

Способ диагностики тромбофилии вследствие гиперпродукции фактора VIII

А.Н.Мамаев*, Е.В.Петрова*, З.С.Баркаган**

*Лаборатория гемостаза МУЗ ГБ№11, Барнаул **
*Алтайский филиал ГУ Гематологический научный центр РАМН, Барнаул***

В последнее время появилось большое число работ, в которых высокий уровень фактора VIII (FVIII) рассматривается, как фактор риска тромбозов [1-15, 17]. Известно, что диапазон колебаний уровня фактора VIII в нормальной плазме весьма широк и составляет 50-150%. При этом, спонтанная кровоточивость гематомного типа возможна лишь при уровне этого коагуляционного фактора менее 5%.

Кроме коагуляционного способа, для определения уровня FVIII используют иммунологические методики [16]. К недостаткам последних следует отнести высокую трудоемкость и значительные временные затраты при осуществлении, а также необходимость оснащения клинической лаборатории специальным дорогостоящим оборудованием для выполнения иммуноферментного анализа. Кроме того, стоимость ИФА-наборов для определения фактора VIII пока весьма высока. Наличие этих недостатков и особенностей привело к тому, что сегодня день весьма широко применяют коагуляционные способы для определения уровня FVIII.

В данной работе на основе данных определения уровня FVIII у 102-х больных с тромбозами представлена частота тромбофилии вследствие высокого уровня фактора VIII в регионе Западной Сибири РФ, а также представлен лабораторный метод для определения высокого уровня коагуляционного фактора VIII.

Материалы и методы

Уровень фактора VIII определяли представленным ниже методом.

Реактивы и оборудование:

- 1) 3,8% (0,1M) раствор цитрата натрия;
- 2) Трис-HCl буфер, рН 7,4 (производитель "Технология-Стандарт", Россия);
- 3) Тех-АПТВ-Эл-тест, (АПТВ-реагент, готовая к применению смесь элаговой кислоты и фосфолипидов, производитель "Технология-Стандарт", Россия);
- 4) Control Plasma N (лиофильно высушенная контрольная нормальная плазма с известным уровнем фактора VIII, производитель "Dade-Behring", Германия);
- 5) Дефицитная по фактору VIII плазма, лиофильно высушенная, (производитель "Dade-Behring", Германия);

- 6) Хлорид кальция 0,025 М раствор, (производитель "Технология-Стандарт", Россия);
7) Центрифуга ОПН-8, (Россия).

Разведение контрольной плазмы

Подготовка разведений контрольной нормальной плазмы с известным уровнем коагуляционного фактора VIII для построения калибровочного графика представлено в таблице.

Таблица. Схема разведения контрольной плазмы с аттестованным значением фактора VIII для построения калибровочной кривой

Пробирка, №	1	2	3	4	5	6
Буфер, мл	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Контрольная плазма с аттестованным значением активности фактора VIII (100%), мл	0,2	-//-	-//-	-//-	-//-	-//-
Перемешать и перенести в другую пробирку	▼ └─0,5мл┐	▲ ▼ └─0,5мл┐	▲ ▼ └─0,5мл┐	▲ ▼ └─0,5мл┐	▲ ▼ └─0,5мл┐	▲ ▼ └─0,1мл┐
Получаемое разведение	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:500
Уровень фактора VIII, %	100	50	25	12,5	6,25	1

Для каждого разведения калибровочной плазмы определяли время свертывания дважды (см. ход определения), средний результат отмечали на калибровочной кривой. Соединяли нанесенные точки.

Разведение исследуемой плазмы

Для определения уровня фактора VIII исследуемую плазму разводили буфером Трис-НС1 в соотношении 1:5. Определяли уровень фактора VIII по калибровочной кривой. При концентрации фактора VIII более 75%, а также для исключения тромбофилии, обусловленной гиперпродукцией фактора VIII, у больных с тромботическим анамнезом, исследуемую плазму разводили в соотношении 1:10 и 1:20.

Ход определения

1. К 0,1 мл разведенной исследуемой плазмы (или одного из разведений контрольной плазмы при построении калибровочного графика), взятой в пробирку (или кювету коагулометра), добавляли 0,1 мл дефицитной по фактору VIII плазмы и 0,1 мл АПТВ-реагента.

2. Пробирку встряхивали и помещали на водяную баню при температуре +37°C.

