

На правах рукописи

Мамаев Андрей Николаевич

**КЛИНИЧЕСКАЯ АПРОБАЦИЯ НОВЫХ
СПОСОБОВ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ
ГЕМОСТАЗА, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ПАТОЛОГИЕЙ
В СИСТЕМЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ
АНТИКОАГУЛЯНТОВ**

14.00.29 – гематология и переливание крови

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Барнаул-2006

Работа выполнена в Алтайском филиале
государственного учреждения "Гематологический
научный центр РАМН"

Научные консультанты:

Член-корр. РАМН, заслуженный деятель науки РФ,
д.м.н., проф. Баркаган Зиновий Соломонович
д.м.н., проф. Момот Андрей Павлович
д.м.н., проф. Цывкина Людмила Петровна

Официальные оппоненты:

д.м.н., проф. Неймарк Михаил Израилевич
д.м.н., проф. Кузник Борис Ильич
д.м.н., проф. Пикалов Илья Викторович

Ведущая организация: Новосибирская государственная медицинская академия

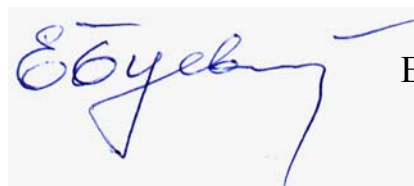
Защита состоится 23 июня 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.208.002.01 при ГОУ ВПО "Алтайский государственный медицинский университет" Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ (656038, г.Барнаул, пр.Ленина, 40).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Алтайского государственного медицинского университета.

Адрес библиотеки: 656031, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126

Автореферат разослан " ____ " _____ " 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.м.н., проф.



Е.И.Буевич

Актуальность темы

Основную роль в торможении процесса свёртывания крови и поддержания её жидкого состояния играют физиологические антикоагулянты – антитромбин III, протеины C, S и др. [Г.В.Андрюенко и соавт., 1980; З.С.Баркаган, 1988-2001; А.Ш.Бышевский и соавт., 1993; Д.М.Зубаиров, 2000; Б.И.Кузник, 2004; З.С.Баркаган и соавт., 2005; U.Abildgaard, 1981; B.Dahlbäck, J.Stenflo et al., 1994; C.T.Esmon, 2001; G.A.Nicolaes, B.Dahlbäck, 2002; B.Dahlbäck, B.O.Villoutreix, 2005 и др.]. Именно поэтому достаточно частыми причинами тромбообразования являются нарушения в антикоагулянтном звене гемостаза, в том числе неполноценность взаимодействия физиологических антикоагулянтов с факторами свёртывания крови [Б.А.Кудряшов, 1975; З.С.Баркаган, 1977-1998; В.П.Балуда и соавт., 1995; Л.П.Папаян, 1999; Д.А.Зубаиров, 2000; В.А.Кобилянская, 2000; Abildgaard, 1981; E.M.Faioni et al., 1998; R.W.Colman, 2001; M.Zangari et al., 2002; B.Dahlbäck, 2005 и др.]. Такие тромбофилические состояния широко распространены в клинической практике, осложняют течение многих заболеваний и нередко приводят к ранней инвалидизации и гибели больных. Они могут быть первичными, генетически обусловленными, а также вторичными, возникающими на фоне других заболеваний. Поэтому распознавание и дифференциация различных нарушений в антикоагулянтном звене системы гемостаза – важная задача, поскольку многие из этих нарушений имеют сходную клиническую симптоматику, но нуждаются в различных профилактических и лечебных воздействиях.

Нарушения в системе протеина С являются одной из наиболее частых причин тромбообразования [З.С.Баркаган и соавт., 1992-2003; Л.П.Папаян и соавт., 1998-2003; В.А.Кобилянская, 2000; N.J.Beauchamp et al., 1994; V.R.Arruda et al., 1995; D.O.Rees et al., 1995; Z.S.Barkagan et al., 1997; G.J.Ruiz-Arguelles et al., 2001; J.Wu et al., 2001; S.K.Al-Jaouni, 2003; B.Dahlbäck, 2005]. Но частота этих нарушений среди больных с тромбозами в регионе Сибири до исследований нашей группы оставалась неизвестной. Кроме того,

до сегодняшнего дня не определён оптимальный алгоритм выявления нарушений в антикоагулянтной системе протеина С, который позволил бы быстро и без дополнительных материальных затрат выявлять эти тромбофилии.

До наших разработок в методиках, предназначенных для диагностики нарушений в системе протеина С, традиционно применялся активатор из яда щитомордника *Agkistrodon contortrix* [M.Kraus, 1995; A.Tripodi et al., 1998; P.Toulon et al., 2001], ареалом обитания которого является Северная Америка, а реагент "Protac[®]", выделяемый из этого яда, запатентован фирмой Pentapharm. Поэтому поиск нового доступного источника активатора протеина С и разработка на его основе отечественных методов выявления нарушений в системе указанного антикоагулянта является весьма актуальной задачей. Кроме того, показания существующих ныне методик зависят от концентрации в плазме коагуляционного фактора V, что нередко затрудняет интерпретацию полученных результатов.

Нарушения в антикоагулянтной системе протеина С нередко бывают вторичными, связанными с антифосфолипидным синдромом (АФС), что отмечают многие исследователи [R.A.Asherson et al., 1996; J.Wu et al., 2000; L.C.Gennari et al., 2002; L.Heilmann et al., 2002; F.J.Munoz-Rodriguez et al., 2002; J.Nojima et al., 2002; G.Sarig et al., 2002; D.Oh et al., 2003]. Однако роль системы протеина С и фосфолипидных фрагментов клеточных мембран в формировании тромботических осложнений у больных с АФС изучены недостаточно. Поэтому нами была исследована связь рецидивирования тромботических нарушений с патологией антикоагулянтной системы протеина С.

Нами разработаны также методы определения антитромбина-III и плазминогена в крови на основе применения новых отечественных хромогенных субстратов и сопоставлены показания этих тестов с результатами, полученными с помощью зарубежных диагностических наборов.

Таким образом, наша работа посвящена уточнению патогенеза и совершенствованию диагностики гематогенных тромбофилий, разработке и клини-

ческой апробации оптимального алгоритма распознавания нарушений в системе протеина С и изучению дисфункции антикоагулянтной системы крови при антифосфолипидном синдроме.

Цель исследования

Совершенствование диагностики гематогенных тромбофилий на основе создания и апробации новых экспресс-методов оценки антикоагулянтного звена системы гемостаза и анализ сдвигов в этой системе.

Задачи исследования

1. Провести широкомасштабные исследования ядов змей отечественной фауны с целью выявления нового активатора протеина С (аналога "Protac[®]"), провести идентификацию активатора на основе оценки специфического влияния на систему гемостаза и обосновать возможность его широкого применения в диагностической практике.
2. На основе применения нового активатора протеина С разработать методы и алгоритм выявления нарушений в системе этого антикоагулянта.
3. Изучить сопряженные нарушения в системе гемостаза у больных с тромбофилией вследствие резистентности фактора Va к активированному протеину С.
4. Провести широкую клиническую апробацию разработанных экспресс-методов оценки антикоагулянтного звена системы гемостаза при различных тромбофилиях.
5. Уточнить патогенетические механизмы, вызывающие рецидивирование тромбоэмболических осложнений при антифосфолипидном синдроме.
6. Разработать и внедрить в практику новые методы определения антитромбина III и плазминогена на основе применения новых отечественных хромогенных субстратов.
7. Уточнить способность метода определения суммарной эффективности системы протеина С, основанного на применении отечественного активатора этой антикоагулянтной системы, выявлять тромбофилию вследствие высокой концентрации фактора VIII.

8. Определить роль нарушений в антикоагулянтном звене системы гемостаза и фибринолизе у больных с ДВС-синдромом.
9. Уточнить патогенез угнетения прокоагулянтной активности плазменных фосфолипидных мембран у больных с антифосфолипидным синдромом.

Научная новизна

1. Впервые найден, выделен и идентифицирован новый активатор протеина С, полученный из яда змеи отечественной фауны *Agkistrodon saxatilis* (патент РФ №2184976), и на этой основе разработан метод суммарной оценки эффективности антикоагулянтной системы протеина С (патент РФ №2190855).
2. Разработан метод определения резистентности фактора Va к активированному протеину С на основе применения активатора протеина С (патент РФ №2129282) и метод определения резистентности фактора Va к активированному протеину С, на результаты которого не оказывает влияния концентрация фактора V (патент РФ №2205411).
3. Разработан эффективный диагностический алгоритм, позволяющий выявить нарушения в антикоагулянтной системе протеина С.
4. Установлено, что у больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С часто выявляются другие тромбогенные сдвиги в системе гемостаза: тромбинемия, гиперкоагуляция в АПТВ-тесте и гиперфибриногенемия.
5. Выявлена прогностическая роль снижения уровней антитромбина III, плазминогена и показателя NR, отражающего функциональное состояние системы протеина С, у больных с ДВС-синдромом.
6. Установлено, что волчаночный антикоагулянт относится к обратимым ингибиторам, которые нарушают прокоагулянтную функцию фосфолипидных матриц, участвующих в коагуляции.
7. Показана патогенетическая связь рецидивирования тромбозов при антифосфолипидном синдроме с нарушениями в системе протеина С.

Практическая значимость

1. На основе применения оригинального активатора протеина С разработан алгоритм диагностики тромбофилических состояний, обусловленных нарушениями в системе протеина С.
2. Показано, что метод суммарной оценки эффективности системы протеина С выявляет тромбофилию, обусловленную высокой концентрацией фактора VIII.
3. Исследование показало, что при неблагоприятных исходах ДВС-синдрома не происходит повышения уровня антикоагулянтов и плазминогена, поэтому повышение антитромбина III, показателя NR и уровня плазминогена служит маркером благоприятного исхода ДВС-синдрома.
4. Показано высокое прогностическое значение исследования функции системы протеина С при антифосфолипидном синдроме.
5. Разработан простой методический подход для отделения волчаночного антикоагулянта от фосфолипидных матриц, циркулирующих в крови больных.
6. Внедрены в практику здравоохранения диагностические наборы для определения нарушений в системе протеина С, которые широко используются в лечебно-профилактических учреждениях Российской Федерации и сопредельных странах.
7. Внедрены в практику здравоохранения высокоточные амидолитические методы определения в плазме уровня антитромбина III (регистрационное удостоверение №29/25040502/6186-04 от 18 марта 2004 г.; ТУ 9398-273-42349142-2003) и уровня плазминогена (регистрационное удостоверение №29/25040502/6187-04 от 18 марта 2004 г.; ТУ 9398-274-42349142-2003), основанные на применении отечественных хромогенных субстратов.

Внедрение

Результаты исследования внедрены в практику работы Алтайского филиала ГУ ГНЦ РАМН (Барнаул), Федерального Академического центра по диагностике и лечению нарушений гемостаза (Барнаул), Алтайского краевого кардиологического диспансера (Барнаул), Алтайского филиала РОНЦ им.

Н.Н.Блохина (Барнаул), КГ КП "Областное медицинское объединение" (Усть-Каменогорск), ГОУ ВПО "Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им.акад. И.П.Павлова" (Санкт-Петербург), ГОУ ВПО "Башкирский государственный медицинский университет" (Уфа), ГОУ ВПО "Северный государственный медицинский университет (Архангельск) и др. Ряд положений диссертационной работы используется в курсе лекций и практических занятий со студентами и курсантами факультета усовершенствования врачей Алтайского государственного медицинского университета. На основе представленных в диссертации данных разработаны и внедрены в медицинскую промышленность Российской Федерации импортозамещающие диагностические технологии (Си-активин[®], Фактор V-ПС-тест, Парус-тест[®], ХромоТех[®]-Антитромбин и др.), предназначенные для выявления нарушений в антикоагулянтной системе крови.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих научных конгрессах и конференциях: Всероссийской конференции "Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии" (Санкт-Петербург, 1995); III Всероссийской конференции "Тромбозы и геморрагии, ДВС-синдром. Проблемы лечения" (Москва, 1997); XI Международном конгрессе токсикологов (Тель-Авив, 1994); XII Международном конгрессе гематологов (Стамбул, 1995); XIV Международном конгрессе по тромбозам (Монпелье, 1996); XVI Международном конгрессе ISTH (Флоренция, 1997); Научно-практической конференции "Профилактика, диагностика и лечение артериальных и венозных тромбозов" (Железногорск, 1998); Международной научной конференции к 100-летию со дня рождения А.Л.Мясникова. "Атеротромбоз – проблема современности" (Москва, 1999); III Всероссийской научно-практической конференции "Современные методы диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы" (Кемерово, 2000); VII Сибирской научно-практической конференции по актуальным вопросам кардиологии (Красноярск, 2002); V межрегиональной научно-практической конференции "Совре-

менные методы диагностики" (Барнаул, 2003); V съезде гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь "Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии" (Минск, 2003); Научно-практической конференции "Actualitati in hematology si transfuziologie" (Кишинёв, 2003); 1-й Украинской конференции "Тромбозы в клинической практике: профилактика, диагностика и лечение" (Киев, 2004); Российской научно-практической конференции "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии" (Санкт-Петербург, 2004); 2 научно-практической конференции "Актуальные вопросы гематологии и внутренних болезней" (Караганда, 2005); VI Всероссийском съезде онкологов (Москва, 2005).

