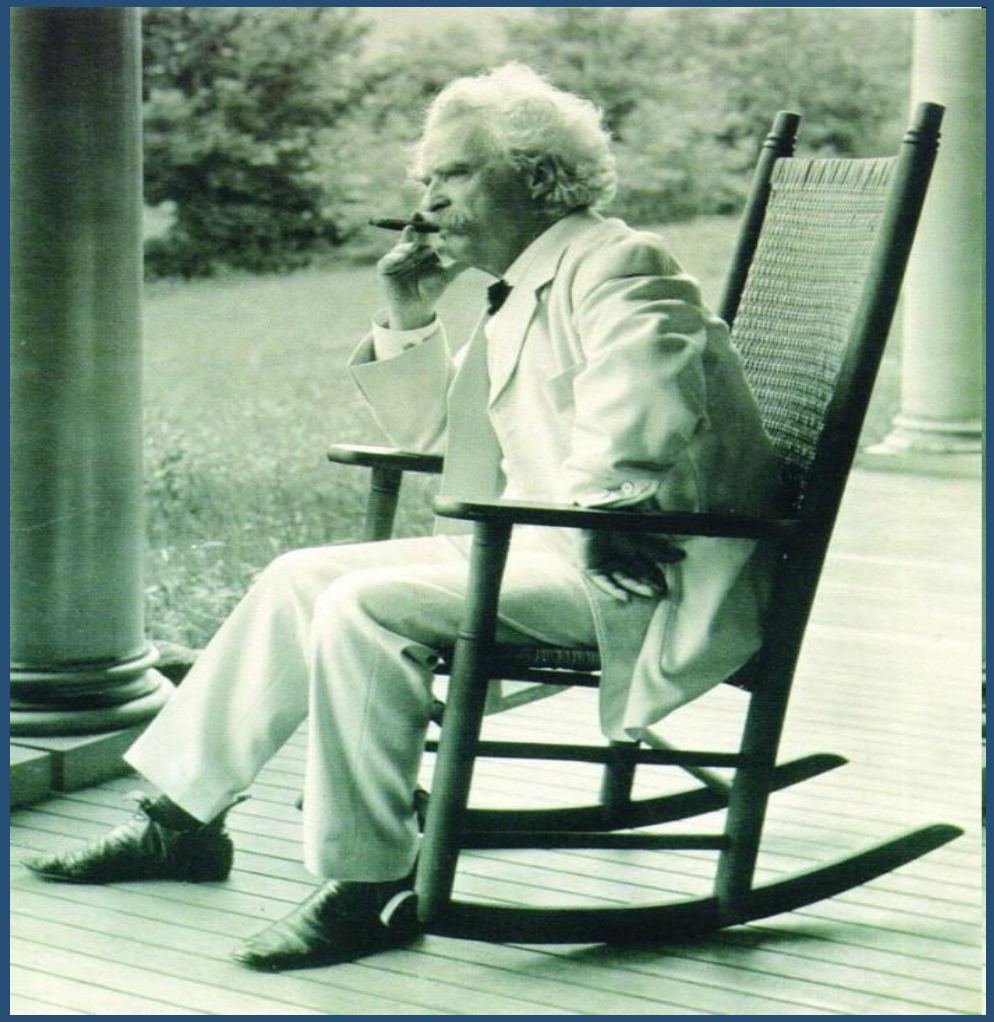
Лабораторная диагностика нарушений гемостаза

Хабарова О.В.
зав. лабораторией биохимических исследований и патологии гемостаза, к.б.н.
2012

Проблема не в том, чего вы не знаете...А в том, в чѐм вы уверены на 100%. На самом деле всѐ абсолютно не так!



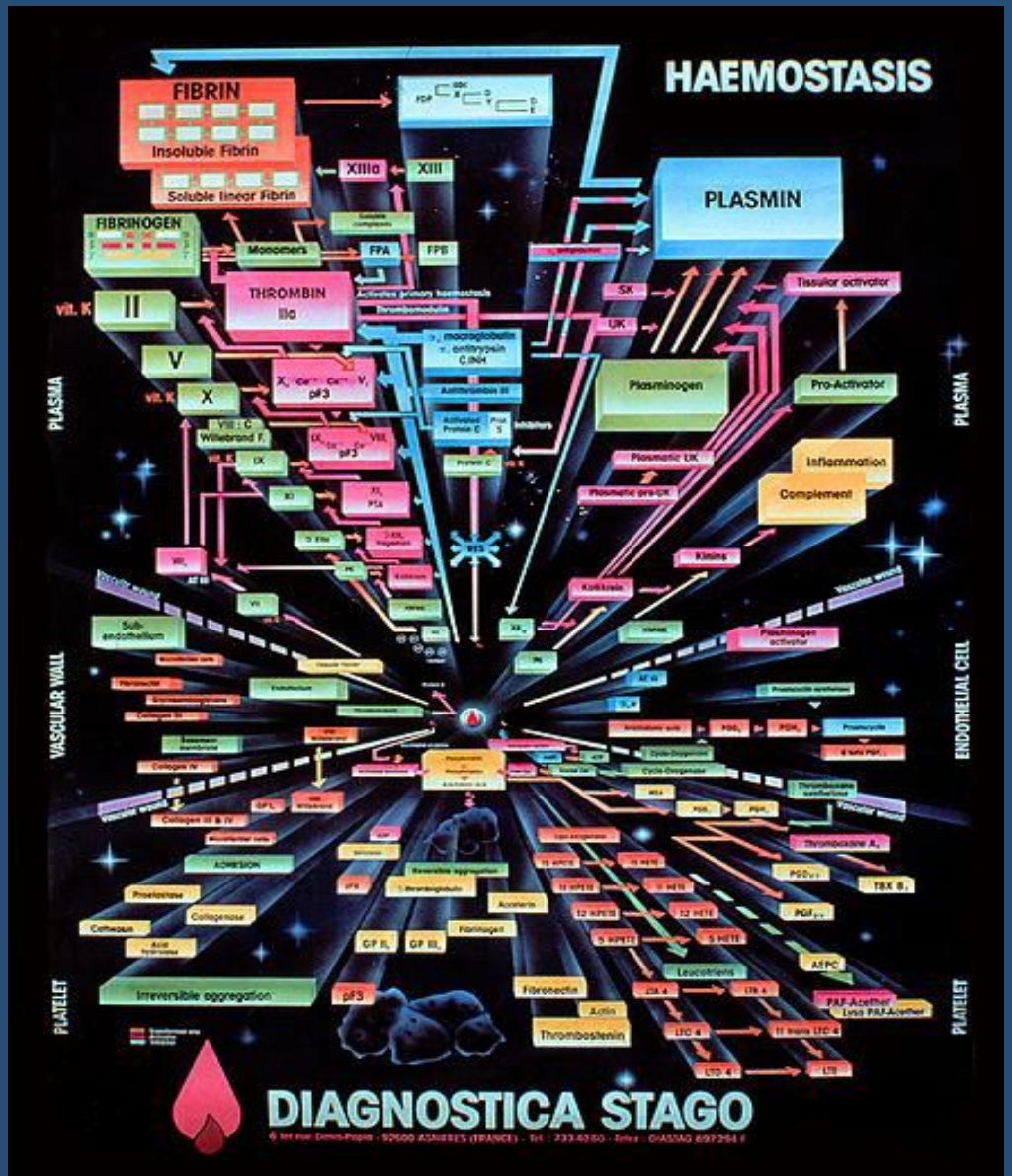
Марк Твен

Система гемостаза – что это?