3. Через 3 мин к смеси добавляли 0,1 мл рабочего раствора хлорида кальция, имеющего температуру +37°C, и включали секундомер.

4. Отмечали время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки.

Определяли время свёртывания дважды, и учитывали средний результат.

Построение калибровочной кривой

Используя калибровочную кривую, находили активность фактора VIII в исследуемой плазме. Следует помнить, что для определения уровня фактора VIII у больных с гемофилией А и при определении уровня ингибитора к фактору VIII, достаточно использовать разведение исследуемой плазмы 1:5. Однако при концентрации фактора VIII более 75%, а также для исключения тромбофилии, обусловленной гиперпродукцией фактора VIII, необходимо определить время свертывания с разведениями исследуемой плазмы 1:10 (полученный результат следует умножить на 2) и 1:20 (полученный результат следует умножить на 4). Как правило, результаты определения уровня фактора VIII в разных разведениях после умножения совпадают. В случае несовпадения следует учитывать средний результат.

Если в разведении 1:20 выявлен уровень фактора VIII более 75% (до умножения на 4), то в этом случае следует приготовить разведение 1:40. Определить время свёртывания с этим разведением в указанной выше тест-системе. Определить концентрацию фактора свёртывания по калибровочной кривой, а затем полученный результат умножить на 8.

Оценка результатов исследования

В норме уровень фактора VIII находится в диапазоне 50-150%. Содержание фактора VIII в диапазоне 151-175 является пограничным. Определять концентрацию фактора VIII желательно вне острого периода тромбоза, а после выписки из стационара. Желательно выполнять определение дважды, с интервалом не менее 3-х недель. Стабильно высокий результат определения антигемофильного глобулина (превышающий 175%) следует расценивать, как тромбофилию вследствие гиперпродукции фактора VIII. Кроме того, следует определить концентрацию фактора VIII у родственников, поскольку нередко эта тромбофилия имеет наследственность [12].

Обследованные больные и группа контроля

Было обследовано 102 больных (57 мужчин и 45 женщин) с венозными и артериальными тромбозами в возрасте до 46 лет. Из числа обследованных больных, 17 обследовано в возрасте 14-20 лет, 34 больных - в возрасте 21-30 лет, 42 больных - в возрасте 31-40 лет, и у 9 больных тромбоз развился в возрасте 41-45 лет. У 67 больных в анамнезе были тромбозы глубоких и/или поверхностных вен нижних конечностей. У 19 из них возникали тромбоэмболии, а у 5 были рецидивы ТЭЛА. У 16 больных были артериальные тромбозы. Наличие тромбов документировано флебографически и/или при дуплексном сканировании. У двадцати восьми больных этой группы установлены кавальные фильтры модели "РЭП-ТЭЛА" и "Волан". У трёх

больных возникали ретромбозы кавальных фильтров. Повышение СОЭ выше 20 мм в час обнаружено у двадцати трёх больных. Лейкоцитоз при поступлении в стационар выявлен у 32 больных. В анализах крови, кроме умеренной гипергаммаглобулинемии, у пяти больных и гиперхолестеринемии у восьми отклонений не было обнаружено. Обследование больных с тромбозами проводили вне острого периода.

Нормальные параметры системы гемостаза были определены при обследовании 47 здоровых людей (29 мужчин и 18 женщин) в возрасте до 45 лет. У всех лиц контрольной группы выполняли полное исследование свертывающей и фибринолитической систем, а также тромбоцитарного гемостаза (так исключали возможность попадания в контрольную группу лиц с невыявленной патологией этой системы). Полученные нами показатели системы гемостаза у здоровых людей контрольной группы были в пределах физиологической нормы и соответствовали приводимым в литературе данным.

Результаты

Большинство исследователей считают уровень FVIII более 175% фактором риска развития тромбозов. Из числа обследованных больных с тромбозами (n=102) уровень FVIII более 175% был выявлен у 8 больных (7,8%) с тромбозами (см. рисунок).