По теме диссертации опубликовано 103 научные работы.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 257 страницах машинописи, иллюстрирована 36 таблицами и 33 рисунками. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав с изложением результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы (407 источников).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Яд змеи щитомордника *Agkistrodon saxatilis* содержит активатор протеина С.
2. Метод суммарной оценки эффективности системы протеина С с вычислением индекса NR способен успешно выявлять дефекты в этой системе.
3. Разработанный нами алгоритм для диагностики нарушений в системе протеина С целесообразно использовать для диагностики нарушений в этой антикоагулянтной системе.
4. Разработанные методы диагностики резистентности фактора Va к активированному протеину С высокоспецифичны и способны эффективно выявлять указанную тромбофилию.
5. В комплексное исследование больных с резистентностью фактора Va целесообразно включать определение других показателей системы гемостаза,

поскольку при этой патологии нередко встречаются различные гиперкоагуляционные нарушения.

6. Результаты суммарной оценки эффективности системы протеина С позволяют прогнозировать рецидивы тромбозов у больных с антифосфолипидным синдромом.
7. Волчаночный антикоагулянт обратимо ингибирует фосфолипидные матрицы в плазме крови.
8. При неблагоприятных исходах ДВС-синдрома не происходит повышения уровня антикоагулянтов и плазминогена, а при благоприятных исходах эти показатели нормализуются.
9. Разработанные методы определения антитромбина III и плазминогена на основе новых отечественных хромогенных субстратов по воспроизводимости и точности не отличаются от известных импортных аналогов.
10. Нарушения в системе протеина С у больных с антифосфолипидным синдромом устраняются при комплексном лечении с применением дискретного плазмафереза.

Работа выполнена в Алтайском филиале ГУ ГНЦ РАМН (директор филиала – член-корр. РАМН, д.м.н., проф. З.С.Баркаган).

Выражаю благодарность моим научным консультантам и учителям: члену-корреспонденту РАМН, заслуженному деятелю науки РФ, профессору Зиновию Соломоновичу Баркагану, профессору Андрею Павловичу Момоту, профессору Людмиле Петровне Цывкиной.

Выражаю искреннюю признательность за товарищескую помощь и совместные исследования д.м.н., профессору Е.И.Буевичу, д.м.н. Г.А.Сухановой, д.м.н. Г.В.Сердюк, д.м.н. Е.Ф.Котовщиковой, к.м.н. Д.Н.Ерину, к.м.н., Н.К.Зяблицкой, к.м.н. Н.И.Тарасовой и к.м.н. И.А.Тараненко, а также врачу-лаборанту МУЗ ГБ 11 Е.В.Петровой и сотрудникам лаборатории гемостаза Т.А.Лапшиной, Т.Г.Усовой и Л.Г.Кравченко.

Содержание работы:

Общая характеристика методов исследования и обследованных больных

В настоящей работе представлены результаты исследования системы гемостаза у 448 больных.

В таблице 1 представлена информация об 338 обследованных больных с тромбозами. Кроме того, для клинической апробации новых диагностических подходов и в качестве групп для сравнения дополнительно обследованы 110 больных. Из числа этих больных 85 больных имели ДВС-синдром и у 25 пациентов были системные заболевания соединительной ткани без АФС. Сравнение изучаемых показателей проводили с результатами исследования плазмы 147 здоровых людей в возрасте от 18 до 45 лет (69 мужчин и 78 женщин).

Таблица 1

Распределение обследованных больных с тромбозами по полу и возрасту

| Группы обследованных | Мужчины | Женщины | Возраст | | | | | Всего |
|--|------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| | | | до 20 | 20-30 | 30-40 | 40-50 | старше 50 | |
| Резистентность к АПС | 45 | 27 | 8 | 24 | 27 | 12 | 1 | 72 |
| Дефицит протеина С | 9 | 5 | - | 3 | 5 | 4 | 2 | 14 |
| Дефицит протеина S | 1 | - | - | - | - | 1 | - | 1 |
| Высокий уровень фактора VIII | 10 | 5 | 1 | 4 | 7 | 2 | 1 | 15 |
| АФС (всего) | 17 | 34 | 9 | 24 | 15 | 3 | - | 51 |
| в том числе | | | | | | | | |
| а) первичный | 7 | 24 | 4 | 16 | 8 | 3 | - | 31 |
| б) вторичный | 5 | 15 | 3 | 9 | 7 | 1 | - | 20 |
| Дефицит АТ-III | 2 | 2 | - | 2 | 2 | 1 | - | 4 |
| Гемореологические формы тромбофилий | 12 | 4 | - | 1 | 7 | 5 | 3 | 16 |
| Больные с тромбозами неустановленной этиологии | 107 | 58 | 18 | 59 | 48 | 32 | 8 | 165 |
| Всего: | 203 | 135 | 36 | 117 | 110 | 60 | 15 | 338 |

При исследовании системы гемостаза определяли следующие показатели:

1. Тесты, характеризующие сосудисто-тромбоцитарный гемостаз: подсчет числа тромбоцитов в камере Горяева с использованием фазового контраста, агрегация тромбоцитов на агрегометре “Биола” (индукторы: АДФ, коллаген, адреналин), определение спонтанной агрегации тромбоцитов, определение концентрации фактора Виллебранда.

2. Тесты, характеризующие коагуляционный гемостаз: активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), протромбиновое время с тромбопластинами, стандартизированными по международному индексу чувствительности (ISI), время свертывания в тесте с ядом гюрзы (*Vipera lebetina turanica*), время свертывания в тесте с ядом эфы (*Echis multisquamatus*), тромбиновое время, концентрация фибриногена в плазме хронометрическим методом.

3. Тесты, оценивающие систему физиологических антикоагулянтов: способ суммарной оценки эффективности системы протеина С (патент РФ №2190855); способ определения активности протеина С по Martinolli (1986); способ определения протеина С кинетическим методом с использованием диагностического набора “Berichrom Protein C” (“Dade-Behring”); резистентность фактора Va к активированному протеину С определяли с помощью разработанных нами способов фенотипической диагностики с вычислением индексов R и NR (патент РФ №2129282; патент РФ №2205411); способ определения прогрессивной активности антитромбина III по Abildgaard et al. (1970) в модификации К.М.Бишевского (1979); способ определения гепаринкофакторной активности антитромбина III с использованием диагностического набора “Berichrom Antithrombin III” (“Dade-Behring”) и разработанным нами методом на основе нового отечественного хромогенного субстрата z-Ala-Ala-Arg-pNa (Москва).

4. Активность фактора VIII определяли унифицированным одностадийным методом, а также по новому изобретению (решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2002120164/15 от 10.11.2003).

5. Определение тромбинемии по количественному содержанию в плазме РФМК (В.А.Елыкомов, А.П.Момот, 1987).

6. Прокоагулянтную активность плазменных фосфолипидных мембран определяли по разработанному в нашей лаборатории методу (*патент РФ №2058031, 1996; А.П.Момот, 1997*).

7. Выявление волчаночных антикоагулянтов выполняли в соответствии с методическими рекомендациями нашего центра (*З.С.Баркаган и соавт., 2003*).

8. Тесты, характеризующие фибринолиз: XIIa-зависимый лизис эуглобулинов, уровень плазминогена определяли методом, основанным на применении отечественного хромогенного субстрата For-Ala-Phe-Lys-pNA.HBr.

Способы статистической обработки результатов исследования

Определяли следующие статистические показатели: среднюю арифметическую (\bar{X}), среднее квадратическое отклонение (SD), ошибку средней арифметической (m). Достоверность различий исследуемых выборочных данных при нормальном распределении с учетом равенства/неравенства дисперсий групп определяли при помощи критерия Стьюдента (t). Различия считались значимыми при $P < 0,05$. Для множественных сравнений применяли критерий Бонферони и критерий Тьюки. Для оценки воспроизводимости новых методов исследования использовали коэффициент вариации. Для устранения резко отличающихся (выскакивающих) результатов применяли критерий Шовене. В ряде случаев (при малом числе наблюдений, когда распределение отличалось от нормального) для расчета достоверности различий эмпирических выборок использовали непараметрические методы статистической обработки. Качественные данные обрабатывали при помощи критерия Фишера и критерия χ^2 , поправку Йейтса использовали при наличии ожидаемых значений менее 10.

Результаты исследования обрабатывали на компьютере с помощью пакета стандартных программ для статистического анализа.

Результаты:

Разработка и апробация способа суммарной оценки эффективности системы протеина С

В коагуляционных методах, предназначенных для диагностики нарушений в системе протеина С, традиционно применяют активатор из яда щитомордника *Agkistrodon contortrix*, ареалом обитания которого является Северная Америка. С целью получения нового доступного активатора протеина С нами были изучены образцы ядов шести змей отечественной фауны: *Agkistrodon halys*, *Agkistrodon saxatilis*, *Vipera lebetina*, *Vipera berus*, *Echis multisquamatus*, *Echis carinatus*. В серии экспериментов было установлено, что лучшим антикоагулянтным эффектом обладала фракция из яда *Agkistrodon saxatilis*. Для доказательства того, что выявленный антикоагулянтный эффект обусловлен активацией протеина С было выполнено дополнительное исследование, в котором сравнивали степень удлинения АПТВ дефицитной по протеину С и нормальной бедной тромбоцитами плазмы (БТП) после добавления фракции из яда *Agkistrodon saxatilis* и известного активатора "Protac[®]" (см. рис.1).

Из рисунка 1 видно, что после добавления в тест-систему 0,05 мл дистиллированной воды АПТВ в нормальной БТП было равным $32,1 \pm 0,9$ сек. После добавления 0,05 мл активатора "Protac[®]" время свертывания нормальной БТП было удлинено до $106,2 \pm 1,9$ сек ($P < 0,001$). После добавления 0,05 мл нового реагента из яда *Agkistrodon saxatilis* время свертывания нормальной БТП также было достоверно удлинено до $110,4 \pm 2,2$ сек ($P < 0,001$) и не отличалось от времени свертывания после добавления известного активатора "Protac[®]".

Из рисунка 1 видно также, что АПТВ в дефицитной по протеину С плазме после добавления дистиллированной воды было равно $33,3 \pm 0,8$ сек, а

после добавления нового реагента составило $33,9 \pm 0,7$ сек (различия не достоверны, $P > 0,5$). АПТВ в дефицитной по протеину С плазме после добавления реагента "Protac[®]" было равно $33,8 \pm 0,9$ сек и не отличалось от аналогичного показателя после добавления дистиллированной воды ($P > 0,5$) и показателя АПТВ, полученного после добавления реагента из яда *Agkistrodon saxatilis* ($P > 0,5$).

Так было показано, что изучаемая фракция не вызывает антикоагулянтного эффекта без протеина С, и что этот эффект не отличается от известного активатора протеина С "Protac[®]".

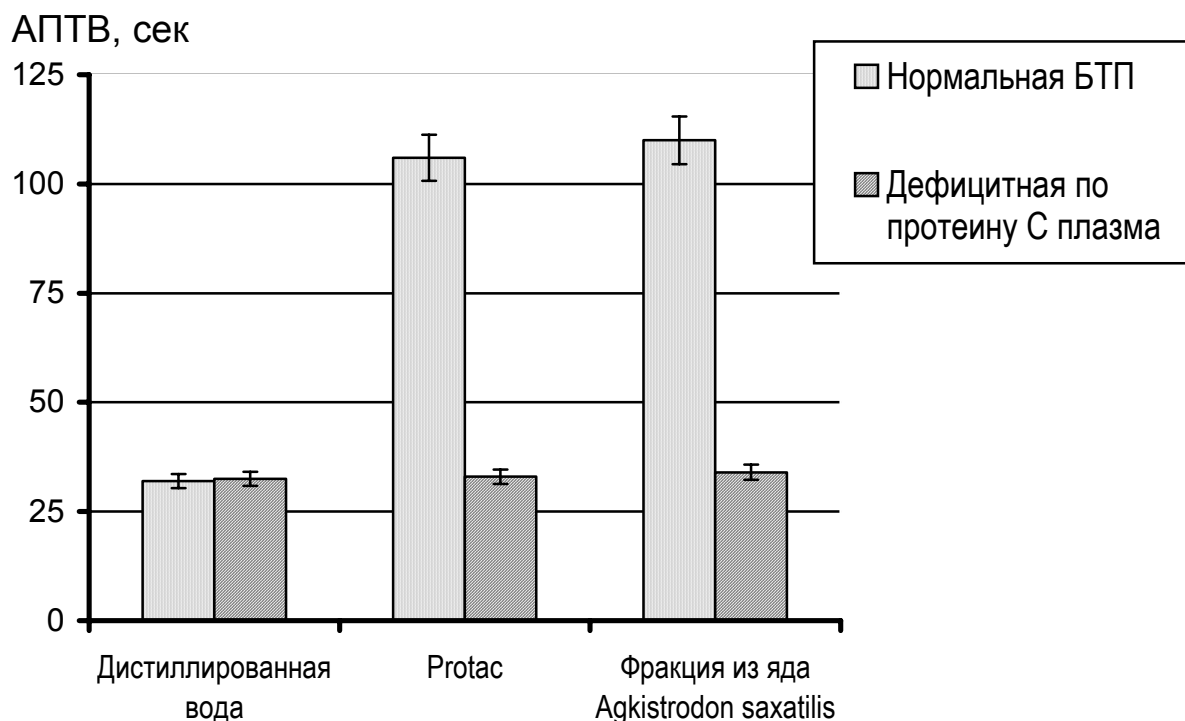


Рис. 1. Сравнительные данные действия фракции яда *Agkistrodon saxatilis* и известного активатора протеина С ("Protac[®]") при исследовании нормальных (n=27) и дефицитных по протеину С образцов плазмы (n=20).

