Система гемостаза. Лабораторная диагностика. Основные синдромы.

Кафедра клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии КГБУЗ ИПКСЗ

г Хабаровск 2021г

Система гемостаза

- Система гемостаза – одна из защитных систем организма, обеспечивающая сохранение крови в жидком состоянии в пределах кровеносных сосудов и образования тромбов в области повреждения стенки сосудов. Включает следующие стадии:
- Локальная вазоконстрикция (сокращение сосудов в области повреждения)
- Образование тромбоцитарного тромба
- Стабилизация тромба фибрином
- Ретракция (сокращение) тромба
- Растворение тромба после восстановления повреждения стенки сосуда

Гемостаз - это функция организма, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение крови в кровеносном русле в жидком агрегатном состоянии, а с другой стороны - остановку кровотечения и предотвращение кровопотери при повреждении кровеносных сосудов. Органы и ткани, участвующие в выполнении этих функций, образуют систему гемостаза.

Составляющие систему гемостаза компоненты условно можно разделить на морфологические и функциональные.

Морфологические компоненты системы гемостаза:

- **Сосудистая стенка.**
- **Тромбоциты и клеточные элементы крови.**
- **Плазменные компоненты - белки, пептиды и небелковые медиаторы гемостаза, цитокины, гормоны.**
- **Костный мозг, печень, селезенка тоже могут рассматриваться как компоненты системы гемостаза, поскольку в них синтезируются и пулируются тромбоциты и плазменные компоненты системы гемостаза.**

Функциональные компоненты системы гемостаза:

- **Прокоагулянты.**
- **Ингибиторы коагуляции, антикоагулянты.**
- **Профибринолитики.**
- **Ингибиторы фибринолиза.**

Гемостатический баланс: за счет компенсаторного взаимодействия система гемостаза поддерживает кровь в жидком состоянии в течение всей жизни, в то же
время при повреждении кровь быстро сворачивается, купируя кровотечение. При смещении гемостатического баланса за рамки физиологических норм возникают условия для развития патологических кровотечений или тромбозов.

Основная функция системы гемостаза в условиях неповрежденных сосудов заключается в поддержании текущей крови в жидком состоянии, а в условиях поврежденных кровеносных сосудов - остановка кровотечения (образование тромба) и участие в регенерации сосудистой стенки. Кровь - важнейшая интегрирующая система, которая обеспечивает обмен метаболитами и информацией между тканями и клетками, пластическую и защитную функцию организма. Протекая по закрытому контуру, кровь контактирует со всеми органами. Общая поверхность капилляров человеческого организма составляет около 1000 кв. м. Многообразие и важность функций, огромная протяженность приводят к значительной уязвимости системы кровообращения. Гемостаз призван поддерживать жидкое агрегатное состояние крови в кровеносном русле.

Основные функции гемостаза

- Быстрая остановка кровотечения (механизмы свертывания),
- Поддержание жидкого состояния крови (противосвертывающие механизмы)

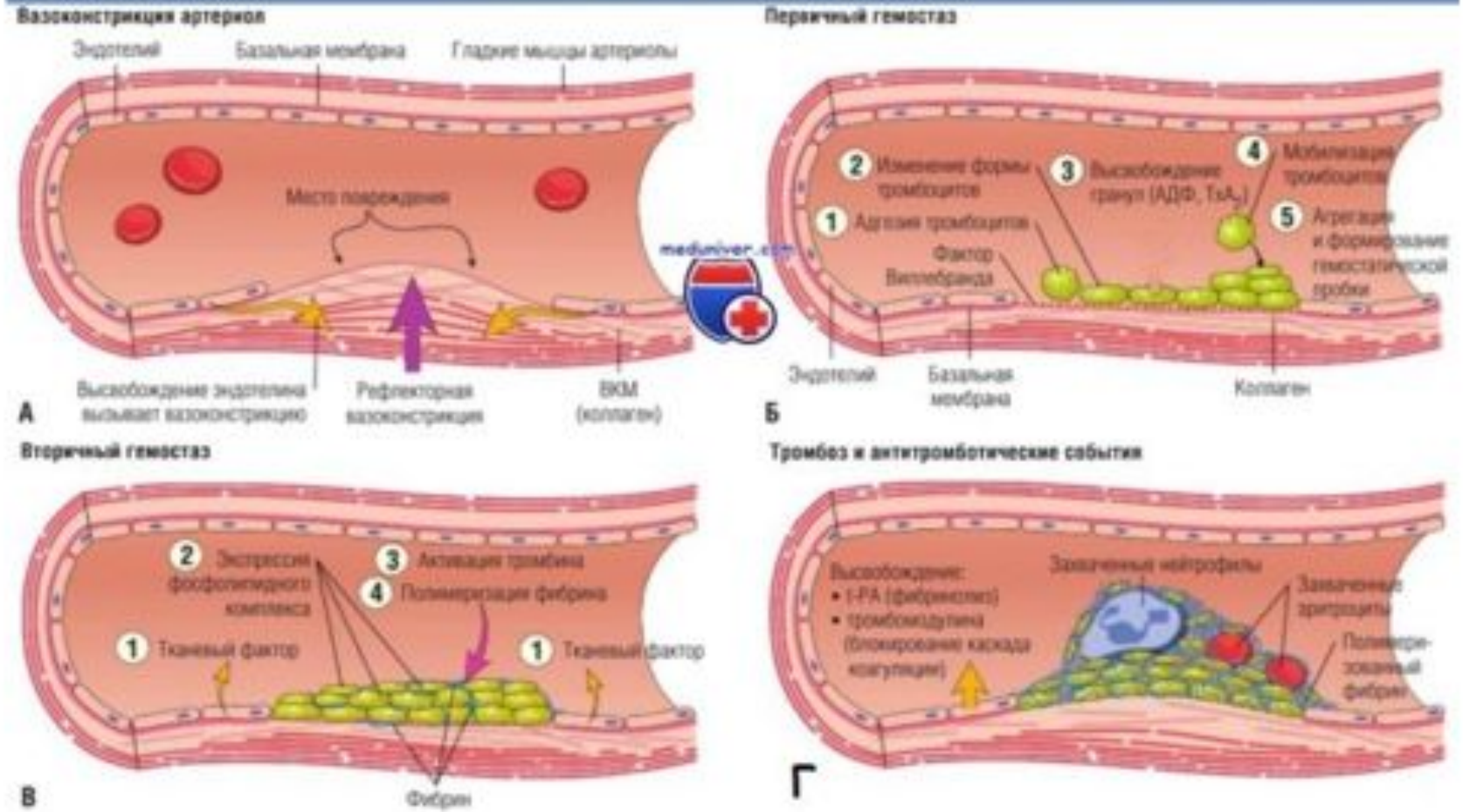
Биологическая роль системы гемостаза

обеспечение оптимальных реологических свойств крови и реализации процесса гемокоагуляции, адгезии, агрегации и активации форменных элементов крови с образованием тромба при повреждении стенок сосудов или сердца. Это предотвращает или уменьшает потерю крови
организмом.

Этапы гемостаза

1. Спазм мелких сосудов в ответ на повреждение – 20 – 30 сек (вазоконстрикция в ответ на травму) – под действием вазоконстрикторных веществ эндотелия и тромбоцитов (адреналин, норадреналин, серотонин, тромбоксаном A_2 и др.).
2. Формирование тромбоцитарной пробки и остановка кровотечений из мелких сосудов. 2 – 4 мин – адгезия и агрегация тромбоцитов, армирование нитями фибрина.
3. Внутренний механизм свертывания и внешний механизм – образование тромбина – 5 – 10 мин.
4. Конечная фаза свертывания - трансформация фибриногена в фибрин и образование фибринового сгустка

Гемостаз в норме



Компоненты системы гемостаза

- стенка сосуда (особенно эндотелий и субэндотелий),
- тромбоциты и другие клетки крови,
- факторы коагуляции и их ингибиторы,
- фибринолитические факторы и их ингибиторы,
- органические низкомолекулярные вещества (фосфолипиды, простагландины и т.д.),
- цитокины, гормоны, ионы кальция.

Функция сосудов в гемостазе:

- **Механическое ограничение кровотока.**
- **Регуляция кровотока по сосудам, в том числе спастическая реакция поврежденных сосудов.**
- **Регуляция гемостатических реакций путем синтеза и представления на поверхности эндотелия и в субэндотелиальном слое белков, пептидов и небелковых веществ, непосредственно участвующих в гемостазе.**
- **Представление на поверхности клеток рецепторов для энзиматических комплексов, вовлеченных в коагуляцию и фибринолиз.**

**Эндотелиоциты синтезируют, представляют на своей поверхности и выделяют в кровь и
субэндотелиальное пространство целый спектр биологически активных веществ. Это белки, пептиды и небелковые вещества, регулирующие гемостаз.**
Антикоагулянтные свойства эндотелия обеспечиваются несколькими механизмами.
• Интактный эндотелий не обладает прокоагулянтной активностью.
**• Эндотелий пассивно предотвращает контакт крови с субэндотелиальными структурами,
обладающими выраженными прокоагулянтными свойствами.**
• Интактный эндотелий синтезирует, выделяет в кровь или представляет на своей поверхности вещества, препятствующие коагуляции,адгезии, агрегации и спазму сосудов.
Со стороны просвета сосуда на поверхности эндотелиальных клеток сформирован слой гликокаликса. Основу гликокаликса образуют молекулы протеогликанов. Стержнем протеогликанов служит очень длинный филамент гиалуроновой кислоты. К гиалуронату с помощью контактных белков крепятся внутренние (ядерные) белки. Основными элементами протеогликанов являются цепочки глюкозаминогликанов,в частности гепарансульфата и

Гепарансульфат обладает мощным антикоагулянтным действием, являясь кофактором антитромбина. Именно гепарансульфат служит основой гепарина, когда последний получают вытяжкой из биологических тканей. Комплекс гепарансульфат-антитромбин является самым активным ингибитором свертывания. На его долю приходится около
80% антикоагулянтной активности крови.
Крайними молекулами глюкозаминогликанов,как правило, являются сиаловые кислоты, которые формируют отрицательный поверхностный заряд.
Клетки крови также имеют на поверхности сиаловые кислоты, поэтому между поверхностью сосудистой стенки и клетками крови формируются
силы электростатического отталкивания.

Способность интактного эндотелия контролировать активность тромбоцитов связана с постоянным синтезом простациклина, эктоаденозиндифосфатазы и оксида азота (NO), которые препятствуют активации, адгезии и агрегации тромбоцитов.
В эндотелиальных клетках, активированных тромбоцитах и других клетках из мембранных фосфолипидов под действием фосфолипаз освобождается арахидоновая кислота, которая в свою очередь является предшественником эйкозаноидов - кислородсодержащих производных. В эндотелиальных клетках из полиненасыщенной арахидоновой кислоты при участии специфического мультиферментного комплекса циклооксигеназы синтезируются простациклин и ряд активных простагландинов.
Антикоагулянтная активность эндотелия связана также с наличием специфического мембранного белка - тромбомодулина. На поверхности интактного эндотелия содержится значительное количество ТМ. Тромбомодулин с высокой аффинностью связывает тромбин, меняя «направленность» его действия.

В ответ на различные стимулы эндотелиоциты отвечают активацией и изменением направленности воздействия на гемостаз. Наиболее значимыми стимулами, активирующими эндотелиоциты, являются воспалительные цитокины, эндотоксины, тромбин, гистамин, гипоксия, свободные радикалы кислорода, турбулентные потоки крови, внутриклеточные инфекционные агенты, механические повреждения, иммунные комплексы и др.
У стимулированных эндотелиальных клеток появляются прокоагулянтные и провоспалительные свойства

В течение нескольких секунд после повреждения сосудистой стенки происходит сокращение поврежденного и соседних кровеносных сосудов,свободные края сосуда вокруг повреждения вворачиваются внутрь кровеносного русла, при этом
кровоток в месте повреждения частично перекрывается.
Ведущую роль в модуляции этих изменений выполняет эндотелии.
Эндотелии (ЕТ) - пептидный гормон, состоящий из 21 аминокислоты, относится к группе цитокинов
В низких концентрациях эндотелии действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение факторов релаксации, а в более высоких - активирует рецепторы на гладких мышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию.

В состав субэндотелиальной базальной мембраны входят различные типы коллагена, фибронектин, витронектин, ламинин, протеогликаны, гликозаминогликаны, тромбоспондин, фактор Виллебранда, а в местах повреждения и воспаления – фибрин.
Субэндотелий является стимулятором адгезии тромбоцитов и активации каскадной системы свертывания крови.
Прокоагулянтные свойства клеток субэндотелия (макрофагов, фибробластов, лейкоцитов и гладких мышечных клеток) обусловлены наличием
на их поверхности тканевого фактора. Тканевой фактор (ТФ) - трансмембранный белок, локализованный на клетках субэндотелия (фибробластах, макрофагах, гладких 18 мышечных клетках). Роль ТФ в процессе свертывания крови очень
велика. При связывании фактора VIIa с ТФ формируется активный комплекс, который в присутствии ионов Ca2+ активирует фактор X. По современным представлениям этот процесс является основным физиологическим путем запуска процесса свертывания крови.
ТФ обладает очень большой тромбогенной активностью.

Коллагены - наиболее распространенные белки в организме животных. Они составляют 25%от общего количества белка. Коллагены образуют нерастворимые нити (фибриллы), которые входят в состав межклеточного матрикса и соединительных тканей.

В гемостазе коллагены выполняют несколько важных функций:

Они образуют эластичный «каркас» сосуда и во многом определяют его прочность, устойчивость к нагрузкам и реологические характеристики.Типы III и VI коллагена обладают высокой прокоагулянтной активностью, связывая с высокой аффинностью фактор Виллебранда,и тем самым обеспечивают адгезию тромбоцитов. Типы I и IV коллагена непосредственно взаимодействуют с тромбоцитарным рецептором GPIa-IIa, следствием чего также является адгезия тромбоцитов. Типы I, III, IV и V коллагена активируют тромбоциты, воздействуя непосредственно на тромбоцитарные рецепторы или опосредованно через фактор Виллебранда. Это влечет за собой изменение формы тромбоцитов, их адгезию и дегрануляцию.

Тромбоцит - безъядерная сферическая клетка диаметром 2-4 мкм, средний объем 7,5 мкм3 (от 3 до 10 мкм3, или фл-фемтолитры).
Интактные тромбоциты имеют форму диска или пластины диаметром 2,8-3,4 мкм, толщиной 0,8-1,2 мкм
и объемом от 5,7 до 8,9 мкм3
Основными функциями тромбоцитов являются:
• формирование первичной тромбоцитарной пробки в зоне повреждения сосуда за счет адгезии и последующей агрегации;
• катализ гуморальных реакций гемостаза за счет:
а) предоставления фосфолипидной поверхности (фактор 3 тромбоцитов или тромбоцитарный тромбопластин), необходимой для взаимодействия большинстваплазменных белков гемостаза;
б) выброса прокоагулянтов из пулов хранения;
• ретракция сгустка крови;
• стимуляция локальной вазоконстрикции, репарации тканей, регулирование местной воспалительной реакции за счет высвобождения соответствующих медиаторов из пулов хранения тромбоцитов.
Формирование первичной тромбоцитарной пробки в зоне повреждения сосудов возникает вследствие процесса, который можно условно
разделить на 3 стадии:
• 1 - адгезия тромбоцитов к субэндотелиальным структурам;
• 2 - активация этих тромбоцитов с выбросом
медиаторов из гранул хранения;
• 3 - агрегация тромбоцитов.

В процессе адгезии важную роль играют 2 механизма.
Один из них - непосредственная адгезия тромбоцитов через рецепторы GPIa-IIa и GPVI к коллагену субэндотелия. Однако это взаимодействие недостаточно для удержания тромбоцитов в местах воздействия высоких скоростей кровотока - артериях и артериолах. Другой механизм, эффективно удерживающий тромбоцитыпри высокой скорости кровотока, включает адгезию тромбоцитов, опосредованную молекулами адгезии - фактором Виллебранда, фибронектином, витронектином, ламинином, тромбоспондином и др. In vivo оба эти механизма работают параллельно.
Основными функциями фактора Виллебранда являются:
• опосредование адгезии тромбоцитов к субэндотелиальным структурам, в первую очередьк коллагену, и последующей агрегации тромбоцитов (участие в первичном сосудистотромбоцитарном гемостазе);
• связывание свободного фактора VIII и защита его молекулы от преждевременной инактивации (участие во вторичном плазменном гемостазе).

При контакте рецепторов адгезии тромбоцитов с субстратом и под воздействием синтезированного в области повреждения сосуда тромбина начинается процесс активации тромбоцитов. Видимо, основную роль в первичной активации тромбоцитов играет сигнал с рецепторовGPIa-IIa, GPIb-V-IX и GPVI, которые контактируют со своими агонистами, в первую очередьс коллагеном, фактором Виллебранда и тромбином. Помимо коллагена, свойством активировать тромбоциты обладают и другие субэндотелиальные структуры. Реакция тромбоцита на активирующие воздействия однотипна:

• Тромбоцит меняет форму (рис. 27): у него появляются псевдоподии, он «распластывается»,
за счет открытой канальцевой системы (ОКС)увеличивается площадь его поверхности.

