

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ КОНЕЧНОГО ЭТАПА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

В. Г. Стуров^{1,2}, С. Я. Анмут¹, Г.Н. Шорина², В.А. Плюшкин¹

ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, Медицинский консультативный центр НГМУ, г. Новосибирск

Свертывание крови - многоступенчатый, поликомпонентный процесс, в котором принимают участие ряд сериновых протеаз, а также неферментные белки - акцелераторы, обеспечивающие взаимодействие факторов свертывания на матрице фосфолипидных мембран [2,23].

Завершающий, конечный этап свертывания крови характеризуется, как известно, трансформацией растворенного в плазме фибриногена в волокна фибрина, которые образуют основной каркас сгустка крови [15]. Фибриноген (фактор I), как основной участник этих превращений, представляет собой, глобулярный гликопротеид с молекулярной массой около 340000 Д, состоящим из 2946 последовательных аминокислот. Этот димер, состоящий из фибринопептидов А и В, в каждой единице содержит три полипептидные цепи, соединенные дисульфидными мостиками (три пептидными цепями). В свою очередь каждая из цепей состоит из 450 аминокислотных последовательностей. При этом в условиях функциональной полноценности фибриногена огромное значение имеют начальная и конечная последовательности аминокислот в этих цепях. У нормального фибриногена они представлены аланином, аспарагином и треонином. Кроме того, около 6% молекулярной массы представлено углеводной частью в виде гексоз, глюкозаминов, сиаловых кислот [4, 9].

В настоящее время появились данные о конформации молекулы фибриногена и ее аминокислотной последовательности [9,13,22]. Структура фибрина, в котором пептиды А и В отсутствуют, обозначаются как "дез-ААВВ-фибрин". В молекуле имеется 29 дисульфидных связей, три из которых соединяют его субъединицы. В молекуле фибриногена, длиной около 45 нм, различают три домена: один центральный, с молекулярной массой 60000 Д, и два периферических домена, с молекулярной массой 95000 Д каждый. Обе субъединицы фибриногена имеют половину центрального домена и один периферический домен. Домены молекулы фибриногена характеризуют не только структуру белка, но и его функциональные свойства. Так, в центральном и периферических доменах имеются центры, ответственные за стыковку мономеров фибрина (МФ) и образование фибрин-полимера [28].

Фактор I в том виде, в каком он вырабатывается паренхиматозными клетками печени и поступает в кровь, называется фибриногеном А. В отличие от фибриногена В, он не осаждается из плазмы витамином К (производным β -нафтохинона) [9,11].

Фибриноген под влиянием тромбина превращается в фибрин в ходе протеолитического дробления его молекулы. Многочисленными исследованиями [4,10,21,25] определено, что вначале тромбин отщепляет от молекулы фибриногена 2 пептида А, образуя дез-А-мономеры фибрина (неполноценные мономеры фибрина). Затем отщепляются 2 пептида В и возникают дез-АВ-мономеры, или полные мономеры фибрина.

Фибринопептиды А иногда появляются в циркулирующей крови, что свидетельствует либо о ранних этапах развития ДВС-синдрома, либо о латентно протекающем внутрисосудистом свертывании крови. Оставшаяся молекула фибриногена представляет собой фибрин-мономер (ФМ). Последний приобретает способность соединяться с себе подобными и образовывать фибрин-полимер, который представляет гель (или сгусток). Сборка ФМ проходит этапы формирования димеров, из которых при продольном и поперечном сшивании образуются полимеры фибрина — протофибриллы, а затем нити фибрина как это показано на рис. 1.

Тромб из такого (“недополимеризованного”) фибрина легко растворяется плазмином и потому не может обеспечить полноценный гемостаз. Это нередко бывает причиной кровоточивости и плохого заживления ран. Подобный фибрин называется растворимым (фибрин S, soluble). Полноценным, то есть устойчивым к фибринолизину, он может стать лишь под действием фибриназы (фактора XIIIa). Образовавшийся после этого воздействия фибрин называется нерастворимым фибрином (фибрин I, insoluble) [4,8].