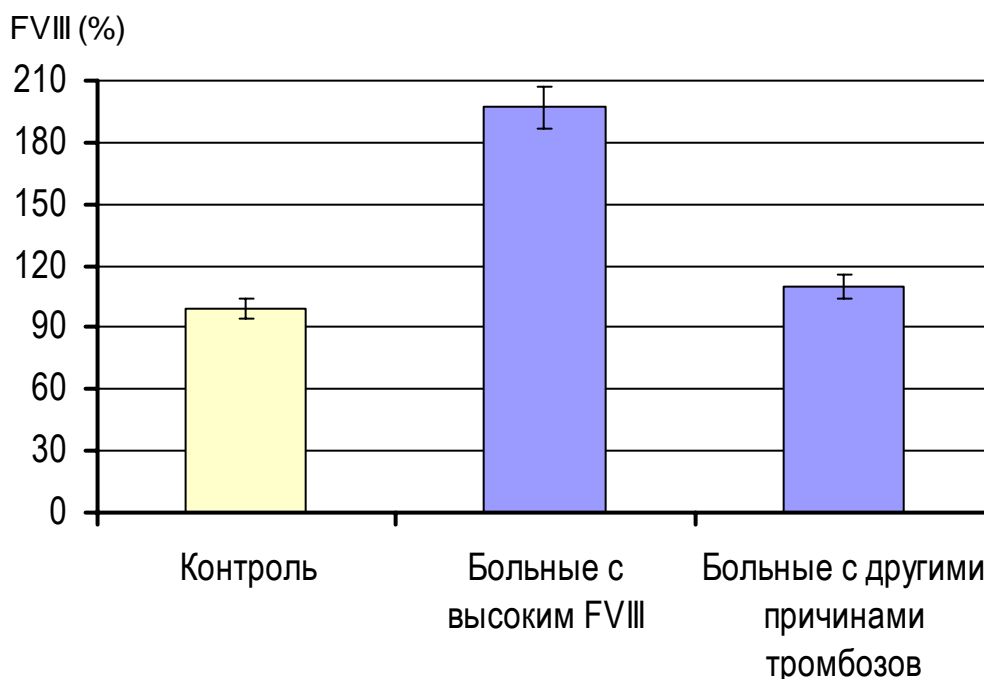


Рис. Средние значения уровня FVIII у больных с тромбофилией, обусловленной высоким содержанием фактора VIII, больных с другими причинами тромбозов и в контроле

Как видно из представленного рисунка, в контрольных исследованиях уровень фактора FVIII был равен $99,8 \pm 3,4$. Средний показатель фактора VIII у больных с повышенной концентрацией этого коагуляционного фактора был $195,1 \pm 8,5\%$ ($P < 0,001$). У больных с тромбозами вследствие других причин уровень фактора VIII был равен $107,3 \pm 4,3\%$ и статистически не отличался от нормативных значений ($P > 0,5$).

Из числа выявленных 8 больных с тромбофилией вследствие гиперпродукции фактора VIII уровень этого прокоагулянта оказался в диапазоне от 175 до 199% у 5-и больных, у 2-х больных уровень FVIII был в диапазоне 200-249. И у одного больного уровень FVIII был равен 250%.

Представленный метод определения фактора VIII высоко специфичен, так как его показания зависят только от концентрации коагуляционного фактора VIII и на его показания не оказывают влияния другие дефекты системы гемостаза, поскольку в тест-системе применяется плазма дефицитная только по фактору VIII, а уровень всех других факторов свёртывания и антикоагулянтов в этой плазме нормальный.

Для оценки воспроизводимости способа использовали определение коэффициента вариации при многократном исследовании одних и тех же образцов нормальной плазмы и плазмы больного с уровнем фактора VIII равным 200% в разные дни. Способ показал хорошую воспроизводимость. Коэффициент вариации не превышал 8%.

Выводы:

1. Представленный способ определения фактора VIII имеет хорошую воспроизводимость и может применяться для диагностики тромбофилии вследствие гиперпродукции фактора VIII.
2. Частота тромбофилии вследствие высокого уровня фактора VIII в регионе Западной Сибири составляет 7,8%.

