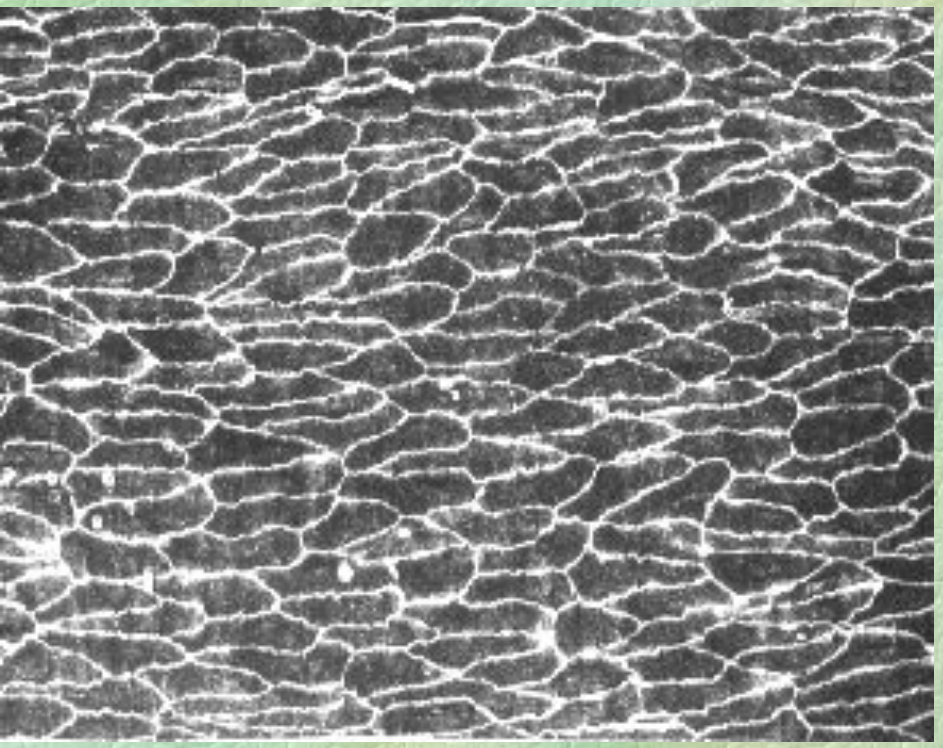
ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

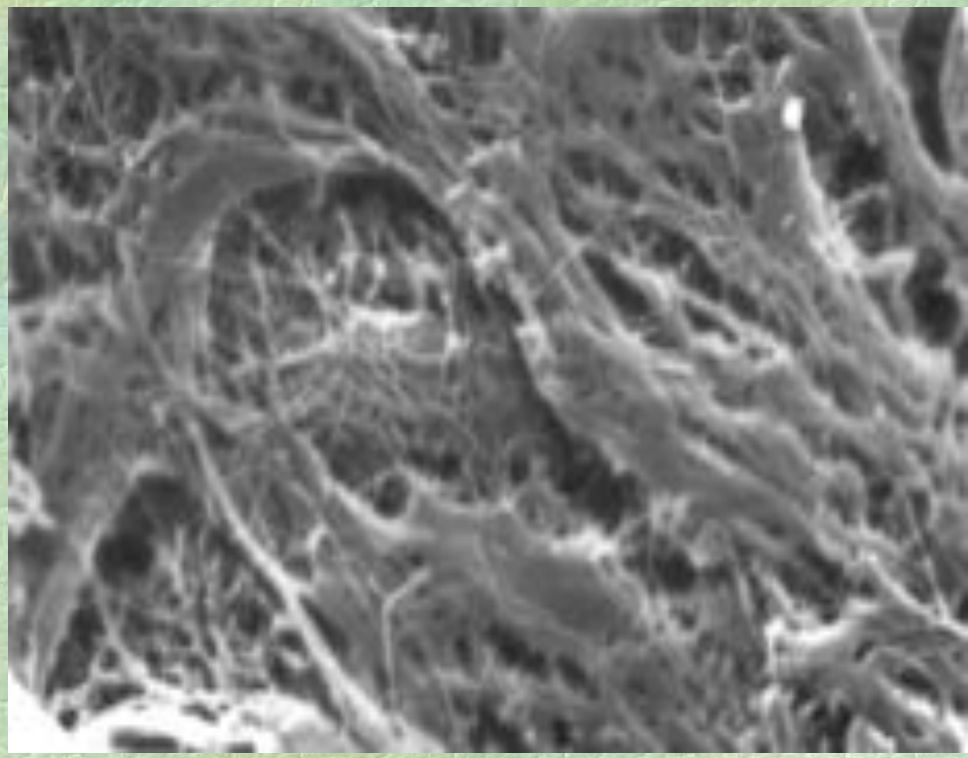
- Сосудистая стенка (эндотелий
- Клетки крови (тромбоциты)
- Плазменные факторы
- Фибринолиз
- Антикоагулянты

Этапы гемостаза

Первичный гемостаз (сосудисто-тромбоцитарный)	Вторичный гемостаз (плазменный)	Фибринолиз
* Вазоконстрикция (немедленно) * Адгезия тромбоцитов (секунды) * Агрегация тромбоцитов (минуты)	* Активация плазменных факторов свертывания * Образование фибрина (минуты)	* Активация факторов фибринолиза (минуты) * Лизис кровяного сгустка (часы)

Принцип контактного взаимодействия

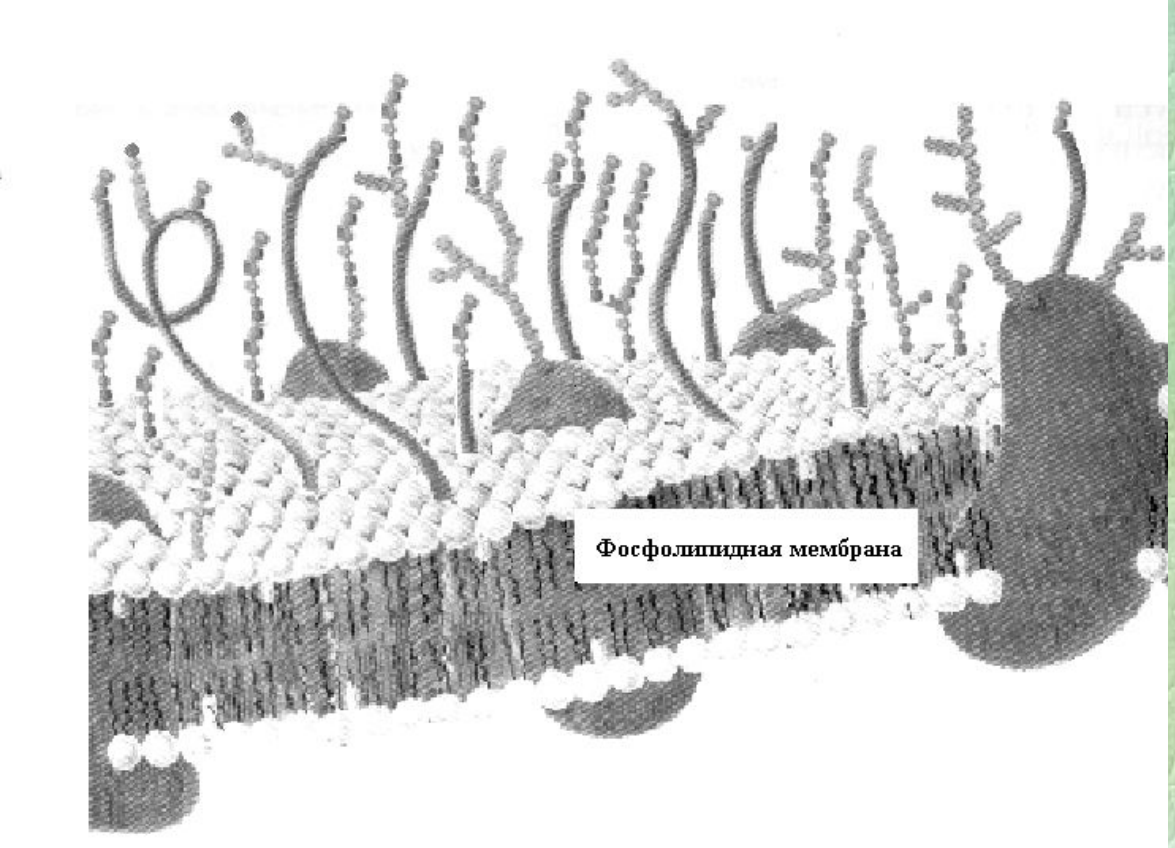


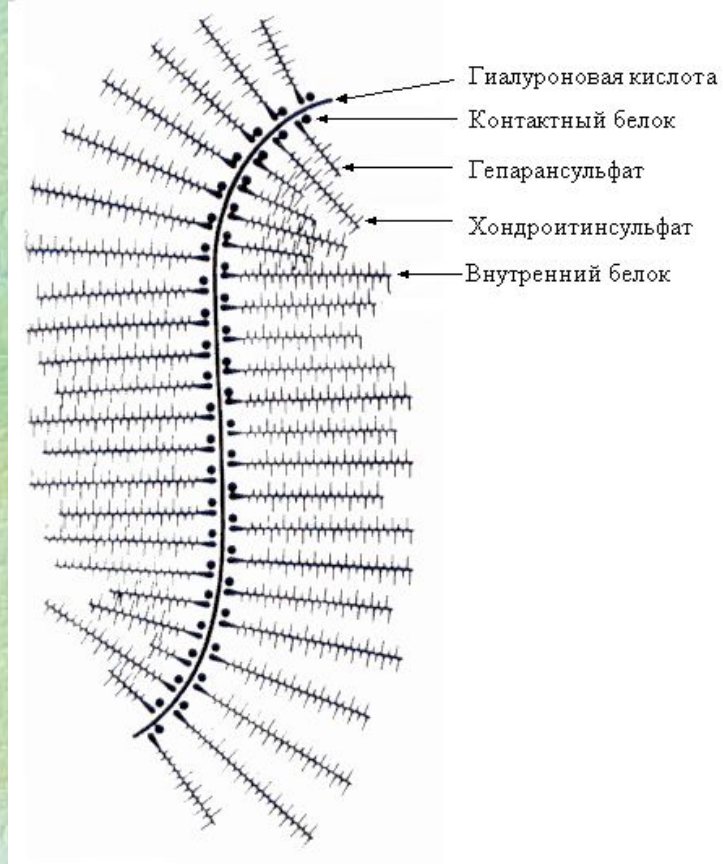


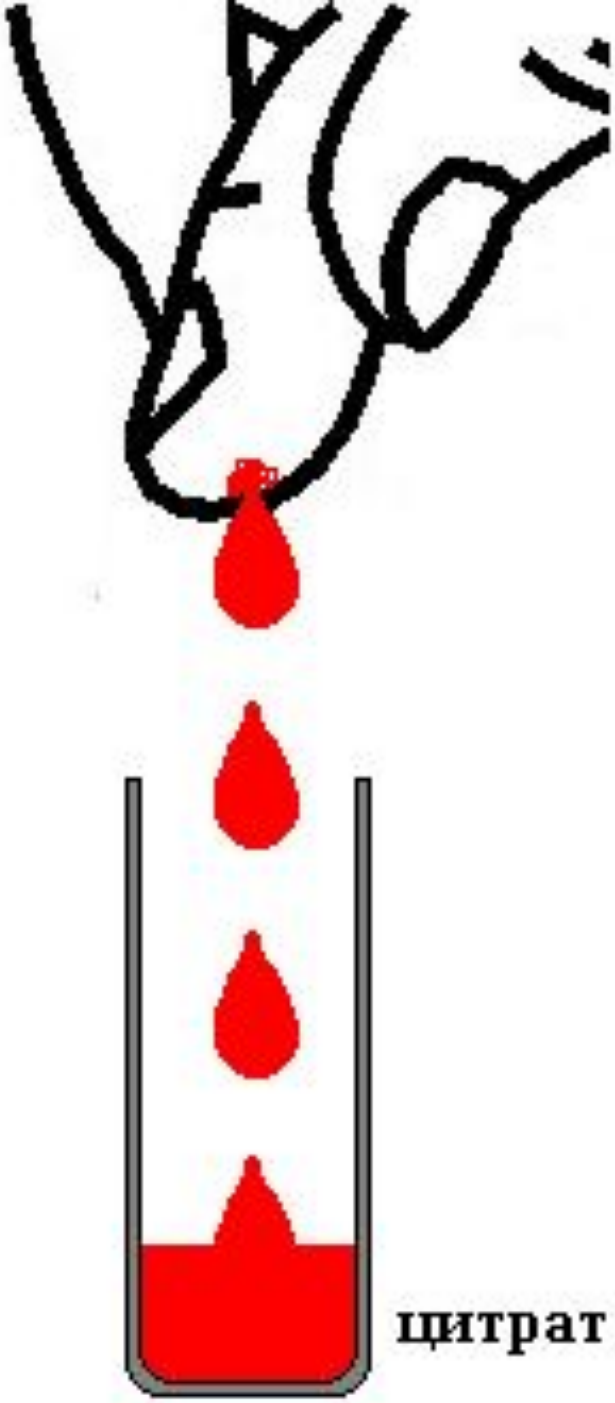
Эндотелиальный покров сосудов – гладкая текучая поверхность. Целостность эндотелия – основное условие несвертывания крови в сосудистом русле

Субэндотелий организован полимерными белками: коллагеном, эластином, имеющими свойство твердого тела. Субэндотелий обладает выраженным тромбогенным эффектом

Протеогликан – основной элемент гликокаликса, сформированного на поверхности неповреженной сосудистой стенки

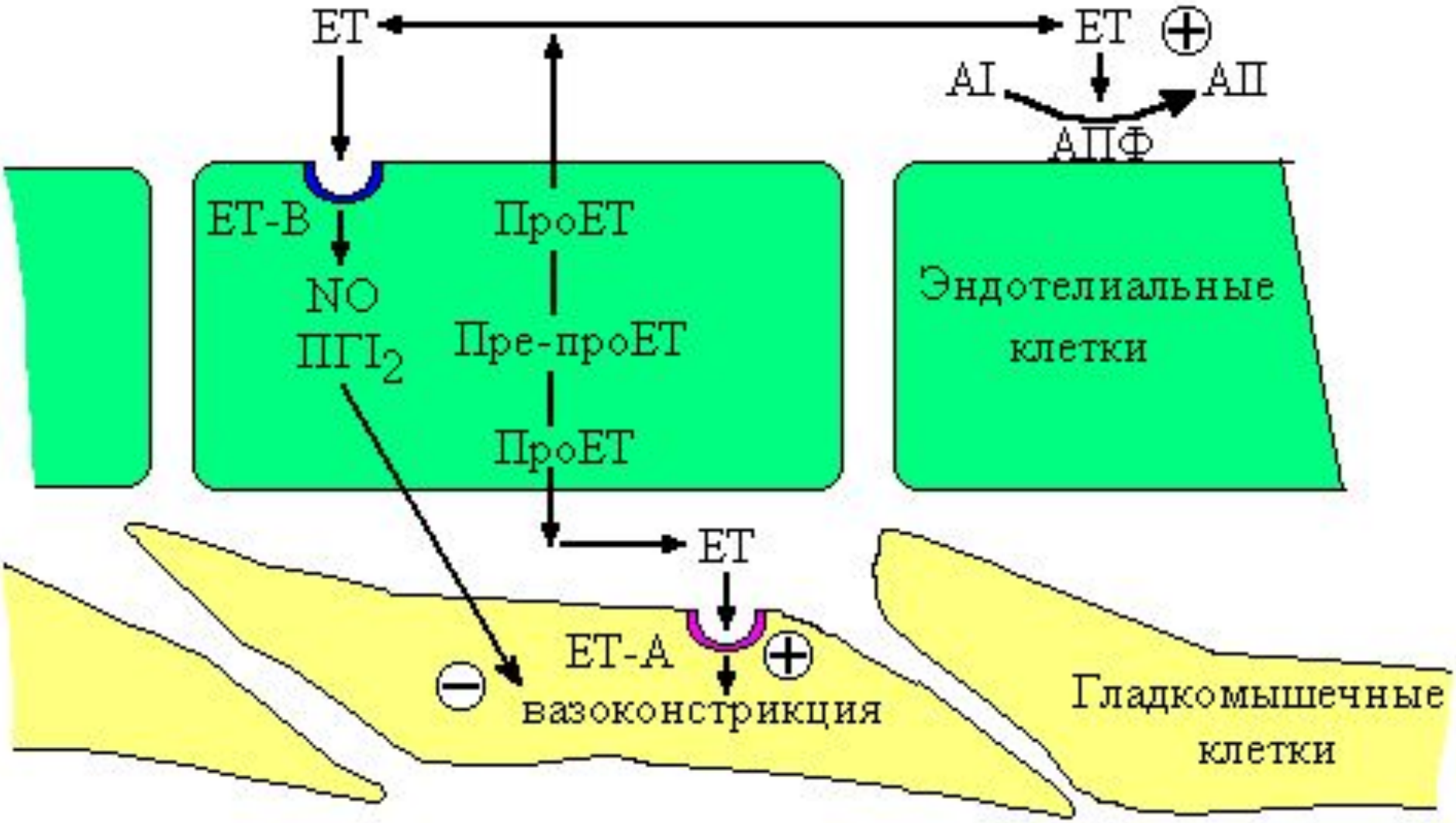






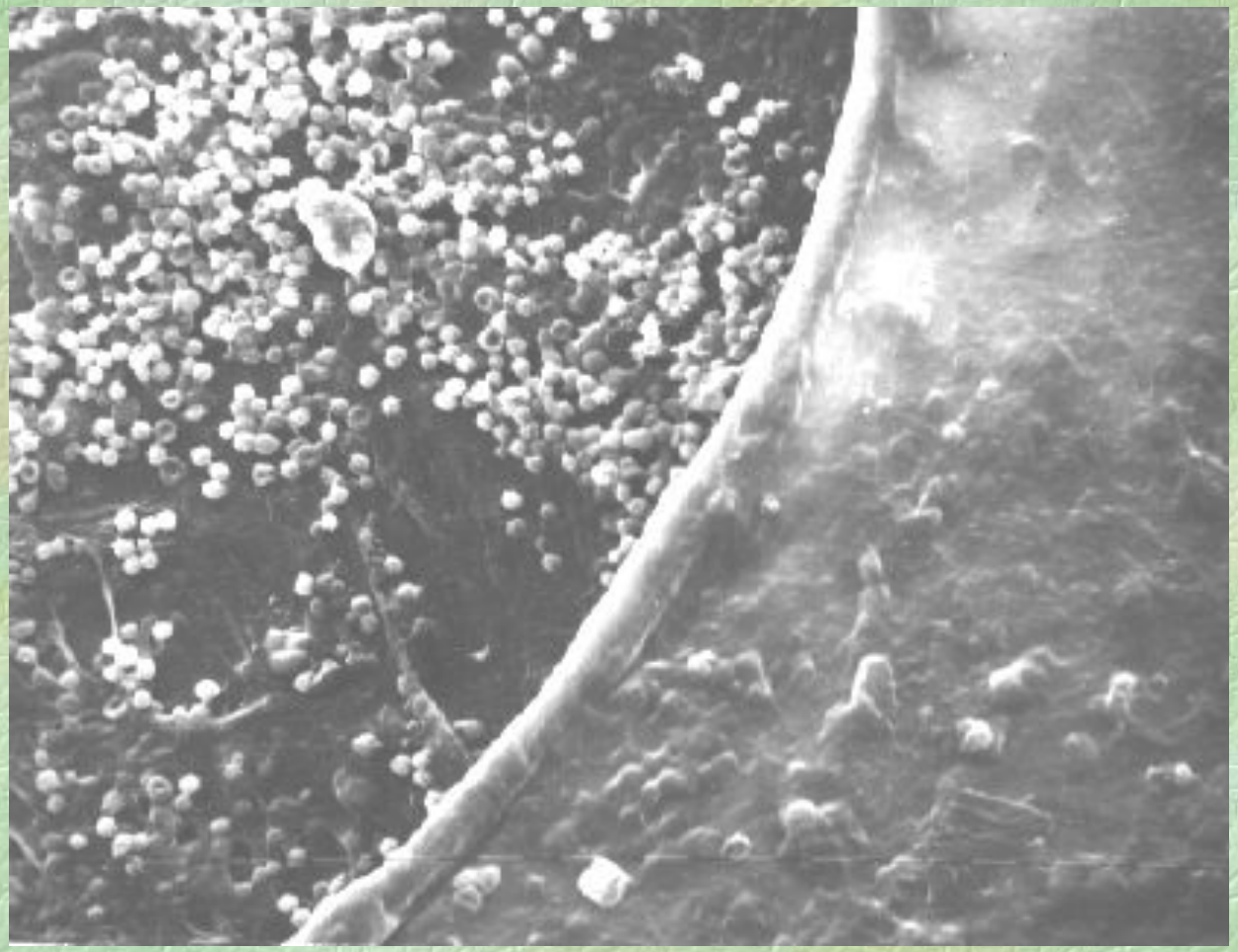
При взятии крови в антикоагулянт не допускается стекание крови по коже пальца, по стенке пробирки и любой другой поверхности, так как мгновенно происходит контактная активация процесса свертывания. Кровь самотеком из прокола должна попадать прямо в антикоагулянт, перемешиваясь с ним.

В физиологических концентрациях эндотелин действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение факторов релаксации, а в более высоких – активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию



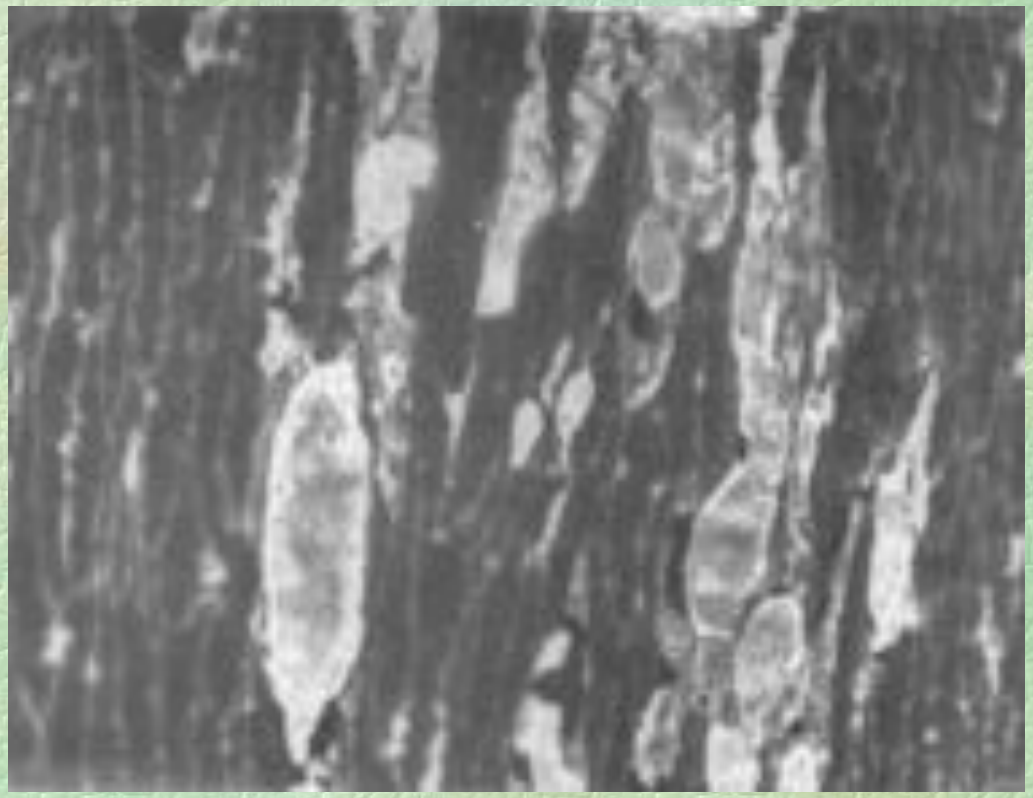
Сравнительная характеристика эндотелина и липидов у пациентов с нестабильной стенокардией

Показатель	Пациенты с нестабильной стенокардией	Здоровые люди	Достоверность различий	Референтные значения
Общий холестерин (ммоль/л)	5,43 ± 0,89	3,98 ± 0,87	P < 0,05	3,5 – 5,2
ХС-ЛПНП (ммоль/л)	3,27 ± 0,57	2,47 ± 0,69	P < 0,05	1,0 – 3,5
ХС-ЛПВП (ммоль/л)	1,19 ± 0,25	1,08 ± 0,27	нд	1,0 – 1,9
Общие триглицериды (ммоль/л)	1,77 ± 0,65	0,82 ± 0,49	P < 0,05	0,5 - 2,0
Эндотелин-1 (пг/мл)	**1,29 ± 0,59**	**0,58 ± 0,17**	**P < 0,01**	**0,3 – 0,9***



