27–28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С.52–54.
55. Довганик З.В., Гайда Г.З. Логінський В.С., Черпак О.М., Паробецька І.М., Чаус Л.М., Макар І.І., Корецька Н.Р. Оцінка аналітичної якості коагулометричного способу визначення активності антитромбіну III / Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5–6 листопада 2002 р.) – К.: Знання України, 2002. – Вип. 31. – С.261–264.
56. Довідник з гематології: Навч. посібник / А.Ф. Романова, Я.І. Виговська, В.С. Логинський та ін.; За ред. А.Ф. Романової. – К.: Здоров'я, 1997. – 324 с.
57. Дорман А., Веge Т. Карманный справочник по лабораторной диагностике:

Навч. посібник. – Минск: Попурри, 2000. – 133 с.

58. Ефимов В.С., Градусов К.А., Подолян В.А., Гришин В.Л., Копцов В.П. Диагностическая ценность тестов рекальцификации и толерантности крови к гепарину при их автоматизированном исполнении // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – №6. – С.84–86.

59. Заикин Е.В., Кадашева О.Г., Лукичева Т.И., Малахов В.Н., Меньшиков В.В., Мошкин А.В., Новикова Е.С. Стандартизация требований к точности клинических лабораторных исследований // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – №9. – С.34.

60. Заславская Р.М. Суточные нормы свертывающей системы крови в норме и патологии и проблемы терапии: Монография – М., 1994. – 452 с.

61. Зеленько О.А. Стан загального коагуляційного потенціалу периферичної крові у щурів під впливом техногенного та біогенного стрес-факторів // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5-6 листопада 2002 р.) – К.: Знання України, 2002. – Вип. 31. – С. 34–38.

62. Зербино Д.Д. Диссеминированное внутрисосудистое свёртывание крови: варианты микротромбов // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – №1. – С. 73–76.

63. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования: Монография – Казань: Вид-во „ФЭН”– 2000. – 367 с.

64. Иванов Е.П. Диагностика нарушений гемостаза. (Практическое пособие для врачей): Навч. посіб. – Минск: Беларусь., 1983. – 224 с.

65. Иванов Е.П. Руководство по гемостазиологии: Навч. посіб – Минск: Беларусь, 1991. – 302 с.

66. Илюхина В.А., Заболотских И.Б. Физиологические основы различий устойчивости организма к субмаксимальной физической нагрузке до отказа у здоровых лиц молодого возраста // Физиология человека. – 2000. – № 3. – С. 92–99.

67. Карасева Ю.В, Морозова В.И., Чикин В.Г., Морозов В.Н, Гусак Ю.К. Состояние антиоксидантного, противосвёртывающего, иммунного потенциалов крови как показатели дизадаптивных механизмов у женщин с

плацентарной недостаточностью // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №11. – С. 44–45.

68. Карасева Ю.В., Морозова В.И., Гусак Ю.К., Морозов В.Н., Чикин В.Г. Особенности адаптационных механизмов в различные периоды нормально протекающей беременности // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №11. – С. 46.

69. Карімов І.З. Окислювальна модифікація білку сироватки крові як показник інтоксикації у операційних хворих // Лабораторна діагностика. – 2003. – № 1. – С. 41–43.

70. Кацадзе Ю.Л. Оценка скорости генерации и нейтрализации тромбина – важнейшая характеристика функционального состояния системы гемостаза больных в процессе лечения дезагрегантами и антикоагулянтами // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002 – №9. – С. 24–25.

71. Кинах М.В., Михайлович В.В. Состояние системы гемостаза у больных циррозом печени, осложнённым пищеводно желудочным кровотечением по результатам аутокоагуляционного теста // Лабораторная диагностика – 1997 – №1 – С. 26–29.

72. Кирпич И.А., Дёгтева Г.Н., Сидоров П.И., Соловьев А.Г. Кононюк Н.Н., Шелыгин К.В.. Влияние экспериментальной хронической алкогольной интоксикации на фоне алиментарной недостаточности на эритроцитарный гомеостаз // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2001. – № 9. – С. 317–319.

73. Киселев В.И., Шахматов И.И., Бондаренко Н.А., Вдовин В.М. Состояние системы гемостаза при моделировании различных стрессовых воздействий на организм человека. // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: Сборник научных трудов к 70–летию НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Республики Беларусь в 2–х томах: Матеріали V з'їзду гематологів і трансфузіологів Республіки Беларусь. – Мінськ: Стринко, 2003. – Т.1. – С. 68–69.