Биологическая система, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение жидкого состояния циркулирующей крови, а с другой, - предупреждение и купирование кровотечений, обозначается как система гемостаза

Баркаган З.С., 2001

Гемостаз для чайников?



Механизмы работы системы гемостаза сложны, но суть нормальной её работы проста - это поддержание гемостатического баланса между факторами свертывания и антикоагулянтными факторами. При смещении гемостатического баланса за рамки физиологических норм возникают условия для развития патологических кровотечений или тромбозов

Долгов В.В., 2005.

Гемостаз в норме

Функционирование системы гемостаза определяется состоянием трех тесно взаимодействующих между собой компонентов:

- **- стенками кровеносных сосудов** (в первую очередь эндотелием и субэндотелиальными структурами);
- - **клеточными элементами крови** (в первую очередь тромбоцитами);
- **- плазменными протеолитическими системами: свертывающей, противосвертывающей** (в том числе **фибринолитической**).

Гемостаз

Первичный или сосудисто-тромбоцитарный

Вторичный (коагуляционны) или плазменный

хотя оба этих механизма взаимно индуцируют друг друга.

Пока эндотелий цел, не поврежден, он обладает высоким антитромботическим потенциалом, что определяется следующими его свойствами :

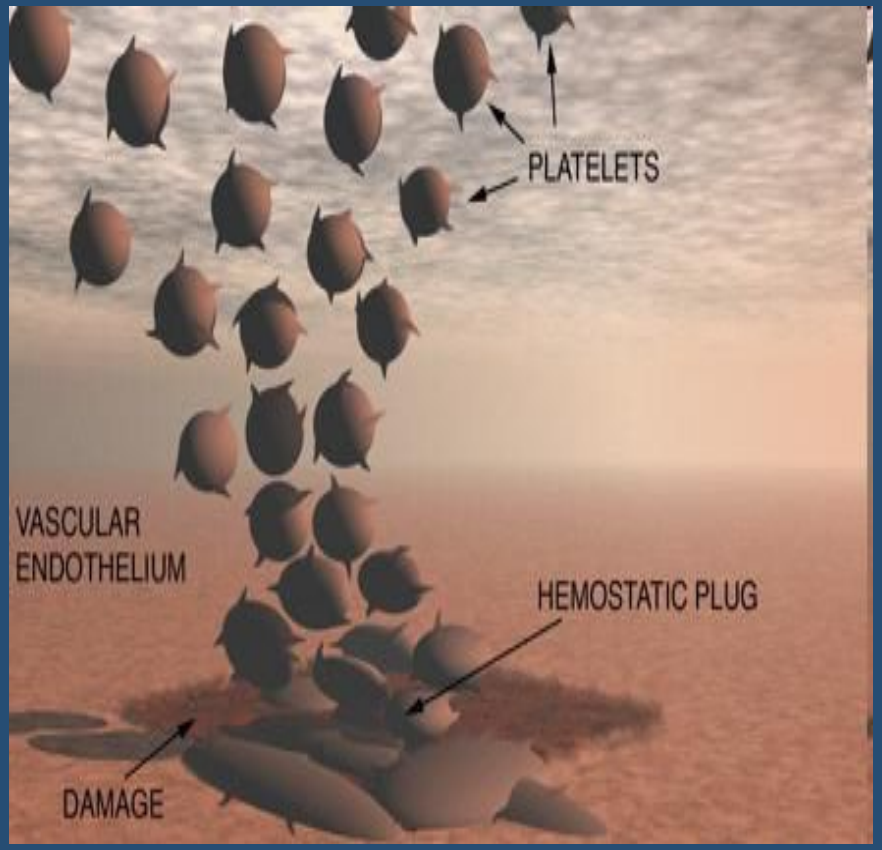
- отрицательной заряженностью
- в мембране ЭК – тромбомодулин, связывающий и инактивирующий тромбин, (этот комплекс) активирует мощную антикоагулянтную систему протеина С
- продуцирует простагландин I_2 мощный вазодилататор и ингибитора агрегации тромбоцитов
- продуцирует ингибитор внешнего пути свертывания крови (TEFI);
- продуцирует тканевый активатор, который стимулирует фибринолиз

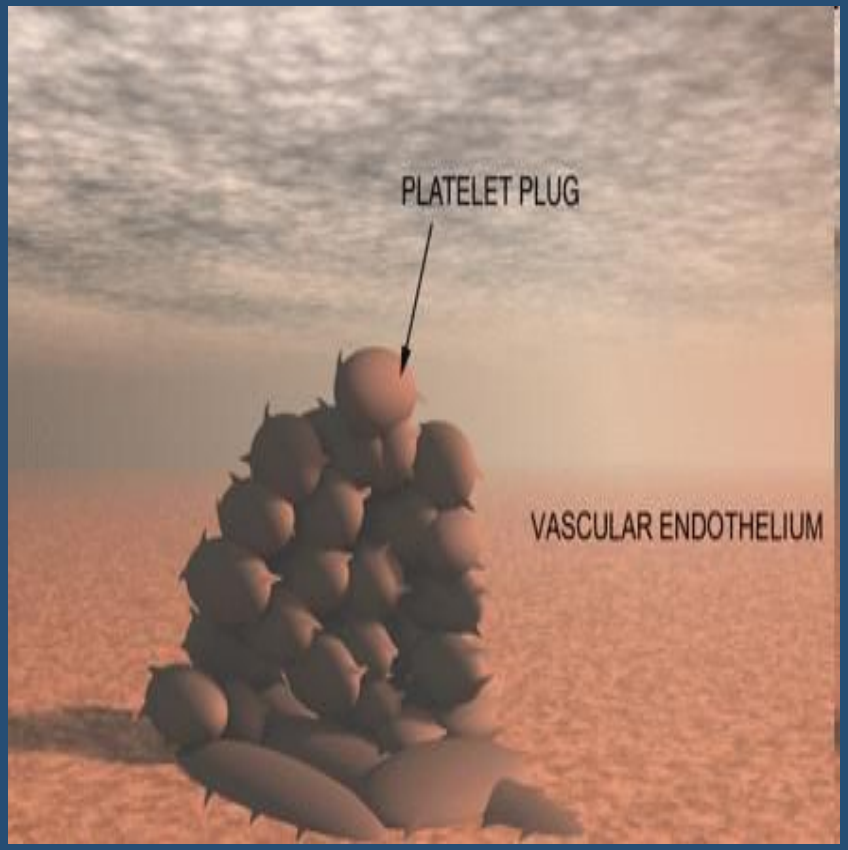
На гипокоагуляцию (антитромботический потенциал) !!!