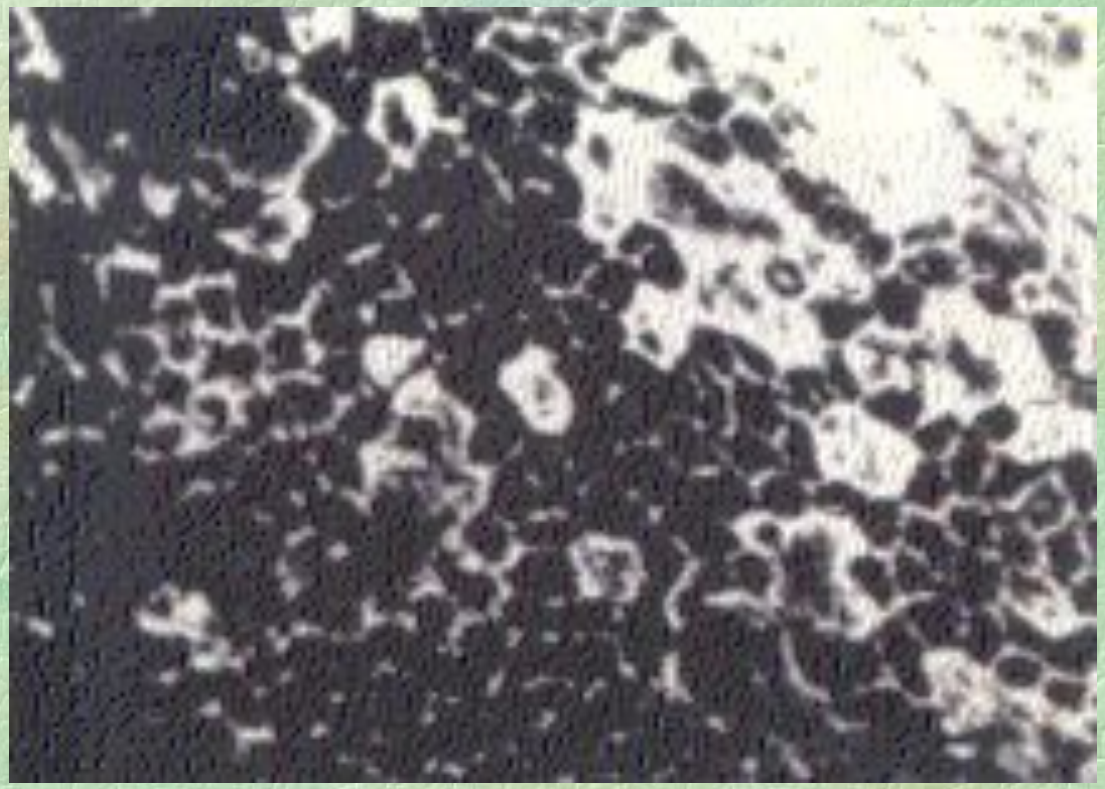
ЭНДОТЕЛИЙ ПРИ СЕПСИСЕ

Септическое повреждение эндотоксином

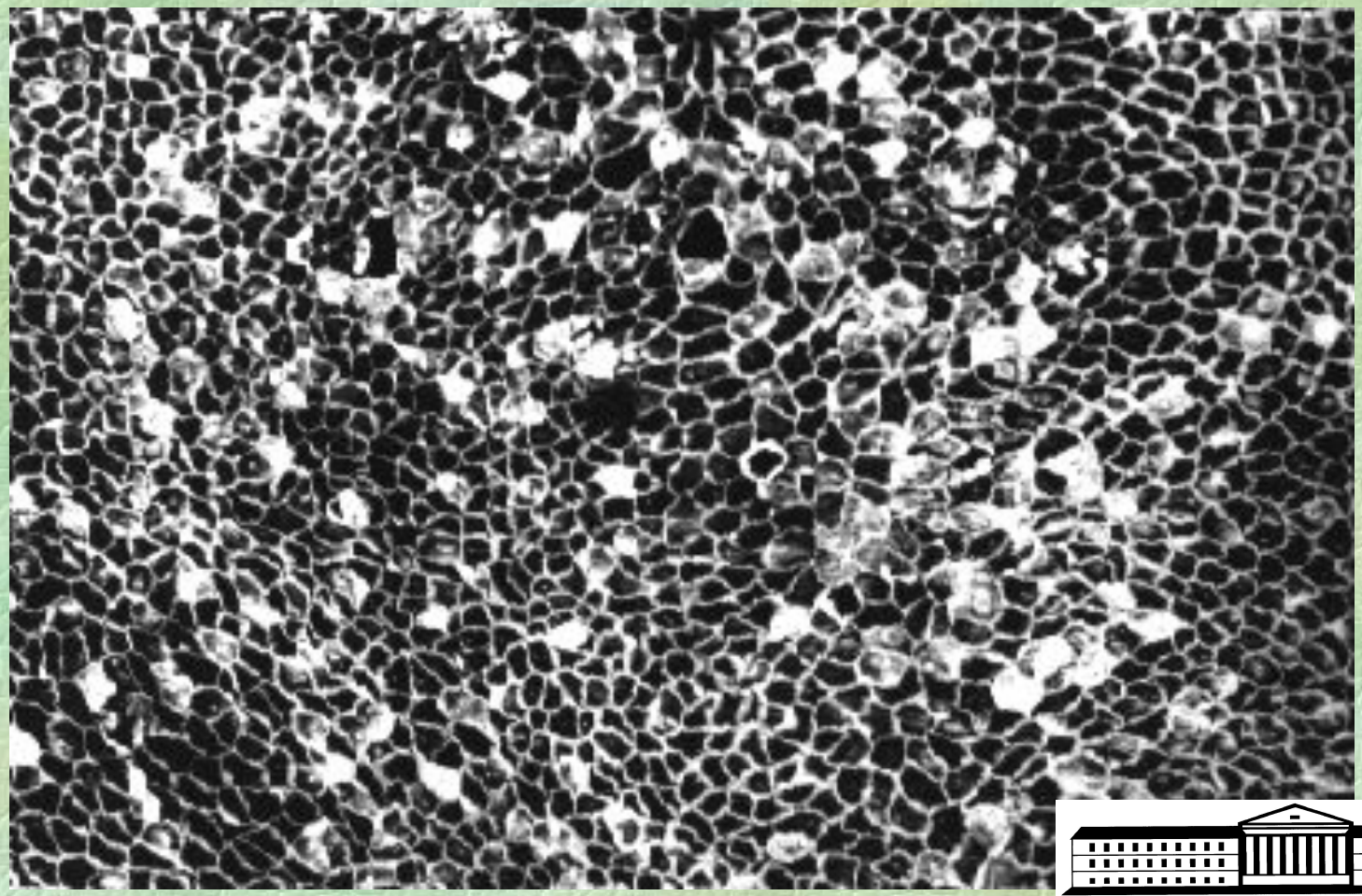


ЭНДОТЕЛИЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Пупочная вена

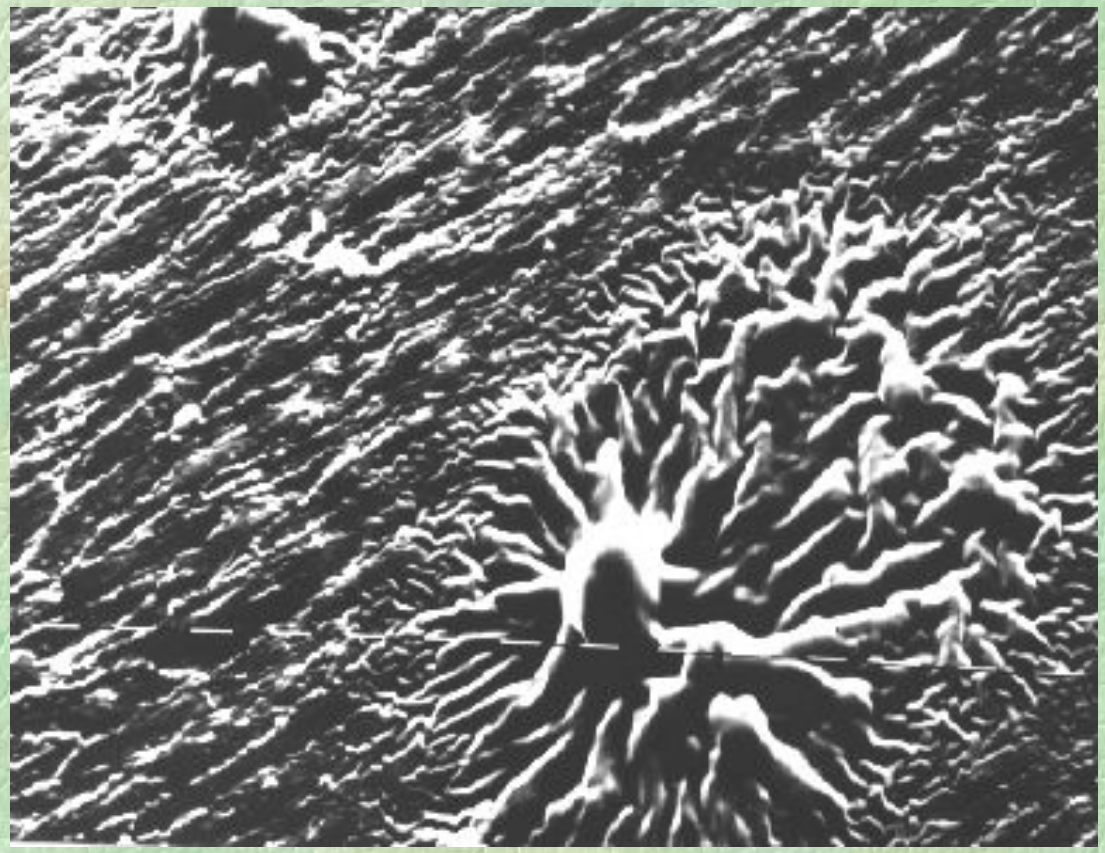


ПУПОЧНАЯ ВЕНА БОЛЬНОЙ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

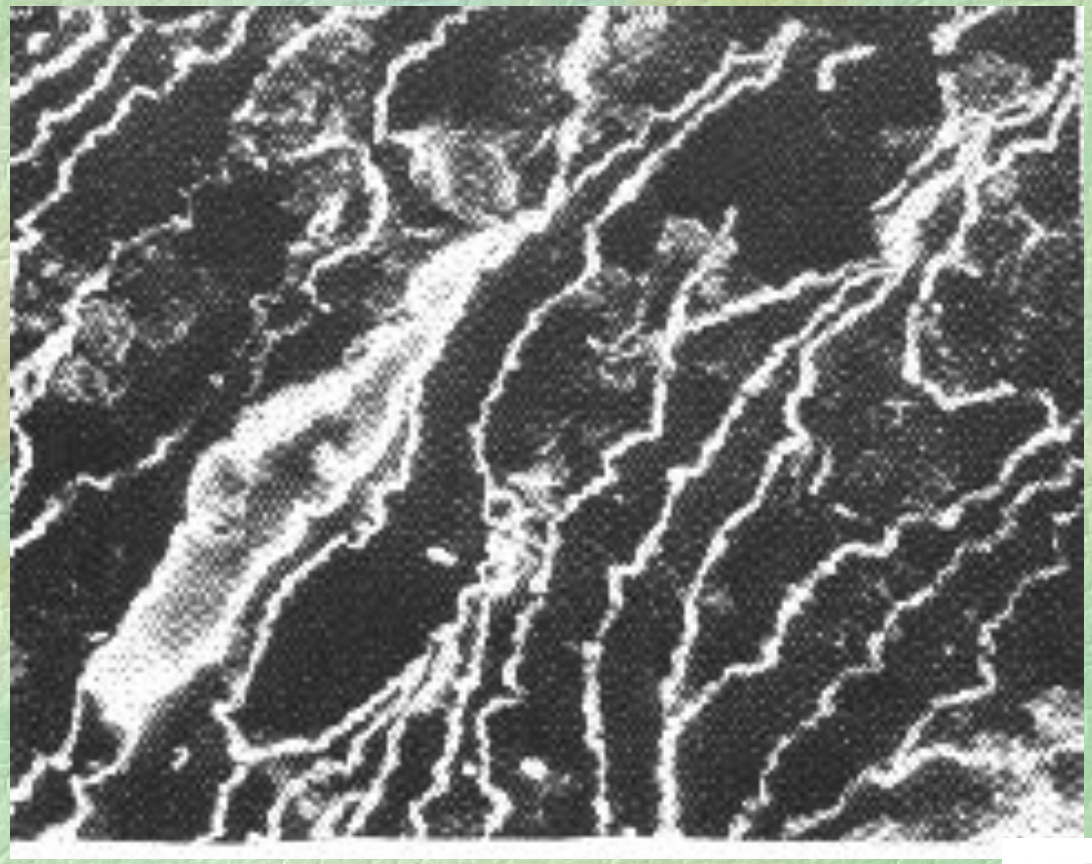


ПОВРЕЖДЕНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ СТРЕССЕ

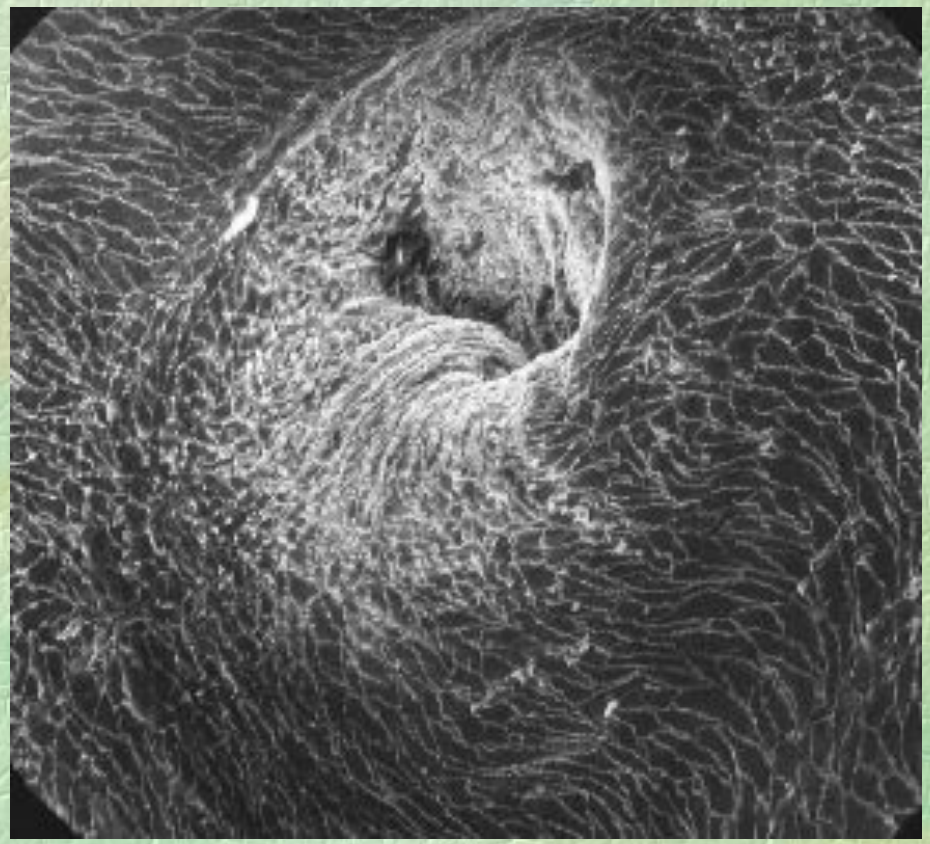
Ребенок погиб после агонального периода



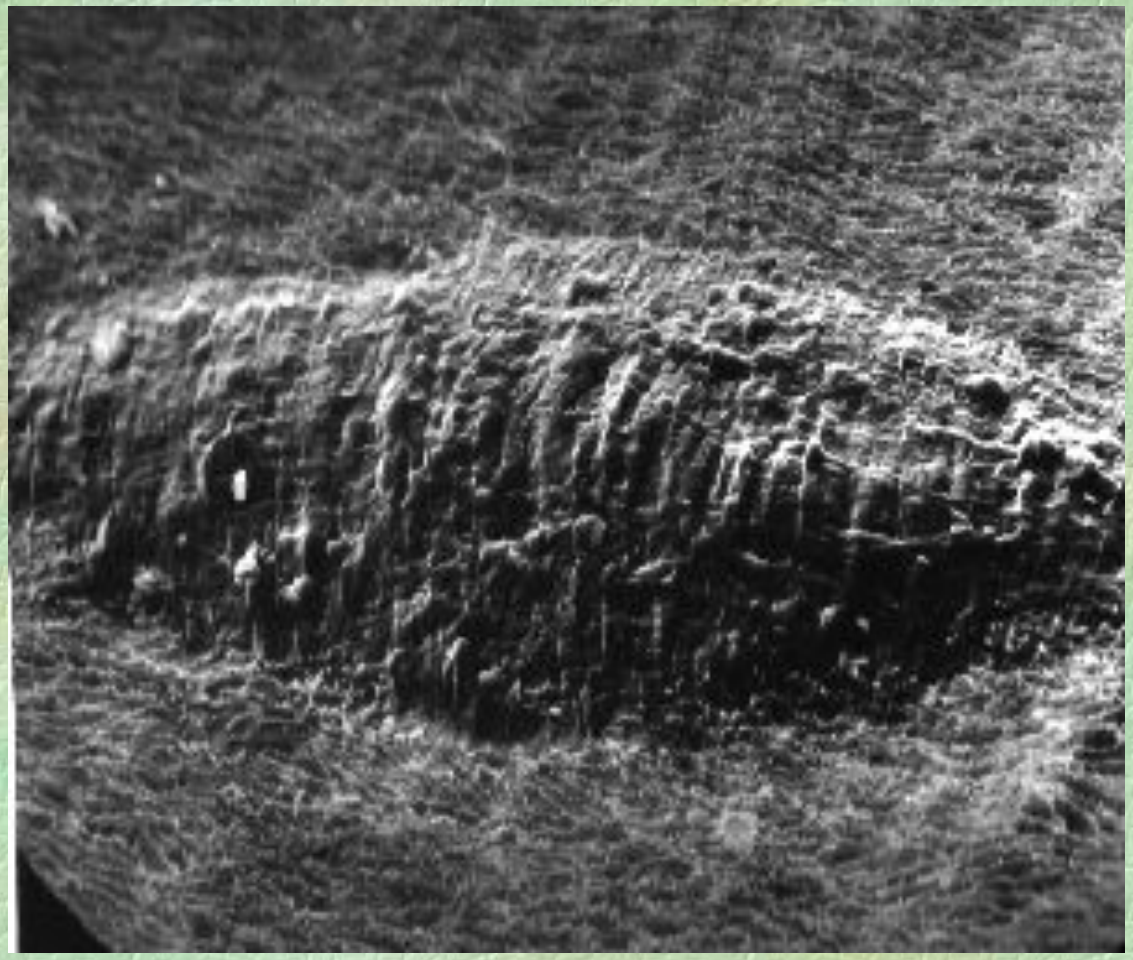
ПОСТРЕЦЕПТОРНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ



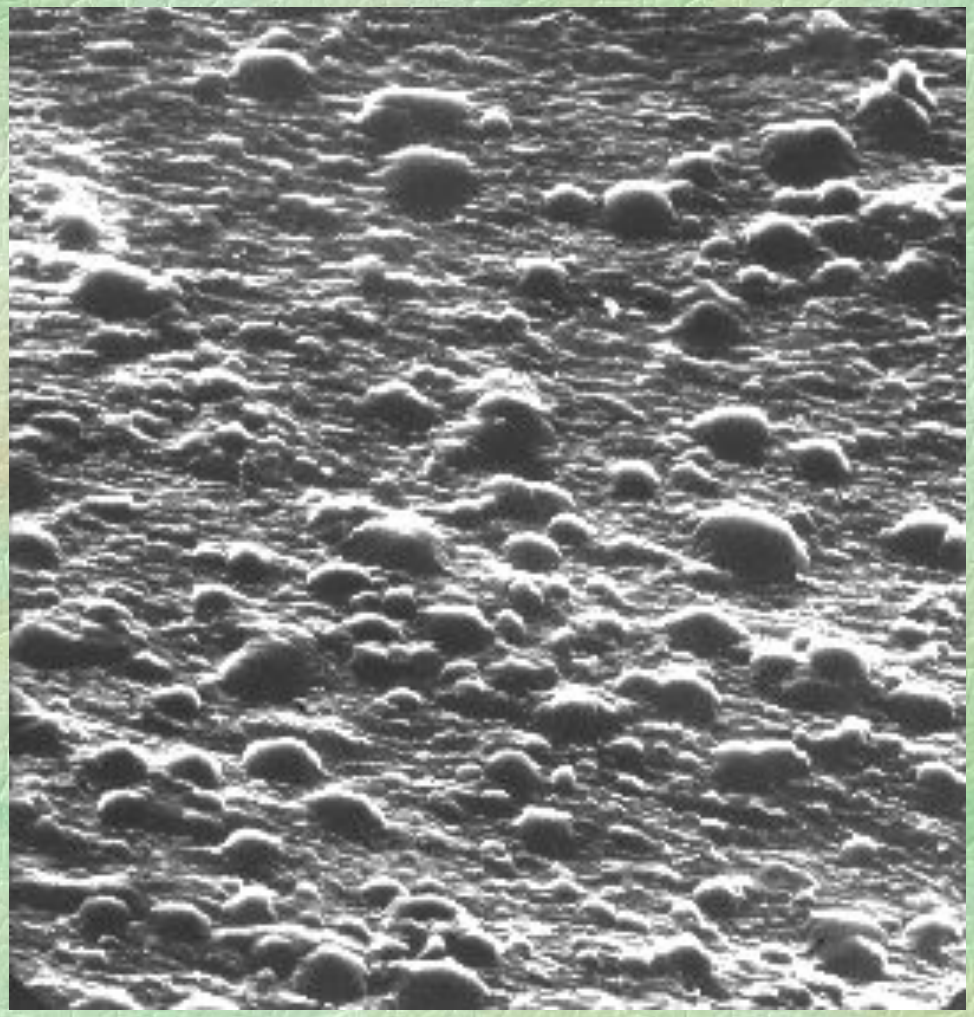
ЗОНА ГЕМОДИНАМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ У ЧСТЬЯ МЕЖРЕБЕРНОЙ АРТЕРИИ



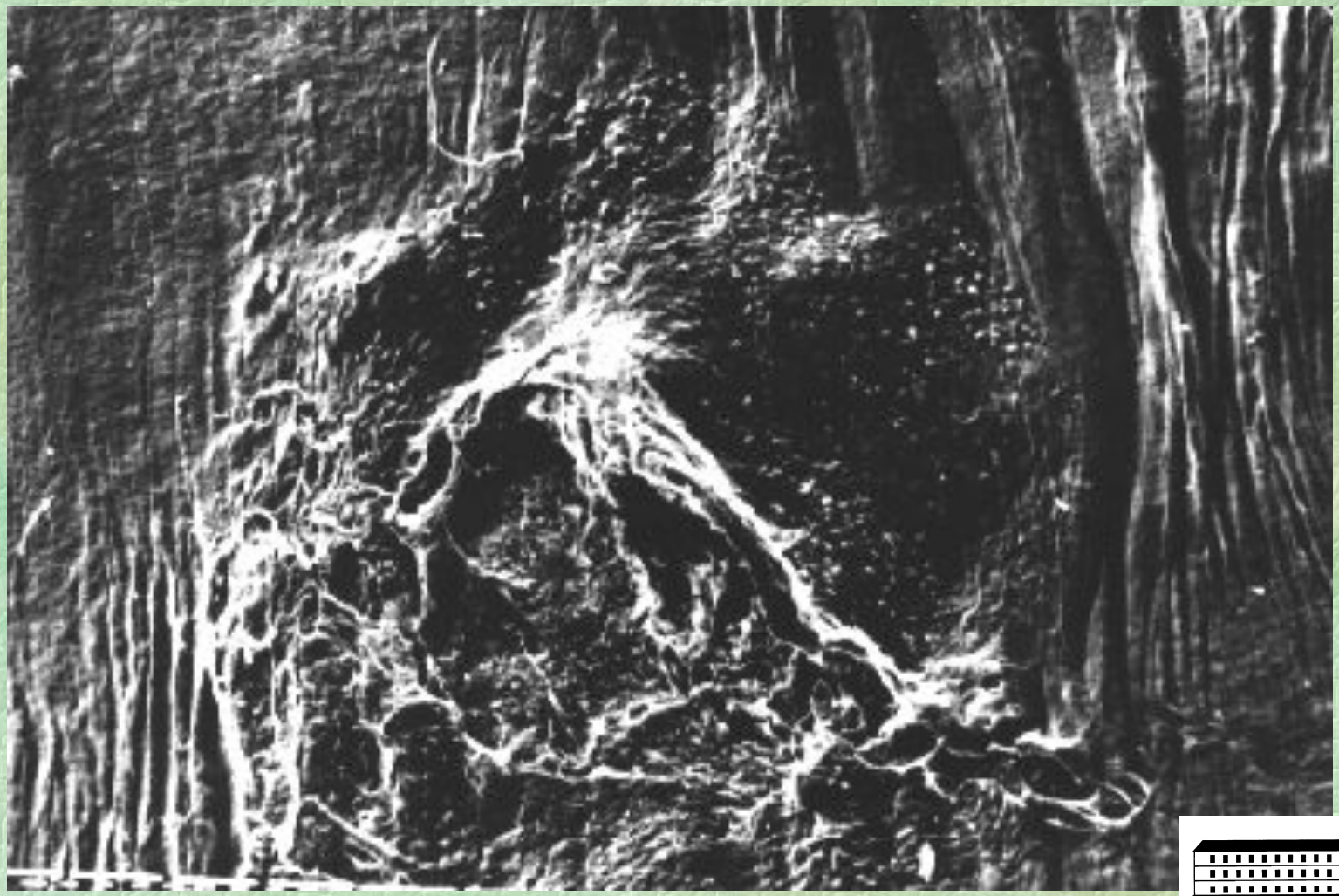
Атеросклеротическая бляшка



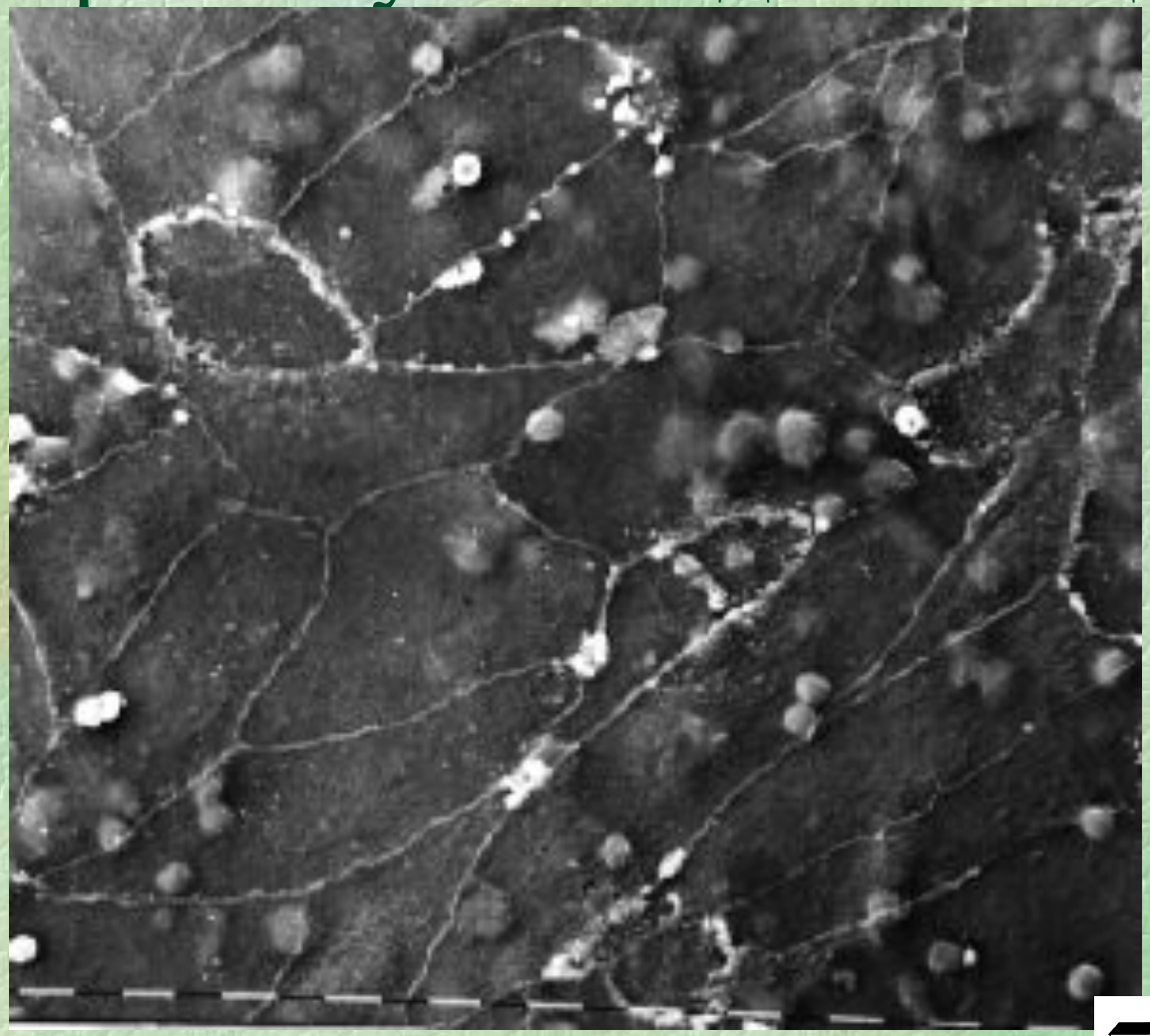
Липоидоз сосудистой стенки



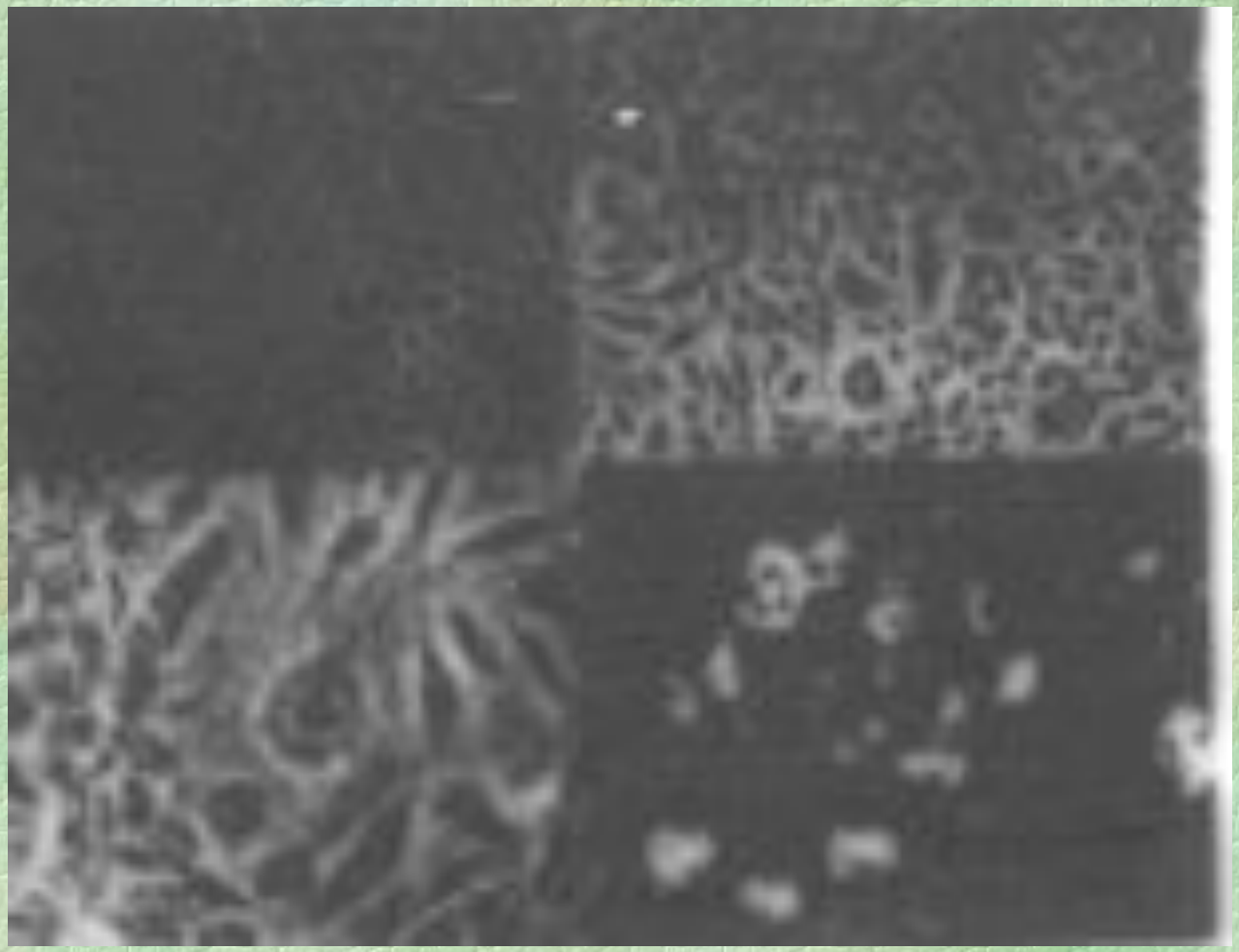
ЛОПНУВШАЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКАЯ БЛЯШКА



