

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**Кафедра клинической лабораторной диагностики,
аллергологии и иммунологии**

Ю. И. ЯРЕЦ, И. А. НОВИКОВА

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

**Учебно-методическое пособие
для студентов 4 курса медико-диагностического факультета
медицинских вузов**

**Гомель
ГомГМУ
2014**

УДК 616-074/078:616-005.1-08(072)

ББК 53.45я73

Я 72

Рецензенты:

кандидат медицинских наук, доцент,
доцент кафедры патологической физиологии Витебского государственного
ордена Дружбы народов медицинского университета

А. Г. Генералова;

кандидат медицинских наук, доцент,
заместитель директора по научной работе Республиканского научно-
практического центра радиационной медицины и экологии человека

Э. А. Надыров

Ярец, Ю. И.

Я 72 Лабораторные методы оценки системы гемостаза: учеб.-метод. пособие
для студентов 4 курса медико-диагностического факультета медицин-
ских вузов / Ю. И. Ярец, И. А. Новикова. — Гомель: ГомГМУ, 2014. — 72 с.
ISBN 978-985-506-600-3

Учебно-методическое пособие содержит сведения о механизмах функционирования системы гемостаза и методах лабораторной ее оценки.

Предназначено для студентов 4 курса медико-диагностического факультета медицинских вузов.

Подготовлено в соответствии с учебной программой по клинической биохимии для студентов 4 курса по специальности «Медико-диагностические дело», утвержденной Министерством образования Республики Беларусь 13 июля 2010 года.

Утверждено и рекомендовано к изданию Центральным учебным научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» 27 июня 2013 г., протокол № 6.

УДК 616-074/078:616-005.1-08(072)

ББК 53.45я73

ISBN 978-985-506-600-3

© Учреждение образования
«Гомельский государственный
медицинский университет», 2014

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Список условных обозначений</i>	4
1. Общие сведения о механизмах гемостаза	5
1.1. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз	5
1.2. Коагуляционный (плазменный гемостаз)	11
1.3. Противосвертывающая (антикоагулянтная система).....	20
1.3.1. Антикоагулянты	20
1.3.2. Система фибринолиза.....	26
2. Лабораторная оценка системы гемостаза	29
2.1. Методы оценки сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.....	33
2.1.1. Манжеточная проба М. П. Кончаловского, Румпель-Леде.....	34
2.1.2. Определение времени кровотечения.....	34
2.1.3. Определение количества тромбоцитов в крови	35
2.1.4. Оценка функциональной активности тромбоцитов	38
2.2. Оценка коагуляционного гемостаза.....	41
2.2.1. Особенности преаналитического этапа	41
2.2.2. Тесты для оценки коагуляционного гемостаза	45
2.2.2.1. Тесты для оценки внутреннего и общего путей свертывания крови	48
2.2.2.2. Тесты для оценки внешнего и общего путей свертывания крови	50
2.2.2.3. Исследование конечного этапа вторичного гемостаза	55
2.2.2.4. Тесты оценки состояния фибринолитической системы.....	57
2.2.2.5. Тесты активации свертывания крови и фибринолиза.....	59
2.2.2.6. Определение первичных физиологических антикоагулянтов	63
Приложение	68
Литература	69

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ELISA — Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
(твердофазный иммуноферментный тест)
- GP — гликопротеиновый рецептор тромбоцитов
- pNA — пара-нитроанилин
- vWF — фактор Виллебранда
- α 2-АП — α 2-антиплазмин
- АДФ — аденозиндифосфат
- АНД — антикоагулянты непрямого действия
- АТ — антитромбин (антитромбин III)
- АТФ — аденозинтрифосфат
- АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время
- ВМК — высокомолекулярный кининоген
- ДВС — диссеминированное внутрисосудистое свертывание
- ИАП — ингибитор активации плазминогена
- ИПТФ — ингибитор пути тканевого фактора
- ИФА — иммуноферментный анализ
- МИЧ — международный индекс чувствительности
- МНО — международное нормализованное отношение
- НМФ — низкомолекулярные гепарины
- НФГ — нефракционированные гепарины
- PS — протеин S
- ПВ — протромбиновое время
- ПДФ — продукты деградации фибрина/фибриногена
- ПК — прекалликреин
- ПО — протромбиновое отношение
- ПС — протеин С
- ПТ — протромбиновый тест
- ПТИ — протромбиновый индекс
- ПЦР — полимеразная цепная реакция
- РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы
- тАП — тканевой активатор плазминогена
- ТАТ — тромбин-антитромбиновый комплекс
- ТВ — тромбиновое время
- ТФ — тканевой фактор
- ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии
- уАП — урокиназный активатор плазминогена
- ФП — фибринопептид

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ ГЕМОСТАЗА

Гемостаз — это биологическая система, которая обеспечивает сохранение жидкого состояния крови в организме в норме и остановку кровотечения при нарушении целостности сосудистого русла.

В поддержании гемостаза участвуют различные структурные и функциональные компоненты. Структурными компонентами гемостаза являются:

- стенки кровеносных сосудов;
- клетки крови, в первую очередь — тромбоциты;
- плазменные ферментные (протеолитические) и неферментные системы.

В системе гемостаза принимают участие факторы свертывающей, противосвертывающей (антикоагулянтной) и фибринолитической систем крови. Изменение функционального состояния одной из систем сопровождается компенсаторными сдвигами в деятельности другой.

Полноценный гемостаз обеспечивается сбалансированным функционированием трех основных механизмов, которые взаимно индуцируют друг друга, могут функционировать одновременно, либо с преобладанием одного из них:

1. Первичный гемостаз (сосудисто-тромбоцитарный) — обеспечивает остановку кровотечения преимущественно из мелких сосудов с низким кровяным давлением, диаметр которых не превышает 100 мкм. Суть процесса состоит в образовании тромбоцитарного сгустка. Продолжительность этой фазы составляет 3–5 мин.

2. Вторичный гемостаз (коагуляционный или плазменный) — включается одновременно с процессами первичного гемостаза, обусловлен последовательной активацией плазменных факторов свертывания. Вторичный гемостаз обеспечивает образование фибринового сгустка (окончательный тромб), который скрепляет тромбоцитарный сгусток и препятствует потере крови. Продолжительность данной фазы около 5–10 мин.

3. Фибринолиз — направлен на растворение фибринового тромба, удаление его из сосудистого русла, восстановление целостности сосудистой стенки и поддержание крови в жидком состоянии. Длительность этого процесса составляет 48–72 ч.

1.1. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз представляет собой первичную реакцию кровеносных сосудов и клеток, которая проявляется спазмом микрососудов, активацией клеток эндотелия и секрецией биологически активных веществ, а также адгезией и агрегацией тромбоцитов. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз сводится к образованию тромбоцитарной пробки, или тромбоцитарного тромба. Условно его разделяют на 3 стадии: 1) временный (первичный) спазм сосудов; 2) образование тромбоцитарной пробки за счет адгезии и агрегации тромбоцитов; 3) ретракция тромбоцитарной пробки.