Для доказательства способности выделенной нами фракции яда активировать протеин С мы провели сравнение способности нового активатора и активатора "Protac[®]" вызывать гидролиз специфичного к протеину С хромогенного субстрата после их добавления в разведённые образцы нормальной БТП. Для этой цели использовали высокоспецифичный к протеину С

хромогенный субстрат p-Glu-Pro-Arg-MNA. Результаты исследования представлены на рис.2.

Представленный рисунок показывает, что скорость гидролиза хромогенного субстрата была одинакова при добавлении предложенного нами активатора протеина С и известного активатора "Protac[®]".

На основе этих результатов нами была разработана методика суммарной оценки эффективности системы протеина С с вычислением показателя нормализованного отношения (NR), а затем изучены показания этого теста при различных видах патологии.

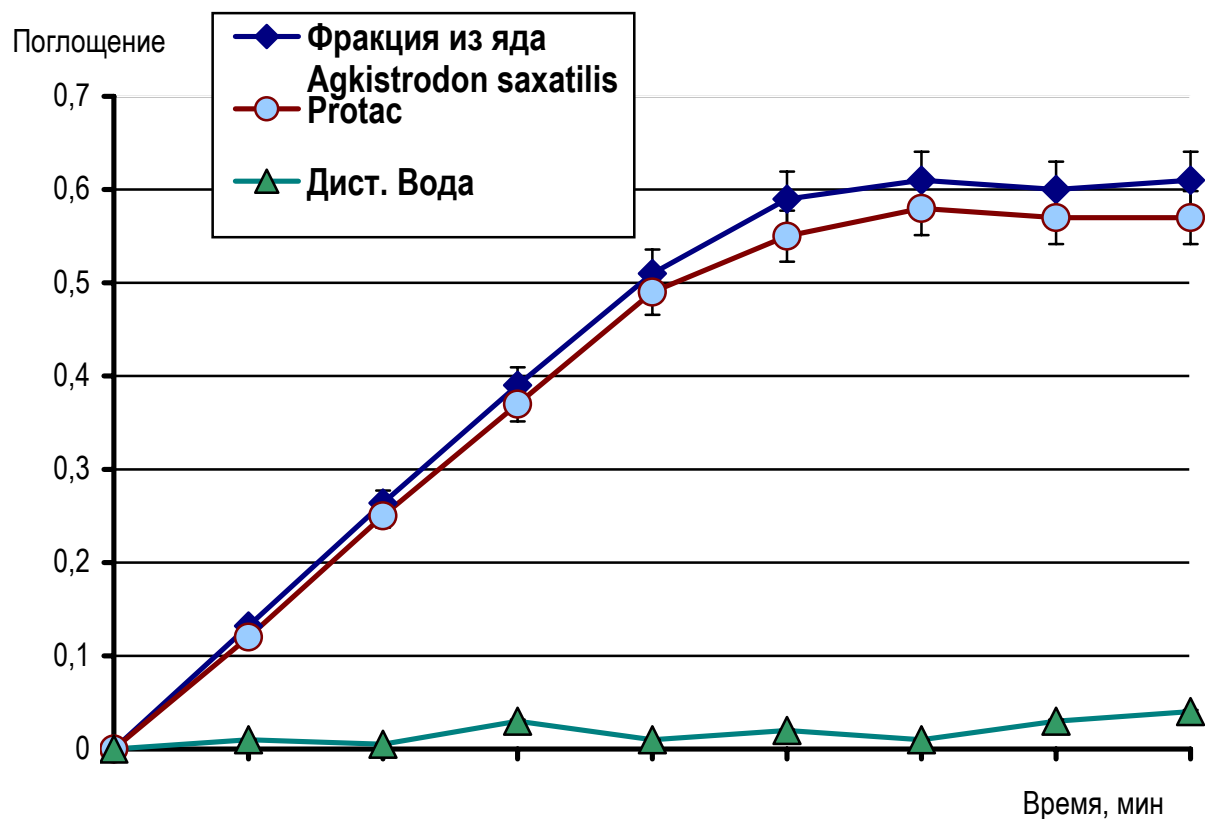


Рис. 2. Кинетика гидролиза хромогенного субстрата p-Glu-Pro-Arg-MNA после добавления в тестируемую смесь активаторов протеина С.

Результаты суммарной оценки эффективности системы протеина С у больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С

Из 338 обследованных больных с тромбозами резистентность фактора Va к активированному протеину С (АПС) была выявлена у 72 пациентов (21,3%). У всех больных эта тромбофилия была диагностирована разрабо-

танним нами в 1996 году способом диагностики этого нарушения [З.С.Баркаган, Л.П.Цыпкина, А.Н.Мамаев, патент РФ №2129282 от 20.04.1999г.].

Показатели NR у этой группы больных, у здоровых (контрольная группа) и в группе больных с тромбозами неустановленной этиологии (группа сравнения) представлены на рис. 3. Из него видно, что у больных с тромбофилией, обусловленной резистентностью фактора Va к активированному протеину С, показатель NR в среднем был равен $0,64 \pm 0,03$ ($n=72$), а в контроле ($n=147$) и в группе сравнения ($n=165$) он оказался достоверно выше $1,01 \pm 0,01$ ($P < 0,001$) и $0,98 \pm 0,03$ ($P < 0,001$) соответственно. Эти результаты свидетельствуют о высокой чувствительности разработанного нами теста к наличию резистентности фактора Va к активированному протеину С.

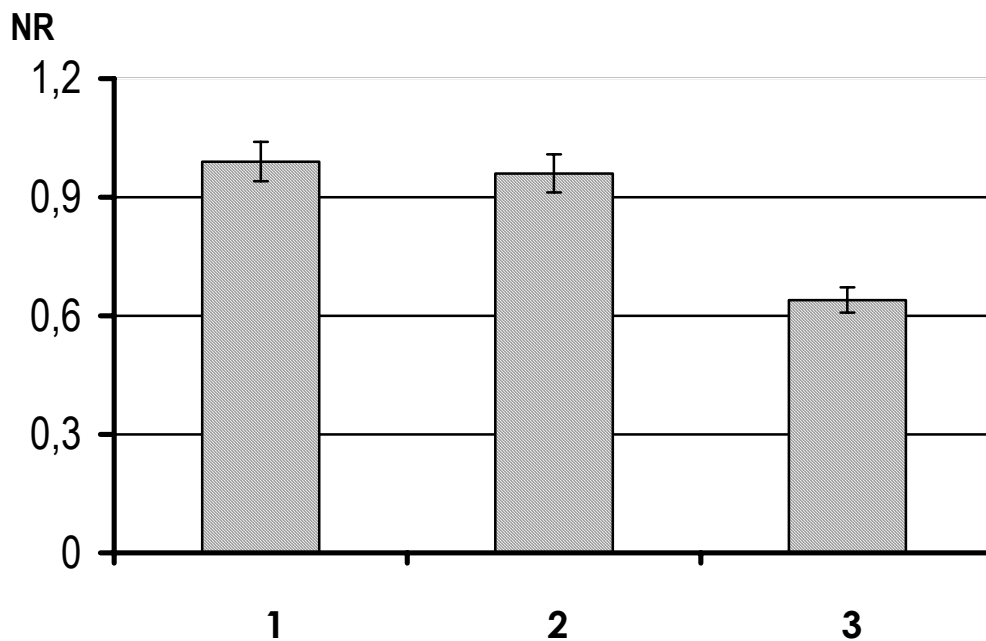


Рис. 3. Показатель NR при суммарной оценке эффективности системы протеина С у здоровых людей (1), у больных с неустановленной причиной тромбозов (2) и в группе больных с тромбофилией, обусловленной резистентностью фактора Va к активированному протеину С (3).

Результаты суммарной оценки эффективности системы протеина С у больных с дефицитом протеинов С и S

Из числа 338 обследованных больных с тромбозами тромбофилия, обусловленная дефицитом протеина С, была выявлена у 14 больных (4,1%). Показатель NR у этих больных составил в среднем $0,61 \pm 0,05$, тогда как в кон-

трольной группе здоровых людей ($n=147$) этот показатель был достоверно выше $1,01\pm 0,01$ ($P<0,001$). В группе сравнения ($n=165$) показатель NR был так же выше $0,98\pm 0,03$ ($P<0,001$), чем в группе больных с дефицитом протеина С.

При исследовании гемостаза у больных с тромбозами мы лишь у одного больного выявили тромбофилию вследствие дефицита протеина S. Уровень протеина S у этого больного был равен 53%, а показатель NR составил 0,65. Полученные результаты позволяют сделать вывод о пригодности разработанного нами теста суммарной оценки эффективности системы протеина С выявлять эти две тромбофилии.

Результаты суммарной оценки эффективности протеина С у больных с повышенной концентрацией в плазме фактора VIII

Известно, что активированный протеин С в комплексе с протеином S инактивирует не только коагуляционный фактор Va, но и фактор VIIIa. Поэтому логично было предположить, что тест суммарной оценки эффективности системы протеина С можно использовать и для диагностики тромбофилии вследствие высокой концентрации фактора VIII. Для проверки этого предположения у больных с этой тромбофилией изучали показатели традиционного способа определения концентрации фактора VIII и теста суммарной оценки эффективности системы протеина С. При использовании этого подхода, нами были выявлены 15 больных с тромбозами, у которых уровень фактора VIII превышал 175%. У этих больных показатель NR в среднем составил $0,66\pm 0,08$ ($n=15$), а при тромбозах в группе сравнения он оставался нормальным $0,98\pm 0,03$ ($P<0,001$).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о неспособности активатора протеина С вызывать гипокоагуляцию у больных с высоким уровнем фактора VIII в разработанной нами тест-системе, и поэтому при выяв-

лении нарушений в системе протеина С методом, оценивающим эффективность этой системы, следует определить концентрацию фактора VIII.

Диагностика резистентности фактора Va к активированному протеину С с помощью нового метода (патент РФ №2129282)

В 1993 году Dahlbäck и соавторы обнаружили новый вид тромбофилии и опубликовали способ диагностики этого заболевания [*B.Dahlbäck et al., 1993*]. Было установлено, что эта тромбофилия обусловлена генетической аномалией фактора V, вследствие чего он теряет способность инактивироваться протеином С, т.е. приобретает резистентность к последнему [*B.Dahlbäck et al., 1993-2005; R.M.Bertina et al., 1994; B.Dahlbäck, 1994-2005; B.Zöller et al., 1994-1995*], что было подтверждено большим числом исследователей из разных частей земного шара [*З.С.Баркаган и соавт., 1997-2003; А.Н.Мамаев, 1997; В.А.Кобилянская, 2000; Л.П.Папаян и соавт., 2001; С.И.Капустин и соавт., 2004; N.J.Beauchamp et al., 1994; D.O.Rees et al., 1995; Z.S.Barkagan et al., 1997; A.Toserno et al., 1998; G.Avellone et al., 2001; J.Wu et al., 2001; P.Zunker et al., 2001; B.Potzsch et al., 2002; P.M.Ridker, 2002; J.A.Rodgers et al., 2002; F.Dawood et al., 2003; J.Gardner, 2003 и др.*].

Надёжное распознавание этой частой тромбофилии открывает перспективы совершенствования профилактики и терапии тромботических проявлений у больных с тромбозами. Поэтому мы разработали метод, основанный на использовании нового отечественного активатора протеина С, который позволил повсеместно осуществлять диагностику этой тромбофилии. Нами было выявлено 72 больных с указанной тромбофилией, что составляет 21,3% от общего числа больных с тромбозами. У всех этих больных исследования повторяли 2-3 раза, выявленные нарушения отличались стабильностью, что говорит о высокой надёжности такой диагностики.

Изменения АПТВ-теста и статистическая значимость этих изменений в новой тест-системе представлены в таблице 2, из которой видно, что у больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С значительно меньше, чем в норме, удлиняется время свертывания в АПТВ-тесте после добавления активатора протеина С. Такое малое удлинение АПТВ в

этой группе показывает неспособность активированного протеина С разрушать аномальный фактор Va.