Многоядерные гигантские перерастянутые эндотелиоциты

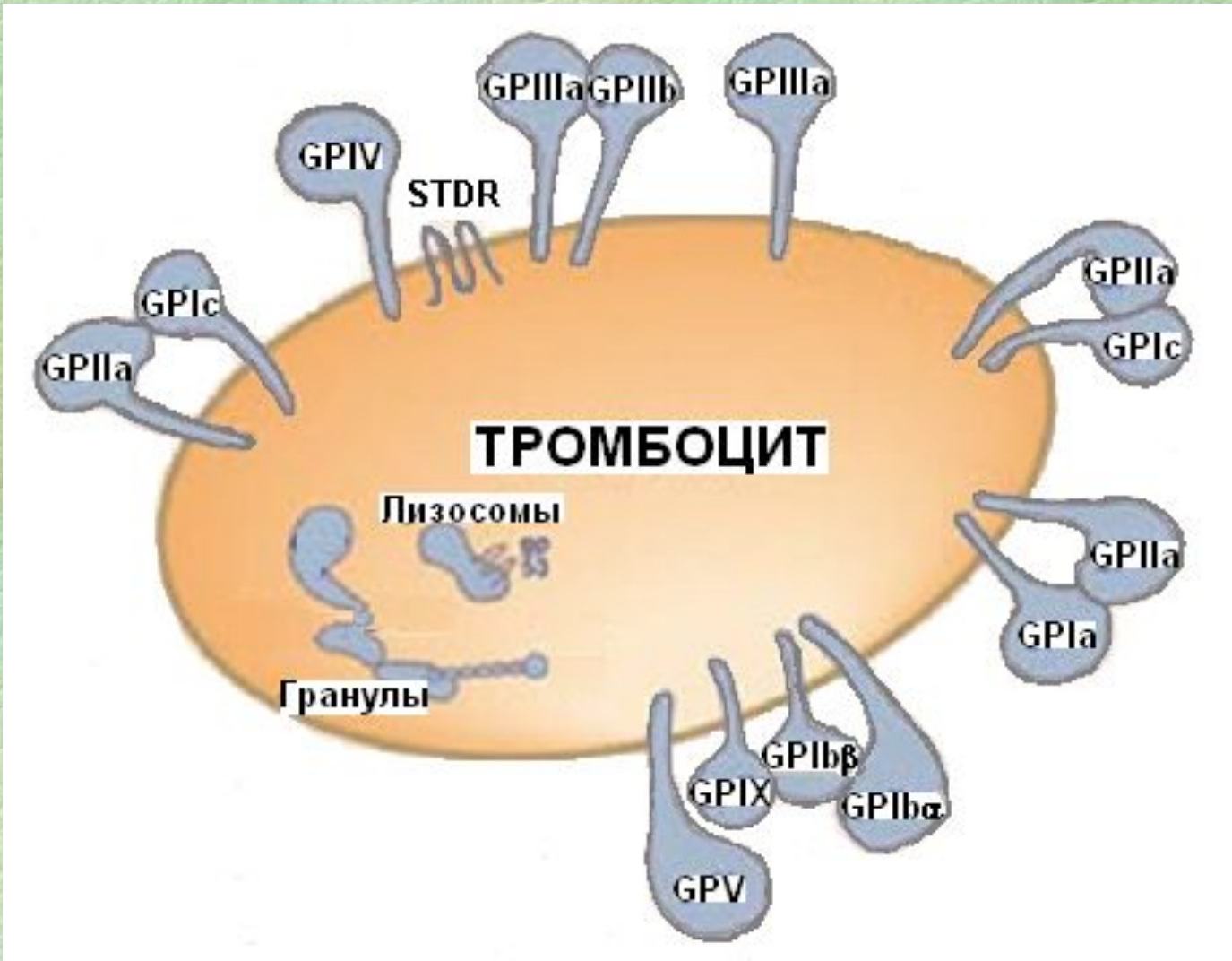


Эндотелий в культуре

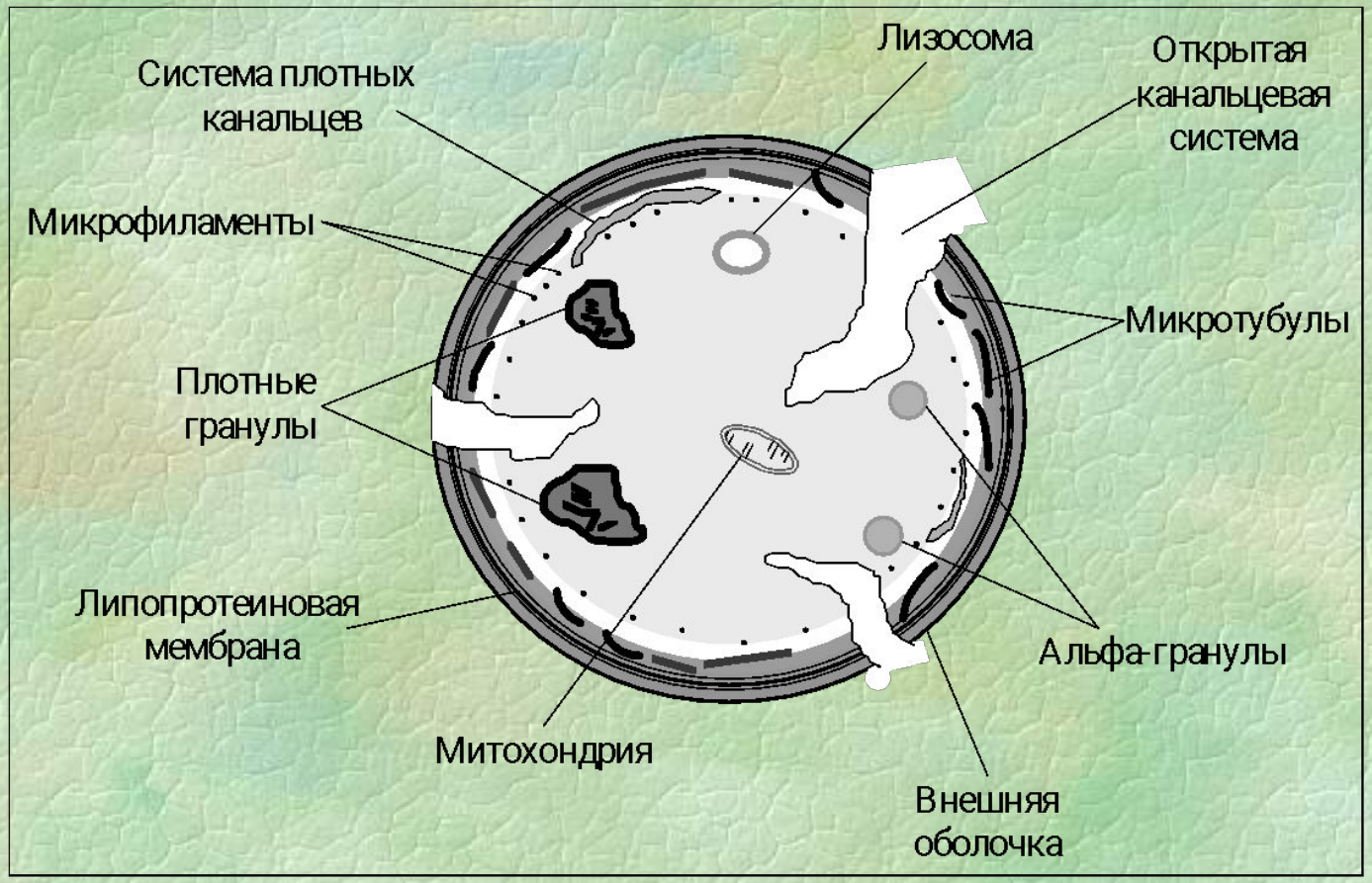


Тромбоцит

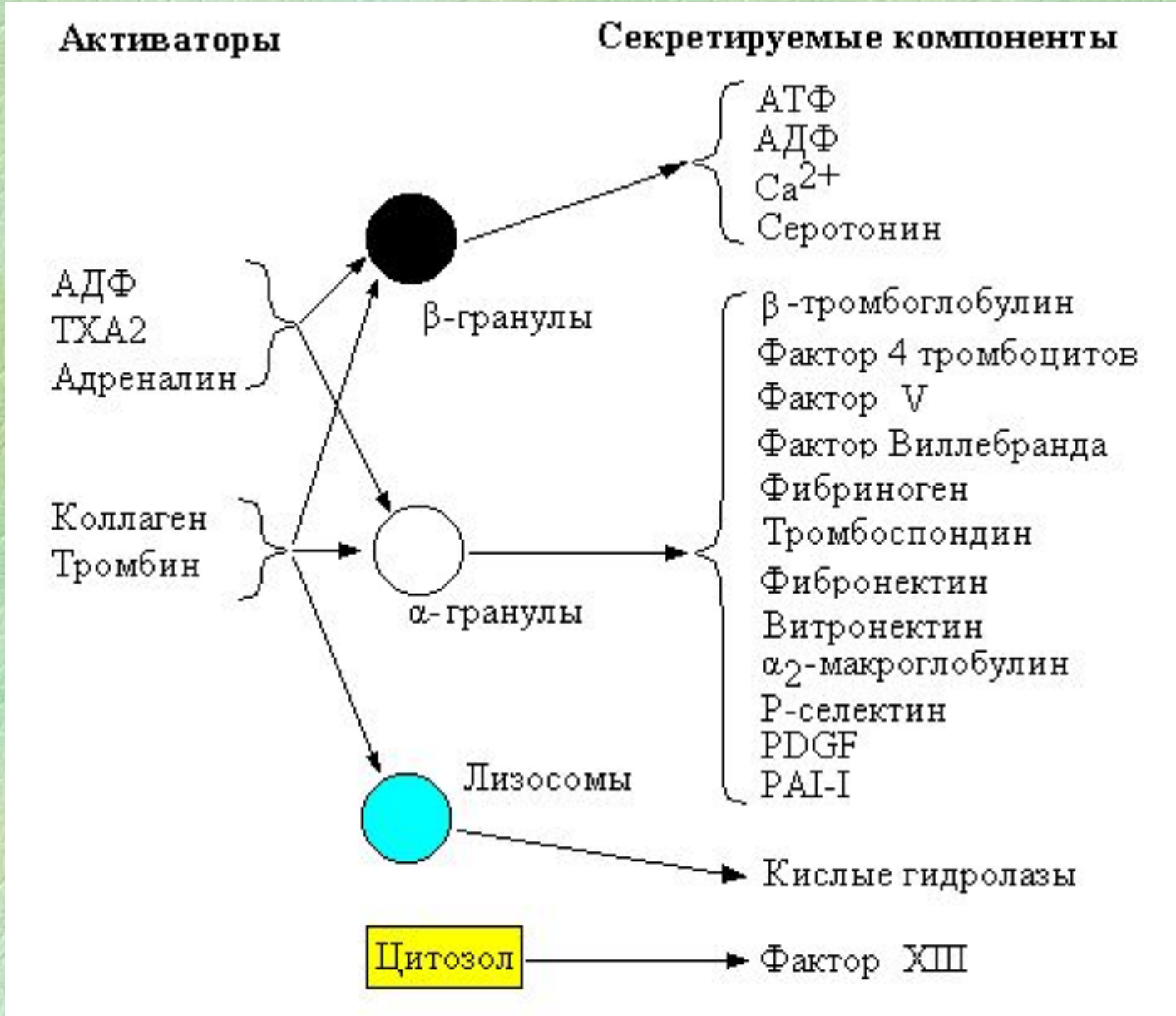
Рецепторы тромбоцита

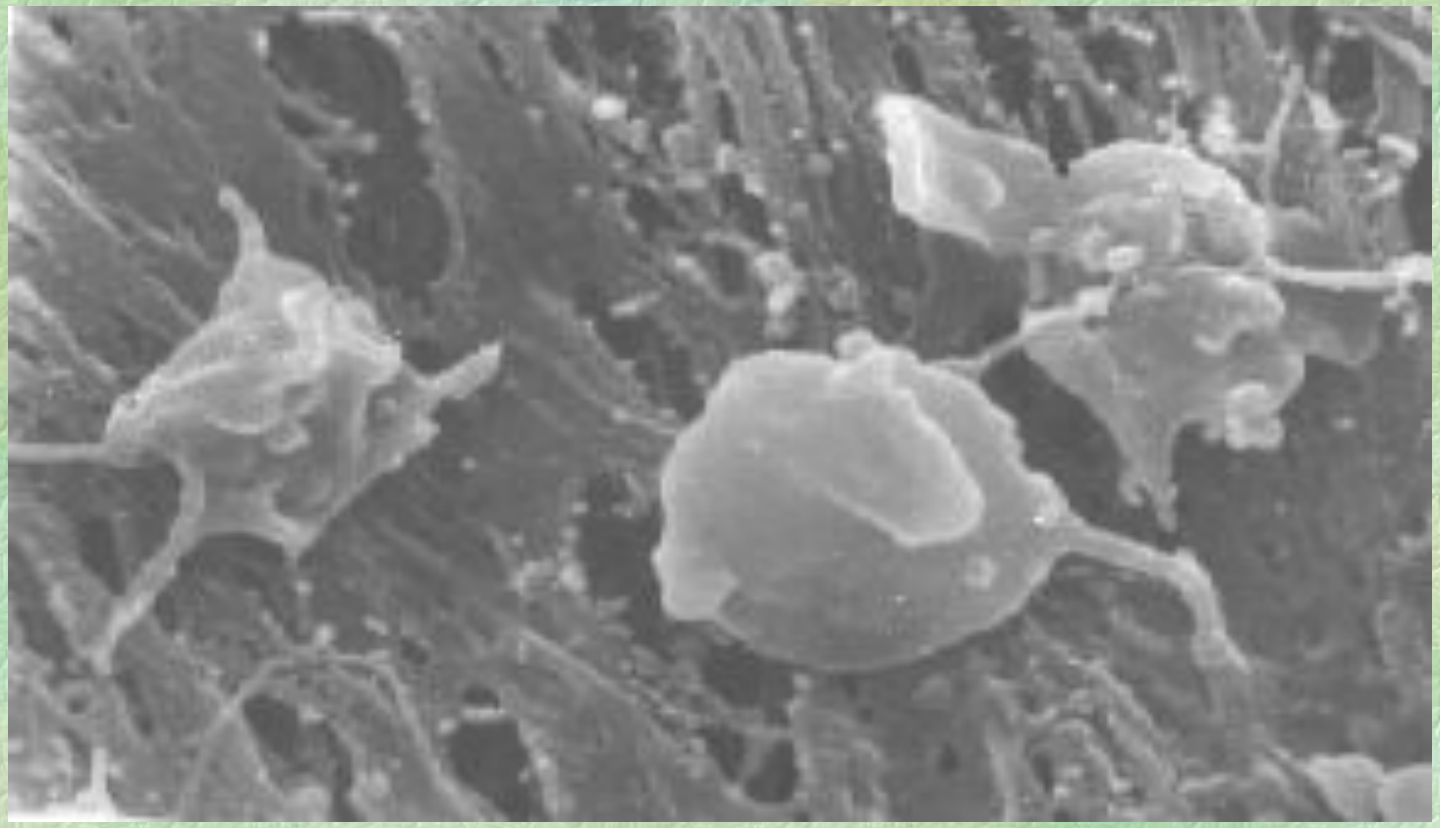


Микроскопическое строение тромбоцита



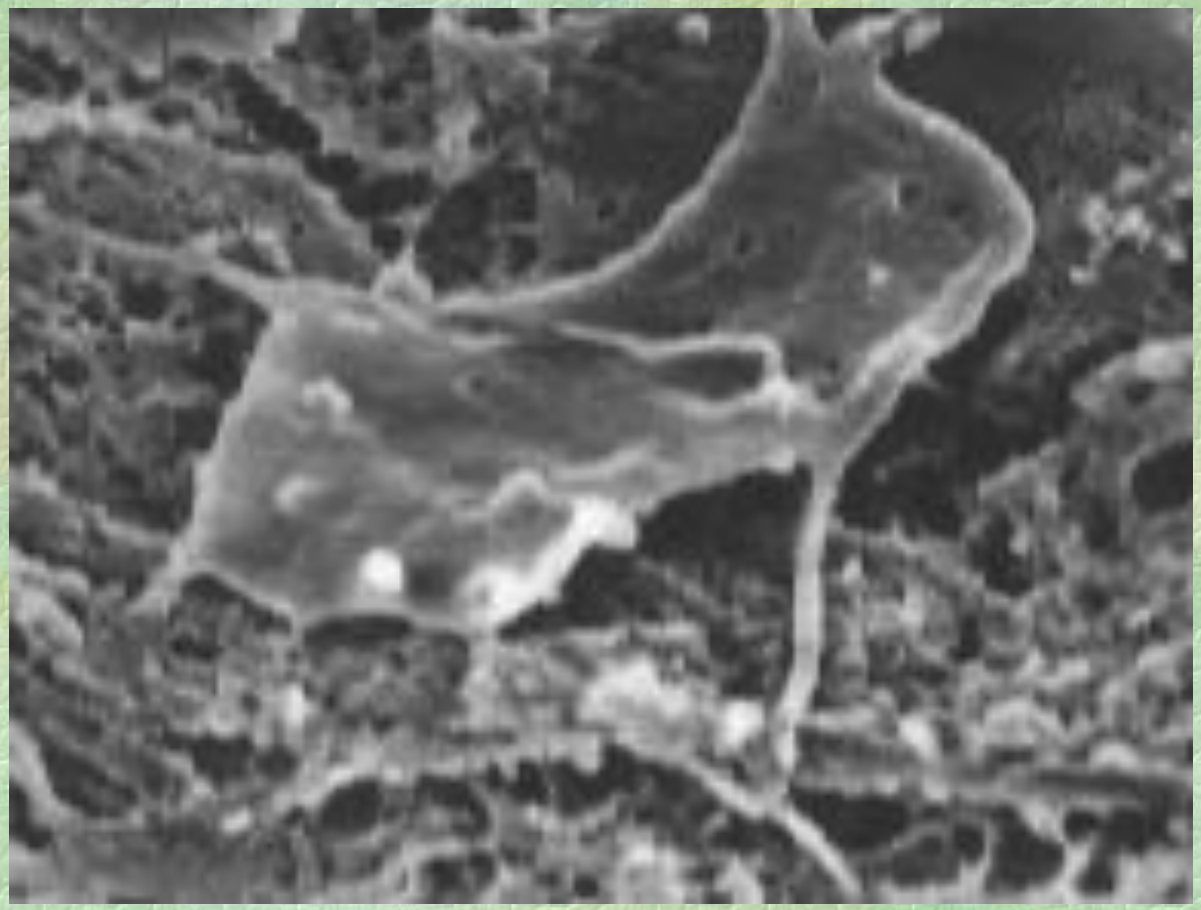
Факторы тромбоцитов



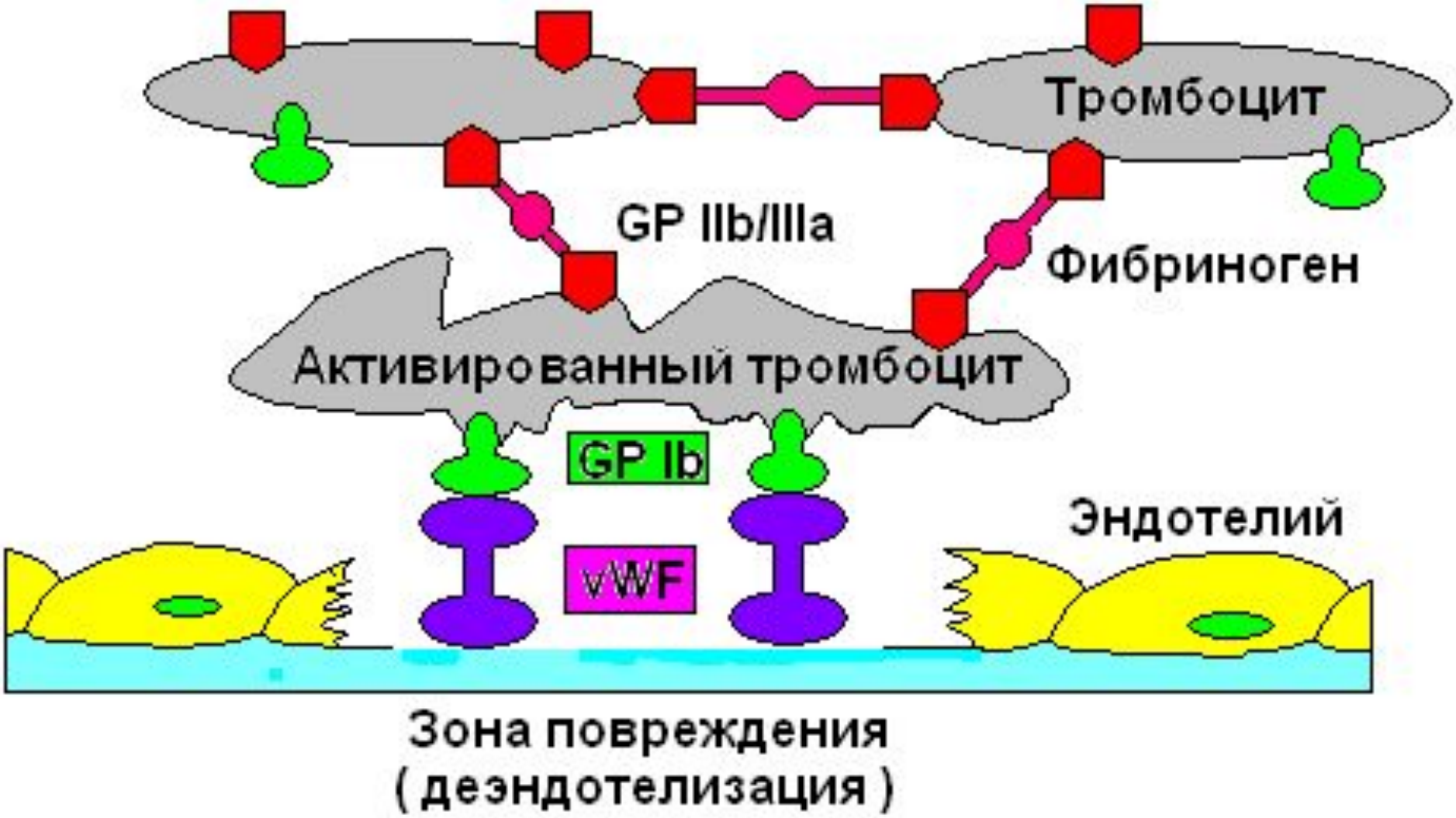


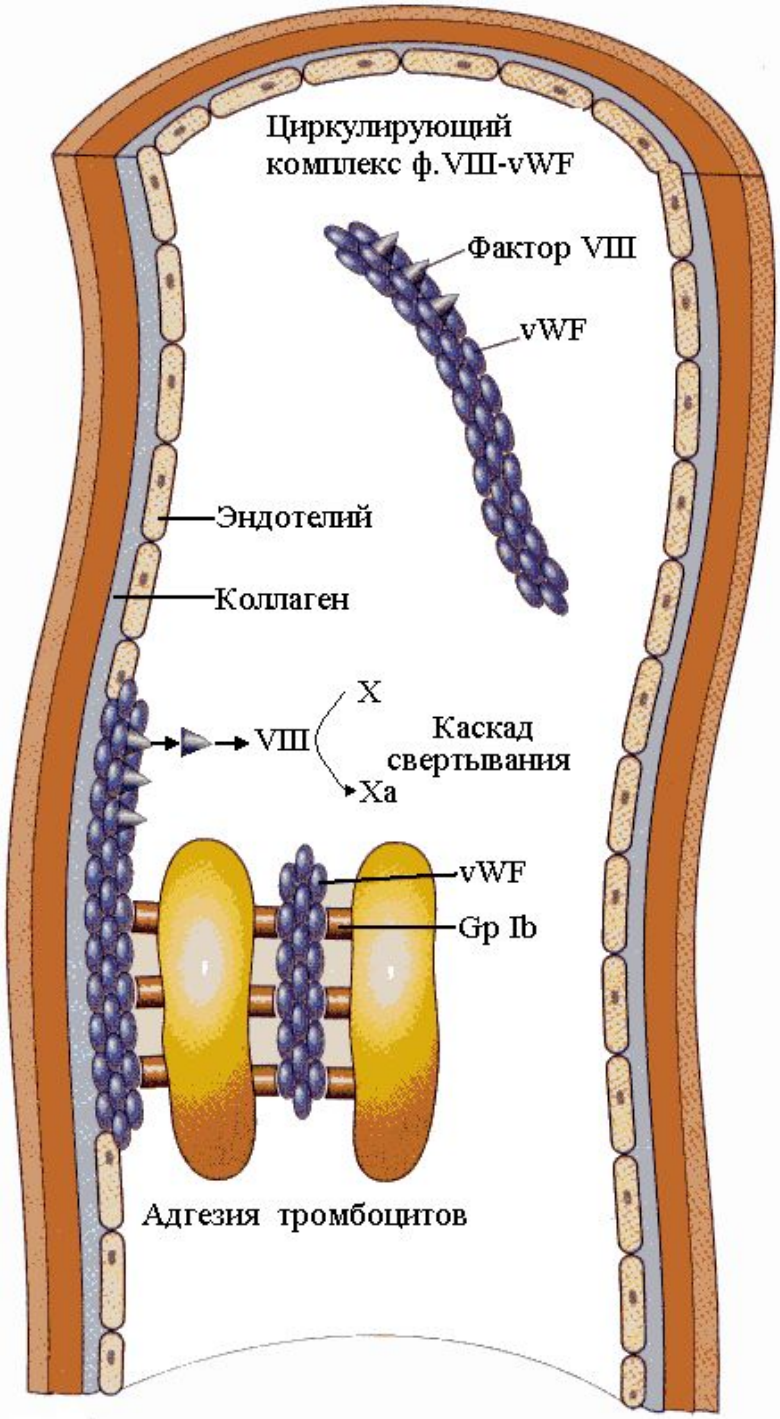
АДГЕЗИРОВАННЫЕ ТРОМБОЦИТЫ

Микроагрегат



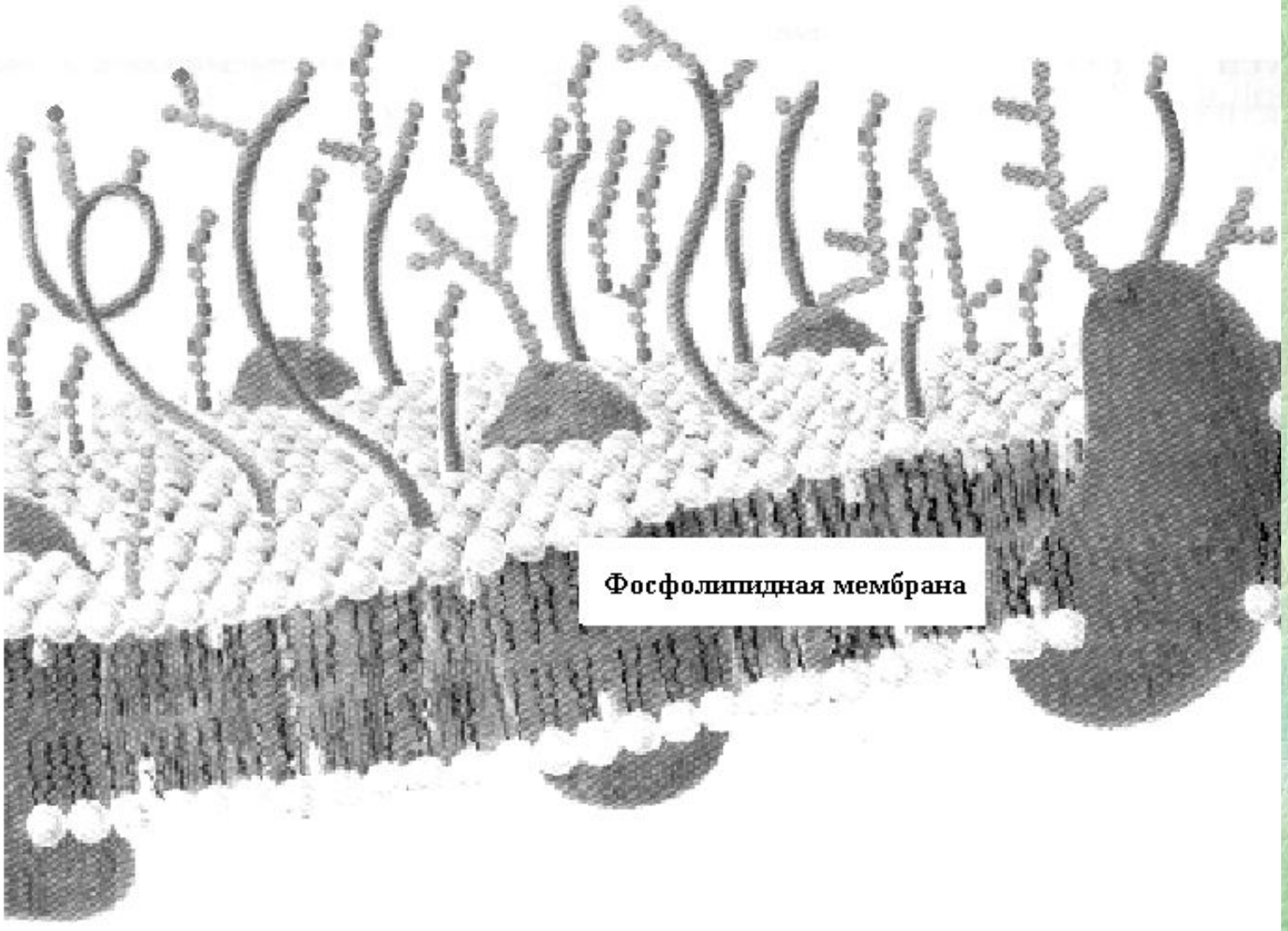
Адгезия и агрегация тромбоцитов





Комплекс фактор VIII-фактор Виллебранда (ф.VIII-vWF) состоит из 2 отдельных белков, которые выполняют в гемостазе разные функции, имеют разную химическую и иммунологическую структуру. Фактор VIII синтезируется главным образом в печени, он необходим для активации X фактора в каскаде свертывания крови, его дефицит вызывает гемофилию А. Фактор Виллебранда (vWF) – полимерный белок, который составляет основную массу комплекса, он синтезируется в эндотелии сосудов и мегакариоцитах, необходим для адгезии тромбоцитов к поврежденной стенке сосудов