• Меняются соотношения различных фосфолипидов между наружным и внутренним листками клеточной мембраны. Это приводит к появлению на наружной поверхности тромбоцита большого количества кислых фосфолипидов с прокоагулянтными свойствами -фактор 3 тромбоцитов (PF3).

• На мембране тромбоцитов экспрессируются или повышают аффинность интегрины.

• Происходит секреция содержимого пулов хранения тромбоцитов во внешнюю среду.

• Тромбоциты фиксируются на поверхностях(субэндотелиальном матриксе и др.) и (или) соединяются друг с другом и другими клетками крови (происходит адгезия и агрегация).

Активация тромбоцитов может быть обратимой и необратимой.

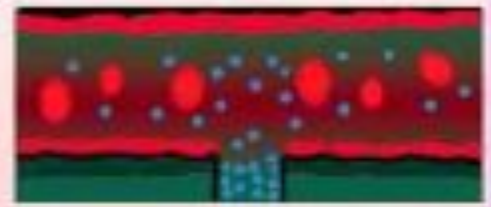
Процесс агрегации заключается в присоединении активированных тромбоцитов, находящихся в токе крови, друг к другу и ранее фиксированным в области повреждения вследствие распространения активирующего сигнала на агрегированные тромбоциты, удаленные от места повреждения, образуется толстый слой тромбоцитов, армированный фибрином.
Этот процесс лежит в основе образования тромбоцитарного тромба.

Общая схема тромбоцитарного гемостаза
Повреждение сосуда
Коллаген
АДФ
Гемолиз
Лабилизация мембраны тромбоцитов
Высвобождение Ca2+
фактор Виллебранда
АДГЕЗИЯ
Изменение формы, образование отростков, активация фосфолипазы A2
Реакция высвобождения А (адреналин, АДФ и др.)
АГРЕГАЦИЯ I
арахидоновая кислота
Тромбоксан A2
Ca2+, Mg2+ белковые плазменные кофакторы
АГРЕГАЦИЯ II
Реакция высвобождения Б (4-й фактор, β-тромбомодулин, ростовой фактор, тромбоспондин)
СГУСТОК, ТРОМБ
фибрин
фибриноген
тромбин
РЕТРАКЦИЯ
переход из одного состояния в другое
активация

ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ

Адгезия
(коллаген – vWF – ТЦ)
~ 3 сек

Агрегация
~ 10 сек

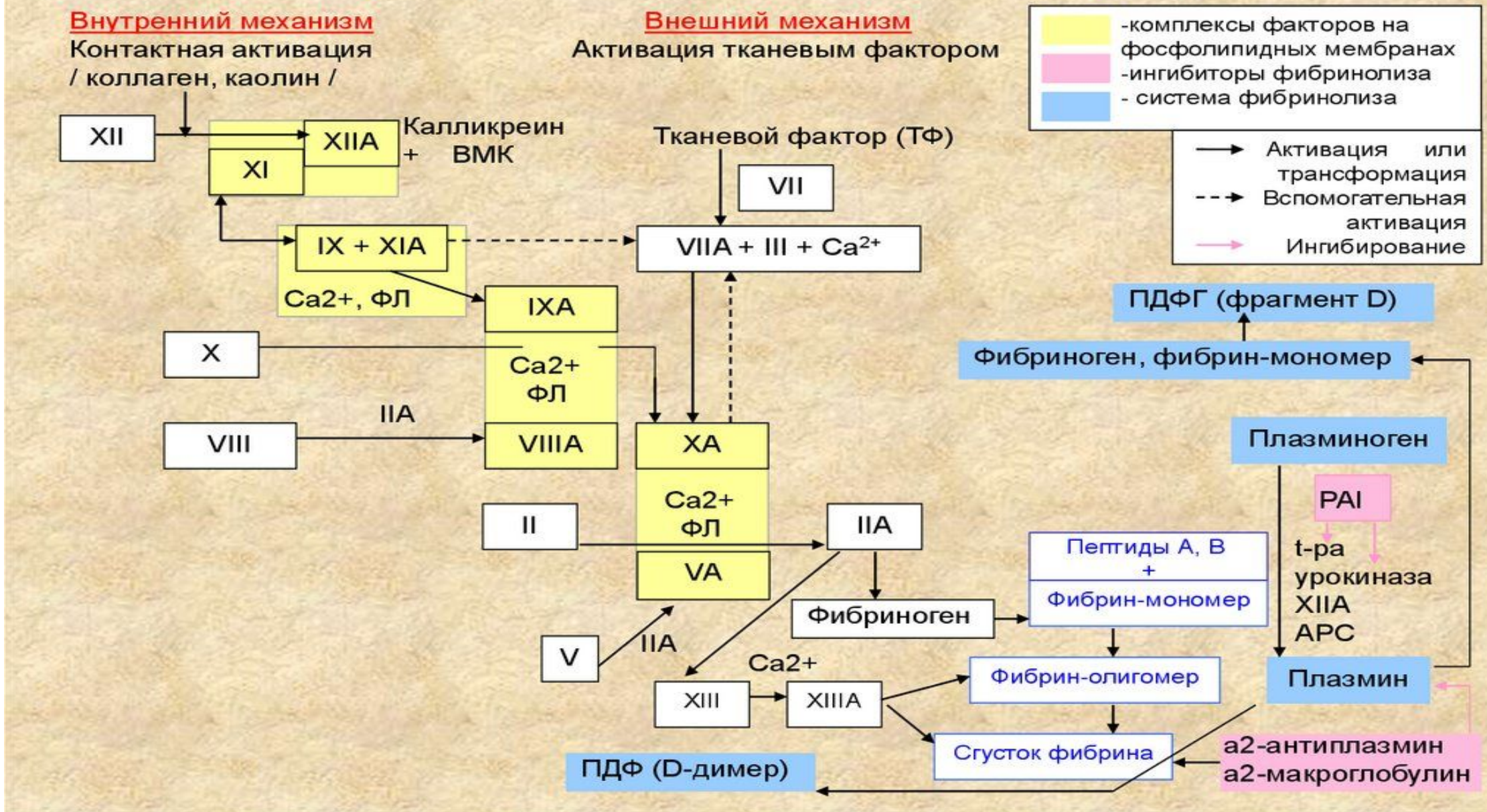


Белый ТЦ тромб
с фибрином
~ 5 мин

Система свертывания плазмы - ферментативная система, осуществляющая каскад протеолитических реакций, в результате которых происходит образование фибриновой пробки в месте повреждения сосуда. Система свертывания тесно связана с другими протеолитическими системами плазмы, в том числе с системой фибринолиза. Белки свертывания плазмы, входящие в каскад свертывания крови, принято называть термином «фактор». В соответствии с международной номенклатурой факторы свертывания плазмы обозначаются римскими цифрами. Активные формы факторов обозначаются теми же римскими цифрами, но с добавлением аббревиатуры «а».
Практически все факторы системы свертывания крови циркулируют в кровотоке в форме неактивных проэнзимов или в форме неактивных кофакторов. Исключение составляет фатор VII, примерно 1-2% которого в норме циркулируют в активной форме. При запуске свертывания крови происходит каскадная активация проэнзимов и кофакторов. Процесс активации представляет собой ограниченный протеолиз неактивных предшественников до активных энзимов и кофакторов.
Активированные энзимы являются сериновыми протеазами (за исключением фактора XIII).
Активированные кофакторы, не обладая самостоятельной ферментативной активностью, играют роль коферментов.
Сериновыми протеазами являются активированные факторы II, VII, IX, X, XI, XII, ПК.
Трансглютаминаза - фактор XIII.
Кофакторы - факторы V, VIII, ВМК.
Все белки системы свертывания крови можно разделить на две группы. Одни белки для полноценного формирования требуют наличия витамина К (витамин-К-зависимые белки), а другие – нет.

Активация протромбина – многостадийный процесс, который происходит по механизму проферментно-ферментного преобразования.
В классическом каскаде свертывания крови выделяют 2 пути активации процесса:
• Активация тканевым фактором (ТФ). Так как ТФ не относится к плазменным факторам и контактирует с кровью только при повреждении сосуда, то активация с его участием обозначается как внешний путь свертывания.
• Активация ф.XII при контакте с отрицательно заряженной поверхностью твердого тела, или контактная активация. Поскольку фактор XII в норме присутствует в плазме, активация с его участием обозначается как внутренний путь свертывания (все факторы присутствуют в плазме в норме).
Внешний и внутренний пути взаимодействуют между собой, а их разделение достаточно условно. Внешний и внутренний пути сходятся на факторе X. Последний со своим кофактором ф.Va образует
протромбиназу - ферментативный комплекс, который активирует протромбин с образованием тромбина. Образовавшийся тромбин поступает в ток крови и активирует фибриноген до фибрин-мономеров. Последние спонтанно соединяются, образуя полимеры фибрина. Условно свертывание плазмы (крови) делится на 2 основные фазы:
1) многоступенчатый этап, приводящий к активации протромбина и превращению его в активный фермент - тромбин;
2) конечный этап, в котором под влиянием тромбина из фибриногена образуется фибрин.
Конечная стадия каскада свертывания плазмы заключается в образовании из растворимого плазменного белка фибриногена нерастворимого фибрина под воздействием тромбина и ф.XIII

Схема коагуляционного гемостаза и фибринолиза



Основные белковые компоненты системы свертывания

Название	Мол. Масса (кД)	Среднее содержание в плазме (мг/л)	Время полужизни	Функция
Протромбин (II)	72	100	4-5 сут	Профермент
Ф. Стюарта (X)	56	10	3 сут	Профермент
Ф. Кристмаса (IX)	56	5	20 ч	Профермент
Проконвертин (VII)	50	0,5	5 ч	Профермент
Антигемофильн.-А(VIII)	330	0,1	10 ч	Кофактор
Проакцелерин (V)	330	10	25 ч	Кофактор
Антигемофильн.-С(XI)	160	5	3 сут	Профермент
Ф. Хагемана (XII)	80	30	3 сут	Профермент
Фибриноген (I)	340	3000	3 сут	Структ. Белок
Фибринстабилизир.(XIII)	150-320	10	12 сут	Профермент
Ф. Виллебранда	225	10		Адгезия
Тканевой Ф. (III)	37	следы		Кофактор

Внешний каскад свертывания крови. Начинается с контакта крови с тканевым фактором (ТФ), который,
взаимодействуя с ф.VIIa, образует комплекс, активирующий ф,X, Усиление активности внешнего каскада свертывания крови обеспечивается 2 механизмами положительной обратной связи
Внутренний путь активации свертывания начинается с активации контактных факторов коагуляционного каскада: ф.XII, прекалликреина и высокомолекулярного кининогена.
Внутренний каскад активации плазменного гемостаза. Начинается с взаимной активации контактных
факторов системы гемостаза, Фактор XIIa переводит фактор XI в XIa. Фактор XIa активирует фактор IX. Все последующие этапы активации свертывания по внутреннему пути требуют ионов Ca2+ и зависят от присутствия фосфолипидов. Фактор IXa активирует фактор X, но эта реакция не очень эффективная. Однако появившийся тромбин активирует фактор VIII. Активный фактор VIIIa вместе с фактором IXa, ионами Ca2+ и фосфолипидами очень эффективно активирует фактор Xa, Обратная связь поддерживает развитие процесса за счет активации тромбином ф.VIII, -IX и –V

Тромбин - ключевой фермент гемостаза.
Тромбин - витамин-К-зависимый белок - является сериновой протеазой. В печени происходит синтез неактивного предшественника протромбина, который в дальнейшем циркулирует в плазме. Важнейшие функции тромбина в гемостазе:

- **Ограниченный протеолиз фибриногена до фибрин-мономеров (происходит в жидкой фазе - кровотоке).**
- **Активация ф.V, -VIII, -VII, -XI.**
- **Активация тромбоцитов.**
- **В комплексе с тромбомодулином тромбин активирует протеин С.**
- **Активация ф.XIII.**
- **Ограниченный протеолиз плазматической карбоксипептидазы В до активной формы - активируемого тромбином ингибитора фиб ринолиза (TAFI).**
- **Стимуляция выброса из эндотелиоцитов тка невого активатора плазминогена.**

Фактор XIII - трансглютаминаза. В плазме большая часть неактивного ф.XIII связана с фибриногеном. Активация ф.XIII происходит путем ограниченного протеолиза неактивного ф.XIII тромбином одновременно с отщеплением пептида А от фибриногена. Как и большинство других ферментов, он выполняет несколько функций в гемостазе:

• Стабилизирует фибриновый сгусток путем образования ковалентных связей между γ-цепями мономеров фибрина.

• Участвует в связывании, α-ингибитора плазмина с фибрином, что способствует предотвращению преждевременного лизиса фибринового сгустка.

• Значительную роль ф.XIII играет в процессах полимеризации актина, миозина и других компонентов цитоскелета тромбоцитов, что чрезвычайно важно для активации тромбоцитов и ретракции образовавшегося фибринового сгустка. Это объясняет наличие ф.XIII в цитоплазме тромбоцитов.

• Обнаружены перекрестные реакции ф.XIII сф.V, фон Виллебранд протеином.

Помимо непосредственно реакций гемостаза,
ф.XIII участвует в процессах образования соединительной ткани, репаративных реакциях:

• Участвует в связывании молекул фибронектина между собой и с молекулами фибрина. Вероятно, это важно для направленной миг
рации клеток и процессов репарации.

• Играет роль в биосинтезе коллагена, катали
зируя образование связей между молекулами
коллагена типов I, II, III и V.

Фибриноген - уникальная молекула, обладающая свойством быстро полимеризоваться в токе крови и образовывать прочную объемную структуру, которая эффективно закрывает повреждение сосуда и предотвращает потерю крови. Концентрация фибриногена в крови здорового человека значительно выше, чем концентрация других белков гемостаза, что связано с его уникальной ролью. Синтез фибриногена происходит в печени и не зависит от витамина К. Некоторое количество
фибриногена синтезируется в мегакариоцитах и содержится в тромбоцитах. Этот фибриноген несколько отличается от фибриногена, синтезированного в печени. Помимо гепатоцитов и мегакариоцитов, активность гена γ-цепей фибриногена обнаружена
в некоторых других тканях - головном мозге, легких, костном мозге, где γ-цепи фибриногена, видимо, выступают в роли молекул адгезии.
Фибриноген - большой многокомпонентный белок, который состоит из трех пар полипептидных цепей - 2α, 2β, 2γ, связанных между собой дисульфидными мостиками и переплетенных друг относительно друга.
Процесс взаимодействия фибриногена и тромбина происходит в жидкой фазе - кровотоке.
Тромбин соединяется с фибриногеном и отщепляет конечные последовательности от α- и β-цепей - 2 ФПА и 2 ФПВ.

В дальнейшем происходит спонтанное соединение комплиментарных участков фибрин-мономеров. Сначала
образуются димеры, далее олигомеры и в конечном итоге собираются мононити полимеризованного фибрина. Таким образом, фибриновая цепь формируется спонтанной, конец в конец полимеризацией фибрин-мономеров, при которой концевая часть одного мономера взаимодействует с центральной частью другого мономера в месте отщепления ФПА. Результатом такой полимеризации является линейный полимер шириной в 2 молекулы. На этом
этапе фибрин легко растворим в 5-молярноймочевине, поэтому он получил название растворимого фибрина.
Соединяясь с фибриногеном, тромбин не только отщепляет фибринопептиды. но и активируетсвязанный с ним фактор XIII. Фактор XIIIa образует ковалентные связи между γ-цепями (D-доменами) нитей растворимого фибрина, которые соединяются за счет образования пептидных мостиков между боковыми радикалами лизина и глютамина. Сшитые между собой мононити фибрина образуют прочную сеть, менее подверженную фибринолизу и более устойчивую к механическим воздействиям. В такой форме фибрин не растворяется в 5-молярной мочевине и называется нерастворимым фибрином.
Образовавшийся фибриновый сгусток - трехмерная молекулярная сеть, в которую включены тромбоциты, эритроциты и лейкоциты.Активированные тромбоциты, связанные с нитями фибрина через рецепторы GPIIb-IIIa, сокращаются под действием тромбостенина (тромбоцитарного актомиозина) вследствие присущих им контрактильных свойств (см. главу «Тромбоциты»). Происходит ретракция сгустка крови. Сгусток уплотняется, из него выдавливается часть сыворотки.Формирование окончательного тромба наступаетна 10-15-й минуте после полимеризации фибрина.Если тромбоциты отсутствуют или имеют дефект GPIIb-IIIa, то ретракции кровяного сгустка не происходит и он быстро лизируется в процессе фибринолиза. При отсутствии ретракции
тромба в сосудистом русле возможен отрыв тромботических масс и эмболия удаленных сосудов.

Роль кальция в гемостатических реакциях

Роль кальция в гемостазе огромна. Большинство белков гемостаза имеют сайты связывания кальция. При удалении кальция из плазмы (например, при смешивании крови с цитратом натрия) активировать гемостатические реакции практически невозможно. Наиболее важные из известных функций кальция в гемостазе:

• Участие в образовании связей витамин-К-зависимых факторов (II, VII, IX, X, протеин С,протеин S) с фосфолипидной поверхностью.