Кроме широко известных функций фибриногена в процессе коагуляционного каскада остановки кровотечений, немаловажное значение приобретает фактор I в процессах активации тромбоцитарного потенциала в частности и, в целом, активации клеточной популяции, содержащей тканевой фактор (ТФ-клетки) [24]. Среди последних наиболее коагулологически важными являются тромбоциты, макрофаги и фибробласты.

Конечный этап свертывания крови условно принято подразделять на 3 этапа [3,15,26]:

Этап 1 (ферментативный).

На данном этапе тромбин последовательно отщепляет от молекулы фибриногена сначала два фибринопептида А, затем - два фибринопептида В, в результате чего образуются полные (дез-ААВВ) мономеры фибрина с четырьмя свободными связями,

способные кратно наращивать свою массу при взаимодействии с другими мономерами фибрина или с фибриногеном [9,28].

Обе формы мономерного фибрина (дез-АА- и дез-ААВВ-) можно обозначать как полный и неполный фибрин-мономеры.

Этап 2 (неферментативный).

На этом этапе трансформации фибриногена в фибрин вначале мономеры фибрина образуют остающиеся в растворенном состоянии комплексы (олигомеры фибрина), состоящие из 2-10 и более мономеров фибрина и обозначаемые как низко-, средне- и высокомолекулярные растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК).

Методами электронной микроскопии, светорассеивания и другими показано, что самосборка фибрин-мономеров в чистой системе и в плазме крови состоит из двух фаз [12,20]. В первой фазе формируются промежуточные олигомеры - нити толщиной в 2 молекулы, получившие название протофибрилл. В результате чего образуются волокна фибрина с упорядоченной структурой и характерной поперечной исчерченностью [25]. Этот фибрин уже становится растворим в 5-7 М мочеvine или 2% уксусной кислоте - растворимый фибрин S (solubile).

Этап 3 (стабилизация фибрина).

На третьем этапе под влиянием фактора XIII и плазменной транслугтаминазы, которые также активируются тромбином в присутствии ионов кальция, в фибрине происходит образование дополнительных дисульфидных связей как между α , так и между β - цепями, что делает его более эластичным и нерастворимым в мочеvine - фибрин I (insolubile) [28].

Такой стабилизированный фибрин менее подвержен лизису плазмином/плазминогеном

Человеческий фибриноген – один из наиболее гетерогенных белков плазмы, структурные компоненты которого могут модифицироваться и после биосинтеза. Эти модификации могут комбинироваться различными способами, как полагают, у каждого человека. В основном они могут быть результатом трех причин: альтернативного процессинга во время биосинтеза, поттрансляционной модификации аминокислотных остатком и протеолитической деградации [19,34].

Среди нарушений конечного этапа свертывания наиболее частыми и клинически значимыми являются весьма разнообразные и многочисленные структурные и функциональные аномалии фибриногена. Все варианты фибриногена, имеющего аномальную стурктуру объединяются в группу “дисфибриногенов” (dysfibrinogens), а

состояния, связанные с клиническими проявлениями дисфункциональных реакции указанных белков – дисфибриногемиями (ДФГ) [29,31].

До недавнего времени в отечественных клиниках специфическая диагностика и адекватная коррекция нарушений конечного этапа свертывания крови у больных практически не проводилась, либо была односторонней, без учета характера нарушений в этой системе. Между тем, ряд нарушений фибринообразования нередко требуют хирургической коррекции, а недоучет геморрагического или тромботического анамнеза и несвоевременное распознавание сдвигов в процессах гемокоагуляции могут служить причиной весьма серьезных осложнений, особенно при наличии потенциально тромбогенных ситуаций (оперативные вмешательства, травмы, беременность, роды).

В виду сложности выявления и идентификации врожденных структурно-функциональных аномалий фибриногена на этапе первичной диагностики коагуляционных дисфункций, наиболее рациональным следует считать распределение всех достоверных критериев диагноза «дисфибриногемия» по следующим основным классификационным признакам:

А. Клинические признаки

1. Микроциркуляторный или пятыхиально-пятнистый тип кровоточивости;
2. Либо хронические ишемические или тромботические эпизоды;
3. Частое сочетание с системной мезенхимальной дисплазией (СМД/ГМД);
4. Упорные геморрагии, несмотря на проводимую терапию;
5. Отягощенный семейный анамнез;
6. Субклинические проявления геморрагических симптомов или асимптомное течение.

