

Министерство здравоохранения Российской Федерации
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ

УТВЕРЖДЕНО
Решением Ученого совета
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России
« 17 » ноября 2015г.

А.Л.БЕРКОВСКИЙ, Е.В.СЕРГЕЕВА, А.В.СУВОРОВ,
А.Л.МЕЛКУМЯН, А.А.КОЗЛОВ, Е.А.НЕШКОВА, Г.А.ЯРОВАЯ.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕПАРИНА

Учебно-методическое пособие

Москва
2015

УДК 616-071
ББК 53.4
Б 489

Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Мелкумян А.Л., **Козлов А.А.**, Нешкова Е.А., Яровая Г.А. Методы определения активности гепарина : учебно-методическое пособие / А.Л. Берковский, Е.В.Сергеева, А.В.Суворов, АЛ.Мелкумян, **А.А.Козлов**, Е.А.Нешкова, Г.А.Яровая; ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». - М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015. – 64 с. ISBN 978-5-7249-2441-2.

Цель учебно-методического пособия - ознакомить специалистов с современными методами определения активности гепарина. Эффективность и безопасность антикоагулянтной терапии во многом зависит от правильного выбора дозы применяемого гепарина. Это положение определяет необходимость тестирования активности гепарина как в фармацевтических препаратах, так и для клинических целей. Содержание пособия соответствует содержанию образовательной программы высшего образования – подготовки кадров высшей квалификации в ординатуре и дополнительной профессиональной программы переподготовки врачей по специальности «Клиническая лабораторная диагностика».

В представленном учебно-методическом пособии с современных позиций описаны структура и свойства гепарина, клинические аспекты гепаринотерапии, методы контроля активности гепарина в препаратах или субстанциях, предназначенных для использования в клинической практике или для производства фармацевтических препаратов, в зависимости от молекулярной массы гепарина (нефракционированный и низкомолекулярный гепарины) и способам индикации его активности (коагулологические методы и методы с использованием хромогенных субстратов). Описаны наиболее специфические и чувствительные методы определения активности гепаринов и тест-системы для их проведения.

Данное учебно-методическое пособие разработано и подготовлено сотрудниками кафедры биохимии РМАПО, МБОУ «Общество больных гемофилией», научно-производственным отделом «РЕНАМ», с участием сотрудников Учебно-методического управления РМАПО в соответствии с системой стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Учебно-методическое пособие предназначено для врачей клинко-диагностических лабораторий и научных сотрудников, производителей и разработчиков технологий получения препаратов гепарина, а также слушателей циклов повышения квалификации врачей по специальности «Клиническая лабораторная диагностика».

УДК 616-071

ББК 53.4

Табл. 13. Ил. 3. Библиогр.: 24 назв.

Рецензенты: д.м.н., профессор «ФГБУ НЦССХ им.Бакулева А.Н.» - **Самсонова Н.Н.**
д.м.н., профессор ГБОУ ДПО РМАПО - **Васильев С.А.**
д.м.н., профессор ГБОУ ДПО РМАПО - **Долгов В.В.**
к.м.н., доцент ГБОУ ДПО РМАПО - **Щетникович К.А.**

ISBN 978-5-7249-2441-2

©ГБОУ ДПО РМАПО, 2015

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ III – антитромбин III

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

в/в - внутривенно

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГИТ - гепарин-индуцируемая тромбоцитопения

ГОСТ - государственный стандарт Российской Федерации

ДВС-синдром - синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания
крови

ИБС - ишемическая болезнь сердца

МЕ - международные единицы

НМГ - низкомолекулярный гепарин

НФГ - нефракционированный гепарин

ОИМ - острый инфаркт миокарда

ОП - оптическая плотность

п/к - подкожно

РСО - рабочий стандартный образец

ТЭЛА - тромбоэмболия легочной артерии

Ф – фактор свертывания крови

ФСВОК - Федеральная система внешней оценки качества клинических
лабораторных исследований

BCSH - British Committee for Standards in Haematology, Британский Комитет по
стандартизации в гематологии

CAP - College of American Pathologists, Колледж Американских Патологов

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, Институт клинической и
лабораторной стандартизации

ЕСАТ - External quality Control of diagnostic Assays and Tests, Международная
программа внешнего контроля качества для лабораторий, работающих
в области тромбозов и гемостаза

ISO - International Organization for Standardization, Международная организация стандартизации

ISTH/ICSH - International Society on Thrombosis and Haemostasis / International Council for Standardization in Haematology, Международные Общества тромбоза и гемостаза, стандартизации в гематологии.

IU – международные единицы (ME).

NEQUAS - United Kingdom National External Quality Assessment Schemes, Международная Программа контроля качества лабораторных реагентов для исследования гемостаза

NIBSC - National Institute for Biological Standards and Control, Национальный Институт биологических стандартов и контролей

pNA - п-нитроанилин

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	6
1. Структура и свойства гепарина	7
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	13
2. Клинические аспекты гепаринов. Осложнения гепаринотерапии	14
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	17
3. Методы определения гепарина. Общие положения	17
3.1. Методы анализа препаратов гепарина	18
3.2. Диагностические методы определения гепарина	20
3.3. Контроль качества тестирования	20
3.4. Коагулологические методы	22
3.5. Хромогенные методы	27
3.6. Фондапаринукс натрия	29
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	29
4. Методы, применяемые для определения активности НФГ и НМГ	30
<i>Контрольные вопросы</i>	31
5. Рекомендуемые методы определения активности гепарина	32
5.1. Определение НМГ в препаратах и субстанциях хромогенным методом	32
5.2. Определение НФГ в препаратах коагулологическим методом	44
5.3. Мониторинг гепаринотерапии методом АЧТВ	49
5.4. Определение антиХа активности коагулологическим методом	50
5.5. Определение антиХа активности хромогенным методом	53
5.6. Определение фондапарина хромогенным методом	56
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	60
Заключение	60
Глоссарий	61
Список литературы	62
Основная	62
Дополнительная	62
Интернет-ресурсы	63

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в развитых странах тромбозы и тромбоэмболические осложнения остаются основной причиной заболеваемости и смертности. Тромбоз глубоких вен и связанные с ним осложнения (в первую очередь тромбоэмболия легочной артерии - ТЭЛА) относятся к наиболее распространенным заболеваниям системы кровообращения, представляющим опасность для жизни больных.

Ежегодно в разных странах мира тромбоз глубоких вен и ТЭЛА диагностируют у 100-160 человек на 100 000 населения. Около 30% из них умирают в ближайший месяц, еще у 20% больных в течение последующих двух лет развивается рецидив заболевания [Савельев В.С., Гологорский В.А., Кириенко А.И., Гельфанд Б.Р., 2001], что свидетельствует о том, что тромбозы являются частой причиной заболеваемости и смертности населения [Ferro J.M., 2003; Fuster V., Vadimon L., Vadimon J.J., Chesebro J.H., 1992]. По данным патологоанатомических исследований, у 50–80% больных, умерших от ТЭЛА, это осложнение не было диагностировано [Stevanovic G., Tucakovic G., Dotlic R., Kanjuh V., 1986]. Не получая адекватного лечения, многие больные умирают в первые часы от начала заболевания. Летальность среди не леченых пациентов достигает 40%, тогда как при проведении своевременной адекватной терапии она не превышает 10% [Stevanovic G., Tucakovic G., Dotlic R., Kanjuh V., 1986; Caprini J.A., Tapson V.F., Hyers T.M., Waldo A.L., Wittkowsky A.K., Friedman R., 2005].

Для профилактики и лечения тромбозов и тромбоэмболических осложнений на протяжении многих десятилетий широко используются антикоагулянтные препараты. По механизму действия антикоагулянтные препараты подразделяются на антикоагулянты прямого и непрямого действия. Первые действуют путем прямого ингибирования активности тромбина и других факторов свертывания крови, вторые ингибируют синтез факторов

свертывания крови, зависимых от витамина К. Доминирующим антикоагулянтом прямого действия является гепарин. Лекарственные препараты гепарина, используемые в медицинской практике, делятся на препараты нефракционированного гепарина (НФГ) и низкомолекулярного гепарина (НМГ).

Данная работа посвящена методами определения активности гепарина, корректность которых принципиально значима как для производства фармацевтических препаратов, так и для контроля гепаринотерапии в условиях клинической практики. Необходимость данного контроля обусловлена использованием различных источников и технологий для получения лекарственных средств этого прямого антикоагулянта, гетерогенностью состава различных гепаринов и необходимостью определения реального уровня его активности у конкретного пациента для проведения эффективной и безопасной гепаринотерапии.

В настоящее время по объективным причинам отсутствует консенсусное мнение о «золотом стандарте» методического подхода к определению активности гепарина. Целью настоящего руководства является обзор методов измерения активности гепарина и на основе данного анализа описание наиболее точных, чувствительных и доступных методов определения активности гепарина.

1. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ГЕПАРИНА

Гепарин был открыт J. McLean в 1916 г. и на протяжении многих десятилетий широко используется в качестве антикоагулянта в хирургической практике, при профилактике и лечении тромбозов, тромбофлебитов, инфаркта миокарда и т.д., а также в аппаратах искусственного кровообращения и гемодиализа.

Гепарин является представителем сульфатированных полисахаридов – глюкозаминогликанов и характеризуется феноменальным структурным

разнообразием. Значительное содержание сульфатных и карбоксильных групп формируют чрезвычайно высокий отрицательный заряд, что обуславливает множество их функций. Глюкозаминогликаны присутствуют на поверхности всех клеток, способны специфически взаимодействовать с макромолекулами внеклеточного матрикса и модифицировать биологическую активность таких белков как хемокины, цитокины, факторы роста, ферменты, молекулы адгезии. Глюкозаминогликаны вносят свой вклад в такие процессы как клеточная сигнализация, антикоагуляционный процесс, рост аксонов, опухолевая прогрессия, метастазирование, выполняют корцепторную функцию для факторов роста в процессе клеточной прореферации, модулируют влияние многих сигнальных молекул на клетку при клеточных взаимодействиях [Mulloy B, 2005; F. Peysselon, S. Ricard-Blum, 2014].

Гепарин – линейный, структурно сложный полимер, состоящий из смеси цепей различной длины с переменными последовательностями, имеет самую высокую плотность отрицательного заряда из всех известных биомолекул. Состоит из повторяющихся, в основном, дисахаридных единиц D-глюкозамина и L-идуроновой или глюкуроновой кислот. Гепарин синтезируется тучными клетками соединительной ткани и содержится во всех тканях млекопитающих, имеющих клеточные элементы: в печени, легких, селезенке, в стенках кровеносных сосудов.

Наиболее изучен антикоагулянтный эффект гепарина, который проявляется через механизм регуляции процесса свертывания крови, направленный на ограничение протеолитических процессов и защиту от тромбообразования. Антикоагулянтное действие гепарина реализуется при взаимодействии с антитромбином - основным ингибитором тромбина и других активных форм факторов свертывания крови, преимущественно Ха, IXa.

Антитромбин принадлежит к суперсемейству белковых ингибиторов сериновых протеиназ. Полипептидная цепь антитромбина содержит два основных функциональных домена – С-концевой, взаимодействующий с

протеиназами, и N-концевой – с двумя сайтами связывания гепарина и гепарансульфатпротеогликанов поверхности клеток эндотелия. Антитромбин ингибирует протеиназы свертывания крови путем образования эквимольного комплекса, однако процесс ингибирования происходит медленно, но прогрессивно ускоряется гликозаминогликанами эндотелия и гепарином.

Лекарственные препараты на основе гепарина производят из ткани легкого или мукозы (слизистой оболочки кишечника) животных, с последующей очисткой и получением гетерогенной субстанции с диапазоном молекулярной массы от 3 до 30 кД, со средней молекулярной массой 15 кД (15 – 100 моносахаридных остатков).

Гетерогенность молекулярной массы препаратов приводит к вариабельности антикоагулянтной активности и фармакокинетики гепарина. Такой гепарин по существующей терминологии определяется как нефракционированный гепарин (НФГ) и только приблизительно 30% молекул НФГ обладает антикоагулянтной активностью. Молекулярной основой высокого сродства связывания гепарина с антитромбином служит уникальная пентасахаридная последовательность. Остальные 70% НФГ имеют минимальную антикоагулянтную активность в терапевтических концентрациях, вследствие отсутствия последовательности пентасахаридов, обеспечивающей связывание с АТ III [К.Р. Савельева, Л.Е. Фрумин, В.Н. Шестаков, 2013; К. Harter, Levine M., Henderson S.O., 2015; M. Hoffman, 2010] (рис. 1В).