Функции сосудов в гемостазе

В процессе первичного гемостаза участвуют все элементы сосудистой стенки (клетки эндотелия, субэндотелиальный слой, гладкомышечные клетки) совместно с тромбоцитами. С одной стороны, сосуды за счет спастической реакции в ответ на повреждение ограничивают объем циркуляции, механически предотвращая кровопотерю. С другой стороны, они активно регулируют гемостатические реакции путем синтеза и представления на поверхности эндотелия и в субэндотелиальном слое белков, пептидов и небелковых веществ, непосредственно участвующих в гемостазе.

Сосудистая стенка функционирует таким образом, что в физиологических условиях способствует поддержанию жидкого состояния крови, а при повреждении или воспалении приобретает тромботические свойства, инициируя процесс свертывания.

Антикоагулянтные и антитромбогенные свойства сосудистой стенки обеспечиваются за счет следующих механизмов:

- целостность эндотелия и свойство текучести эндотелиальной мембраны формирует гладкую несмачиваемую внутреннюю поверхность сосуда;

- наличие слоя гликокаликса, имеющего отрицательный заряд, формирует силы электростатического отталкивания между поверхностью сосудистой стенки и клетками крови;

- эндотелий сосудов секретирует вещества, препятствующие коагуляции, адгезии, агрегации и спазму сосудов. Такими веществами являются:

- ✓ простациклин — расширяет сосуды и ингибирует агрегацию тромбоцитов;

- ✓ тромбомодулин — связывает и инактивирует тромбин, превращая его в активатор системы протеинов С и S (одной из главных противосвертывающих систем), при этом происходит инактивация факторов свертывания крови Va, VIIa и стимуляция фибринолиза;

- ✓ оксид азота (NO) — расширяет сосуды, ингибирует агрегацию тромбоцитов;

- ✓ ингибитор пути тканевого фактора (ИПТФ) — белок, который высвобождается при стимуляции эндотелия и является главным ингибитором внешнего пути свертывания крови за счет связывания и инактивации фактора Ха (комплекс ИПТФ + Ха посредством взаимодействия с ф. VIIa и TF предотвращает активацию ф. X и IX).

При повреждении сосудистой стенки происходит активация эндотелиальных клеток, в результате чего антикоагулянтный потенциал эндотелия сменяется на прокоагулянтный. При этом в процесс активации свертывания вовлекаются более глубокие слои сосудистой стенки (субэндотелий).

Прокоагулянтная активность сосудистой стенки обусловлена следующими факторами:

- изменением фосфолипидного состава наружной поверхности мембран эндотелиоцитов с появлением рецепторов для ферментных комплек-

сов коагуляционного каскада (IXa + VIIIa + Ca²⁺; VIIa + TФ + Ca²⁺, Ха + Va + 3 фактор тромбоцитов + Ca²⁺);

- наличием на клетках субэндотелия (макрофагах, фибробластах, лейкоцитах и гладких мышечных клетках) тканевого фактора (ТФ), который, обладая большой тромбогенной активностью, запускает процесс свертывания крови за счет активации IX и X факторов и синтеза протромбиназы;
- коллагеном субэндотелия, который является субстратом для адгезии и активации тромбоцитов и активатором контактной (внутренней) системы коагуляции;
- высвобождением фактора Виллебранда (vWF), тромбоспандина А₂, которые обеспечивают адгезию и дегрануляцию тромбоцитов;
- синтезом эндотелием биологически активных веществ:
 - ✓ сериновых протеиназ (факторы V, X, XI, XII) и фибриногена;
 - ✓ ингибиторов активации плазминогена I и II типов, вследствие чего замедляется фибринолиз;
 - ✓ эндотелина-1, вызывающего спазм гладкомышечных клеток сосудистой стенки и усиление агрегации тромбоцитов.

Функции тромбоцитов в гемостазе

Участие тромбоцитов в процессах первичного гемостаза реализуется за счет выполнения ими таких функций как:

- ангиотрофическая — обеспечение жизнеспособности и репарации эндотелиоцитов путем синтеза ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток сосудистой стенки;
- ангиоспастическая — поддержание спазма поврежденных сосудов путем секреции вазоспастических веществ (серотонин, катехоламины, β-тромбоглобулины);
- адгезивная — прикрепление к поврежденному эндотелию или к чужеродной поверхности;
- агрегационная — образование тромбоцитарного тромба;
- участие в плазменном гемостазе. В процессе активации тромбоцита на его поверхности возрастает содержание фосфолипидов, обладающих прокоагулянтной активностью. Наличие таких фосфолипидов необходимо для фиксации, активации и взаимодействия плазменных белков гемостаза. Эти фосфолипиды называют фактором 3 тромбоцитов или тромбоцитарным тромбопластином. В результате на поверхности активированных тромбоцитов происходит формирование комплексов из свертывающих факторов плазмы: [IX + VIIIa; Ха + Va] (рисунок 3).

Адгезия тромбоцитов к эндотелию сосудов происходит, как правило, при повреждении сосудистой стенки и обнажении субэндотелиальных структур. В процессе адгезии участвуют мембранные гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов GPIIb/IIIa и GPVI. Более прочный механизм, обеспечивающий

окончательную фиксацию тромбоцитов и их удержание на эндотелии сосудов с высокой скоростью кровотока (например, артериол) реализуется с участием *молекул адгезии* (фактор Виллебранда, фибронектин, витронектин, ламинин, тромбоспондин и др). Так, фактор Виллебранда (vWF) специфически связывается с гликопротеиновым рецепторным комплексом тромбоцитов GPIb-V-IX и коллагеном субэндотелия, выполняя функцию «биологического клея». Поэтому именно vWF является ключевым при формировании тромба в мелких артериях, артериолах и артериальных капиллярах. В местах, где интенсивность кровотока невелика, роль vWF уменьшается, преобладающим становится взаимодействие, опосредованное другими молекулами адгезии, а также прямая адгезия тромбоцитов к коллагену посредством GPIa-IIa.

После контакта рецепторов адгезии тромбоцитов (GPIa-IIa, GPIb-V-IX и GPVI) с субстратом (коллагеном, vWF, а также тромбином, который с высокой аффинностью связывается с GPIb-V-IX) начинается *активация* тромбоцитов. При этом изменяется морфология клеток: появляются псевдоподии, увеличивается площадь поверхности за счет «распластывания». Одновременно происходит перемещение отрицательно заряженных фосфолипидов с внутренней поверхности мембраны на внешнюю. Эти фосфолипиды (фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилэтаноламин) обладают прокоагулянтными свойствами (служат матрицей для взаимодействия плазменных факторов свертывания и образования их активных комплексов), поэтому получили название *мембранный фосфолипидный фактор* (синонимы: фактор 3 тромбоцитов, тромбоцитарный тромбопластин). Вышеперечисленные процессы сопровождаются секрецией содержимого гранул тромбоцитов.