При повреждении эндотелия его антитромботические свойства трансформируются в мощный протромботический потенциал, определяющийся следующими механизмами:

- секрецией мощного активатора адгезии тромбоцитов к субэндотелию (коллагену) – фактора Виллебранда (FW)
- продукцией стимулятора агрегации тромбоцитов циклического простагландина – тромбоксана A_2
- продукцией и высвобождением тканевого тромбопластина или тканевого фактора (TF) –главного активатора основного механизма свертывания крови;
- - продукцией ингибиторов активатора плазминогена (PAI).

Первичный гемостаз - формирование тромбоцитарной пробки





Необходимые компоненты первичного гемостаза

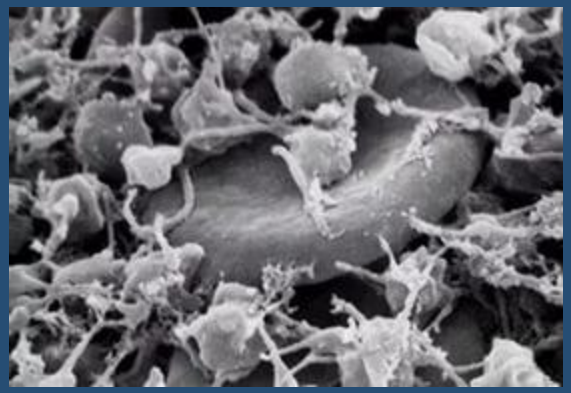
- –коллаген
- –тромбоциты
- –фактор Von Willebrand

2 этапа сосудисто-тромбоцитарного гемостаза

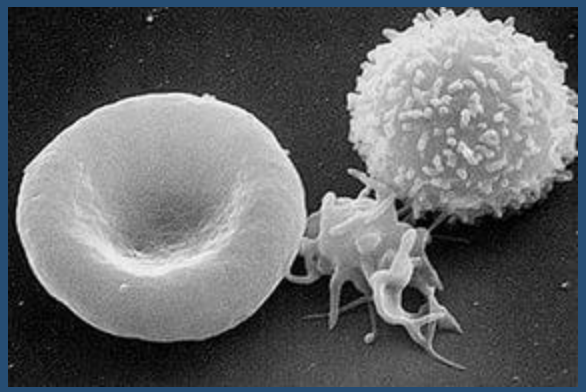
- 1 При повреждении сосуда (как извне, так и эндогенное без разрыва) в кровь попадает большое количество БАВ-эндотелиальный релаксирующий фактор, АПФ, простоциклин (ингиб. агрегации и вазоконстрикции), изменяющих сосудистый тонус. В области повреждения формируется стаз.
- 2. Адгезия(прилипание к поврежденному участку сосуда) и агрегация (склеивание между собой) тромбоцитов. Адгезия тромбоцита реализуется:

  - через коллаген (на тр.- (Ia), базальной мембраны ЭК при соприкосновении с кровью (медленная адгезия в мелких соссудах)
  - либо через активацию тромбоцитов вещ-ми из поврежденных ЭК- через рецепторы (Ib) даже при быстром кровотоке в крупных венах и артерих.

Локально!- ЭК активируют и ограничение роста сгустка и его разрушение. Иначе –тотальное тромбирование.