Различие показателей NR у больных указанных групп наглядно демонстрирует рисунок 5. Нами у 30 больных была обнаружена умеренная резис-

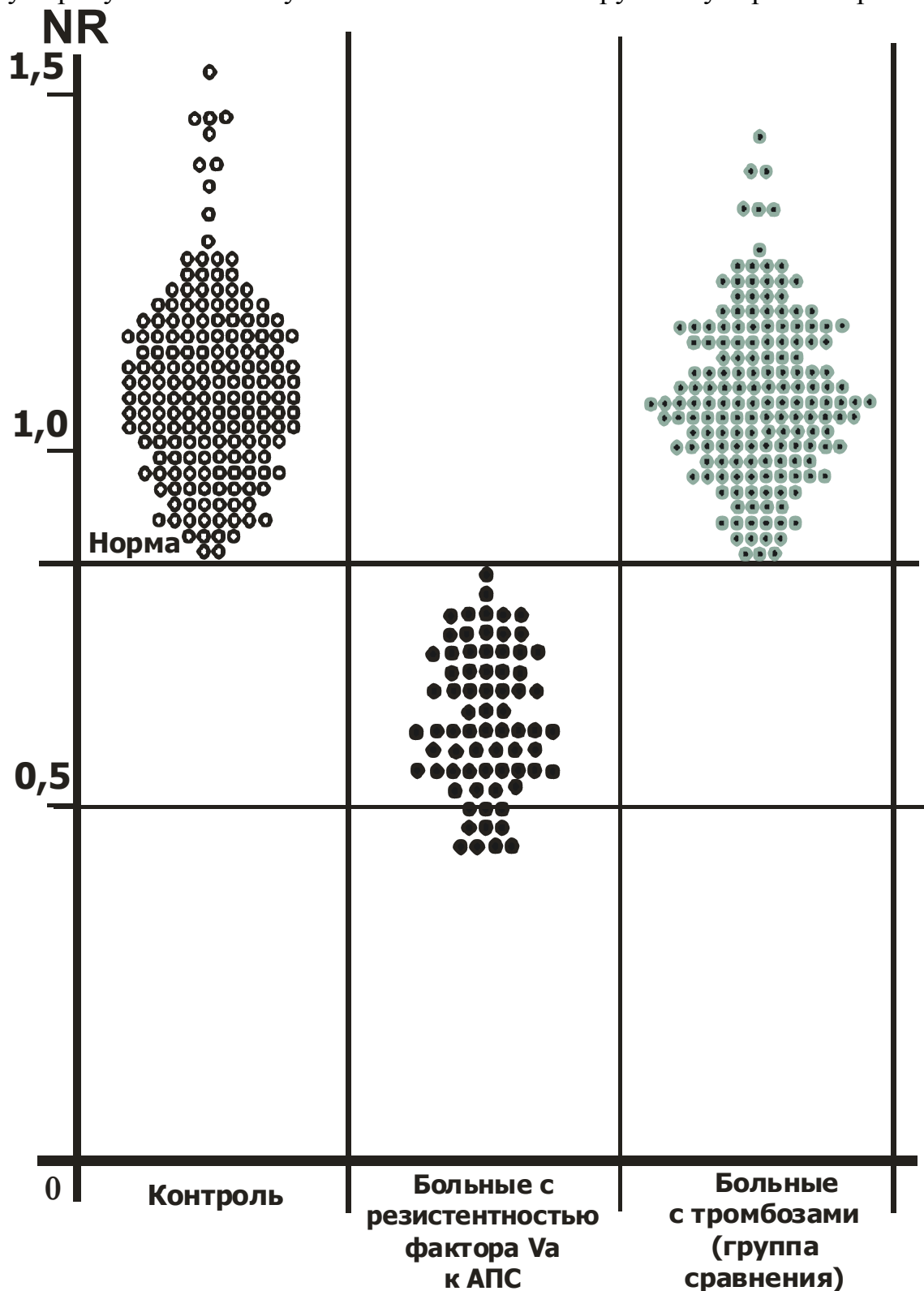


Рис. 5. Показатели NR при резистентности фактора Va к активированному протеину С в разных группах больных с тромбозами и в контроле.

тентность к протеину С (NR 0,70-0,79), у 32 – значительная (NR 0,50-0,69) и у 10 – глубокая (NR<0,5), что характерно для тяжелой формы этой патологии.

Таблица 2
Результаты определения резистентности фактора Va к активированному протеину С в контрольной группе и в группах больных с тромбозами

| Исследуемые группы | АПТВ после добавления буфера в тестируемую смесь, с ① | АПТВ после добавления активатора ПС в тестируемую смесь, с ② | Степень удлинения АПТВ, ratio | P ₁₋₂ |
|--|---|--|-------------------------------|------------------|
| Больные с резистентностью фактора Va к активированному протеину С (n=72) | 59,1±1,1 | 72,2±1,8 | 1,22±0,06 | <0,001 |
| Больные без резистентности фактора Va к активированному протеину С (n=165) | 55,9±1,0 | 173,4±2,4 | 3,10±0,05 | <0,001 |
| Контроль (n=147) | 52,8±0,8 | 158,1±2,2 | 2,99±0,05 | <0,001 |

Показатели, полученные при обследовании больных с тромбозами, сравнивали с аналогичными результатами, полученными при помощи известного набора реагентов Акцелеримат[®] (производитель Biomérieux). Установлено, что разработанный нами способ имеет очень хорошую сопоставимость результатов с аналогом. Линейный коэффициент корреляции был равен 0,94 (P<0,001). Кроме того, повторными исследованиями установлено, что разработанный и применяемый нами в этом исследовании способ диагностики тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора Va к активированному протеину С, надёжен и имеет хорошую воспроизводимость. Коэффициент вариации при исследовании одного и того же образца плазмы в разные дни не превышал 5%.

Характеристика вторичных сопряженных нарушений при тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора Va к активированному протеину С

Из таблиц 3 и 4 видно, что в группе больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С и в группе сравнения повышен уровень РФМК. Повышение этого показателя было выявлено у 25 больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С (34,7%) и у 32-х больных из группы сравнения (19,4%). На основе статистического анализа (критерий χ^2) был сделан вывод о том, что у больных с этой тромбофилией достоверно чаще ($P=0,011$) встречается тромбинемия, чем в группе больных с тромбозами неустановленной этиологии.

Внутренний механизм гемостаза у больных с тромбофилией вследствие резистентности фактора Va к активированному протеину С и у больных группы сравнения оценивали при помощи АПТВ-теста. У больных с указанной тромбофилией значимый сдвиг АПТВ в сторону гиперкоагуляции, выходящий за пределы $X \pm 2SD$, был выявлен у 29 (40,3%) больных, а сдвиг в сторону гипокоагуляции у 17 (23,6%) пациентов. В группе сравнения гиперкоагуляция была выявлена у 40 (24,2%) пациентов, а гипокоагуляция у 27 больных (16,4%). Частотный анализ при помощи критерия χ^2 показал, что у больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С достоверно ($P=0,012$) чаще развивается гиперкоагуляция в АПТВ-тесте, тогда как гипокоагуляция встречается с одинаковой частотой ($P=0,187$).

В обеих сравниваемых группах был удлинен XIIa-зависимый фибринолиз, причём этот тест был нарушен у 27 (37,5%) больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С и у 49 (29,7%) больных из группы сравнения. Различие этого показателя в группах оказалось недостоверным ($P=0,297$).

Кроме того, у 29 больных из группы сравнения и у 22-х больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С было повышено содержание фибриногена в плазме. Применение критерия χ^2 позволило мате-

матически обосновать вывод о том, что у больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С достоверно чаще ($P=0,026$) выявляется гиперфибриногенемия.

Совместно с Е.Ф.Котовщицкой и Н.И.Тарасовой нами было установлено, что у больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С повышена агрегация тромбоцитов (см. таб.3).

Таблица 3

Результаты исследования системы гемостаза ($X \pm m$) у больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С ($n=72$)

| Методы исследования | Больные | Контроль | P |
|---|-----------|-----------|--------|
| <i>АПТВ, с</i> | 33,4±0,7 | 35,9±0,2 | >0,05 |
| <i>Протромбиновое, с</i> | 12,8±0,4 | 12,4±0,1 | >0,05 |
| <i>Эхитоксовое время, с</i> | 28,9±1,5 | 29,7±0,4 | >0,05 |
| <i>Тромбиновое время, с</i> | 15,7±0,6 | 15,1±0,1 | >0,05 |
| <i>Антитромбин III, %</i> | 103,8±2,7 | 99,7±1,0 | >0,05 |
| <i>Фибриноген, г/л</i> | 4,3±0,3 | 2,9±0,1 | <0,05 |
| <i>Р Ф М К, мг%</i> | 6,2±1,0 | 3,3±0,1 | <0,01 |
| <i>Тромбоциты, $\times 10^9$/л</i> | 249,2±9,2 | 232,1±3,7 | >0,05 |
| <i>Спонтанная агрегация тромбоцитов, %</i> | 36,6±1,0 | 12,4±0,2 | <0,001 |
| <i>XIIa-фибринолиз, мин</i> | 37,4±1,4 | 6,7±0,2 | <0,001 |

Таблица 4

Результаты исследования системы гемостаза ($X \pm m$) у больных с тромбозами неустановленной этиологии ($n=165$)

| Методы исследования | Больные | Контроль | P |
|---|-----------|-----------|--------|
| <i>АПТВ, с</i> | 36,5±0,6 | 35,9±0,2 | >0,05 |
| <i>Протромбиновое, с</i> | 12,9±0,3 | 12,4±0,1 | >0,05 |
| <i>Эхитоксовое время, с</i> | 30,5±0,4 | 29,7±0,4 | >0,05 |
| <i>Тромбиновое время, с</i> | 15,3±0,1 | 15,1±0,1 | >0,05 |
| <i>Антитромбин III, %</i> | 98,8±1,9 | 99,7±1,0 | >0,05 |
| <i>Фибриноген, г/л</i> | 3,7±0,3 | 2,9±0,1 | <0,02 |
| <i>Р Ф М К, мг%</i> | 6,0±0,9 | 3,3±0,1 | <0,005 |
| <i>Тромбоциты, $\times 10^9$/л</i> | 246,1±6,3 | 232,1±3,7 | >0,05 |
| <i>Спонтанная агрегация тромбоцитов, %</i> | 28,1±1,1 | 12,4±0,2 | <0,001 |
| <i>XIIa-фибринолиз, мин</i> | 19,8±1,2 | 6,7±0,2 | <0,001 |

Таким образом, у больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С выявлен гиперкоагуляционный сдвиг, который проявляется частой тромбинемией, гиперфибриногенемией, укорочением АПТВ, а также повышенной агрегацией тромбоцитов.

Разработка диагностического алгоритма для выявления нарушений в системе протеина С

Используя разработанные нами и известные методы диагностики, мы уточнили частоту различных тромбофилий, связанных с нарушениями в системе протеина С (табл. 5).

Таблица 5
Частота тромбофилий, обусловленных различными нарушениями в системе протеина С

| Нарушения в системе протеина С | Число больных | Частота |
|--|----------------------|----------------|
| Резистентность фактора Va к активированному протеину С | 72 | 70,59% |
| Высокая концентрация фактора VIII | 15 | 14,71% |
| Дефицит протеина С | 14 | 13,73% |
| Дефицит протеина S | 1 | 0,98% |
| Всего больных | 102 | 100% |

Как видно из представленной таблицы, наиболее часто встречается резистентность фактора Va к активированному протеину С, а наиболее редкой формой является дефицит протеина S. В связи с этим, последовательность выполнения диагностических тестов для идентификации указанных тромбофилий, по нашему мнению, должна быть строго определённой и соответствовать частоте нарушений в системе протеина С. Это позволяет быстрее выявить искомое тромбофилическое нарушение и экономить материальные средства, необходимые для приобретения диагностических наборов. Предлагаемый нами алгоритм для диагностики патологии антикоагулянтной системы протеина С представлен на рисунке 6.