• Участие в активации фактора XIII.

• Участие в образовании связи ф.VII и тканевого фактора.

• Ускорение процесса роста фибринового сгустка, участие в стабилизации фибриновогосгустка, ограничениепротеолиза фибрина и фибриногена плазмином, защита фибриногена и фибрина от температурной и щелочной денатурации.

• Стабилизация структуры многих белков гемостаза и опосредование взаимодействия между ними.

• Участие в процессах активации тромбоцитов и других клеток.

• Кальций необходим для формирования цитоскелета и возбуждения клетки. Он участвует в полимеризации актина и миозина и формировании актин-миозиновых волокон. Без него невозможны процессы изменения формы активированных клеток, их движение, секреция.

• Кальций участвует в регуляции большинства внутриклеточных процессов как внутриклеточный мессенджер (посредник).

Среди ингибиторов ферментов системы гемостаза, в свою очередь, можно условно выделить 2 группы - ингибиторы сериновых протеаз и неспецифические ингибиторы протеаз, к которым относится α2-макроглобулинАнтитромбин (синоним - антитромбин III,АТ) - гликопротеин, состоит из 432 аминокислот и
имеет 4 участка гликолизации с разным количеством сиаловых кислот. Этот ингибитор формирует стабильный 1:1 комплекс с сериновыми протеазами плазменного гемостаза. Кроме того, АТ связывается со специфическими сульфатными группами на пентасахаридных структурах гепарина.
АТ синтезируется в печени и является наиболее
значимым ингибитором системы свертывания крови
Активность АТ в десятки тысяч раз усиливается в присутствии отрицательно заряженных гликозаминогликанов, таких, как гепарансульфат, входящих в структуру гликокаликса на поверхности
эндотелиальных клеток. Аналогичное потенцирующее действие на АТ оказывает гепарин, вырабатываемый тучными клетками. Антикоагулянтное действие гепарина связано с его способностью вызывать конформационные изменения
АТ. Функция гепарина каталитическая. После образования эквимолярного 1:1 комплекса тромбинантитромбин (ТАТ) гепарин может освобождаться для организации других комплексов

С1-ингибитор (Cl-Ing) - наиболее важный ингибитор факторов контактной активацииα2-макроглобулин - гликопротеид, неспецифический ингибитор протеазОн включается в физиологическую инактивацию протеиназ после истощения других ингибиторов, обладающих высоким сродством, но относительно низкой емкостью. Он инактивирует большинство протеаз, включая ферменты системы свертывания крови и фибринолиза. Система протеина С включает непосредственно сам протеин С (ПС) и его кофактор протеин S (ITS). Другими компонентами системы являются мембранный белок тромбомодулин (ТМ), рецептор протеина С на эндотелиальных клетках(РПСЭК) и С4-связывающий протеин. Система протеина С вместе с антитромбином и ингибитором внешнего пути - наиболее важные и эффективные компоненты, очищающие плазму от активированных кофакторов плазменного гемостаза и ограничивающие процесс свертывания крови. Протеин С (ПС) - витамин-К-зависимый белок плазмы, синтезируется в печени. Активированный протеин С (АПС) является специфической сериновой протеазой, сходной по структуре с другими витамин-К-зависимыми сериновыми протеазами. Основная функция его в гемостазе -инактивация факторов Va и VIIIa. Помимо этого, он ингибирует PAI, что приводит к усилению фибринолиза.

**Протеин S (ПS) - витамин-К-зависимый белок, синтезируемый в печени. Протеин S присутствует в плазме частично в свободном состоянии,
частично в комплексе с С4-связывающим протеином (С4-СП), который доставляет протеин S на
фосфолипидную мембрану. Дефицит nS, так же как и дефицит ПС, приводит к развитию тромбозов. Тяжесть течения тромбофилии при дефиците nS также пропорциональна степени снижения его активности, а гомозиготные формы дефицита nS неизвестны. С4-связывающий протеин (С4-СП) - острофазный белок, синтезируется в печени. В плазме присутствует в виде молекулы, содержащей 7 идентичных ос-цепей и одну β-цепь . Сниженный
уровень С4-СП имеет место у новорожденных и
лиц, принимающих непрямые антикоагулянты.
Повышение С4-СП наблюдается при воспалении,
активации аутоиммунных реакций, при беременности, у женщин, принимающих стероидные
контрацептивы; при этом происходит избыточное
связывание протеина S. Дефицит свободной формы протеина S рассматривается как фактор риска тромбофилии.**

СИСТЕМА ФИБРИНОЛИЗА

В процессе формирования гемостатической пробки активизируются механизмы, направленные на ограничение роста сгустка, постепенное растворение тромба и создание условий для нормального кровообращения. Осуществляется эта функция благодаря системе фибринолиза.

Система фибринолиза - протеолитическая система плазмы крови, ответственная за лизис фибринового сгустка, а также вовлеченная в деградацию коллагена, ангиогенез, апоптоз и связанная с другими протеолитическими системами.

Центральным ферментом системы фибринолиза является плазмин, на регуляцию активации которого направлены все реакции системы фибринолиза. В рамках настоящего изложения будет рассматриваться роль компонентов системы фибринолиза в гемостазе.

Фибринолиз локализует образование фибрина в месте повреждения, сдерживает избыточное фибринообразование, препятствуя окклюзии просвета сосуда. Баланс между фибринообразованием и фибринолизом способствует сохранению окончательного тромба на весь период восстановления целостности сосудистой стенки, после чего равновесие сдвигается в сторону.

Основные звенья фибринолиза. Образование основного фермента фибринолиза плазмина происходит под влиянием факторов внутреннего или внешнего пути активации фибринолиза,
Внутренний путь начинается с активации проурокиназы.
Внешний путь определяется влиянием тканевого активатора плазминогена (t-PA).
Накопление свободного плазмина в системном кровотоке предотвращается группой острофазных белков, КК - калликреин,
ВМК - высокомолекулярный кининоген, u-PA - урокиназа, Cl-Ing - ингибитор 1-го компонента комплемента, PAI-1 - ингибитор тканевого активатора плазминогена типа 1, ПДФ -
продукты деградации фибрина

Ингибиторы фибринолиза. Практически все ингибиторы фибринолиза являются белками острой фазы. TAFI - тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза, t-PA- тканевой активатор плазминогена, Cl-Ing - ингибитор 1-го компонента комплемента, АТ - антитромбин III, PAI-1, PAI-2 - ингибиторы тканевого активатора плазминогена (тип 1 и 2), ПДФ - продукты деградации фибрина/фибриногена

Активация системы фибринолиза

ФИБРИНОЛИЗ (послефаза гемостаза)

- **Фибринолиз** – это процесс расщепления фибринового сгустка, в результате которого происходит восстановление просвета сосуда.

Изменения гемостаза при беременности

Изменения показателей системы гемостаза начинают регистрировать не раньше, чем со 2-го месяца беременности, затем изменения прогрессивно увеличиваются вплоть до родов. Скрининговые тесты ПТ, АЧТВ и показатели фибринолиза указывают на развитие гиперкоагуляции и гипофибринолиза.
Отдельные факторы гемостаза чаще всего
меняются следующим образом:

• Концентрация фибриногена и содержаниеф.VII и ф.VIII увеличиваются. Причем дляф.УП имеет место пропорциональное повышение как активности, так и содержания(VII:C и VII:Ag), тогда как ф.VIII непропорционально повышается по отношению к комплексу ф.VII- vWF.
• Имеет место некоторое повышение факторов IX, X и протромбина.
• Содержание ф.ХШ имеет тенденцию к снижению.
• Обнаруживают уменьшение свободного протеина S, что связывается с увеличением С4-связывающего белка.
• Высокочувствительными методами регистрируется повышение активационных маркеров протромбина - F1+2.
• Обнаруживается повышение агрегации тромбоцитов.

Наиболее значительным является угнетениефибринолиза во 2-м и особенно в 3-м триместре беременности. Причем количество плазминогена,эндогенных и экзогенных активаторов фибринолиза имеет тенденцию к повышению (t-PA, u-PA,ф.XII, прекалликреин и высокомолекулярныйкининоген). Угнетение же фибринолиза связанос существенным увеличением ингибиторов: ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1),который освобождается из эндотелиальных клеток, и особенно ингибитора активатора плазминогена 2-го типа (PAI-2), который нарабатывается плацентой. Ингибирование фибринолиза приберемен ности - основная причина сдвига гемостатического баланса к гиперкоагуляции и формированию предтромботического состояния.

Клинические задачи, стоящие перед клиницистом при исследовании системы гемостаза
(Вавилова Т.В., 2005)

- Выявление причин кровоточивости
- Выявление причин тромбообразования
- Оценка состояния системы гемостаза при различных видах патологии, без клинических проявлений гемостазиопатии
- Предоперационное обследование для оценки риска гемостазиологических осложнений
- Контроль антикоагулянтной терапии

Типовые формы патологии системы гемостаза.

- Усиление свёртываемости крови и тромбообразования — гиперкоагуляция и развитие тромботического синдрома.
- Уменьшение свёртываемости крови и тромбообразования — гипокоагуляция и развитие геморрагических синдромов.
- Фазное нарушение состояния системы гемостаза (ДВС-синдром): фаза гиперкоагуляции, сопровождаясь интенсивным потреблением прокоагулянтов, переходит в фазу гипокоагуляции. Развиваются коагулопатия потребления и тромбогеморрагический синдром.

Лабораторные методы, используемые в исследовании гемостаза:

- Клоттинговые: (ВСК, ПВ, АПТВ, ТВ …)
- Хромогенные: (активность ATIII, PC, PI)
- Иммунологические:(количество отдельных факторов)
- ПЦР: (ДНК-диагностика наследственных гемофилий и тромбофилий: аномалия Лейдена, гомоцистеинемия, дефицит АТ)
- Проточная цитофлуориметрия: (определение рецепторов тромбоцитов)
- Нефелометрия: (исследование функции тромбоцитов по методу Born)

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

Методы оценки тромбоцитарного звена гемостаза

- Количество тромбоцитов в крови: микроскопический метод, определение с помощью автоматических счётчиков (количество, размер, тромбокрит, показатель анизоцитоза)
- Определение резистентности сосудов: манжеточная проба, проба «щипка», показатель длительности (времени) кровотечения: по Дьюку (1910), Айви (1941) Борхгревинку-Ваалеру (1958), Шитиковой (1975), аппаратные методики.

Функциональная активность Тр: агрегация спонтанная, агрегация индуцированная (скрининговая: визуальный метод по А.С.Шитиковой 1984г – феномен «снежной бури»); гемолизат-агрегационный тест по Л.З.Баркагану; определяемая на агрегометре с различными индукторами агрегации; адгезия (на стекловолокне и др., по агрегации с ристомицином), секреции (по уровню Р-селектина); комплексная оценка методом проточной цитофлуориметрии (исследование поверхностных рецепторов, липидов и внутреннего содержимого гранул)

- Фактор Виллебранда: антиген vWF, активность, ингибитор vWF
- Ретракция кровяного сгустка
- Определение содержимого гранул Тр

Методы оценки коагуляционного звена гемостаза

- Обязательные тесты (скрининг-коагулограмма): время свёртывания по Ли-Уайту, коалиновое время или время рекальцификации (используются редко), АПТВ, протромбиновое время (индекс)-МНО, тромбиновое время, фибриноген
- Дополнительные тесты: определение факторов свёртывания крови (VIII, IX, X, V, VII, XIII), ингибитора ф VIII, либетоксовый, анцистродоновый тесты, тест с ядом эфы, волчаночный антикоагулянт, этаноловый тест
- Определение первичных антикоагулянтов: активность антитромбина III, гепарин-Ко-факторная активность, анти-Ха-активность, протеины С и S
- Оценка системы фибринолиза: спонтанный и стимулированный эуглобулиновый лизис, плазминоген, антиплазминовая активность, Д-димеры, РКФМ, продукты деградации фибрина/фибриногена.

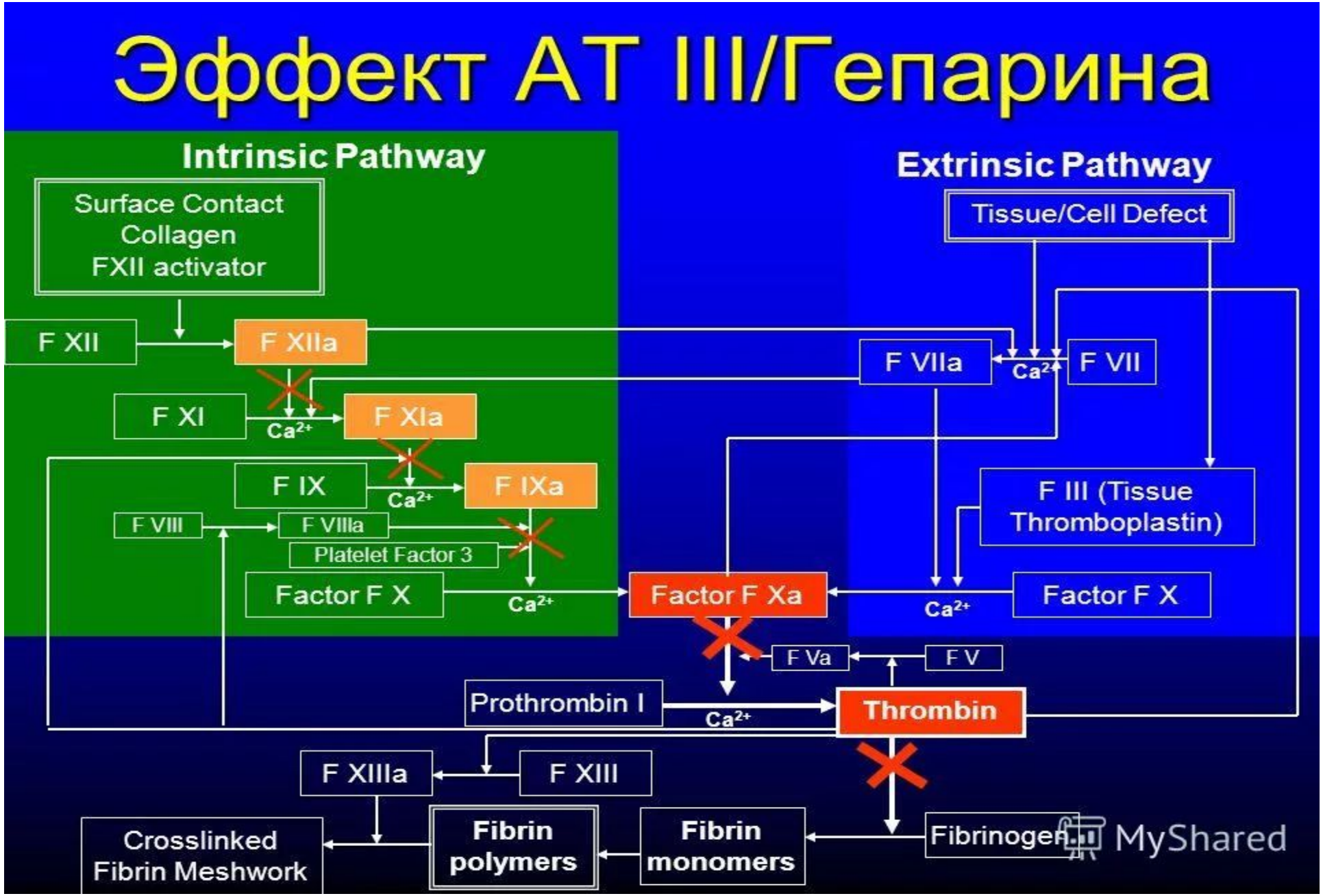
Методы исследования коагуляционного гемостаза

1. Определение времени свертывания крови – выявляет грубые нарушения при дефиците одного или нескольких факторов свертывания
2. Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) – время свертывания рекальцифицированной плазмы в условиях стандартной контактной (каолин) и фосфолипидной (кефалин) активации (N = 30 сек) – выявляет дефицит VIII, IX, XI, XI факторов при условии нормальных показателей остальных методов.