В. Лабораторные критерии

1. Нормальная концентрация фибриногена в плазме (2,0 - 3,9 г/л по Clauss); редко – гипо (а) фибриногенемия;
2. Часто – гипоагрегация тромбоцитов на фибриноген, коллаген, арахидонат;
3. Нормальные показатели активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), концентрации РФМК, Д-димеров, активности антикоагулянтов;
4. Удлинение конечного этапа свертывания: пролонгирование тромбинового времени (ТВ) – <i>ведущий признак при скрининг – диагностике;</i>
5. Удлинение Эхитоксового (яд эфы многочешуйчатой) и/или Анцистродонового (Рептилазного) (яд щитомордника обыкновенного) времени свертывания крови;
6. Пролонгирование скорости Ауто- (реже Гетеро-) полимеризации мономеров фибрина;
7. Угнетение XIIIa-зависимого фибринолиза по лизису эуглобулинового сгустка;
8. Дефицит фибринопептидов А и фрагментов протромбина (FP1, FP2).

С. Молекулярно - генетические маркеры

1. Структурные аномалии фибриногена при электрофоретическом сканировании и изофокусировании, эмиссионной фотометрии, электронной микроскопии [12,25];
2. Отсутствие и/или аномалия функциональных сайтов, дисбаланс аминокислот при секвенировании и амплификации материнской ДНК – <i>окончательная молекулярно-генетическая верификация;</i>
3. Рентгеновская кристаллография фибриногена и фибрина (“Knob-hole interactions”), функциональная неполноценность доменов связывания [27,28].

Поскольку многие из представленных лабораторных и молекулярных критериев ДФГ в отечественных клиниках сложно выделить, более предпочтительны, на наш взгляд, следующие лабораторные пробы с использованием коагулологических тестов, доступных в широкой клинической сети на территории Российской Федерации (табл. 2-3) [2].

Таблица 2

Набор лабораторных тестов для выявления гипо-(а)-фибриногенемии

<i>Коагулологические тесты</i>	<i>Изменения</i>
Время кровотечения по Дюке	Чаще удлинено или нормальное
Время свертывания по Ли-Уайту	Чаще удлинено
АПТВ	Глубокая гипокоагуляция
ПВ	Значительно удлинено
ТВ	Значительно удлинено (не определяется)
Количество тромбоцитов	Норма
Эхитоксовое время	Нормальное или удлинённое
Концентрация фибриногена	Снижена
Анцистроновое время	Резко удлинённое

Таблица 3

Набор лабораторных тестов для выявления дисфибриногенемии

<i>Скрининговая диагностика</i>	
Время кровотечения	Как правило нормальное
Время свертывания по Ли-Уайту	Чаще нормальное
АПТВ	Нормальное или удлинённое
ПВ	Нормальное или удлинённое
ТВ	Чаще удлинено
Количество тромбоцитов	Норма
Эхитоксовое время	Нормальное или удлинённое

Концентрация фибриногена	Норма или снижена
Анцистродоновое время	Чаще удлиненное
<i>Уточняющие тесты для диагностики ДФГ</i>	
Ауто-гетерополимеризация ФМ	Чаще замедление Ауто-ПФМ, реже Ауто- и Гетеро-ПФМ, изолированная пролонгация Гетеро-ПФМ (при действии ингибиторов полимеризации)
Эуглобулиновый лизис сгустка фибрина	Признаки активации Хагеман-зависимого фибринолиза (↑ чувствительности к плазмину), при тромботических формах – угнетение фибринолиза (избыток PAI-1, истощение плазмينا, дефицит t-PA).
Активность плазминогена	Чаще нормальная (снижение при тромбофилиях в условиях хронического ДВС-синдрома)
Соотношение антиген фибриногена/количество фибриногена > 1.0	
Дефицит фибринопептидов А и фрагментов протромбина (FP1, FP2);	
<i>Окончательная молекулярно - генетическая верификация</i>	
Молекулярные аномалии фибриногена при электрофорезе в геле полиакриламида, при изофокусировании, эмиссионной фотометрии или электронной микроскопии	
Отсутствие и/или аномалия функциональных сайтов, дисбаланс аминокислот при секвенировании и амплификации материнской ДНК (выявление характера мутаций в цепи нуклеотидов, определяющих структуру α-, β- и γ- цепей фибриногена.	
Рентгеновская кристаллография фибриногена и фибрина (“Knob-hole interactions”), функциональная неполноценность доменов связывания.	