В тромбоцитах выделяют 3 вида гранул: α -гранулы, электронно-плотные тельца (δ -гранулы) и лизосомы (γ -гранулы). В *α -гранулах* хранятся различные белки: β -тромбоглобулин, 4-й тромбоцитарный фактор, фактор Виллебранда, фибриноген, фактор V свертывания, ростовой фактор и др. *Плотные δ -гранулы* содержат АТФ, АДФ, серотонин, катехоламины и другие вещества. В *γ -гранулах* (лизосомах) находятся гидролитические ферменты — пероксидаза, глюкозидаза, галактозидаза, кислая фосфатаза, неспецифическая эстераза. При этом тромбоциты способны секретировать содержимое гранул как частично (при обратимой активации), так и полностью — при реакциях высвобождения, связанных с необратимой агрегацией. Так, секреция компонентов α - и δ -гранул происходит в процессе адгезии и активации тромбоцитов и способствует обратимой агрегации (агрегация I, см. рисунок 1). В свою очередь, лизосомы секретируют хранящийся в них секрет только при необратимой агрегации тромбоцитов (агрегация II, рисунок 1). После дегрануляции гранулы не восстанавливаются, цитоплазма тромбоцитов «опустошается», тромбоциты теряют свою физиологическую активность и подвергаются быстрой элиминации в селезенке. При качественных дефектах тром-

боцитов (тромбоцитопатиях) нарушаются «реакции высвобождения» гранул, что обуславливает повышенную кровоточивость.

Одновременно с адгезией и активацией тромбоцитов наступает их *агрегация*, которая заключается в присоединении активированных тромбоцитов, находящихся в токе крови, друг к другу и к тромбоцитам, ранее фиксированным в области повреждения. Процесс агрегации осуществляется с помощью фибриногена, который связывается с рецепторами GPIIb-IIIa на активированных тромбоцитах, что обеспечивает формирование «фибриновых мостиков» между клетками. Также GPIIb-IIIa имеет места связывания с фактором Виллебранда и другими молекулами адгезии. Это имеет значение для эффективной агрегации тромбоцитов в условиях воздействия высоких скоростей кровотока.

Агрегация тромбоцитов может быть *обратимой*, когда происходят лишь частичные конформационные изменения и частичная секреция гранул, а спустя некоторое время тромбоцит возвращается в интактное состояние и поступает в ток крови (агрегация I на рисунке 1). Впоследствии такой тромбоцит может повторно активироваться и вступать во взаимодействие с другими клетками и структурами. Обратимая агрегация возникает при кратковременном воздействии слабого стимула. К слабым стимуляторам тромбоцитов относятся АДФ, адреналин, вазопрессин, серотонин. При этом передача сигнала от рецепторов тромбоцитов проходит стадию усиления внутри клетки через дополнительный этап образования тромбоксана и секреции хранимых в гранулах активных компонентов. Так, взаимодействие стимулятора с рецепторами мембраны тромбоцитов приводит к активации фосфолипазы и высвобождению из мембранных фосфолипидов арахидоновой кислоты. Из арахидоновой кислоты в тромбоцитах образуется тромбоксан A_2 , который увеличивает проницаемость плазматической мембраны тромбоцитов для ионов Ca^{2+} — внутриклеточного мессенджера (посредника) перемещения различных молекул. Повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , а также образование тромбоксана A_2 являются факторами, обеспечивающими секрецию компонентов тромбоцитарных гранул в процессе активации тромбоцитов, что приводит к агрегации. В связи с этим при исследовании агрегации тромбоцитов в присутствии слабых стимуляторов на агрегатограммах кривая имеет двухступенчатую форму, что обусловлено усилением агрегации после выделения содержимого пулов хранения (см. подраздел 2.1.4).

При длительной или сильной стимуляции (к сильным стимуляторам тромбоцитов относятся коллаген, тромбин, большие дозы АДФ), происходит *необратимая агрегация* тромбоцита (агрегация II на рисунке 1). В этом случае тромбоцит прочно фиксируется к другим клеткам или внеклеточным структурам, происходит полная дегрануляция и секреция содержимого пулов хранения (реакция высвобождения). Такой тромбоцит, даже в

случае возвращения его в кровоток, не может в дальнейшем вступать во взаимодействие с другими клетками и быстро элиминируется из кровообращения. При наличии большого количества таких тромбоцитов в кровотоке (например, при ДВС-синдроме) в тестах *in vitro* выявляется снижение агрегации тромбоцитов со всеми индукторами.

Активация, адгезия и сопутствующая этим процессам агрегация тромбоцитов лежит в основе образования тромбоцитарного тромба. По мере удаления от зоны повреждения концентрация агонистов активации и агрегации тромбоцитов снижается и соответственно уменьшается степень активации тромбоцитов. Дистально расположенные активированные тромбоциты отрываются от сгустка и возвращаются в кровоток. Таким образом, периферическая дезагрегация тромбоцитов предотвращает неограниченный рост сгустка.

Регуляция процессов активации и агрегации тромбоцитов в организме человека осуществляется рядом биологически активных факторов, среди которых наиболее важное значение играют тромбоксан A_2 и простагландин I_2 (простациклин), АДФ, тромбин. При сохранении целостности эндотелиального покрова действие простациклина преобладает над тромбоксаном A_2 , благодаря чему в сосудистом русле не наблюдается адгезии и агрегации тромбоцитов. При повреждении эндотелия в месте травмы синтез простациклина не происходит, и тогда проявляется влияние тромбоксана, приводящее к образованию тромбоцитарной пробки. АДФ высвобождается из плотных гранул тромбоцитов в ответ на повреждение сосуда, при стимуляции коллагеном, адреналином или тромбоксаном. АДФ в зависимости от дозы может вызывать обратимую или необратимую агрегацию тромбоцитов. Тромбин вызывает агрегацию тромбоцитов как непосредственно, так и за счет стимуляции выделения АДФ и инициации синтеза тромбоксана. Тромбин вызывает образование фибрина, который связывается мембранными гликопротеидами GPIIb-IIIa активированных тромбоцитов и образует между ними «мостики», обеспечивая прочное склеивание тромбоцитов.

Образовавшаяся вследствие вышеописанных процессов тромбоцитарная пробка в дальнейшем сокращается и уплотняется, то есть наступает ее *ретракция*. Данный процесс обеспечивается за счет сокращения фибрилл миозина, фиксированных к мембранным гликопротеидам (GPIIb-IIIa), и постепенного «сжимания» цитоплазмы активированного тромбоцита. Ретракция способствует улучшению механических свойств сгустка.