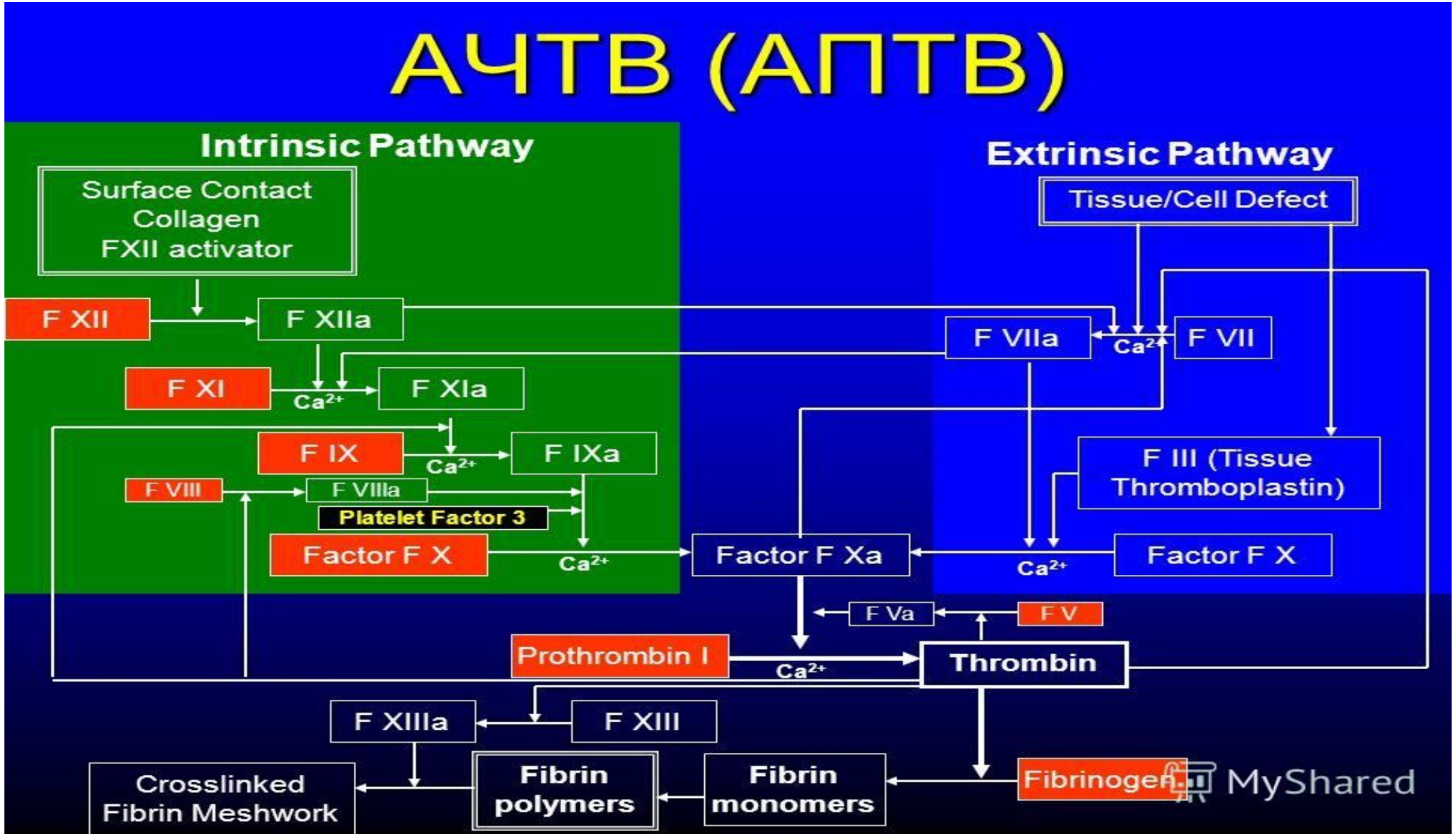
Первые два метода – оценка начального этапа внутреннего механизма коагуляции.

3. Протромбиновое (тромбопластиновое) время – активация рекальцифицированной плазмы тканевым тромбопластином известной активности – факторы VII, X, V, II – факторы протромбинового комплекса – внешний механизм.
4. Тромбиновое время – активирование плазмы стандартным тромбином – конечный этап свертывания – переход фибриногена в фибрин.
5. Определение содержания фибриногена в плазме.
6. Определение факторов свертывания.

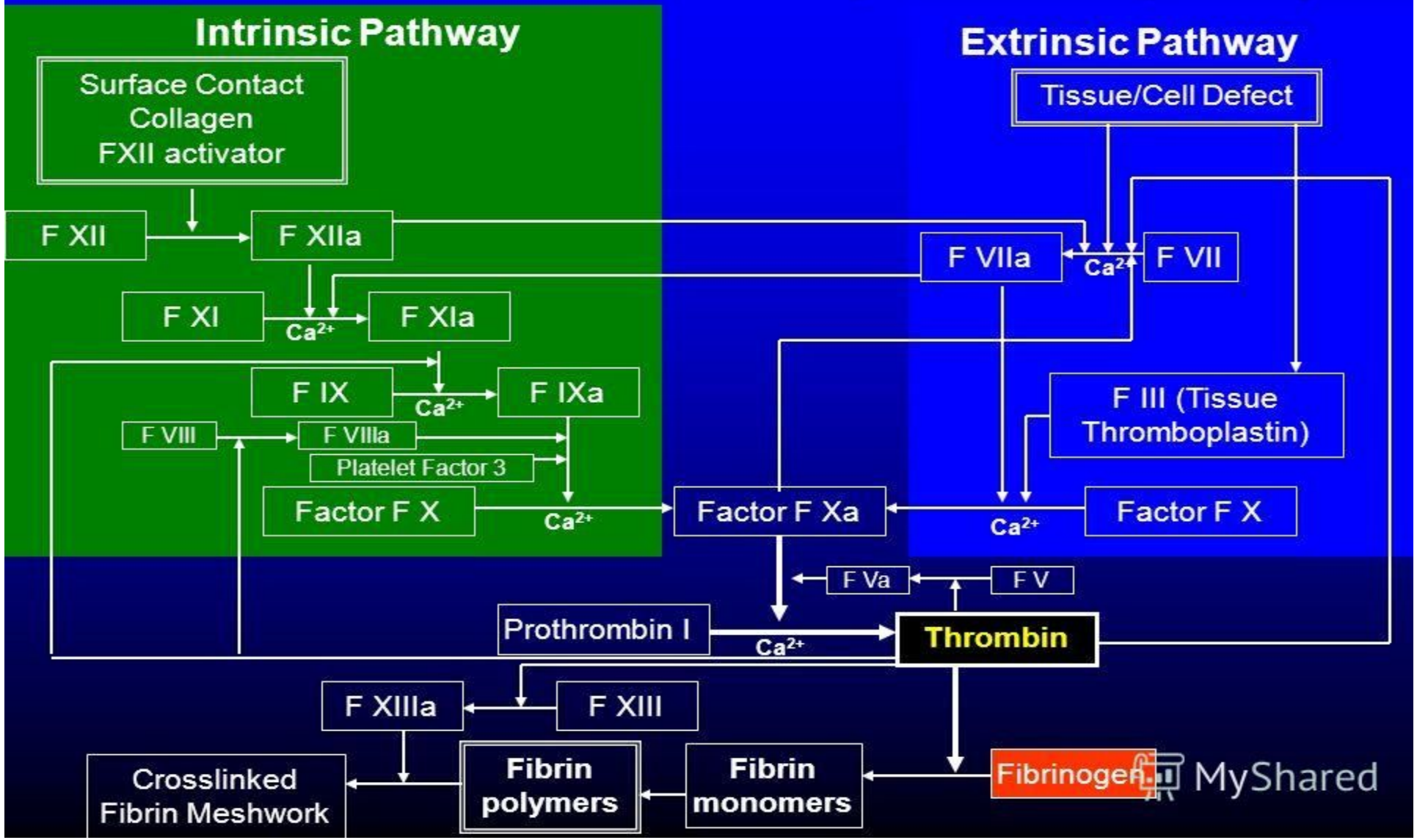
Эффект AT III/Гепарина



MyShared


АЧТВ (АПТВ)
Intrinsic Pathway
Surface Contact
Collagen
FXII activator
F XII
F XIIa
F XI
Ca2+
F XIa
F IX
Ca2+
F IXa
F VIII
F VIIIa
Platelet Factor 3
Factor F X
Ca2+
Extrinsic Pathway
Tissue/Cell Defect
F VIIa
Ca2+
F VII
F III (Tissue
Thromboplastin)
Factor F Xa
Ca2+
Factor F X
F Va
F V
Prothrombin I
Ca2+
Thrombin
F XIIIa
F XIII
Crosslinked
Fibrin Meshwork
Fibrin
polymers
Fibrin
monomers
Fibrinogen
MyShared

Тромбиновое время (ТВ)



Классификация

1. Геморрагические диатезы, обусловленные дефектом тромбоцитарного звена
— недостаточность количества тромбоцитов
— функциональная неполноценность тромбоцитов
— сочетание количественной и качественной патологии тромбоцитов
2. Геморрагические диатезы, обусловленные дефектом прокоагулянтов (гемофилии) — недостаточное их количество, необходимое для формирования фибрина
— недостаточная функциональная активность отдельных прокоагулянтов
— наличие в крови ингибиторов отдельных прокоагулянтов
3. Геморрагические диатезы, обусловленные дефектом сосудистой стенки
— врожденные
— приобретенные
4. Геморрагические диатезы, обусловленные избыточным фибринолизом
— эндогенным (первичным и вторичным)
— экзогенным
5. Геморрагические диатезы, обусловленные сочетанием нарушений различных компонентов системы гемостаза (болезнь Виллебранда, ДВС-синдром и пр.)

Тромбоцитопатии — состояния, характеризующиеся нарушением свойств тромбоцитов (адгезивного, агрегационного, коагуляционного) и, как правило, расстройствами гемостаза.
Тромбоцитопатиям (в отличие от тромбоцитопений) свойственны стабильные, длительно сохраняющиеся функциональные, биохимические и морфологические изменения в тромбоцитах. Они наблюдаются даже при нормальном количестве тромбоцитов и не исчезают при устранении тромбоцитопении (если таковая имелась).

Первичный скрининг нарушений гемостаза

Диагностическая значимость скрининговых тестов определяется тем, что нормальные результаты их позволяют исключить наличие значительных отклонений в содержании компонентов системы гемостаза, в то время, как аномальные позволяют конкретизировать направление поиска дефектного звена. Так же, скрининговые тесты используются также для контроля антикоагулянтной терапии.

Первый этап обследования системы гемостаза должен включать в себя ориентировочные тесты коагулограммы, отражающие состояние целых звеньев системы гемостаза, - скрининговые тесты: время кровотечения, количество тромбоцитов, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), концентрация фибриногена, РФМК, Д-димер.

Скрининговые тесты при кровоточивости выполняют при первичной постановке диагноза у больного с геморрагическим синдромом, в основном для диагностики врожденных коагулопатий. Определяют количество тромбоцитов, анализируют мазок периферической крови, определяют время кровотечения, АЧТВ, ПВ, АТ-III, фибриноген, РФМК, Д-димер.

Скрининговые тесты при тромбообразовании выполняют при венозном тромбозе любой локализации. Определяют количество тромбоцитов, АЧТВ, ПВ, фибриноген, РФМК, Д-димер, скрининговый тест на волчаночный антикоагулянт.

Обследование больных с повышенной кровоточивостью, как и больных с клиникой тромбозов, следует начинать с анамнестических данных (сопутствующие заболевания, прием препаратов, приводящих к изменению свойств тромбоцитов), клинического осмотра (состояние кожи, слизистых и других органов и систем), скрининговых методов лабораторной диагностики.

Время кровотечения - это время от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови. Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов и их взаимодействие с сосудистой стенкой. Этот скрининговый метод позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного генеза, болезнь Виллебранда и нарушение проагрегантных свойств сосудистой стенки. У этого метода есть серьезные недостатки:

- метод плохо стандартизируется;
- низкая чувствительность;
- низкая специфичность не позволяет однозначно интерпретировать результаты метода;
- не соответствует современным санитарно-эпидемиологическим требованиям

Норма - 2-4 мин от начала и до полной остановки кровотечения.

Укорочение времени кровотечения свидетельствует о гиперагрегации тромбоцитов.

Удлинение времени кровотечения до 10 мин и более говорит о патологии тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза.

Удлинение времени кровотечения часто сочетается со снижением количества тромбоцитов - тромбоцитопенией.

При нормальном числе тромбоцитов удлинение времени кровотечения является характерным признаком:

- тромбоцитопатий врожденного или приобретенного генеза, болезни Виллебранда с дефицитом ф. Виллебранда;
- терапии нестероидными противовоспалительными препаратами (аспирин), гепаринами, непрямыми оральными антикоагулянтами;
- ДВС-синдрома (II фаза гипокоагуляции);
- синдрома массивных гемотрансфузий, на фоне инфузионной терапии.

Количество тромбоцитов в крови в норме составляет 180-320 тыс/мкл.

Уменьшение числа тромбоцитов ниже 150 тыс/мкл носит название тромбоцитопении, дифференциальная диагностика должна быть направлена на исключение у больного:

- побочного действие лекарственных препаратов (антиагреганты, антикоагулянты, инфузионно-трансфузионная терапия, химиотерапия, лучевая терапия, гемодиализ);
- определение способность тромбоцитов к адгезии и агрегации с различными стимуляторами (АДФ, коллаген, ристомицин, адреналин);
- определить активность фактора Виллебранда и плазменных факторов;
- исключить повышенное разрушение тромбоцитов при гиперспленизме;
- исключить потери тромбоцитов в случаях значительной кровопотери;
- исключить острую вирусную инфекцию.

Повышенное количество тромбоцитов в крови (более 350 тыс/мкл) носит название тромбоцитоз - первичный (тромбоцитемия и другие миелопролиферативные заболевания) или вторичный (реактивный) тром-боцитоз. Первым этапом диагностики (анамнестическими, клиническими и лабораторными данными) необходимо исключить наиболее частые причины тромбоцитоза: инфекционные, воспалительные, тромботические и гематологические (в основном дефицит железа) причины.

При подозрении на тромбоцитопатию необходимо определить способность тромбоцитов к адгезии и агрегации с различными стимуляторами (АДФ, коллаген, ристомицин, адреналин), определение активности фактора Виллебранда, активности плазменных факторов (факто-ра VIII) и, возможно, другие методы исследования.

АЧТВ тест является одним из самых информативных скрининговых тестов, используется для оценки внутреннего звена свертывания плазмы крови. Тест чувствителен к дефициту всех факторов свертывания (кроме ф. VII), к гепарину (диагностика антикоагулянтного действия гепаринов), к специфическим ингибиторам (антитела к факторам VIII и IX) и к неспецифическим ингибиторам (волчаночный антикоагулянт). Норма АЧТВ – 27 – 35 с.
Укорочение АЧТВ свидетельствует об активации внутреннего звена гемостаза (гиперкоагуляции), наблюдается при гиперкоагуляционном синдроме, ДВС-синдроме (фаза гиперкоагуляции).
Удлинение АЧТВ свидетельствует о:

- дефиците ф. VIII (гемофилия А), ф. IX (гемофилия В), ф. XI, ф. XII - при нормальных результатах ПВ;
- дефиците ф. II, ф. V и ф. X при одновременном удлинении АЧТВ и ПВ;
- ДВС-синдроме (фаза гипокоагуляции);
- дефиците ф. Виллебранда, при клинике кровоточивости необходимо дополнительное исследование способности тромбоцитов к адгезии и агрегации с различными стимуляторами (АДФ, коллаген, ристомицин, адреналин), определение активности ф. Виллебранда, ф. VIII;
- наличие волчаночного антикоагулянта (ВА) при клинике тромбозов или подозрении на тромбофилию;
- гепаринотерапии. Обычно наблюдается выраженное удлинение АЧТВ;
- прием оральных непрямых антикоагулянтов. Обычно наблюдается умеренное удлинение АЧТВ с выраженным удлинением ПВ.

Протромбиновое время (ПВ) - этот тест является одним из основных базовых тестов, используемых в повседневной клинической практике. Тест ПВ используют для выявления нарушений активности факторов внешнего пути свертывания - определяет активность факторов протромбинового комплекса: ф.II, ф. VII ф. X, ф. V; для оценки функции печени, а также для контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия. Норма ПВ – 12-20 с. Укорочение ПВ свидетельствует об активации внешнего звена гемостаза (гиперкоагуляции) при гиперкоагуляционном синдроме, ДВС-синдроме.

Удлинение ПВ свидетельствует о возможном дефиците факторов внешнего звена гемостаза:

- дефиците или аномалии факторов протромбинового комплекса (VII, II, X) в случаях приема оральных непрямых антикоагулянтов, дефиците ф. V;
- гепаринотерапии;
- заболеваниях печени, желчного пузыря;
- ДВС-синдроме (фаза гипокоагуляции).

Тромбиновое время (ТВ) - характеризует конечный этап процесса свертывания: превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина. На него влияет концентрация фибриногена в плазме и наличие продуктов деградации фибрина.
Норма ТВ - 14 - 18 с.
Укорочение ТВ свидетельствует о возможной активации системы гемостаза гиперкоагуляции:
- гиперкоагуляционном синдроме, ДВС-синдроме (гиперкоагуляционная фаза), гиперфибриногенемии.
Удлинение ТВ свидетельствует о:

- гепаринотерапии. Обычно наблюдаются умеренное удлинение ПВ с одновременным выраженным удлинением АЧТВ;
- активации фибриполитической системы крови при ДВС-синдроме, тромболитической терапии, заболеваниях печени, поджелудочной. В этом случае обычно наблюдается повышение ПДФ и Д-димера в крови;
- гипофибриногенемии - если уровень фибриногена в крови ниже 1,0 г/л.
- наличием ингибиторов тромбина и фибриногена.