74. Ковальчук Ю.П. Оценка стоимости преаналитического этапа при проведении лабораторного исследования // Клиническая лабораторная

диагностика. – 2003. – №9. – С. 15.

75. Козлов А.А., Качалова Н.Д., Климович Л.Г., Берковский А.Л., Простакова Т.М. О стандартизации реагентов тромбопластина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – №9. – С.35.

76. Козлова Т.В. Контроль антикоагулянтной терапии: возможности, проблемы перспективы // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001 – №9. – С. 19–20.

77. Кондурцев В.А. Экологическая гематология: сообщение 1. Патоморфоз геморрагических заболеваний за последние 30 лет // Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии: Матеріали ХХІ Російської конференції. – СПб., 1995. – С. 193.

78. Константинова Е.Э., Миронова Е.В., Иванова Л.А., Толстая Т.Н. Реологические свойства крови, агрегация тромбоцитов и состояние микроциркуляции при артериальной гипертензии // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27–28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С. 84–86.

79. Копытова Т.В., Добротина Н.А., Хими́на Л.И., Ларина Т.М. Лабораторная диагностика эндоинтоксикации // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – №1. – С.14–17.

80. Корякин А.М., Коваленко В.М., Карагаева Л.Г., Епифанцева Н.Н., Никитина Е.А., Мишенкова Е.В. Изменения агрегации тромбоцитов у больных хроническим алкоголизмом // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №6. – С. 15.

81. Корякина Е.В., Белова С.В., Горячев В.И. Молекулы средней массы в оценке активности ревматоидного воспаления // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №6. – С. 32.

82. Кузник Б.И., Баркаган З.С. Современные представления о процессе свертывания крови, фибринолизе и естественных антикоагулянтах // Гематология и трансфузиология. – 1991. – №11. – С. 18–21.

83. Лабораторная и инструментальная діагностика: Монографія / П.А. Воро-

- бьев, Л.И. Дворецкий, В.В. Желнов, С.В. Яковлев – М.: Ньюдиамед АО, 1997. – 210 с.
84. Лакин Г.Ф. Биометрия: Навч. посібник – М.:Высшая школа, 1980. – 293 с.
85. Ленская Р.В., Сорокин П.Н., Селезнёв В.А., Ченцова Н.Н., Иконникова О.А., Дорофеева М.П., Романов Е.И. Динамика индивидуальных и усреднённых доз внутреннего облучения Cs-137 в течении 1991–1999 годов у детей российского Чернобыля, проживающих на загрязнённых радионуклидами территориях // Гематология и трансфузиология. – 2002. – №5. – С. 33–35.
86. Линденбратен А.Л., Шипова В.М. Экономический анализ деятельности лабораторной службы // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №5. – С. 51.
87. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Лабораторная гематология – М.: ЮНИМЕД-пресс, 2002. – 114 с.
88. Луцик Б.Д., Матвійчук Б.О., Ястремська О.О., Патер Я.З., Темник І.В., Порохнавець Л.Є., Кінах М.В., Мазурик Н.Р., Долинська Н.В. Клініко-лабораторні критерії діагностики синдрому ендогенної інтоксикації у хворих з гострою кишковою непрохідністю // Лабораторна діагностика. – 2003. – № 1. – С. 38–41.
89. Лычёв В.Г. Диагностика и лечение диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови: Навч. посіб. – М.: Медицинская книга; Нижний Новгород: НГМА, – 2001 – 192 с.
90. Магеровський Ю.В., Гайда Г.З., Даниш Т.В., Новак В.Л., Паробецька І.М., Черпак О.М., Гайда А.В., Вус М.М., Орлова Л.В., Корецька Н.Р. Тест-система для скрінінгових коагулологічних досліджень: аналітична якість та безпека // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27–28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С.113–114.
91. Макаров В.А. Неведрова О.Е., Воюшина Т.Л., Момот А.П., Баркаган З.С., Мамаев А.Н. Новые хромогенные субстраты для коагулологических исследований // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5–6 листопада 2002 р.)