В большинстве случаев диагностический поиск при ДФГ ограничивается использованием скрининговых тестов оценки эффективности фибриногенеза. Однако в ряде случаев также необходимо выполнять ряд биохимических и молекулярно-генетических анализов, позволяющих оценить эффективность генерации фибрина. К

сожалению, для отечественных клиник они мало доступны по экономическим соображениям. Тем не менее, проводимые в ряде НИИ фундаментальных исследований реакций полимеризации фибрина, консолидации фибринового сгустка, реакций “ $\text{A}\alpha$ -Кноб - $\text{B}\beta$ -hole interactions”, характеризующих эффективность конечного этапа свертывания крови, позволят определить новые, ранее неизвестные механизмы нарушений данного процесса [14,30].

Значительно реже встречаются тромбогенные варианты ДФГ. В этих случаях лабораторная ситуация противоположна вышеописанной. Среди тестов коагулограммы имеется резкое укорочение показателя ПТВ и соответственно, якобы беспричинное, повышение в плазме уровня РФМК (на основании ОФТ-теста). Этот факт должен настораживать всегда, особенно у лиц молодого возраста. Основопологающим в этих случаях является выполнение тромбинового и анцистродонового времени свертывания. Чаще всего в этих тестах определяется гиперкоагуляция. Чтобы избежать ошибки, повторное исследование следует провести с тромбином, разбавленным в 5 раз или “тромбиновой” сывороткой. Ввиду крайне высокой чувствительности к тромбину аномального фибриногена, время образования сгустка фибрина в плазме больного все равно будет значительно укорочено, в сравнении с контролем [18,32,33].

подавляющее большинство ДФГ при исследовании тромбинового теста характеризуются различной мерой выраженности удлинением времени образования сгустка. Они же, как правило, сопровождаются геморрагическими проявлениями. Кровоточивостью, иногда проффузной, чаще всего сопровождаются те типы ДФГ, которые сочетаются с гипофибриногенемией.

Существенную проблему для диагностики ДФГ создают тромбогеморрагические варианты патологии, при которых показатели гемостазиологического каскада могут быть разнонаправленными и нередко не соответствующими клиническим проявлениям. В целом ускорение АПТВ на фоне гипокоагуляции в тестах ТВ и ПТВ, высокий уровень тромбинемии (увеличение количества РФМК в плазме) при тенденции к угнетению XIIa -зависимого фибринолиза и снижению активности плазминогена должны наводить на мысль о сочетанном варианте ДФГ. В этом случае точная верификация диагноза становится возможной после проведения молекулярно-генетического исследования молекулы фибриногена в специализированном центре.

Как показал клинический опыт, многие ДФГ с геморрагическим компонентом годами расцениваются как различного рода тромбоцитопатии. Вплоть до настоящего времени источником, пополняющим когорту ДФГ, являются неправильно диагностированные в свое время тромбоцитарные дисфункции. Поэтому ДФГ и тромбоцитопатии необходимо в первую очередь и обязательно дифференцировать между собой.

Вторая диагностическая ошибка сводится к тому, что ДФГ с полной несвертываемостью плазмы принимают за афибриногению. Поэтому в подобных случаях обязательно необходимо проверять плазму на наличие в последней фибриногена другими, неферментативными методиками, такими как: осаждение этанолом, хлористым аммонием, термокоагуляцией, с помощью гетерогенных коагулаз змеиных ядов.