Литература

1. Баркаган З.С. Клинико-патогенетические варианты, номенклатура и основы диагностики гематогенных тромбофилий. // Проблемы гематол. и перелив. крови. – 1996. – №3. – С.5-15.
2. Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Момот А.П., Петрова Е.В. Частота высокой активности фактора VIII в крови больных с венозными тромбозами в регионе Западной Сибири. // В сб. Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии. – М. – 2005. – С.219.
3. Мамаев А.Н., Цывкина Л.П., Ходоренко С.А. и соавт. Выявление высокого уровня коагуляционного фактора VIII у больных с онкологическими заболеваниями. // Материалы российской научно-практической конференции «Современные методы лечения онкологических больных: достижения и неудачи» под редакцией профессора А.Ф.Лазарева. – Барнаул. – 2006. – С.214-215.
4. Bobrow R.S. Excess factor VIII: a common cause of hypercoagulability. // J. Am. Board Fam. Pract. – 2005. – 18(4). – P.328.
5. Cristina L., Benilde C., Michela C. et al. High plasma levels of factor VIII and risk of recurrence of venous thromboembolism. // Br. J. Haematol. – 2004. – 124(4). – P.504-510.
6. Cushman M. Inherited Risk Factors for Venous Thrombosis. // Hematology – 2005. – P.452-457.
7. Erkekol F.O., Ulu A., Numanoglu N., Akar N. High plasma levels of factor VIII: an important risk factor for isolated pulmonary embolism. // Respirology – 2006. – 11(1). – P.70-74.
8. Glueck C.J., Pranikoff J., Aregawi D. et al. The factor V Leiden mutation, high factor VIII, and high plasminogen activator inhibitor activity: etiologies for sporadic miscarriage. // Metabolism. – 2005. – 54(10). –P.1345-1349.
9. Goldenberg N.A., Knapp-Clevenger R., Manco-Johnson M.J. Elevated plasma factor VIII and Ddimer levels as predictors of poor outcomes of thrombosis in children. // N.Engl. J. Med. – 2004. – 351. – P.1081-1088.
10. Hoijer P., Olsson E. Elevated coagulation factor VIII, postoperative thrombosis and flap failure in late breast reconstruction with a free TRAM flap: a case report. // J.Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. – 2006. – 59(1). – P.102-104.
11. Koster T., Blann A.D., Briet E. et al. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. // Lancet. – 1995. – 345. – P.152-155.

12. Kraaijenhaen R.A., Anker P.S., Koopman M.M.W., et al. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. // *Thromb. Haemost.* – 2000. – 83. – P.5-9.
13. Kyrle P.A., Minar E., Bialonczyk C., et al. The Risk of Recurrent Venous Thromboembolism in Men and Women. // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – 350. – P.2558-2563.
14. Kyrle P.A., Minar E., Hirschl M., et al. High plasma level of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – 343. – P.457-462.
15. Marilyn J. Manco-Johnson. How I treat venous thrombosis in children. // *Blood* – 2006. – V.107. – N.1. – P.21-29
16. Moritz B., Brox C., Turecek P.L. et al. Characteristics of a novel assay for the determination of FVIII antigen, Immunozy m F VIII:Ag. // *Annals of Hematology*. - Supplement II to Vol. 74. - Abstracts 41th Annual Meeting of the GTH. – 1997. – Abstr. 232.
17. O'Donnell J., Tuddenham E.G., Manning R. et al. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. // *Thromb. Haemost.* – 1997. – 77. – P.825-828.

Директор Алтайского филиала ГУ
Гематологический научный центр РАМН,
Барнаул, член-корр. РАМН, д.м.н., проф.

З.С.Баркаган

Зав. лабораторией гемостаза
МУЗ Городская больница №11,
Барнаул, д.м.н., с.н.с.

А.Н.Мамаев

Врач-лаборант лаборатории гемостаза
МУЗ Городская больница №11,
Барнаул

Е.В.Петрова

Резюме

Способ диагностики тромбофилии вследствие гиперпродукции фактора VIII

А.Н.Мамаев, Е.В.Петрова, З.С.Баркаган

Известно, что диапазон колебаний уровня фактора VIII у здоровых людей весьма широк, а концентрация фактора VIII является фактором риска тромбозов. В данной работе представлен простой и доступный лабораторный метод для определения высокого уровня коагуляционного фактора VIII. Кроме того, на основе результатов определения уровня FVIII у 102-х больных с тромбозами изучена частота тромбофилии вследствие гиперпродукции фактора VIII в регионе Западной Сибири.

Адрес для переписки: 656050, г.Барнаул, ул.Малахова 51, ГБ№11, Алтайский гемцентр, лаборатория гемостаза, зав. лабораторией гемостаза Андрею Николаевичу Мамаеву
е-mail: amamaev@yandex.ru