- К.: Знання України, 2002. – Вип. 31. – С. 224–228.
92. Максимов Ю.Н., Узлова И.Ю. Препараты, оказывающие влияние на процесс свёртывания крови и фибринолиз // Журн. практ. врача. – 1996. – №3. – С. 39–42.
93. Медведев В.В., Волчек Ю.З. Клиническая лабораторная диагностика: Навч. посіб. – СПб.: Гиппократ, 1995. – 208 с.
94. Международная федерация клинической химии. Важность качества в клинических лабораториях // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №11. – С. 49–50.
95. Мельник А.А. Референтные значения лабораторных показателей у детей и взрослых: Монографія – К.: Книга плюс, 2000. – 118 с.
96. Мельник О.О. Скринінгові методи дослідження // Лабораторна діагностика. – 2002. – №2. – С. 40–45.
97. Мельников А.А., Викулов А.Д., Багракова С.В. Состояние анти-коагулянтной системы и реологических свойств крови у спортсменов с разным уровнем физической работоспособности // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2002. – №3. – С. 53–58.
98. Меньшиков В.В. Качество клинических лабораторных исследований. Новые горизонты и ориентиры: Навч. посіб. – М.: 2002. – 304 с.
99. Меньшиков В.В. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап: Монографія – М.: 1999. – 220 с.
100. Меньшиков В.В. Стандартизация в клинической лабораторной медицине // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – №5. – С. 50–53.
101. Меньшиков В.В. Факторы, определяющие качество клинико–лабораторных исследований // Клиническая лабораторная диагностика – 1995. – № 4. – С. 8–11.
102. Меньшиков В.В., Кадышева О.Г., Пимонова Л.Н. Система обеспечения качества клинико–лабораторных исследований // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – №12. – С. 9–15.
103. Меньшиков В.В., Малахов В.Н., Заикин Е.В., Лукичева Т.И., Кадашева О.Г., Романовская О.А. Опыт применения в клинических лабораториях

нормативов качества клинических лабораторных исследований // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №9. – С. 24.

104. Меньшиков В.В. О концепции стандарта качества клинических лабораторных исследований // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №2. – С. 5–12.

105. Меньшиков В.В. От экономии затрат к экономике клинического эффекта КДЛ // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №5. – С. 52–53.

106. Мишалов В.Г., Бурка А.А., Терехов С.Н., Заря И.Л., Ющенко П.В., Томилин В.В., Вознюк В.П. Профилактика тромбоэмболических осложнений при оперативных вмешательствах у больных с сопутствующим ожирением // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5–6 листопада 2002 р.) – К.: Знання України, 2002. – Вип. 31. – С. 232–236.

107. Мишалов В.Г., Осадчий А.И., Черняк В.А., Бейчук В.В., Миргородская Д.С. Венозный тромбоз и риск развития тромбоэмболических осложнений // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5–6 листопада 2002 р.) – К.: Знання України, 2002. – Вип. 31. – С.239–241.

108. Момот А.П., Шахматов И.И., Соколов Э.А. Возможности лабораторной диагностики нарушений в системе гемостаза с помощью наборов и реагентов фирмы «Технология–Стандарт» // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: Сборник научных трудов к 70-летию НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Республики Беларусь в 2-х томах: Матеріали V з'їзду гематологів і трансфузіологів Республіки Білорусь. – Мінськ: Стринко, 2003. – Т.1. – С. 98–100.

109. Момот А.П. Современные принципы, методы и средства лабораторной диагностики патологий гемостаза. Возможности отечественных лабораторий // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003 – №9. – С. 32.

110. Морозова В.И., Чикин В.Г., Хадарцев А.А., Карасева Ю.В, Морозова В.Н, Хапкина А.В. Диагностика адаптивных процессов у лиц, подверженных длительному холодовому воздействию // Клиническая лабораторная

диагностика. – 2001. – №11. – С. 45–46.

111. Мостовой Ю.М., Константинович–Чічірельо Т.В. Клініко–епідеміологічний аналіз тромбоемболії легеневої артерії як причини смерті за даними аутопсій за період 1993–2002 // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27–28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С. 130–132.

112. Мочанова Н.Ю., Бебешко В.Г., Бруслова К.М. Стан первинного та вторинного гемостазу у дітей, які зазнали дії іонізуючого опромінення, з залізодефіцитними анеміями // Лабораторна діагностика. – 2000. – С. 34–35.