Антикоагулянтный эффект гепарина, как было уже сказано, проявляется в образовании комплекса с антитромбином, и в увеличении скорости инактивирования тромбина (ФIIa) и активированного X фактора свертывания крови (Ха) более, чем в 1000 раз, а минимальная структура, обеспечивающая активацию антитромбина III - пентасахарид (рис. 1), содержащий четыре специфически расположенные сульфогруппы.

Основные компоненты структуры гепарина представлены на рисунке 1. На рисунке 1В представлено схематическое изображение уникальной

пентасахаридной последовательности, являющейся основным структурным элементом гепарина, который потенцирует активность антитромбина III (АТ III).

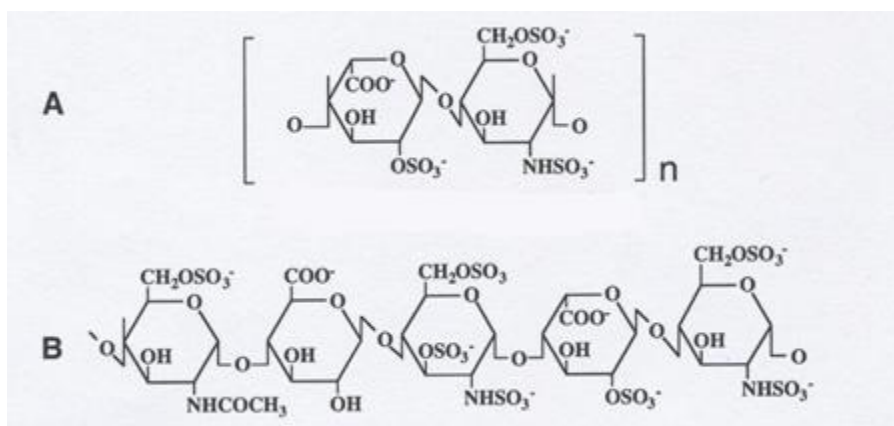


Рис. 1. Структурные компоненты гепарина

Активация антитромбина III, обеспечиваемая пентасахаридным фрагментом, приводит к изменению третичной структуры ингибитора, что, во-первых, значительно увеличивает скорость ингибирования тромбина и, во-вторых, повышает сродство к гепарину.

После образования комплекса с протеазой и расщепления по реактивному центру происходят новые изменения конформации антитромбина III, приводящие уже к снижению сродства к гепарину и как следствие, он высвобождается из комплекса и вновь связывается с другой свободной молекулой АТ III, генерируя множественные циклы инактивации фермента. Снижение сродства к гепарину после образования комплекса протеаза-антитромбин III может способствовать диссоциации комплекса с поверхности эндотелия и удалению его из крови. Высокая скорость ингибирования тромбина, примерно на порядок превышающая скорость ингибирования фактора Ха, обусловлена еще и тем, что в этой реакции гепарин не только стимулирует активность антитромбина III, но и связывается с тромбином, выполняя роль матрицы, обеспечивающей эффективное взаимодействие протеазы с ингибитором.

Кроме тромбина, такое взаимодействие характерно при ингибировании факторов IXa и XIa, но не играет существенной роли при ингибировании факторов Xa, XIIa и калликреина. Роль матрицы могут выполнять только те молекулы гепарина, которые содержат не менее 18 сахаридных остатков. В кровеносных сосудах функцию кофактора антитромбина III могут выполнять гликозаминогликаны и гликопротеины люминальной поверхности эндотелия, которые имеют гепариноподобные структуры. При этом необходимо отметить, что на взаимодействие антитромбина III и тромбина с гликопротеинами эндотелия и стенки сосудов влияет ряд белков плазмы [Casu B, Naggi A, Torri G., 2015; Учебное пособие. 3-е издание / под ред. В.А. Ткачука, 2008].

В начале 70-х годов XX века было начато фракционирование НФГ с выделением фракций гепарина с меньшим молекулярным весом. Так, с помощью химической или ферментативной деполимеризации из НФГ были получены препараты низкомолекулярного гепарина (НМГ) с молекулярной массой 4 – 6,5 кД (4 – 40 моносахаридов). При получении НМГ используются различные методы, поэтому молекулярная масса и антикоагулянтная активность препаратов варьируются (табл. 1).

Таблица 1

Препараты НМГ. Молекулярный вес и соотношение ингибирующих активностей для фактора Xa и тромбина (антиXa/антиIIa активность)

Международное наименование НМГ	Молекулярный вес	АнтиXa/антиIIa
Дальтепарин	2-9 кД	2,7:1
Эноксапарин	3-8 кД	3,8:1
Тинзапарин	3-6 кД	1,9:1
Ревипарин	Средний вес 4 кД	3,5:1
Надропарин	Медианный вес 4,5 кД	3,6:1
Ардепарин	Средний вес 6 кД	1,9:1

Уменьшение длины цепей гепарина снижает его способность связываться с белками крови, эндотелиальными клетками (что также обеспечивает длительную циркуляцию препарата в крови – в 2 раза дольше, чем НФГ), макрофагами и тромбоцитами, снижает аффинность НМГ к фактору фон

Виллебранда, что способствует уменьшению его влияния на тромбоциты и развитие тромбоцитопении, а, следовательно, снижению частоты геморрагических осложнений при его применении. При этом период полувыведения НМГ в плазме крови больных существенно увеличивается, что обеспечивает более прогнозируемый лечебный эффект препарата. Таким образом, для НМГ характерны высокая биодоступность, большой период полужизни, меньшее связывание с белками, клетками крови, клетками эндотелия, а также превалирование почечного клиренса над клеточным, последнее следует учитывать при назначении НМГ больным с почечной недостаточностью.

Снижение молекулярного веса до 5,4 кД (18-19 моносахаридных остатков) вызывает значительные качественные изменения активности гепарина. Фракции гепарина с молекулярной массой ниже этой величины после комплексообразования с АТ III ингибируют преимущественно фактор Ха, а непосредственно на фактор IIa (тромбин) влияют значительно меньше, а гепарины с большей массой инактивируют и тромбин (антиIIa активность) и фактор Ха (антиХа активность). Это различие в действии гепаринов оценивают по отношению активностей антиIIa/антиХа. Так, для препаратов НФГ это отношение составляет 1:1, а для НМГ – 1:2-1:8 (в зависимости от различных препаратов НМГ).

Удельная антикоагулянтная активность препаратов НФГ составляет 150-190 МЕ/мг, а НМГ 80-120 антиХа Ед/мг и 35-45 антиIIa Ед/мг. Только 30% антикоагулянтной активности НМГ осуществляется через АТ III, а 70% активности через ингибитор внешнего пути свертывания, взаимодействие с кофактором гепарина II, ингибицию прокоагулянтного действия лейкоцитов, активацию фибринолиза, модуляцию сосудистого эндотелия (рецепторно и нерепторно обусловленную). Именно поэтому у пациентов сохраняется “антитромботическое состояние” после подкожного введения профилактической дозы НМГ в течение 24 ч, несмотря на то, что уже через 12 ч

после инъекции анти-Ха активность не обнаруживается [Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Акиньшина С.В., 2007].

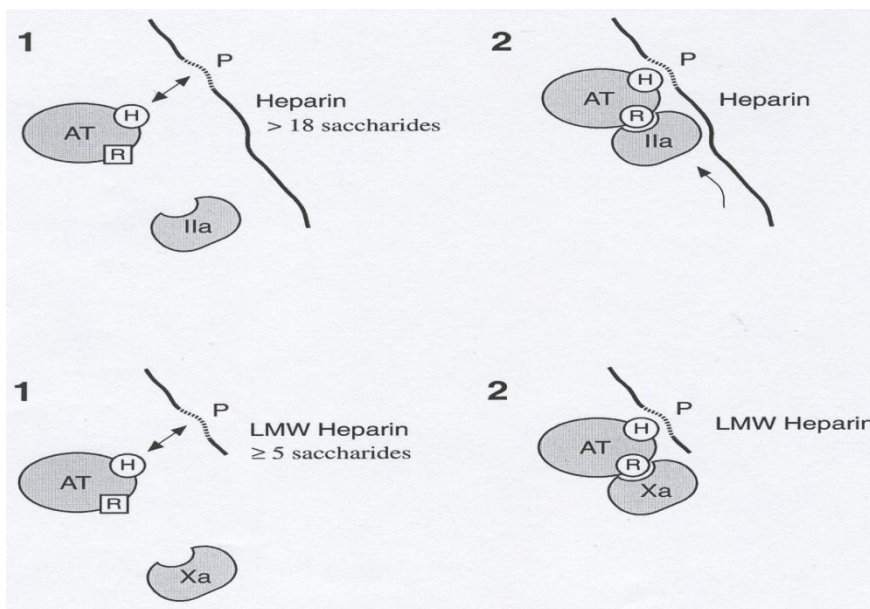


Рис. 2. Схема взаимодействия гепарина, АТ III и факторов Ха и IIa свертывания крови

Верхняя часть рисунка: действие гепарина на реакцию между АТ III и тромбином (IIa), включающее связывание и фермента и ингибитора с цепью гепарина, длина которой не должна быть менее 18 моносахаридов.

Нижняя часть рисунка: инактивация фактора Ха в присутствии НМГ, не требующая образования полного комплекса и обусловленная только связыванием гепарина с АТ III.

Примечание: Н – место связывания гепарина, R – активный центр АТ, без активации находящийся в конформационном состоянии, не предполагающем ингибирование протеаз, P – структурная последовательность цепи гепарина, специфичная для связывания АТ III.

Контрольные вопросы и задания:

1. Где синтезируется гепарин?
2. Как реализуется антикоагулянтный эффект гепарина?
3. Какие виды гепаринов известны на сегодняшний день и на чем основан принцип этой классификации?
4. Без какого фактора практически невозможна реализация антикоагулянтного эффекта низкомолекулярного гепарина?
5. К чему привело фракционирование гепарина?
6. Укажите соотношение антиIIa/антиХа активности для различных видов гепаринов.
7. Как преимущественно выводится НМГ из организма и, соответственно, какой группе пациентов надо назначать НМГ с особой осторожностью?

2. КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕПАРИНОВ. ОСЛОЖНЕНИЯ ГЕПАРИНОТЕРАПИИ

При выборе препаратов гепарина и режимов его применения следует руководствоваться данными об эффективности и безопасности конкретного препарата для каждого показания в отдельности.

Известно, что скорость выведения гепарина из крови является дозозависимой. Так, при низких дозах клиренс НФГ, вероятно, осуществляется по насыщаемому механизму в основном на уровне поглощения эндотелиальными клетками, а при высоких дозах – по ненасыщаемому механизму в основном за счет почечной фильтрации. НМГ выводятся главным образом почками и поэтому их время полувыведения на терапевтическом уровне в 2-4 раза выше, чем таковое у НФГ. Биодоступность подкожно введенного НМГ составляет приблизительно 90%, а НФГ только около 30%. Эти свойства препаратов НМГ предполагают целесообразным их подкожное введение.

Необходимо также отметить, что при общепринятых способах введения: внутривенном (в/в) или подкожном (п/к), антикоагулянтное действие гепарина является немедленным при в/в введении, а при п/к инъекциях оно проявляется через 20-60 минут.

Вследствие высокой биодоступности, более длительного периода полувыведения, отсутствия зависимости клиренса от дозы препарата антикоагулянтный эффект НМГ по сравнению с НФГ более предсказуем.

Основными показаниями к применению гепаринов являются:

- профилактика и лечение венозных тромбозов (тромбоза глубоких вен и ТЭЛА (тромбозы легочной артерии)),
- профилактика и лечение фибрилляции предсердий с системной эмболизацией,

- профилактика и лечение ИБС (ишемической болезни сердца), включая нестабильную стенокардию и острый инфаркт миокарда (ОИМ), предотвращение повторного ОИМ,

- лечение острой и хронической коагулопатии (ДВС-синдром),

- предотвращение тромбообразования в кардиоваскулярной хирургии,

- предотвращение тромбообразования во время процедуры гемодиализа,

- в качестве антикоагулянта в гемотрансфузиологии и в ходе лабораторных исследований [Marder Victor J., Aird William C., Bennett Joel S., Schulman Sam M.D., White Gilbert C., 2011].

