

# 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-реактента.

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**

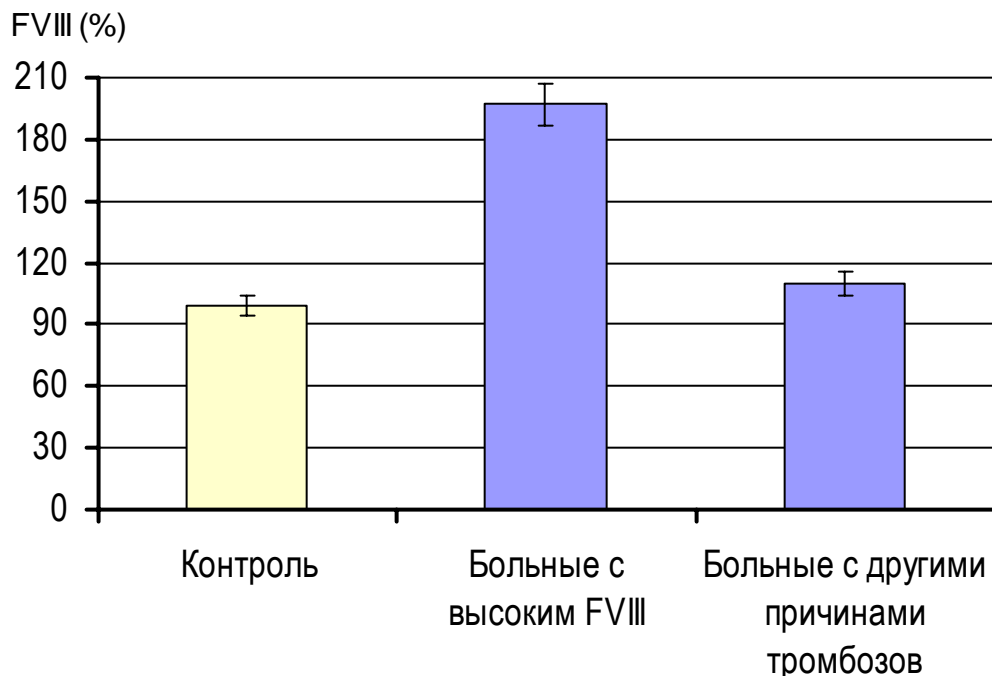
Было обследовано 102 больных (57 мужчин и 45 женщин) с венозными и артериальными тромбозами в возрасте до 46 лет. Из числа обследованных больных, 17 обследовано в возрасте 14-20 лет, 34 больных - в возрасте 21-30 лет, 42 больных - в возрасте 31-40 лет, и у 9 больных тромбоз развился в возрасте 41-45 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. // Respiriology – 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  
e-mail: [amamaev@yandex.ru](mailto:amamaev@yandex.ru)