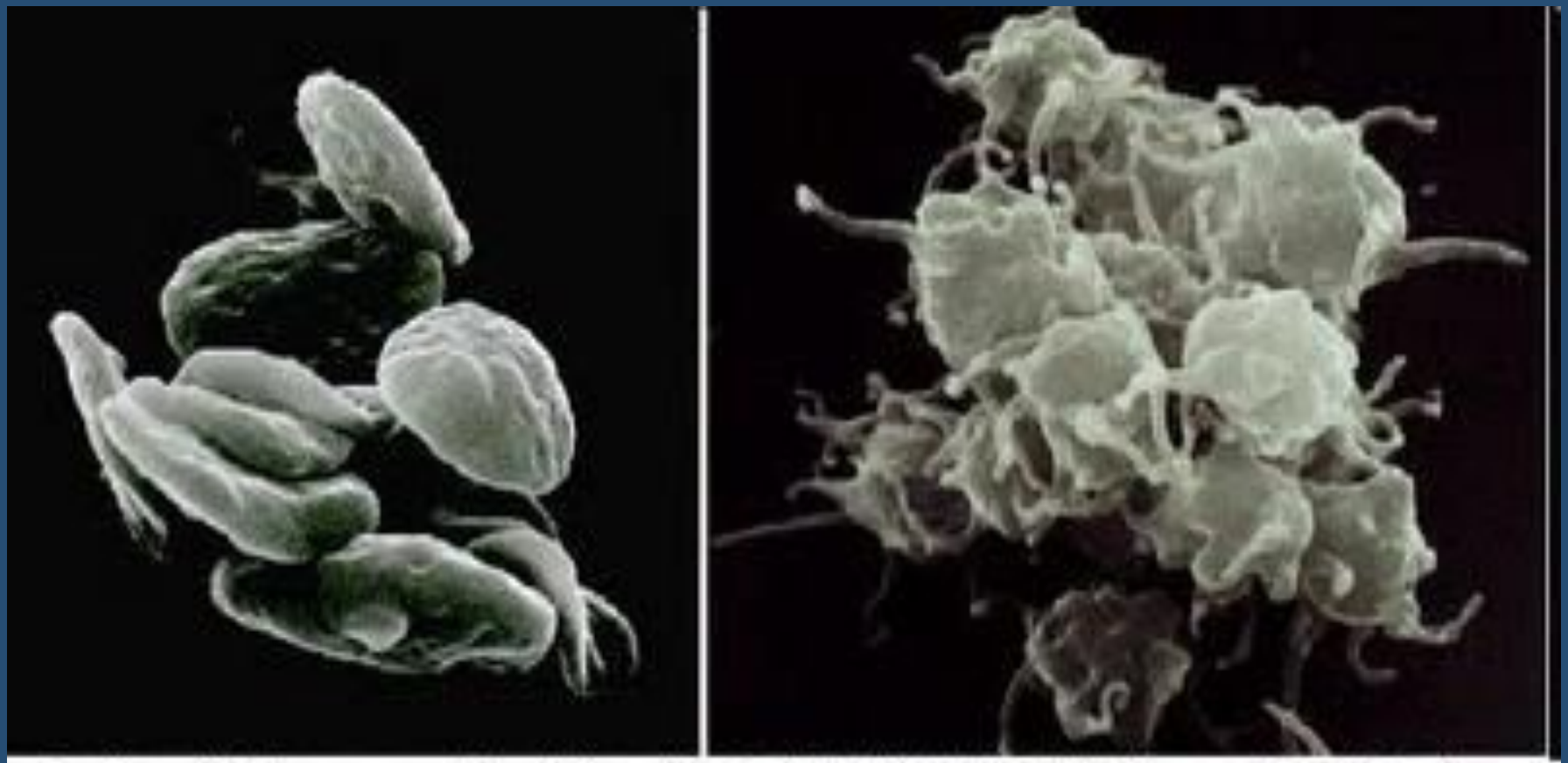


Тромбоцит



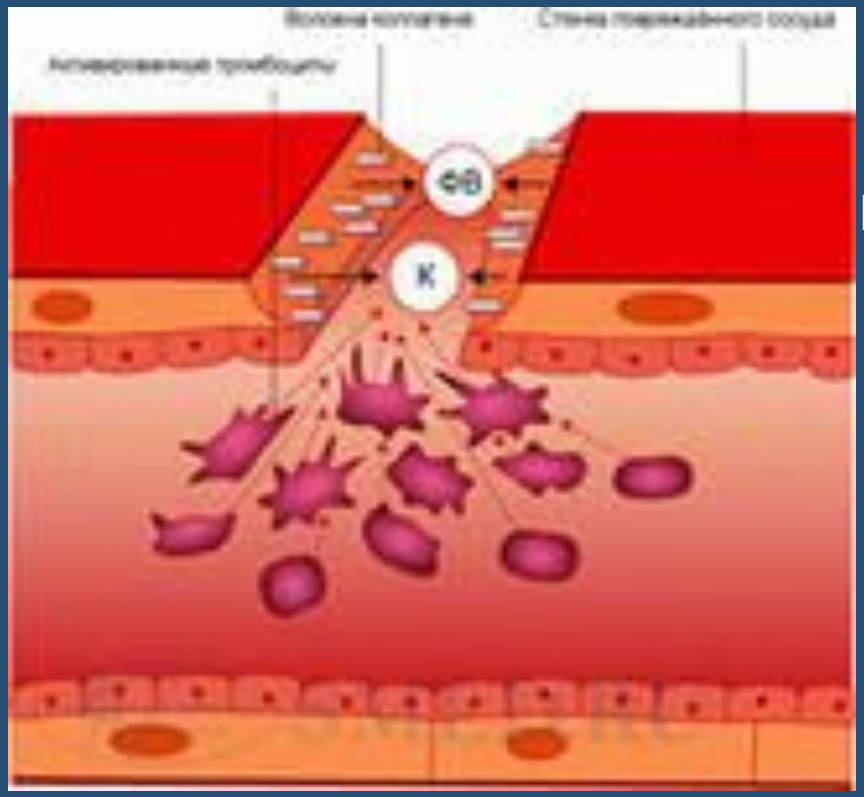
- Адгезия
- Агрегация (обратимая и необратимая)
- Образование псевдоподий и через рецепторы (IIb-IIIa) образование комплексов, сети, связывание с АДФ и фибриногеном
- Наличие рецепторов к факторам VIIIa IXa Xa XIa, а Va фактор синтезируется самими тромбоцитами;
- Наличие гранул: альфа-гр I(АДФ, адреналин, серотонин,кальций, фактор роста тромбоцитов, антигепар. фактор), альфа-гр II (лизосомальные инзимы, ограничивающие рост тромба)