Осложнения гепаринотерапии. Необходимо учитывать наличие, так называемой гепариновой резистентности, которая выявляется при невозможности достижения терапевтических уровней НФГ гепарина при дозе введенного препарата до 35 000 МЕ/24 часа.

Потенциальные причины гепаринорезистентности: дефицит АТ III, обусловленный наследственным дефицитом или приобретенным (ДВС-синдром, нефротический синдром, энтеропатии, снижение уровня АТ III на фоне длительной терапии гепарином в результате потребления АТ III), заболевания печени с нарушением синтеза АТ III, повышение скорости выведения гепарина; увеличение связывания гепарина с белками плазмы; повышенное содержание фактора VIII; повышенная концентрация фибриногена; резистентность к гепарину, индуцированная лекарственными препаратами.

Возможными осложнениями действия гепаринов (чаще НФГ, чем НМГ) являются:

- развитие кровоточивости при использовании неадекватной дозировки или способа введения, гепариновой резистентности или повышенной индивидуальной чувствительностью пациента к гепарину. Тяжелые кровотечения отмечены у 1-33% больных при различных формах гепаринотерапии. Риск повышен у пожилых больных с гипертензией и у людей

с иными гипокоагуляционными нарушениями состояния системы гемостаза (например, при врожденных тромбоцитопатиях);

- развитие иммунологически обусловленной тромбоцитопении, вызываемой гепарином (гепарин-индуцируемая тромбоцитопения (ГИТ)). Причиной такой тромбоцитопении является образование аутоантител к комплексу гепарина с фактором 4 тромбоцитов. Так, риск развития такой тромбоцитопении при лечении НМГ или НФГ составляет менее 1% и 3%, соответственно. У больных с тромбоцитопенией, вызванной НФГ, летальность превышает 20%.

- развитие остеопороза при длительной непрерывной гепаринотерапии, особенно при беременности. 3-х месячная терапия гепарином вызывает развитие остеопороза у 2-3% больных;

- в редких случаях при применении и НФГ и НМГ развиваются некрозы кожи, алопеция, гипертрансаминаземия, эозинофилия, гипоальдостеронизм, и как следствие натрийурия и гиперкалиемия.

Осложнения при лечении гепаринами могут быть вызваны неправильной дозировкой вследствие связывания гепарина с белками острой фазы, особенно у больных с венозными тромбоэмболиями, после хирургических вмешательств или инфаркта миокарда.

Длительное применение НФГ в больших дозах может привести к истощению АТ III, что помимо гепаринорезистентности может вызвать состояние гиперкоагуляции и стать причиной тромбоза.

Помимо высокой эффективности и безопасности НМГ, в отличие от НФГ [Bergqvist D., 1988; Carpini J., Wentworth D., 2006], следует еще отметить и удобство их применения. Так, если стандартный НФГ с лечебной целью необходимо вводить внутривенно, то НМГ вводят 1-2 раза в день подкожно. При применении НМГ отсутствует необходимость регулярного контроля лабораторных показателей при нормальном функциональном состоянии почек и нормальном весе пациента.

Контрольные вопросы и задания:

1. Какие способы введения гепарина допустимы (в/в, в/м или п/к)?
2. Введение какого вида гепарина сопровождается наиболее выраженными геморрагическими осложнениями, с чем это связано?
3. Назовите причины гепариновой резистентности и ее осложнения?
4. Какому виду гепарина наиболее свойственно развитие гепариновой резистентности и гепарининдуцируемой тромбоцитопении?
5. В каких случаях необходим регулярный лабораторный контроль НМГ?

3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕПАРИНА. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Цель лабораторного контроля при гепаринотерапии заключается в оптимизации антитромботического лечения и минимизации риска развития кровотечений при передозировке.

В настоящее время считается необходимым мониторинг в/в введения высоких доз НФГ. Для препаратов НМГ рекомендуется определение анти-Ха активности, по меньшей мере, 1 раз в начале лечения, и 1 раз в месяц при длительном применении НМГ [Key N., Makris M., O'Shaughnessy D., Lillicrap D., 2009]. Данные рекомендации распространяются при применении низких подкожных инъекций НФГ и НМГ при профилактике тромбоза глубоких вен. Регулярный контроль анти-Ха активности при применении НМГ требуется у пациентов с почечной недостаточностью, ожирением, низкой массой тела (менее 50 кг), антифосфолипидным синдромом, а также при беременности, особенно у женщин с высоким риском тромбозмболических осложнений [Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Акиньшина С.В., 2007; Gerlach A.T., Pickworth K.K., Seth S.K., Tanna S.B., Barnes J.F., 2000].

Необходимо отметить, что риск развития кровоточивости может зависеть также и от индивидуальных особенностей больного (возраст, вес, лекарственные взаимодействия, содержание белков, связывающих гепарин и

др.). Поэтому дозировка гепарина должна подбираться индивидуально и клиницисты должны быть уверены в адекватности результатов измерений активности гепарина.

Определение активности гепарина также крайне важно для производства фармацевтических препаратов гепарина. Оценка результатов измерения активности гепарина в субстанциях, полупродуктах и целевых лекарственных средствах позволяет обеспечивать эффективность производства и выпускать достоверно аттестованные препараты.

На настоящий момент методы измерения активности гепарина могут быть разделены на методы для определения НФГ или НМГ (в зависимости от молекулярной массы), или по характеру анализируемой пробы – препарат гепарина или образцы крови больных, получающих лечение гепарином. Это разделение достаточно условно, так как отдельные методы (например, хромогенные) могут быть использованы во всех вариантах тестирования.

К основным стандартизованным методам определения гепарина в настоящее время относятся представленные в Европейской Фармакопее 5.0 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0 - 01/2005:20705): методы АЧТВ и хромогенные способы измерения степени ингибирования комплексом антитромбин III - гепарин фактора Ха и тромбина (антиХа- и антиПа активности гепарина).

3.1. Методы анализа препаратов гепарина

Методы анализа препаратов гепарина можно классифицировать следующим образом [под ред. Р.У.Колмена, 1988]:

1.Химические методы (определение мукополисахаридов). Измерение концентрации гепарина основано на карбазольной реакции гексуроновой кислоты или ацетилацетоновой конденсации гексозаминов с дальнейшим определением пиррольных производных с помощью реагента Эрлиха

(p-диметиламинобензальдегид). Тестируемые препараты гепарина оценивают по карбазольной реакции в серной кислоте.

Чувствительность метода позволяет определять 12 мкг или 1,6 Ед гепарина в 1мл.

2.Метахроматические методы. Методы основаны на изменении максимума спектра поглощения раствора гепарина некоторыми красителями. В качестве красителей используют азур А, толуидиновый синий и карбоцианиновый краситель. Условием правильного проведения метода является отсутствие в анализируемой системе белков, высоких концентраций солей, изменяющих спектр поглощения.

Метод чувствителен к присутствию 10 мкг или 1 Ед гепарина в 1 мл.

3.Коагулологические методы. Метод основан на способности НФГ удлинять время свертывания плазмы крови, в частности, активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). По рекомендации Европейской фармакопеи 5.0 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0 - 01/2005:20705) сравнивают время свертывания плазмы овец после добавления к ней разведений Международного стандарта НФГ или разведений испытуемого препарата. Метод предполагает различные способы регистрации момента образования сгустка, а именно визуальный, механический или оптический при длине волны не менее 600 нм.

Чувствительность метода - не более 0,1 МЕ гепарина на 1мл.

4. Хромогенные методы. Наиболее широко применяемыми в настоящее время являются методы измерения остаточной амидолитической активности факторов Ха или тромбина (фактор IIa) после катализируемой гепарином инактивации их антитромбином III. Амидолитическую активность определяют с помощью хромогенных субстратов, специфичных для фактора Ха или тромбина, по количеству отщепляемого от субстрата p-нитроанилина, обратно пропорциональному активности исследуемого гепарина. Тест проводят в условиях, при которых фактическая скорость инактивации фермента связана

линейной зависимостью с содержанием гепарина в анализируемом препарате гепарина.

Методы характеризуются высокой (0,01 МЕ/мл) и точной чувствительностью по сравнению с коагулологическим тестированием.

Определение активности гепарина как в препаратах НМГ, так и тест-системах с использованием хромогенных субстратов подробно описаны в пятом разделе данного пособия (Рекомендуемые методы определения активности гепарина).

3.2. Диагностические методы определения гепарина

Существующие в настоящее время методы определения активности гепарина в плазме крови пациента основаны на способности гепарина подавлять образование фибринового сгустка.

В лабораторной практике в основном используются коагулологические и хромогенные методы измерения антикоагулянтной активности гепарина.

3.3. Контроль качества тестирования

Определение активности гепарина, как и все другие объекты клинико-лабораторных исследований, должно соответствовать утвержденным правилам контроля качества на следующих этапах лабораторного исследования:

- преаналитическом,
- аналитическом,
- постаналитическом.

Рекомендации и стандарты по обеспечению качества всех этапов лабораторных исследований отражены в приказах Национального стандарта Российской Федерации в области лабораторной медицины ГОСТ Р 53133.1-2008 и ГОСТ Р 53133.2-2008, а также предоставляются такими международными организациями как Международная организация

стандартизации (International Organization for Standardization - ISO), Институт клинической и лабораторной стандартизации (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI), Британский Комитет по стандартизации в гематологии (British Committee for Standards in Haematology - BCSH) и др.

На преаналитическом этапе основным требованием к анализируемому образцу плазмы является отсутствие тромбоцитов и фактора 4 тромбоцитов. Для обеспечения этого требования необходимо осторожное взятие крови из не травмированных сосудов с минимальным временем наложения манжеты (или без нее) и с рекомендуемым размером иглы для взятия крови, не превышающим 21g. Такой режим взятия крови минимизирует степень активации тромбоцитов (и системы свертывания крови), предотвращая, тем самым, выделение из тромбоцитов фактора 4, связывающегося как с НФГ, так и с НМГ, что приводит к ошибочным результатам определения активности гепаринов.

Для получения плазмы, лишенной тромбоцитов, рекомендуется следующий режим центрифугирования:

- первое центрифугирование при 2000g в течение 15 минут при комнатной температуре,

- второе центрифугирование в том же режиме в течение 5 минут (двойное центрифугирование) или фильтрация полученной в результате первого центрифугирования плазмы на фильтрах с диаметром пор 0,22 мкм.

Кровь помещают в пробирку с антикоагулянтом - цитратом натрия с концентрацией 0,109 М. Это условие крайне существенно при использовании для взятия крови вакуумных систем, которые могут содержать 0,109 М и 0,129 М цитрата натрия. Изменение концентрации цитрата может существенно изменять результаты тестирования с помощью активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ).

Активацию тромбоцитов можно также подавить применением в качестве антикоагулянта специальных консервантов, например СТАД (цитрат, теофиллин, аденозин, дипиридамо́л).

При получении контрольных плазм должны быть соблюдены меры для полного истощения плазмы по тромбоцитам. Измерение активности гепарина следует проводить в течение 4 часов после взятия проб крови, при этом плазма должна быть получена в пределах 1 часа после забора крови.

На аналитическом этапе исследования, кроме стандартных требований к качеству клинико-диагностических исследований при определении активности гепарина необходимо использовать плазмы-калибраторы и контрольные материалы, аттестованные по Международным или вторичным стандартам гепаринов. В настоящее время существуют 6-й Международный стандарт для НФГ (code 07/328 от 2009 г.) с содержанием 2145 МЕ на 1 ампулу и 3-й Международный стандарт для НМГ (code 11/176 от 2012 г.) содержащий 1068 МЕ антиХа активности на 1 ампулу и 342 МЕ антиПа активности на 1 ампулу. В некоторых исследованиях показана необходимость применения двух плазм-калибраторов: отдельно для НФГ и НМГ, то есть желательно использовать калибраторы с тем же гепарином, что и в испытуемом образце плазмы. Рекомендуется также применение двух контрольных материалов: с высокой и низкой активностью гепарина.