113. Мошкин А.В. Особенности организации преаналитического этапа в централизованной лаборатории // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №9. – С. 22.

114. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Управление качеством лабораторных исследований: Монография – Москва: Медицина. – 2001. – 358 с.

115. Назаренко Г.И., Полубенцева Е.И., Кишкун А.А., Антипин А.Н. Практический опыт применения технологических карт для повышения эффективности использования возможностей лаборатории // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – №9. – С. 8–10.

116. Назаренко Г.И., Полубенцева Е.И., Кишкун А.А. Основные принципы создания критических путей в клинической лабораторной диагностике // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №9. – С. 40–41.

117. Назаров В.Г. Лекарственные средства, влияющие на гемостаз // Акушерство и гинекология. – 1993. – №2. – С. 52–56.

118. Неведрова О.Е., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Момот А.П., Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Савин А.А. Новые диагностикумы для оценки состояния системы гемостаза // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27–28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С. 132–134.

119. Нешина Е.И. Эффективность лабораторной диагностики коагулопатий // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002 – №9. – С. 25.

120. Никитина В.В., Сорокоумов В.А., Остроумова М.Н., Жучихина А.А.,

Ковалёва И.Г., Мнускина М.М. Изменение показателей липидного обмена и системы перикисного окисления липидов под влиянием магнитных полей различной интенсивности у неврологических больных // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №6. – С.39.

121. Никоненко А.Г. Критерии сравнения эффективности аллопатических и антигомотоксических препаратов // Биологическая терапия. – 2000. – №1. – С. 44–47.

122. Нильсен И.М. Гемофилия: Монографія / Пер. з англ. – СПб.: Рубеж, – 1999. – 102 с.

123. Образцов И.Ф., Кардаков Д.В., Коган А.Е., Ханин М.А. Математическая модель фонового состояния системы свёртывания крови // Доклады РАН. – 2001. – №2. – С. 261–263.

124. Панченко Е.П., Добровольский А.Б. Какие из показателей гемостаза могут помочь врачу? // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001 – №9. – С. 18–19.

125. Паньков В.Н., Садков С.А., Ситников С.А., Ворожцова С.И. Молекулы средней массы как показатель степени нарушения гемокоагуляции при гемофилии // Лабораторное дело. – 1989. – №9. – С. 24–28.

126. Папаян Л.П. Болезнь Виллебранда // Гематология и трансфузиология, – 1996 – С. 21–24.

127. Папаян Л.П. Новое в представлении процесса свёртывания крови // Трансфузиология. – 2004. – №1. – С. 7–22.

128. Пат. 42934 А Україна, МКВ G01N 33/50. Спосіб визначення ендотоксикозу: Пат. 42934 А Україна, МКВ G01N 33/50. М.Д. Бех, В.В. Дем'яненко, С.М. Андрейчин, Н.В. Бігуняк (Україна). – №2000020831; Заявл. 15.02.00; Опубл. 15.11.01, Бюл. 10.– 2 с.

129. Перехрестенко П.М. Проблеми гемостазіології та трансфузіології // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5–6 листопада 2002 р.) – .К.: Знання України, 2002. – Вип. 31. – С.354–362.

130. Петрищева Н.Н., Папаян Л.П. Гемостаз. Физиологические механизмы,

принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний: Монографія – СПб.: 1999. – 118 с.

131. Пименова Л.М., Меньшиков В.В., Лукичева Т.И., Кадашева .О.Г., Шипова В.М. Принципы расчёта стоимости лабораторного анализа // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №5. – С. 51–52.

132. Плаксина Г.В., Римарчук Г.В, Щеплягина Л.А., Цывенкова Л.А., Лаптева Т.И., Полякова Т.И. Лабораторный мониторинг оценки состояния здоровья детей из районов экологического неблагополучия // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №6. – С.17.

133. Платонова Т.Н. Методы анализа состояния системы гемостаза при лечении антикоагулянтами непрямого действия // Гематологія і переливання крові: Матеріали міжнародного симпозіуму “Гемостаз – проблеми і перспективи” (5-6 листопада 2002 р.) – .К.:Знання України,2002.–Вип.31.–С.265–270.

134. Платонова Т.Н., Сушко Е.А., Соловьёв Д.А., Ена Я.М. Определение содержания фибриногена в плазме крови человека с помощью тромбиноподобного фермента Анцистрон–Н и анализ состояния гемостаза в присутствии ингибиторов свёртывания // Физиологический журнал.– 1993.– №1.– С.65–74.