Тромбоциты в покое и после активации

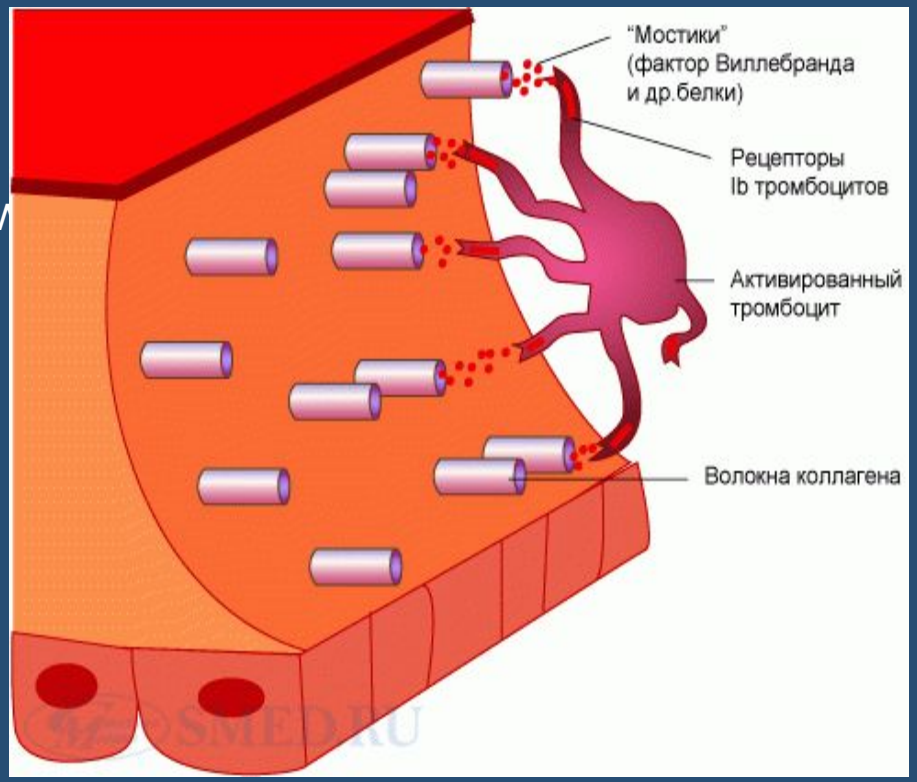


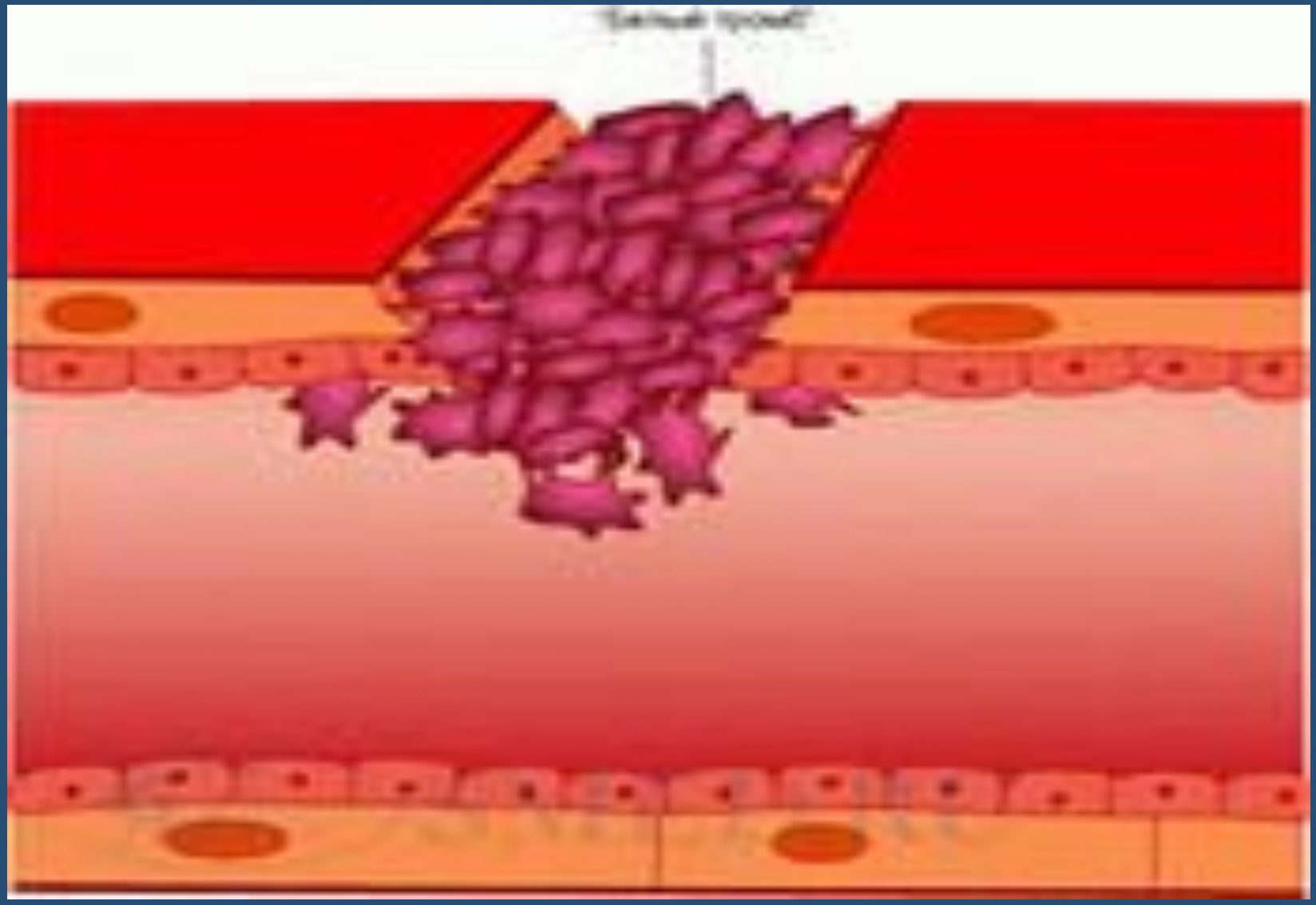
Resting platelets are smooth and disc shaped (left). Activated platelets have an irregular shape with many protruding pseudopodia.
(http://www.perfusion.com/perfusion/articles/general/9905-platelet-anatomy/)

Реализация сосудисто-тромбоцитарного гемостаза обеспечивается спазмом сосудов и их механической закупоркой агрегатами тромбоцитов с образованием, так называемого белого тромбоцитарного (первичного) тромба.



New

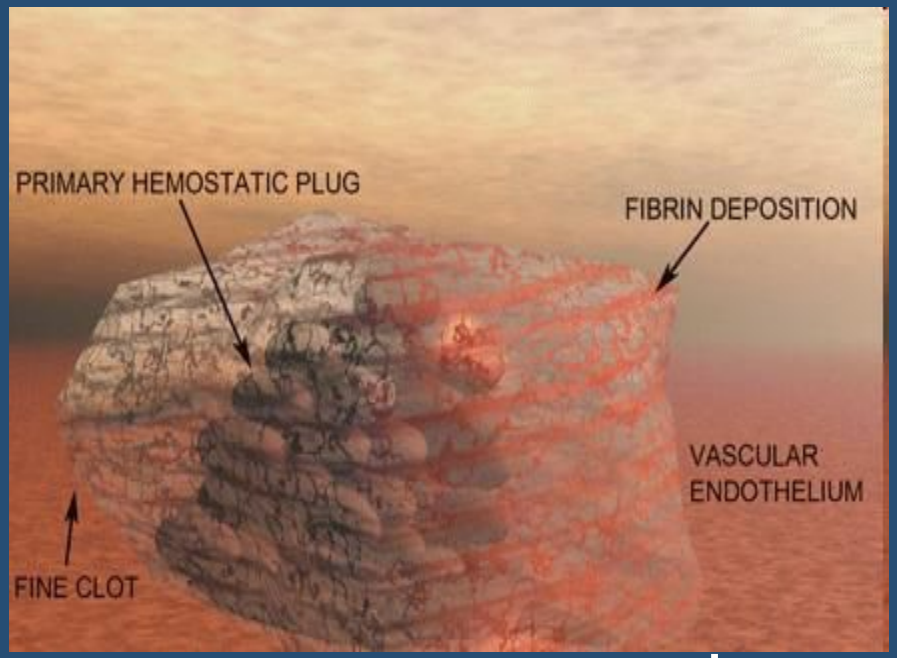




Лабораторная оценка тромбоцитарного гемостаза

- Количественное определение тромбоцитов.
- Качественная:
- ТЭГ
- Агрегация тромбоцитов («Хроно-лог». PFA-200)