Наиболее трудно дифференцировать ДФГ с состояниями, при которых в крови существенно повышено количество различных (физиологических и патологических) антикоагулянтов. Блокируя действие естественным путем образовавшегося тромбина, они имитируют состояние дисфибриногемии. Однако скрупулезный и вдумчивый анализ коагулограммы позволит доказать, что плазма, содержащая антикоагулянты, способна тормозить образование сгустка при добавлении ее к плазме донора, что неспособна делать плазма больного с наличием в ней аномального фибриногена, позволяет правильно определиться с диагнозом.

Необходимо иметь в виду и возможность наличия у больного симптоматической (приобретенной) ДФГ, которая всегда обусловлена тяжелой патологией печени (агрессивные хронические, в т.ч. аутоиммунные гепатиты, циррозы, опухолевый процесс), трансплантацией костного мозга, приемом цитостатиков (антрациклины и L-аспарагиназа) [32].

В подобных случаях кроме ДФГ отмечается гетерогенизация альбуминов (появление его нескольких фракций при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле или на ацетатцеллюлозе), а также эмбрионального белка α -фетопротейна. Приобретенные геморрагические ДФГ обусловлены нарушением соотношения в молекуле фибриногена сиаловых кислот и гексозамина [35].

Кроме того, возможны случаи развития фетальной дисфибриногемии, связанной с биохимической незрелостью печеночных ферментов, особенно у новорожденных,

рожденных с признаками ЗВУР, внутриутробной гипоксии, тяжелой фето-плацентарной недостаточности [16].

Сопоставив данные лабораторной палитры нарушений конечного этапа генерации фибрина, был разработан алгоритм клинико-лабораторной диагностики, который базируется на последовательном выполнении ряда диагностических этапов.

I ЭТАП: Лабораторный скрининг

АПТВ – удлинение → коагулопатии (гемофилия, болезнь Виллебранда, сочетанная коагулопатия), АФС-синдром → определение активности фактора Виллебранда, факторов VIII, IX, XI, наличие волчаночного антикоагулянта.

Нормокоагуляция – ДФГ, диспротромбинемия. Нарушения фибринолитической активности плазмы.

Гиперкоагуляция → тромбофилия → активность АТ-III, протеинов С и S, плазминогена.

ПТВ – гипокоагуляция → гипо (дис) протромбинемия, дефицит факторов II, V, VII, IX, TF, печеночная дисфункция → оценка активности указанных факторов, ядовитые тесты (Эхитокс): удлинение *Echitox time* → диспротромбинемия, ДФГ → подтверждение ДФГ иными тестами.

Гиперкоагуляция – склонность к тромбообразованию, АФС с тромбогенным компонентом.

Нормокоагуляция – углубленное исследование на II этапе диагностики.

ТВ - гипокоагуляция → ДФГ, нарушение ПФМ, гипофибриногенемия гипокоагуляция → гиперфибриногенемия, угнетение фибринолиза, избыток циркулирующего тромбина → уровень фибриногена, ПДФ/ПДФг, эуглобулиновый лизис.

Нормокоагуляция – углубленное исследование на II этапе диагностики.

Концентрация фибриногена: *Нормальное* → печеночная генерация гликопротеида не страдает.

Пониженное → ТВ + ядовитые тесты (*Agkistrodon time*) → ДФГ, гипо (а) фибриногенемия.

Повышенное → воспалительный процесс, подострый ДВС синдром (фаза гиперкоагуляции), угнетение фибринолиза

Агрегационная активность тромбоцитов:

- **Спонтанная агрегация (агрескрин - интегральный индуктор)** – внутрисосудистая активация, сенсбилизация мембраны TP.
- **АДФ** – $P2X_{ADP}$ и $P2Y_{ADP}$, GP IIb – рецепторы, мембранная активация.
- **Адреналин** – рецепторы мембраны GP IIb/IIIa, мембранная активация.
- **Тромбин, арахидоновая кислота** – внутриклеточная активация, эффективность и скорость синтеза тромбоксана A_2 , метаболизм арахидоната, реакция секреции содержимого гранул.
- **Коллаген** – преэндотелиальная, пристеночная (контактная активация), гес. GP VI.
- **Нативный фибрин (фибриноген)** – образование межтромбоцитарных фибриногеновых мостиков, контактная активация с эндотелиальным фибрином и мембранными рецепторами GP Ib.
- **Ристомицин / ристоцетин** – адгезия тромбоцитов к субэндотелию при наличии достаточного количества и активности фактора Виллебранда, активация рецепторов GP Ia/Ib, косвенная оценка скорости секреции vWF из α -гранул тромбоцитов.