Правильность определения активности гепарина в каждой лаборатории необходимо контролировать по Внешнему контролю качества, то есть систематической независимой сверкой собственных результатов с таковыми Программ Внешнего контроля качества.

В частности, такой международной программой в настоящее время являются ФСВОК, ECAT Foundation (Нидерланды) и NEQUAS (Великобритания).

3.4. Коагулологические методы

По классификации Colman R. [Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J., and Salzman, E.W., 1982] к **общим коагулологическим методам** определения активности гепарина относятся методы измерения времени свертывания

цельной крови, времени свертывания после рекальцификации и активированное время свертывания крови. Принцип данных методов заключается в регистрации удлинения времени образования сгустка под действие АТ III, способного инактивировать в комплексе с гепарином активность сериновых протеаз каскада свертывания крови. Хронологически эти методы были применены в клинической лабораторной практике первыми; их общеизвестность и простота обуславливают их преимущества. Однако все эти методы не специфичны, так как на их результаты влияет не только наличие гепарина, но и состояние отдельных звеньев каскада свертывания крови.

Более **специфичными скрининговыми тестами** для определения гепарина являются тромбиновое время и АЧТВ. Необходимо отметить, что эти методы существенно различаются по своей чувствительности к гепарину. Из них наиболее распространен метод АЧТВ, так как его чувствительность практически подчиняется линейной зависимости в пределах активностей гепарина, характерных для терапевтической области.

Принцип **метода определения тромбинового времени** заключается в клоттинговом определении инактивации экзогенного тромбина комплексом гепарин-АТ III. Преимуществом этого метода является отсутствие влияния на его результаты вариаций содержания других факторов свертывания, в частности, снижения уровня витамин К-зависимых факторов у больных, комбинируемо получающих и гепарин и непрямые пероральные антикоагулянты (например, варфарин).

Метод определения тромбинового времени может быть также составной частью метода определения содержания гепарина в **тесте нейтрализации гепарина протаминсульфатом или полибренном (тест титрования)**. Принцип этого метода заключается в способности этих веществ стехиометрически связываться с гепарином, образуя малодиссоциируемый комплекс, и блокировать антикоагулянтную активность гепарина. Количество протамина или полибрена, необходимое для нейтрализации антикоагулянтного действия

гепарина в тесте тромбинового времени, пропорционально концентрации гепарина в плазме. Измерение активности гепарина в тесте титрования проводят с помощью кривых нейтрализации, построенных по концентрациям гепарина относительно концентрации нейтрализатора. Метод применяется при определении активности НФГ, характеризуется чувствительностью в пределах 0,05 МЕ гепарина/мл и является относительно специфичным, так как процесс связывания нейтрализатора с гепарином не зависит от других компонентов системы гемостаза.

Активированное частичное тромбопластиновое время. АЧТВ является одним из основных методов оценки состояния системы гемостаза и контроля эффективности антикоагулянтной терапии гепарином. Принцип метода заключается в измерении времени образования сгустка рекальцифицированной плазмы крови, стабилизированной цитратом натрия, при внесении в анализируемый образец фосфолипидного реагента и активатора внутреннего пути свертывания. В присутствии терапевтических доз гепарина это время удлиняется в 1,5 – 2,5 раза. Эта вариабельность результатов определения АЧТВ обусловлена индивидуальными свойствами применяемых реагентов. Так, фосфолипидные компоненты реагентов значительно различаются по своей функциональной способности. Кроме этого, стандартизация контроля лечения гепарином с помощью АЧТВ-теста затруднена вследствие интегрированной, глобальной природы метода. На его результаты влияют многие факторы, в частности:

- состояние системы гемостаза пациента (наличие волчаночного антикоагулянта, реагирующих с анионными фосфолипидами тромбопластиновых реагентов; повышенное содержание фибриногена, фактора VIII, фактора 4 тромбоцитов, дефицит АТ III);
- наличие или отсутствие тромбозов;
- одновременная с гепарином терапия непрямыми антикоагулянтами, тромболитиками или низкомолекулярными гепаринами;

- способ регистрации образования сгустка в коагулологических анализаторах.

Международные организации ISTH/ICSH рекомендуют тест АЧТВ в качестве надежного метода контроля антикоагулянтной терапии гепарином, так как для этого теста характерна почти линейная зависимость результатов от концентрации гепарина. Однако чувствительность к гепарину различных АЧТВ-реагентов варьирует в широких пределах. Это обуславливает вариабельность результатов АЧТВ тестирования в терапевтической области активности гепарина.

Кроме того, известно, что результаты определения активности гепарина при помощи метода АЧТВ в плазме пациента, в которую добавили гепарин, не соответствуют данным измерения той же активности гепарина в плазме пациентов, получающих гепарин, что затрудняет унификацию АЧТВ-теста по данным *in vitro*. Для получения сопоставимых результатов при мониторинге гепаринотерапии с использованием различных АЧТВ-реагентов диагностические лаборатории должны сами определить чувствительность теста АЧТВ к НФГ.

Стандартизация теста АЧТВ, «нейтрализующая» различие чувствительности АЧТВ-реагента к гепарину, осуществляется с помощью некоторых рекомендуемых Колледжем Американских Патологов (CAP) способов [Olson JD, Arkin CF, Brandt JT, et al, 1998; Olson JD, Arkin CF, Brandt JT, 1998]:

- В испытуемой пробе необходимо определить гепарин по антиХа активности для установления корреляции между активностью гепарина и величиной АЧТВ, получаемой с новым реагентом.

- При переходе лаборатории на новый АЧТВ-реагент применяется кумулятивный суммарный метод. Суть метода заключается в выборе реагента, чувствительность которого близка к систематически определяемым значениям чувствительности предшествующего реагента. Различия значений АЧТВ нового и предшествующего реагентов должны быть менее 5-7 секунд. В этом случае

терапевтическая область значений АЧТВ при мониторинге гепаринотерапии не требует пересмотра.

Авторы рекомендуют проводить установление терапевтических пределов для каждого вновь используемого в лаборатории АЧТВ-реагента с помощью коммерческих аттестованных по антиХа активности гепариновых плазм. Должны быть определены значения АЧТВ в плазмах, содержащих 0,3 (0,2 – 0,4) анти Ха МЕ/мл и 0,7 (0,6 – 0,75) антиХа МЕ/мл, и эти значения АЧТВ являются пределами терапевтической области гепаринотерапии. В международной практике мониторинга гепаринотерапии результаты определения АЧТВ принято выражать в виде индекса АЧТВ, т.е. отношения значения АЧТВ испытуемого образца к АЧТВ контроля. По рекомендации программы Внешнего Контроля Качества NEQAS (Великобритания) под АЧТВ контроля следует понимать среднее значение АЧТВ здоровой популяции (не менее 100 здоровых доноров, указано в паспорте на реагент).

Необходимо обратить внимание на интерферирующие влияния непрямых антикоагулянтов (например, варфарина) или тромболитиков на определении активности гепарина в тесте АЧТВ. В условиях клинической практики достаточно часто назначение варфарина сочетается с гепарином (порядка 2-3 дней при переходе с одного препарата на другой). Так как варфарин удлиняет АЧТВ, получаемые в таких случаях лабораторные результаты могут привести к отмене лечащим врачом назначенного ранее гепарина. Аналогичная ситуация характерна для больных с инфарктом миокарда, получающих тромболитическую терапию тканевым активатором плазминогена. В этом случае необходимо прямое измерение ингибирующего действия гепарина. Так, Колледж Американских Патологов (CAP) в диагностических целях рекомендует измерение антикоагулянтной активности гепарина по антиХа активности.

Более специфичным методом является измерение антикоагулянтного действия гепарина на уровне одного фермента. В настоящее время широко

применяется **коагулологический метод определения антиХа активности гепарина**. Метод разработан Yin et al. в 1973 году и основан на ингибировании фактора Ха. Принцип метода заключается в клоттинговом измерении количества нейтрализованного фактора Ха, которое прямо пропорционально концентрации гепарина при избыточном содержании в пробе АТ III.

Метод характеризуется высокой чувствительностью к гепарину (до 0,01 МЕ/мл), специфичностью и воспроизводимостью (коэффициент вариации при различных активностях гепарина составляет только 3%).

Детально коагулологические методы измерения гепарина с помощью теста АЧТВ и по антиХа активности представлены в пятом разделе данного пособия (Рекомендованные методы определения активности гепарина).

3.5. Хромогенные методы

Метод измерения антиХа и антиIIa активности гепарина с помощью хромогенных субстратов, специфичных для фактора Ха или тромбина (IIa) (хромогенный или амидолитический метод), был разработан Teien et al. в 1976 году. В последующем метод был модифицирован добавлением в анализируемую пробу с гепарином экзогенного АТ III, что обеспечивает подавление влияния на результаты измерений вариаций концентрации АТ III в плазме больных. Метод может проводиться и в одноэтапном и в двухэтапном варианте.

Определение активности гепарина основано на способности комплекса АТIII-гепарин нейтрализовать факторы Ха или IIa. Активность гепарина определяют в плазме, добавляя к ней избыток АТ III, факторов Ха или тромбина. При этом происходит ингибирование активированных факторов комплексом АТIII-гепарин пропорционально количеству гепарина в плазме. Оставшееся количество фактора Ха или тромбина катализирует отщепление хромофора п-нитроанилина (pNA) от специфического для каждого фермента

синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного рНА, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности гепарина в плазме.

Процесс идет **по следующей схеме:**

1. При определении антиХа активности гепарина (в основном для НМГ)

АТШ (избыток) + гепарин \Rightarrow АТШ-гепарин.

АТШ-гепарин + Ха (избыток) \Rightarrow АТШ-гепарин-Ха+Ха (остаток).

Субстрат-рНА + Ха (остаток) \Rightarrow Пептид + рНА.

2. При определении антиПа активности гепарина (в основном для НФГ)

АТШ (избыток) + НМГ \Rightarrow АТШ-гепарин.

АТШ-гепарин + Па (избыток) \Rightarrow АТШ-гепарин-Па+Па (остаток).

Па (остаток) + ПаСубстрат-рНА \Rightarrow Пептид + рНА.

Условия проведения хромогенного теста подбирают таким образом, чтобы скорость инактивации фактора Ха или тромбина была связана линейной зависимостью с активностью гепарина в анализируемой пробе. Метод позволяет проводить определение гепарина по конечной точке и по кинетике процесса ингибирования факторов Ха и Па.

Хромогенные методы, основанные на приведенном выше принципе и схеме измерений, применяются для определения НФГ в плазме пациента и являются наиболее общепринятыми для тестирования НМГ, фондапарина и других прямых ингибиторов фактора Ха.

Хромогенные методы характеризуются высокой чувствительностью (до 0,01 МЕ/мл) и имеют высокую воспроизводимость и специфичность.

Подробно хромогенные методы определения антиХа и антиПа активности гепаринов представлены в пятом разделе пособия (Рекомендованные методы определения активности гепарина).

3.6. Фондапаринукс натрия

Этот перспективный для клинического применения прямой избирательный ингибитор фактора Ха является синтетическим пентасахаридом, химическая структура которого соответствует таковой природного гепарина. Широкое использование фондапаринукса натрия у хирургических больных, в частности, в ортопедии предполагает адекватное определение его активности в процессе лечения. Этот антикоагулянт тестируют с помощью хромогенного метода измерения антиХа активности. Методика и тест-система для его определения представлены в пятом разделе пособия (Рекомендованные методы определения активности гепарина).

Контрольные вопросы и задания:

1. Укажите основные современные стандартизованные методы определения гепарина.
2. Как классифицируются методы анализа препаратов гепарина? Какие из них наиболее широко применяются в лабораторной практике?
3. Назовите этапы контроля качества лабораторного исследования.
4. Какова рекомендуемая концентрация антикоагулянта цитрата натрия в пробирке для последующего проведения анализа? На какой параметр гемостазиологического исследования может влиять изменение его концентрации?
5. В течение какого срока после взятия проб крови следует проводить измерение активности гепарина? В течение какого срока после забора крови должна быть получена плазма?
6. При помощи каких глобальных мер проводится определение правильности определения активности гепарина и лабораторных исследований в целом?
7. Назовите специфичные скрининговые тесты для определения гепарина.

4. МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НФГ И НМГ

Тестирование НФГ чаще всего осуществляется обычными коагулологическими методами, а именно определением активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени или активированного времени свертывания.

В Фармакопее США описан метод тестирования НФГ с помощью теста АЧТВ с использованием в качестве субстрата плазмы крови овец. Наиболее распространенным способом определения НФГ в плазме пациентов является коагулологический метод АЧТВ. К преимуществам применения метода АЧТВ относятся простота его проведения и возможность проводить измерения с помощью автоматических анализаторов. Хотя этот метод является функциональным, непосредственно оценивающим антикоагулянтную активность, он может давать погрешности измерений вследствие индивидуального содержания в крови пациентов факторов свертывания, искажающего антикоагулянтное действие гепарина, и за счет вариабельности состава применяемых при тестировании реагентов. При явном несоответствии результатов АЧТВ эффекту от введенного гепарина, необходимо применение более специфических методов.

Специфический мониторинг НФГ может быть осуществлен по одному гемостатическому фактору коагулологическим или хромогенным методами измерения антиХа и антиIIa активности НФГ. Однако, эти методы не являются общепринятыми в клинической практике вследствие более высокой стоимости тестов. Определение НФГ может также быть проведено с помощью инактивации гепарина протаминсульфатом или полибреном.

В настоящее время в России интенсифицируется производство НМГ из различных отечественных и импортных субстанций. Широкое клиническое применение НМГ обуславливает необходимость эффективного производства

таких препаратов. Процесс производства НМГ требует контроля по функциональной активности гепарина в исходной субстанции, полупродуктах и целевых препаратах НМГ.

Эффективность производства фармацевтических препаратов во многом зависит от контроля качества выполняемых работ. Современная система обеспечения качества производства предъявляет, в частности, соответствующие требования к определению биологически активного вещества в субстанциях и готовых лекарственных формах. Согласно руководствам ВОЗ и Европейской фармакопеи к таким требованиям относятся:

- выбор специфических и избирательных методов измерения,
- аттестация и чистота компонентов используемых тест-систем,
- аналитическая валидация применяемой методики по ряду характеристик (правильность, точность, воспроизводимость, линейность и др.).

Европейской Фармакопеей 5.0 рекомендован хромогенный метод количественной идентификации НМГ по измерениям антиХа- и антиПа-активности.

Использование хромогенного метода определения антиХа-активности в плазме пациентов является практически единственным способом измерения активности НМГ. Анализ с помощью АЧТВ малоинформативен, так как удлинение АЧТВ для НМГ минимально. Повышение точности и правильности результатов определения активности НМГ этими методами обеспечивается стандартизацией измерений в основном за счет применения соответствующих Международных стандартов.

Контрольные вопросы:

1. Какими методами чаще всего осуществляется тестирование НФГ?
2. В каких случаях применяется специфический мониторинг НФГ?
3. Какие хромогенные способы измерения активности НМГ являются общепринятыми на сегодняшний день?

5. РЕКОМЕНДОВАННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕПАРИНА

На основании анализа литературных данных и собственного опыта авторы рекомендуют проводить определение активности гепарина следующими методами.

5.1 Определение активности НМГ в препаратах и субстанциях хромогенным методом

Для тестирования НМГ в препаратах авторы рекомендуют валидированный хромогенный метод определения функционально активного НМГ и соответствующая тест-система на основе полученных авторами высокоочищенных и аттестованных реагентов. Метод описан в Европейской фармакопее и позволяет измерять ингибиторную активность гепарина в препаратах и субстанциях НМГ как по конечной точке, так и по кинетике процесса.

В качестве реагентов используют тромбин (фактор IIa), фактор Ха и АТ III, а также специфические для тромбина и фактора Ха хромогенные субстраты. На основе полученных реагентов и специфических для факторов IIa и Ха хромогенных субстратов была сформирована тест-система для определения активности НМГ (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09152).

Принцип метода. Активность НМГ в препаратах и субстанциях определяют, добавляя к ним избыток АТ III и фактор Ха или фактор IIa, что вызывает ингибирование факторов комплексом АТ III-НМГ пропорционально количеству НМГ в препарате или субстанции. Оставшееся количество факторов Ха или IIa катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетических хромогенных субстратов. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна антиХа- или антиIIa-

активностям НМГ. Идентификацию функциональных свойств НМГ в препаратах и субстанциях проводят по отношению антиХа/антиПа активности.

Набор реагентов тест-системы. В состав набора входят следующие компоненты:

1. АТ III (1 МЕ/флакон), лиофильно высушенный.
2. Фактор Ха (15 нкат/флакон), лиофильно высушенный.
3. Тромбин (фактор Па) (10 МЕ/флакон), лиофильно высушенный.
4. Хромогенный субстрат для фактора Ха (ZdArgGlyArgpNA), лиофильно высушенный.
5. Хромогенный субстрат для тромбина (TosGlyProArgpNA), лиофильно высушенный.
6. Рабочий Стандартный Образец (PCO) НМГ.
7. Концентрат буфера (5 мл).
8. Бычий сывороточный альбумин (1 г).

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. АТ III, фактор Ха и тромбин получены из плазмы крови, которую следует рассматривать как потенциально инфицированную, способную длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Меры предосторожности при работе с набором основаны на положениях соответствующих законодательных правил.

Приготовление реагентов:

1. Рабочий буферный раствор. Концентрат буфера (5 мл) переносят в мерный стакан вместимостью 100 мл и доливают дистиллированной водой до 80 мл, затем при перемешивании количественно переносят из флакона бычий сывороточный альбумин и тщательно перемешивают до растворения. Доводят объем до 100 мл дистиллированной водой и перемешивают. рН рабочего

буферного раствора 7,4. Рабочий буферный раствор может храниться при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней.

2.70% раствор кислоты уксусной. В мерную колбу вместимостью 100 мл поместить 70 мл кислоты уксусной ледяной (хч), довести объем раствора водой объем до метки и перемешать. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

3.Раствор АТ Ш для определения анти Ха активности. Во флакон с лиофильно высушенным АТ Ш вносят 1,0 мл рабочего буферного раствора и растворяют содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

4.Раствор АТ Ш для определения анти Па активности. Во флакон с лиофильно высушенным АТ Ш вносят 2,0 мл рабочего буферного раствора и растворяют содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

5.Раствор фактора Ха. Во флакон с лиофильно высушенным фактором Ха вносят 6,0 мл рабочего буферного раствора, растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

6.Раствор тромбина (фактор Па). Во флакон с лиофильно высушенным тромбином вносят 9,0 мл рабочего буферного раствора, растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

7.Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха. Во флакон с хромогенным субстратом для фактора Ха вносят 6,0 мл дистиллированной воды, растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

8.Раствор хромогенного субстрата для тромбина (фактор Па). Во флакон с хромогенным субстратом для тромбина вносят 6,0 мл

дистиллированной воды, растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

9. Раствор Рабочего Стандартного Образца (PCO) НМГ. Во флакон с PCO НМГ вносят 1 мл дистиллированной воды и растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

Стабильность растворов реагентов. Стабильность полученных рабочих растворов представлена в таблице 2.

Таблица 2

Стабильность растворов реагентов

Реагенты	2-8 ⁰ С	18-25 ⁰ С	-40 ⁰ С
Раствор АТ Ш	3 сут	1 сут	6 мес
Раствор фактора Ха	3 сут	1 сут	6 мес
Раствор тромбина	3 сут	1 сут	6 мес
Растворы хромогенных субстратов	10 сут	2 сут	6 мес
Рабочий буферный раствор	7 сут	8 час	-

Условия хранения набора реагентов. Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре 2-8⁰С в течение всего срока годности, равного 2 годам. Допускается хранение наборов при температуре до 25⁰С не более 10 суток.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Оборудование и материалы. Для проведения метода используется следующее оборудование:

1. Сканирующий спектрофотометр для прочтения 96 луночных планшетов типа Multiscan EX (LabSystems, Финляндия) или равноценный.
2. Термошейкер для 96 луночных планшетов.
3. рН-метр, милливольтметр типа рН 340 или равноценный.

4. Весы аналитические.

5. Мешалка лабораторная типа Вортекс.

6. Пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 50 мкл; от 20 до 200 мкл; от 200 до 1000 мкл типа Ленпипет или равноценные.

7. Пипетки полуавтоматические многоканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 50 мкл и от 20 до 200 мкл типа Ленпипет или равноценные.

8. Мерная колба вместимость 10 мл класс точности 1-100-2.

9. Мерная колба вместимостью 25 мл класс точности 1-100-2.

10. Мерная колба вместимостью 100 мл класс точности 1-100-2.

11. Мерная колба вместимостью 250 мл класс точности 1-100-2.

12. Пластиковые пробирки с крышками типа эппендорф объемом 1,5 мл.

13. Пластиковые пробирки с крышками объемом 10 мл.

14. Вода дистиллированная ФС 42-2619-97.

15. Кислота уксусная ледяная – хч.

16. Перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88).

Анализируемые образцы. Для анализа используют готовую лекарственную форму препарата НМГ или субстанцию НМГ, разведенную буферным раствором до активности приблизительно равной 0,1антиХа МЕ/мл и 0,05антиШа МЕ/мл.

Приготовление серии разведений Рабочего Стандартного Образца (РСО) НМГ. В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл рабочего буферного раствора, 200 мкл раствора Рабочего Стандартного Образца НМГ, перемешивают и доводят рабочим буферным раствором до метки (раствор препарата сравнения S_1):

- 1 мл раствора S_1 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S_2);

- 1 мл раствора S_2 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S_3);

- 1 мл раствора S_3 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S_4);

- 1 мл раствора S_4 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S_5);

- 1 мл раствора S_5 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S_6).

Расчет активности. При активности НМГ в РСО равном A МЕ/мл активности в препаратах сравнения будут составлять:

$$S_1 = A/50 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_2 = A/75 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_3 = A/112,5 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_4 = A/168,8 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_5 = A/253,1 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_6 = A/379,7 \text{ МЕ/мл}$$

Растворы $S_1 - S_5$ используют для построения калибровочного графика при определении антиХа активности НМГ, а растворы $S_2 - S_6$ – анти Па активности.

Растворы $S_1 - S_6$ используют сразу после приготовления.

Приготовление серии разведений испытуемого препарата НМГ:

- В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл дистиллированной воды, 100 мкл исследуемого препарата, перемешивают, доводят дистиллированной водой до метки (раствор 1).

- В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл дистиллированной воды, 100 мкл раствора 1, перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки (раствор 2).

- 200 мкл раствора 2 помещают в пробирку, вместимостью 3 мл. Добавляют 1,8 мл буферного раствора и перемешивают (раствор испытуемого препарата T_1 , рассчитанная активность около 0,1 МЕ/мл).

- 1 мл раствора T_1 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор T_2).

- 1 мл раствора T_2 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора с и перемешивают (раствор T_3).

= 1 мл раствора T_3 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор T_4).

Растворы $T_1 - T_4$ используют сразу после приготовления.

Приготовление серии разведений испытуемой субстанции НМГ:

- В мерную колбу объемом 100 мл вносят 100 мг субстанции и доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и получают раствор субстанции с концентрацией 1 мг/мл (раствор 1)

- В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл дистиллированной воды, 100 мкл раствора 1, перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки (раствор 2).

- 200 мкл раствора 2 помещают в пробирку, вместимостью 3 мл. Добавляют 1,8 мл буферного раствора и перемешивают (раствор испытуемого препарата T_1).

- 1 мл раствора T_1 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор T_2).

- 1 мл раствора T_2 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора с и перемешивают (раствор T_3).

- 1 мл раствора T_3 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор T_4).

Растворы T₁ – T₄ используют сразу после приготовления.

Ход анализа при определении антиХа активности НМГ. Определения проводят в полистирольных планшетах, помещая их в термошейкер при 37°C:

•С помощью одноканальной пипетки соответствующие разведения РСО НМГ, образца испытуемого препарата и буферный раствор для определения холостой амидолитической активности вносят в объеме 20 мкл согласно схеме распределения, представленной в таблице 3.