135. Платонова Т.Н., Чернищенко Т.Н., Гірницька О.В., Савчук О.М., Соколовська Л.І., Гамісонія М.Ш., Макогоненко С.М. Лабораторна діагностика стану системи гемостазу // Український біохімічний журнал – 2000. – №6. – С.67–74.

136. Плющ О.П., Тенцова И.А., Копылов К.Г., Северова Т.В. Диагностика и лечение больных с редкими формами наследственных коагулопатий // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997 – №5. – С. 70.

137. Полунин А.В., Коршунова Н.К., Медведев Н.В. Временной десинхроз биологического ритма агрегационного потенциала тромбоцитов у практически здоровых лиц // Проблемы гематологии и переливания крови. – М., 2002. – №1. – С. 203–204.

138. Пособие для врачей–лаборантов по методам исследования гемостаза:

- Навч. посіб. / Козлов А.А., Берковский А.Л., Качалова Н.Д., Простакова Т.М.. – М.: НПО Ренам, 2002. – 94 с.
139. Прудник И.М., Кадашева О.Г. Экономическое обоснование затрат на проведение внутрилабораторного контроля качества // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – №9. – С. 14–15.
140. Рекомендации немецких лабораторных обществ по обеспечению качества преаналитического этапа // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №5. – С. 51–52.
141. Розанова Л.С. Диагностика геморрагического синдрома и физический статус больного // Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии: Матеріали ХХІ Російської конференції. – СПб., 1995. – С. 201–202.
142. Ройтман Е.В., Дементьева И.И., Ерёменко А.А., Михайлов Ю.М., Леонова С.Ф. Использование алгоритма „Агрегатное состояние крови” в поэтапной диагностике и коррекции нарушений свёртывания и реологии крови (2–летний опыт работы) // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997 – №5. – С. 72.
143. Саенко В.Ф., Сухарев И.И., Гомоляко И.В., Влайков Г.Г. Профилактика тромбоэмболических осложнений в хирургии: Методичні рекомендації – К.: 1997. – 12 с.
144. Сапрыгин Д.Б., Катанов С.И., Романова Е.Н. Организация системы обеспечения качества в соответствии с международными стандартами – опыт ЗАО „Юнимед лабораториз” // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – №9. – С. 3–4.
145. Современные методы профилактики и лечения тромбоэмболических осложнений в интенсивной терапии. Методичні рекомендації / Клигуненко Е.Н., Фроленко В.В., Ехалов В.В., Максименко С.В. – Днепропетровск: – 2000. – 38 с.
146. Стандарты в гематологии: Монографія / За ред. Я.І. Виговської, В.Л. Новака – Львів: ПП „Кварт”, 2002. – 165 с.
147. Суханова Г.А., Акбашева О.Е., Дюкова Е.В., Кондратьев А.П. Антиоксиданты и ингибиторы протеолиза в оценке состояния здоровья человека //

- Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №11. – С. 8.
148. Суханова Г.А., Федотова Т.В., Сазонов А.Э. Рыжов С.В., Чухнова Д.Л.. Биохимические показатели состояния здоровья детей из районов радиационного и химического загрязнения // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №6. – С. 46.
149. Суховий М.В. Гемофилия як хірургічна проблема: Монографія – К.: АДЕФ Україна, 2001. – 208 с.
150. Суховій М.В., Дєєв В.А., Вознюк В.П., Томілін В.В., Куповська С.І., Кубашко А.В. Комплексна лабораторна діагностика порушень системи гемостазу при гіпокоагуляційному синдромі // Лабораторна діагностика. – 2002. – №2. – С. 8–10.
151. Танащян М.М., Ионова В.Г., Карабасова М.А., Лютова Л.В., Демина Е.Г. Гемореология, гемостаз и фактор курения у больных с ишемическими инсультами // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2002. – №3. – С. 42–45.
152. Тарасова Л.Н., Владимирова С.Г., Савиных Е.Ю., Платонова Г.К. Показатели качества метода Квика при использовании тромбопластиновых реагентов в ручном и аппаратном исполнении // Клиническая лабораторная диагностика – 2000. – №3. – С. 24–28.
153. Тарасова Л.Н., Платонова Г.К. О необходимости стандартизации методов определения коагуляционной активности фактора VIII (обзор литературы) // Лабораторное дело. – 1988. – №11. – С. 3–7.
154. Титов В.Н. Биологический параметр – “чистота” внутренней среды in vivo, эндогенные и экзогенные патогены. Функциональное единение гломерулярной фильтрации и воспаление // Клиническая лабораторная диагностика – 2003. – №9. – С. 47–48.
155. Титов В.Н. Интервалы нормы в клинической биохимии // Клиническая лабораторная диагностика – №1. – 1995. – С. 1–6.
156. Ткаченко Е.В., Коковская О.В., Мищенко В.П., Мищенко И.В., Ткач Е.А. Асимметрия крови и её свёртывания в норме и при остром нарушении мозгового кровообращения // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика,