Плазменный гемостаз

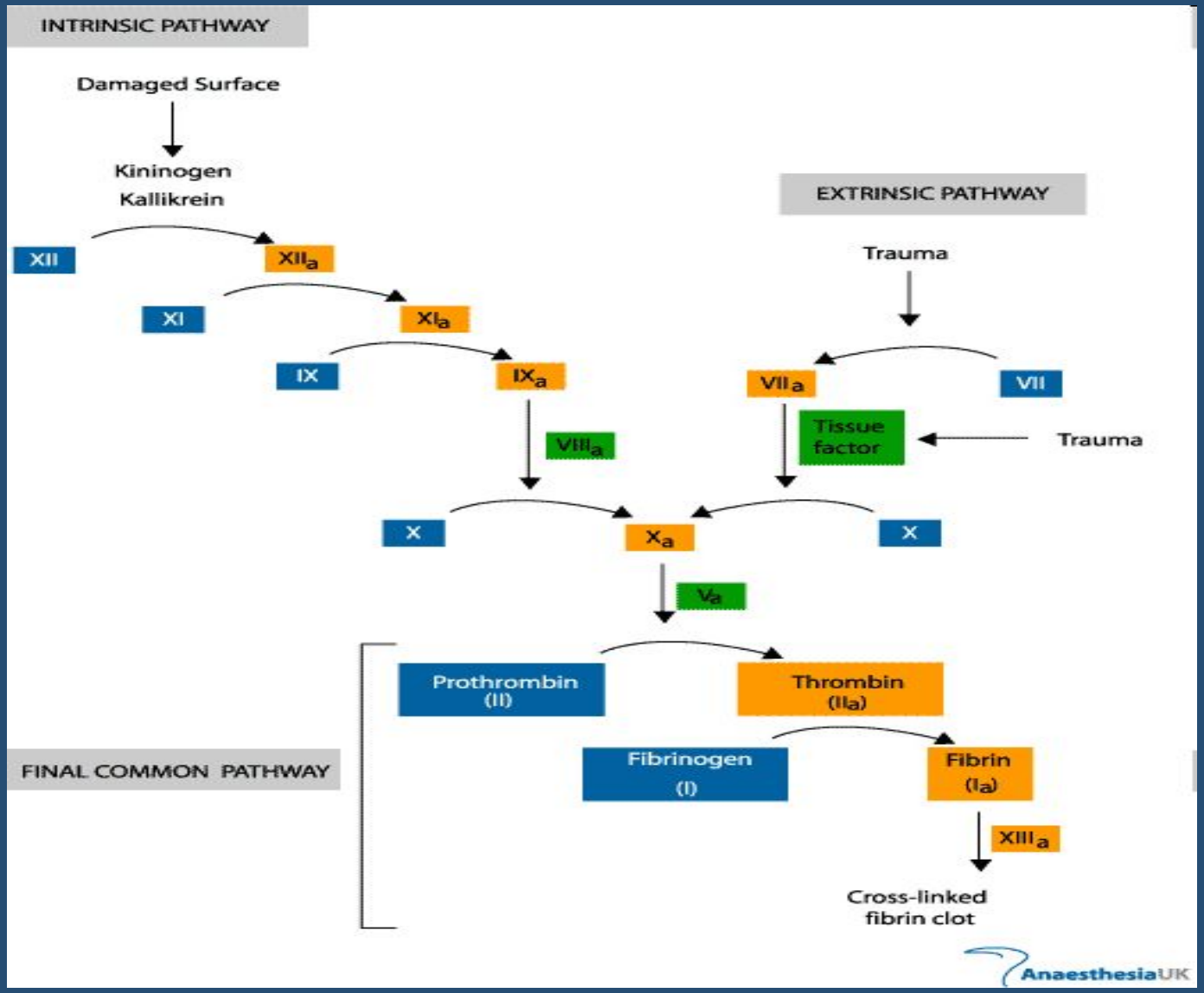


Система свертывания плазмы - ферментативная система, осуществляющая каскад протеолитических реакций, в результате которых происходит образование фибриновой пробки в месте повреждения сосуда

Развитие взглядов на реакцию свертывания крови.

- •«Классическая каскадная» теория – внешний и внутренний путь –1969 г.
- •«Современная каскадно-матричная теория» или клеточная теория –2002 г.

В классическом каскаде коагуляции выделяют 2 пути активации процесса:



- Внутренний путь необходим для формирования тромба при повреждении сосуда, не связанным с внеш. воздействием. Активация этого пути происходит при контакте коллагена базальной мембраны ЭК поврежденного сосуда с кровью + ВМК И КК, адсорбирующегося на отр. заряженной поверх. клеток вместе с XII фактором.
- Внешний – при попадании в кровоток тканевого фактора при травме.
- Внеш. и внутр. пути приводят к появлению Ха фактора к нему присоединяется Va фактор из тромбоцитов в месте повреждения и образуется (Ха+Va) протромбиназный комплекс, который в присутствии Са (из тромбоцитов) трансформирует протромбин в тромбин.

- Этот тромбин активирует VIII и V , что приводит к резкому увеличению Ха, а затем тромбина и ловинообразному увеличению свертывания.
- Финальная стадия –полимеризация фибрина , сшивание нитей между собой под воздействием XIII фактора. Образуется нерастворимый фибрин-полимер и тромб!!!

Почему была неудовлетворительна классическая теория?

Дефицит FXII (активатора внутреннего пути) не проявлялся кровотечением.

- Было показано,что:

-во-первых, что комплекс ТФ-фактор VIIa - теназа внешнего пути активирует не только фактор X, но и фактор IX.

-во-вторых, было показано, что теназа внутреннего пути - комплекс факторов VIIIa и IXa в присутствии фосфолипидов активирует фактор X со скоростью в 50-100 раз большей, чем теназа внешнего пути;

- в третьих, было показано, что фактор XI активируется не под действием фактора XIIa, как предполагалось в классической схеме реакций, а тромбином при участии гликопротеина Iba тромбоцитов

Эти данные послужили основанием для внесения существенных модификаций в схему реакций активации свертывания крови

В настоящее время более актуальна «клеточная теория гемостаза»