II ЭТАП: Углубленная оценка эффективности конечного этапа свертывания

Тесты с ядовыми гетерогенными коагулазами:

- **Лебетоксовый тест** (с ядом *Vipera lebetina turanica*) - активность факторов V, X, наличие АФС синдрома, чувствителен к антифосфолипидным антителам (ВА).
- **Эхитоксовый тест** (с ядом *Echis multiscquamosus*) – активность факторов II, I → гипо (дис) протромбинемия, ДФГ с нарушением чувствительности аномального фибриногена к тромбину, отщепления ФП-В от β -цепей фибриногена.
- **Анцистродоновый тест** (с герпетоксином *Agkistrodon halys halys*) – активность фибриногена → ДФГ с нарушением отщепления фибринопептидов А от α -цепей (**ведущий скрининговый тест**)[6].

Оценка скорости ПФМ:

Ауто - ПФМ – ДФГ с нарушением ПФМ, отсутствие в плазме ингибиторов полимеризации (РФМК, Д-димеров), нарушение чувствительности фибриногена к тромбину дефект в функциональных сайтах молекулы фактора I.

Гетеро-ПФМ – наличие ингибитора ПФМ (аномальный фибриноген, физиологические ингибиторы ПФМ), наличие в кровотоке свободного тромбина, избытка РФМК, Д-димеров и Д-фрагментов, наличие совокупной тромбинемии.

Сочетанное нарушение Ауто- и Гетеро-ПФМ:

- ДФГ с нарушением отщепления обоих фибринопептидов
- Блокада центров связывания с тромбоном,
- Дефект SH₂ - (сульфидных) связей в цепях фибриногена,
- Дефект в доменах связывания Д и Е,
- Сочетанные ДФГ,
- ДФГ с нарушением реакций “Aα-Knob – Bβ-hole interactions”.

Активность фибринолиза:

- *XIIIa-зависимый*, опосредованный через фактор Хагемана и компоненты калликреин-кининовой системы (ВМК, ПК).
- *Хагеман-независимый* – t-РА, реакция трансформации пламиноген→плазмин, активация тканевой u-РА (урокиназы).

Угнетение→истощение фактора XIIIa, ДФГ с нарушением чувствительности к плазмину тромбогенные варианты ДФГ, снижение скорости лизиса сгустка эуглобулинов→тромботические осложнения.

Активация (усиление фибринолитического потенциала плазмы) →ДФГ с усилением чувствительности и аффинности аномального фибрина/фибриногена к плазмину и t-РА (u-РА), избыток PAI-1, 2 и протеазы NEXIN→быстрый лизис эуглобулинов, нарушение эффективной генерации фибрина→геморрагические проявления.

Активность фактора XIIIa (плазменной трансглутаминазы), лизис фибринового сгустка в 5M мочеvine или 5% p-ре уксусной кислоты.

- Врожденный дефицит – болезнь Локки - Лорана
- Вторичная недостаточность (нарушение стабильности и консолидации сгустка фибрина), дефект взаимодействия с фибрином при наличии ДФГ.

III ЭТАП: Детализированная (уточняющая) биохимическая верификация

1. Оценка уровня фибринопептидов (FP-A, FP-B), фрагментов протромбина FP1 и FP2.
2. Концентрация фибронектина в плазме.
3. Оценка скорости лизиса фибрина в уксусной кислоте, в растворе 5М мочевины и/или в ядовитых герпетоксинах.
4. Уровень продуктов деградации фибрина /фибриногена (РФМК, D-димеры, D-, E-фрагменты и др.).
5. Оценка фибринолиза: активность плазминогена, эуглобулиновый лизис сгустка, концентрация PAI-1, фактора XIIIa.