Схематически механизмы сосудисто-тромбоцитарного гемостаза представлены на рисунке 1.

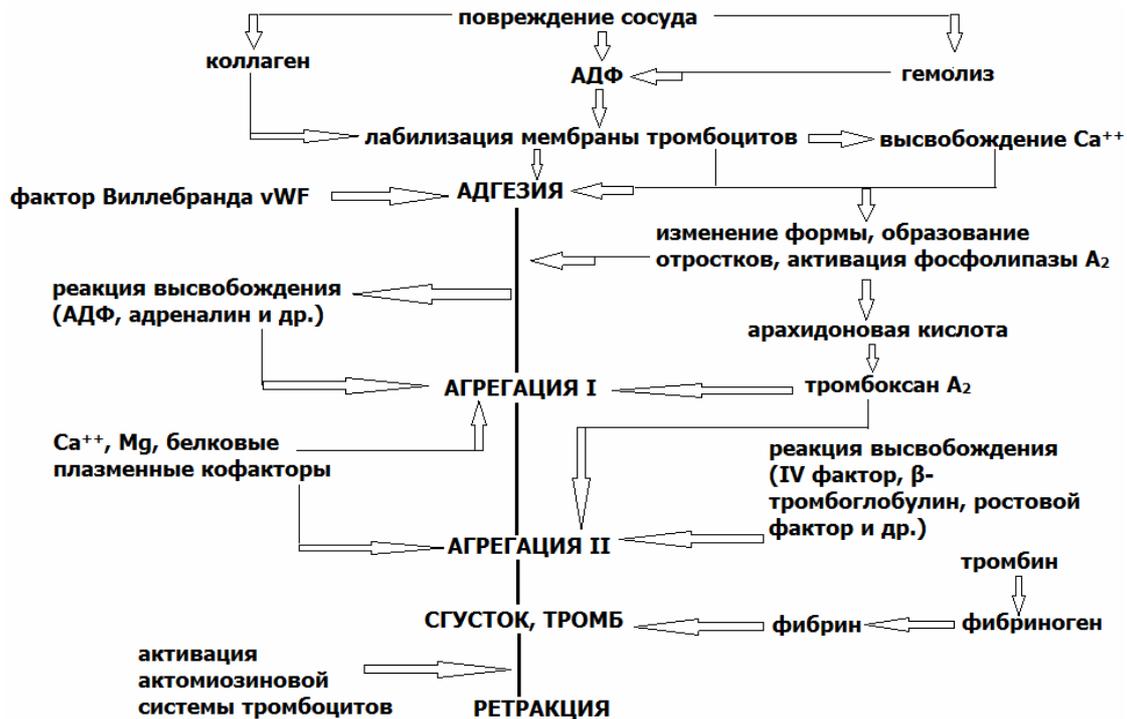


Рисунок 1 — Схема тромбоцитарного гемостаза

Примечание. Повреждение сосуда приводит к обнажению коллагена субэндотелия, выделению АДФ из тромбоцитов и эритроцитов, что способствует лабильзации мембраны тромбоцитов с появлением на внешней мембране отрицательно заряженных фосфолипидов. Включается процесс адгезии, важнейшую роль в котором играет фактор Виллебранда; ионы кальция выступают в роли кофакторов. Активированные тромбоциты секретируют факторы, способствующие агрегации. Агрегация I (обратимая агрегация) происходит под влиянием слабых стимулов (АДФ, адреналин). Агрегация II (необратимая) наблюдается при воздействии более сильных стимулов (тромбин, большие дозы АДФ, вещества, которые выделяются в результате реакции высвобождения). Фибрин обеспечивает более прочную агрегацию тромбоцитов и формирование тромбоцитарного тромба. Ретракция сгустка обеспечивается активацией актомиозиновой системы тромбоцитов. Для нормального осуществления агрегации тромбоцитов необходимы ионы Ca и Mg, а также участие метаболита арахидоновой кислоты — тромбоксана A₂.

1.2. Коагуляционный (плазменный) гемостаз

Коагуляционный гемостаз, как указывалось выше, обеспечивает образование фибрина, который уплотняет тромбоцитарный тромб и закрепляет его в месте повреждения сосуда. Процесс условно подразделяют на 4 фазы (рисунок 2):

- образование протромбиназы, необходимой для превращения протромбина в тромбин;
- образование тромбина из протромбина под действием протромбиназы;
- образование фибрина из фибриногена под влиянием тромбина;
- ретракция сгустка и спонтанный фибринолиз — посткоагуляционная фаза.

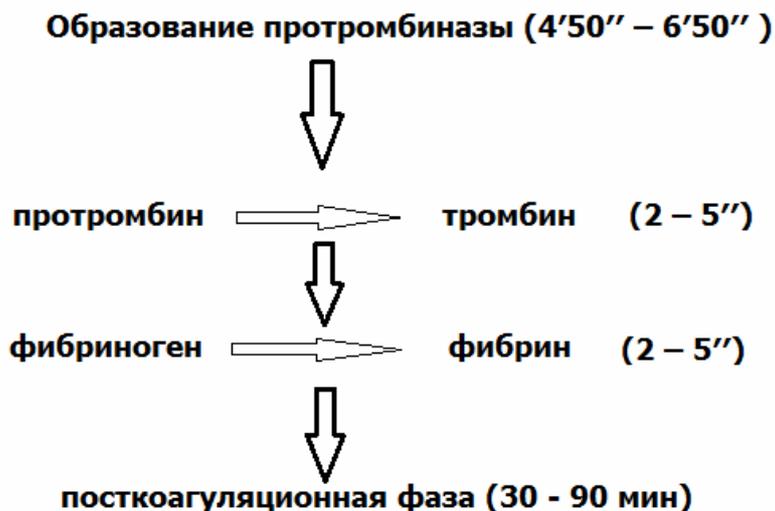


Рисунок 2 — Основные фазы плазменного гемостаза

Реализация процессов образования сгустка осуществляется посредством последовательных взаимодействий факторов свертывания крови с участием субстратных белков (фибриноген) и ионов кальция (таблица 1).