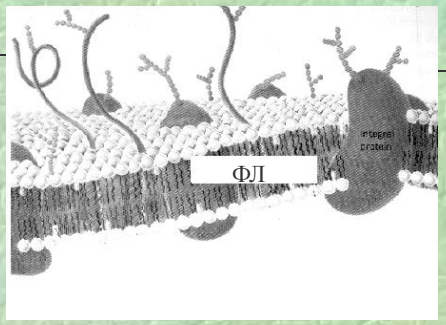
Модель клеточной мембраны



Фосфолипаза С

диглицерид

моноглицерид



Фосфолипаза A_2

АРАХИДОНОВАЯ КИСЛОТА

5ГПЕТЕ *Липооксигеназа*

Лейкоциты

Циклооксигеназа

ПГG_2

Пероксидаза

ПГH_2

Простагландин-синтетаза — **ПГI_2**

Изомераза — **ПГD_2** **ПГE_2**

Редуктаза — **ПГ$F_{2\alpha}$**

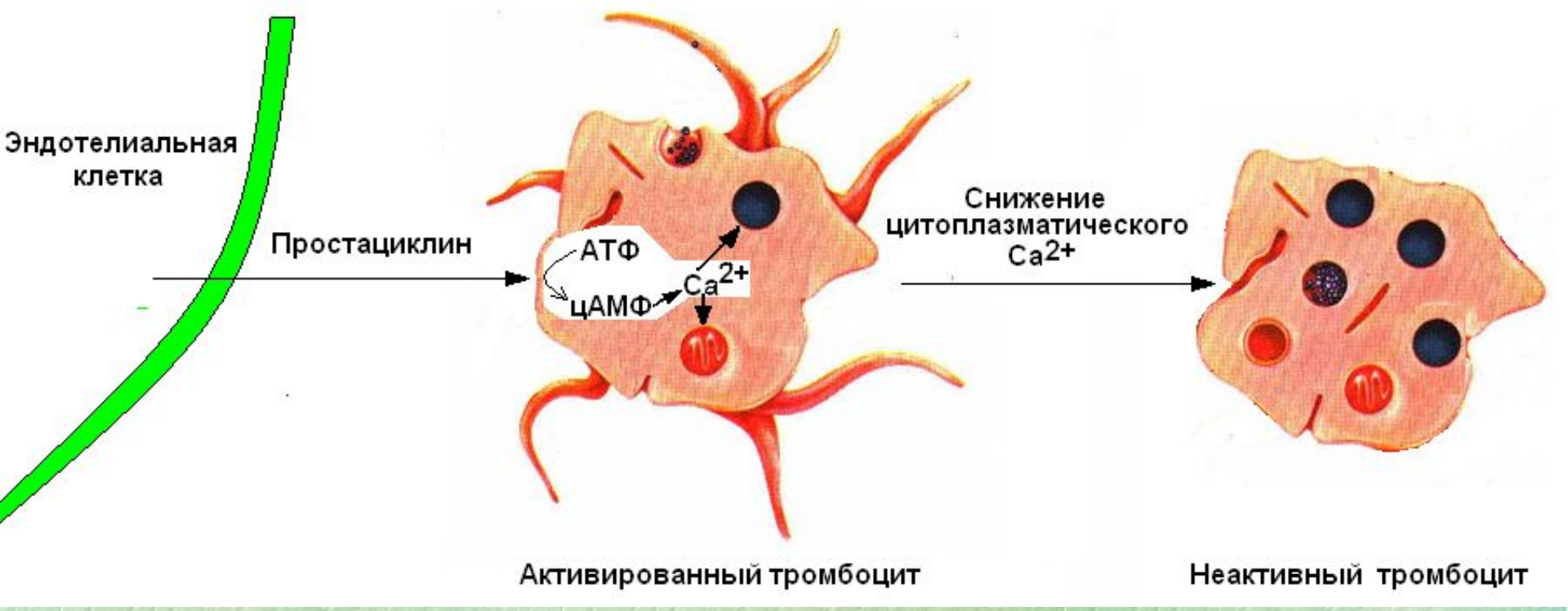
Тромбоксан-синтетаза — **ТхA_2**

МДА

Эндотелиальные клетки

Тромбоциты

Эндотелий ингибирует активацию тромбоцитов за счет выработки простациклина



ФОСФОЛИПИДЫ

Фосфолипаза A_2

Подавление противовоспалительными стероидными препаратами

АРАХИДОНОВАЯ КИСЛОТА

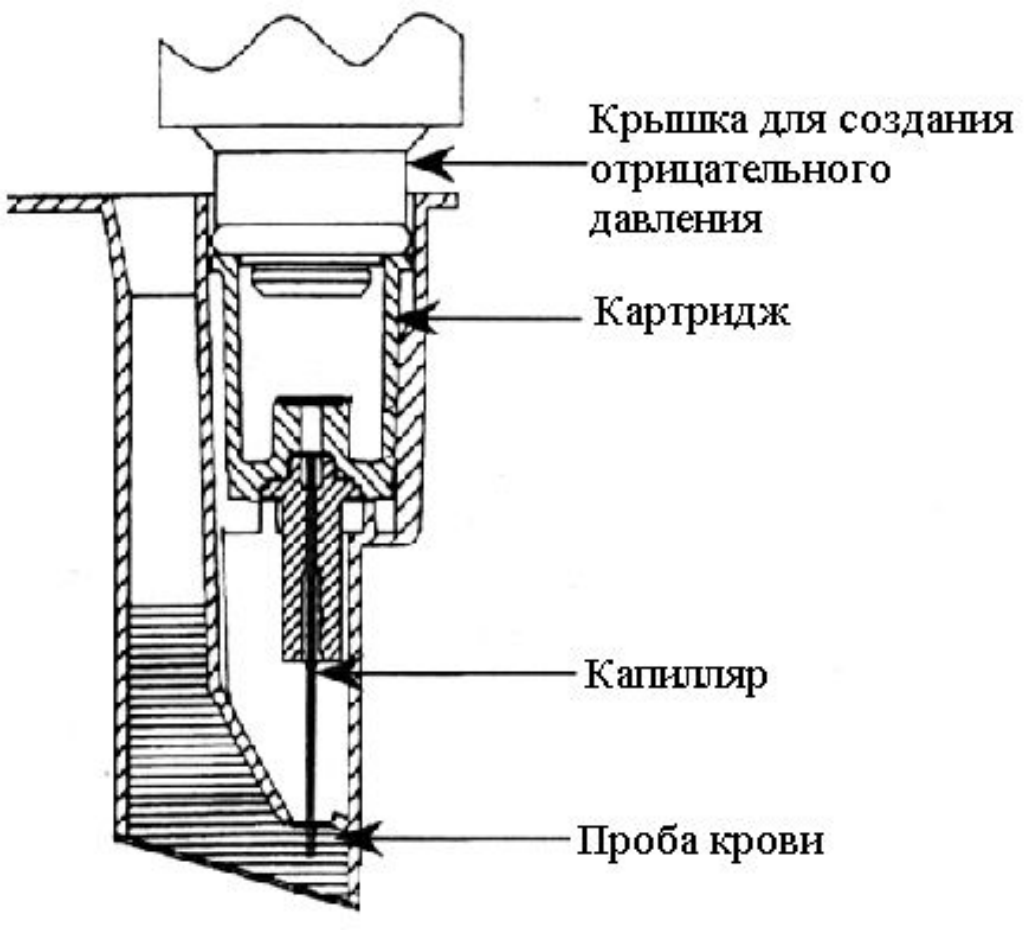
ЛЕЙКОТРИЕНЫ

Циклооксигеназа

Подавление аспирином, индометацином, фенилбутазоном

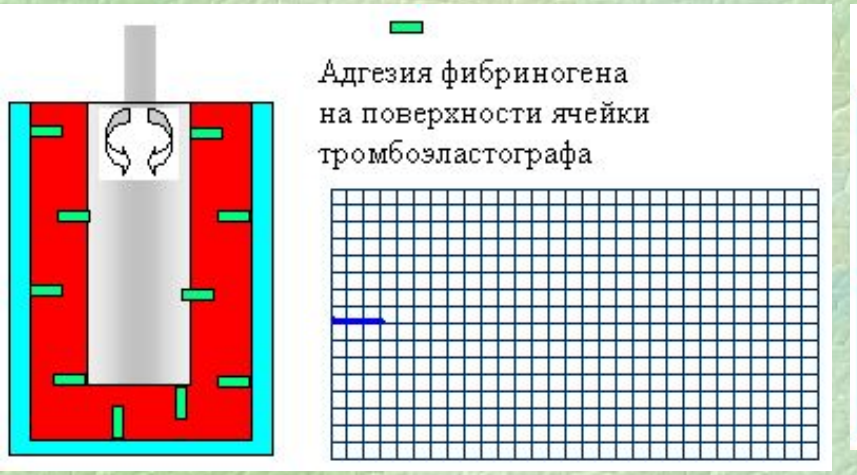
ПРОСТАГЛАНДИНЫ

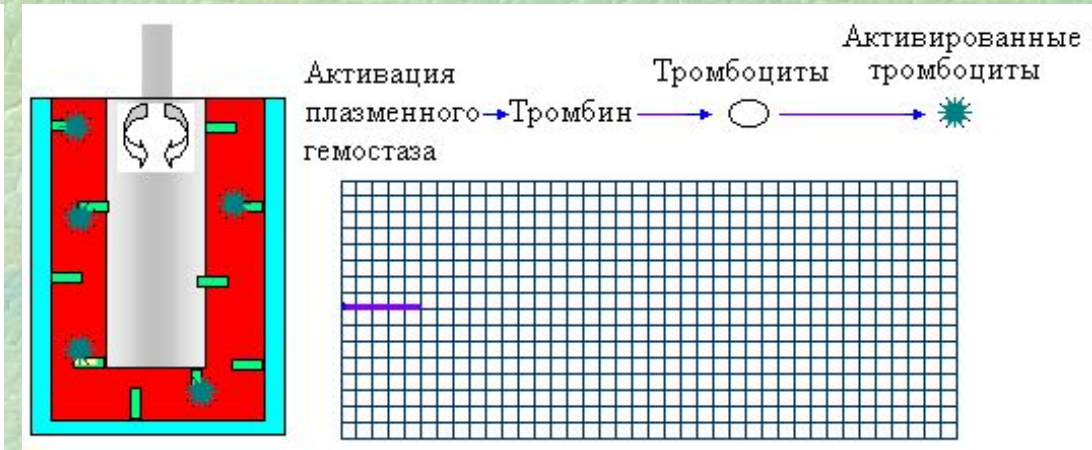
Динамический тромбоэластограф PFA-100. Имитация первичного гемостаза

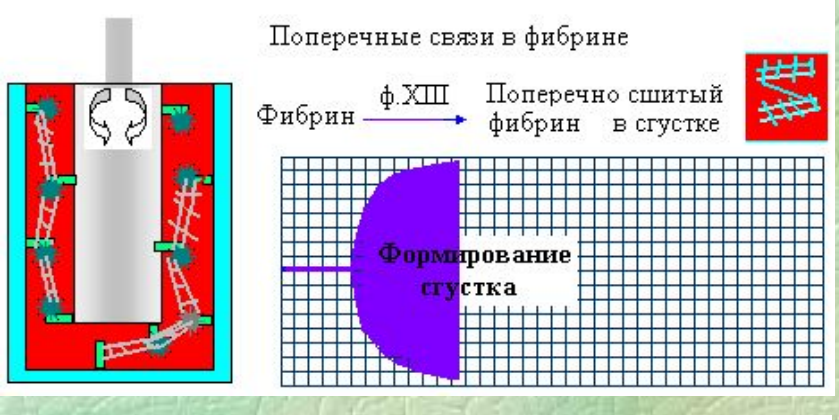


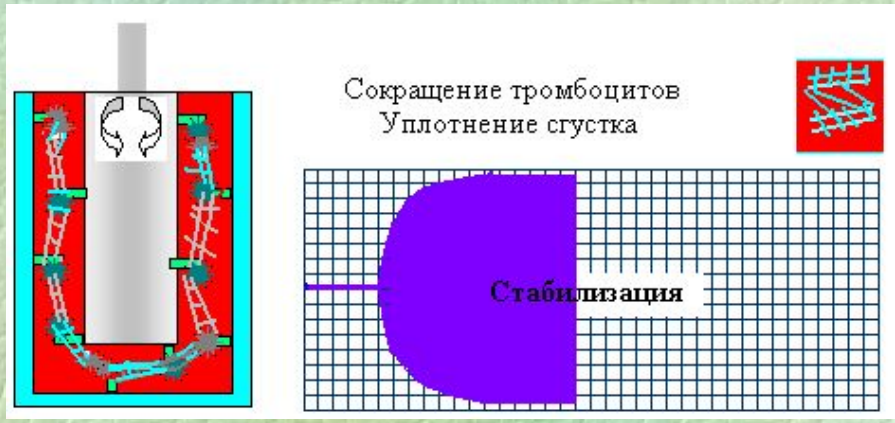
образование тромбоцитарной пробки оценивается по перфузионному давлению

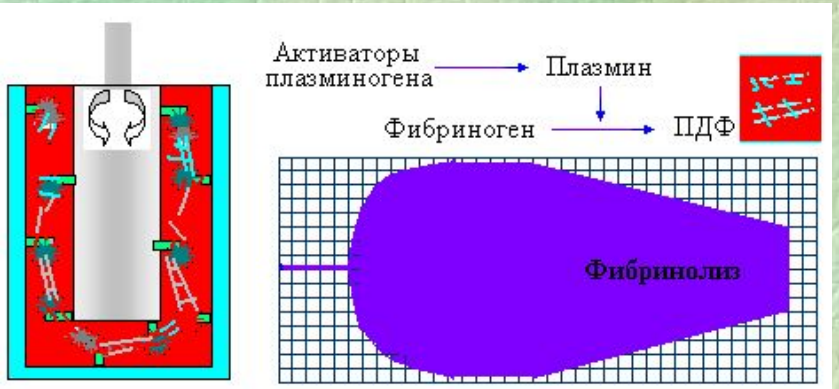
Тромбоэластография





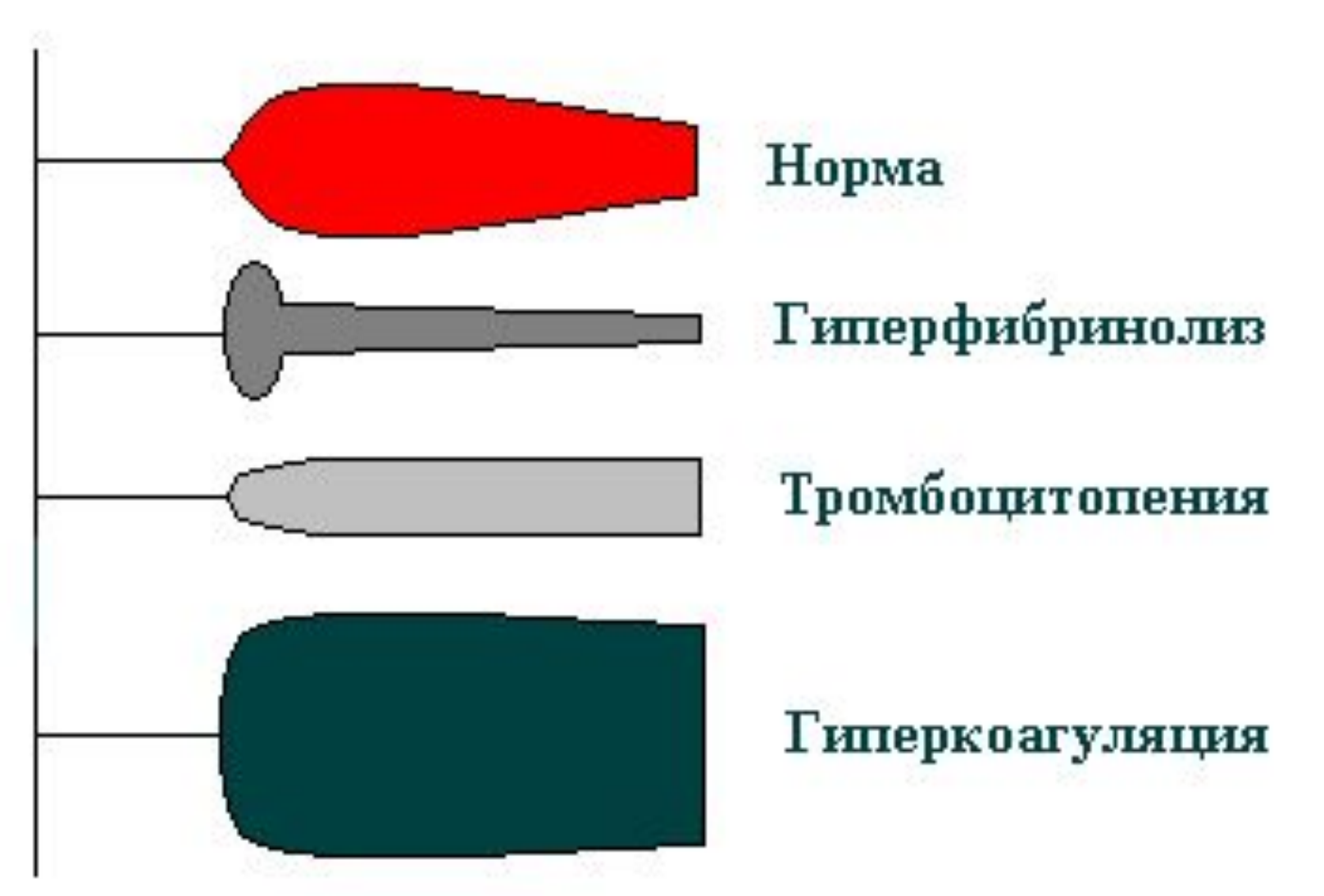






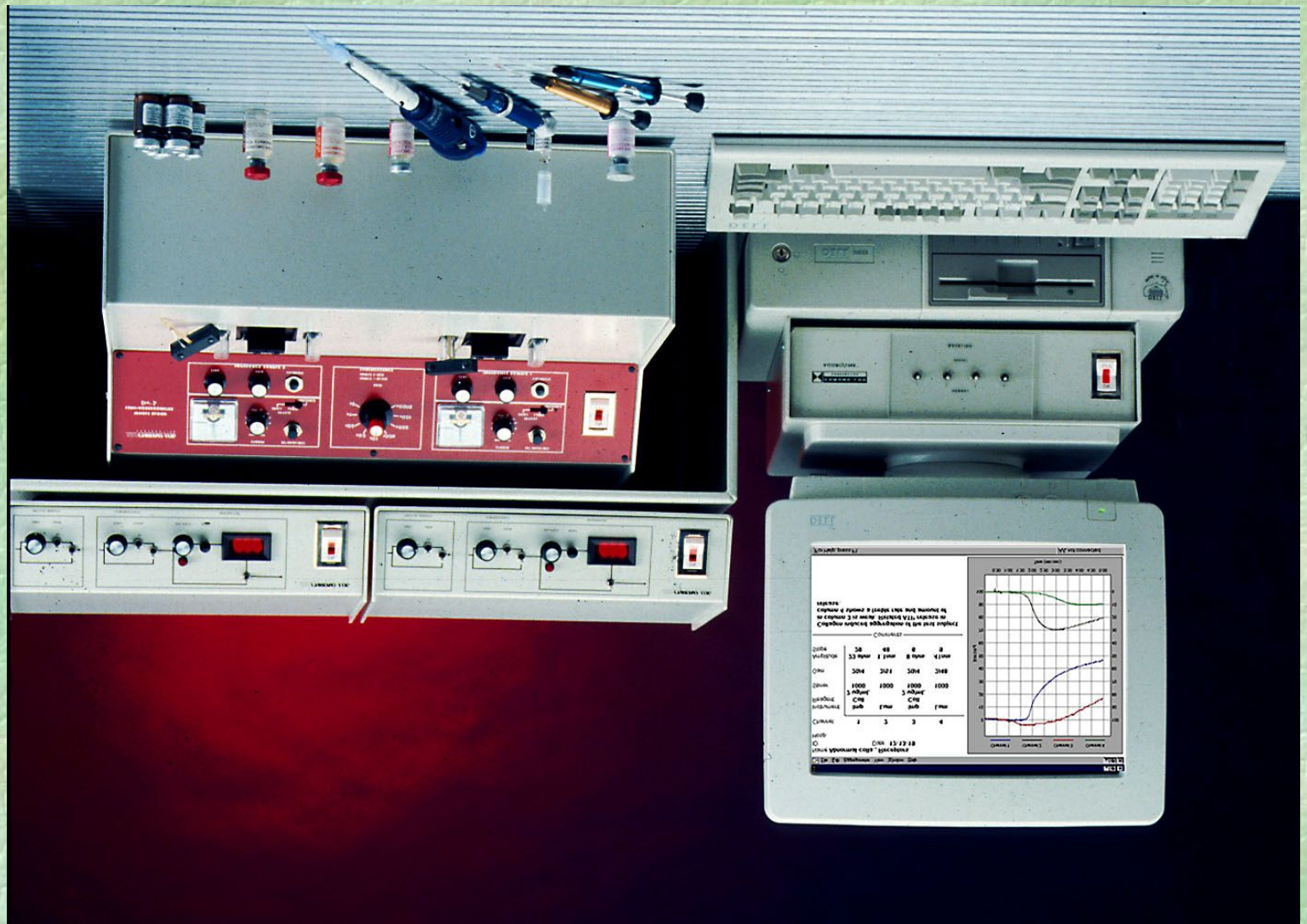
Последовательные этапы формирования сгустка крови

Типичные примеры измененных ТЭГ



Тромбоэластограф ROTEG. Оценивает стадии образования, стабилизации и лизиса сгустка цельной крови, имеет 4 параллельных канала, может быть использован для оценки влияний лекарственных препаратов на свертывание

Агрегометр CHRONO-LOG



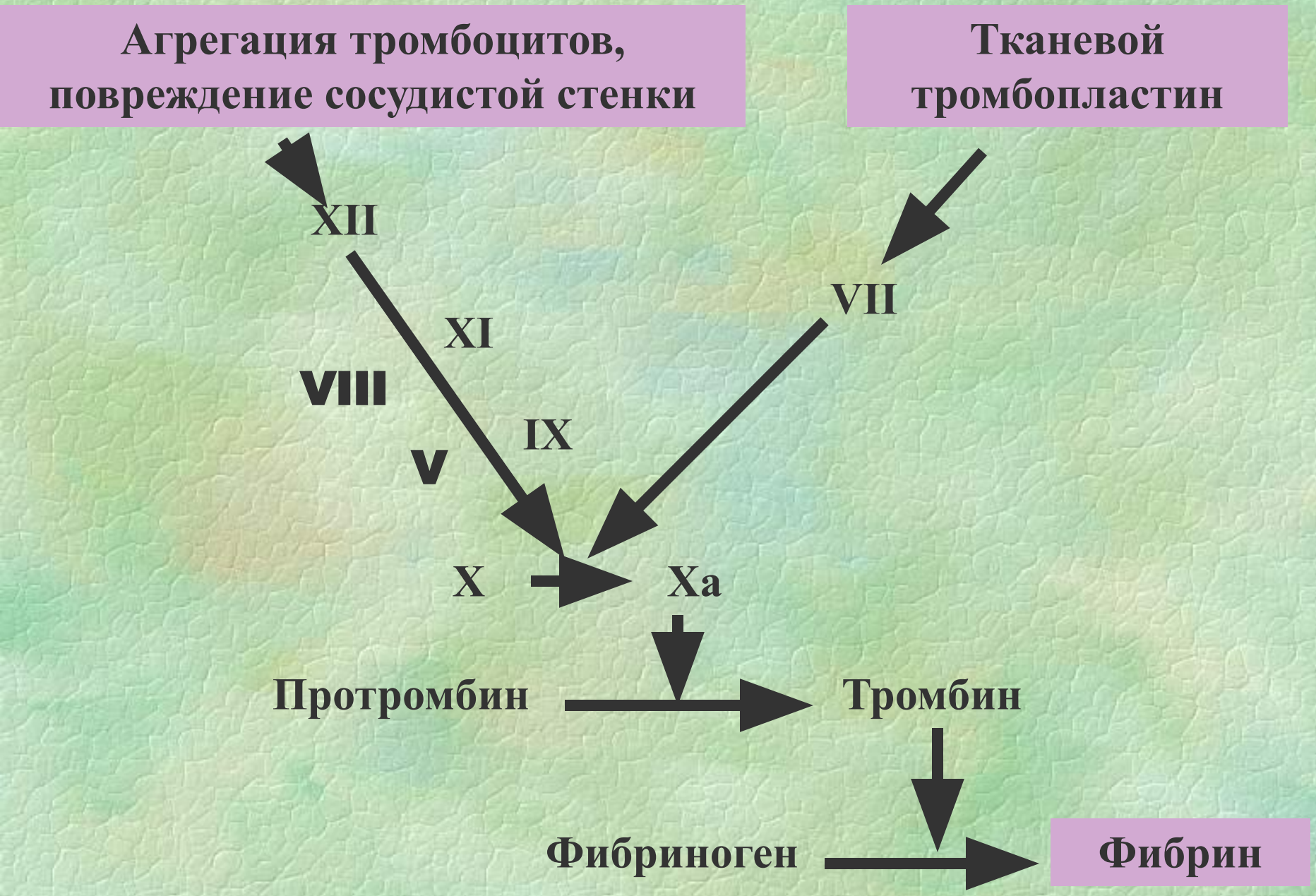
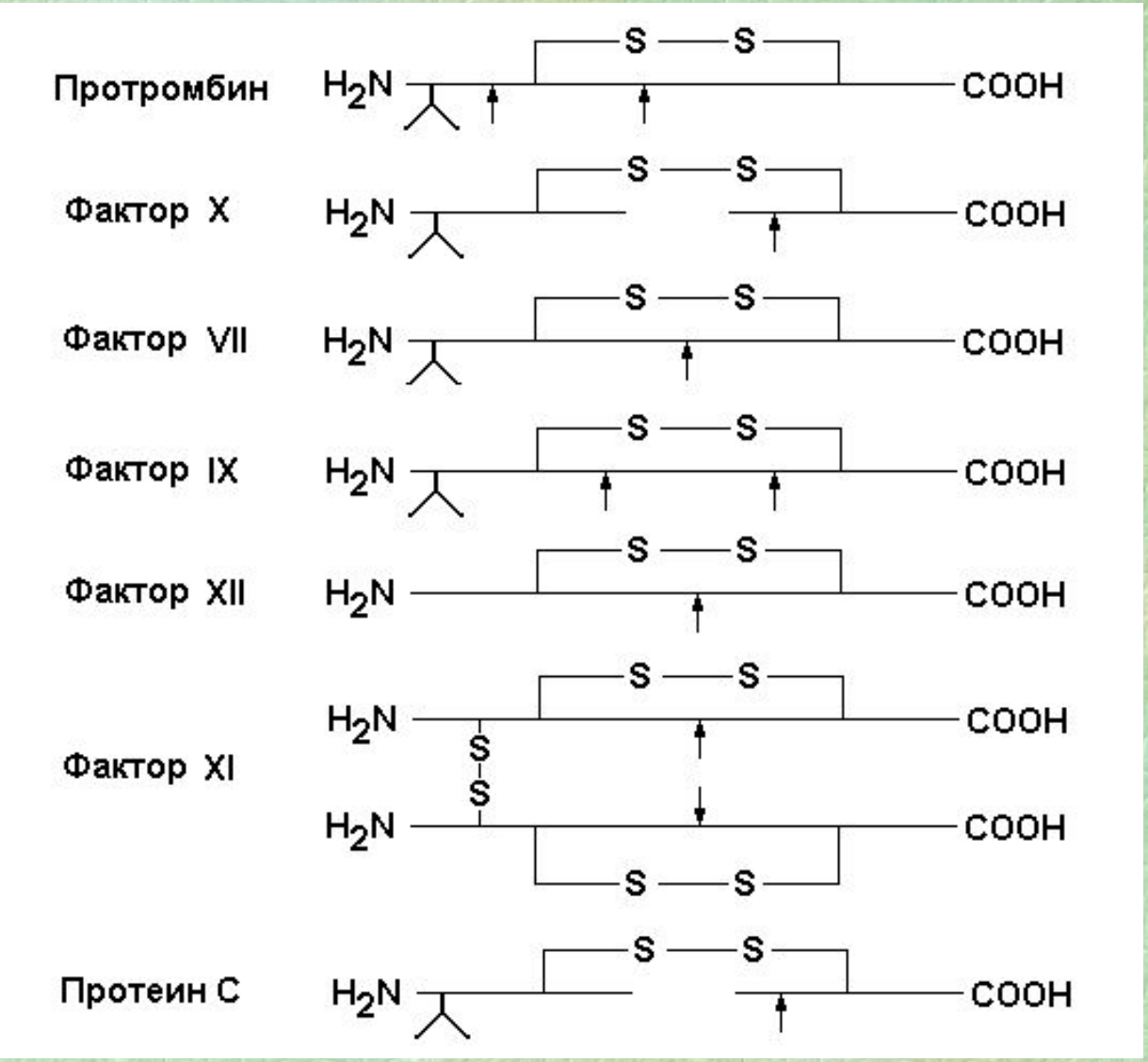

Агрегация тромбоцитов, повреждение сосудистой стенки
Тканевой тромбопластин
XII
XI
VIII
IX
V
VII
X
Xa
Протромбин
Тромбин
Фибриноген
Фибрин

СХЕМА СТРОЕНИЯ И УЧАСТКОВ ПРОТЕОЛИЗА ПЛАЗМЕННЫХ ФАКТОРОВ

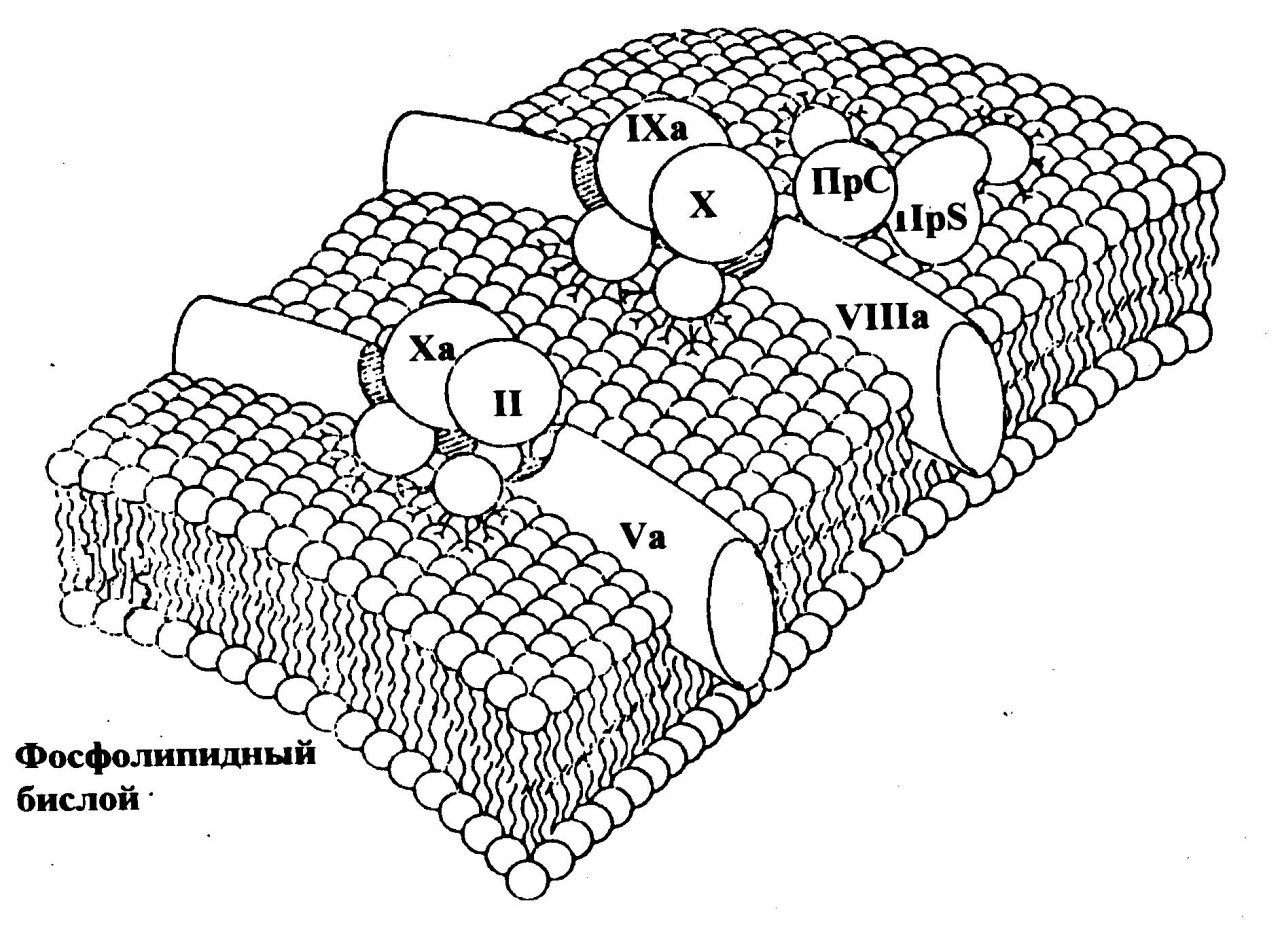


КОМПЛЕКСЫ ПРИ АКТИВАЦИИ ПЛАЗМЕННЫХ ФАКТОРОВ

Факторы-субстраты протеолитических систем гемостаза

Фермент	Субстрат	Ко-фактор
Xa	Протромбин	Va, Ca, ФЛ
IXa	X	VIIa,Ca, ФЛ
VIIa	X, IX	Тромбопластин
IIa	Протеин C	Тромбомодулин, эндотелий
XIIa	Прекаллекреин,XI	ВМК, поверхность
Каллекреин	XII	ВМК, поверхность
Протеин C	Va , VIIIa	Протеин S, Ca, ФЛ

Сборка комплексов плазменных факторов на VIIIa и Va факторах, интернализованных в фосфолипидную мембрану



Каскад усиления свертывания крови

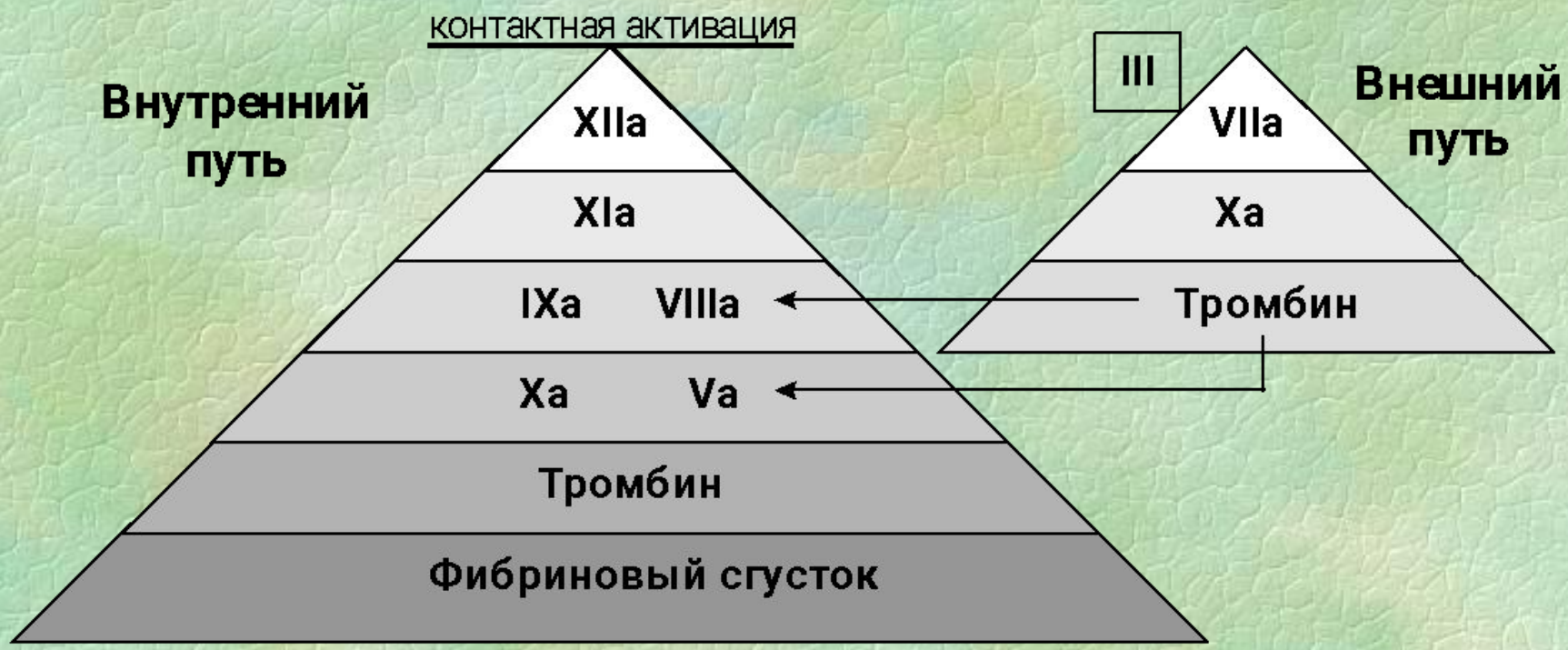
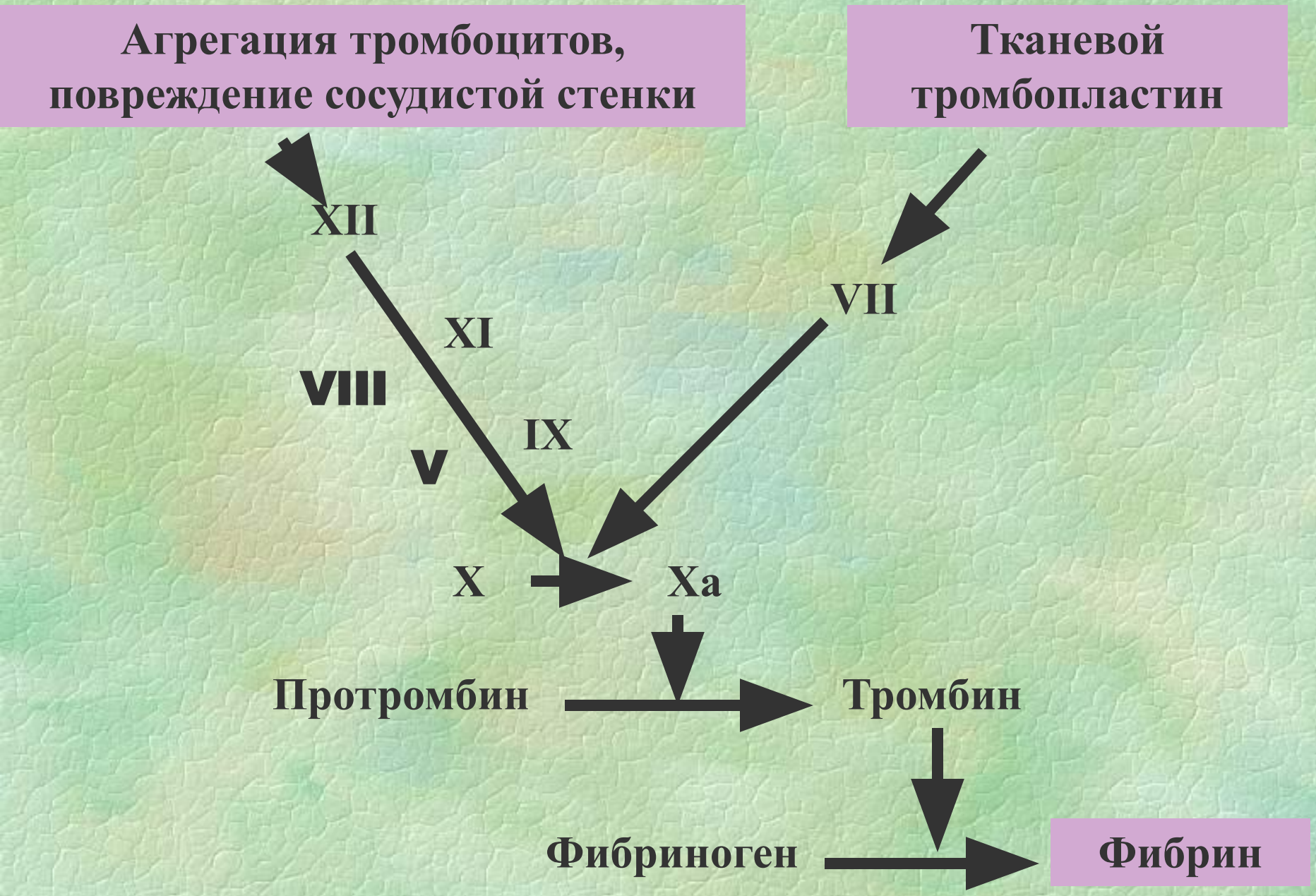


Рисунок 1.
Каскадное усиление системы свертывания крови.