Hoffman M, 2001

http://atvb.ahajournals.org/cgi/reprint/26/1/41

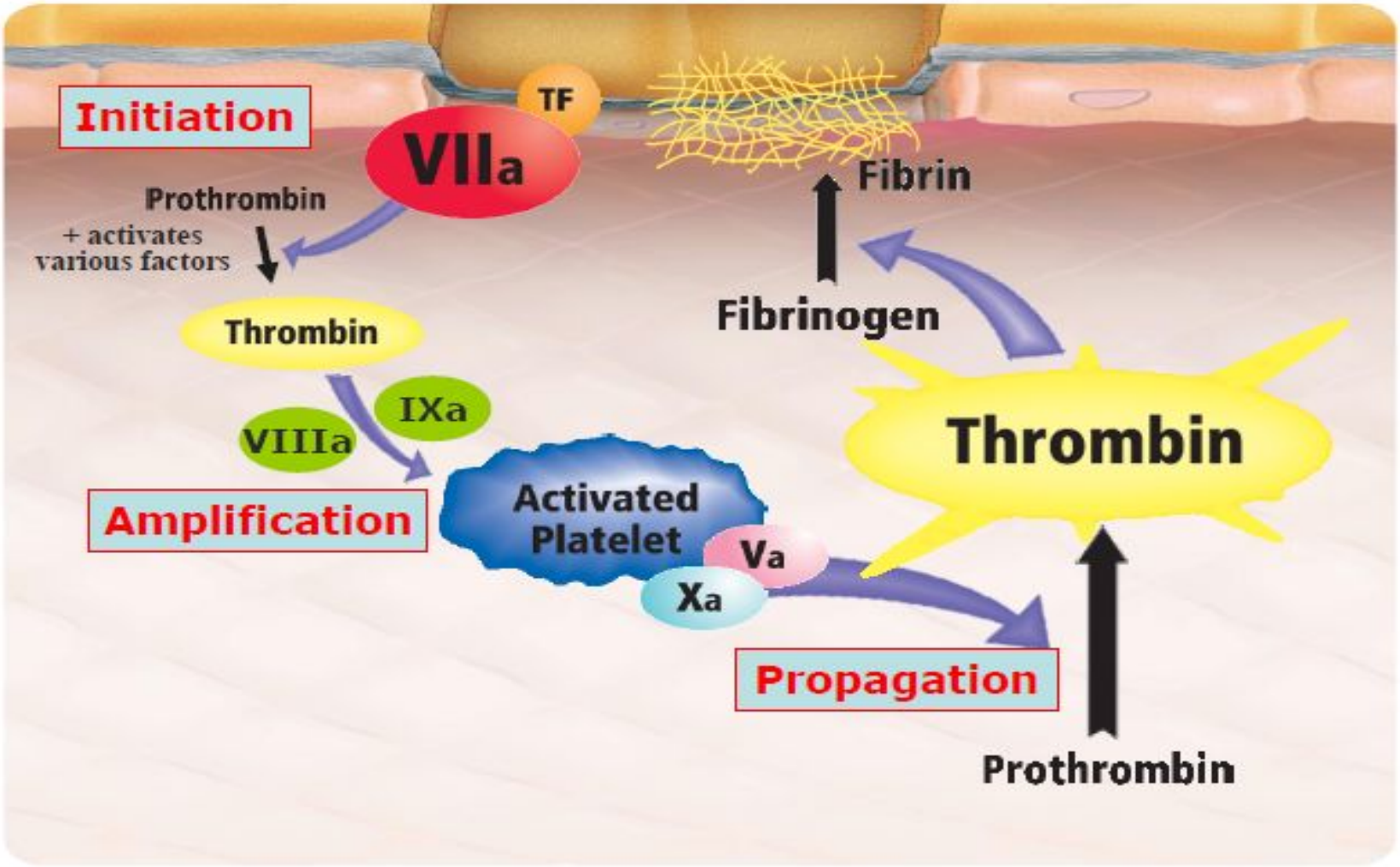
Или интегральная схема гемостаза in vivo

Современная каскадно-матричная теория свертывания крови, сформированная в последние десятилетия, учитывает реакции взаимодействия белков плазмы и тромбоцитов, компонентов сосудистой стенки и других клеток крови.

Согласно данной теории процесс коагуляции делится на 3 перекрывающихся фазы: фазу инициации, фазу усиления и распространения согласно динамике образования тромбина.

Данные последних исследований показали, что в начальном периоде активации свертывания крови тромбин образуется с относительно низкой скоростью, затем в процессе наступает перелом, и его скорость резко возрастает (тромбиновая вспышка)

thrombin generation



Hoffman M & Munroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; **85:** 958-965

Зачем нужен «тромбиновый взрыв»?

- Образование сгустка происходит в начале фазы распространения, но:

-Быстрое образование тромбина приводит к генерации более стабильного, плотного сгустка, устойчивого к фибринолизу.

Зачем нужен «тромбиновый взрыв»?

-Большие кол-ва тромбина необходимы для подавления фибринолиза (активация TAFI).

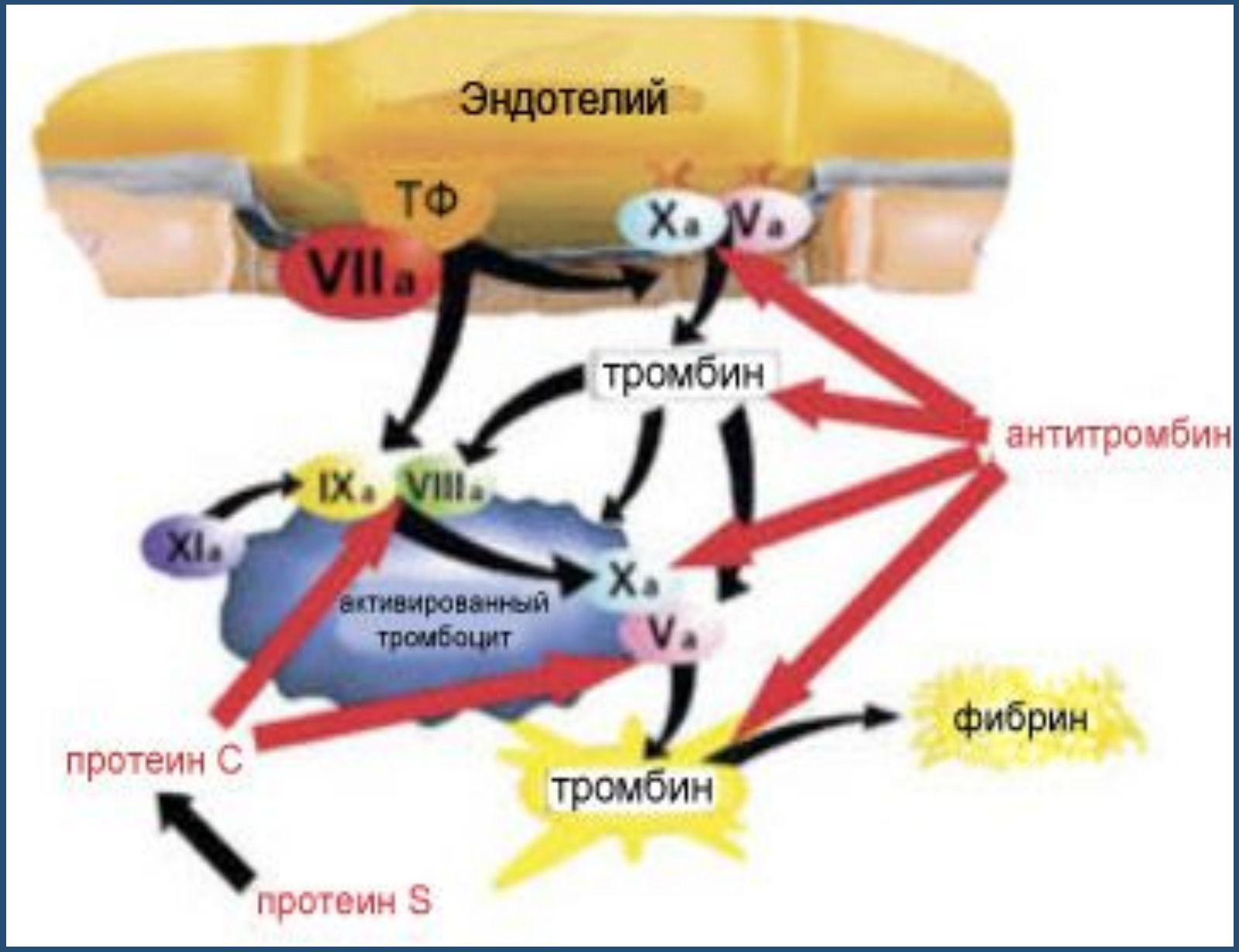
- Одновременно тромбин активирует протвосвёртывающую систему, протеинС, которые четко локализуют тромб от здоровых сосудов, мешая ему распространятся.