Таблица 1 — Факторы свертывания крови

Обозначение	Наименование	Содержание в плазме, г/л	% активности в нормальной плазме	Период полужизни, дни	Минимальный уровень, необходимый для гемостаза
I	Фибриноген	1,8–3,5	–	3–5	0,8 г/л
II	Протромбин	Около 0,1	80–120	2,5	30 %
V	Проакцелерин	Около 0,01	70–150	0,5–1,0	10–15 %
VII	Проконвертин	Около 0,005	80–120	2–3 ч	10–20 %
VIII	Антигемофильный глобулин А	0,01–0,02	70–150	0,5–0,7	20–35 %
IX	Антигемофильный глобулин В (фактор Кристмаса)	Около 0,005	70–130	1,0–1,3	20–30 %
X	Фактор Стюарта-Прауэра	Около 0,01	80–120	1,3–2,0	20–25 %
XI	Антигемофильный глобулин С (плазменный предшественник тромбопластина, фактор Розенталя)	Около 0,005	70–130	2,5–3,5	?
XII	Фактор Хагемана (контактный фактор)	Около 0,03	70–150	2,0–3,0	?
XIII	Фибринстабилизирующий фактор (фибриназа, фактор Лаки-Лоранда)	0,05–0,08	70–140	5,0–10,0	5 %
vWF	Фактор Виллебранда	0,05 мкМ	Варьирует	1,0–3,0	?
ПК	Прекалликреин (фактор Флетчера)	0,03–0,05		–	< 1 %
ВМК	Высокомолекулярный кининоген (фактор Фитцджеральда)	0,06–0,08		–	< 1 %

Международная номенклатура факторов свертывания включает 13 факторов свертывания, имеющих римскую нумерацию, а также дополнительные факторы — фактор Виллебранда (vWF), фактор Флетчера прекалликреин (ПК), фактор Фитцджеральда высокомолекулярный кининоген (ВМК) (таблица 1).

Большинство факторов свертывания являются белками. Они находятся в крови в виде неактивных проэнзимов или в форме неактивных кофакторов. Исключение составляет фактор VII, примерно 1–2 % которого в норме циркулируют в активной форме. Факторы пронумерованы римскими цифрами в порядке их открытия и доказательства роли в гемокоагуляции. Их активные формы образуются при частичном протеолизе и обозначаются прибавлением к номеру буквы «а». Для обозначения участия в свертывании плазмы тканевого фактора (или тканевого тромбопластина) и ионов кальция им ранее были присвоены символы соответственно III и IV. Однако в настоящее время римская нумерация для них не используется, так как они не относятся непосредственно к плазменным факторам (тканевой тромбопластин) либо не являются белком (ионы Ca). Фактор VI (акцелерин) — активная форма фактора V (проакцелерина), поэтому он исключен из употребления и международной номенклатуры.

Ионы кальция (ранее фактор IV) — имеют важнейшее значение для активации протромбиназы и превращения протромбина в тромбин, ускорения процесса превращения фибриногена в фибрин. Ионы кальция также необходимы для взаимодействия факторов свертывания с фосфолипидной поверхностью клеток. В норме содержание ионов кальция в плазме составляет 2,0–2,75 ммоль/л. Феномен связывания ионов кальция цитратом натрия используется для предотвращения коагуляции крови, используемой для лабораторного исследования состояния системы гемостаза (см. далее подраздел 2.2.1).

Дополнительные факторы обладают широким спектром регулирующих функций в процессе гемостаза. Так, ПК после активации фактором XIIa превращается в калликреин, который катализирует гидролиз связей ВМК. При этом освобождается брадикинин, который контролирует множество физиологических и патогенетических процессов. ВМК контролирует адгезию и активность тромбоцитов, функциональную активность эндотелиоцитов. ВМК трансформируется в кинин под действием калликреина и участвует в активации ф. XI, ускоряя действие на последний ф. XIIa. vWF играет важную роль в сосудисто-тромбоцитарном и коагуляционном звеньях гемостаза: является носителем для ф. VIII и посредником адгезии тромбоцитов к коллагену в месте повреждения (см. выше, подраздел 1.1).

ВМК, ПК совместно с факторами XI и XII принято обозначать как «факторы контакта». Они связываются с коллагеном базальной мембраны эндотелия или с отрицательно заряженной фосфолипидной поверхностью мембраны тромбоцитов, взаимно активируют друг друга и образуют ком-

плекс [IXa+VIIIa+Ca²⁺], запуская процесс свертывания крови по внутреннему пути (см. рисунок 3). В связи с этим внутренний путь образования протромбиназы также называют «контактным».

Ряд факторов свертывания для своего полноценного формирования требуют наличия витамина К (так называемые витамин-К-зависимые факторы свертывания). Витамин-К-зависимыми белками являются факторы II, -VII, -IX, -X, протеины С и S.

Витамин-К-зависимые факторы свертывания и антикоагулянтные белки (протеины С и S) синтезируются в печени и имеют сходную структуру молекулы. Характерной их особенностью является наличие уникальной аминокислоты – γ -карбоксивлутамина. Эта аминокислота образуется во время синтеза витамин-К-зависимых белков в печени путем γ -карбокислирования глутамина ферментом γ -карбоксивлутаминпептидазой, в работе которого принимают участие активированные формы витамина К. γ -карбоксивлутамин дает возможность витамин-К-зависимым факторам с помощью ионов Ca²⁺ образовывать комплексы с отрицательно заряженными фосфолипидами.

Взаимодействие факторов свертывания между собой и с физиологическими антикоагулянтами почти на всем протяжении процесса свертывания крови происходит на фосфолипидах, расположенных на наружной поверхности клеточной мембраны тромбоцитов и эндотелиоцитов. Наибольшей прокоагулянтной активностью обладают отрицательно заряженные фосфолипиды – фосфатидилхолин, фосфатидилсерин или фосфатидилэтаноламин. Для активизации плазменного гемостаза необходим также выход фосфолипидов из клеток, что возможно при повреждении мембран и активации тромбоцитов. Функция фосфолипидов состоит в образовании на поверхности клеток (в присутствии ионов Ca²⁺) активированных факторов X+V, IX+VIII и протромбина.

Первая фаза коагуляционного гемостаза — образование протромбиназы. Это сложный многоступенчатый процесс, в результате которого в крови накапливается комплекс факторов, способных превратить протромбин в тромбин, который называется протромбиназой [Xa+Va+**фосфолипид (фактор 3 тромбоцитов)**+Ca²⁺]. Образование протромбиназы может проходить двумя путями: внешним и внутренним. При этом внешний и внутренний механизмы не обособлены друг от друга, а тесно взаимосвязаны между собой, поэтому их разграничение условно, но делает понятной трактовку применяемых в клинической практике коагуляционных тестов.

Пусковым фактором внешнего пути является травмированная сосудистая стенка или внесосудистая ткань, которые содержат тканевой фактор (ТФ, фактор III — тканевой тромбопластин). Он состоит из белка — апопротеина III и комплекса фосфолипидов, экспрессируется на поверхности практически всех клеток организма, за исключением эндотелия и клеток крови.