Агрегация тромбоцитов, повреждение сосудистой стенки
Тканевой тромбопластин
XII
XI
VIII
IX
V
VII
X
Xa
Протромбин
Тромбин
Фибриноген
Фибрин

Международное Нормализованное Отношение

Международным Комитетом по тромбозам и гемостазу рекомендован тест протромбиновое время (ПВ) с оценкой результатов по МНО

$$МНО = \left(\frac{\langle ПВ \cdot больного \rangle}{\langle ПВ \cdot донорской\ пул \cdot плазмы \rangle} \right)^{МИЧ}$$

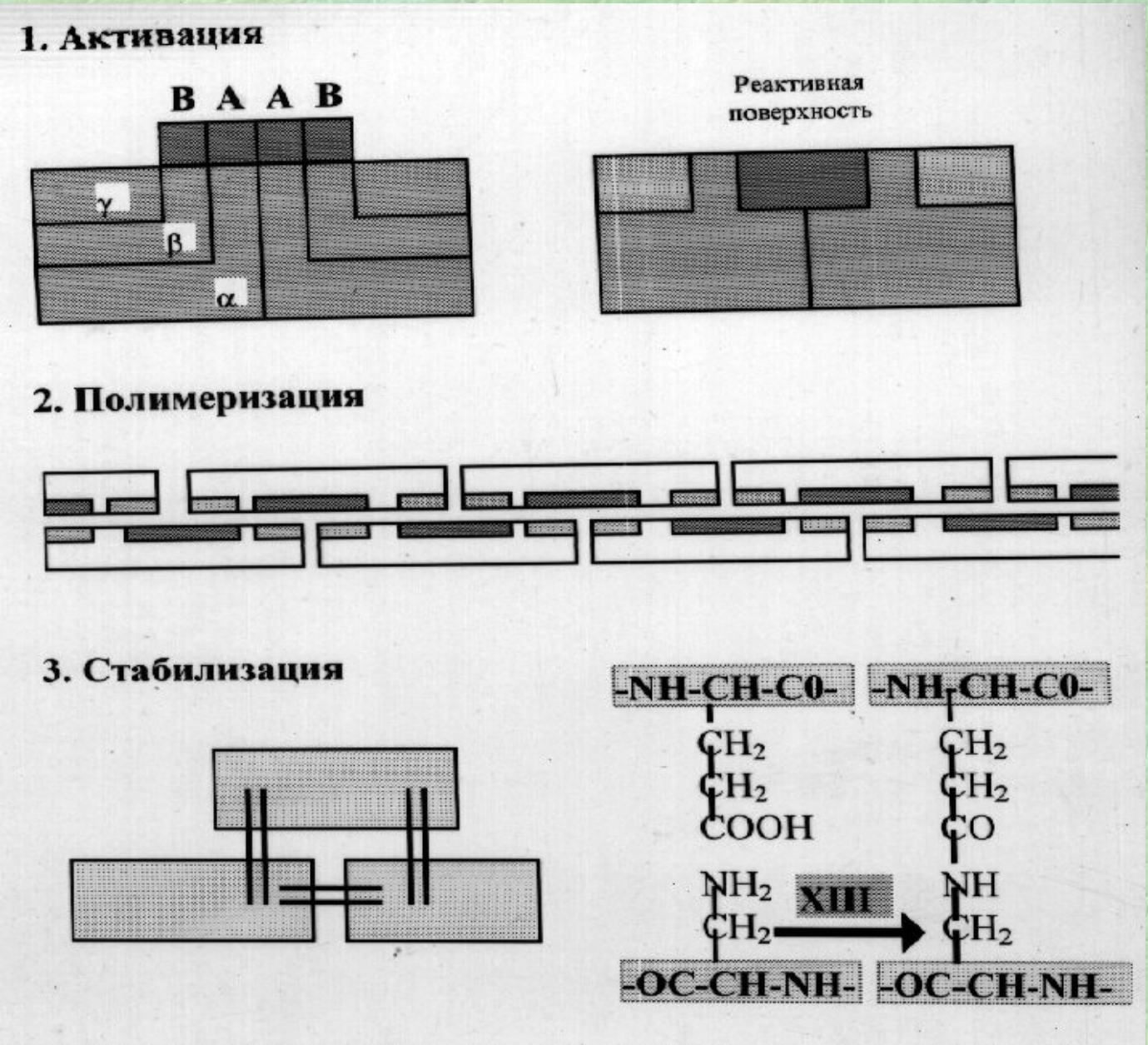
При определении ПВ больного и стандартной плазмы с любым тромбопластином, учитывая международный индекс чувствительности (МИЧ или ISI в английской аббревиатуре) используемого тромбопластина, получают относительное значение, как будто был использован в качестве тромбопластина Международный стандарт ВОЗ, МИЧ которого принят за 1,0. Эту величину и принято называть Международным Нормализованным Отношением – МНО (INR - английская аббревиатура).

МИЧ для различных тромбопластинов варьирует от 0,9 до 2,8. Чем выше значение МИЧ, тем менее чувствителен к изменению содержания компонентов протромбинового комплекса тромбопластин и, следовательно, тем больше может быть ошибка в определении ПВ. Использование тромбопластинов с МИЧ 1,4 - 1,5 обеспечивает хорошее совпадение результатов даже при низких дозах непрямых антикоагулянтов. Основная цель, которую преследовало введение МНО, состояла в обеспечении оптимизации терапии оральными антикоагулянтами, а для лаборатории это еще освобождение от необходимости построения калибровочного графика для каждой серии тромбопластинов.

Рекомендуемый диапазон МНО при терапии непрямыми антикоагулянтами

Показатели	МНО
Профилактика системных тромбоэмболий Послеоперационная профилактика венозного тромбоза Лечение флеботромбоза и легочной тромбоэмболии Преходящие нарушения мозгового кровообращения Постинфарктная профилактика венозного тромбоза Мерцание предсердий Нестабильная стенокардия Пороки клапанов сердца Биологические протезы сердечных клапанов	**2,0 - 3,0**
Рецидивирующий тромбоз глубоких вен Инфаркт миокарда Механические протезы сердечных клапанов Рецидивирующие системные тромбоэмболии	**3,0 - 4,5**

Формирование фибрина



ФИБРИНОЛИЗ

ПРОАКТИВАТОРЫ
АКТИВАТОРЫ
ИНГИБИТОРЫ АКТИВАТОРОВ
АНТИПЛАЗМИН
ПЛАЗМИНОГЕН
ПЛАЗМИН
α_2- МАКРОГЛОБУЛИН
α_1- АНТИТРИПСИН
ФИБРИН
ПДФ

АКТИВАТОРЫФИБРИНОЛИЗА

Внутренний механизм

Фактор XII-зависимый

XII XIIa

Прекаллекреин + ВМ кининоген

Фактор XII-независимый

Протеины С + S

Внешний механизм

Эндотели-альный

Тканевой активатор

Тканевой

Уроки наза

Другие

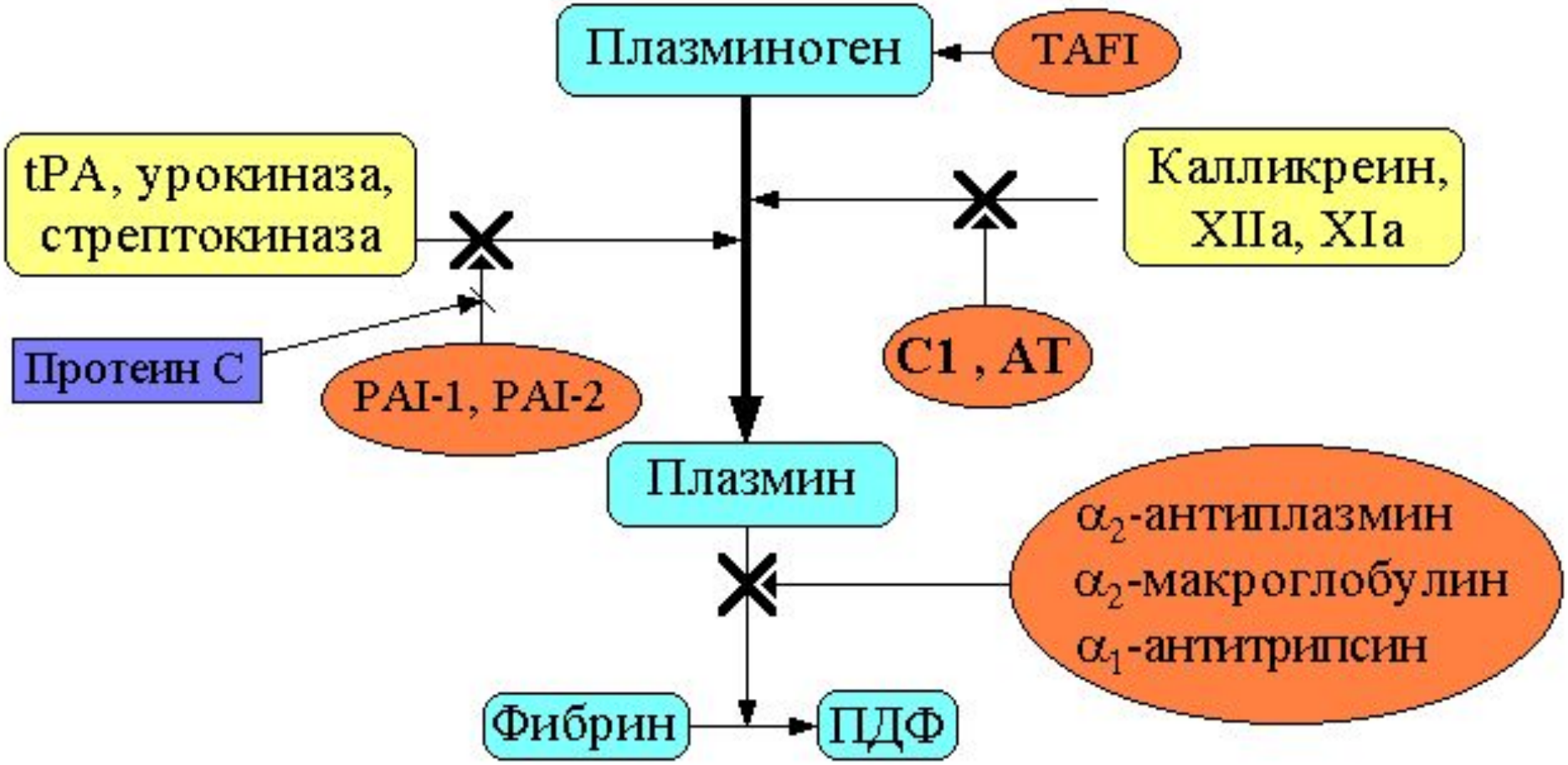
Стрепто-киназа

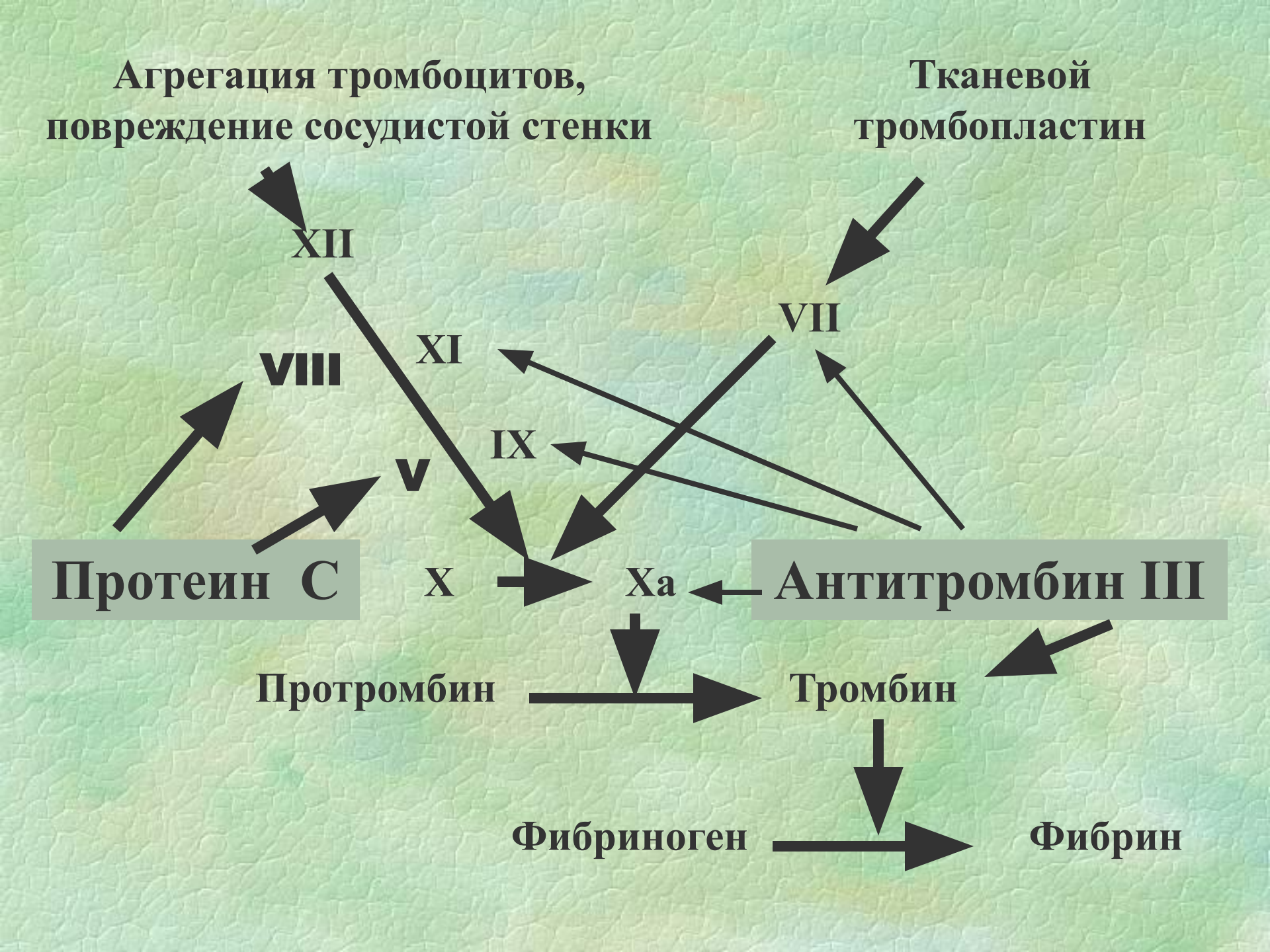
PAI-I

PAI-II

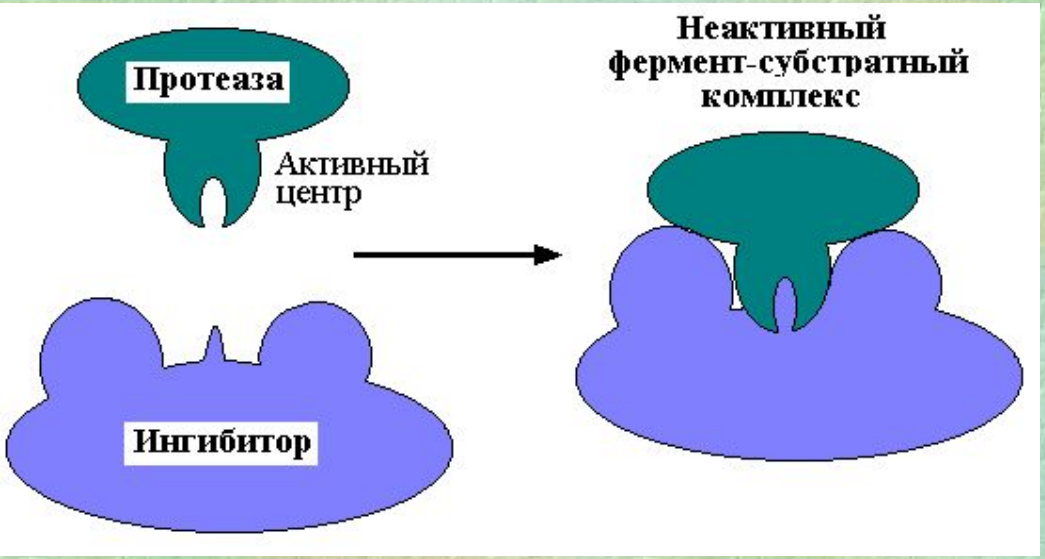
ПЛАЗМИНОГЕН → ПЛАЗМИН

Ингибиторы фибринолиза

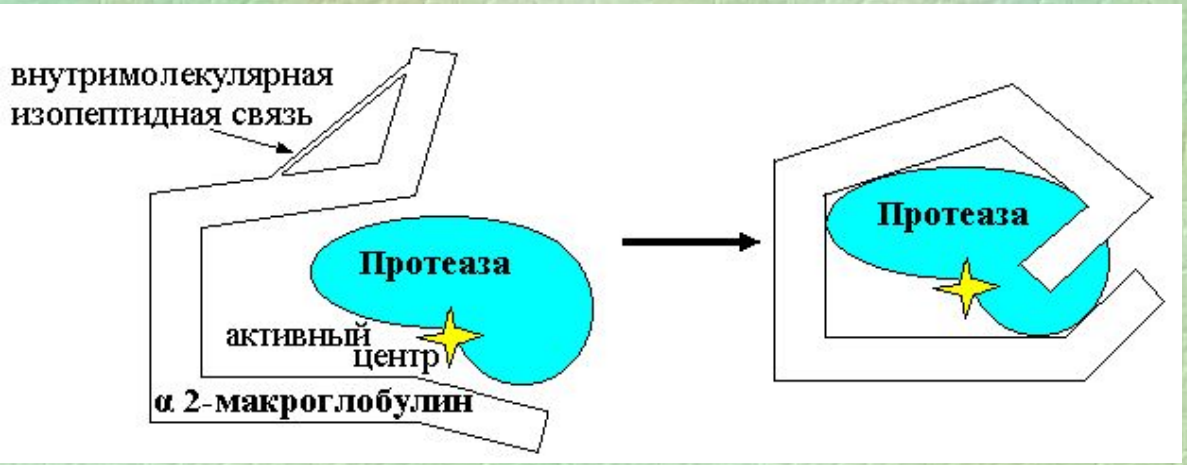



Агрегация тромбоцитов,
повреждение сосудистой стенки
Тканевой
тромбопластин
XII
VII
XI
VIII
IX
V
Протеин С
X
Xa
Антитромбин III
Протромбин
Тромбин
Фибриноген
Фибрин

Ингибиторы протеаз



Ингибирование активных сериновых протаз серпинами за счет образования стабильного неактивного фермент-субстратного комплекса



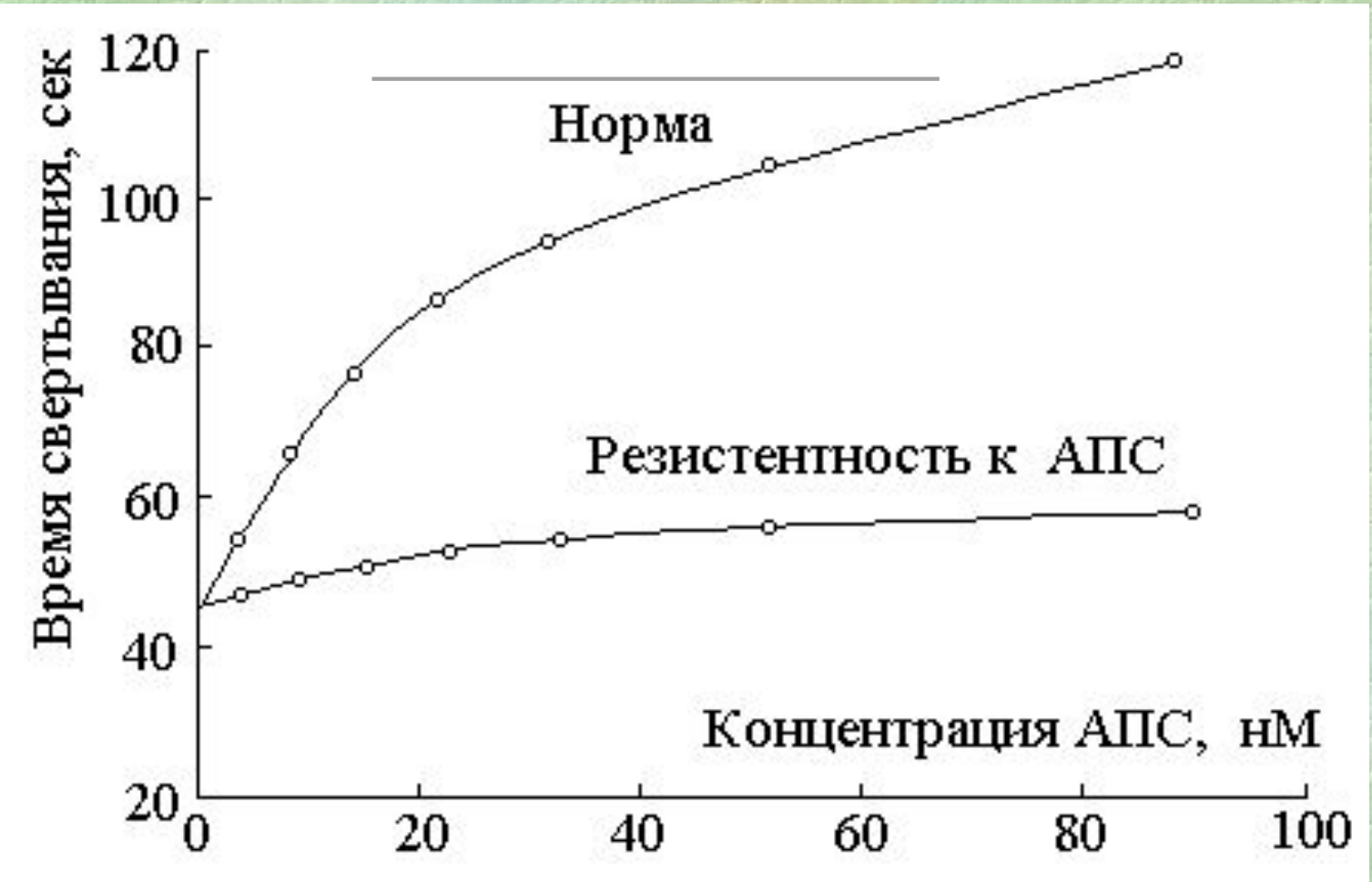
Ингибирование активных протаз за счет погружения фермента внутрь макромолекулы α_2-макроглобулина

Терапевтический диапазон Анти-Ха при терапии фракционированным гепарином

Мониторинг антикоагулянтной терапии при лечении фракционированным гепарином основывается на тесте анти-Ха (анти-Ха МЕ/мл), предваряющим очередное введение препарата, так как значения АЧТВ остаются в единица измерения - пределах нормы или удлиняются незначительно. Тест анти-Ха заключается в измерении оставшегося Ха с использованием специфического хромогенного субстрата.

Препарат	Показания	Дозировка	Анти-Ха (МЕ/мл)
Фрагмин, фраксипарин ловенокс, клексан	Профилактика венозного тромбоза - умеренный риск	2000 - 2500 МЕ п/к 1 раз в день	Мониторинг не требуется
	Профилактика венозного тромбоза - высокий риск	4000 - 5000 МЕ п/к 1-2 раза в день	0,2 - 0,4
Дальтепарин, ревипарин, эноксипарин	Интенсивная терапия при инфаркте миокарда, венозных и артериальных тромбоэмболиях	100-120 МЕ/кг веса п/к 2 раза в сутки	0,3 МЕ/мл до инъекции, через 3 ч после инъекции; ≈ 1,5 МЕ/мл
	Экстракорпоральное кровообращение, гемодиализ < 4 часов	Болюс 3000 - 6000 МЕ	≈ 1,0
	Экстракорпоральное кровообращение, гемодиализ > 4 часов	Болюс 2000 - 3000 МЕ, 500-1000 МЕ/ч	≈ 1,2

Резистентность к активированному протеину С (АПС) при мутации в гене, контролирующем синтез V фактора и приводящей к образованию фактора Лейдена



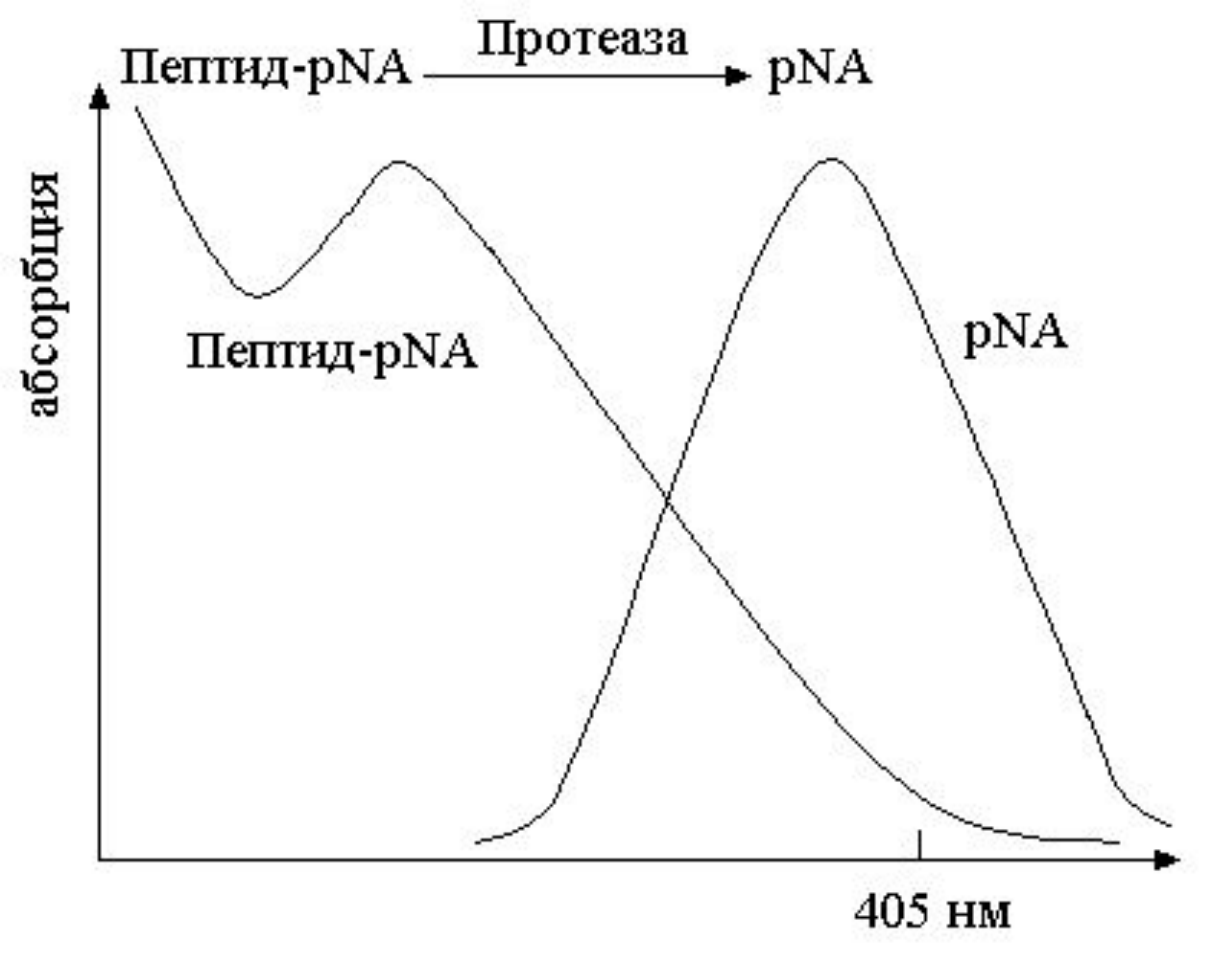
Идеология постановки тестов коагулограммы

Исследование системы гемостаза должно быть комплексным и включать тесты, характеризующие состояние сосудистой стенки, клеток крови и белков плазмы. Скрининговые тесты, проводимые для оценки функционального состояния всей системы гемостаза или отдельных ее звеньев, часто бывают более полезными и значимыми для диагностики, чем отдельные дифференцирующие тесты на различные компоненты.