Таблица 3

Схема внесения проб в лунки планшета

Ряд	Номер лунки в ряду											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		B	S ₂	S ₄	T ₁	T ₃						
B		B	S ₂	S ₄	T ₁	T ₃						
C		B	S ₂	S ₄	T ₁	T ₃						
D		B	S ₂	S ₄	T ₁	T ₃						
E		S ₁	S ₃	S ₅	T ₂	T ₄						
F		S ₁	S ₃	S ₅	T ₂	T ₄						
G		S ₁	S ₃	S ₅	T ₂	T ₄						
H		S ₁	S ₃	S ₅	T ₂	T ₄						

•С помощью многоканальной пипетки, вносят по 20 мкл раствора АТ Ш (1 МЕ/мл) последовательно во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета.

•С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по 40 мкл 70% раствора кислоты уксусной для остановки реакции. Порядок внесения реактивов представлен в таблице 4.

Схема определения антиХа активности

Раствор АТ III	20 мкл
Образец препарата или стандарта	20 мкл
Раствор фактора Ха	40 мкл
Инкубация при 37°C и перемешивании 2 минуты	
Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха	100 мкл
Инкубация при 37°C и перемешивании 4 минуты	
70% раствор кислоты уксусной	40 мкл

Ход анализа при определении антиIIa активности НМГ. Определения проводят в полистирольных планшетах, помещая их в термошейкер при 37 °С:

- С помощью одноканальной пипетки соответствующие разведения РСО НМГ, образца испытуемого препарата и буферный раствор для определения холостой амидолитической активности вносят в объеме 20 мкл согласно схеме распределения, представленной в таблице 5.

- С помощью многоканальной пипетки, вносят по 20 мкл раствора АТ III (0,5 МЕ/мл) последовательно во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета.

- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по 40 мкл раствора фактора IIa (тромбина) и выдерживают в термошейкере при 37 °С точно 2 минуты.

- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по 100 мкл раствора хромогенного субстрата для тромбина и инкубируют 4 минуты при 37°C.

- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-ой ряды лунок планшета вносят по 40 мкл 70% раствора кислоты уксусной для остановки реакции. Порядок внесения реактивов представлен в таблице 6.

Схема внесения проб в лунки планшета

Ряд	Номер лунки в ряду											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		B	S ₃	S ₅	T ₁	T ₃						
B		B	S ₃	S ₅	T ₁	T ₃						
C		B	S ₃	S ₅	T ₁	T ₃						
D		B	S ₃	S ₅	T ₁	T ₃						
E		S ₂	S ₄	S ₆	T ₂	T ₄						
F		S ₂	S ₄	S ₆	T ₂	T ₄						
G		S ₂	S ₄	S ₆	T ₂	T ₄						
H		S ₂	S ₄	S ₆	T ₂	T ₄						

Таблица 6

Схема определения антиХа активности

Раствор АТ III	20 мкл
Образец препарата или стандарта	20 мкл
Раствор фактора Ха	40 мкл
Инкубация при 37°C и перемешивании 2 минуты	
Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха	100 мкл
Инкубация при 37°C и перемешивании 4 минуты	
70% раствор кислоты уксусной	40 мкл

Регистрация результатов. Измеряют оптическую плотность (ОП) растворов при 405 нм с помощью планшеточного спектрофотометра Multiscan EX или аналогичного оборудования.

Определяют среднее значение ОП для параллельных проб разведений РСО НМГ. В программе Microsoft Excel строят график, на котором по оси абсцисс (линейной) откладывают величины, соответствующие ОП, а по оси ординат (логарифмической) – антиХа или антиХа активность РСО НМГ. Проводят

линию тренда в диапазоне активности 0,2 – 0,04 МЕ/мл для антиХа активности и 0,06 – 0,0167 МЕ/мл для антиПа активности. Коэффициент корреляции линий тренда не должен быть ниже 0,98.

Используя уравнение линии тренда по средним значениям ОП, рассчитывают антиХа и антиПа активность исследуемого препарата с учетом разведений. Результаты расчета активности для каждого разведения исследуемого образца не должны различаться между собой более чем на 10%. В этом случае за активность исследуемого препарата принимается среднее значение активностей, полученных для каждого разведения. В том случае, если для какого-либо разведения полученное значение активности отличается от остальных более чем на 10% его необходимо исключить из расчета среднего значения активности.

Для получения надежных результатов при применении разработанной тест-системы необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

Практические сложности тестирования:

- если после добавления уксусной кислоты произошло обесцвечивание пробы, необходимо заменить рабочий раствор уксусной кислоты. Рекомендуется использование препаратов уксусной кислоты импортного производства (например, Merck, Fluka);

- в связи с высокой термолабильностью анализируемой системы особое внимание следует обращать на строгое соблюдение температурного режима теста;

- рабочие образцы НМГ следует использовать только в течение 30 минут.

Ниже представлена выполненная авторами валидация метода.

Оценку правильности измерений хромогенным методом функционально активного НМГ провели на аттестованных по антиПа и антиХа активности Британском и Международном стандартах.

Определяли антиХа и антиПа активности в каждом из стандартов, используя в качестве калибратора другой стандарт. Показано, что правильность тестирования разработанным методом, то есть близость результатов измерений с истинными значениями составляла 97-99%.

Правильность тестирования была также оценена по сравнению результатов измерения активностей НМГ предлагаемым методом и валидированной методикой с использованием реагентов фирмы Chromogenix (Швеция). В этом варианте валидации правильность измерений также составляла 98%.

Полагая доказанной правильность определения активностей НМГ, провели количественную аттестацию созданного нами РСО НМГ с использованием в качестве калибратора Британского стандарта. Результаты измерений Международных стандартов с применением РСО НМГ в качестве калибратора свидетельствовали о правильности тестирования; относительная погрешность не превышала 5%.

Воспроизводимость тестирования была доказана при проведении анализа в лаборатории авторов в разное время различными сотрудниками, а также при измерении активностей одних и тех же образцов НМГ в других лабораториях. Получаемые результаты не различались более чем на 8%.

Анализ результатов тестирования функционально активного НМГ разработанной тест-системой в препаратах НМГ Фрагмин (2 лекарственных формы), Фраксипарин, в субстанции НМГ Эноксапарин позволяет сделать следующие **заклучения** об основных аналитических характеристиках методики:

- Линейность определяемых значений антиХа активности НМГ лежит в диапазоне от 0,2 до 0,04 МЕ/мл, при этом отклонение от линейности не превышает 4%.

- Линейность определяемых значений антиПа активности НМГ лежит в диапазоне от 0,06 до 0,008 МЕ/мл; при этом отклонение от линейности не превышает 6%.

- Коэффициент вариации (случайная погрешность) результатов определения антиХа- и антиПа активности НМГ не превышает 5% и 3,5%, соответственно.

- Чувствительность метода определения антиХа- и антиПа активностей составляет 0,01 МЕ/мл.

- Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии не превышает 10%.

Таким образом, разработанное тестирование НМГ хромогенным, рекомендуемым Европейской фармакопеей методом с помощью созданной тест-системы соответствует предъявляемым к аналитическому контролю требованиям и может быть применено для оценки эффективности этапов процесса производства и целевых лекарственных препаратов НМГ.

5.2 Определение НФГ в препаратах коагулологическим методом

Принцип метода. Активность НФГ в препаратах измеряют по времени образования сгустка после рекальцификации в присутствие активатора внутреннего пути свертывания крови и фосфолипидов. Количественное определение проводят по калибровочной прямой, построенной с помощью РСО, аттестованного по Международному стандарту НФГ.

Ниже представлен метод, проводимый с помощью Международного стандарта НФГ 97/578 (Национальный Институт Биологических Стандартов и Контролей, NIBSC, Великобритания).

Используемые реагенты. Пулированная плазма овец, полученная от не менее 5 животных, реагенты НПО Ренам Каолин-активатор, Эрилид-фосфолипиды и 0,035 М раствор кальция хлорида.

Приготовление реагентов:

- Эрилид - лиофильно высушенный стабилизированный реагент на основе смеси мозговых и соевых фосфолипидов. Вносят во флакон с эрилидом суспензию каолина.

- Эрилид-каолиновая смесь готова к проведению анализа через 30 минут после добавления каолина. Перед проведением анализа встряхивают.

- 0,035М раствор кальция хлорида (титрованный) готов к применению.

Анализируемые образцы. Для анализа используют готовую лекарственную форму препарата НФГ или субстанцию НФГ, разведенную физиологическим раствором до активности приблизительно равной 0,5 - 1,0 МЕ/мл.

Приготовление серии разведений Рабочего Стандартного Образца (PCO) НФГ:

- В пробирку, вместимостью 1,5 мл вносят 0,9 мл физиологического раствора и 0,1мл раствора PCO НМГ и тщательно перемешивают (раствор 1).

180 мкл раствора 1 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 20 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S₁).

- 160 мкл раствора 1 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 40 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S₂).

- 140 мл раствора 1 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 60 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S₃).

- 120 мкл раствора 1 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 80 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S₄).

- 100 мкл раствора 1 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 100 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения, раствор S₅).

Расчет активности. При активности НФГ в PCO, равном А МЕ/мл, активности в препаратах сравнения будут составлять:

$$S_1 = A/11,1 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_2 = A/12,5 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_3 = A/14,3 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_4 = A/16,7 \text{ МЕ/мл}$$

$$S_5 = A/20 \text{ МЕ/мл}$$

Приготовление серии разведений испытуемого препарата НФГ:

- В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл физиологического, 100 мкл исследуемого препарата, перемешивают и доводят физиологическим раствором до метки (раствор 1).

- В мерную колбу объемом 10 мл вносят около 9 мл физиологического, 200 мкл исследуемого препарата, перемешивают и доводят физиологическим раствором до метки (раствор 2).

- 180 мкл раствора 2 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 20 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор испытуемого препарата, раствор T₁).

- 160 мкл раствора 2 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 40 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор испытуемого препарата, раствор T₂).

- 140 мл раствора 2 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 60 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор испытуемого препарата, раствор T₃).

- 120 мкл раствора 2 помещают в пробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 80 мкл физиологического раствора и перемешивают (раствор испытуемого препарата, раствор T₄).

Растворы T₁ – T₄ используют сразу после приготовления.

Ход анализа. Представлен в таблице 7.

Схема определения НФГ

Внести в кювету анализатора:	Образец	Сравнение
Плазма овцы	50мкл	50мкл
Одно из разведений испытуемого препарата или препарата сравнения	50мкл	-
Физиологический раствор	-	50мкл
АЧТВ-реагент	50мкл	50мкл
Инкубировать при 37°C точно 2 мин.		
0,035 М раствор кальция хлорида	50 мкл	50мкл
Зафиксировать время свертывания в секундах на коагулологическом анализаторе.*		

*Все измерения должны быть дублированы.

1. Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика используют растворы препарата сравнения S₁- S₅. В программе Microsoft Excel строят калибровочный график, где по оси X откладывают время свертывания в секундах, по оси Y – активность НФГ в растворах препаратов сравнения в МЕ/мл. В качестве примера на рисунке 3 представлен калибровочный график, построенный с использованием в качестве препарата сравнения Международного стандарта НФГ.

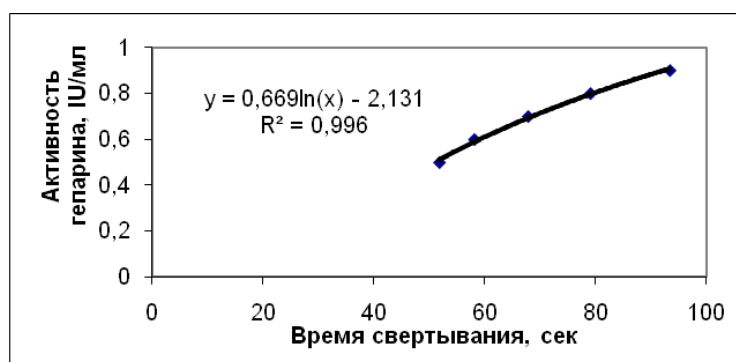


Рис.3. Зависимость времени свертывания от активности НФГ

Примечание: IU – Международные единицы (МЕ)

2. Определение активности НФГ в препарате.