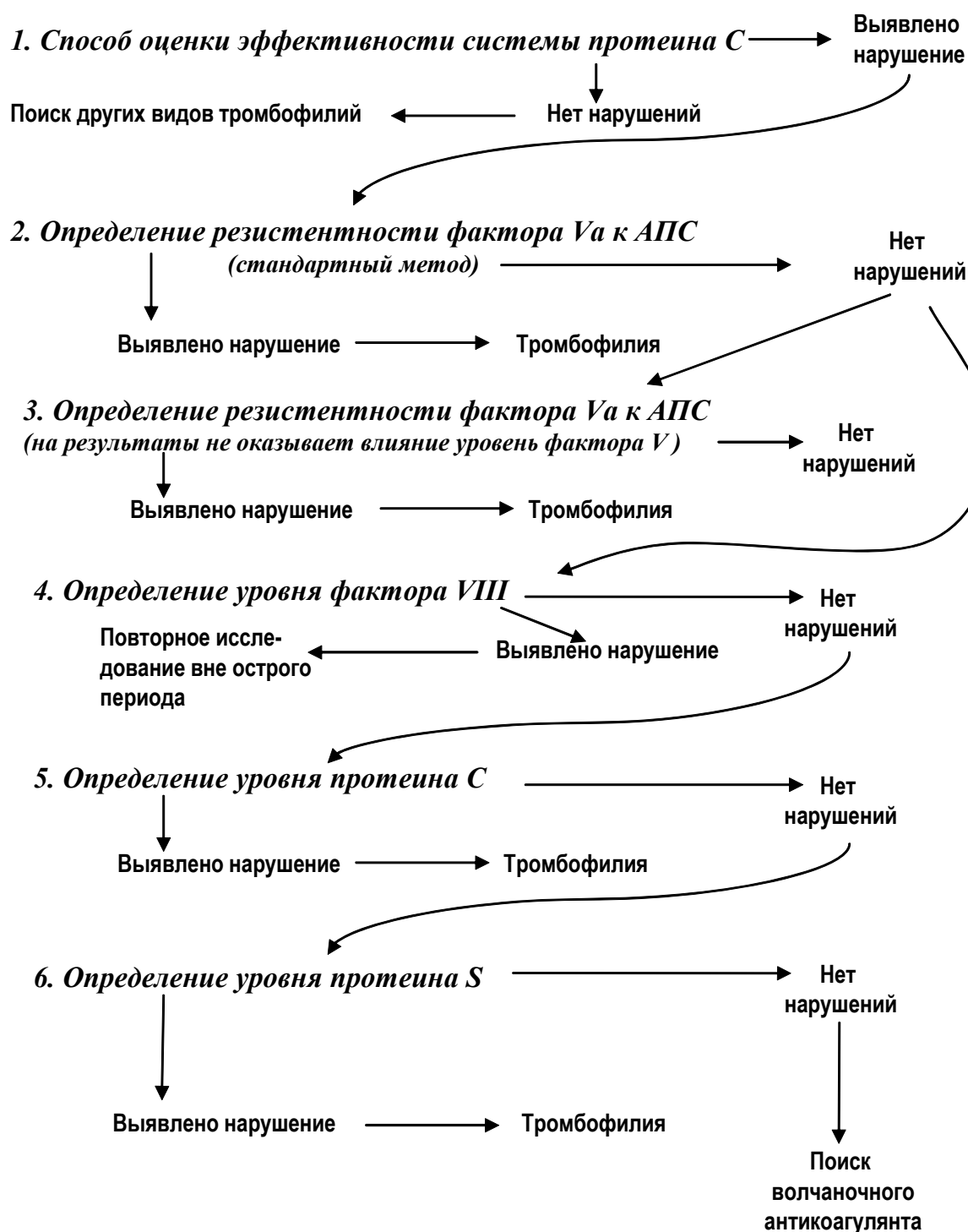


Рис.6. Алгоритм для выявления нарушений в системе протеина С.

Значение определения антитромбина III, протеина С и плазминогена у больных с ДВС синдромом

Острый и подострый ДВС-синдромы были выявлены у 85 больных (совместно с к.м.н. Д.Н.Ериным и к.м.н. Н.К.Зяблицкой). Эти пациенты были нами обследованы до начала комплексной терапии с применением свежезамороженной плазмы (СЗП) и спустя 2-5 дней от начала проведения такой терапии. Ретроспективно мы разделили этих больных на 2 группы, в зависимости от исхода заболевания (табл. 6-8). У больных с ДВС-синдромом, как следует из представленных таблиц, уровни антитромбина-III, плазминогена и показатель NR, отражающий функциональное состояние системы протеина С, были снижены. Из таблиц видно также, что при благоприятном исходе ДВС-синдрома на 2-5-й день после начала лечения нарастали уровни антитромбина-III, плазминогена и повышался показатель NR, тогда как в случаях летального исхода сохранялась депрессия компонентов антикоагулянтной системы и фибринолиза. В целом по группе больных с ДВС-синдромом летальность была 14,1%. При этом показатель летальности оказался зависим от объема заместительной терапии СЗП. При объеме заместительной терапии СЗП менее 800 мл/сутки летальность составила 27,3%, а при объеме более 800 мл/сутки летальность была 4,9% ($P < 0,05$).

Таблица 6
Уровень антитромбина-III у больных с ДВС-синдромом в процессе лечения при разных исходах

| Дни исследования | Исход | | P ₃₋₄ |
|--|---------------------------|-----------------------|------------------|
| | Благоприятный (n=73) ③ | Летальный (n=12) ④ | |
| Уровень АТ-III до лечения ① | 61,0±2,9 | 58,8±3,6 (n=12) | >0,05 |
| Через 2-5 суток после начала лечения ② | 82,7±2,8 | 63,3±4,7 (n=10) | <0,001 |
| P ₁₋₂ | <0,001 | >0,1 | - |

Таблица 7

Показатель NR у больных с ДВС-синдромом в процессе лечения при разных исходах

| Дни исследования | Исход | | P ₃₋₄ |
|--|---------------------------|-----------------------|------------------|
| | Благоприятный (n=83) ③ | Летальный (n=12) ④ | |
| Показатель NR до лечения ① | 0,63±0,01 | 0,64±0,02 (n=12) | >0,05 |
| Через 2-5 суток после начала лечения ② | 0,79±0,02 | 0,62±0,02 (n=10) | <0,001 |
| P ₁₋₂ | <0,001 | >0,1 | - |

Таблица 8

Концентрация плазминогена у больных с ДВС-синдромом в процессе лечения при разных исходах

| Дни исследования | Исход | | P ₃₋₄ |
|--|---------------------------|-----------------------|------------------|
| | Благоприятный (n=83) ③ | Летальный (n=12) ④ | |
| Уровень плазминогена до лечения ① | 54,0±1,0 | 51,1±1,1 (n=12) | >0,05 |
| Через 2-5 суток после начала лечения ② | 87,2±1,7 | 50,2±3,4 (n=10) | <0,001 |
| P ₁₋₂ | <0,001 | >0,1 | - |

Корреляционный анализ, проведенный по результатам определения уровней антитромбина-III и плазминогена разными методами (реагенты Da-de-Behring и новые отечественные хромогенные методики, разработанные совместно с проф. В.А.Макаровым, к.х.н. Т.Л.Воюшиной и к.х.н. О.А.Неведровой), выявил хорошую сопоставимость полученных результатов. Линейные коэффициенты корреляции (r) при сопоставлении этих методов составили 0,93 ($P<0,001$) для антитромбина III и 0,95 ($P<0,001$) для плазминогена.

Таким образом, сравнительные испытания новых методов с использованием отечественных хромогенных субстратов показали высокую информативность и прогностическую значимость определения антитромбина III и плазминогена у больных с ДВС-синдромом.

Нарушения в системе протеина С у больных с АФС

По своей структуре волчаночный антикоагулянт (ВА) относится к иммуноглобулинам, которые неспецифично ингибируют отрицательно заряженные фосфолипиды и тем самым удлиняют время свертывания крови в фосфолипид-зависимых методах исследования системы гемостаза [З.С.Баркаган, 1989-2005; З.С.Баркаган и соавт., 1989-2001; Е.Л.Насонов и соавт., 1995; В.П.Балуда, М.В.Балуда, 1997; Г.В.Сердюк, 2005; M.Samata et al., 1993; D.G.Federman et al., 2001; J.Nojima et al., 2002; L.Heilmann et al., 2003; B.Namjou, 2003; S.L.Perry et al., 2003 и др.]. Кроме того, инактивация фактора V протеинами С и S также происходит на фосфолипидных мембранах [E.A.Norstrom et al., 2003], и поэтому ВА препятствует этому процессу. Высказывается предположение, что к развитию тромботических осложнений у больных с АФС приводит именно нарушение инактивации фактора Va активированным протеином С [F.J.Munoz- Rodriguez et al., 2002; D.Oh et al., 2003]. Для уточнения этого предположения мы определяли эффективность системы протеина С у больных с АФС при помощи разработанного нами метода.

Показатели NR у группы больных с АФС, в контрольной группе и группе сравнения, представлены на рисунке 7.

Из рисунка видно, что у больных с АФС (n=51) показатель NR в среднем составил $0,68 \pm 0,03$, тогда как в группе сравнения этот показатель был равен $0,98 \pm 0,03$ (n=165, $P < 0,001$), т.е. так же, как и в контрольной группе $1,01 \pm 0,01$ (n=147). Эти данные подтверждают важную роль нарушений в системе протеина С в формировании тромбогенности у больных с АФС.

После курса комплексного лечения, включающего применение дискретного плазмафереза, антикоагулянтов и дезагрегантов, показатель NR у больных с АФС достоверно повысился с $0,68 \pm 0,03$ до $0,77 \pm 0,02$ ($P < 0,02$).

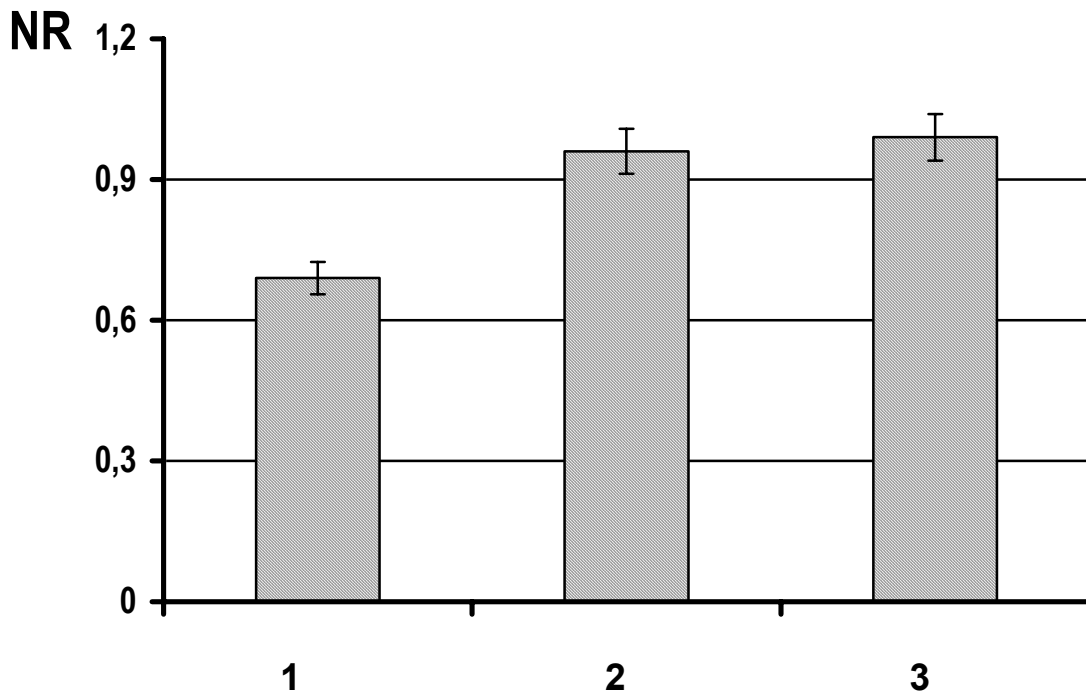


Рис. 7. Показатели NR, полученные у больных с АФС (1), в группе больных с тромбозами без АФС (2) и у здоровых людей (3).

Представленные данные свидетельствуют о том, что у больных с АФС имеются глубокие нарушения в антикоагулянтной системе протеина С, которые устраняются после комплексного лечения с включением дискретного плазмафереза в комплекс лечебных мероприятий.

Для выявления связи рецидивирования тромбозов при АФС и нарушений в системе протеина С мы использовали статистический критерий χ^2 . Было установлено, что из числа больных с АФС (n=51) нарушения в системе протеина С имелись у 24-х больных. Из их числа рецидивы тромбозов были выявлены у 16 пациентов, а из 27 больных без нарушений в системе протеина С рецидивы тромбозов были обнаружены лишь у 6 больных. Частотный анализ показал связь нарушений в системе протеина С и рецидивов тромбозов у больных с АФС (P=0,0014).

Таким образом, в патогенезе рецидивов тромбозов у больных с АФС большое значение имеет нарушение функционирования антикоагулянтной системы протеина С, а показатель NR является прогностическим критерием рецидивирования тромбозов при этом заболевании.

Доказательство ингибирующего действия волчаночного антикоагулянта на прокоагулянтную активность плазменных фосфолипидных мембран у больных с АФС

Ранее нами было выявлено снижение прокоагулянтной активности плазменных фосфолипидных мембран (ПФМ) у больных с антифосфолипидным синдромом (З.С.Баркаган и соавт., 1995; А.Н.Мамаев, 1997; А.П.Момот и соавт., 1997; Z.S.Barkagan et al., 1995). Для доказательства того, что найденное нами снижение прокоагулянтной активности ПФМ обусловлено их ингибированием волчаночным антикоагулянтом, нами была проведена серия дополнительных экспериментов с образцами БТП двадцати больных системной красной волчанкой (СКВ), осложненной антифосфолипидным синдромом.

Для устранения ингибирующего влияния волчаночного антикоагулянта на прокоагулянтную активность плазменных фосфолипидных мембран плазму больного разводили в 100 раз трис-НСI буфером (РН=7,4). Такое разведение плазмы устраняет действие ингибитора волчаночного типа путём отделения ингибитора от плазменных фосфолипидных мембран. Разведенную плазму затем фильтровали через фильтр с диаметром микропор 0,2 мкм. При этом разведенный ингибитор волчаночного типа проходил через микропоры фильтра, а ПФМ, лишённые ингибирующего влияния, оставались на поверхности фильтра, что позволяло исследовать их истинную прокоагулянтную активность (см. рис.8).

Как видно из представленного рисунка, у обследованных больных с АФС на фоне СКВ была снижена прокоагулянтная активность ПФМ до $44,9 \pm 2,1\%$. После устранения ингибирующего влияния ВА разведением прокоагулянтная активность ПФМ у этих больных достоверно повысилась до $101,9 \pm 5,2\%$ ($P < 0,001$).