діагностика, лікування” (27–28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С. 206–208.

157. Тлепшуков И.К., Балуда М.В., Цыб А.Ф. Изменения гемостатического гомеостаза у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской атомной станции // Гематология и трансфузиология. – 1998. – №1. – С.39–41.

158. Усенко Л.В., Мальцева Л.А. Эндотоксикоз. Современный взгляд на проблему (приглашение к дискуссии) // Лікування та діагностика – 1999. – №4; 2000. – №1. – С.13–15.

159. Фейгин Г.А. Изменения в системе гемостаза и их устранение в практической хирургии // Российская. ринология.– 1996.– № 2–3. –С. 113–114.

160. Физиология системы гемостаза: Монографія / В.П. Балуда, М.В. Балуда, И.И. Деянов., И.К. Тлепшуков – М.: 1995. – 244 с.

161. Хасянова И.В., Чернышенко Т.М., Савчук А.И., Краснобрижа Е.И., Платонова Т.Н., Юсова Е.И. Изменения в системе гемостаза у пациентов с венозной тромбоемболией // Кровообіг та гемостаз. Додаток: Матеріали І Української конференції „Тромбози в клінічній практиці: профілактика, діагностика, лікування” (27–28 травня 2004 р.). – К.: 2004. – С. 214–215.

162. Цавта Б. Концепции референтного интервала и биологической вариации // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №9.– С. 8–9.

163. Цавта Б. Преаналитика: проблемы и решения // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №9.– С. 9.

164. Чернов В.М., Лобанова Е.В., Якунина Л.Н., Вдовин В.В., Григорьянц Л.Я., Румянцев А.Г. и др. Динамика заболеваемости гемофилией детей различных регионов Российской Федерации с 1991 по 1994 г // Гематология и трансфузиология – 1999. – №2. – С. 7–10.

165. Шакиров Д.Ф. Состояние энергетического метаболизма, свободнорадикального микросомального окисления и обмена электролитов у работников нефтеперерабатывающей промышленности // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – №5. – С. 41–44.

166. Шахматов И.И., Бондаренко Н.А. Отбор информативных методов оценки гемостаза при остром эмоциональном и физическом стрессе // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №9. – С. 24.

167. Шевченко О.П. Фибриноген: биологическая роль и клиническое значение // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997 – №5. – С.24–25.
168. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз: Монографія – СПб.: Вид-во СПб ГМУ. – 2000. – 227 с.
169. Шиффман Ф. Д. Патофизиология крови: Монографія/Пер. з англ. під ред. Ю.В. Наточина, Є.Б. Жибурга, Ю.М. Токарева. – М. – СПб.: „Издательство BINOM” – Невский диалект. – 2000. – 250 с.
170. Шишко Г.А., Качан С.Э., Качан Г.Л. и др. Клинические проявления гемофилии А в периоде новорожденности (Случай из практики) // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: Сборник научных трудов к 70-летию НИИ гематологии и переливания крови Минздрава Республики Беларусь в 2-х томах: Матеріали V з'їзду гематологів і трансфузіологів Республіки Беларусь – Мінськ: Стринко, 2003. – Т.1.. – С. 160–162.
171. Эмануэль В.Л., Эмануэль Ю.В., Генкин А.А., Карпищенко А.И.. Информативность лабораторных технологий с позиций доказательной медицины // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002 – №9. – С. 8.
172. Яворський О.Г., Бевз О.В., Лаповець Л.Є., Темчук В.М. Типи адаптаційних реакцій у здорових та хворих на стабільну стенокардію у випадку фізичного навантаження різної інтенсивності // Лабораторна діагностика. – 2001. – № 2. – С. 25–26.
173. Ястржембська М. Два обличчя фактора фон Виллебранда: роль у гемостазі і тромбозі // Лабораторна діагностика. – 2002. – №2. – С. 10–14.
174. Ahmad S.S., London F.S., Walsh P.N. The assembly of the factor X-activating complex on activated human platelets // J. of Thromb. & Haemost. – 2003. – Vol. 1, № 2. – P. 48–59.
175. Aleman G., Tovar A. R., Torres N. Metabolismo de la homocisteina y riesgo de enfermedades cardiovasculares: Importancia del estado nutricional en ácido fólico, vitaminas B6 y B12. // Rev. invest. clin. – 2001. – № 2. – P. 141–151.
176. Alvagor Mtat, Lavid-Levy Ofri. Effects of blood-collection systems and tubes on hematologic, chemical, and coagulation tests and on plasma hemoglobin // Clin. Chem. – 2001. – № 4. – P. 794–795.