Динамический тромбоэластограф PFA-100. Он позволяет наблюдать ***in vitro*** за процессом закупорки сосуда при моделировании этого процесса в специально созданном картридже

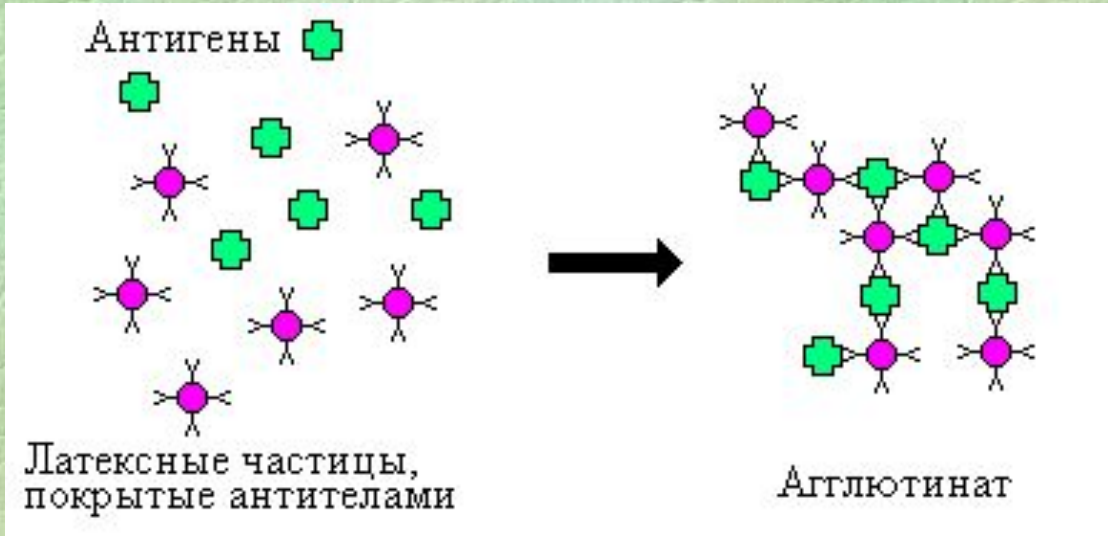
Датчик тромбоэластографа PFA-100 содержит капилляр, моделирующий микрососуд. В цельной крови, проходящей по капилляру, активируется образование сгустка. На стенках нанесен коллаген и адреналин или АДФ, которые являются первичной причиной запуска гемостаза.

Амидолитические методы с использованием хромогенных и флуорогенных субстратов

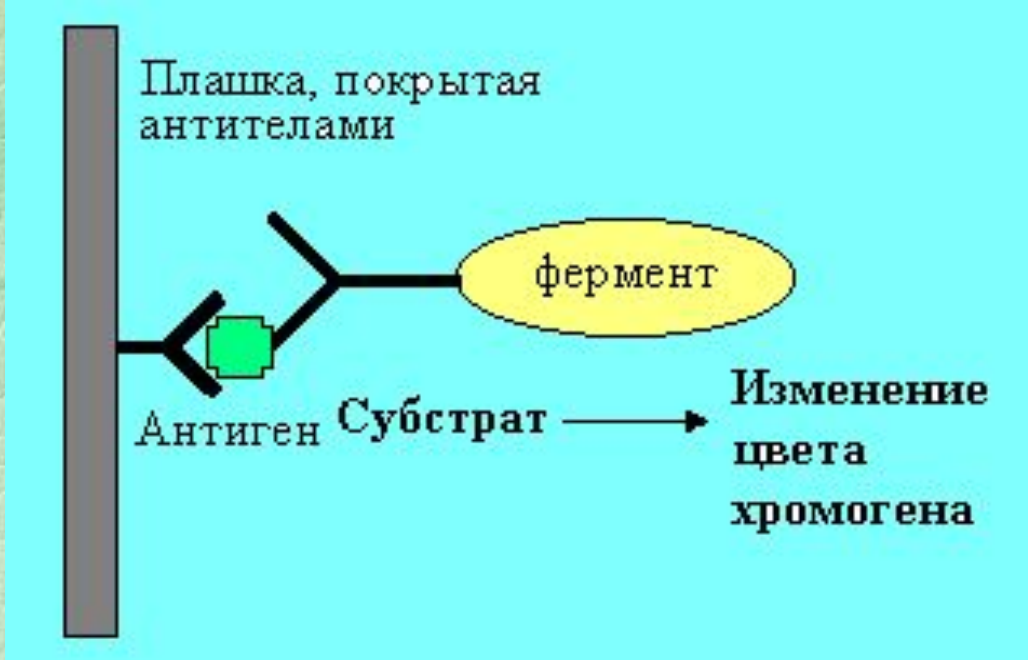


Принцип определения активности протеолитического фермента (протеазы) с использованием хромогенного субстрата

Иммунохимические методы

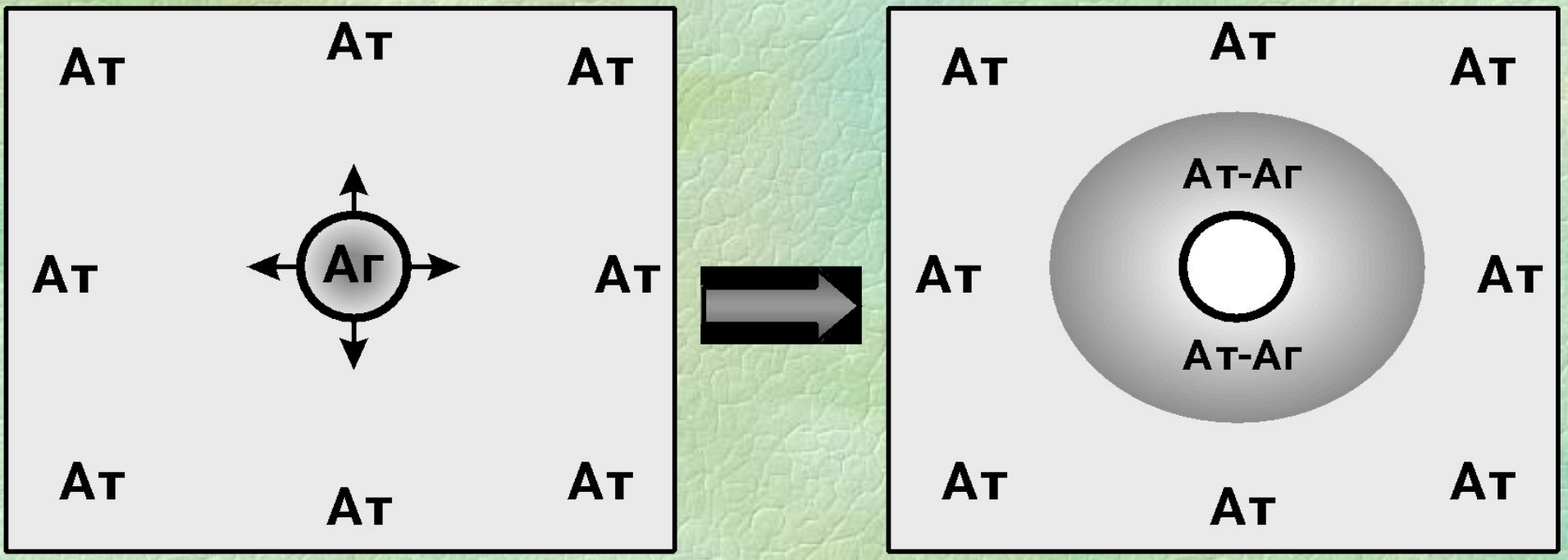


Принцип латекс-агглютинации



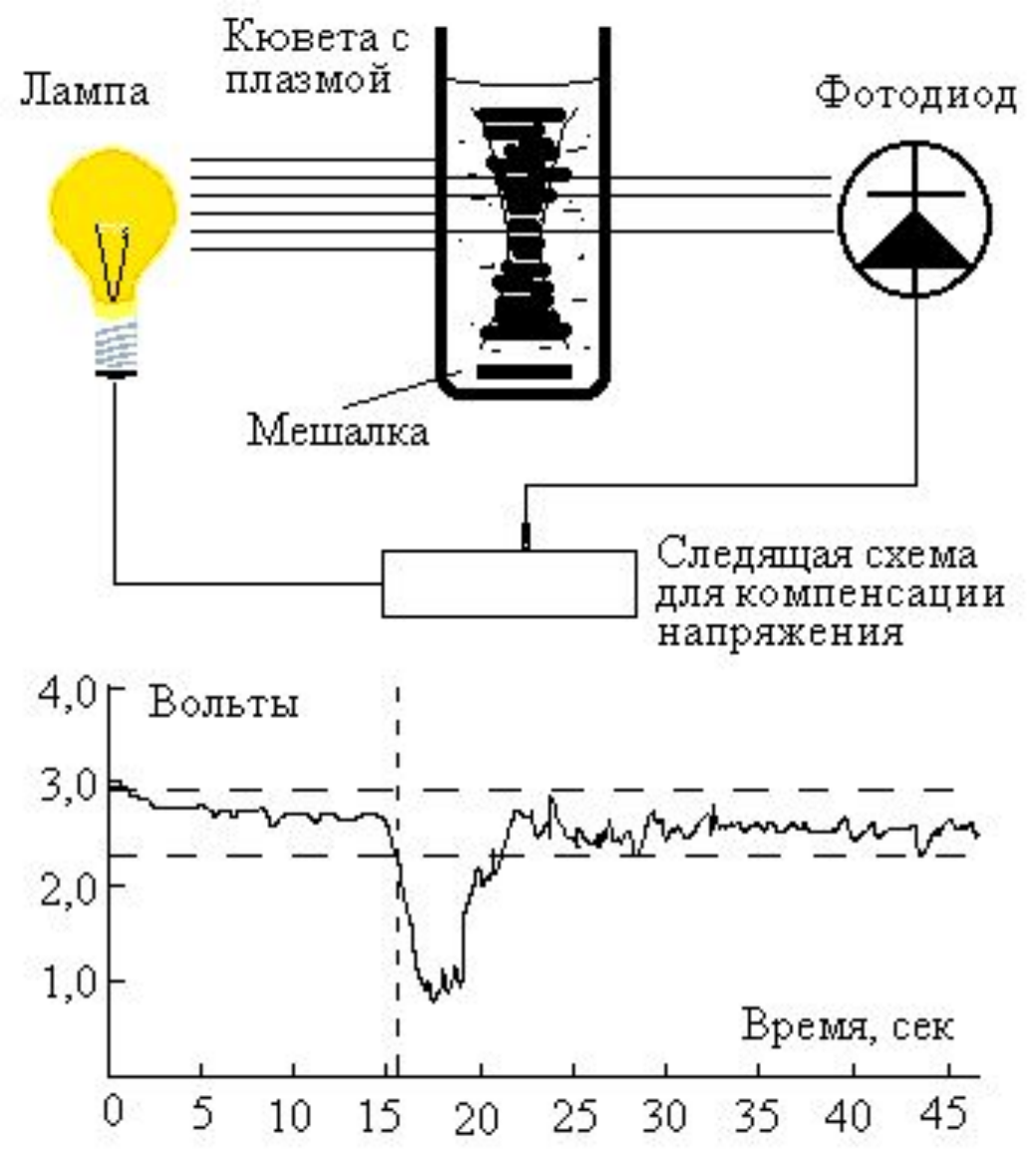
Принцип ELISA. На плашке, покрытой антителами против фактора гемостаза, связывается антиген

Принцип метода **радиальной иммунодиффузии**, используемый для полуколичественной оценки некоторых факторов гемостаза

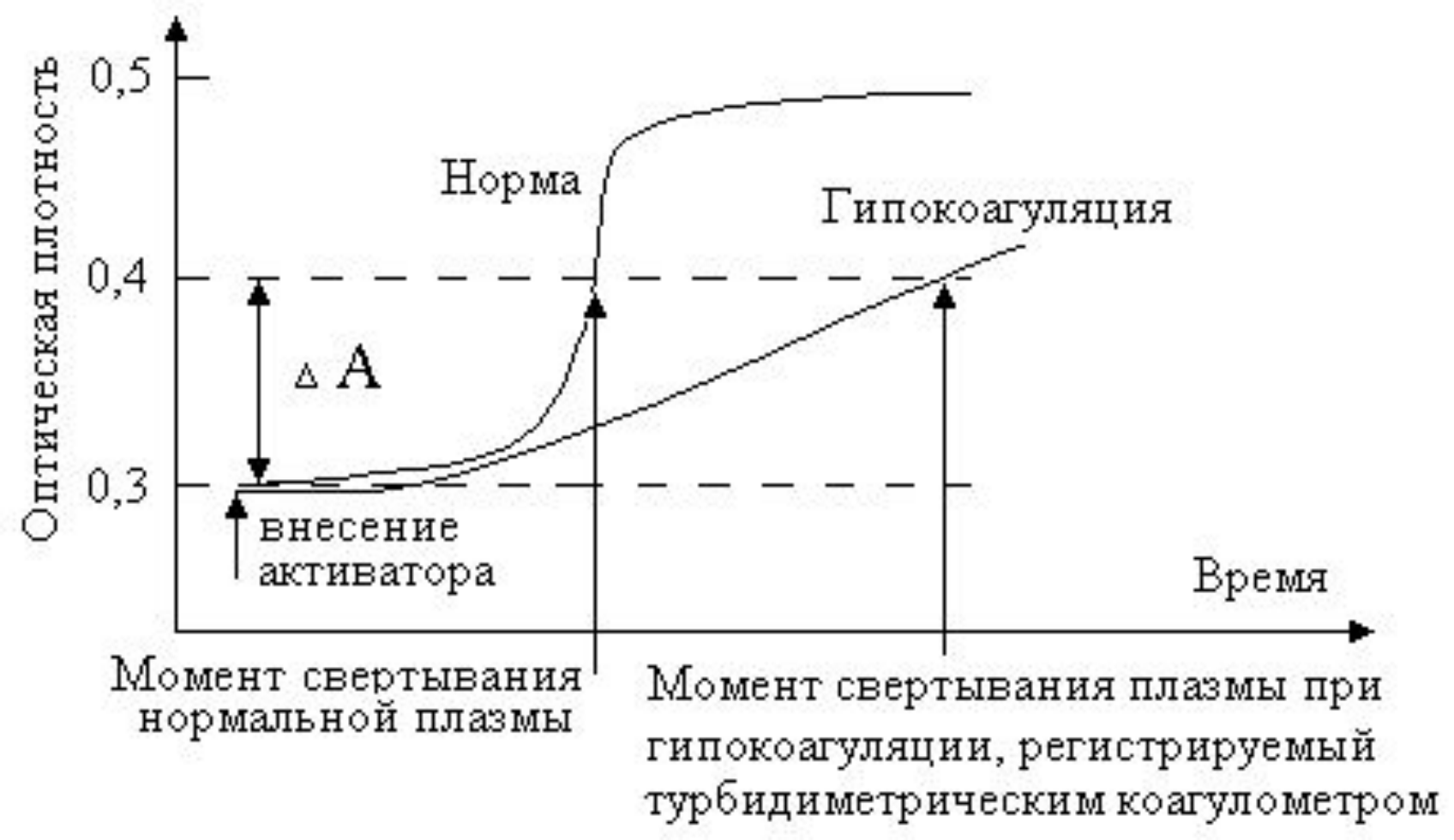


Принцип работы механического коагулометра

Принцип регистрации выпадающего фибрина оптико-механическим коагулометром



. Принцип регистрации момента образования сгустка турбидиметрическим коагулометром.



Линейка коагулометров фирмы Sysmex

Коагулометр СА-50, 4-канальный, выполняются тесты: ПВ, АЧПВ, ТВ, МНО, АТ, фибриноген

Автоматический коагулометр СА-500 Делает клоттинговые тесты , хромогенные тесты и др. До 33 тестов в час

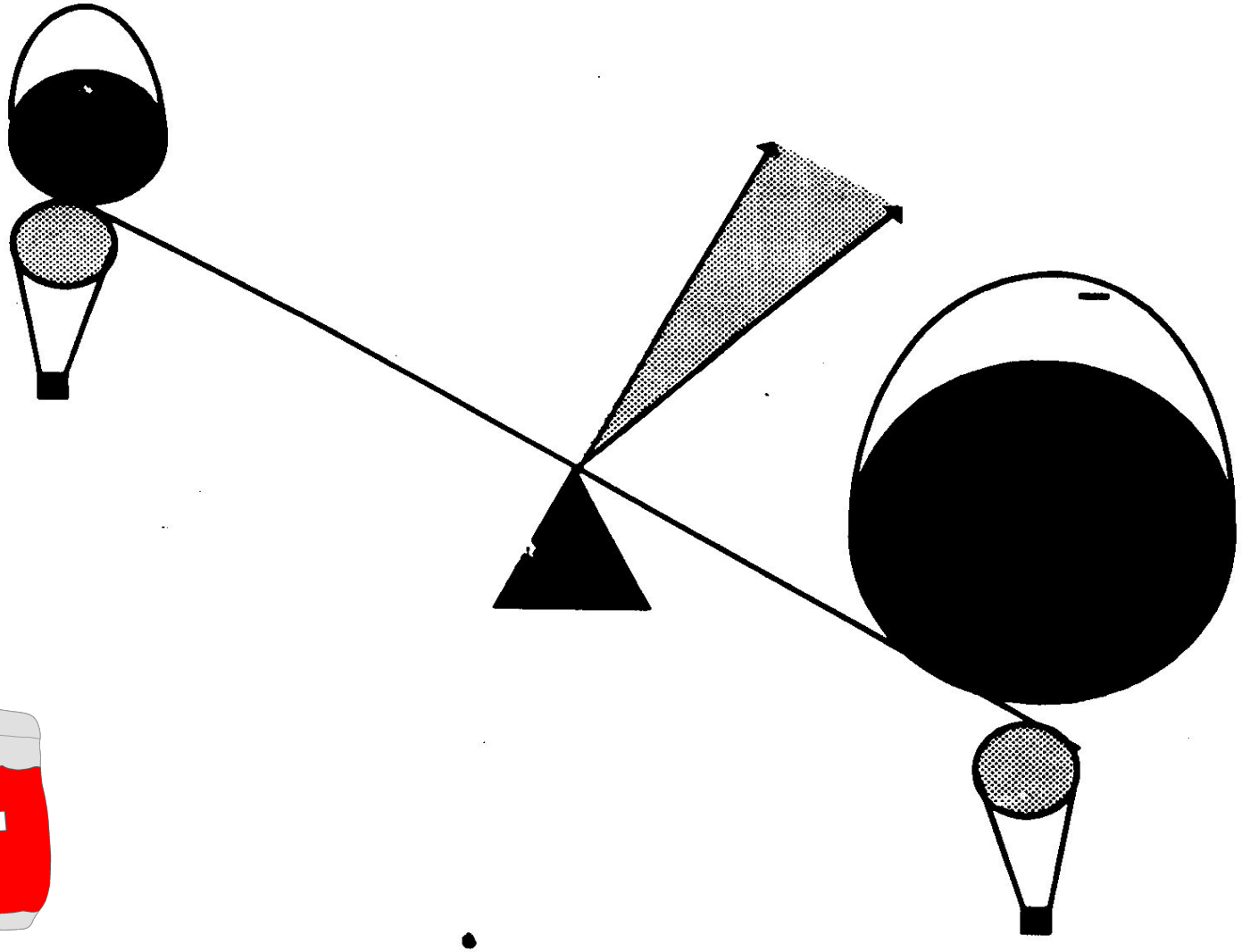
Автоматический коагулометр СА-1500 Выполняет клоттинговые, хромогенные и турбидиметрические тесты До 80

СА-7000

До 500 тестов/час по 20 выбранным параметрам

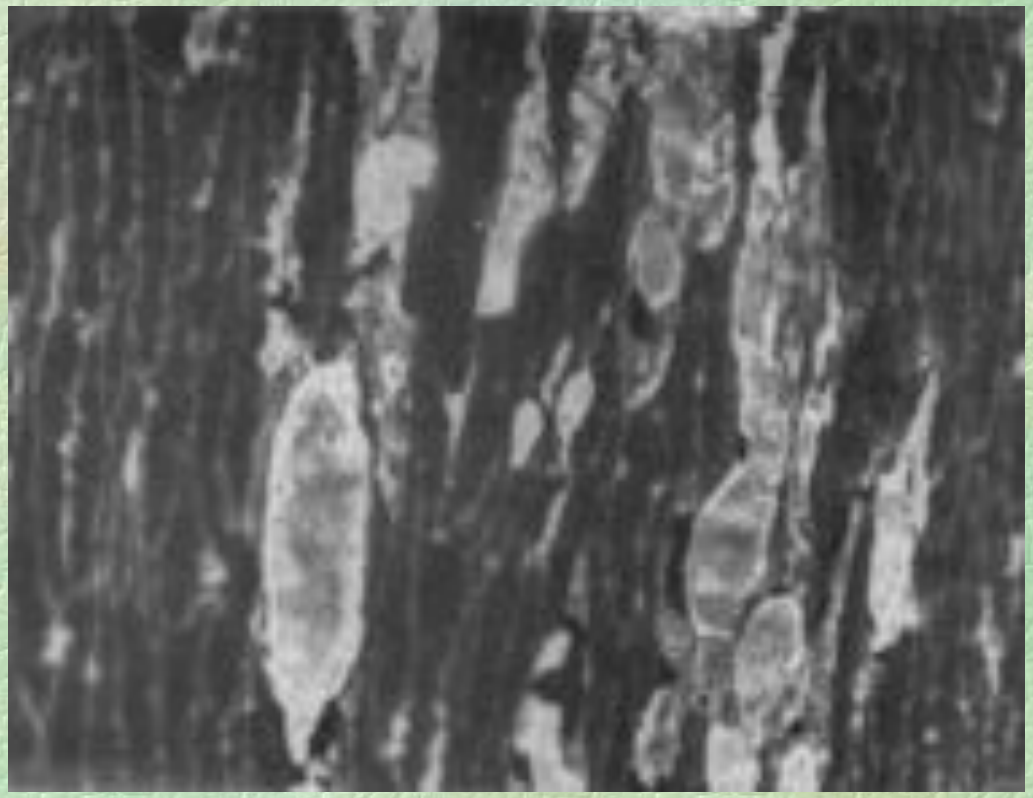
ДИНАМИЧЕСКОЕ РАВНОВЕСИЕ

ДВС-синдром

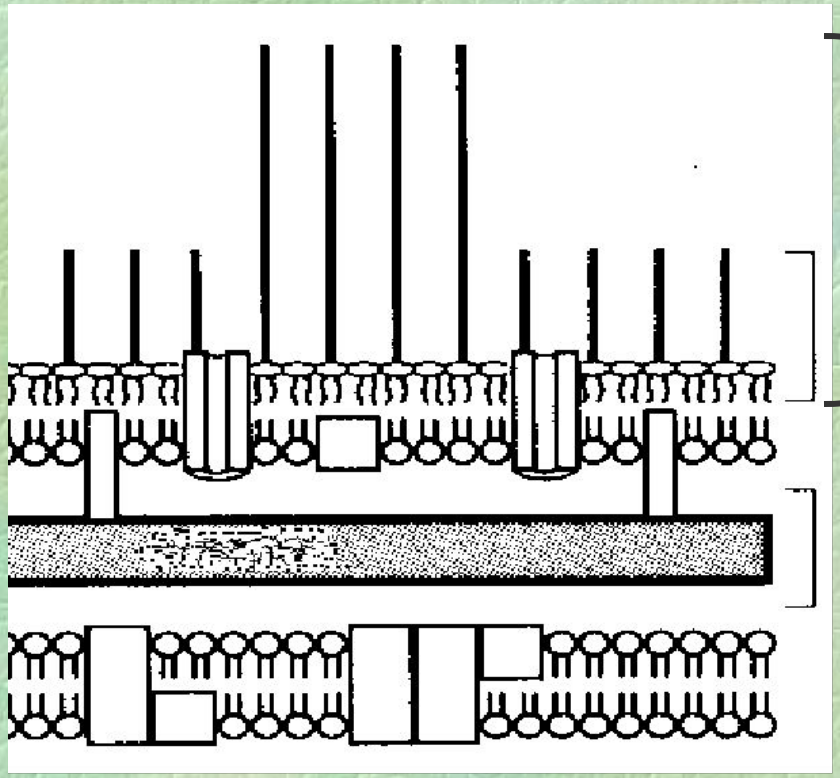


ЭНДОТЕЛИЙ ПРИ СЕПСИСЕ

Септическое повреждение эндотоксином



Патогенез ДВС-синдрома
эндотоксин



Липополисахариды (**эндотоксин**) клеточной мембраны бактерий

Клеточная мембрана грам-отрицательных бактерий

Патогенез ДВС-синдрома **тромбоциты**

- Агрегация тромбоцитов - обязательный компонент патогенеза ДВС-синдрома
- При эндотоксиновых формах поражения, грам-отрицательном сепсисе ДВС развивается через активацию тромбоцитарно-сосудистого гемостаза
- Системные васкулиты перерастают в ДВС через тромбоцитарные нарушения

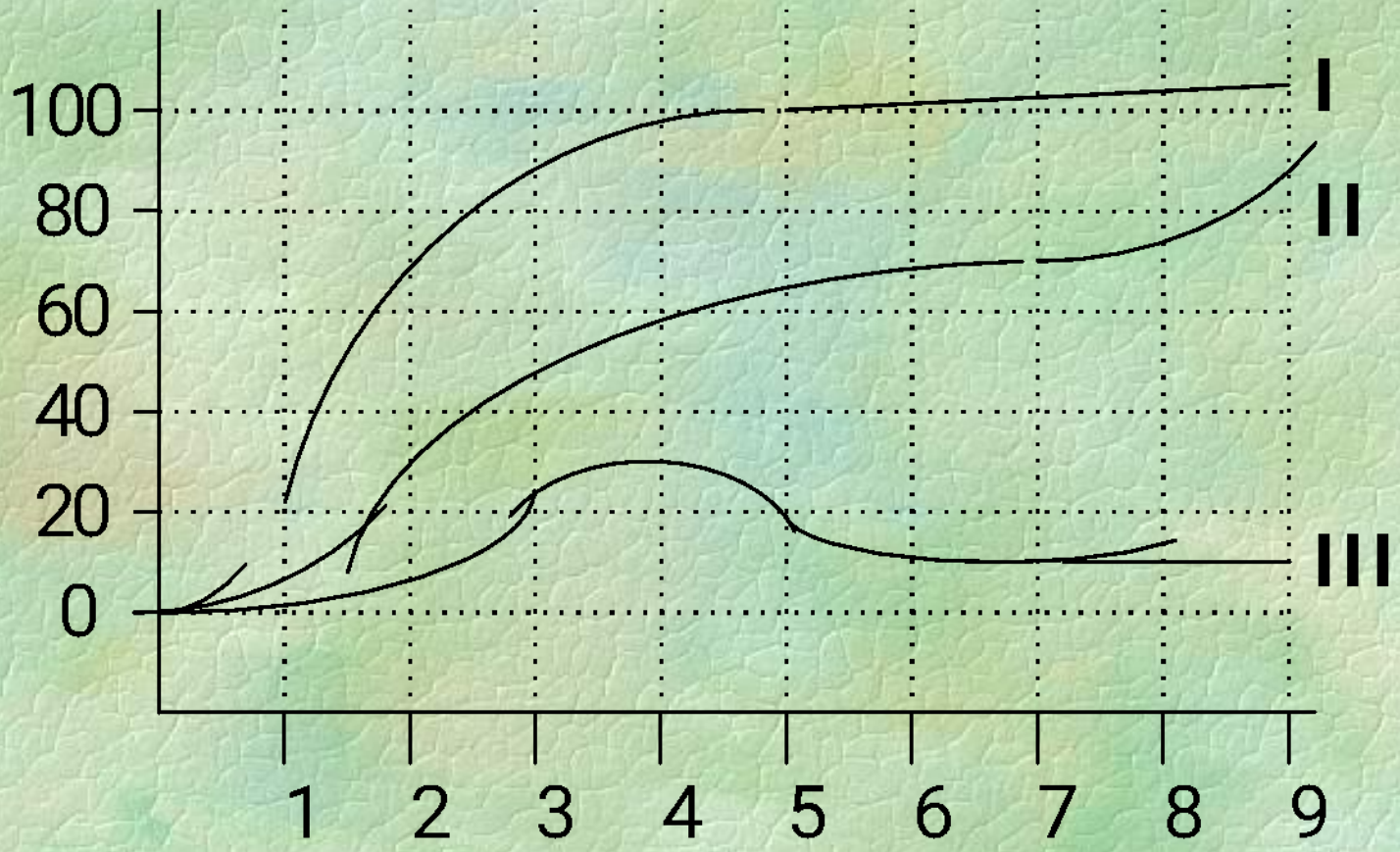
Вовлеченность тромбоцитов в патогенез ДВС-синдрома

- **Тромбоцитопения** (< 150 тыс/мкл)

  - возникает в результате потребления тромбоцитов
- **Тромбоцитопатия**

  - возникает в результате реактивного выброса в кровоток незрелых тромбоцитов и потребления наиболее полноценного пула тромбоцитов

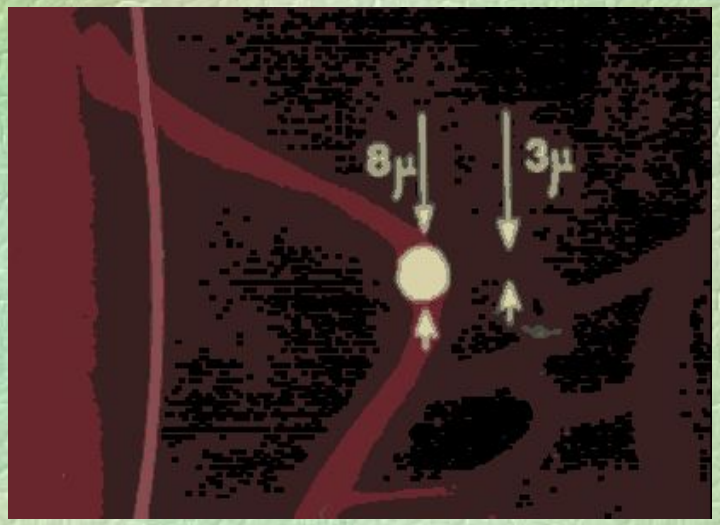
АДФ-индуцированная агрегация



I - гиперагрегация, II - исходная, III - нарушение агрегации

МИКРОЦИРКУЛЯЦИЯ

Диаметр эритроцитов больше диаметра капилляров



Эритроциты в капилляре

Эритроциты при ДВС

- Травматизация эритроцитов нитями фибрина в капиллярах
- Фрагментация с изменением формы
- Анизоцитоз (□ RDW)
- Симптомокомплекс внутрисосудистого гемолиза: □ свободного Hb, неконъюгированного билирубина, ретикулоцитоз
- Гемолиз активирует свертывание из-за освобождения АДФ из эритроцитов

Геморрагический синдром ДВС

- Геморрагический синдром обусловлен :

  - потреблением факторов (II, V, VIII и др.)