При контакте плазмы с клетками, несущими тканевой фактор, происходит активация внешнего механизма свертывания крови вне нарушенного кровеносного сосуда. Эндотелиальные клетки экспрессируют ТФ только при их стимуляции, например, при различных патологических процессах, когда антикоагулянтный потенциал эндотелия меняется на прокоагулянтный. При контакте ТФ и ф. VIIa формируется комплекс, который активирует ф. X. Фактор Xa при участии ф. Va, в присутствии ионов Ca^{2+} , на отрицательно заряженной фосфолипидной поверхности формирует протромбиназу. Фактор VIIa также активирует ф. IX в присутствии ТФ, обеспечивая связь между внешним и внутренним путями. В настоящее время полагают, что внешний путь — основной физиологический путь запуска процесса свертывания крови. Он значительно короче, чем внутренний. Благодаря этому первые порции тромбина, переводящего фибриноген в фибрин, образуются уже через 5–7 с после травмы. В лабораторных условиях этот механизм воспроизводится в тесте *Протромбиновое время* (см. подраздел 2.2.2.2).

Пусковым моментом последовательности реакций внутреннего пути образования протромбиназы служит повреждение сосудистой стенки. При этом тромбоциты, на рецепторах которых адсорбируются прокоагулянты, устремляются к месту повреждения, где происходит их активация. Помимо этого тромбоциты становятся поставщиком плазменных факторов (прежде всего XII — фактора Хагемана). При связывании «факторов контакта» (прекалликреин, кининоген) с коллагеном базальной мембраны эндотелия или с отрицательно заряженной чужеродной поверхностью происходит их активация. Прекалликреин (фактор Флетчера) под влиянием своего кофактора — высокомолекулярного кининогена (фактор Фицджеральда) превращается в калликреин. Контакт фактора Хагемана с коллагеном поврежденной сосудистой стенки приводит к его активации, этот процесс усиливается высокомолекулярным кининогеном и калликреином. Образование активной формы XII фактора служит сигналом для запуска внутреннего механизма коагуляции с последовательной активацией XI, IX и VIII факторов с участием ионов кальция. Образовавшийся комплекс активирует X фактор, что приводит к образованию необходимого количества протромбиназы. Процесс образования протромбиназы по внутреннему пути длится в среднем от 5 до 7 мин.

В лабораторных условиях активация по внутреннему пути может быть достигнута с использованием некоторых небιологических отрицательно заряженных поверхностей, например, стекла, каолина, кремния, сульфата декстрана, а также в присутствии эллаговой кислоты. Оценка свертывания по внутреннему механизму в клинико-диагностических лабораториях производится с помощью теста *активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ)* (см. подраздел 2.2.2.1).

Начиная с момента образования протромбиназы внешний и внутренний пути соединяются в общий путь.

Следует отметить ключевую роль **XII фактора** в реализации процессов гемостаза. Активация фактора Хагемана может осуществляться не только при контакте с коллагеном и протеазами, но и с помощью ферментного расщепления (калликреином, плазмином, другими протеазами). XII фактор является универсальным активатором всех плазменных протеолитических систем (свертывающей, калликреин-кининовой, плазминовой) и системы комплемента. Посредством активации калликреин-кининовой системы внутренний и внешний механизмы взаимно активируют друг друга (между отдельными их этапами существуют своеобразные «мостики» — альтернативные пути для процессов коагуляции). Так, комплекс факторов XIIa-калликреин-кининоген (внутренний механизм) ускоряет активацию фактора VII (внешний механизм), а фактор VIIa ускоряют активацию фактора IX (внутренний механизм).

Вторая фаза коагуляционного гемостаза — трансформация протромбина (ф. II) в тромбин (IIa) под действием протромбиназного комплекса, в котором активным началом является ф.Ха, а акцелератором процесса — ф. Va. Продолжительность данной фазы 2–5 с.

Тромбин (фактор IIa) — ключевой фермент гемостаза — является сериновой протеазой. Его неактивный предшественник — протромбин — синтезируется в печени. В плазме крови протромбин содержится в количестве около 0,1 г/л (снижается при нарушении белково-синтетической функции печени). Важнейшие функции тромбина в гемостазе:

- ограниченный протеолиз фибриногена до фибрин-мономеров (происходит в кровотоке);
 - активация ф. V, VIII, VII, XI;
 - активация тромбоцитов;
 - активация протеина С в комплексе с тромбомодулином;
 - активация ф. XIII.;
 - стимуляция выброса из эндотелиоцитов тканевого активатора плазминогена.
- Важнейшим ингибитором тромбина является антитромбин III.

Третья фаза коагуляционного гемостаза — образование из растворимого плазменного белка фибриногена нерастворимого фибрина под воздействием тромбина и ф. XIII.

Фибриноген (фактор I) — крупный многокомпонентный белок, синтезируется в печени, состоит из трех пар полипептидных цепей — 2α , 2β , 2γ , связанных между собой дисульфидными мостиками и переплетенных друг относительно друга. Пространственная структура молекулы фибриногена состоит из центрального E-домена и 2 периферических D-доменов. α - и β -цепи формируют глобулярные структуры – фибринопептиды А и В (ФП А и ФП В), которые закрывают комплементарные участки в фибриногене и не позволяют этой молекуле полимеризоваться.

Общая схема коагуляционного каскада представлена на рисунке 3.