Для определения активности НФГ используют растворы испытуемого препарата $T_1 - T_4$.

Каждое разведение испытуемого препарата анализируют по схеме, представленной в таблице 8.

По возможности анализ растворов препарата сравнения и испытуемого препарата должен проводиться одновременно.

Используя уравнение линии тренда калибровочного графика и время свертывания разведений тестируемого препарата, а также учитывая их итоговые разведения (табл.8), определяют активность НФГ в каждой из четырех анализируемых проб.

Рассчитывают среднюю величину, которую и рассматривают как активность НФГ в изучаемом препарате.

Таблица 8

Итоговые разведения испытуемого препарата НФГ

№ пробы	T_1	T_2	T_3	T_4
Итоговое разведение	5555,6	6250	7142,9	8333,3

Аналитические характеристика методики:

- Линейность определяемых значений активности НФГ лежит в диапазоне от 0,5 до 0,9 МЕ/мл, при этом отклонение от линейности не превышает 5%.
- Коэффициент вариации (случайная погрешность) результатов определения активности НФГ не превышает 5%.
- Чувствительность метода составляет 0,1 МЕ/мл.
- Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии не превышает 5%.

5.3 Мониторинг гепаринотерапии методом АЧТВ

Для контроля гепаринотерапии НПО Ренам выпускает три набора реагентов:

АЧТВ-тест (состав набора: АЧТВ-реагент на основе соевых фосфолипидов и эллаговой кислоты и кальция хлорида 0,025М раствор) – код ПГ-7/1.

Коагуло-тест (состав набора: Эрилид (кефалин), каолин 0,5% суспензия, кальция хлорида 0,025М раствор) – код ПГ-8.

Коагуло-экспресс (состав набора: коагуло-реагент и кальция хлорида 0,025М раствор) – код ПГ-6А.

Для установления терапевтической области выпускается Набор плазм для контроля гепаринотерапии (код ГП-5).

Получение исследуемой плазмы для анализа. Венозную кровь берут в силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку на 3,8% (0.11моль/л) цитрате натрия (9:1). Проводят двойное центрифугирование: центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин (1200g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку.

Для анализов достаточно 1,0 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 4 часов, при 2-8°C не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C. Схема анализа представлена в таблице 9.

Результаты мониторинга гепаринотерапии следует выражать в виде индекса АЧТВ, т.е. отношения величины АЧТВ в исследуемой плазме к среднему значению АЧТВ здоровых доноров (паспортные данные соответствующего АЧТВ-реагента).

Терапевтическая область адекватной гепаринотерапии устанавливается определением значений АЧТВ для каждого примененного реагента в аттестованных гепаринизированных плазмах с величинами антиХа активности 0,3 (0,2-0,4) и 0,7 (0,6-0,75) антиХа МЕ/мл.

Полученные значения АЧТВ в секундах и будут являться пределами терапевтической области гепаринотерапии.

Таблица 9

Схема анализа

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма исследуемая (контрольная)	50мкл
АЧТВ-реагент	50мкл
Инкубировать при 37°С точно 3 мин.	
0,025 М раствор кальция хлорида	50 мкл
Зафиксировать время свертывания в секундах на коагулологическом анализаторе.*	

*Для всех типов коагулологических анализаторов.

5.4 Определение антиХа активности гепарина коагулологическим методом

Для определения антиХа активности гепарина в плазме пациентов НПО Ренам предлагает:

- набор реагентов Реаклот-Гепарин (состав набора: субстратная плазма, реагент 1 - смесь фактора Ха и фосфолипидов, 0,035 М раствор кальция хлорида (код ГП-2),
- набор плазм калибраторов для построения калибровочной прямой (код ГП-3),
- набор контрольных плазм для проведения внутреннего контроля качества (код ГП-4).

Метод и предлагаемая тест-система предназначены для мониторинга за введением гепарина (в том числе и НМГ), путем определения его антиХа активности в плазме пациента.

Принцип метода. Метод основан на способности небольших количеств гепарина исследуемой плазмы в присутствии АТ III нейтрализовать экзогенный фактор Ха.

Процесс происходит в два этапа:

1. инактивация избытка фактора Ха комплексом АТ III-гепарин.
2. измерение коагулологической активности остаточного фактора Ха на фосфолипидной мембране в присутствии ионов кальция.

Источником АТ III, фибриногена и фактора V служит субстратная плазма.

Приготовление реагентов:

1. **Реагент 1 - смесь фактора Ха и фосфолипидов.** Во флакон с лиофильно высушенным реагентом вносят 2 мл дистиллированной воды, растворяют при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения. Возможно однократное замораживание – оттаивание.

2. **Субстратная плазма.** Во флакон с лиофильно высушенной субстратной плазмой вносят 2 мл дистиллированной воды, растворяют при осторожном покачивании. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения. Возможно однократное замораживание – оттаивание.

3. **Раствор кальция хлорида, 0.035М.** Раствор кальция хлорида после вскрытия флакона можно хранить при +2-8⁰С в закрытом состоянии до окончания срока годности, указанного на этикетке. Прогретый при 37⁰С раствор должен быть использован в течение 8 часов.

Получение исследуемой плазмы для анализа. Венозную кровь берут в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку на 3,8% (0.11моль/л) цитрате натрия (9:1), центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют 15 мин при

3000 об/мин. Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования переносят плазму в пластиковую пробирку.

Для анализов достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8°C не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C.

Схема анализа представлена в таблице 10.

Таблица 10

Схема анализа

Внести в кювету анализатора:	Объем
Субстратная плазма	100 мкл
Исследуемая (контрольная) плазма	25 мкл
Инкубировать при 37°C точно 1 минуту.	
Реагент 1	50 мкл
Инкубировать при 37°C точно 2-3 минуты*.	
Раствор кальция хлорида, 0.035M	50 мкл

*в зависимости от типа коагулологического анализатора

Построение калибровочного графика. В программе Microsoft Excel строят калибровочный график с использованием плазм калибраторов с известными активностями гепарина, указанными в паспорте. На оси ординат (Y) по логарифмической шкале откладывают величины времени свертывания, полученные для каждой контрольной плазмы, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале откладывают активность гепарина в антиХа единицах в мл плазмы. Используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца определяют активность гепарина. Калибровочный график линеен в интервале активности гепарина от 0 до 0.8 антиХа Ед/мл.

Интерпретация результатов. Профилактическая область – 0,1 – 0,3 антиХа Ед/мл. Терапевтическая область – 0,3 – 0,7 антиХа Ед/мл. Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности гепарина могут полностью

нейтрализовать фактор Ха в системе, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности гепарина для таких образцов могут быть получены при предварительном разведении исследуемой плазмы субстратной плазмой в 2 или 4 раза. При этом результат, считанный из калибровочного графика, должен быть умножен на 2 или 4, соответственно.

Контроль качества. Проводится с помощью набора контрольных плазм для определения антиХа активности гепарина (2 уровня активности гепарина) – код ГП-4.

5.5 Определение антиХа активности гепарина хромогенным методом

Для определения антиХа активности гепарина в плазме пациентов хромогенным методом НПО Ренам предлагает:

- набор реагентов Реахром-Гепарин (состав набора: АТ III, фактор Ха, буфер концентрированный и хромогенный субстрат) - код ГП-1,
- набор плазм калибраторов для построения калибровочной прямой (код ГП-3)
- набор контрольных плазм для проведения внутреннего контроля качества (код ГП-4).

Метод и предлагаемая тест-система предназначены для мониторинга за введением гепарина (в том числе и НМГ), путем определения его антиХа активности в плазме пациента.

Тест ингибирования активности фактора Ха является наиболее чувствительным и информативным из всех способов определения активности гепарина в плазме крови.

Принцип метода. Метод определения активности гепарина основан на способности комплекса АТ III-гепарин нейтрализовать фактор Ха. Активность гепарина определяют в плазме, добавляя к ней избыток АТ III и фактора Ха. При этом происходит ингибирование фактора Ха комплексом АТ III-гепарин пропорционально количеству гепарина в плазме. Оставшееся количество

фактора Ха катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата, специфичного для фактора Ха.

Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна активности гепарина в плазме. Процесс идет по следующей схеме:

АТШ (избыток) + гепарин \Rightarrow АТШ-гепарин.

АТШ-гепарин + Ха (избыток) \Rightarrow АТШ-гепарин-Ха+Ха (остаток).

Субстрат-pNA + Ха (остаток) \Rightarrow Пептид + pNA.

Приготовление реагентов:

1. Рабочий буферный раствор. Буфер концентрированный (5 мл) разводят дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь рН=8,4 \pm 0,05.

2. Рабочий раствор АТ Ш. Во флакон с лиофильно высушенным АТ Ш вносят 1 мл дистиллированной воды и растворяют содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

3. Рабочий раствор фактора Ха. Во флакон с лиофильно высушенным фактором Ха вносят 2 мл дистиллированной воды, растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

4. Раствор хромогенного субстрата. Во флакон с хромогенным субстратом вносят 2 мл дистиллированной воды, растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Дополнительные реагенты: 50% раствор уксусной кислоты.

Получение исследуемой плазмы для анализа. Венозную кровь берут в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку на 3,8% (0.11моль/л) цитрате натрия (9:1), центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют 15 мин при

3000 об/мин. Центрифугирование следует проводить как можно скорее. Немедленно после центрифугирования плазму переносят в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8°C не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C.

Ход анализа:

1. Разводят исследуемую плазму или плазмы-калибраторы трех уровней рабочим буферным раствором в **5** раза по схеме:

0.1мл плазмы + 0.4мл рабочего буферного раствора - Раствор 1:

2. Непосредственно перед проведением анализа готовят реакционную смесь (Раствор 2, табл.11).

Таблица 11

Приготовление раствора 2

Рабочий буферный раствор	400 мкл
Рабочий раствор АТ III	100 мкл
Раствор 1	100 мкл

Анализ проводится в пластиковых пробирках, прогретых при 37°C, по следующей схеме (табл.12):

Таблица 12

Схема анализа

Внести в пробирку:	Образец	Кювета сравнения
Рабочий раствор фактора Ха	200 мкл	-
Раствор 2	200 мкл	-
Рабочий буферный раствор	-	1000мкл
Инкубировать при 37°C точно 5 минут		
Раствор хромогенного субстрата	200 мкл	-
Инкубировать при 37°C точно 5 минут		
50%-ая уксусная кислота	400 мкл	-

Измеряют оптическую плотность образца против кюветы сравнения на спектрофотометре (ФЭКе) при длине волны 405 нм.

В программе Microsoft Excel строят калибровочный график, где на оси ординат (Y) по линейной шкале откладывают величины оптической плотности, полученные для каждой плазмы-калибратора, а на оси абсцисс (X) по линейной шкале откладывают активность гепарина в антиХа единицах в мл плазмы. Калибровочный график линеен в интервале активности гепарина от 0 до 1,0 антиХа Ед/мл. Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определяют активность гепарина в антиХа единицах.

Интерпретация результатов. Терапевтическая область 0,3-0,7 анти Ха-активность. Профилактическая область 0,1-0,3 анти Ха-активность. Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем активности гепарина могут полностью нейтрализовать фактор Ха в системе, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности гепарина для таких образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы в 10 или в 20 раз рабочим буферным раствором (Раствор 1). При этом результат, считанный из калибровочного графика, должен быть умножен на 10 или 20 соответственно.

Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных:

- с повышенным содержанием липидов;
- с повышенным содержанием билирубина.

Контроль качества. Проводится с помощью набора контрольных плазм для определения антиХа активности гепарина (2 уровня активности гепарина) – код ГП-4.

5.6. Определение фондапаринукса натрия хромогенным методом

Фондапаринукс натрия (в дальнейшем фондапаринукс) – первый синтетический антитромботический препарат, селективно ингибирующий

фактор свертывания Ха и обладающий высоким сродством к АТ III. Связывание фондапаринукса натрия с АТ III приводит к конформационным изменениям белка и появлению способности ингибировать фактор Ха. Поэтому определение антиХа активности – наиболее подходящий метод для мониторинга за лечением и профилактикой фондапаринуксом.