Фибриноген - количественный анализ фибриногена по методу Клаусса - является базовым тестом исследования гемостаза.
Норма фибриногена в плазме крови составляет 2.0-4,0 г/л.
Проводится при гиперфибриногенемиях, связанных с тяжестью воспалительных, иммунных, деструктивных процессов, с риском развития артериальных тромбозов и инфарктов органов.
Снижение концентрации фибриногена наблюдается при остром ДВС-синдроме, при лечении фибринолитиками, при врожденных гипо- и дисфибриногенемиях.
Повышение уровня фибриногена свидетельствует о возможном развитии инфекционных, воспалительных или аутоиммунных процессов.
Снижение уровня фибриногена в крови характерно для гипофибриногенемии при развитии острого ДВС-синдрома.

РФМК - растворимые фибрин-мономерные комплексы, которые образуются в процессе деградации молекул фибриногена/фибрина под действием тромбина и плазмина.
Норма РФМК - менее 4 мг/100мл.
РФМК - это один из ранних маркеров тромбинемии - активации внутрисосудистого свертывания крови.
Повышение РФМК характерно при развитии гиперкоагуляционного синдрома, ДВС-синдрома, аутоиммунных заболеваний.

Д-димеры - специфические продукты деградации фибрина. Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием плазмина и некоторых неспецифических фибринолитиков.
С помощью анализа Д-димера в крови можно оценить, как происходит процесс образования и распада фибрина - тромбообразование и фибринолиз. Исследование этого показателя применяется при диагностике тромботических состояний, тромбозе глубоких вен, легочной эмболии, ДВС-синдроме и при осложнениях беременности.
Повышенный Д-димер характерен для массивных поражений тканей, обширных гематом, хирургических вмешательств, беременности (к концу срока уровень Д-димера в 3-4 раза превышает норму), у лиц старше 80 лет.
Д-димер может быть признаком серьезных заболеваний:

- тромбоз глубоких вен
- ДВС-синдром
- легочная тромбоэмболия
- инфекционные заболевания, сепсис
- онкологические заболевания
- болезни печени
- ишемическая болезнь сердца (в том числе и инфаркт миокарда), сердечная ндостаточность.

Норма Д-димера: <248 нг/мл
Д-димеры долго циркулируют в крови, время их полувыведения со-ставляет более 24 ч, повышение D-димеров может наблюдаться в течение нескольких недель после острого тромбоза. На содержание D-димеров влияют такие факторы, как величина тромба, время от начала клинических проявлений до назначения антикоагулянтной терапии, прием антикоагулянтов, на фоне которых уровень D-димеров постоянно снижается. Поэтому более важной для исключения диагноза тромбоза является отрицательная диагностическая значимость теста.

Уточняющее обследование

В зависимости от результатов скрининговых тестов или клинических показаний может оказаться необходимым исследование отдельных компонентов.

Применяемые методы могут быть разделены на функциональные, основанные на определении специфической активности компонента, и иммунологические, в которых измеряется концентрация антигена.

Уточняющее обследование включает в себя диагностические тесты:

- агрегация тромбоцитов с различными индукторами (АДФ, коллаген, ристомицин), активность ф. Виллебранда, исследование вязкости крови;
- факторы свертывания ф. VIII (диагностика гемофилии А и тромбофилий), ф. IX (диагностика гемофилии В и тромбофилий), ф.XIII, резистентность фактора Va к действию протеина С (диагностика ф. V Лейден);
- XIIa-зависимый фибринолиз (определение фибринолитической активности плазмы), плазминоген, РФМК, ПДФ, Д-димер;
- физиологические антикоагулянты - антитромбин III, протеин С, протеин S;
- определение анти-Ха активности гепарина;
- определение волчаночного антикоагулянта (антифосфолипидный синдром);

Нарушение системы гемостаза

(по направленности изменений)

ГИПОКОАГУЛЯЦИЯ

- - снижение способности крови сворачиваться с появлением склонности к повторным кровотечениям и кровоизлияниям (спонтанным или после незначительных травм)
- 1. ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ
- 2. ТРОМБОЦИТОПАТИЯ
- 3. ВАЗОПАТИЯ
- 4. КОАГУЛОПАТИЯ

ГИПЕРКОАГУЛЯЦИЯ

- повышенная способность крови образовывать сгустки в сосудах

1. ТРОМБОЗ
2. ДВС-СИНДРОМ

Лабораторная оценка гемостаза при склонности к тромбозам (USA)

РАПС (aPCR) *	+ мутация Лейден G1691A (ПЦР)
Люпус-антикоагулянт	LA-АЧТВ, dRVVT, микс-тесты
Антитела к кардиолипину *	IgM / IgG
Антитромбин III	Хромогенный метод, антиген АТ III
Гомоцистеин (натощак) *	Биохимический метод / ИФА
Активность ф. VIII	Клоттинговый / хромогенный метод
Активность протеина С	Хромогенный метод, антиген ПрС
Активность протеина S	Общий и свободный ПрS (антиген)
Мутация гена протромбина G20210A *	ПЦР-метод

* - *селективный профиль тестов при эпизоде тромбоза, приеме АК во время исследования или в последние* ***10-14 дней***

MAYO Laboratories, 2009

Coagulaton Testing. Quick Guide to Coagulation Testing. Marques, MB; Fritsma, GA. AACC Press, 2006. -62p.

MyShared

При склонности к кровоточивости можно:

1. **Провести глобальный тест гемостаза** –
   ВСК / ВАС, тромбоэластография, тромбодинамика
   - экспресс-исследование
2. **Оценить тромбоцитарное звено гемостаза**
   (время кровотечения, количество и агрегация ТЦ)
3. **Оценить коагуляционное звено гемостаза**
   (АЧТВ, ПВ / ПО / МНО, фибриноген / ТВ, отдельные факторы, антикоагулянты, фибринолиз…)

MyShared

Лабораторная оценка гемостаза при кровоточивости (USA)

Внутр. путь гемостаза	**АЧТВ**
Внешний путь гемостаза	**ПВ / ПО / МНО**
Фибринообразование	**Фибриноген**, **ТВ** или рептилазное время
Активность факторов	**ф.II + V + VII или X** (на базе ПВ), **ф.VIII + IX + XI или XII** (на базе АЧТВ), **ф.XIII**
ингибиторы факторов	**Микс-тесты** ПВ / АЧТВ (с инкубацией), **люпус-антикоагулянт**, **ингибиторы ф.VIII / IX**
болезнь Виллебранда	Активность **ф.VIII, vWF:RCo, vWF:Ag**, кривая ответа на ристоцетин, мультимеры vWF
Функция тромбоцитов	**Агрегация ТЦ** с АДФ, адреналином, тромбином, коллагеном, арахидонатом, ристоцетином
Фибринолиз	**Лизис эуглобулинов, PAI-1**
ДВС	**D-димер** (колич.), **АЧТВ, ПВ, фибриноген**

MyShared

MAYO Laboratories, 2009

Контроль за лечением антиагрегантами

Ингибиторы ЦОГ-1 *(аспирин, кардиомагнил, тромбо АСС)*
Блокаторы АДФ-рецепторов *(клопидогрель, тиклопидин)*
Ингибиторы фосфодиэстеразы *тромбоцитов (дипиридамол)*
Блокаторы тромбоцитарных рецепторов IIb/IIIa *(абциксимаб)*

В большинстве случаев лабораторного тестирования не требуется.

Эффективность препаратов:

- **Агрегация ТЦ** с арахидонатом / АДФ / TRAP / адреналином *на оптических / импедансных агрегометрах, включая POC-тесты на аппаратах VerifyNow, Multiplate…*
- Тест **PlateletMapping** *на тромбоэластографе*

MyShared

Лабораторный контроль гепаринотерапии

Гепарин связывается с БОФ, PF4, макрофагами и др., и его действующая концентрация может снижаться

Эффективность гепарина (НФГ в терапевтических дозах):

1. **АЧТВ** (↑ в 1,5-2,5 раза от нормы), **ТВ**
2. **АСТ / ВАС** (*point-of-care*), **ВСК**

Дополнительные тесты, риск осложнений:

3. **Динамика уровня D-димера** / РФМК в плазме
4. **Количество тромбоцитов** - опасность HIT ! (+ уровень анти-PF4)
5. AT III (не менее 70% !)

Прямые ингибиторы тромбина (Лепирудин, Аргатробан; перор. – Дабигатран / Прадакса) – оценка не требуется,
при ОПН / ХПН, ОПечН, тромбозе / кровотеч-и - **ТВ** с разведением, экариновое время, анти-ф.IIa-активность с калибровкой по Прадаксе

Прямые ингибиторы Ха (Фондапаринукс, перор. – Ривароксабан / Ксарелто) – оценка не требуется (либо динамика D-димера)

MyShared

По Lawson JH, et al. Semin Hematol. 2004;41(suppl):55-64.

Исследование системы гемостаза

- определение причин кровоточивости;
- распознавание причин склонности к тромбофилии;
- отбор больных группы риска для профилактики кровотечений и тромбоэмболий в послеоперационном (послеродовом) периоде;
- диагностика ДВС-синдрома при неотложных и критических состояниях;
- контроль за лечением антикоагулянтами, антиагрегантами, фибринолитиками и препаратами заместительной терапии компонентами крови;
- решение проблем привычного невынашивания беременности при АФС, тромбофилиях

Методы исследования коагуляционного гемостаза

Тромбиновое время (ТВ)

- *Принцип:* **определяют время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы стандартным количеством тромбина.**
- *Нормальные величины* : в плазме в норме 28-32 сек
- *Клиническое значение :*

  Это время, необходимое для образования сгустка фибрина в плазме при добавлении к ней тромбина. Оно зависит только от **концентрации фибриногена** и активности **ингибиторов тромбина** (антитромбин III, гепарин, парапротеины). Используется для оценки как третьей фазы свертывания крови - образования фибрина, так и состояния естественных и патологических антикоагулянтов.

- В клинике используется для:
  - контроля за гепаринотерапией (особенно при использовании гепарина с высоким молекулярным весом);
  - контроля за фибринолитической терапией;
  - диагностики гиперфибринолитических состояний;
  - диагностики афибриногенемии и дисфибриногенемии.

Методы исследования коагуляционного гемостаза

Тромбиновое время (ТВ) удлиняется при:

- наследственных и приобретенных а- и гипофибриногенемиях (тяжелые поражения печени, фибринолиз, острый ДВС-синдром), при парапротеинемиях; повышенном содержании в плазме ПДФ.
- при лечении гепарином и фибринолитиками

Тромбиновое время (ТВ) укорачивается при:

- Гиперфибриногенемии (фибриноген 6,0 г/л и выше)
- Гиперкоагуляционной фазе острого и подострого ДВС-синдрома

Методы исследования коагуляционного гемостаза

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ,АПТВ, каолин – кефалиновое время)

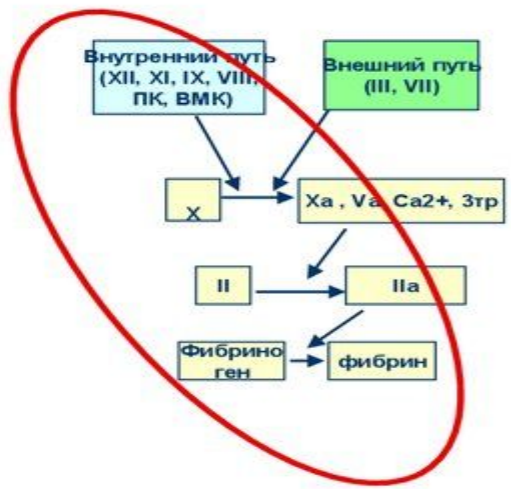
- *Принцип*: определяют время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы при добавлении оптимального количества кальция в условиях стандартной контактной (каолином) и фосфолипидной (эритрофосфатид – заменяет ф.3 тромбоцитов) активации процесса свертывания
- *Нормальные величины*: 27-35 сек.
- *Клиническое значение* :

АЧТВ позволяет измерить внутренние факторы свертывания крови (XII, XI, IX, VIII, ПК, ВМК) и факторы общего пути (X, V, II, I).

АЧТВ возрастает при:

- дефиците факторов внутреннего пути (XII,ПК, ВМК, XI, IX и VIII);
- дефиците факторов общего пути (X, V, II, I).
- наличии ингибиторов свертывания

При увеличении АЧТВ свыше 60 с и при нормальном количестве фибриногена проводят коррекционно-ингибиторные пробы (микст-тест), которые позволяют выявить дефицит факторов свертывания или наличие ингибитора



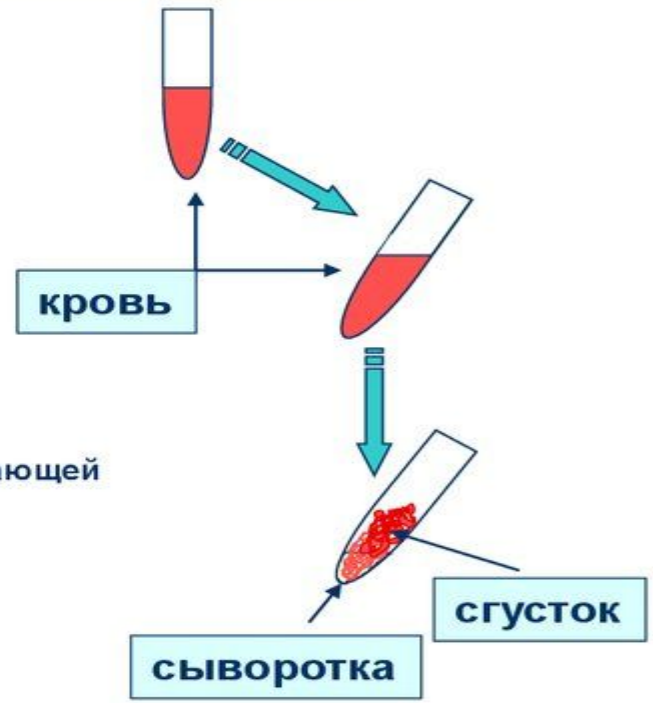
Методы исследования коагуляционного гемостаза

Время свертывания цельной крови (по Ли-Уайт)

- *Принцип*: определяют время свертывания цельной нестабилизированной венозной крови.
- *Нормальные величины*: 5-10 мин.
- *Клиническое значение :*
  Характеризует состояние системы гемостаза в целом.

Укорочение ВСЦК (гиперкоагуляция) возникает при
- активации свертывающей системы
- дефиците антикоагулянтов в организме
- снижении активности фибринолиза

Удлинение ВСЦК возникает при
- врожденном и приобретенном дефиците факторов свертывающей системы
- избытке антикоагулянтов (лечение антикоагулянтами)
- выраженной активации фибринолитической системы



Методы исследования тромбоцитарного компонента гемостаза:

- **Длительность кровотечения** при стандартном проколе кожи - методы Duke, Ivy, Шитиковой
- **Подсчет количества тромбоцитов в крови.**
- **Тромбоцитарная формула (изучение размеров, формы, структуры тромбоцитов).**
- **Исследование агрегации тромбоцитов (без добавления индукторов или с добавлением индукторов агрегации – АДФ, адреналин, коллаген, тромбин, ристомицин и др.)**
- **Определение ретракции кровяного сгустка.**

Тесты ПВ и АЧТВ при кровоточивости

↑ **ПВ** (↓ % по Квику < 60-70%, ПТИ < 0,8; МНО > 1,2-1,5)

↑ **АЧТВ, ИАЧТВ > 1,2** ***Не было ли гемодилюции ???***

АЧТВ	*ПВ (ПО, МНО)*	*Наиболее частая патология*	
		врожденная	*приобретенная*
↑	**Норма**	**Дефицит ф.VIII, IX, XI**	**Ингибитор ф.VIII** **Волчаночный антикоагулянт** (*кровоточивости нет*)
Норма	↑	**Дефицит ф. VII**	**Гиповитаминоз К** (дефицит только ф.VII)
↑	↑	**Глубокий дефицит фибриногена (<1 г/л)** **Дисфибриногенемии** **Дефицит ф.II, ф.V, ф.X**	**ДВС крови** **Массивные трансфузии** **Тяжелая патология печени** **Недост-ть факторов** (амилоидоз)
Норма	**Норма**	**Умеренная недостаточность факторов** **Болезнь Виллебранда** (умеренной степени) **Недостаточность ф.XIII**	**Тромбоцитопения** **Качественные нарушения ТЦ** **Приобретенная б-нь Виллебранда**

MyShared

Мониторинг антикоагулянтной терапии (USA)

Варфарин	**ПВ** (в виде **МНО**)
Нефракционированный гепарин	**АЧТВ** **Анти-Ха** активность (хромогенный метод)
Низкомолекулярный гепарин	**Анти-Ха** активность (хромогенный метод) или не требуется
Прямые ингибиторы тромбина (Лепирудин, Аргатробан; пероральные – Агабатран)	**АЧТВ**
Прямые ингибиторы Ха (Фондапаринукс, пероральные – Ривароксабан)	Не требуется, или **АЧТВ**
Антитромбоцитарные препараты (аспирин, клопидогрель, тиклопидин…)	Не требуется, или 11-dТХA_2, или АДФ-агрегация ТЦ

Coagulaton Testing. Quick Guide to Coagulation Testing. Marques, MB; Fritsma, GA. AACC Press, 2006. -62p.