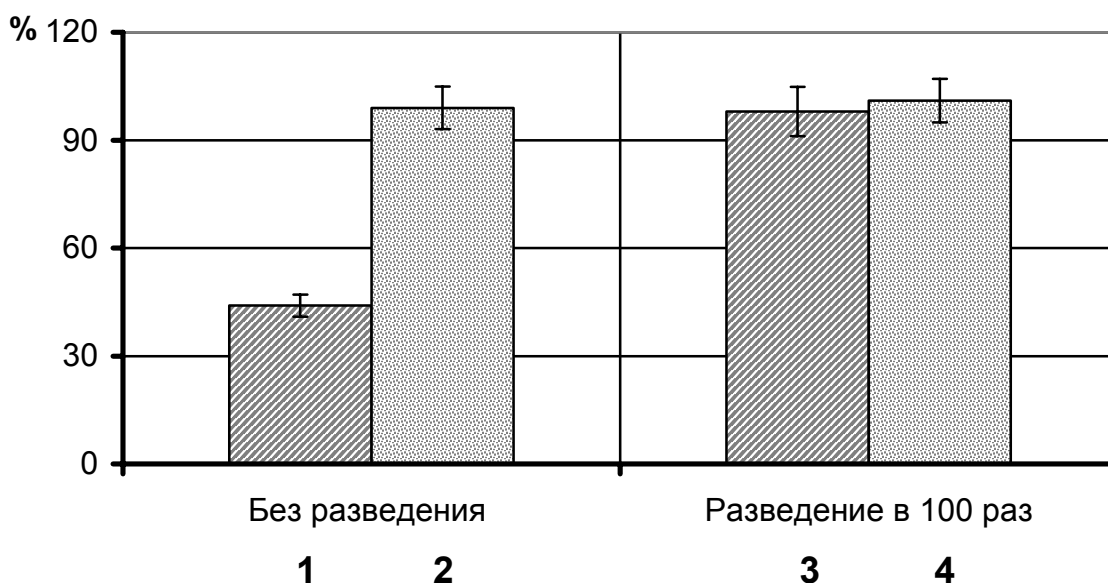


Рис.8. Прокоагулянтная активность ПФМ у больных с АФС до и после устранения ингибирующего влияния ВА (1-прокоагулянтная активность ПФМ у больных со вторичным АФС, 2-прокоагулянтная активность ПФМ у больных с системными заболеваниями соединительной ткани без АФС, 3-прокоагулянтная активность ПФМ у больных со вторичным АФС после разведения, 4 – прокоагулянтная активность ПФМ у больных с системными заболеваниями соединительной ткани без АФС после разведения).

Повышение прокоагулянтной активности ПФМ свидетельствует о том, что разведение плазмы больного с АФС устраняет ингибирующее влияние волчаночного антикоагулянта. Для контроля мы определяли прокоагулянтную активность у 25 больных с системными заболеваниями соединительной ткани без ВА (группа сравнения). Мы не обнаружили изменения прокоагулянтной активности ПФМ после разведения БТП у группы сравнения (рис.8).

Эти данные говорят о том, что снижение прокоагулянтной активности ПФМ у больных с АФС обусловлено обратимым ингибированием фосфолипидных матриц антикоагулянтом волчаночного типа.

Сопряженные изменения антикоагулянтной системы протеина С и прокоагулянтной активности ПФМ

Учитывая большую зависимость клинических проявлений АФС от состояния системы протеина С, нами были изучены сопряженные изменения в системе протеина С и фосфолипидной активации процесса свёртывания крови. Для выявления этой связи между прокоагулянтной активностью ПФМ и

системой протеина С мы использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. При сравнении была выявлена положительная корреляционная связь между этими параметрами, коэффициент корреляции R был равен 0,76 (P=0,004). Таким образом, при снижении прокоагулянтной активности ПФМ у больных с АФС закономерно снижается и показатель NR, отражающий функциональное состояние системы протеина С.

Выводы

1. В яде змеи отечественной фауны *Agkistrodon saxatilis* имеется фракция, обладающая свойствами активатора протеина С, которая по антикоагулянтному действию аналогична импортному реагенту "Protac[®]" и может быть использована в методах, оценивающих функцию системы протеина С, а также для выявления наследственных и приобретённых нарушений этой системы.
2. Разработанные методы диагностики резистентности фактора Va к активированному протеину С высокоспецифичны и позволяют диагностировать указанную тромбофилию.
3. Для диагностики нарушений в системе протеина С наиболее оптимален следующий диагностический алгоритм: оценка эффективности системы протеина С → определение резистентности фактора Va к активированному протеину С → определение уровня фактора VIII → определение концентрации протеина С → определение концентрации протеина S.
4. У больных с резистентностью фактора Va к активированному протеину С часто встречаются гиперкоагуляционный и гиперагрегационный сдвиги в системе гемостаза (гиперфибриногенемия, тромбинемия с гиперкоагуляцией по внутреннему механизму свёртывания), что требует комплексной антитромботической терапии.
5. Разработанные новые методы определения антитромбина III и плазминогена на основе новых отечественных хромогенных субстратов точны, высоковоспроизводимы и доступны отечественным диагностическим лабораториям.

6. При неблагоприятных исходах ДВС-синдрома в процессе лечения не происходит повышения уровня антитромбина III, показателя NR и плазминогена, тогда как при благоприятных исходах эти показатели нарастают.
7. У больных с АФС часто развиваются нарушения в системе протеина С, которые повышают риск рецидивов тромбозов и устраняются после лечения с использованием дискретного плазмафереза в комплексе лечебных мероприятий.
8. Способ суммарной оценки эффективности системы протеина С способен выявить тромбофилию, обусловленную высокой концентрацией фактора VIII в крови.
9. Снижение прокоагулянтной активности плазменных фосфолипидных мембран у больных с АФС обусловлено обратимым ингибированием фосфолипидных матриц антикоагулянтом волчаночного типа.

Практические рекомендации

1. Разработанные доступные методы и алгоритм диагностики нарушений в системе протеина С могут быть использованы в повседневной диагностической практике для идентификации гематогенных тромбофилий.
2. Для прогноза тромботических осложнений и контроля за эффективностью лечения больных с АФС необходимо исследовать состояние системы протеина С.
3. Активатор протеина С из яда змеи отечественной фауны *Agkistrodon saxatilis* может использоваться в повседневной диагностической практике.
4. При снижении фактора V для диагностики тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора Va к АПС, следует использовать тест смешивания исследуемой плазмы с плазмой больного с этой же тромбофилией. Это позволит избежать ошибок вследствие недостаточной концентрации фактора V в тест-системе.
5. При лечении ДВС-синдрома необходимо определить уровни антитромбина, плазминогена и показатель NR, что даёт прогностическую информацию и сведения о достаточности заместительной терапии.

6. С целью контроля эффективности терапии АФС афферентными методами следует применить способ суммарной оценки эффективности системы протеина С до и после курса лечения.
7. Для определения уровня антитромбина III и плазминогена следует использовать амидолитические методы, которые обладают высокой воспроизводимостью и не отличаются от зарубежных аналогов.

Список опубликованных работ

1. Barkagan Z.S., Tsyvkina L.P., Mamaev A.N. The influence of plasma phospholipid membranes and lupus "anticoagulants" (LA) on snake venoms clotting action. // In: 11th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. – Tel Aviv, 1994. – P.80.
2. Момот А.П., Бишевский К.М., Мамаев А.Н., Баркаган З.С. Определение и оценка участия фрагментов клеточных мембран в процессе свертывания крови. // В кн: Сборник научных трудов Российской конференции "Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии". – С-Петербург, 1995. – С.126-127.
3. Barkagan Z.S., Mamaev A.N., Momot A.P., Ceimah I. A new simple test for determination of the changes of plasma phospholipid procoagulant activity in patients with the anti-phospholipid syndrome (APS). // In: XIIIth Meeting of the International Society of Haematology. – Istanbul, 1995. – P.945.
4. Barkagan Z.S., Momot A.P., Mamaev A.N. Coagulation activity of plasma phospholipid membranes (PhM) in patients with lupus anticoagulant (LA). // In: 14th International Congress on Thrombosis. Montpellier, 1996. – Abstr.51. – P.342.
5. Barkagan Z.S., Tsyvkina L.P., Tseimakh I.Ya., Mamaev A.N. The influence of different heparins on haemocoagulant action of central-asian snake venoms. // In: 14th International Congress on Thrombosis. – Montpellier, 1996. – Abstr. 51. – P.342.
6. Баркаган З.С., Гервазиев В.Б., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Карпенко А.А., Цеймах И.Я. Первый опыт диагностики тромбофилии, обусловленной резистентностью к активированному протеину С. // Тер. архив. – 1997. – №2. – С.35-37.
7. Баркаган З.С., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Цеймах И.Я. Предварительные данные о частоте тромбофилии, обусловленной резистентностью к активированному протеину С в Российской популяции региона Сибири. // В кн: Тезисы докладов на III Всероссийской конференции "Тромбозы и геморрагии, ДВС-синдром. Проблемы лечения". – Москва, 1997. – С.16-17.
8. Баркаган З.С., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Цеймах И.Я. К методике фенотипической диагностики резистентности к протеину С. // В кн: Тезисы докладов на III Всероссийской конференции "Тромбозы и геморрагии, ДВС-синдром. Проблемы лечения". – Москва, 1997. – С.18-20.
9. Barkagan Z.S., Tsyvkina L.P., Mamaev A.N., Tseimakh I.Ya. Prevalence of APC-resistance (APC-R) among the patients with early thrombosis in the Siberian region of Russia In: XVI Congress of the International Soc. on Thrombosis and Haemostasis. – Florence, 1997. – Abstr.32. – P.126.
10. Баркаган З.С., Дорохов А.Е., Мамаев А.Н., Момот А.П., Селиванов Е.Н., Сердюк Г.В., Цеймах И.Я., Цывкина Л.П. К вопросу о критериях диагностики антифосфоли-

- пидного синдрома. // В кн: Тезисы докладов на II Всероссийском съезде ревматологов. – Тула, 1997. – С.15-16.
11. Баркаган З.С., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Цеймах И.Я. Распространенность, диагностика и клиническое значение тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора V к активированному протеину C. // Вестник Рос. Академии наук. – 1997. – №2. – С.39-40.
 12. Момот А.П., Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Бишевский К.М. Использование элиминации фосфолипидных мембран плазмы для выявления эффектов "волчаночного антикоагулянта". // Клин. лаб. диагн. – 1997. – №8. – С.20-22.
 13. Barkagan Z., Tsyvkina L., Mamaev A. Prevalence of Various Thrombophilic States among patients with early beginning recurrent Thromboses in West Siberian Population. // XIVth Meeting of the International Society of Haematology. – Stockholm, 1997. – P.147.
 14. Баркаган З.С., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н. К методике скрининговой оценки нарушений в антикоагулянтной системе протеина C-S и диагностика тромбофилии, обусловленной резистентностью к протеину C. // Сборник лекций и тезисов докладов научно-практической конференции "Профилактика, диагностика и лечение артериальных и венозных тромбозов". – Железногорск, 1998. – С.14.
 15. Momot A.P., Mamaev A.N., Barkagan Z.S. Use of new Protein C Activator for diagnostics of Protein C system disorders // 15th International Congress on Thrombosis. Antalya, - Haemostasis (supplement for abstracts). – 1998. – Abstr.410.
 16. Момот А.П., Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Неведрова О.Е., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Ерин Д.Н. Метод определения плазминогена и его диагностическое значение. // Пробл. гематол. и перел. крови, – 1999. – №1. – С.17-20.
 17. Голевцова З.Ш., Мамаева И.В., Супрун Е.В., Мамаев А.Н. Совершенствование методов контроля эффективности лечения непрямими антикоагулянтами. // Клин. лаб. диагн. – 1999. – №10. – С.42-43.
 18. Момот А.П., Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Неведрова О.Е., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Ерин Д.Н. Новые хромогенные субстраты на плазмин и тромбин. // Сборник материалов Международной научной конференции к 100-летию со дня рождения А.Л.Мясникова. "Атеротромбоз – проблема современности". – Москва, 1999. – С.87-88.
 19. Мамаев А.Н., Момот А.П., Баркаган З.С. Новый способ выявления эффектов антикоагулянтов волчаночного типа. // Клин. лаб. диагностика. – 1999. – №10. – С.46.
 20. Мамаев А.Н., Момот А.П. Способ дифференциальной диагностики тромбофилий, обусловленных нарушениями в антикоагулянтной системе PC-PS-FVa. // Клин. лаб. диагностика. – 1999. – №10. – С.46.
 21. Момот А.П., Тараненко И.А., Мамаев А.Н. Современный контроль за лечением непрямими антикоагулянтами (антагонистами витамина K). // Консилиум. – 2000. – №6 (16) – С.11-17.
 22. Баркаган З.С., Момот А.П., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Селиванов Е.В. Принципы лабораторной диагностики антифосфолипидного синдрома. // Клин. лаб. диагностика. – 2000. – №3. – С.47-51.
 23. Момот А.П., Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Неведрова О.Е., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Ерин Д.Н. Метод определения плазминогена с отечественным хромогенным субстратом и его диагностическое значение. // Клин. лаб. диагн. – 2000. – №3. – С.21-22.
 24. Баркаган З.С., Момот А.П., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Селиванов Е.В. Принципы лабораторной диагностики антифосфолипидного синдрома. //Тромбоз, гемостаз и реология. – 2000. – №3. – С.13-16.
 25. Цывкина Л.П., Момот А.П., Мамаев А.Н. К характеристике тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора Va к активированному протеину C – частота, методы

диагностики, терапия. // Консилиум. – 2000. – №6(16). – С.21-23.