  - тромбоцитопатией потребления

  - повреждением сосудистой стенки ПДФ

ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕСТЫ

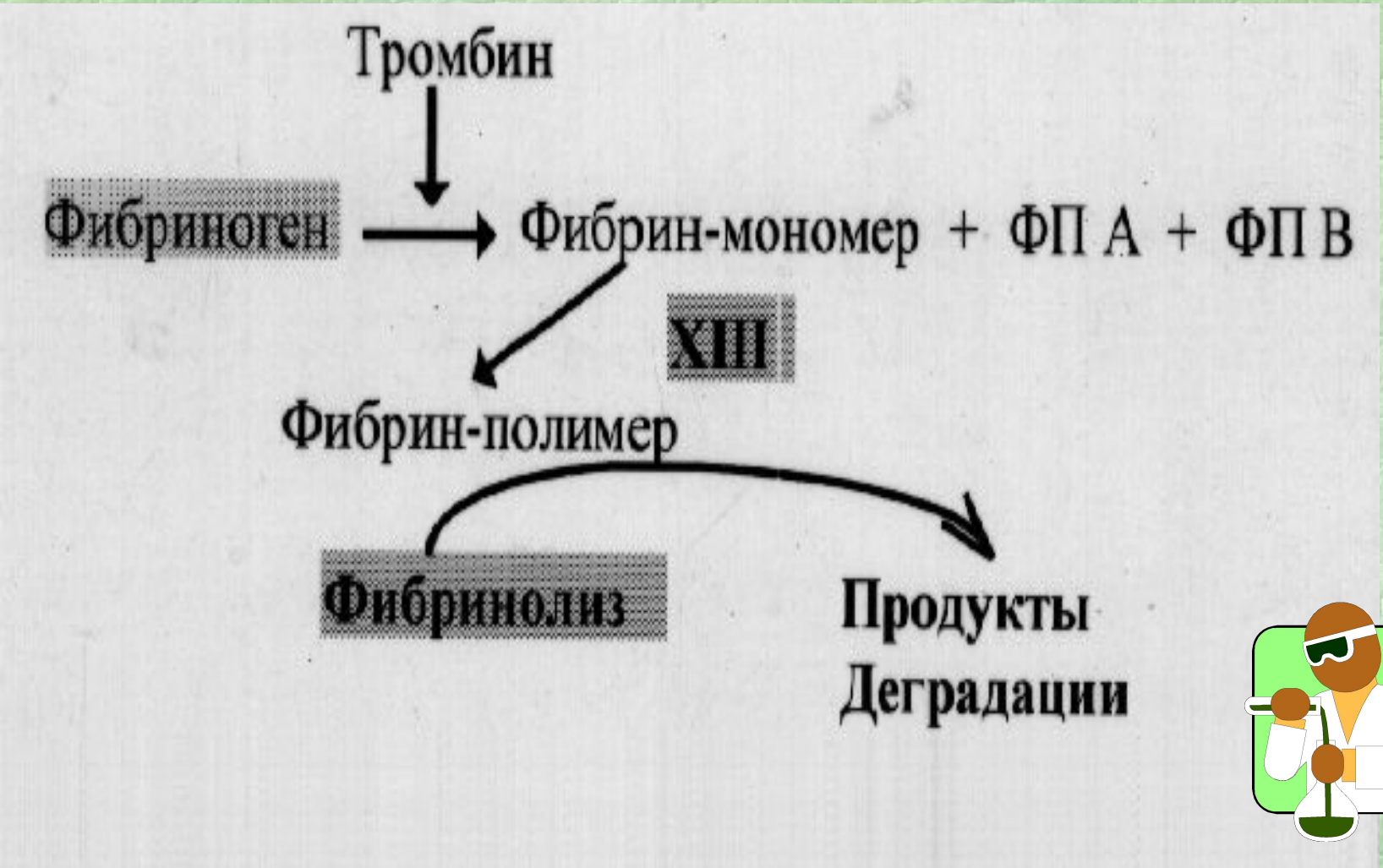
Количественные изменения (коагулопатия потребления и тромбоцитопатия потребления)

- в фазе потребления -по свертыванию на игле
- острое снижение в крови тромбоцитов при одновременном повышении спонтанной агрегации
- выявление в мазке обломков эритроцитов (увеличение анизоцитоза, RDW)
- потребление и истощение в крови антитромбина III
- при остром ДВС удлинение АЧТВ, АВР, ТВ, снижение ПИ
- уменьшение факторов свертывания , фибриногена (±)

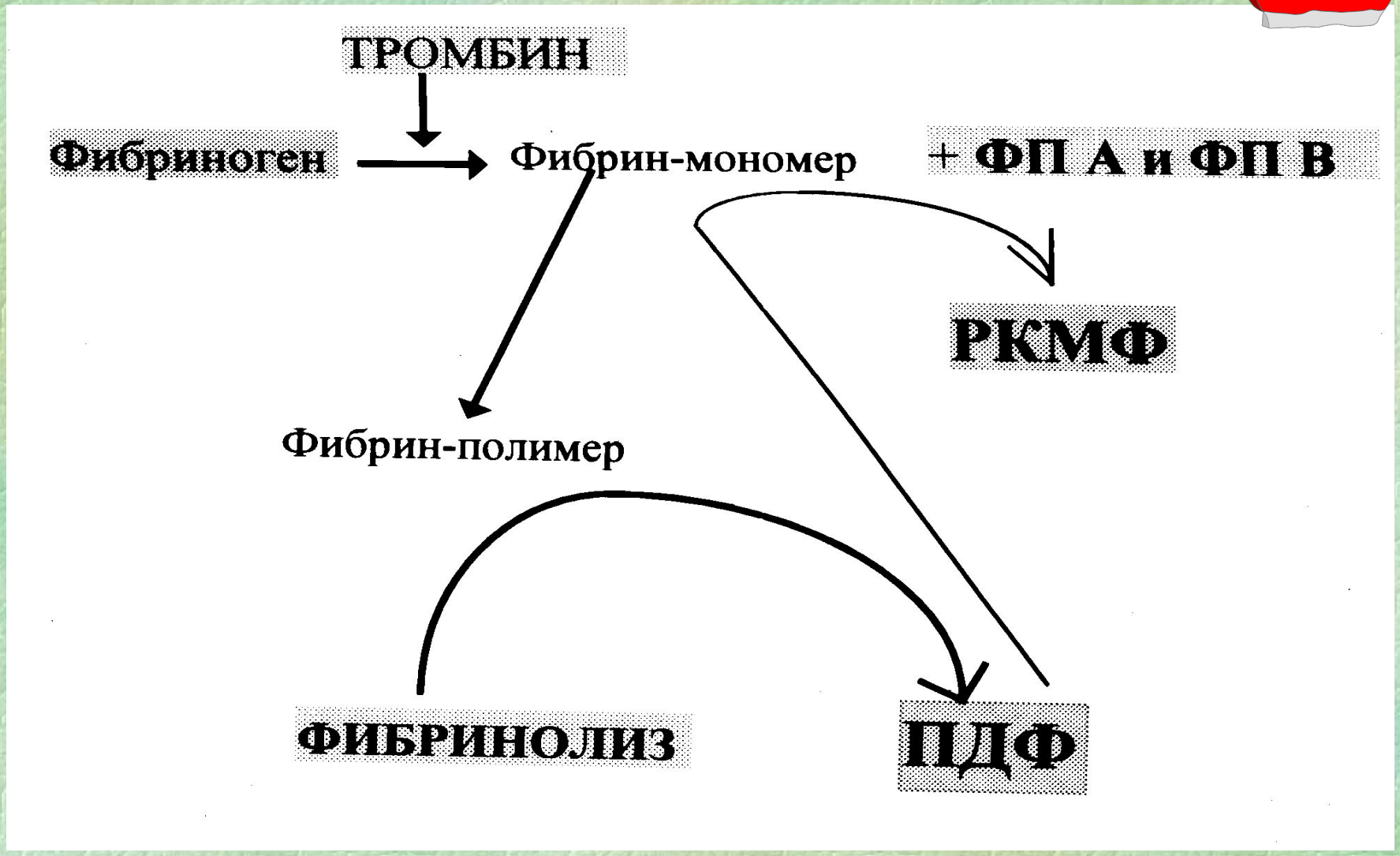
Количественные изменения (новое качество)

- положительные тесты на РКМФ (этаноловый, фенантролиновый и др.)
- определение фибринопептидов А и В (ФП А и ФП В) (ИФА-диагностика)
- выявление ПДФ
- D-димеры

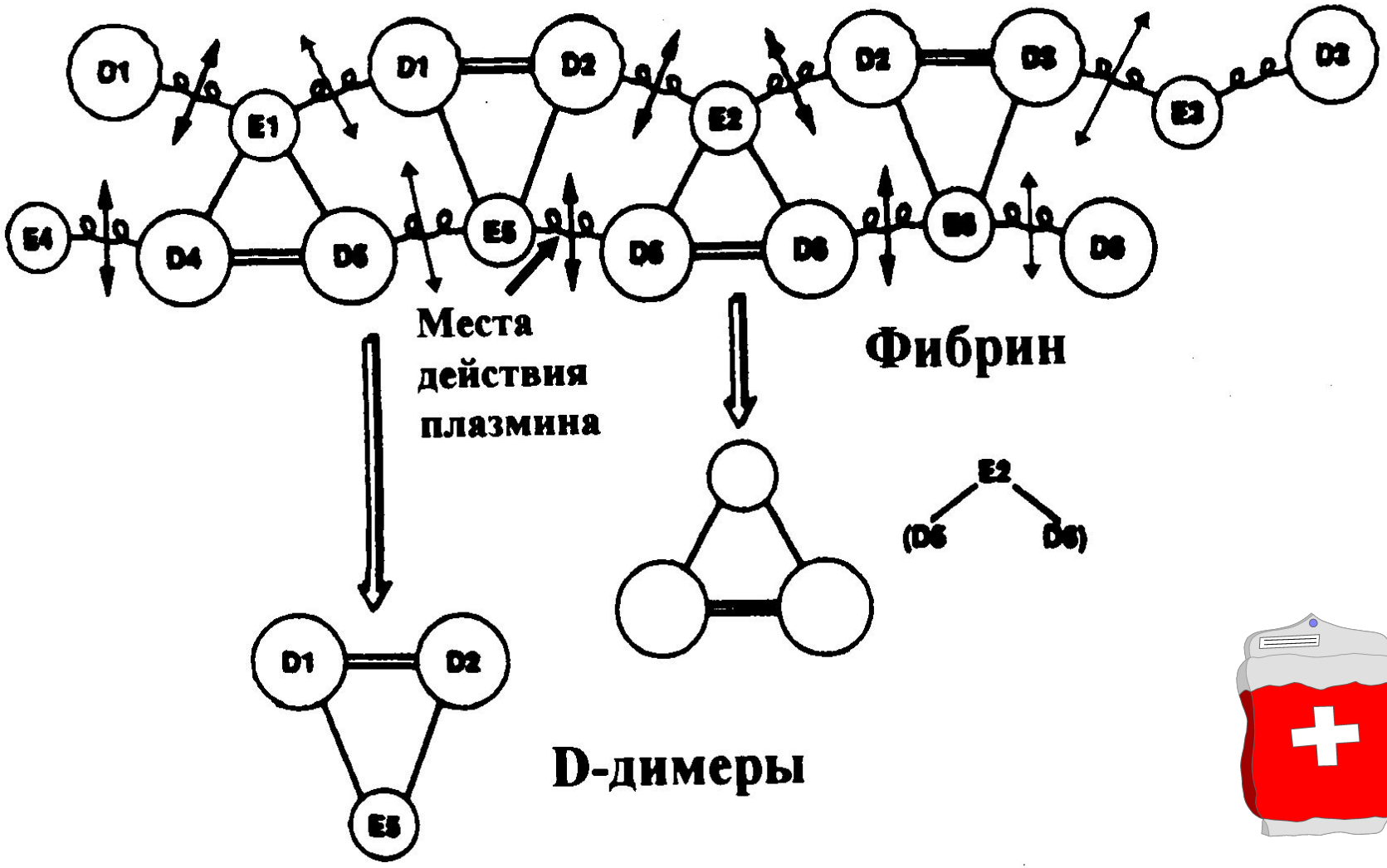
ОБРАЗОВАНИЕ И РАЗРУШЕНИЕ ФИБРИНА



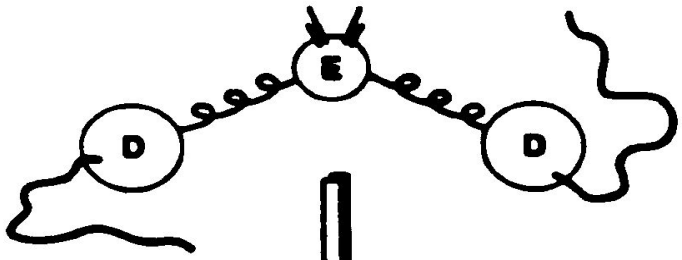
ДВС-синдром


ТРОМБИН
Фибриноген
Фибрин-мономер
+ ФП А и ФП В
РКМФ
Фибрин-полимер
ФИБРИНОЛИЗ
ПДФ

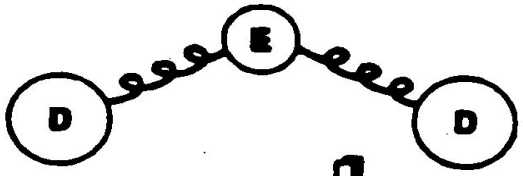
D -димеры


D1
E1
D1
D2
E2
D2
D3
E3
D3
E4
D4
D5
E5
D5
D6
E6
D6
Места действия плазмина
Фибрин
E2
(D5
D6)
D1
D2
E5
D-димеры

Деградация фибриногена

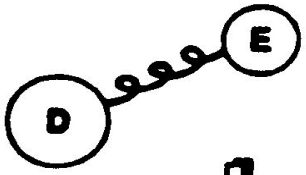


фибриноген



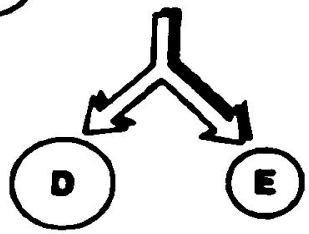
Фибрин-мономер

Фрагмент Y

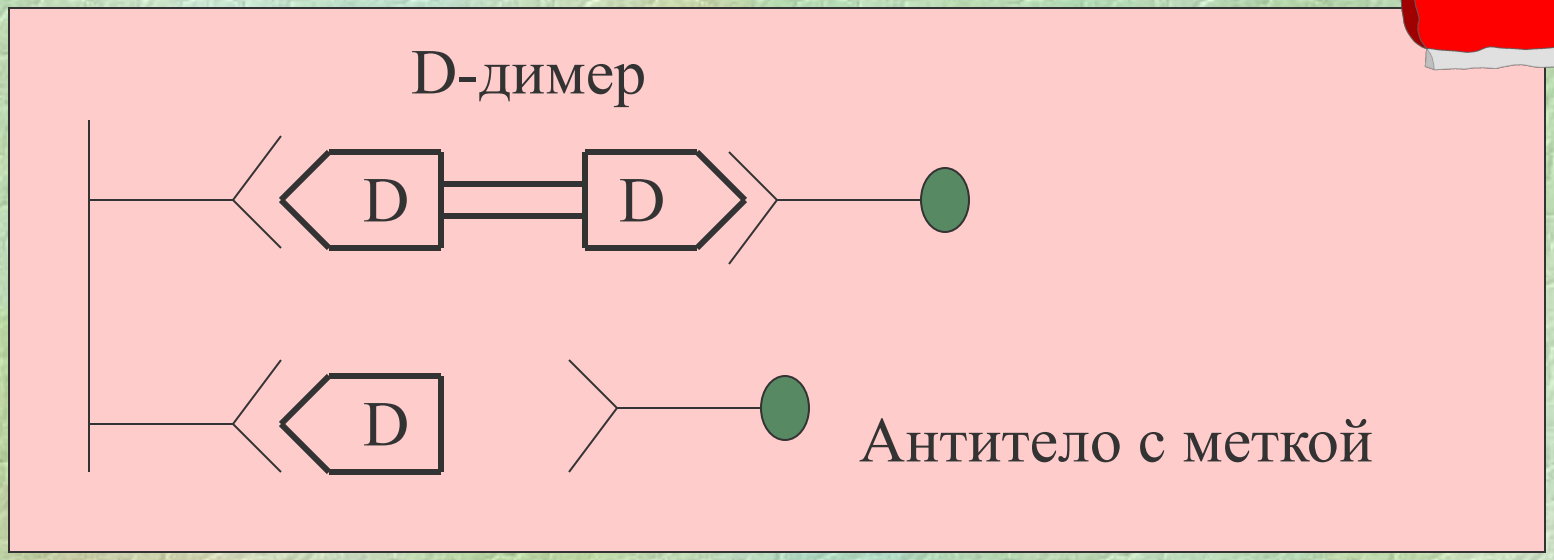


+

Фрагмент D



D-димеры

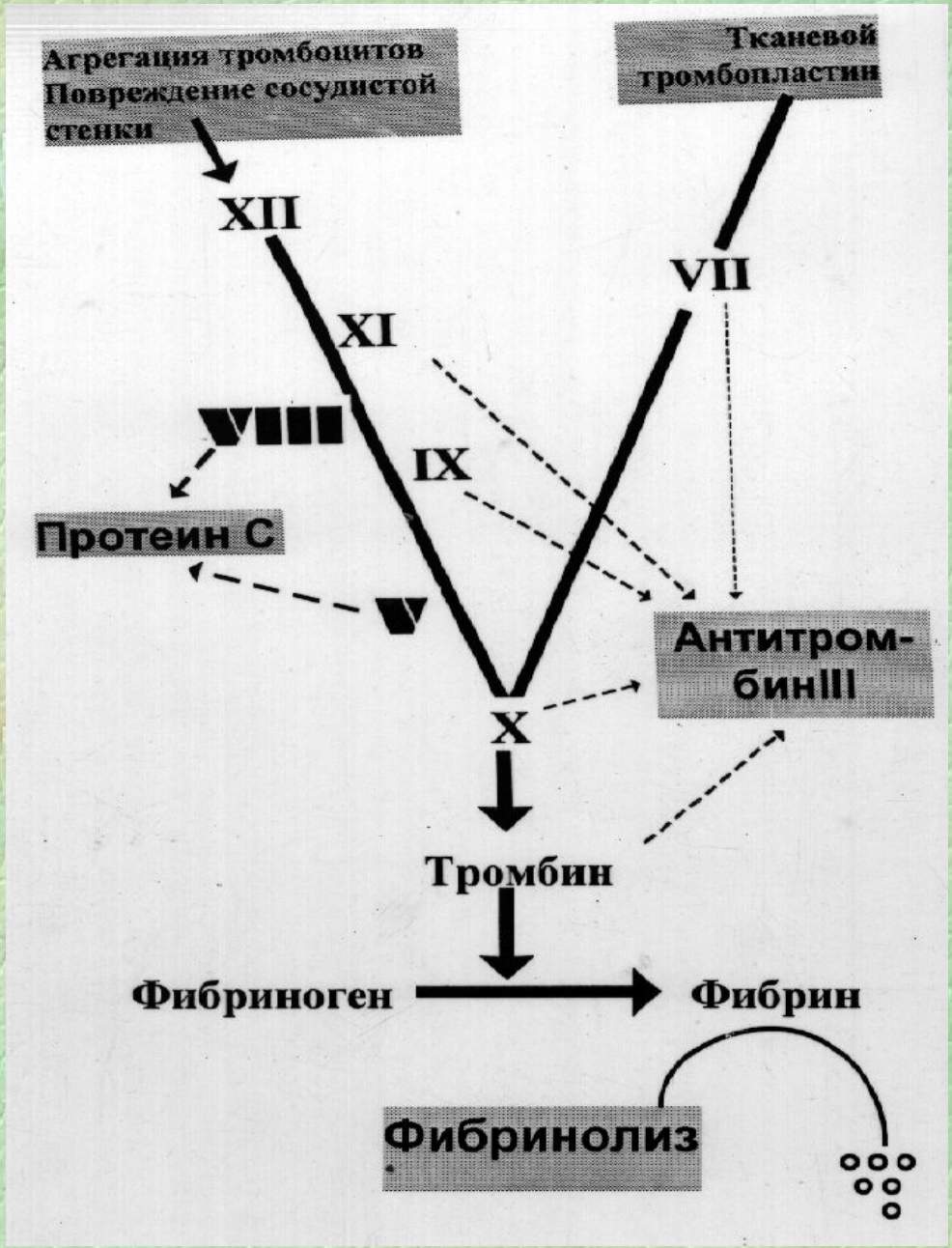


Сравнительная характеристика специфичности и чувствительности диагностики ДВС-синдрома

Тест	**Больные с ДВС** (кол-во положительных рез-тов)	**Больные без ДВС** (кол-во положительных рез-тов)
D-димеры	93,7 %	20 %
Антитромбин III	87,5 %	6 %
Фибринопептид	89,5 %	13 %
ПДФ А	83,7 %	40 %
Протаминсульфатный тест	26 %	13 %
Протромбиновое время	20 %	
АЧТВ	48 %	

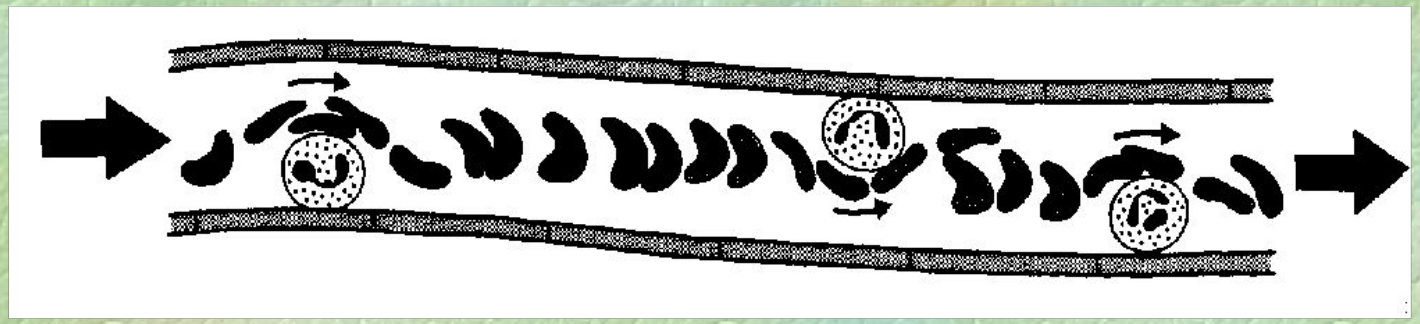
Совокупность следующих исследований дает информацию о наличии и особенностях ДВС

- В фазе гиперкоагуляции - по свертыванию на игле, низкоконтактной тромбоэластограмме
- Выявление в мазке обломков эритроцитов
- Острое снижение тромбоцитов при одновременном повышении спонтанной агрегации
- Снижение факторов свертывания (V , VIII , II)
- Положительные тесты на РКМФ (этаноловый, тест склеивания стафилококков,ортофенантролиновый)
- Потребление антитромбина III
- Накопление ПДФ, D-димеров

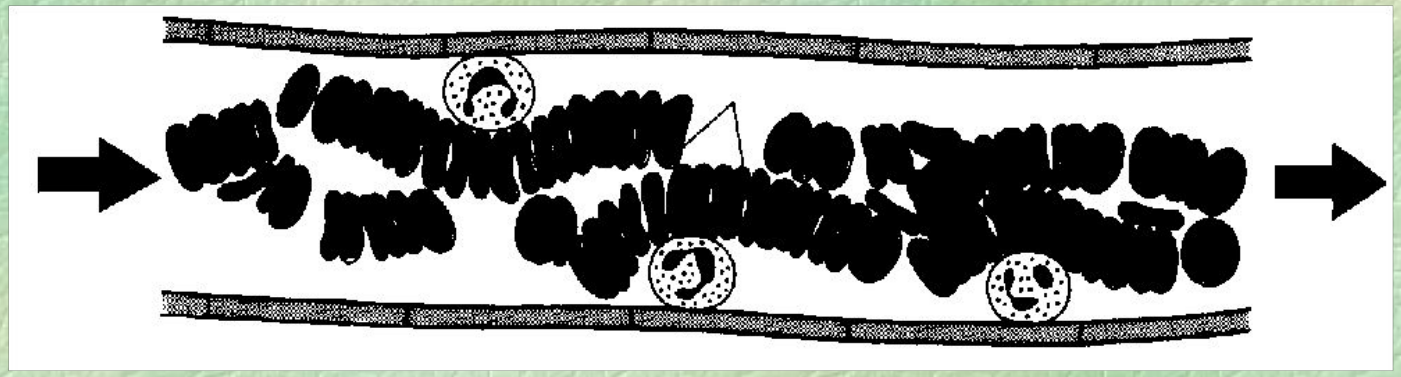

Агрегация тромбоцитов
Повреждение сосудистой стенки
Тканевой тромбопластин
XII
VII
XI
VIII
IX
Протеин С
V
Антитром-бинIII
X
Тромбин
Фибриноген
Фибрин
Фибринолиз

Образование монетных столбиков эритроцитов при замедлении кровотока

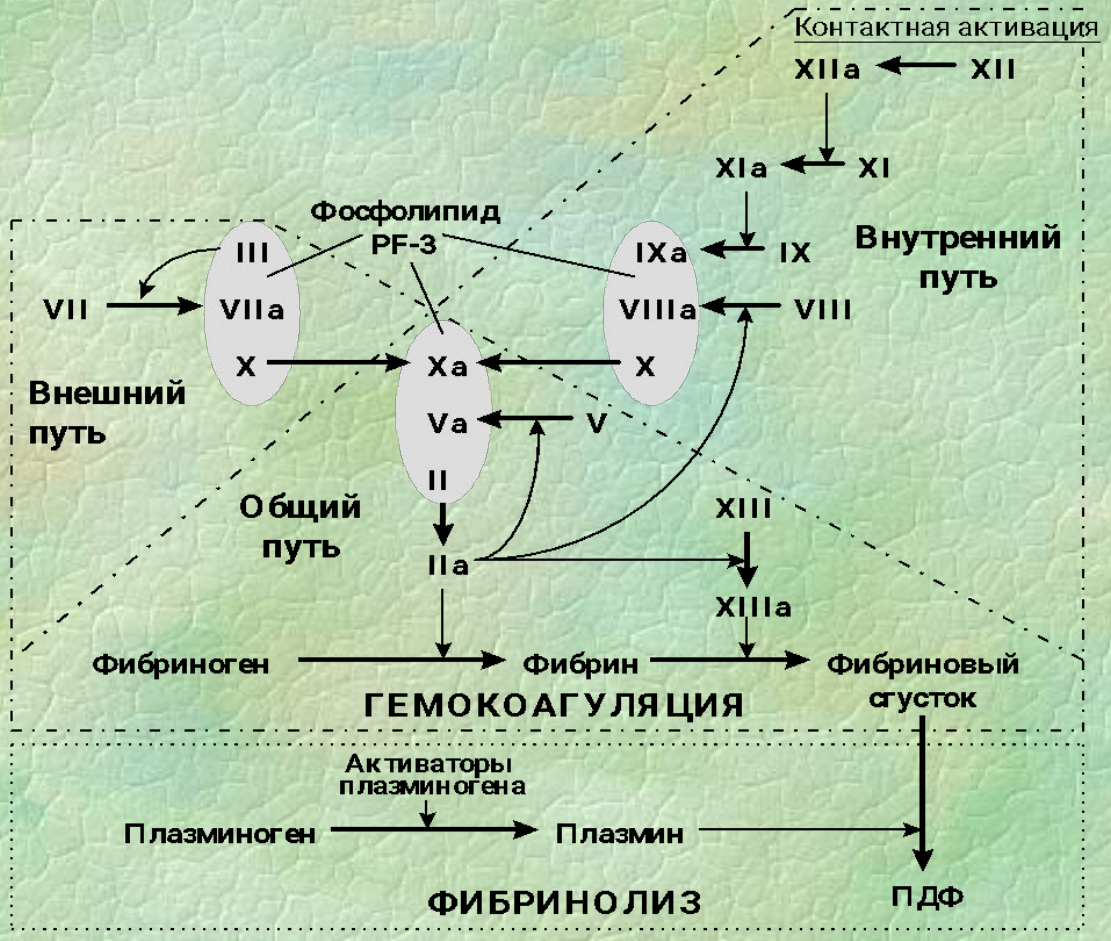
Нормальный кровоток в венулах



Кровоток в венулах примедленной скорости



Образование и лизис фибринового сгустка



АГРЕГАТ ЛЕЙКОЦИТАРНЫЙ НЕЙТРОФИЛЫ

Факторы свертывания крови

Таблица 1.