Тесты ПВ и АЧТВ при кровоточивости

↑ **ПВ** (↓ % по Квику < 60-70%, ПТИ < 0,8; МНО > 1,2-1,5)

↑ **АЧТВ, ИАЧТВ > 1,2** ***Не было ли гемодилюции ???***

АЧТВ	*ПВ (ПО, МНО)*	*Наиболее частая патология*	
		врожденная	*приобретенная*
↑	**Норма**	**Дефицит ф.VIII, IX, XI**	**Ингибитор ф.VIII** **Волчаночный антикоагулянт** (*кровоточивости нет*)
Норма	↑	**Дефицит ф. VII**	**Гиповитаминоз К** (дефицит только ф.VII)
↑	↑	**Глубокий дефицит фибриногена (<1 г/л)** **Дисфибриногенемии** **Дефицит ф.II, ф.V, ф.X**	**ДВС крови** **Массивные трансфузии** **Тяжелая патология печени** **Недост-ть факторов** (амилоидоз)
Норма	**Норма**	**Умеренная недоста-точность факторов** **Болезнь Виллебранда** (умеренной степени) **Недостаточность ф.XIII**	**Тромбоцитопения** **Качественные нарушения ТЦ** **Приобретенная б-нь Виллебранда**

Алгоритм лабораторного исследования при тромбоцитопении

Harrison's Manual of Medicine: 17th ed., 2008

Преаналитический этап исследования гемостаза

- Исследование ТЦ гемостаза: за день до сдачи крови **избегать стрессов**, **физических нагрузок**, смены режима дня, изменений в питании, приема **алкоголя**.
- **Максимально аккуратная венепункция,** жгут – не более 1 мин !
- **Стараться не брать кровь из внутривенного катетера !**
- **Взятую кровь в закрытой пробирке как можно быстрее обработать для получения плазмы** (1 ч; для ПВ – до 24 ч).
- **Плазму хранить при комнатной t°** до 4 ч, иначе – заморозить.
- **Учесть действие вводимых лекарств (гепарина);** после инфузии выждать не менее 1 ч (если возможно).

Недобор крови → избыток цитрата, замедление свертывания

MyShared

Взятие крови

Существенное значение имеет, на какой крови выполняется тот или иной тест: на цельной, стабилизированной капиллярной или на плазме венозной крови.

Капиллярная кровь

Капиллярная кровь как диагностический материал имеет ограниченное значение. Определение ПВ в капиллярной крови используется в основном для контроля за приемом непрямых антикоагулянтов в амбулаторных и домашних условиях, а также для экспресс-диагностики у детей первых месяцев жизни.

До настоящего времени венозная кровь - основной источник материала для анализа состояния гемостаза. Взятие венозной крови - критическая процедура для тестов на коагулограмм. Важным моментом является длительность наложения манжеты. Во время венопункции длительность венозного стаза рекомендуется не более 1 мин, а сила сжатия - ниже на 10 мм Hg диастолического давления крови.

Кровь рекомендуется брать:

- **«бабочкообразной» иглой в градуированную силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку, содержащую антикоагулянт;**
- **в градуированный пластиковый шприц, содержащий антикоагулянт;**
- **в моноветт - коммерческая аспирационная система (градуированный шприц), содержащая антикоагулянт;**
- **в вакутейнер - коммерческая система (пробирка с определенным отрицательным давлением для взятия точного объема крови), содержащая антикоагулянт;**
- **в специальные пробирки для транспортировки крови для исследования гемостаза. Например, пробирка СТАД содержит цитрат натрия (0,105 М), теофиллин, аденозин и дипиридамол. Три последних вещества предотвращают активацию тромбоцитов.**

Влияние различных факторов преаналитического этапа на результаты коагулологических исследований

Положение тела **влияет на состав крови, число клеток, состав белков и белково-связывающих макромолекул, особенно выраженные изменения наблюдаются у пациентов с отеками. Уровень этих показателей всегда выше в положении стоя, так как при этом часть жидкости из сосудистого ложа переходит в окружающие ткани. При переходе из стоячего положения в сидячее, а особенно в положение лежа, жидкость быстро возвращается в сосуды («разведение крови»), этот эффект в большей степени выражен у пациентов с отеками. У здоровых людей через 8 ч лежания в постели концентрация фибриногена и активность антитромбина в крови примерно на 20% ниже, чем после 1 ч в положении стоя.**

Влияние физической нагрузки и эмоционального стресса

Физическая нагрузка и эмоциональные переживания сопровождаются изменениями плазменного гемостаза, фибринолиза и функции тромбоцитов. После серии приседаний содержание в

плазме фактора Виллебранда (vWF:Ag) увеличивается до 50%о, у спортсменов после бега на 10 км

содержание ф.VIII повышается на 60%, vWF -примерно в 3 раза, что приводит к укорочению АЧТВ. Активация фибринолиза после физической нагрузки связана с повышением в плазме тканевого активатора плазминогена (t-PA). Аналогичные изменения наблюдаются у пациентов, перенесших эмоциональный стресс.

Влияние пищи на показатели гемостаза

Практика показывает, что исследование гемостаза необязательно проводить натощак. Легкий завтрак без жира даже показан перед взятием крови на исследование гемостаза.

Характер пищи после длительного периода голодания оказывает влияние на показатели плазменного гемостаза и фибринолиза.

Жирное мясо уменьшает фибринолитическую активность, в то же время бесхолестериновая диета способствует повышению фибринолитической активности крови.

Фрукты и зеленые овощи в большом количестве способствуют активации фибринолиза в основном за счет уменьшения ингибитора активатора плазминогена (PAI-1).

Рыбная диета в течение нескольких недель сопровождается уменьшением количества и агрегации тромбоцитов, а также снижением фибринолиза. Уменьшение агрегации тромбоцитов объясняется увеличением в их мембране полиненасыщенных жирных кислот, которыми богата рыба и морепродукты.

Витамин С, витамин Е, лук и чеснок могут вызвать нарушения агрегации тромбоцитов.

Витамин К в организме человека частично синтезируется микрофлорой кишечника, частично поступает с пищевыми продуктами. Несмотря на то что при применении per os антибиотиковширокого спектра могут возникнуть кровотечения из-за недостатка витамин-К-зависимых факторов, тем не менее для организма важен и пищевой витамин К. Витамин К в больших концентрациях содержится в овощах (шпинате, кабачках),
злаках и печени.

Алкоголь влияет на показатели системы гемостаза в зависимости от дозы. После приема алкоголя наблюдается уменьшение антитромбина и фибриногена, повышение ингибитора активатора плазминогена и уменьшение времени кровотечения. Хронический алкоголизм сопровождается уменьшением количества тромбоцитов и нарушением их агрегации, которые однако достаточно быстро восстанавливаются после выхода из запоя. Курение приводит к увеличению агрегации тромбоцитов и их адгезии, повышению β-тромбоглобулина, t-PA, активности PAI-1 и фибриногена, снижению ф.VII.
Кокаин в большой дозе может вызвать настолько сильную активацию и агрегацию тромбоцитов, что это перерастает в тяжелую тромбоцитопению и ДВС-синдром.

Интерферирующие лекарственные препараты

Оральные контрацептивы повышают активность большинства факторов плазменного гемостаза, увеличивают агрегацию тромбоцитов и снижают уровень протеина С и протеина S. Как правило, сами оральные контрацептивы не вызывают клинических проявлений патологии гемостаза, но они резко увеличивают вероятность тромбозов при наличии наследственных или приобретенных риск-факторов тромбофилий.

Валъпроиковая кислота (используется в препаратах для лечения эпилепсии) может вызвать тромбоцитопению, уменьшение уровня фибриногена, состояние, имитирующее болезнь Виллебранда II типа.

Аспарагиназа (препарат для лечения лимфобластных лейкозов) может приводить к снижению фибриногена, уменьшению антитромбина, протеинов С и S, витамин-К-зависимых факторов, снижению плазминогена.

Антибиотики широкого спектра действия могут привести к различным отклонениям в показателях гемостаза. Принимаемые внутрь антибиотики вызывают дефицит витамина К в организме за счет подавления активности бактериальной микрофлоры. После назначения высокой дозы пенициллина наблюдалась тромбоцитопения, нарушения функций тромбоцитов, удлинение тромбинового времени.

Анальгетики (нестероидные противовоспалительные, антиревматоидные, жаропонижающие препараты), содержащие ацетилсалициловую кислоту, влияют на функцию тромбоцитов. Необратимое ингибирование циклооксигеназы вызывает подавление, вплоть до полного отсутствия, адгезии тромбоцитов. Другие анальгетики (индометацин, фенилбутазон, диклофенак) подавляют агрегацию тромбоцитов в меньшей степени, чем аспирин.

Материалом для коагулологических исследований является плазма .
Трехзамещенный цитрат натрия обладает специфической способностью стабилизировать лабильные факторы свертывания (V и VIII). Цитратная плазма, обогащенная тромбоцитами, используется для изучения их агрегации. В связи с этим цитрат натрия является антикоагулянтом выбора для коагулологических исследований. В соответствии с рекомендацией ВОЗ концентрация цитрата должна быть 109 ммоль.
Кровь смешивают с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Кровь в пробирке необходимо тщательно перемешать, перевертывая пробирку, при этом не допускается образования пены. Нельзя трясти пробу, так как это может вызвать денатурацию белков и активацию тромбоцитов.
Стабилизированную кровь до центрифугирования (в том числе и в процессе транспортировки) хранят
при комнатной температуре (+18... +25 °С). Центрифугирование для получения плазмы должно проводиться при ускорении 1500-2000 g в течение 10 минут, при этом получается плазма, «бедная» тромбоцитами. Если пробы необходимо заморозить перед проведением теста, то после размораживания рекомендуется повторно отцентрифугировать пробу и работать с супернатантом. Это делается для удаления остатков разрушенных тромбоцитов, фосфолипидов и белков их мембран, которые могут влиять на некоторые коагуляционные тесты.

Проверка исследуемых образцов перед выполнением тестов

Проверка образцов крови или плазмы перед проведением коагуляционных тестов позволяет избежать многих ошибок, связанных с преаналитическими погрешностями.

Неправильное соотношение кровь/цитрат можно определить, если объем крови в пробирке меньше или больше, чем требуемый. При малом объеме крови будет зарегистрировано ложное удлинение коагуляционных тестов.

Пробы с видимыми сгустками фибрина. В зависимости от степени свертывания коагуляционные тесты могут быть укорочены, нормальны или удлинены.

Гемолиз может произойти при хранении неотцентрифугированной крови или после центрифугирования. В таких тестах результаты варьируют в зависимости от степени гемолиза. Если гемолиз присущ in vivo, что подтверждается взятием нового образца, то тесты могут выполняться для оценки гемостатической ситуации. Если гемолиз произошел после взятия крови, то такие образцы следует отбросить, чтобы не получить ложных результатов.

Тесты для оценки сосудистого и тромбоцитарного компонентов гемостаза.
Время кровотечения - это время от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови. Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов и взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой. Время кровотечения не выявляет всех тромбоцитарных нарушений (такого метода вообще не существует), этот скрининговый тест позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного генеза, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки. После выявления патологии нет необходимости повторять
это исследование, нужно использовать более чувствительные и специфичные методы. У этого метода есть серьезные недостатки: Метод плохо стандартизуется. Результаты теста позволяют лишь предположить наличие тех или иных нарушений. Низкая чувствительность. Отсутствие удлинения времени кровотечения не всегда позволяет исключить нарушения тромбоцитарного или сосудистого звеньев гемостаза.
Низкая специфичность не позволяет однозначно интерпретировать результаты метода.
Однако это наиболее доступный метод для выявления нарушений взаимодействия тромбоцитов с сосудистой стенкой. Кроме того, это дешевый метод, позволяющий заподозрить нарушения соответствующего звена гемостаза и решить вопрос о необходимости дальнейших углубленных исследований.

Новым подходом в лабораторной диагностике является имитирование тромбоцитарного гемостаза на приборе PFA-100® (фирма «Dade Behring»,Германия). В PFA-100 в измерительном картридже цитратная кровь пропускается через капилляр диаметром 150 мкм, моделирующий микрососуд,покрытый пленкой из коллагена/адреналина или коллагена/АДФ. Это сопровождается образованием тромбоцитарной пробки, что оценивается по перфузионному давлению. Остановка перфузии фиксируется как «время окклюзии сосуда». Метод позволяет эффективно с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять дефицит фактора Виллебранда, функциональные нарушения тромбоцитов, вызванные аспирином, наследственные и приобретенные нарушения адгезии и агрегации тромбоцитов. С применением 2 агонистов (индукторов агрегации) возможно селективное выделение аспириновых тромбоцитопатий. По типу измерения PFA-100 является динамическим агрегометром.

Тромбоцитарные показатели

Число тромбоцитов (Platelets, PL, PLT) При подсчете на автоматических анализаторах тромбоциты распознаются по размерам в диапазоне 2-20 фл. Автоматические счетчики позволяют получать достаточно надежные результаты по количеству тромбоцитов. При подсчете тромбоцитов в камере Горяева коэффициент вариации составляет 7-15%, тогда как автоматический подсчет воспроизводится с точностью
до 2-4%. Современные анализаторы сигнализируют (флагирование на бланке) о выходе количества тромбоцитов за референтные пределы, наличии агрегатов тромбоцитов, макротромбоцитов или других элементов, сравнимых по объему с тромбоцитами (микроэритроциты).
Ложное занижение числа тромбоцитов может быть при их агрегации, агглютинации под действием тромбоцитарных агглютининов и при прилипании тромбоцитов к лейкоцитам (тромбоцитарный «сателлитизм»). При подсчете на гематологических анализаторах в качестве антикоагулянта используется ЭДТА. При наличии аутоантител к тромбоцитам калиевая соль ЭДТА инициирует агрегацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией.

Средний объем тромбоцита (MPV) У здоровых людей MPV равен 6-12 фл и находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов. Такое соотношение определяет постоянство тромбоцитарной массы в циркулирующей крови.MPV увеличивается с возрастом; отмечено, что у мужчин MPV несколько выше, чем у женщин. Использование ЭДТА в качестве антикоагулянта вызывает изменение формы тромбоцитов от
диска к сфере, что приводит к увеличению MPV на 10-12% в течение 2 часов, а затем показатель существенно не меняется.

Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (PDW)

PDW - показатель, являющийся мерой гетерогенности размеров (анизоцитоза) тромбоцитов. Величина PDW в среднем составляет 10-15%.

Как артефакт, ложнозавышенное увеличение PDW может быть связано с присутствием микроцитов, шизоцитов, микроагрегатов тромбоцитов,фрагментов цитоплазмы лейкоцитов.

Этот показатель находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов и их периода жизни. В каждом конкретном случае важна не только величина PDW, но и ее динамика во времени, а также связь с другими тромбоцитарными показателями. Так, увеличение PDW с одновременным снижением MPV свидетельствует о преобладании микротромбоцитов среди общей популяции тромбоцитов (указывает на угнетение тромбоцитопоэза), а сочетание повышенного PDW с увеличением MPV отражает нарастание числа макротромбоцитов (усиление продукции тромбоцитов).

Одновременное присутствие фракций макротромбоцитов и микротромбоцитов ведет к увеличению PDW, но MPV может оставаться в пределах нормы. В современных гематологических анализаторах отдельными показателями указывается процентное содержание микротромбоцитов (MicroPLT) и макротромбоцитов (MacroPLT).

PDW может применяться для дифференциальной диагностики. Так, увеличение PDW свыше 10,5% было обнаружено у 50% больных эссенциальной тромбоцитемией, у 21% пациентов с реактивным тромбоцитозом и лишь у 14% здоровых людей.

Тромбоцитокрит (PCT).

PCT - показатель, характеризующий процент тромбоцитарной массы в объеме крови. У здорового человека показатель стремится остаться стабильным: при уменьшении числа тромбоцитов усиливается тромбопоэз, в циркулирующую кровь выбрасывается большее число молодых макротромбоцитов, что ведет к увеличению MPV. При увеличении количества циркулирующих тромбоцитов снижается продукция их в костном мозге, тем самым уменьшается процент макротромбоцитов и MPV уменьшается. Однако при нарушении этого равновесия происходит или уменьшение PCT, что в конечном счете приводит к патологии первичного гемостаза и риску возникновения кровотечений, или повышение PCT, увеличивающее активность тромбоцитов и их способность к агрегации. Это повышает риск тромбозов.

Нормальные значения PCT варьируют в пределах 0,15-0,35%. Было обнаружено, что снижение PCT менее 0,1% обусловило возникновение послеоперационных кровотечений у пациентов с развившейся тромбоцитопенией. Также было отмечено, что этот показатель оказался более чувствительным для оценки риска возникновения кровотечения, чем число тромбоцитов.