26. Баркаган З.С., Цывкина Л.П., Момот А.П., Мамаев А.Н., Карпенко А.А. Диагностика и клиническое значение тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора Va к активированному протеину С в регионе Сибири. // Сборник тезисов III Всероссийской научно-практической конференции "Современные методы диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы". – Кемерово, 2000. – С.156-157.

27. Момот А.П., Тараненко И.А., Мамаев А.Н. Влияние фенилина и кумаринов на динамику депрессии витамин К-зависимых факторов свертывания и антикоагулянтов. // Сборник тезисов V Сибирской научно-практической конференции по актуальным вопросам кардиологии. – Красноярск, 2000 г. – С.408-411.

28. Баркаган З.С., Момот А.П., Мамаев А.Н., Цывкина Л.П., Сердюк Г.В. Современное учение о тромбофилиях. // Материалы конференции "Острый коронарный синдром: проблемы патогенеза, профилактики, диагностики, классификации, терапии". – Томск, 2001. – С.195-202.

29. Мамаев А.Н., Момот А.П., Сердюк Г.В. Клиническая апробация метода определения активности ингибиторов волчаночного типа. // Материалы конференции "Актуальные вопросы лабораторной диагностики и лечения нарушений гемостаза". – Барнаул, 2001. – С.109-110.

30. Тараненко И.А., Момот А.П., Мамаев А.Н., Баркаган З.С. Сравнительный анализ угнетения выработки витамин К-зависимых факторов свертывания и нарушений в системе протеина С при лечении оральными антикоагулянтами кардиологических больных. // Материалы конференции "Острый коронарный синдром: проблемы патогенеза, профилактики, диагностики, классификации, терапии". – Томск, 2001. – С.211-213.

31. Мамаев А.Н. Вычисление прогрессивной активности антитромбина III без построения калибровочных кривых. // Материалы конференции "Актуальные вопросы лабораторной диагностики и лечения нарушений гемостаза". – Барнаул, 2001. – С.110-112.

32. Тараненко И.А., Мамаев А.Н., Момот А.П. Динамика витамин К-зависимых факторов свертывания и протеинов С+S в процессе лечебного применения антикоагулянтов непрямого действия. // Материалы II Российской конференции "Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины". – Москва, 2001. – С.116-117.

33. Шилова А.Н., Мамаев А.Н., Момот А.П., Ельчанинов В.В., Коваль А.Д. Отработка скрининга выявления нарушений в системе протеина С в условиях гепаринотерапии у больных с внутрисосудистым свёртыванием крови. // Материалы конференции "Актуальные вопросы практической медицины". – Барнаул, 2001. – С.20-21.

34. Сердюк Г.В., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н. Методы медикаментозной профилактики невынашивания беременности при антифосфолипидном синдроме. // Материалы конференции "Актуальные вопросы практической медицины". – 2001. – Барнаул, 2001. – С.32-33.

35. Мамаев А.Н., Момот А.П. "Кофакторный эффект" в коагуляционных тестах смешивания с нормальной плазмой у больных с антифосфолипидным синдромом. // Материалы IV научно-практической конференции "Современные методы диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы". – Новосибирск, 2001. – С.162-163.

36. Мамаев А.Н. Значительное (>5SD) повышение уровня протеина С у больной с волчаночным антикоагулянтом. // Материалы IV научно-практической конференции "Современные методы диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы". – Новосибирск, 2001. – С.165-166.

37. Мамаев А.Н. Математический подход к построению калибровочных кривых для определения активности антитромбина III. // Материалы II Российской конференции "Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины". – Москва, 2001. – С.117.

38. Мамаев А.Н., Цеймах И.Я. Сравнительная характеристика показателей метода определения резистентности к протеину С и метода скрининговой оценки нарушений в антикоагулянтной системе протеина С. // Вестник Рос. Гос. мед. универ. – 2002. – №1 (22). – С.138.
39. Мамаев А.Н., Зыбарев А.А. Прокоагулянтная активность фосфолипидных фрагментов клеточных мембран у больных антифосфолипидным синдромом. // Вестник Рос. гос. мед. универ. – 2002. – №1(22). – С.139.
40. Цеймах И.Я., Мамаев А.Н. Оптимальный алгоритм для выявления нарушений в системе протеина С у больных с тромботическими нарушениями. // Вестник Рос. Гос. мед. универ. – 2002. – №1 (22). – С.160.
41. Баркаган З.С., Котовщикова Е.Ф., Мамаев А.Н., Костюченко Г.И. О сочетании резистентности фактора Va к активированному протеину С и гипергомоцистеинемии. // В кн: Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. – Москва, 2002. – С.29-30.
42. Момот А.П., Мамаев А.Н., Баркаган З.С. Способ контроля эффективности заместительной терапии ДВС-синдрома. // Клин. лаб. диагн. – 2002. – №9. –С.27-28.
43. Зяблицкая Н.К., Момот А.П., Мамаев А.Н., Макаров В.А. Сравнение нового и амидолитического методов определения уровня плазминогена. // Клин. лаб. диагн. – 2002. – №10. –С.31.
44. Мамаев А.Н. Классификационные признаки коагулометров. // Клин. лаб. диагн. – 2002. – №10. – С.32.
45. Тараненко И.А., Мамаев А.Н., Момот А.П. Влияние фенилина и кумаринов на динамику депрессии витамин К-зависимых факторов свёртывания и антикоагулянтов. // Тезисы докладов VII Сибирской научно-практической конференции по актуальным вопросам кардиологии. – Красноярск, 2002. – С.175-177.
46. Шилова А.Н., Ходоренко С.А., Воробьёв П.А., Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Момот А.П., Сура М.В. Сравнительное изучение эффективности профилактического применения нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов при хирургическом лечении онкологических больных. // Клин. геронтол. – 2002. – №4. – С.11-17.
47. Шилова А.Н., Ходоренко С.А., Воробьёв П.А., Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Момот А.П. Эффективность профилактического применения нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов при хирургическом лечении онкологических больных. // Пробл. гематол. – 2002. – №2. – С.10-16.
48. Воробьёв П.А., Шилова А.Н., Ходоренко С.А., Мамаев А.Н., Авксентьева М.В., Сура М.В., Баркаган З.С., Момот А.П. Клинико-экономический анализ профилактического применения нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов при хирургическом лечении онкологических больных. // Совр. онкология. – 2002. – №2(4). – С.99-109.
49. Воробьёв П.А., Баркаган З.С., Сура М.В., Авксентьева М.В., Шилова А.Н., Ходоренко С.А., Мамаев А.Н., Момот А.П., Папшева Е.В. Клинико-экономический анализ применения далтепарина натрия (фрагмин) в сравнении с нефракционированным гепарином у онкологических больных. // Пробл. стандартиз. в здравоохран. – 2002. – №5. – С.8-16.
50. Мамаев А.Н. Момот А.П., Зяблицкая Н.К. Критерий оценки эффективности гемотрансфузионной терапии при ДВС-синдроме. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции "Настоящее и будущее технологичной медицины". – Ленинск-Кузнецкий, 2002. – С.50.
51. Воробьёв П.А., Баркаган З.С., М.В.Сура, Папшева Е.В., Авксентьева М.В., Шилова А.Н., Ходоренко С.А., Мамаев А.Н., Момот А.П. Клинико-экономический анализ применения препарата фрагмин в сравнении с нефракционированным гепарином у онкологических больных. // Пробл. стандартиз. в здравоохран. – 2002. – №5. – С.75.

52. Мамаев А.Н., Момот А.П., Цывкина Л.П., Сердюк Г.В. Нарушения в системе протеина С у больных с антифосфолипидным синдромом. // Материалы конференции "Новое в изучении патогенеза, диагностике профилактике и лечении патологии гемостаза". – Москва, 2002. – С.90.
53. Неведрова О.Е., Воюшина Т.Л., Момот А.П., Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Макаров В.А. Наборы с отечественными хромогенными субстратами для диагностики патологии гемостаза. // Пособие для врачей. – Москва, 2002. – 23с.
54. Мамаев А.Н., Шилова А.Н. Способ для диагностики и контроля эффективности заместительной терапии ДВС-синдрома. // Вестник Рос. гос. мед. универ. – 2002. – №1 (22) – С.20.
55. Момот А.П., Мамаев А.Н., Соколов Э.А., Ельчанинов В.В., Коваль А.Д. Новый активатор протеина С и его применение для определения нарушений в системе протеина С. // Материалы конференции "Новое в изучении патогенеза, диагностике профилактике и лечении патологии гемостаза". – Москва, 2002. – С.93.
56. Момот А.П., Мамаев А.Н., Ельчанинов В.В., Коваль А.Д., Соколов Э.А., Дударев В.А., Баркаган З.С. Новый активатор протеина С и его применение для диагностики тромбофилий. // Клин. лаб. диагностика. – 2002. – №9. – С.25.
57. Мамаев А.Н., Момот А.П., Сердюк Г.В. Нарушения в антикоагулянтной системе протеина С у больных с волчаночным антикоагулянтом. // Тезисы докладов VII Сибирской научно-практической конференции по актуальным вопросам кардиологии. – Красноярск, 2002. – С.119-120.
58. Мамаев А.Н., Момот А.П., Тараненко И.А., Шахова Т.В. Диагностика тромбофилий, обусловленных нарушениями в системе протеина С. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции "Настоящее и будущее технологичной медицины", – Ленинск-Кузнецкий, 2002. – С.48.
59. Волощенко К.А., Андреева О.А., Мамаев А.Н., Сидор Н.В. Терапия нарушений системы гемостаза у тяжело обожженных на этапе квалифицированной медицинской помощи. // Материалы конгресса "Актуальные проблемы современной хирургии". – Москва, 2003. – С.237.
60. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Баркаган З.С., Момот А.П., Мамаев А.Н., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. Антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens*. // Тромбоз гемостаз и реология. – 2003. – №4(16). – С.36-39.
61. Баркаган З.С., Момот А.П., Мамаев А.Н., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Неведрова О.А., Шилова А.Н., Зяблицкая Н.К. Диагностика и оценка эффективности терапии основных видов патологии гемостаза. // Методические рекомендации. – Харьков, 2003. – 44с.
62. Мамаев А.Н., Момот А.П., Тараненко И.А. Сравнение результатов определения резистентности к протеину С и метода скрининга нарушений в антикоагулянтной системе протеина С. // Материалы V межрегиональной научно-практической конференции "Современные методы диагностики". – Барнаул, 2003. – С.43.
63. Баркаган З.С., Момот А.П., Сердюк Г.В., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Тараненко И.А., Селиванов Е.В. Диагностика антифосфолипидного синдрома. // Методическое пособие - Барнаул, 2003. – 38 с.
64. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Шевченко Н.М., Звягинцева Т. Н., Мамаев А.Н., Момот А.П. Иммуностимулирующая и антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens*. // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – №4 (48). – С.11-13.
65. Баркаган З.С., Момот А.П., Сердюк Г.В., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Тараненко

- И.А., Селиванов Е.В. Диагностика антифосфолипидного синдрома. // Методическое пособие. – Барнаул, 2003. – 38 с.
66. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Мамаев А.Н., Момот А.П., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. Антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens*. // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2003. – №11(136). – С.532-534.
67. Баркаган З.С., Момот А.П., Мамаев А.Н., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Неведрова О.А., Шилова А.Н., Зяблицкая Н.К. Новый метод определения антитромбина III и его диагностическое значение при обследовании больных с онкологическими заболеваниями. // Омский научный вестник. – 2003. – №3(24). – С.67-71.
68. Баркаган З.С., Момот А.П., Мамаев А.Н., Ельчанинов В.В., Соколов Э.А., Коваль А.Д. Диагностика тромбофилий новым активатором протеина С. // Материалы V съезда гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь "Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии". – Минск, 2003. – С.18-19.
69. Мамаев А.Н., Момот А.П., Бишевский К.М. Активность фосфолипидных фрагментов клеточных мембран у больных с волчаночным антикоагулянтом. // Материалы V съезда гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь "Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии". – Минск, 2003. – С.94-95.
70. Суханова Г.А., Баркаган З.С., Котовщикова Е.Ф., Мамаев А.Н., Цывкина Л.П. Тромботические мезенхимальные дисплазии и их связь с другими тромбофилиями. // Гематол. и трансфузиол. – 2003. – №6. – С.13.
71. Мамаев А.Н., Момот А.П., Зяблицкая Н.К. Дифференциальная диагностика тромбофилий вследствие нарушений в антикоагулянтной системе протеина С. // Материалы V съезда гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь "Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии". – Минск, 2003. – С.95.
72. Неведрова О.Е., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Момот А.П., Мамаев А.Н., Савин А.А. Новые хромогенные субстраты для диагностики патологии гемостаза. // Материалы конференции "Actualitati in hematology si transfuziologie", – Кишинёв, 2003. – С.96-99.
73. Момот А.П., Мамаев А.Н., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Неведрова О.А., Зяблицкая Н.К. Клиническая апробация новых хромогенных субстратов, специфичных к тромбину и плазмину. // Материалы конференции итоговой научной конференции, посвященной 50-летию АГМУ. – Барнаул, 2004. – С.191-192.
74. Баркаган З.С., Сердюк Г.В., Момот А.П., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н., Тараненко И.А. Новые современные подходы к диагностике антифосфолипидного синдрома. // Материалы конференции итоговой научной конференции, посвященной 50-летию АГМУ. – Барнаул, 2004. – С.61-62.
75. Мамаев А.Н. Классификационные признаки приборов, регистрирующих коагуляцию. // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2004. – №3. – С.78.
76. Мамаев А.Н., Момот А.П., Вольф В.А., Буевич Е.И., Цывкина Л.П. Количественный метод определения волчаночного антикоагулянта. // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции "Интенсивная медицинская помощь: проблемы и решения". – г.Ленинск-Кузнецкий, 2004. – С.301-302.
77. Мамаев А.Н., Момот А.П., Цывкина Л.П. и соавт. Метод дифференциации тромбофилий, обусловленных нарушениями в антикоагулянтной системе протеина С. // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции "Интенсивная медицинская помощь: проблемы и решения". – г.Ленинск-Кузнецкий, 2004. – С.303-304.
78. Баркаган З.С., Момот А.П., Мамаев А.Н., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Неведрова О.А., Шилова А.Н., Зяблицкая Н.К. Новый метод определения антитромбина III и его диагностическое значение. // Клини. лаб. диагностика. – 2004. – №7. – С.18-21.