Для определения количества фондапаринукса в плазме больного НПО Ренам предлагает:

- Набор реагентов Реахром-Гепарин (состав набора: АТ III, фактор Ха, буфер концентрированный и хромогенный субстрат) - код ГП-1,
- Набор плазм калибраторов с известной концентрацией фондапаринукса 2.0; 1.5; 1.0; 0.5; 0 мкг/мл.

Принцип метода. Метод определения концентрации фондапаринукса основан на способности его комплекса с АТ III нейтрализовать фактор Ха. Концентрацию фондапарина определяют в плазме, добавляя к ней избыток АТ III и фактора Ха. При этом происходит ингибирование фактора Ха комплексом фондапаринукса -гепарин пропорционально количеству фондапаринукса в плазме. Оставшееся количество фактора Ха катализирует отщепление паранитроанилина (pNA) от специфического для фактора Ха, синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна концентрации фондапаринукса в плазме.

Процесс идет по следующей схеме:

$\text{АТ III (избыток)} + \text{фондапаринукс} \Rightarrow \text{АТ III- фондапаринукс.}$

$\text{АТ III- фондапаринукс} + \text{Ха (избыток)} \Rightarrow \text{АТ III- фондапаринукс -Ха+Ха}$
(остаток).

$\text{Субстрат-pNA} + \text{Ха (остаток)} \Rightarrow \text{Пептид} + \text{pNA.}$

Приготовление реагентов:

1.Рабочий буферный раствор. Буфер концентрированный (5 мл) разводят дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь $\text{pH}=8,4 \pm 0,05$. Хранить при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ не более 20 дней.

2. Рабочий раствор АТ Ш. Во флакон с лиофильно высушенным АТ Ш вносят 1 мл дистиллированной воды и растворяют содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

3. Рабочий раствор фактора Ха. Во флакон с лиофильно высушенным фактором Ха вносят 2 мл дистиллированной воды, растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

4. Раствор хромогенного субстрата. Во флакон с хромогенным субстратом вносят 2 мл дистиллированной воды, растворяют при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Получение исследуемой плазмы для анализа. Венозную кровь берут в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку на 3,8% (0.11M) цитрате натрия (9:1), центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Анализируемую плазму переносят в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 0,2 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 2 часов, при 2 - 8°C не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C.

Ход анализа:

- Для построения калибровочного графика используют плазмы-калибраторы с известной концентрацией фондапаринукса 2.0; 1.5; 1.0; 0.5; 0 мкг/мл.

- Разводят исследуемую плазму или плазмы-калибраторы пяти уровней рабочим буферным раствором в 20 раз по схеме: 0.05 мл плазмы + 0.95 мл рабочего буферного раствора.

- Измеряют оптическую плотность образца против кюветы сравнения на спектрофотометре при длине волны 405 нм.

- При построении калибровочного графика на оси абсцисс (X) по линейной шкале откладывают величины концентраций фондапаринукса в плазме, а на оси ординат (Y) по логарифмической шкале откладывают оптическую плотность. Калибровочный график линеен в интервале концентраций фондапаринукса от 0 до 2,0 мкг/мл. Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца, определяют концентрацию фондапаринукса в мкг/мл.

Анализ проводится в пластиковых пробирках, прогретых при 37⁰С. Схема определения концентрации фондапаринукса представлена в таблице 13

Таблица 13

Схема определения фондапаринукса

Внести в пробирку:	Образец	Кювета сравнения
Исследуемая разведенная плазма (или плазма-калибратор)	100 мкл	-
Рабочий раствор АТ III	100 мкл	
Рабочий раствор фактора Ха	200 мкл	-
Рабочий буферный раствор	-	1000мкл
Инкубировать при 37 ⁰ С точно 5 минут		
Раствор хромогенного субстрата	200 мкл	-
Инкубировать при 37 ⁰ С точно 5 минут		
50%-ая уксусная кислота	400 мкл	-

Интерпретация результатов:

- Терапевтическая область 0,6-1,5 мкг/мл.
- Профилактическая область 0,2-0,7 мкг/мл

Образцы исследуемой плазмы с высоким уровнем содержания фондапаринукса могут полностью нейтрализовать фактор Ха в системе, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения концентрации фондапаринукса для таких образцов могут быть получены при разведении

исследуемой плазмы в 40 раз рабочим буферным раствором. При этом результат, рассчитанный по калибровочному графику, должен быть умножен на

2. Завышенные результаты могут быть получены при анализе образцов плазм больных: - с повышенным содержанием липидов;

- с повышенным содержанием билирубина.

Контрольные вопросы и задания:

1. Какие рекомендуемые методы определения активности гепарина Вы можете назвать?
2. Какие компоненты входят в состав набора реагентов тест-системы?
3. Перечислите оборудование и материалы, применяемые при определении НМГ в препаратах и субстанциях хромогенным методом.
4. Какие практические сложности могут иметь место при тестировании?
5. В чем состоит суть построения калибровочного графика?
6. Какими показателями следует выражать результаты мониторинга гепаринотерапии?
7. В чем заключается принцип хромогенного метода определения концентрации фондапаринукса?
8. При каких случаях могут быть получены завышенные результаты при анализе образцов плазм больных?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном пособии авторы представили обзор и описание наиболее точных, чувствительных и доступных методов определения активности гепарина, применение которых позволит контролировать активность различных видов гепаринов в клинической ситуации и при производстве фармацевтических препаратов, что в итоге должно привести к оптимизации прогноза и своевременной диагностике тромбеморрагических осложнений антитромботической терапии.

ГЛОССАРИЙ

Антикоагулянты – препараты, влияющие на различные звенья процесса свёртывания крови. Применяют в клинической и экспериментальной практике с целью профилактики и лечения тромбообразования и тромбоэмболических осложнений. Условно делят на 2 группы – антикоагулянты прямого действия (гепарины, гепариноиды, новые оральные антикоагулянты) и непрямого действия (антагонисты витамина К).

Гемостаз (система гемостаза) - комплекс реакций организма, основная функция которых заключается в поддержании жидкого состояния крови и быстром купировании повреждений сосудистой стенки. Условно различают два основных механизма гемостаза: сосудисто-тромбоцитарный и коагуляционный (плазменный). Современная модель гемостаза – клеточная (или клеточно-ассоциированная).

Европейская Фармакопея - руководящий документ, используемый в большинстве стран Европы при производстве фармацевтических продуктов в странах Европейского сообщества. Содержит описание действующих и вспомогательных веществ, а также методов анализа фармацевтических продуктов. В 2011 году вышло официальное издание Европейской Фармакопеи на русском языке.

Кофактор - (cofactor)- небелковое вещество, которое обязательно должно присутствовать в организме в небольших количествах, чтобы соответствующие ферменты смогли выполнить свои функции.

Пролиферация (proliferatio; лат. proles потомство + ferre носить, приносить) новообразование клеток и внутриклеточных структур (митохондрий, эндоплазматической сети, рибосом и др.).

Тромбоз – формирование в сосуде кровяных сгустков, препятствующих нормальному току крови. Существует 2 основных видов тромбозов – венозный (чаще всего проявляется тромбозом глубоких вен) и артериальный (может приводить к инсульту, инфаркту миокарда и пр.).

Факторы свертывания крови - группа веществ, содержащихся в плазме крови и тромбоцитах и обеспечивающих свёртывание крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Клиническая биохимия : учебное пособие. 3-е издание / под ред. В.А. Ткачука. – 2008;
2. Р. Савельева, Л.Е. Фруммин, В.Н. Шестаков, «Гепарин и низкомолекулярные гепарины» Вестник службы крови России, 2013, №4, стр. 46-52;
3. F . Peysse lon , S . Ricard-Blum, Heparin-protein interactions: from affinity and kinetics to biological roles. Application to an interaction network regulating angiogenesis. Matrix Biol. 2014,35:73;
4. K. Harter , Levine M. , Henderson S.O ., Anticoagulation drug therapy: a review, West J Emerg Med. 2015 16(1):11-17;

Дополнительная

- 5.Савельев В.С., Гологорский В.А., Кириенко А.И., Гельфанд Б.Р. Профилактика венозных тромбоэмболических осложнений. В кн.: Савельев В.С., ред. Флебология: Руководство для врачей. М.: Медицина; 2001: 390—408;
6. Ferro J.M. Cardioembolic stroke: an update. Lancet Neurol. 2003; 2(3): 177—88;
7. Fuster V., Badimon L., Badimon J.J., Chesebro J.H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. N.Engl. J. Med. 1992; 326: 242—50;
8. Stevanovic G., Tucakovic G., Dotlic R., Kanjuh V. Correlation of clinical diagnoses with autopsy findings: a retrospective study of 2145 consecutive autopsies. Hum. Pathol. 1986; 17: 1225—30;
9. Caprini J.A., Tapson V.F., Hyers T.M., Waldo A.L., Wittkowsky A.K., Friedman R. Treatment of venous thromboembolism: adherence to guidelines and impact of physician knowledge, attitudes, and beliefs. J. Vasc. Surg. 2005; 42: 726—33;
10. Mulloy B. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. An Acad Bras Cienc. 2005, 77(4):651-64;
11. M. Hoffman, Heparins: Clinical Use and Laboratory Monitoring, LabMedicine, 2010, 41, 621-626;
12. Casu B, Naggi A, Torri G., Re-visiting the structure of heparin, Carbohydr Res. 2015 Feb 11;403:460;

13. Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Акинъшина С.В. Тромбозы и тромбоэмболии в акушерско-гинекологической клинике. М.: МИА; 2007;
14. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 6th edition. Marder Victor J., Aird William C., Bennett Joel S., Schulman Sam M.D., White Gilbert C., 2011, Lippincott Williams & Wilkins;
15. Bergqvist D. Prophylaxis of postoperative deep vein thrombosis in general surgery: experiences with fragmin. Acta Chir Scand Suppl 1988;543:87-89;
16. Carpini J., Wentworth D. Venous thrombosis prophylaxis. Venous and lymphatic disease. Eds.N.Labropoulos –Ch 14–11/1/2006-189461-XML Model C-pp.177-200;
17. Key N., Makris M., O’Shaughnessy D., Lillicrap D., eds. Practical hemostasis and thrombosis. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009;
18. Gerlach A.T., Pickworth K.K., Seth S.K., Tanna S.B., Barnes J.F. Enoxaparin and bleeding complications: a review in patients with and without renal insufficiency. Pharmacotherapy. 2000; 20: 771—775;
19. Нарушения реакций образования тромбина./ Под ред. Р.У.Колмена. М.: Медицина, 1988 , с. 175 – 208;
20. Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J.,and Salzman, E.W. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia, J.B. Lippincott 1982 p. 962-982;
21. Olson JD, Arkin CF, Brandt JT, et al. Laboratory monitoring of unfractionated heparin therapy. Arch Pathol Lab Med. 1998;122:782-798;
22. Olson JD, Arkin CF, Brandt JT, et al. College of American Pathologists Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy: laboratory monitoring of unfractionated heparin therapy. Arch Pathol Lab Med 1998;122:782–98.

Интернет-ресурсы

23. ГОСТ Р 53133.1-2008 доступен на сайте <http://meganorm.ru/Data2/1/4293829/4293829237.pdf>;
24. ГОСТ Р 53133.2-2008 доступен на сайте <http://gostrf.com/normadata/1/4293829/4293829240.pdf>;

БЕРКОВСКИЙ Арон Леонидович
СЕРГЕЕВА Елена Владимировна
СУВОРОВ Александр Владимирович
МЕЛКУМЯН Анна Леоновна
КОЗЛОВ Альберт Анатольевич
НЕШКОВА Елена Андреевна
ЯРОВАЯ Галина Алексеевна

Методы определения активности гепарина

Учебно-методическое пособие

Редактор

Подписано в печать.... Формат 60x90 **1/16**

Печать... Бумага...

Гарнитура Times New Roman Сур. Усл. Печ. Л... Усл. Кр. – отг., .

Уч. – изд. л. ...Тираж ... экз.

Заказ № ... С (...).

Российская медицинская академия последипломного образования
ГБОУ ДПО РМАПО Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1, Москва, 123995

Электронный адрес www.rmapo.ru

E-mail: rmapo@rmapo.ru