177. Bartels P.C.M., Sc1worl M., Van Bodegraven A.A. Reduction of preanalytical errors due in vitro activation of coagulation. // Clin. Lab. – 2001. – № 2. – P. 449–452.
178. Bishop M.L., Duben–Engelkirk .L., Fody E.P. Clinical chemistry: principles, procedures, correlations: Навч. посіб. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. – 2000. – 682 p.
179. Burke C.D., Miller L., Handler S.D., Coven A.R. Preoperative history and coagulation screening in children undergoing tonsillectomy // Pediatrics.–1992.– Vol.89, №4. – P. 691–695.
180. Colman R.W. Disorders of thrombin formation: Монографія. – New York: Churchill Livingstone, 1983. – 161 p.
181. Davis T.M.E., Gull C. A., Holtan R. R. Relationship between ethnicity and glycemic control, lipid profiles, and blood pressure during the first 9 years of type 2 diabetes. U.K. prospective diabetes study (UKPDS 55) // Diabetes Care. – 2001. – № 7. – P. 1167–1174.
182. Diagnosis of Thrombotic Disorders. A Laboratory Manual: Навч. посіб. / U. Seligsohn, R.M. Bertina, A. Zivelin et al. – International Society on Thrombosis and Haemjstasis & Christian Medical College, Vellore, India, 2002. – 114 p.
183. Edelberg J.M., Christie P.D., Rosenberg R.D. Regulation of vascular bed–specific prothrombotic potential // Circ. Res. – 2001. – № 2. – P. 117–124.
184. Federici A.B. Diagnosis of von Willebrand disease // Haemophilia – 1998. – Vol. 4, №4. – P. 654–660.
185. Fichbach F.T. A manual of laboratory and diagnostic tests: Навч. посіб.: – Philadelphia: J.B. Lippincout Companu, 1992. – 1019 p.
186. Folsot A. R. Fibrinolytic factors and atherothrombotic events: Epidemiological evidence // Pap. Arterial Thrombosis From Mechanisms to Treatment. Матеріали The 13th Paavo Nurmi Symposium (1–3 Sept 2000 y). – Helsinki – Ann. Med. – № 9 – P. 85–91.
187. Furie B. The molecular basic of blood coagulation // Cell. – 1998. – Vol. 53, №4. – P. 505–515.
188. Greaves M., Chee Y–L. Role of coagulation testing in predicting bleeding