Агрегация тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов исследуют на агрегометре с использованием индукторов агрегации.
Требования к пробам критичны. Исследование агрегации проводят на плазме, богатой тромбоцитами (ПБТ, английская аббревиатура PRP).
Желательно использовать ПБТ, содержащую примерно 200 клеток/нл. Это требование затрудняет оценку агрегации тромбоцитов при тромбоцитопении.
Пробы помещаются в кювету агрегометра,который представляет собой оптический прибор с регистрацией проходящего света. Проба в кювете постоянно перемешивается специальной мешалкой. При формировании агрегатов повышается прозрачность плазмы и, следовательно, увеличивается поток проходящего через кювету света. Изменение светопропускания регистрируется в виде кривой.
Агрегация с АДФАгрегация с адреналиномАгрегация с тромбиномАгрегация с арахидонатом.
Принцип оценки индуцированной агрегации. После добавления индуктора агрегации и формирования агрегатов тромбоцитов происходит просветление суспензии.
Вид агрегатограммы зависит от типа и концентрации индуктора. Наиболее распространенные индукторы АДФ и адреналин используются в нескольких концентрациях. Форма агрегатограммы может быть несколько отлична на агрегометрах разных производителей, так как выводимый результат теста в определенной степени зависит от скорости и характера перемешивания, температуры, способа регистрации и некоторых других факторов.
Лекарственные средства, такие, как аспирин и другие нестероидные противовоспалительные препараты, антибиотики (3-лактамного ряда, некоторые витамины, пряности могут быть причиной нарушенной агрегации).

	Тип наследования	Количество тромбоцитов	Размер тромбоцитов	Агрегация тромбоцитов				
				Адреналин	АДФ	Коллаген	Ристоцетин	Арахидоновая кислота
Нарушения адгезии								
Псевдоболезнь Виллебранда	А-Д	↓	Норма	+	+	+	Усилена	+
Синдром Бернара–Сулье	А-Р	↓	Крупные	+	+	+	–	+
Первичные нарушения агрегации								
Тромбастения Гланцмана	А-Р	Норма	Норма	–	–	–	+	~
Вторичные нарушения агрегации								
Дефекты пулов хранений								
Дефицит плотных гранул	А-Р	Норма	Норма	–	±	–	±	±
Дефицит α-гранул (синдром серых тромбоцитов)	А-Р	↓	Крупные	+	±	±	+	+
Смешанный дефицит α- и плотных гранул	А-Д			±	±	–	±	±
Квебекская аномалия тромбоцитов	А-Д	↓	Норма	–	+	+	+	+
Нарушения секреции	Различный	Норма	Норма	–	±	–	±	–
Нарушения прокоагулянтной активности тромбоцитов. Синдром Скотта	А-Р	Норма	Норма	+	+	+	+	+

Таблица 4. **Показатели индуцированной агрегации тромбоцитов при нарушениях сосудисто-тромбоцитарного гемостаза с различными агонистами**

Патология	Агонист				
	АДФ	Арахидоновая кислота	Коллаген	Адреналин	Ристоцетин
Тромбоцитопатия	N/↓	N/↓	N/↓	N/↓	N
Нарушения пула хранения	1/N/↓	1N	N/↓	1/↓	N
Синдром Бернара-Сулье	N	N	N	N0/↓↓	
Тромбастения Гланцмана	0	0	0	0	N
Дефект рецептора коллагена (GP Ia/IIa или GP V)	N	N0/↓↓	N	N	
Дефекты активности тромбоксансинтетазы	1/↓/↓↓	0/↓↓	Чаще ↓	1/↓	N
Афибриногенемия	↓/0	↓/0	↓/0	↓/0	N
Болезнь фон Виллебранда	N	N	N	N0/↓↓	
	N	N	N	N	↑ (субтип 2B)

Примечания: N – норма; 0 – отсутствие; 1 – только первичная волна; ↓ – умеренное снижение; ↓↓ – значительное снижение.

Изменения агрегатограмм при нарушениях функции тромбоцитов

Болезнь	АДФ		Адреналин		Арахидоновая кислота	Тромбин	Коллаген	Ристоцетин
	Первая волна	Вторая волна	Первая волна	Вторая волна				
Болезнь Виллебранда	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	↓
Синдром Бернара–Сулье	Н	Н	Н	Н	Н	Н/↓	Н	↓
Тромбоцитостения Гланцмана	↓	↓	↓	↓	↓	↓		+/–
Передозировка аспирина	↓	↓	↓	↓	↓	+/–	↓	+/–
Синдром серых тромбоцитов	↓	↓/↓↓	↓	↓	Н/↓	+/–	↓	+/–

Исследования агрегации тромбоцитов в образцах цельной крови.

Корпорация «Chrono-log» производит агрегометры, работающие на образцах цельной цитратной крови и использующие электронно-импедансный и люминесцентный методы детекции. Прибор регистрирует микротоки,протекающие в специальном электродном блоке, при погружении его в различные образцы -цельную кровь, плазму, богатую тромбоцитами (ПБТ), разведенную кровь или во взвесь отмытых тромбоцитов.

Процессы агрегации в цельной крови наиболее приближены к физиологическим условиям in vivo. Именно поэтому достигается высокая достоверность и специфичность результатов исследования, что дает возможность не только быстро провести необходимую диагностику, но и обеспечить надежную программу мониторинга проводимой терапии в реальном времени. Поскольку импедансная агрегометрия на цельной крови является наиболее адекватным средством для определения гиперагрегации, метод рекомендуется для исследования пациентов с риском тромбоэмболических осложнений. Этот методболее чувствителен и адекватен по сравнению с оптической агрегацией, поскольку измерения происходят в присутствии всех нативных элементов цельной крови, включая эритроциты и лейкоциты.

Тромбоэластография (ТЭГ) - один из первых методов комплексной оценки гемостаза. Тромбоэластография была предложена еще в 1948 г. Гартертом (Hartert) и до настоящего времени остается единственным методом, который качественно и полуколичественно позволяет охарактеризовать процесс образования сгустка, его механические характеристики, плотность, стабильность и процесс фибринолиза. В настоящее время метод усовершенствован, он позволяет количественно оценить перечисленные параметры. Модификацию метода с использованием компьютерного анализа данных можно назвать тромбоэластометрией (ТЭМ). ТЭГ и ТЭМ могут быть использованы для исследования цельной крови, цельной крови с антикоагулянтами, богатой и бедной тромбоцитами плазмы с цитратом в качестве антикоагулянта. Принцип ТЭГ: исследуемый образец помещается между двумя поверхностями, на одну из которых подаются вращательно-колебательные движения, а другая соединена с устройством, принимающим и фиксирующим колебания. После добавления в образец активатора свертывания крови начинается образование сгустка. По мере полимеризации фибрина колебания с одной поверхности начинают передаваться на другую и регистрироваться. Получающаяся кривая зависимости амплитуды колебаний от времени характеризует процесс свертывания крови, а позже фибринолиза.

Наиболее важной информацией, которую можно извлечь из кривой ТЭГ, является:

- **Время до начала образования фибрина (г-время).**
- **Время формирования сгустка (к-время).**
- **Максимальная амплитуда (зависит от концентрации фибриногена, количества и качества тромбоцитов, взаимодействия фибрина и тромбоцитов в сгустке).**
- **Время лизиса тромба.**

Метод позволяет исследовать как спонтанную коагуляцию, так и индуцированную активаторами. Применение различных активаторов и реактивов позволяет достичь разных диагностических целей. В качестве дополнительных реактивов могут использоваться гепарин, фибринолитики или их ингибиторы. Изменения ТЭГ, которые отражают наиболее распространенные изменения гемостаза. Наряду с изменениями, вызываемыми лекарственными препаратами,ТЭГ позволяет идентифицировать тромбоцитопатии, гиперкоагуляцию и другие нарушения.

Высокоинформативным методом, сочетающим иммунохимические технологии с исследованием клеточных популяций, является проточная цитометрия. Проточная цитометрия позволяет охарактеризовать клеточные популяции, их размеры, стадию дифференцировки. Этим методом определяют наличие или отсутствие на клеточной поверхности специфических рецепторов или продуктов клеточной активации, субпопуляции тромбоцитов и даже циркулирующие эндотелиальные клетки. Метод возможен при наличии проточного цитометра и специфических реактивов, в первую очередь моноклональных антител. Основным достоинством этой технологии является возможность разделить клеточные популяции на активированные и неактивные.

Тем не менее использование данной технологии для оценки гемостаза используется крайне редко, так как технология дорогая и требуется высококвалифицированный персонал, подготовленный в области проточной цитометрии и гемостазиологии.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) начинает внедряться в лаборатории, занимающиеся гемостазом, в первую очередь наследственными нарушениями свертывания крови. Наследственные заболевания связаны с отсутствием или дисфункцией белков в результате мутаций в генах, кодирующих их синтез. Задачей молекулярнобиологических методов является выявление этих мутаций. Обширные молекулярно-генетические

исследования проводятся при диагностике гемофилии А и В, а также болезни Виллебранда. ПЦР используется для выявления мутаций фактора V Лейден, протромбина 20210G→A, полиморфизма фактора XIII, дефицита AT, протеинов С и S и в других случаях. ПЦР и другие методы молекулярной и генной диагностики используются для выявления наследственных заболеваний, при которых нарушения гемостаза являются сочетанной формой патологии. Эти методы играют очень важную роль в пренатальной диагностике, объектом для исследования может быть амниотическая жидкость или хорион, которые можно получить на 8-10-й неделе беременности. Этими исследованиями можно

Коагуляционные, или клоттинговые, методы основаны на определении промежутка времени от добавления стартового реактива, запускающего каскад свертывания плазмы, до момента образования сгустка (выпадения фибрина). При постановке коагуляционных тестов необходимо перемешать плазму с реактивом до гомогенной суспензии и поддерживать стабильной температуру реакции. Коагуляционные тесты - в настоящее время наиболее распространенный методический подход для оценки плазменного гемостаза в клинико-диагностических лабораториях. Необходимо подчеркнуть, что коагуляционные методы являются скрининговыми, тем не менее на их основе сконструирован ряд методов для оценки активности факторов плазмы.

Ручные методы

Автоматизированные коагулометры

Принцип работы механического коагулометра. Кювета с плазмой расположена под наклоном и вращается, шарик стоит на месте, не вращается. В момент свертывания шарик захватывается сгустком; как только
шарик уходит от датчика, меняется магнитное поле, прибор регистрирует момент свертывания плазмы.

Принцип регистрации выпадающего фибрина оптико-механическим коагулометром. Выпавшие в кювете
нити фибрина меняют световой поток, падающий на фотодиод. Фотодиод связан через следящую схему компенсации с напряжением на лампе. В результате на лампу подается такое напряжение, которое меняет яркость свечения лампы, чтобы световой поток, попадающий на светодиод, поддерживался в заданном диапазоне. По изменению напряжения на лампе регистрируется начало выпадения фибринового сгустка

Принцип регистрации момента образования сгустка турбидиметрическим коагулометром. При свертывании плазмы происходит резкое увеличение оптической плотности в фотометрической ячейке. Коагулометр
определяет время от внесения активатора свертывания до момента изменения оптической плотности на ДА (например, на 0,1 ед. оптической плотности).

Нефелометрический принцип измерения светорассеяния, заложенный в основу определения момента выпадения сгустка на коагулометрах фирмы «Sysmex» (Япония). Метод позволяет повысить точность измерений и их воспроизводимость до 2-3%, а также снизить влияние на результат самого образца. Анализаторы работают на любых реагентах (в том числе на российских).

Преимущества и недостатки различных методов обнаружения сгустка

Методы	Преимущества	Недостатки
Механический	Принципиальная возможность работы на цельной крови, высокая толерантность к типу используемых реагентов и пробирок, низкая стоимость анализаторов	Низкая чувствительность - нет детекции слабых сгустков, необходимо применять мешалки в пробах
Оптико-механический	Точность больше, чем в механическом методе, перемешивание пробы во время снятия показаний	Чувствительность ниже нефелометрического метода, необходимо применять мешалки в пробах
Турбидиметриче-ский	Чувствительность выше предыдущих методов, низкая стоимость анализаторов	Чувствительность ниже нефело-метрического метода
Нефелометрический	Высокая чувствительность, высокая точность измерения	Высокая стоимость прибора

Амидолитические методы с использованием хромогенных и флуорогенных субстратов

Принцип определения активности протеолитического фермента (протеазы) с использованием хромогенного субстрата. Максимум поглощения паранитроанилина, связанного с пептидом, находится в области короткого ультрафиолета, а свободного паранитроанилина -380 нм, При длине волны 405 нм поглощает практически только свободная форма хромогена, на этой длине волны проводится регистрация протеолитической реакции

Иммунохимические методы

Латекс-агглютинация выявляется визуально или на автоматизированных нефелометрах.

Принцип латекс-агглютинации. Латексные частицы, покрытые антителами против фактора гемостаза, при взаимодействии с этим фактором (антигеном) образуют агрегаты, видимые визуально или регистрируемые на соответствующих приборах.

Метод ELISA для выявления концентрации факторов гемостаза, как правило, использует принцип «сендвича».

Принцип ELISA. На плашке, покрытой антителами против фактора гемостаза, связывается антиген, Проявляющие антитела, конъюгированные с ферментом, связываются с антигеном. Фермент меняет цвет хромогена пропорционально количеству антигена.

Скрининговые тесты оценки плазменного звена гемостаза

Скрининговые тесты:

- **Время кровотечения.**
- **Количество тромбоцитов.**
- **АЧТВ.**
- **Протромбиновое время (по Квику).**
- **Тромбиновое время и/или фибриноген.**

Основным тестом на состояние внутреннего каскада свертывания плазмы является АЧТВ, на состояние внешнего каскада - ПВ.

Изменение АЧТВ и ПВ при патологии отдельных компонентов плазменного звена гемостаза и влиянии некоторых лекарственных средств

Дефицит фактора/терапия	ПВ	АЧТВ	Комментарий
Дефицит фактора XII, ВМК или ПК	Норма	Удлинено	При использовании некоторых реактивов АЧТВ не меняется
Дефицит факторов XI, VIII или IX	Норма	Удлинено	Степень удлинения АЧТВ зависит от реактивов
Дефицит факторов X, V или II	Удлинено	Удлинено	ПВ более чувствительно
Дефицит фактора VII	Удлинено	Норма	Подтип фактор VII Padova определяется только с тромбопластином из мозга кролика
Дефицит фибриногена, дисфибриногенемия	Норма/удлинено	Норма/удлинено	Зависит от реагентов и использованного прибора, при фибриногене >1 г/л обычно норма
Гепарин в терапевтических концентрациях	Норма/удлинено (зависит от реактивов)	Удлинено/не определяется	Влияние гепарина на АЧТВ зависит от использованных реактивов
Низкомолекулярный гепарин	Норма/граничные изменения	Норма/удлинено	Изменения АЧТВ зависят от использованных реактивов
Лечение непрямыми антикоагулянтами	Удлинено	Тенденция к удлинению	АЧТВ менее чувствительный показатель, чем ПВ
Гирудин в терапевтических дозах	Удлинено	Удлинено	АЧТВ более чувствительный показатель, чем ПВ
ДВС-синдром	Удлинено/норма	Удлинено/норма	Зависит от тяжести и стадии ДВС
Волчаночный антикоагулянт	Норма/удлинение	Изменено/норма	При наличии волчаночного антикоагулянта ПВ, как правило, нормально. Удлинение АЧТВ зависит от реактивов
Тяжелая патология печени	Удлинено	Удлинено	Зависит от реактивов и приборов
Дефицит фактора XIII	Норма	Норма	Не влияет на АЧТВ и ПВ

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)
АЧТВ используется как скрининговый тестдля оценки внутреннего каскада свертыванияплазмы, скрининговой диагностики волчаночного антикоагулянта и слежения за антикоагулянтным действием гепаринов. АЧТВ - более значимый тест для первичного выявления патологии,чем ПВ, так как выявляет относительно часто встречающуюся гемофилию А и В (дефицит факторов VIII и IX соответственно) и наличие волчаночного антикоагулянта. Укорочение А ЧТВ иногда определяется у больных с тромбофилией. Это может быть связано с резистентностью фактора V к активному протеину С,повышенным уровнем фактора VIII или активированных факторов свертывания. Однако чаще всего укорочение АЧТВ объясняется нарушениями работы с кровью на преаналитическом этапе.
Удлинение А ЧТВ происходит при:
- **врожденном или приобретенном дефиците факторов II, V, VIII, IX, X, XI, XII, прекалликреина, ВМК;**
- **снижении активности ф-VIII на фоне болезни Виллебранда;**
- **лечении гепарином, гирудином или апротинином (ингибитор контактной фазы коагуляции);**
- **присутствии в крови ПДФ, волчаночного антикоагулянта; нарушении функции печени;**
- **коагулопатии потребления (ДВС-синдром);**
- **тяжелой дисфибриногенемии или афибриногенемии.**

Протромбиновое время (ПВ) - широко используемый скрининговый тест для оценки внешнего каскада свертывания плазмы. ПВ обычноиспользуется для определения активности ф.УП,контроля за лечением непрямыми антикоагулянтами, при скрининге системы гемостаза, редкодля количественного определения фибриногена(в автоматических коагулометрах, имеющих специальную программу).
ПВ удлиняется при:
• дефиците факторов VII, X, V, протромбина ифибриногена, в том числе при тяжелых заболеваниях печени, при наличии аутоантителпротив факторов свертывания. Чувствительность к недостатку протромбина и фибрино
гена в тесте ПВ меньше, чем к недостатку других вышеперечисленных факторов;
• иногда в присутствии волчаночных антикоагулянтов. Протромбиновое время, выраженное черезмеждународное нормализованноеотношение (МНО)
Современные коагулометры программируются на вычисление МНО. Стандартизованный протромбиновый тест был разработан Международным комитетом по стандартизации в гематологии и Международным комитетом по тромбозу и гемостазу и принят ВОЗ в 1983 г. В его основе лежит наличие линейной зависимости междулогарифмами протромбинового времени, определенными с разными тромбопластинами. На практике это означает, что значения ПО, определенные с использованием разных тромбопластинов,могут быть приведены путем возведения в степень, представляющую собой МИЧ используемого тромбопластина, к величине, которая была быполучена при определении факторов протромбинового комплекса с первичным стандартом тромбопластина. Эту величину было предложено называть МНО - международным нормализованнымотношением (INR - английская аббревиатура). По рекомендации ВОЗ определение МИЧ (ISI - английская аббревиатура) является обязанностьюпроизводителей тромбопластина, которые должны определять относительную чувствительностькаждой серии выпускаемых ими тромбопластинов, сравнивая ее с эталоном тромбопластина,чувствительность которого принята за единицу.