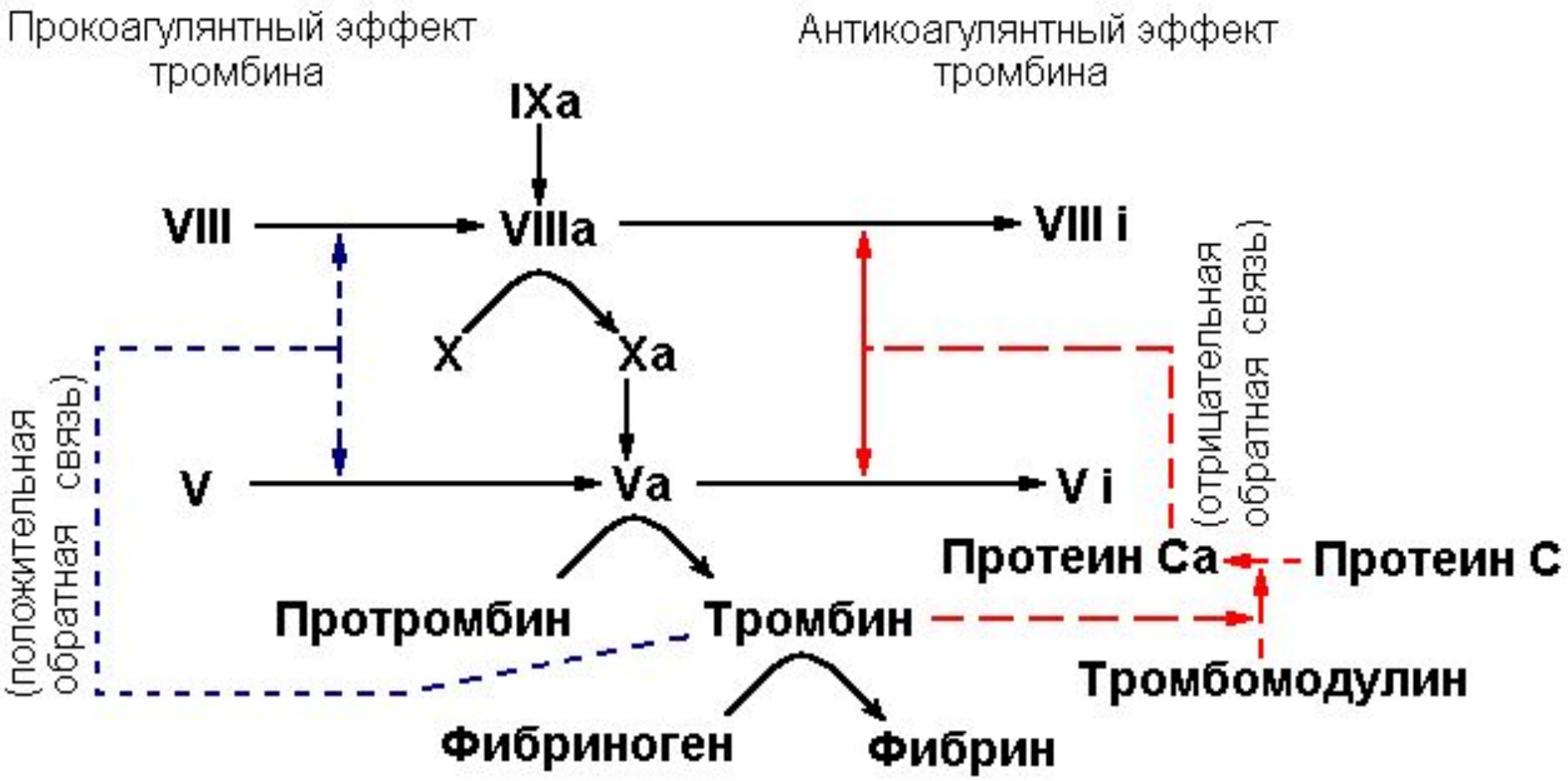
Фактор	Название (синонимы)	Содержание в плазме, г/л (%)	Гемостатический минимум	Период полураспада, ч
I	Фибриноген	1,7-3,5	0,5-1,0 г/л	72-120
II	Протромбин	0,07 (70-120)	40%	48-96
III	Тканевый тромбопластин (тканевый фактор)	–	–	–
IV	Ионы кальция	0,09-0,1	#	–
V	Проакцелерин (Ас-глобулин)	0,01 (70-120) [12-17 Ед/мл]	10-15%	15-18
VII	Проконвертин	0,05 (80-130)	5-10%	4-6
VIII: К	Антигемофильный глобулин А коагулянтная часть (плазменный тромбопластический фактор А)	0,03-0,05 (70-150)	30-35%	12-18
VIII: фВ	Фактор фон Виллебранда (ристоцетиновый кофактор)	(65-145)	50%	18-30
IX	Фактор Кристмаса (антигемофильный глобулин В, плазменный тромбопластиновый компонент)	0,003-0,005 (70-120)	20-30%	15-30
X	Фактор Стюарта-Праурэр	0,01 (80-120)	10-20%	24-40
XI	Плазменный предшественник тромбопластина - РТА (антигемофильный глобулин С, фактор Розенталя)	0,5-1,85 (70-120)	10-20%	30-70
XII	Фактор Хагемана (контакный фактор)	0,03-0,04 (70-150)	<1%	50-70
XIII	Фибринстабилизирующий фактор (фибриназа, фактор Лаки-Лоранда)	0,019 (60-150)	2-3%	>72
Прекалликреин (фактор Флетчера)		0,05 (60-150)	<1%	
Высокомолекулярный кининоген (фактор Фицджеральда)		0,06 (70-130)	<1%	

Влияние различных факторов на результаты коагулологических исследований.

Таблица 1.

Преданалитические факторы	**Влияние**
Время суток	снижение содержания факторов свертывания и повышение уровня PAI-1 в ночное время
Прием пероральных контрацептивов	повышение активности большинства факторов свертывания, агрегации тромбоцитов, снижение уровня АТ-III
Длительный стаз (более 3 мин.)	увеличение фибринолитической активности, укорочение АЧТВ, ПТВ, ТВ, повышение уровня фибриногена, АТ-III
Стресс, физическая нагрузка	повышение фибринолитической активности (уровня t-PA), укорочение АЧТВ, активация фактора VIII
Положение тела	в положении стоя происходит относительное увеличение содержания факторов свертывания
Температура +18 — +24^{0}С в течении 8 часов	снижение активности факторов VIII, V и IX (удлинение АЧТВ)
Температура +4^{0}С	увеличение активности факторов VII, XI и XII

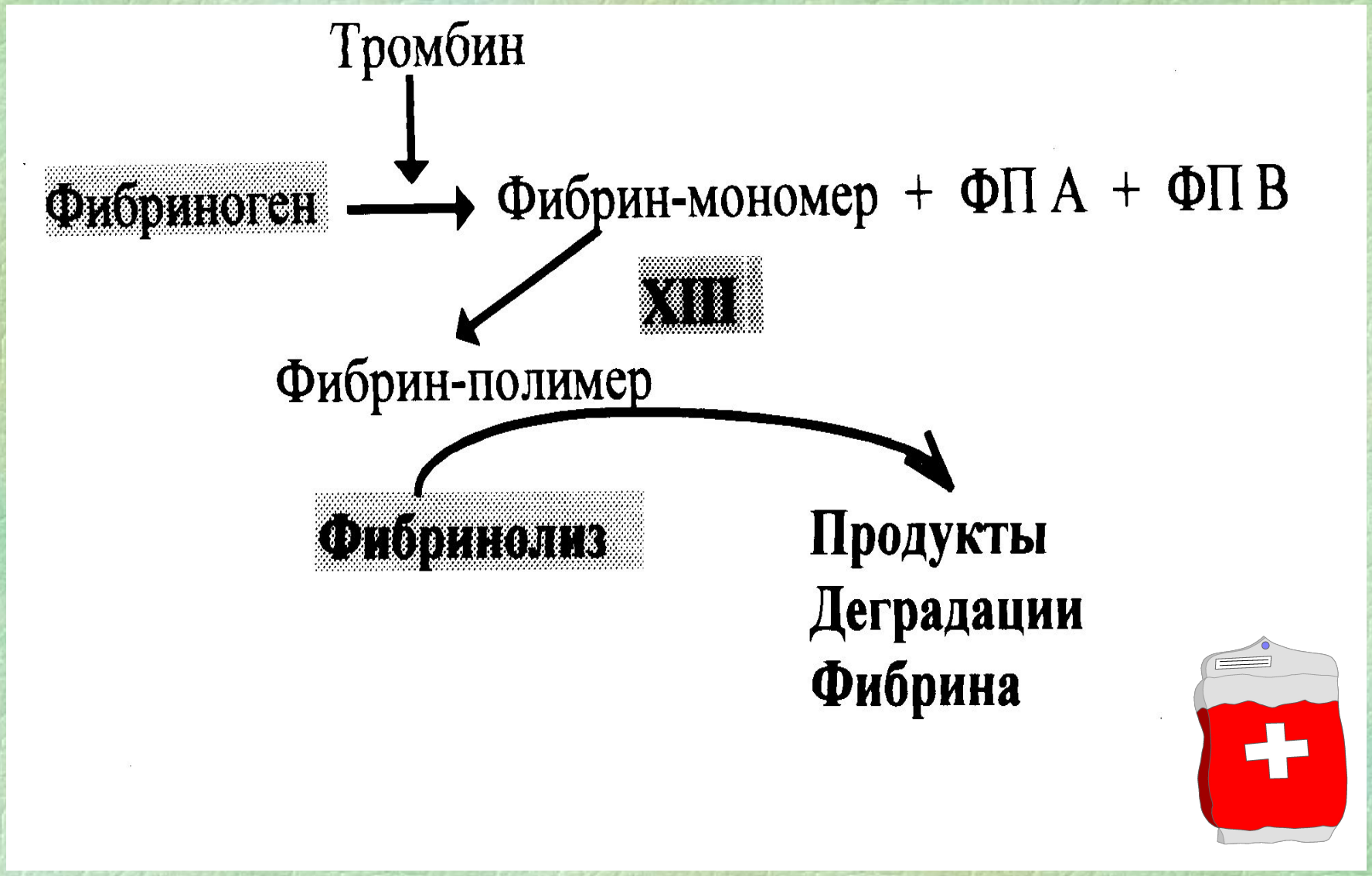
ПРОКОАГУЛЯНТНОЕ И АНТИКОАГУЛЯНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРОМБИНА

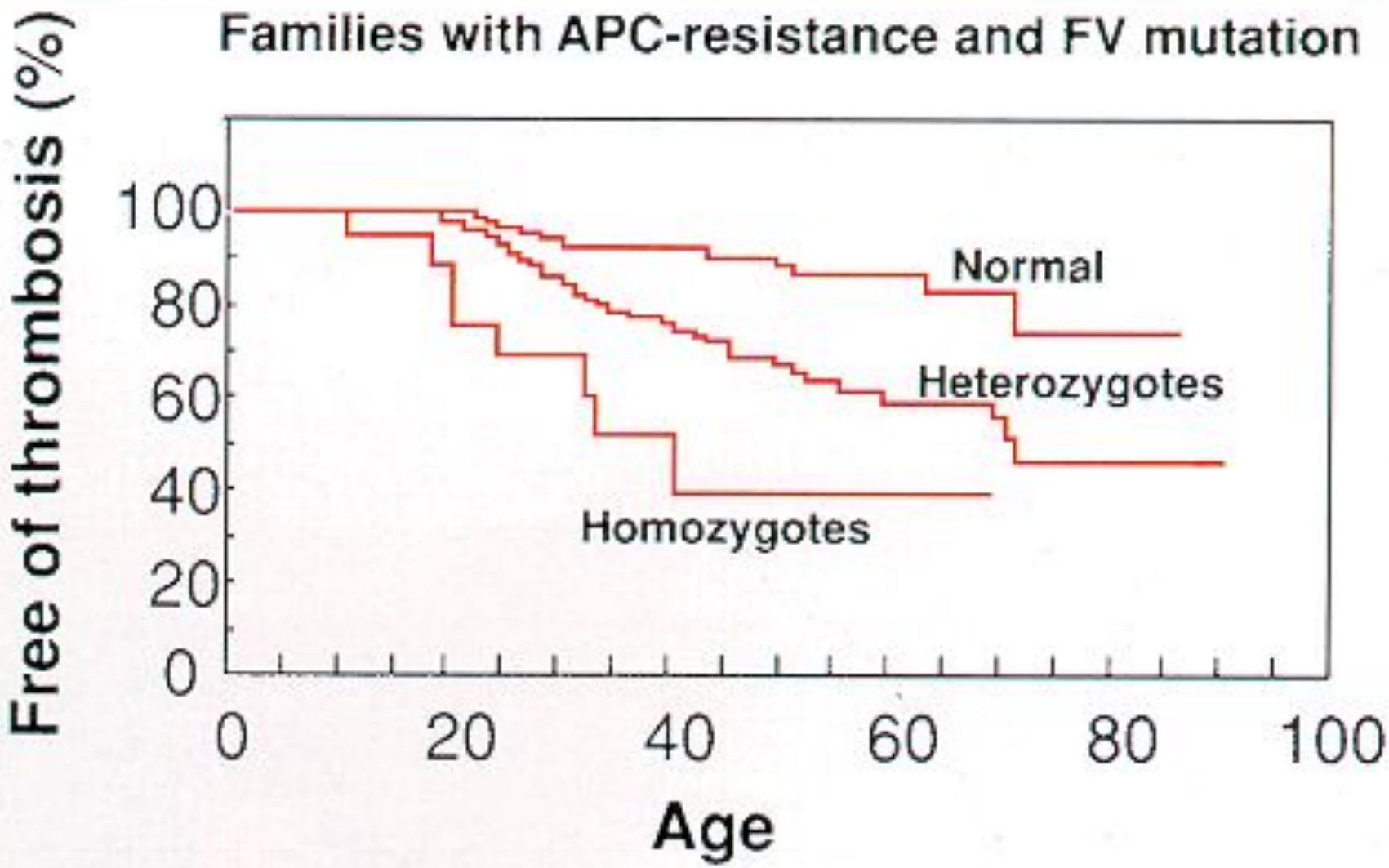


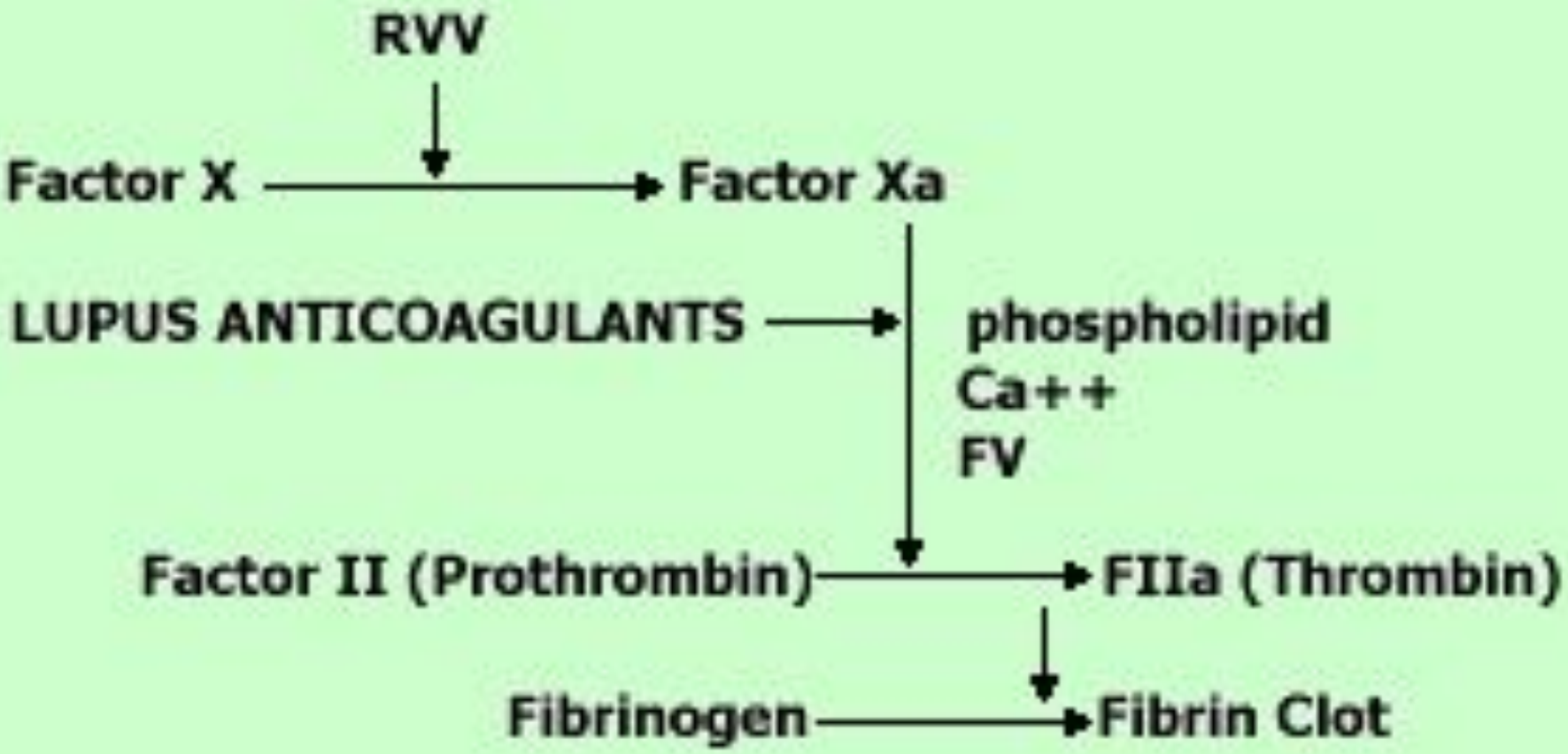
Некроз кишечника и геморрагии при шоке

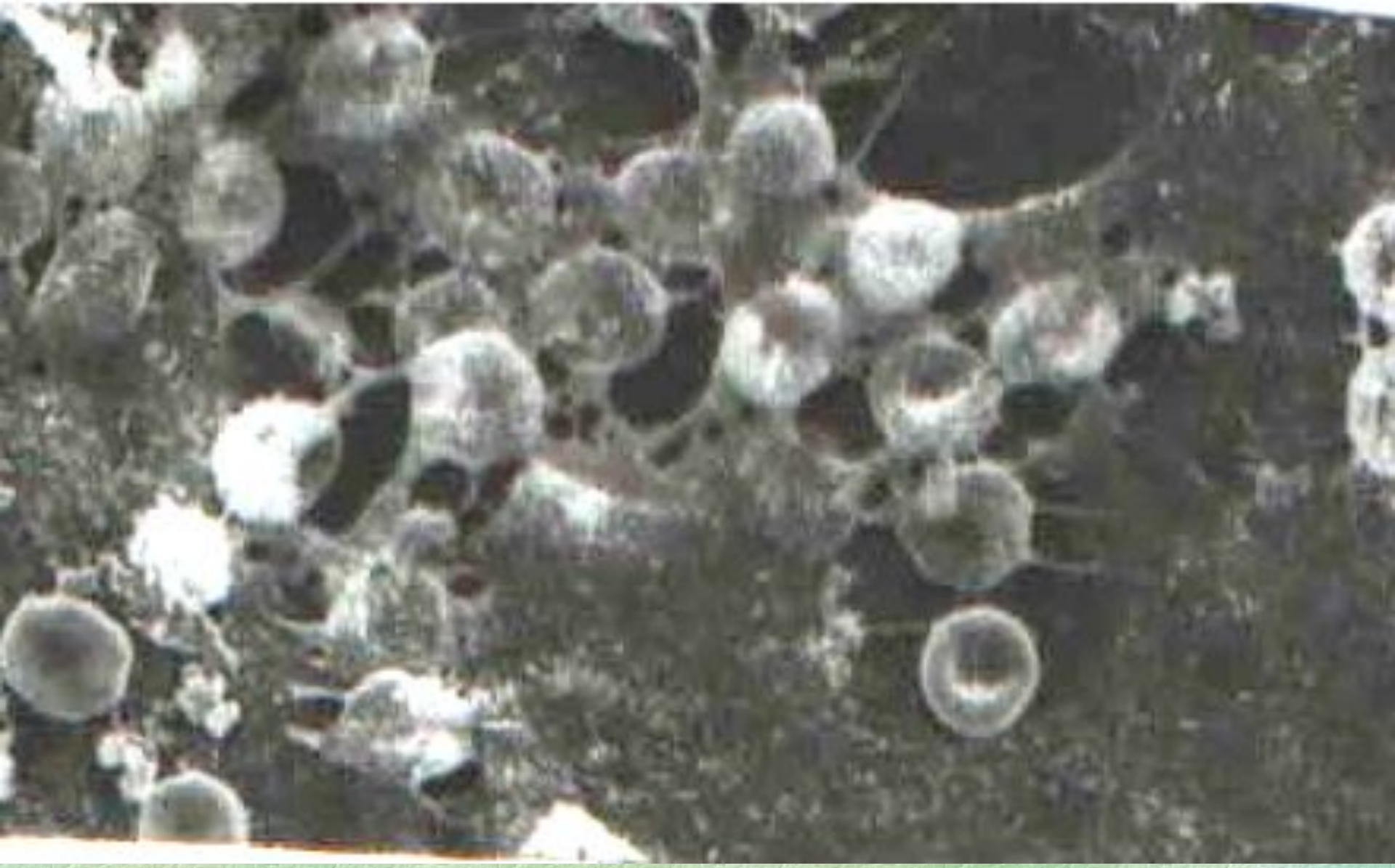
Отток крови от органов брюшной полости при шоке в результате централизации кровообращения может привести к необратимым изменениям, полиорганной недостаточности

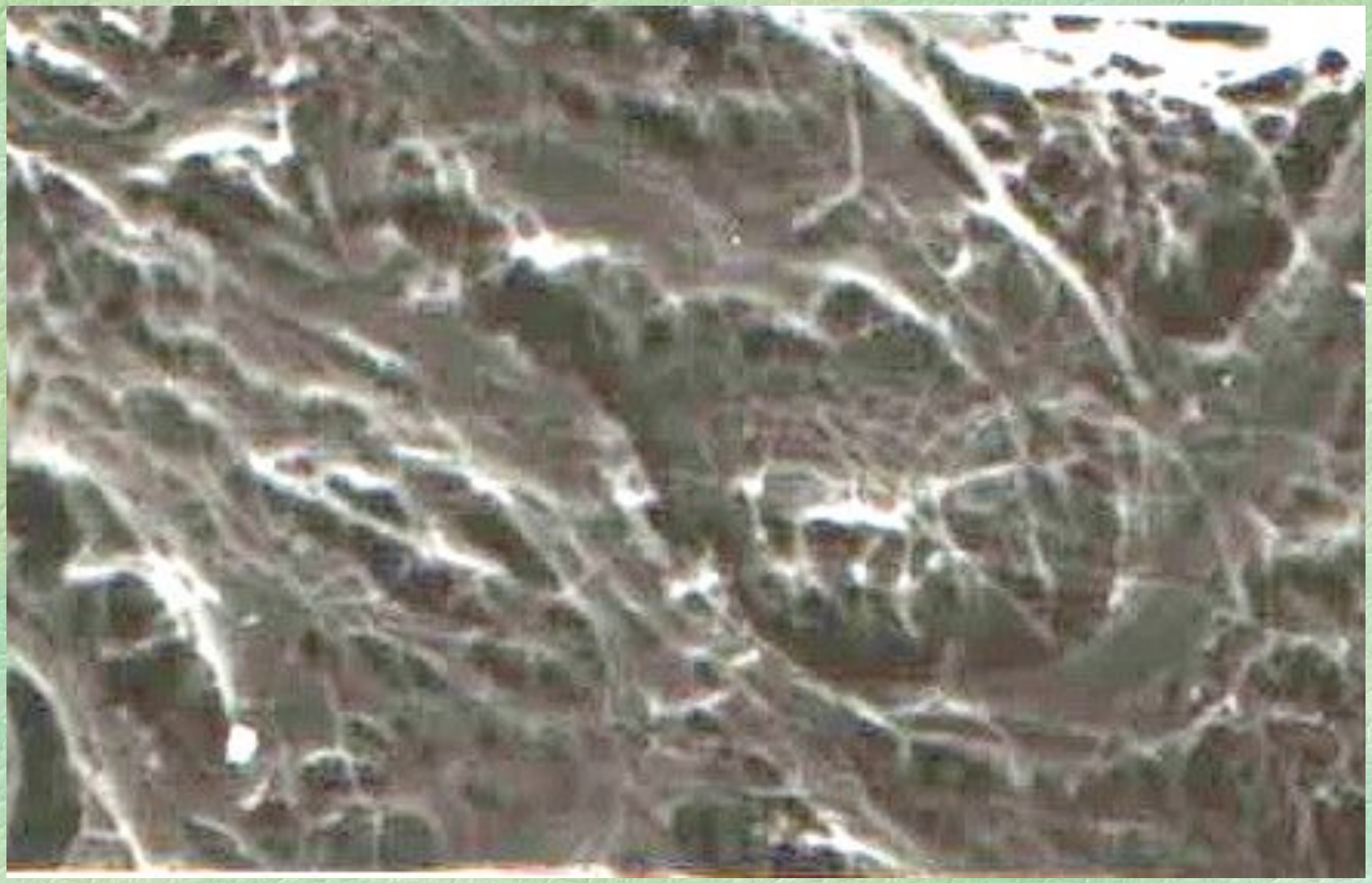
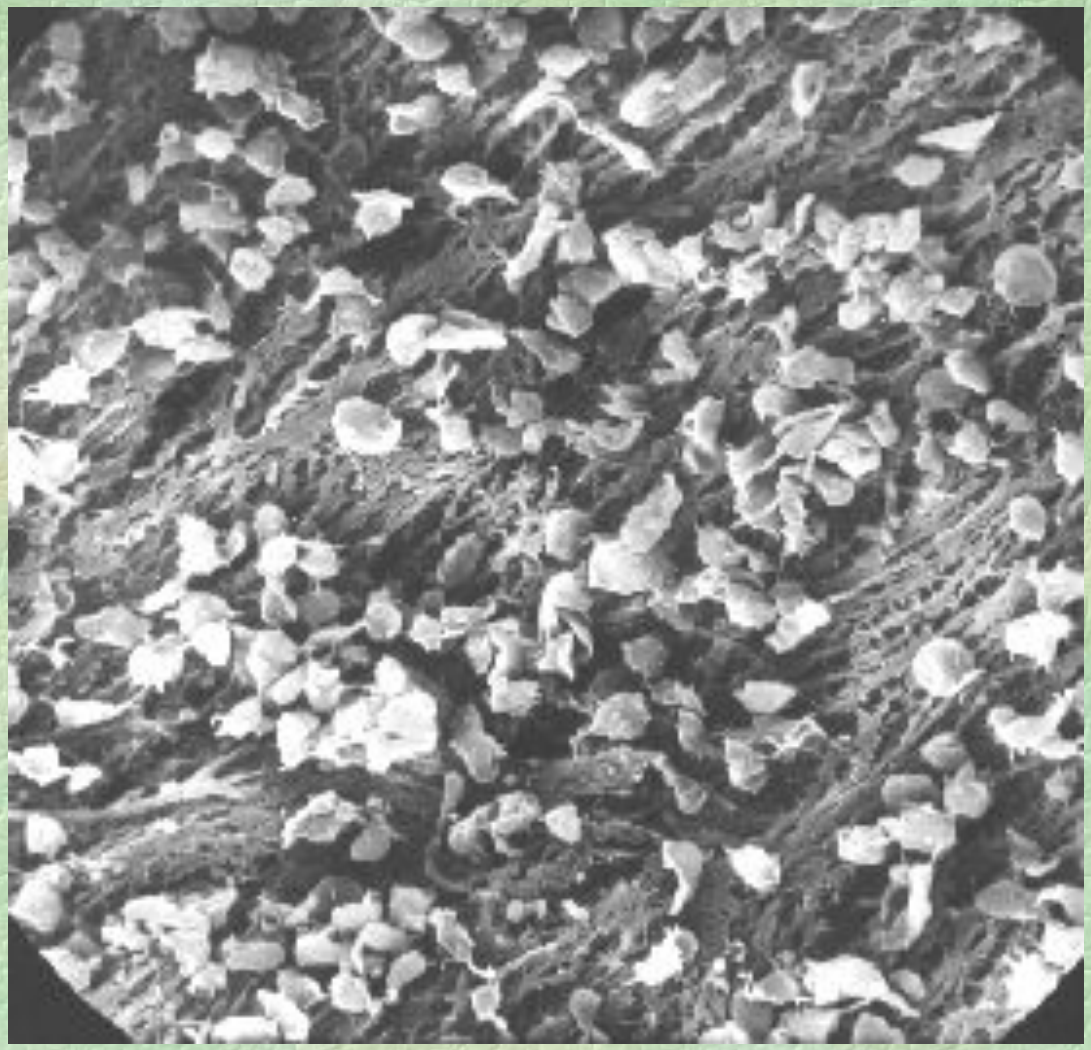
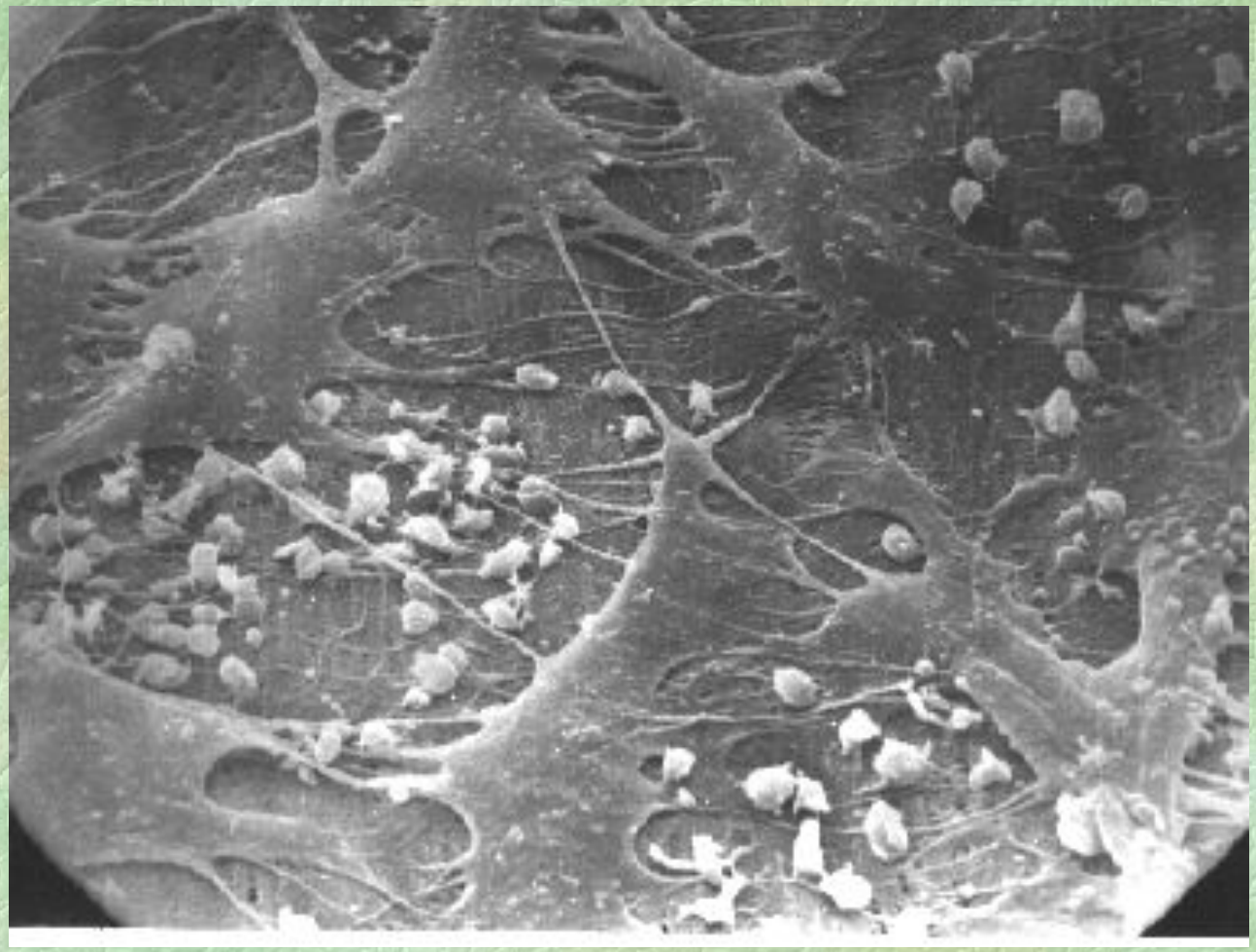
норма


Тромбин
Фибриноген
Фибрин-мономер + ФП А + ФП В
XIII
Фибрин-полимер
Фибринолиз
Продукты
Деградации
Фибрина


Families with APC-resistance and FV mutation
Free of thrombosis (%)
100
80
60
40
20
0
Normal
Heterozygotes
Homozygotes
0
20
40
60
80
100
Age


RVV
Factor X
Factor Xa
LUPUS ANTICOAGULANTS
phospholipid
Ca++
FV
Factor II (Prothrombin)
FIIa (Thrombin)
Fibrinogen
Fibrin Clot





Адгезированные тромбоциты на сосудистой стенке