- risk // The hematology Journal. – 2003 – V. 4, Issue 6. – P. 373–378.
189. Heemskerk J.W.M., Bevers E.M., Lindhout T. Platelet activation end blood coagulation // *Thromb. & Haemost.* – 2002. – Vol. 88. – P.186–193.
190. Heine H. Neurogene Entzündung als Basis chronischer Schmerzen – Beziehungen zur Antihomotoxischen Therapie // *Biol. Med.* 1997. – №6 – S. 246–250.
191. Hoffman M, Monroe D.M. A cell-based model of hemostasis // *Thromb. & Haemost.* – 2001. – Vol. 85. – P. 958–965.
192. Hoffman M, Roberts H.R., Monroe D.M. Cellular interactions in hemostasis // *Haemostasis.* – 1996. – Vol. 26. – P.12–16.
193. Hoyer L.M. Medical progress: Hemofilia A // *The New England Journal of Medicine.* – 1994. – V. 330, № 1. – P. 38–47.
194. Ingerslev J., Kristensen H.L. Clinical picture and treatment strategies in factor VII deficiency // *Haemophilia.* – 1998. – Vol. 4, №4. – P. 689–696.
195. Ju Hong-Bo, Luo Zhi-Cheng, Yang Ji-Qing, Qu Xue-Min, Wang Si-Gang, Ma Hong-Yan, Yao Bao-Ymg. Disi junyi daxue xuebao // *J. Forth Milit. Med. Univ.*–2001. – № 5. – P. 471–473.
196. Khalid F., Toumi NH, Bouguerra F. et al. Genetic study of congenital afibrinogenemia: review of 12 cases // *Ann. Pediatr.* – 1999. – №38. – P. 461–467.
197. Kolde H. Haemostasis: Монографія – Basel: Pentapharm Ltd, 2001. – 243 p.
198. Leeners J.V., Mossakowski J., Kayser S. Case report of congenital afibrinogenemia // *Klin. Pediatr.* – 1995. – №207. – P. 34–35.
199. Leray C., Wiesel M.–L., Freund M., Cazenave J.–P., Gachet C. Long-chain n=3 fatty acids specifically affect rat coagulation factors dependent on vitamin K. Relation to peroxidative stress. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vasc. Biol.* – 2001. – № 3. – P. 459–465.
200. Ljung R., Petrini P., Nilsson I. Diagnostic symptoms of severe and moderate hemophilia A and B – a survey of 140 cases // *Acta Paediatr. Scand.* – 1990. – №79. – P. 196–200.
201. Lusher J.M., Obstet A. J. Screening and diagnosis of coagulation disorders // *Gynecol.* – 1996. – Vol. 175, №3. – P. 778–783.
202. Parkin J.D., Smith J.L., O'Neill A.J. et al. Mill bleedind disorders. A clinical

- and laboratory study // *Medical Journal of Australia*. – 1992. – № 4. – P. 614–617.
203. Philippou H, Adami, A, Amersey R.A. et al. A novel specific immunoassay for plasma two-chain factor VIIa: investigation of FVIIa levels in normal individuals and in patients with acute coronary syndromes // *Blood*. – 1997. – Vol.89. – P. 767–771.
204. Pijoan Zubizarreta Jose I., Irigoten Garbisu Itziar, Aguirre Errasti Ciriaco. In-tervalos de referencia poblacional y determinantes de la homocisteina // *Med. clin.* – 2001. – № 13. – C. 487–491.
205. Prevention of venous thromboembolism: Монографія / Bergquist D., Comerota A.I., Nicolaides A.N., Scurr J.H. – Nicosia: Med-Orion, 1994. – 462 p.
206. Roberts H.R., Monroe D.M., Oliver J.A., Chang J.Y., Hoffman M. New concepts of blood coagulation // *Haemophilia*. – 1998. – Vol. 4 – P. 331–334.
207. Rodak B.F. Diagnostic hematology: Монографія – Philadelphia: Saunders, 1995.–720p.
208. Sadler J.E. A revised classification of vonWillebrand disease // *Thromb. Haemost.* – 1994. – №71. – P. 520–525.
209. Schütte W., Schädlich S., Blankenburg T. Thrombinaktivierung bei Asthma bronchiale // *Atemwegs und Lungenkrankh.* – 2001. – №1. – S. 587–592.
210. Sutterlin R., Bathels D. Recommendations for initial diagnosis and therapy in acute blood coagulation disorders // *Anesthesiol. Reanim.*–1996.–Vol.21,№3.– P.76–80
211. US Dept. of Health and Human Services. Medicare, Medicaid and CLIA Programmes: Regulations Implementing the Clinical Laboratory Improvements Amendments of 1988 (CLIA). Final Rule // *Fed. Regist.* – 1992. – № 57. – P. 7002–7168.
212. Yamaroto J., Taka T., Ijiri Y., Hashimoto M., Kitaturoi K, Yatake K, Yamashita M., Sasaki Y., Oiwa K, Seki J.. Antithrombotic effect of tomato // *The Japanese-European Kobe Symposium on Thrombosis: Materials The Japanese-European Kobe Symposium on Thrombosis (6–7 Nov 2000 y).* – Kobe. – Platelets. – 2001. – №3. – C. 185.