Клеточная теория признаѐт наличие «наружного» и «внешнего» пути, но существенно их модифицирует

Пртивосвертывающая система

- противосвертывающие белки антитромбин, кофактор гепарина II, a_2 –макроглобулин, ингибиторы a_1-протеазы и С1-комплемента, а так же протеин С (Си), протеин S, тромбомодулин и ингибитор пути тканевого фактора (TFPI).

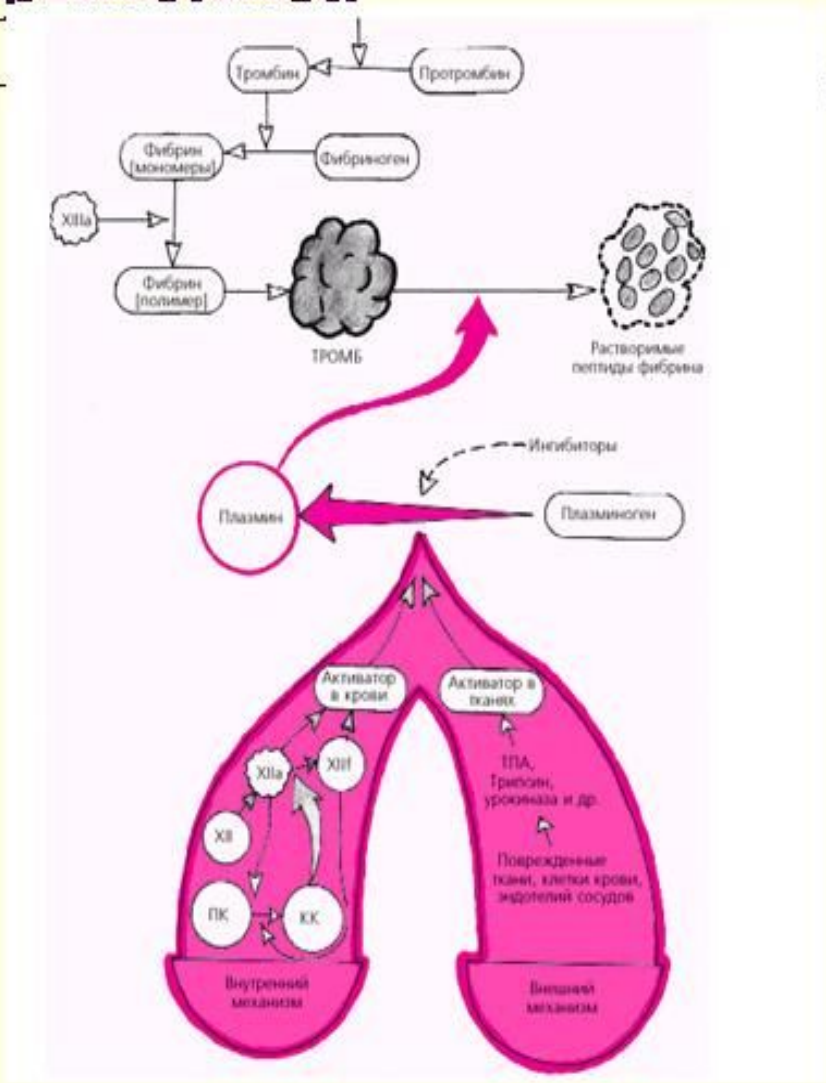
При этом протеин С, активированный комплексом тромбин-тромбомодулин, вместе с S ингибируют активированные кофакторы (Va и VIIIa), а все остальные подавляют действие самих активированных факторов. TFPI ограничивает активность фактора Xa и комплекса тканевого фактора с фактором VIIa.


Эндотелий
ТФ
VIIa
Xa
Va
тромбин
антитромбин
IXa
VIIIa
XIa
Xa
Va
активированный тромбоцит
фибрин
протеин С
тромбин
протеин S

Фибртнолитическая система

Величина тромба также зависит от фибринолитической системы крови, состоящей из плазминогена, его активаторов и ингибиторов, определяющих уровень образующегося плазмина.

Схема фибринолиза



Лабораторная диагностика нарушений гемостаза

- Преаналитический этап

Тесты исследования гемостаза (по принципу метода) делятся на:

- 1. *Клоттинговые*, или хронометрические тесты, которые позволяют определить биологическую активность исследуемых факторов гемокоагуляции. Единицей измерения, применяемой в данных методах, является время формирования фибринового сгустка.
- 2. *Амидолитические методы* с использованием хромогенных субстратов, в ходе которых анализируется время гидролиза пептидного субстрата.
- 3. Методы, которые позволяют определить концентрацию исследуемого фактора с помощью применения моноклональных антител – *иммунолоические* методы.
- Отдельно необходимо отметить *генетические* методы, которые позволяют выявить наличие мутаций генов, определяющих формирование отдельных факторов свертывания крови и других участников фибринолиза и гемокоагуляционного процесса

В зависимости от вопросов, которые ставит перед собой клиницист, тесты делятся на:

1. Есть ли патология ?

лабораторные методы, которые позволяют ответить на вопрос о состоянии свертывания крови у здорового человека, у пациента при подготовке к оперативным вмешательствам или в тех случаях, когда имеются клинические признаки нарушения гемокоагуляции. Для этого достаточно проведения так называемых **оценочных или скрининговых тестов:**

- **Количество и скрининг (PFA-200) агрегации тромбоцитов** (скрининг первичного гемостаза)
- **«Простая» коагулограмма (ПВ, АЧТВ, ТВ, Ф, РФМК)** при наличии кровоточивости и при мини-операцияз
- **«Развернутая» коагулограмма (ПВ, АЧТВ, ТВ, Ф, АнтIII, Пл, Фибринолиз, Д-димер, РФМК)** при рисках и наличии тромбозов и предстоящих обширных операциях

2. В чем причина выявленных нарушений?

для выявления причин кровоточивости:

- Время кровотечения
- Агрегация тромбоцитов (в т.ч. с ристомицином, АДФ, коллагеном и адреналином),
- Определение антигена и активности фактора Виллебранда,
- Определение активности факторов свертывания крови
- Определение ингибиторов факторов свертывания крови

для выявления причин тромботических состояний:

- Определение активности системы протеина С (Си), (протеины С, S; РАПС –мутация Лейден)
- Опеделение повышенной активности факторов свертывания.
- Генетическое тестирование на наличие мутации гена фактора V (мутация Лейден) и мутации гена протромбина G20210A;
- Определение маркеров активации свертывания и повреждения эндотелия – D-димера, антигена фактора Виллебранда;
- Определение уровня гомоцистеина в динимике
- Определение волчаночного антикоагулянта не менее 2х раз с интервалом не менее 12 недель
- Выявление антител к первому домену β2 гликопротеин 1.