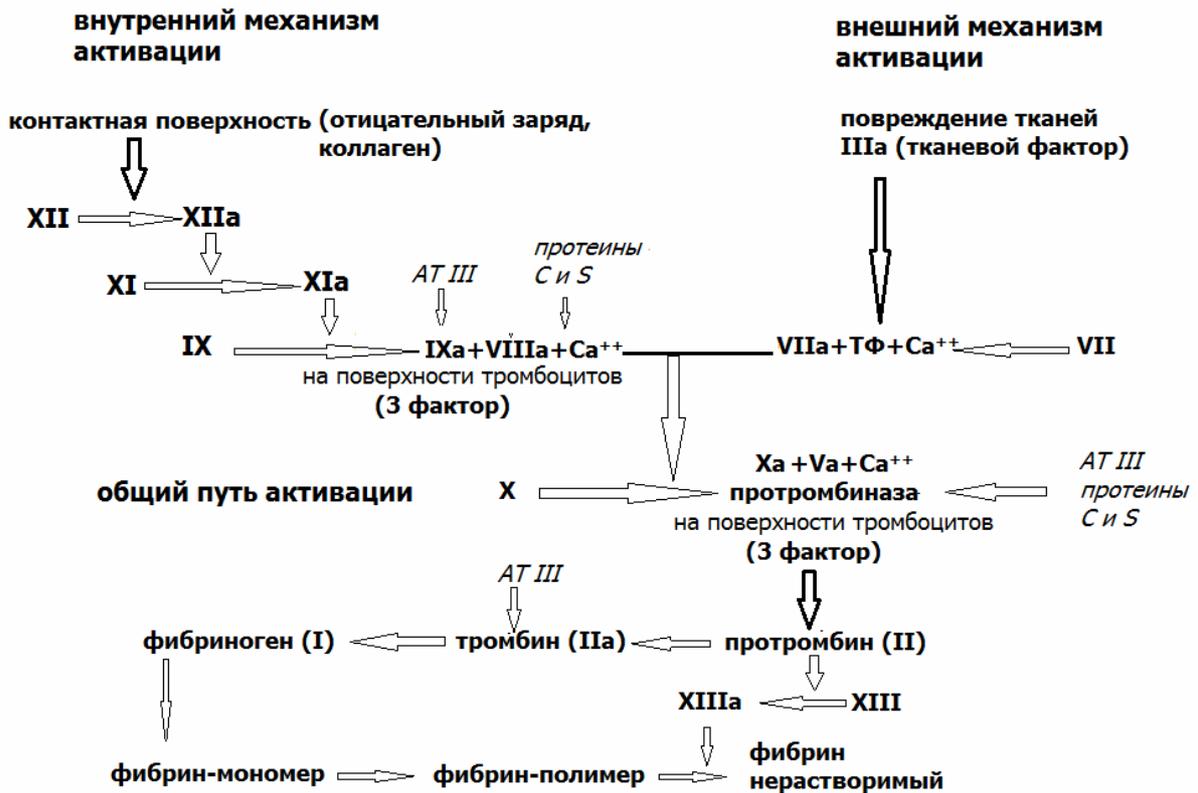


Рисунок 3 — Схема коагуляционного гемостаза

Примечание. Внутренний путь активируется при контакте с отрицательно заряженной поверхностью (поврежденный эндотелий, коллаген субэндотелия) фактора Хагемана (XII), который вызывает последовательную активацию факторов свертывания XI, IX+VIII и образование активного комплекса внутреннего пути [IXa+VIIIa+Ca⁺⁺]. Внешний путь запускается поступлением в кровь извне тканевого фактора (фактор III). Происходит активация ф. VII и образуется активный комплекс внешнего пути [VIIa+ТФ+Ca⁺⁺]. Под влиянием активных комплексов внешнего и внутреннего путей активируются ф. X и ф. V и образуется протромбиназа — комплекс факторов [Xa+Va+Ca⁺⁺]. Для взаимодействия факторов свертывания между собой и образования активных комплексов необходимо участие тромбоцитов, которые предоставляют фосфолипидную поверхность — 3 фактор. Протромбиназа трансформирует протромбин в тромбин. Тромбин расщепляет фибриноген до фибрин-мономеров, которые затем полимеризуются в фибрин-полимер. Фактор XIII (фибрин-стабилизирующий фактор), активированный тромбином, в присутствии ионов Ca²⁺ превращает нестабильный растворимый фибрин в стабильный нерастворимый фибрин. Курсивом выделены факторы, осуществляющие отрицательную регуляцию процесса свертывания — физиологические антикоагулянты (анти тромбин III, система протеинов C и S).

Процесс взаимодействия фибриногена и тромбина включает несколько этапов. На первом этапе под действием тромбина происходит отщепление конечных последовательностей от α- и β-цепей фибриногена и высвобождение фибринопептидов А и В. В результате образуются растворимые фибрин-мономеры, которые имеют свободные связи. На следующем (неферментном) этапе происходит спонтанное соединение (полимеризация)

комплементарных участков фибрин-мономеров вначале в димеры, затем — в тетрамеры и более крупные олигомеры, остающиеся еще в растворенном виде и представляющие собой мононити полимеризованного фибрина шириной в 2 молекулы. Компоненты превращения фибриногена на данных этапах (ФП А и ФП В, фибрин-мономеры, фибрин-олигомеры) обозначаются как растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) в связи со способностью растворяться в 5М растворе мочевины. В качестве синонима используется термин **«растворимый фибрин»** — РФ или фибрин S (soluble — растворимый). Данный фибрин не может обеспечить полноценный гемостаз, так как легко растворяется плазмином.

В норме РФ находится в крови в минимальном количестве и не определяется лабораторными тестами. При активации процесса свертывания крови развивается тромбинемия (быстрое нарастание концентрации тромбина) и происходит образование большого количества РФ, часть которого не успевает полимеризоваться и циркулирует в крови. Поэтому повышенное количество растворимого фибрина в плазме является маркером активации свертывающей системы крови (в англоязычной литературе его иногда называют «белок, предшествующий тромбозу» — Thrombus Precursor Protein) и выявляется при ДВС-синдроме, тромбозах и тромбофилиях. Чем выше активность тромбообразования в организме, тем выше уровень циркулирующих в крови РФМК.

Для определения растворимого фибрина в современной клинической практике наиболее широко используются иммунологические методы (латекс-агглютинация, иммуноферментный анализ). Ранее широко применялись так называемые *тесты паракоагуляции* (см. подраздел 2.2.2.5). В настоящее время за рубежом эти тесты не используются, а в нашей республике сохраняют свое значение как экспресс-методы.

Соединяясь с фибриногеном, тромбин не только отщепляет фибринопептиды, но и активирует связанный с ним фактор XIII (рисунок 3). Фактор XIIIа образует ковалентные связи между γ -цепями (D-доменами) нитей растворимого фибрина. Сшитые между собой мононити фибрина образуют прочную сеть, менее подверженную фибринолизу и более устойчивую к механическим воздействиям. В такой форме фибрин не растворяется в 5М растворе мочевины и называется *нерастворимым фибрином* (фибрин I, insoluble).

Основные этапы процесса полимеризации фибрина представлены на рисунке 4.