Интерпретация результатов
ПВ удлинено (ПИ снижен, ПО и МНО повышены) - врожденный дефицит факторов II, V,VII, X, хронические заболевания печени с нарушением функции, дефицит витамина К (холестаз, мальабсорбция, дисбактериоз), лечение антикоагулянтами непрямого действия, гипофибриногенемия (менее 0,5 г/л), дисфибриногенемия
и нарушение полимеризации фибрина, ДВС-синдром, присутствие ингибиторов свертывания (гепарин, ПДФ).
ПВ укорочено (ПИ увеличен, ПО и МНО снижены) - состояние гиперкоагуляции, массивное поступление тканевого тромбопластина в кровоток (травма, некроз), повышенная свертываемость во время беременности и после родов.

Способы выражения протромбинового теста

Выражение, единицы	Расчет	Комментарий
Время свертывания, секунды		Очень сильно зависит от реагентов, приборов, способа регистрации
Протромбиновый индекс (ПИ), %	$ПИ = \frac{время\ свертывания\ нормальной\ плазмы}{время\ свертывания\ плазмы\ больного} \times 100\%$	ПИ в % не несет смысловой нагрузки, так как между количеством факторов и измерением ПВ в секундах нет пропорциональной зависимости
Протромбиновое отношение (ПО)	$ПО = \frac{время\ свертывания\ плазмы\ больного}{время\ свертывания\ нормальной\ плазмы}$	Зависит от реагентов, приборов; сравнивать ПО, измеренное в разных лабораториях, практически невозможно
ПТ по Квику – % от нормы	Определяется по калибровочному графику, который строится путем разведения стандартной плазмы (100% протромбина) в соотношении 1:1 (50% протромбина), 1:2 (33% протромбина), 1:3 (25% протромбина), 1:4 (20% протромбина)	Тест не стандартизован, однако рекомендуется для оценки состояния факторов внешнего пути активации плазменного гемостаза
Международное нормализованное отношение (МНО)	$МНО = ПО^{МИЧ}$	Рекомендуется использовать при контроле лечения непрямыми антикоагулянтами

Тромбиновое время (ТВ) - скрининговый тест на полимеризацию фибриногена/фибрина и на антикоагулянтную активность в плазме. ТВ регистрируется по свертыванию плазмы при добавлении к нейнизкой или средней концентрации тромбина (бычьего или человеческого). ТВ определяется в основномколичеством и качеством фибриногена и присутствием антикоагулянтов в плазме. Если в плазмеприсутствует гепарин, то комплекс гепарин-антитромбин быстро нейтрализует добавленный тромбин и ТВ будет удлиняться. Среди скрининговыхтестов ТВ - наиболее чувствительный тест на присутствие гепарина. В то же время известно, что чувствительность к гепарину у ТВ зависит от pH, ионной силы тест-системы, свойств тромбина(происхождение и степень очистки), т. е. в значительной степени определяется составом набора реагентов. Увеличение ТВ происходит также в присутствии относительно высокой концентрации продуктов деградации фибрина (ПДФ), наблюдаемой при назначении тромболитической терапии, при ДВС-синдроме, заболеваниях печени и придисфибриногенемиях. Результат определяется нетолько общим количеством ПДФ, но и их составом. Непрямые антикоагулянты не влияют нарезультаты теста. Иногда удлинение ТВ наблюдается в присутствии аутоантител к тромбину или парапротеиновпри миеломной болезни, которые препятствуют полимеризации мономеров фибрина. Ингибиторами полимеризации фибрин-мономеров могут быть IgG или IgM, которые удлиняют как ТВ, так и рептилазное время. Аутотела к тромбину подавляют только ТВ и не влияют на рептилазное время.К увеличению ТВ приводят: • снижение концентрации фибриногена менее0,5 г/л (врожденная или приобретенная гипо/афибриногенемия); качественные изменения молекулы фибриногена (дисфибриногенемия);
• присутствие физиологических (гепарин) ипатологических (ПДФ, моноклональные белки) ингибиторовтромбина и фибринообразования;
• наличие парапротеинемии, уремии, в некоторых случаях волчаночных антикоагулянтов.

В случае обнаружения патологических изменений АЧТВ и/или ПВ необходимо проводить дополнительные исследования с целью выяснения причины этих отклонений

Фактор	Нормальный диапазон активности (%)	Снижение активности (без наследственных заболеваний)	Повышение активности
Протромбин	70–130	• Антагонисты витамина К • Дефицит витамина К • Патология печени • Антифосфолипидный синдром	• Стадия гиперкоагуляции при ДВС • Состояние после операции • Мутация протромбина 20210G→A • После введения витамина К
V	65–150	• Гиперфибринолиз • Патология печени • ДВС-синдром • Злокачественная опухоль	• Последний триместр беременности • Холестаз • Состояние после операции • При/после ДВС
VII	70–130	• Антагонисты витамина К • Патология печени • Дефицит витамина К	• Тромбофилия • Острый тромбоз • Инфаркт миокарда • Гипертриглицеридемия • Введение витамина К • Холодовая активация
VIII	50–150	• ДВС-синдром • Гиперфибринолиз • Дефицит фактора Виллебранда • Лечение вальпроиковой кислотой	• Тромбофилия • Рекуррентный тромбоз • Опухолевый процесс • Беременность • Патология печени • Заболевания почек • Острофазовая реакция
IX	50–130	• Антагонисты витамина К • Патология печени • Амилоидоз • Лечение вальпроиковой кислотой • Дефицит витамина К	• Сахарный диабет • Лечение кортикостероидами
X	70–140	• Антагонисты витамина К • Патология печени • L-аспарагиназа • Амилоидоз • Дефицит витамина К	• Состояние после введения витамина К
XI	70–130	• ДВС-синдром • Патология печени • Гиперфибринолиз	• Гипертония • Астма
XII	70–130	• Тромбоз • ДВС-синдром • Гиперфибринолиз • Нефротический синдром	• Диабет • Беременность

Определение фибриногена - один из рутинных тестов коагулограммы, выполняемый разными методами. Определение фибриногена по Клауссу считается наиболее адекватным тестом, выполняется на коагулометрах. Турбидиметрический метод.Иммунохимические методы.
Референтный диапазон для фибриногена в плазме в норме составляет 1,8-3,5 г/л (часто приводят значения 2-4 г/л), практически не зависитот возраста и пола. Печень синтезирует 2-5 г фибриногена в день, время полувыведения фибриногена из крови составляет около 4 дней. Фибриноген - острофазный белок. Концентрация его может превышать 10 г/л при тяжелых бактериальных инфекциях, при травме и тромбозе. Повышение уровня фибриногена в остройфазе воспаления, как правило, имеет транзиторный характер. У курящих людей уровень фибриногена в плазме крови несколько выше, чему некурящих. К значительному росту фибриногена приводят заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром), коллагенозы (ревматоидный артрит, узелковый периартериит), ночная пароксизмальная гемоглобинурия, новообразования
(рак легкого). При атеросклерозе наблюдается устойчивое увеличение фибриногена, трудно корригируемое лекарственными препаратами. В результате риск сердечно-сосудистых заболеваний повышается с
возрастанием исходного уровня фибриногена в интервале 3,0-4,5 г/л. Обнаружено, что повышение уровня фибриногена в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями предшествует развитию инфаркта миокарда и инсульта. Корреляция между уровнем фибриногена и развитием этих осложнений особенно четко прослеживается у пациентов молодого и среднего возраста. Определение уровня фибриногена - наиболее
чувствительный тест для выявления бессимптомных стадий заболевания периферических артериальных сосудов.

Дисфибриногенемия - относительно часто встречающееся заболевание, причем это состояние может определяться несколькими мутациями,одни из которых не сопровождаются, другие сопряжены с кровотечениями, а при некоторых -развиваются тромбозы.

Снижение концентрации фибриногена в плазме наблюдается при врожденном дефиците фибриногена, печеночно-клеточной недостаточности, ДВС-синдроме, острых фибринолитических состояниях, поражениях костного мозга (лейкоз, опухолевые метастазы), при инфекционном мононуклеозе. Гипофибриногенемию могут вызвать такие лекарственные препараты, как вальпроат натрия, фибраты, фенобарбитал, стрептокиназа, урокиназа, L-аспарагиназа. Физическая перегрузка снижает фибриноген. Лекарственную дефибринизацию плазмы можно достичь, используя ферменты змеиного яда (Reptilase® или анкрод), которые применяются для улучшения реологии крови за счет снижения вязкости.

Изменения скрининговых тестов при врожденном дефиците факторов VIII и IX, наличии специфического ингибитора и волчаночном антикоагулянте

Тесты	Врожденный дефицит факторов внутреннего пути	Ингибитор факторов внутреннего пути	Волчаночный антикоагулянт
Количество тромбоцитов	Н	Н	Н или ↓
Время кровотечения	Н	Н	Н
АЧТВ	↑	↑	↑
ПТ	Н	Н	Н или ↑
Тест смешивания. Исследование сразу после смешивания	Коррекция	Обычно коррекция	Нет коррекции
Тест смешивания. Исследование после часовой инкубации	Коррекция	Нет коррекции	Нет коррекции

Спонтанный эуглобулиновый лизис - традиционный метод оценки фибринолиза. В кислой среде при низкой температуре происходит осаждение эуглобулиновой фракции белков плазмы, содержащей фибриноген, факторы свертывания, плазминоген и его активаторы. Ингибиторы фибринолиза выпадают в осадок в незначительном количестве (около 2%). После растворения эуглобулиновой фракции и образования фибринового сгустка определяют время его лизиса, чтоотражает фибринолитическую активность плазмы.

Укорочение времени лизиса эуглобулинов (активация фибринолиза) отмечается при:

• уменьшении концентрации фибриногена -гипо- и дисфибриногенемия;

• увеличении содержания плазминогена и его активаторов - панкреатит, панкреонекроз, метастазирующии рак предстательной железы, легкого,яичников, метастазы меланомы, операции налегких, предстательной, поджелудочной железе,гиперкатехоламинемия (стресс, тиреотоксикоз, гипертонический криз, введение адреналина),шок, патология беременности, терминальные идругие состояния, сопровождающиеся развитием ДВС-синдрома, цирроз, рак, метастатическоепоражение печени (снижение ан-типлазминовой и антиактиваторной функции). Увеличение времени лизиса эуглобулинов (угнетение фибринолиза) отмечается при:

• гиперфибриногенемии;

• врожденной а-, гипо- или дисплазминогенемии;

• дефиците плазминогена и его активаторов - рецидивирующие венозные тромбозы, системные васкулиты, сепсис, нефротический синдром, гипокоагуляционная стадия ДВС-синдрома, цирроз печени (нарушение синтеза плазминогена).

Определение D-димеров D-димеры - это специфические продукты деградации фибрина, входившего в состав тромба.Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием плазмина и некоторых неспецифических фибринолитиков. Концентрация D-димеров в сыворотке пропорциональна активности фибринолиза и количеству лизируемого фибрина. Этот тест позволяет судить об интенсивности процессов образования и разрушения фибриновых сгустков. Определение D-димеров проводится иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител, иммунодиффузии, методом турбидиметрии, латекс-агглютинации. Во всех методах исследования используются моноклональные антитела к эпитопам на D-димере, которые образуются при расщеплении нерастворимого фибрина плазмином.

На определение D-димеров практически не оказывает влияние техника взятия крови, примесь тромбоцитов, не требуется использования ингибиторов для подавления других факторов.

Повышение уровня D-димеров в крови определяется при возникновении венозных тромбозов, атеротромбозе, тромбоэмболии легочной артерии, ДВС-синдроме, после операций, особенно при большом операционном поле и других состояниях с повышенным образованием фибрина. D-димеры достаточно долго циркулируют в крови, время их полувыведения составляет более 24 ч, повышение D-димеров может персистировать в течение нескольких недель после острого тромбоза.

Уровень D-димеров повышен у больных с тромбозом глубоких вен бедра, с тромбоэмболией легочной артерии, он может повышаться после обширных хирургических вмешательств, травм, при онкологических заболеваниях. На значение D-димеров влияют такие факторы, как величина тромба, время от начала клинических проявлений до назначения антикоагулянтной терапии, прием антикоагулянтов, на фоне которых уровень D-димеров постоянно снижается. Поэтому более важной для исключения диагноза тромбоза является отрицательная диагностическая значимость теста. Причем для разных тестов отрицательная диагностическая значимость колеблется от 78 до 100%, она выше у более чувствительных методов, что характерно для ИФА-диагностики. D-димеры определяются в моче, но их появление интерпретируется как маркер почечной дисфункции.

Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) паракоагуляционный ортофенантролиновый тест. С помощью ортофенантролинового теста возможно не только качественное, но и количественное определение РФМК. Гепаринотерапия с содержанием гепарина в плазме крови до концентрации 10 ед/мл не влияет на результаты теста. Ортофенантролиновый тест более чувствителен, чем другие паракоагуляционные тесты. Однако при остро протекающих (катастрофических) формах ДВС с глубокой гипофибриногенемией показатели паракоагуляционных тестов могут снижаться.

Маркеры активации гемостаза

Показатель	Характеристика	Диагностическое значение
D-димеры	Продукты, образующиеся при лизисе фибрина под влиянием плазмина. Накапливаются при активации гемокоагуляции и фибринолиза	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, оценка эффективности тромболитической терапии
ТАТ – тромбин-антитромбиновый комплекс	Комплексы взаимодействия тромбина и антитромбина. Отражают количество образующегося тромбина в системе циркуляции за короткий период	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
F1+2 – фрагменты протромбина	Указывают на активацию протромбина фактором Ха и на образование тромбина *in vivo*. Отражают количество образующегося тромбина в системе циркуляции за длительный период	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением гепарином и непрямыми антикоагулянтами. Наследственный или приобретенный дефицит ингибиторов
РФМК	Фибрин-мономеры и олигомеры, а также их комплексы с ПДФ. Отражают активность тромбина *in vivo*	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
ФПА – фибринопептид А	Продукт протеолиза фибриногена. Отражает активность тромбина *in vivo*	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
ПДФ	Продукты деградации фибрина/фибриногена под влиянием плазмина	Определяют состояние гиперфибринолиза, повышаются у больных с тромбозами (реактивный фибринолиз) и ДВС, при лечении фибринолитиками
ПАП – плазмин-α_2-антиплазминовый комплекс	Отражает образование плазмина *in vivo*	Выявление гиперфибринолиза или реактивного фибринолиза, ДВС, инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии
PF4 – фактор 4 тромбоцитов, **β-TG** – β-тромбоглобулин	Метаболиты, освобождаемые из тромбоцитов в плазму. Отражают активацию тромбоцитов *in vivo*	Диагностика гиперактивного состояния тромбоцитов, артериального тромбоза, повреждения сосудов, инсульта
vWF – фактор Виллебранда	Освобождается из эндотелиальных клеток. Маркер повреждения эндотелиальных клеток	Диагностика поражения сосудистой стенки, фактор риска инфаркта миокарда и инсульта
ТМ	Мембранный белок в эндотелиальных клетках, в плазме – маркер повреждения эндотелия	Диагностика повреждения сосудистой стенки, ДВС-синдрома
ф.XIIa	Активный фактор XII, указывает на активацию контактной фазы	Фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний

Контроль качества в коагулологии является центральным элементом обеспечения эффективности диагностических исследований. Помимо непосредственного контроля за самой аналитической процедурой, необходимо стандартизовать и контролировать взятие и подготовку образцов на преаналитическом этапе. Оценка полученных данных должна проводиться с учетом состояния пациента, используемых им лекарственных препаратов, особенностей подготовки образца на преаналитическом этапе, методики выполнения анализа, используемых инструмен тов и реактивов. О высокой степени качества и диагностической эффективности лабораторных исследований можно говорить лишь тогда, когда под контролем находится весь процесс от назначения исследования и взятия биологического материала до получения достоверного результата. Решающим фактором правильности выполнения исследования является проведение всеобъемлющего внутрилабораторного контроля качества всех выполняемых тестов. Оптимальная система контроля предполагает оценку качества лабораторных исследований на внутрилабораторном, федеральном и международном уровнях.