IV ЭТАП: Окончательная молекулярно-генетическая верификация

1. Выявление структурных аномалий фибриногена при электрофоретическом сканировании в геле ПАГ и реакциях изофокусирования.
2. Отсутствие или аномалия функциональных центров связывания с ТФ-клетками (тромбоцитами, эритроцитами, моноцитами, макрофагами, эндотелиоцитами, фибробластами) и различными коагулологическими компонентами (тромбином, фактором XIII, плазмином, коллагеном фибронектином, тромбоспондином, гепарином, ионами Ca^{2+} , Zn^{2+} и др.).
3. Молекулярно-генетический анализ аминокислотной структуры цепей при исследовании нуклеотидной последовательности с помощью методов ПЦР-анализа.
4. Оценка реакций “A α -Knob – B β -hole interactions” с помощью методов рентгеновской кристаллографии фибрина и/или фибриногена.
5. Выявление характера функциональной неполноценности доменом связывания.

Резюмируя изложенную в данном разделе информацию, можно заключить, что дифференциальный диагноз и верификация нарушений на уровне конечного этапа свертывания достаточно сложна и многообразна. Большинство исследований являются высокотехнологичными и доступными лишь для научно-исследовательских лабораторий крупных НИИ. Вместе с тем I и II этапы скрининговой диагностики при достаточной осведомленности клиницистов и врачей-лаборантов в данной области, вполне реальны и для большинства городских ЛПУ и широкой клинической базы и позволят проводить адекватную клиничко-лабораторную диагностику нарушений гемостаза.

Литература

1. Алексеенко И. Дисфибриногенемии // Медицинская газета. – 1996. - № 27. – С. 23-24.
2. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы лабораторной диагностики нарушений гемостаза // Метод. рекоменд. – Москва, НьюДиамед, 1999. – 127 с.
3. Батрак Т.А. Участие нарушений полимеризации мономеров фибрина в генезе различных видов кровоточивости: Автореф. дисс...канд. мед. наук. - Барнаул, 1999, 27 с.
4. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: "Фен", 2000. – 364 с.
5. Папаян Л.П. Новые представления процесса свертывания крови // Трансфузиология, № 1. – т. 5. – 2004. – С 7-22.
6. Цывкина Л.П. Клинико-диагностическое значение герпетоксинов в распознавании основных видов патологии системы гемостаза: Автореф. дисс...д-ра мед. наук, Барнаул, 1997.
7. Ashby M.A., Lazarchick J. Acquired dysfibrinogenemia secondary to mithramycin toxicity // Am. J. Med. Sci. - 1986 Jul. – Vol. 292. – N 1. – P. 53-55.
8. Becker I., Bartl K., Wahlefeld A.W. A functional Photometric Assay for plasma fibrinogen // Throm. Res. - 1984. - Vol. 35, N 5. – P. 475-484.
9. Blomback B. Fibrinogen structure, activation, polymerization and fibrin gel structure // Thromb Res. - 1994. – Vol. 75. – № 3. - P. 327-8.
10. Brass E.P., Forman W.B., Edwards R.V., Lindan O. Fibrin formation: the role of the fibrinogen-fibrin monomer complex // Thromb. Haemost. – 1996. – Vol. 36, N 1. – P. 37-48.
11. Chung D.W., Harris J.E., Davie E.W. In: Liu C.Y., Chien S. Eds. Fibrinogen, thrombosis, coagulation, and fibrinolysis. New York, Plenum Press, 1990, p 39-48.
12. Doolittle R.E. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion // Adv. Protein. Chem., Ed. Anfinsen C.B., Edsall J.T., Richards F.M. - NY & London: Acad. Press. – 1983. – Vol. 27. – P. 1-109.
13. Doolittle R.F. The structure and evolution of vertebrate fibrinogen // Ann. NY Acad. Sci. – 1983. – Vol. 408. – P.13–27.
14. Egeberg O. Inherited fibrinogen abnormality causing thrombophilia // Thromb. Diath. Haemorrh. – 1999. - N 3. – P. 311–319.
15. Fitzgerald L.A., Phillips D.R. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice / Ebs.: R.W. Colman et al. – Philadelphia, 1997. – P. 572-593.