79. 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. // Материалы 1-й Украинской конференции: Тромбозы в клинической практике: профилактика, диагностика и лечение. – Киев, 2004. – С.132-133.
80. Баркаган З.С., Сердюк Г.В., Цывкина Л.П., Костюченко Г.И., Мамаев А.Н., Котовщикова Е.Ф. Тактика ведения больных при гематогенных тромбофилиях. // Сиб. мед. журнал. – 2004. – №5. – С.103-104.
81. Баркаган З.С., Цывкина Л.П., Котовщикова Е.Ф., Мамаев А.Н., Суханова Г.А., Варавская Ю.В., Костюченко Г.И. Ранние ишемические инсульты и их связь с гематогенными тромбофилиями. // Сиб. консилиум. – 2004. – №4 (34). – С.6-7.
82. Баркаган З.С. Суханова Г.А., Варавская Ю.В., Цывкина Л.П., Котовщикова Е.Ф., Мамаев А.Н., Костюченко Г.И. Нарушения гемостаза у больных с ранними ишемическими инсультами. // Гематол. и трансфузиол. – 2004. – №1. – С. 24-26.
83. Момот А.П., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Неведрова О.А., Мамаев А.Н., Шилова А.Н., Зяблицкая Н.К. Новые хромогенные субстраты к тромбину и плазмину и результаты их клинической апробации. // Материалы Российской научно-практической конференции "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии". – Санкт-Петербург, 2004. – С.98-99.
84. Мамаев А.Н. Случай значительного (>5SD) повышения протеина С у больной с первичным антифосфолипидным синдромом. // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции "Интенсивная медицинская помощь: проблемы и решения", г. Ленинск-Кузнецкий, 2004. – С.300-301.
85. Баркаган З.С., Воробьев П.А., Сура М.В., Папшева Е.В., Авксентьева М.В., Шилова А.Н., Ходоренко С.А., Мамаев А.Н., Момот А.П. Клинико-экономический анализ применения препарата Фрагмин в сравнении с нефракционированным гепарином у онкологических больных. // Пробл. стандартиз. в здравоохран. – 2004. – №3. – С.74-78.
86. Мамаев А.Н., Момот А.П., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Цывкина Л.П., Неведрова О.Е. Способ лабораторного контроля гепаринотерапии. // Клиническая диагностика. – №9. – 2004. – С.72.
87. Момот А.П., Зяблицкая Н.К., Мамаев А.Н. О контроле достаточности трансфузий свежзамороженной плазмы при остром и подостром ДВС-синдроме. // Материалы конференции Российской Академии естествознания. – Анталия, 2004. – С.135-136.
88. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Цывкина Л.П. К методике распознавания и частоте резистентности фактора Va к активированному протеину С. // Омский научный вестник. – 2005. – №1 (30). – С.80-85.
89. Сердюк Г.В., Момот А.П., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н. Использование скрининговых и противовесных тестов в диагностике антифосфолипидного синдрома. // Омский научный вестник – 2005. – №1(30). – С.249-252.
90. Мамаев А.Н., Цывкина Л.П., Шилова А.Н., Ходоренко С.А., Назаров А.В., Россоха А.В. Новый амидолитический метод определения антитромбина III и его значение при обследовании больных раком желудка и толстой кишки. // В сб.: Новые технологии в онкологической практике (тезисы докладов Российской научно-практ. конференции с международным участием) – Барнаул, 2005. – С.253-254.
91. 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. – Москва, 2005. – С.219.
92. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Морозова Л.И., Цывкина Л.П., Мамаева И.В. Опыт успешного применения рекомбинантного фактора VIIa (НовоСэвен) в терапии терминаль-

- ных акушерских кровотечений. // Материалы семинара "Новые медицинские технологии в акушерстве, гинекологии и неонатологии". Клинические лекции, тезисы докладов под редакцией профессора Т.А.Фёдоровой. – Москва, 2005. – С.21-23.
93. Мамаев А.Н., Цывкина Л.П., Андагулов К.Б., Нуразханова Ж.Ш. Дифференциальная диагностика тромбофилических синдромов вследствие нарушений в антикоагулянтной системе протеина С, основанная на тестах смешивания. // Материалы 2 научно-практической конференции республики Казахстан "Актуальные вопросы гематологии и внутренних болезней". – Караганда, 2005. – С.171.
94. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Морозова Л.И., Мамаева И.В. Опыт применения рекомбинантного активированного фактора VII в терапии острого ДВС-синдрома. // Омский научный вестник – 2005. – №1 (30). – С.85-86.
95. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Ходоренко С.А., Цывкина Л.П. Мамаева И.В., Мазикова Ю.Ю., Россоха А.В. Опыт применения препарата НовоСеვენ в терапии терминальных кровотечений. // Омский научн. вестник – 2005. – №1 (30). – С.86.
96. Карпенко А.А., Мамаев А.Н., Хореев Н.Г., Субботин Ю.Г., Яшин А.Н. О безопасности применения лечебных доз фраксипарина (Фраксоди) при терапии острых флелотромбозов. // Омский научн. вестник – 2005. – №1 (30). – С.143.
97. Кузнецова Т.А., Момот А.П., Мамаев А.Н., Шевченко Н.М., Беседнова Т.Н., Звягинцева Н.Н. Гепариноподобная активность фракции из бурой водоросли *Fucus evanescens*. // Омский научный вестник – 2005. – №1 (30). – С.176-178.
98. Андагулов К.Б., Мамаев А.Н., Нуразханова Ж.Ш., Сидоренко М.М. Контроль антикоагулянтной терапии больных антифосфолипидным синдромом. // Материалы 2 Республиканской научно-практической конференции "Актуальные вопросы гематологии и внутренних болезней". – Караганда, 2005. – С.143-144.
99. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Цывкина Л.П., Мамаева И.В., Ходоренко С.А. Назаров А.В. Опыт использования рекомбинантного фактора VIIa в терапии кровотечений после хирургического лечения онкологических заболеваний. // В кн. "Современные технологии в онкологии: материалы VI Всероссийского съезда онкологов". – Том II. – Москва, 2005. – С.263.
100. Мамаев А.Н., Цывкина Л.П., Шилова А.Н., Назаров А.В., Ходоренко С.А. Частота выявления высокого уровня коагуляционного фактора VIII у больных с онкологическими заболеваниями желудочно-кишечного тракта. // В кн. "Современные технологии в онкологии: материалы VI Всероссийского съезда онкологов". – Том II. – Москва, 2005. – С.368.
101. Андагулов К.Б., Мамаев А.Н., Сидоренко М.М., Нуразханова Ж.Ш. Оптимальный алгоритм для выявления нарушений в системе протеина С у больных с тромботическими нарушениями. // Материалы 2 научно-практической конференции республики Казахстан "Актуальные вопросы гематологии и внутренних болезней". – Караганда, 2005. – С.143.
102. Мамаев А.Н., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Цывкина Л.П., Шилова А.Н., Ходоренко С.А. Назаров А.В., Баркаган З.С. Новый амидолитический метод определения анти-тромбина III и его значение при обследовании больных с онкологическими заболеваниями ЖКТ. // В кн. "Современные технологии в онкологии: материалы VI Всероссийского съезда онкологов". – Москва, 2005. – С.366-367.
103. Баркаган З.С., Котовщикова Е.Ф., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н. Влияние тиенопиридиновых антиагрегантов на тромбоцитарное, коагулянтное и антикоагулянтное звенья гемостаза при лечении тромбозов и тромбофилий. // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2005. – №3(23). – С.10-15.

Патенты и изобретения

1. Баркаган З.С., Цывкина Л.П., Мамаев А.Н. Способ диагностики тромбофилии, обус-

- ловленной резистентностью фактора V к активированному протеину C. Патент РФ №2129282 от 20 апреля 1999 г.
2. Баркаган З.С., Мамаев А.Н., Момот А.П., Бишевский К.М. Способ определения волчаночного антикоагулянта. Патент РФ №2181203 от 10 апреля 2002 г.
 3. Момот А.П., Мамаев А.Н., Сердюк Г.В. Способ диагностики антифосфолипидного синдрома. Патент РФ №2186391 от 27 июля 2002 г.
 4. Момот А.П., Ельчанинов В.В., Соколов Э.А., Мамаев А.Н. Коваль А.Д. Способ получения активатора протеина C. Патент РФ №2184976 от 10 июля 2002 г.
 5. Мамаев А.Н., Момот А.П., Баркаган З.С. Способ контроля эффективности заместительной терапии при ДВС-синдроме. Патент РФ №2190855 от 10 июля 2002 г.
 6. Мамаев А.Н., Момот А.П. Способ диагностики тромбофилии, обусловленной резистентностью фактора V к активированному протеину C. Патент РФ №2205411 от 27 мая 2003 г.
 7. Момот А.П., Мамаев А.Н., Зыбарев А.А. Способ диагностики тромбофилии, обусловленной высокой активностью коагуляционного фактора VIII. Решение о выдаче патента на изобретение по заявке №2002120164/15 (021090) от 10.11.2003. (Приоритет от 27.04.2002).
 8. Мамаев А.Н., Бишевский К.М., Мамаева И.В. Способ получения реактива, содержащего активированный коагуляционный фактор X. Решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2000130830/14 от 26 апреля 2002.
 9. Момот А.П., Тараненко И.А., Мамаев А.Н. Способ контроля лечения непрямими антикоагулянтами. Патент РФ №2222019 от 20 января 2004 г.
 10. Шевченко Н.М., Звягинцева Н.М., Исаков В.В., Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Момот А.П., Мамаев А.Н. Средство, обладающее антикоагулянтным и иммуностропным действием. Патент РФ №2247574 от 10 марта 2005 года.
 11. Мамаев А.Н., Момот А.П., Макаров В.А., Воюшина Т.Л., Шахматов И.И. Способ определения концентрации гепарина. Патент РФ №2249819 от 10 апреля 2005 г.
 12. Момот А.П., Тараненко И.А., Сердюк Г.В., Мамаев А.Н. Способ диагностики антифосфолипидного синдрома. Патент РФ №2254572 от 20 июня 2005 года.
 13. Айсина Р.Б., Булыгин О.Ю., Варфоломеев С.Д., Воюшина Т.Л., Мухаметова Л.И., Мамаев А.Н., Момот А.П. Способ определения тканевого активатора плазминогена. Решение о выдаче патента по заявке №2003131106/15 (033477) от 14 января 2005 г.
 14. Айсина Р.Б., Булыгин О.Ю., Мухаметова Л.И., Варфоломеев С.Д., Мамаев А.Н., Момот А.П. Способ получения растворимого фибрин-мономера. Решение о выдаче патента по заявке №2003131105/15 от 28 января 2005 г.
 15. Момот А.П., Ельчанинов В.В., Айсина Р.Б., Булыгин О.Ю., Мамаев А.Н., Коваль А.Д. Способ получения тромбиноподобного коагулирующего фермента. Патент РФ №2262947 от 27 октября 2005 года.

УДК 616.151.55; 616-005.6; 616.151.511; 616.15-07

Подписано в печать 10 мая 2006 г. Формат 60×84/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,15. Тираж 120 экз. Заказ 54.

Отпечатано в типографии "Принтэкспресс"

656049, г.Барнаул, ул.Кирова, 47

email: printex2005@gmail.com