16. Franchini M., Raffaelli R., Musola M., et al. Neonatal dysfibrinogenemias and thromboembolic emergencies // *Ann. Hematol.* – 2006. – Vol.85, N 8. – P. 552-554.
17. Hanss M. M. L. et al A database for human fibrinogen variants // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 936. – P. 89–90.
18. Hanss M.M.L., Ffrench P.O., Mornex J.F., et al. Two novel fibrinogen variants found in patients with pulmonary embolism and their families // *J. Thromb. &Haemost.* – 2003. – Vol. 1. – P. 1251–7.
19. Henschen A., Lottspeich F., Kehl M., et.al. Covalent structure of fibrinogen // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1983, Jun 23. – Vol. 408. – P. 28-43.
20. Kant J.A., Fornace A.J.Jr., Saxe D. Et al. Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1985. – Vol. 82, N8. – P. 2344-2348.
21. Kun-hwa H. Thrombin interaction with fibrin polymerization sites // *Thromb. Res.* – 1997. – Vol. 86, N. 4. - P. 301-315.
22. Lane DA, Henschen A, Jasani MK, et al. *Fibrinogen—Fibrin Formation and Fibrinolysis.* Berlin: Walter, 1999.
23. Mann K.G. Biochemistry and physiology of blood coagulation // *Thromb & Haemost.* – 1999. – Vol. 82. – P. 165–174.
24. Martin D., Boys C., Ruf W. Tissue factor: Molecular recognition and cofactor function // *FASEB J.* – 1995. – Vol. 9. – P. 852 – 859.
25. Matsuda M., Sugo T., Yoshida N., et al. Structure and functions of fibrinogen: insights from Dysfibrinogens // *Thromb.&Haemost.* – 1999. – Vol. 82. – P. 283–90.
26. Matsuda M. Structure and function of fibrinogen inferred from hereditary dysfibrinogens // *Intl. J. Haematol.* – 2000. - Vol.72, N 4. – P. 436-447.
27. McDonagh J. Dysfibrinogenemia and other disorders of fibrinogen structure and function. In: Colman R.W., George J.N. et al.: *Haemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*, 4th ed., Philadelphia, PA: Lappincott, Williams & Wilkins, 2001, pp. 855-852.
28. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin polymerization: Appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly // *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* – 1997. – P. 257–267.
29. Mosesson MW. Dysfibrinogenemia and thrombosis // *Sem. Thromb. Hemost.* – 1999. – Vol.3. – P. 311–9.
30. Neerman-Arbez M. The molecular basis of inherited afibrinogenemia // *Thromb & Haemost.* – 2001. – Vol. 86. – P. 154–163.

31. Roberts H.R., Stinchcombe T.E., Gabriel D.A. The dysfibrinogenemias // Br. J. Haematol. - 2001. – Vol. 114. – P. 249–57.
32. Samama M.M., Heverkate F. Hereditary disfibrinogenemia, afibrinogenemia, hypofibrinogenemia and thrombosis. In: Hypercoagulable States. / Eds.: Segghatchian M.J., Samama M.M., Hecker S.P., CRC Press. Boca Raton. – NY & London & Tokyo. – 1996. – P. 379-384.
33. Siebenlist K.R., Mosesson M.W. Factors affecting g-chain multimer formation in crosslinked fibrin // Biochemistry. – 1992. – N 31. – P. 936–941.
34. Soderquist Th., Blomback B. Fibrinogen structure and evolution // Naturwissenschaften. – 1971. –Vol. 1, N 58. – P. 16-23.
35. Soria L., et al. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis // Blood, Vol. 95 No. 9 (May 1), 2000: pp. 2780-2785
36. Zhang J.-Z., Redman C.M. Role of interchain disulfide bonds on the assembly and secretion of human fibrinogen // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269, N 2. - P. 652-658.