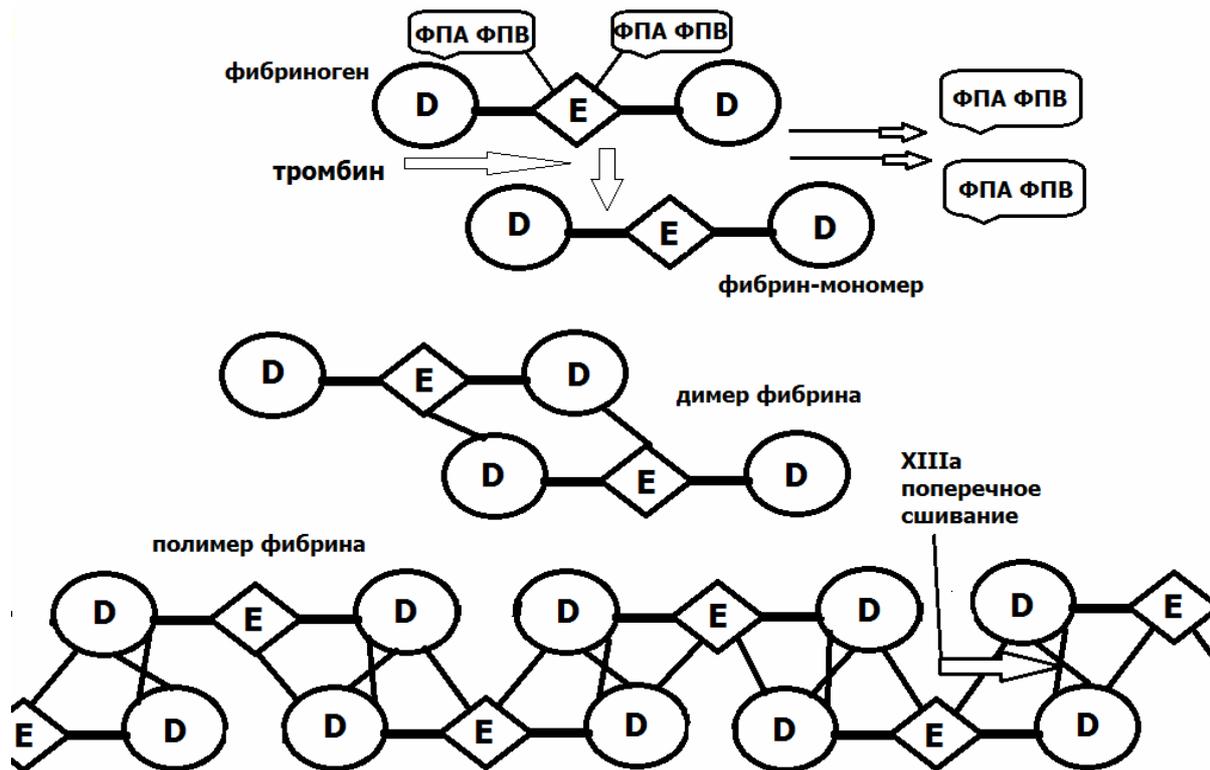


Рисунок 4 — Схема превращения фибриногена в фибрин

Примечание. Тромбин отщепляет от E-домена молекулы фибриногена два фибринопептида А и два фибринопептида В, в результате чего образуются фибрин-мономеры. За счет формирования связей между D-и E-доменами субъединиц фибрина в параллельных зонах образуются димеры фибрина. Активированный ф. XIII катализирует формирование дополнительных перекрестных связей между D-доменами смежных субъединиц фибрина. Эти связи стабилизируют молекулу фибрина, образуется нерастворимый фибрин-полимер.

Конечный этап свертывания крови в лабораторных условиях воспроизводится в тесте *Тромбиновое время* (см. подраздел 2.2.2.3).

Четвертая фаза коагуляционного гемостаза — посткоагуляционная. Продолжительность фазы 30–90 мин. В это время происходит ретракция сгустка и спонтанный фибринолиз. Спонтанный фибринолиз осуществляется на поверхности сгустка с помощью специальной системы фибринолиза (см. подраздел 1.3.2). Благодаря ему, фибриновая сеть первичного тромба частично растворяется, а освободившиеся от фибрина форменные элементы отделяются от сгустка. Одновременно происходит ретракция сгустка, из него выделяется 60–75 % сыворотки. Баланс между фибринообразованием и фибринолизом способствует уплотнению тромба и выполнению им гемостатической функции на период восстановления целостности сосудистой стенки, после чего равновесие сдвигается в сторону фибринолиза и тромб растворяется.

1.3. Противосвертывающая (антикоагулянтная) система

Процесс свертывания крови в физиологических условиях практически полностью контролируется противосвертывающей системой. Запуск противосвертывающей системы происходит параллельно активизации системы свертывания.

Антикоагулянтная система организма состоит из собственно антикоагулянтов и системы фибринолиза.

1.3.1. Антикоагулянты

Физиологическое значение антикоагулянтов заключается в ограничении трансформации факторов свертывания в активную форму и предотвращении образования сгустков фибрина в токе крови. Это имеет чрезвычайную важность, так как свертывающий потенциал 1 мл крови является достаточным для превращения всего фибриногена в организме в фибрин в течение 10–15 с.

Естественные антикоагулянты подразделяются на первичные и вторичные.

Первичные (физиологические) антикоагулянты постоянно присутствуют в кровеносном русле, независимо от процесса свертывания крови. К ним относятся антитромбин III, гепарин, протеины C и S, ингибитор внешнего (тканевого) пути свертывания крови (ИПТФ — ингибитор комплекса ф.ТФ+VIIa+Ca²⁺), α 2-макроглобулин, антитрипсин и др. Все перечисленные факторы, за исключением белков системы протеина C и α 2 — макроглобулина, а также ИПТФ относятся к серпинам (термин «серпины» представляет собой аббревиатуру английского термина (SERPIN), которым обозначаются ингибиторы сериновых протеаз). Их избыток, дисфункция или дефицит могут быть причиной тромбоза или кровотечения.

Вторичные (патологические) антикоагулянты образуются в ответ на появление в крови активных прокоагулянтов. Их образование обычно является результатом ферментативной деградации коагуляционных факторов, в силу чего последние теряют способность к участию в процессе свертывания крови и приобретают свойства антикоагулянтов. К вторичным антикоагулянтам относят антитромбин I (фибрин), антитромбин IX, антитромбопластины, ауто-II-антикоагулянт, фибринопептиды, метафактор Va, метафактор XIa, продукты деградации фибрина (ПДФ) и др.

Антитромбин III (АТ III) обладает наиболее выраженным антикоагулянтным действием, обеспечивая до 90 % всей антикоагулянтной активности крови. АТ III синтезируется гепатоцитами, а также в небольшом количестве клетками эндотелия. Его эффект обусловлен формированием стабильного комплекса практически со всеми сериновыми протеазами плазменного гемостаза. Активности находящегося в крови здорового человека АТ III достаточно, чтобы ингибировать в 3 раза больше тромбина, чем может образоваться из циркулирующего протромбина. Скорость ингибирования протеаз АТ III значительно повышается в присутствии гепарина. С

этим связан антикоагулянтный эффект гепарина, который, связываясь с тромбином, выполняет роль матрицы, обеспечивающей эффективное взаимодействие последнего с ингибитором.

Значение АТ III, как основного модулятора гемостаза, подтверждается наличием тенденции к тромбообразованию у лиц с врожденным или приобретенным дефицитом АТ III. Дефицит АТ III клинически проявляет себя рецидивирующими венозными и артериальными тромбоэмболиями, возникающими у нескольких членов семьи, довольно часто в раннем возрасте. Риск патологических тромбозов возрастает при снижении активности АТ III в плазме ниже 60 %. Низкая активность АТ III в крови выявляется при ДВС-синдроме, у пациентов с инфарктом миокарда, сахарным диабетом, атеросклерозом, болезнями печени, острым панкреатитом, тромбоэмболиями, возникающими в послеоперационном периоде, во второй половине беременности, в также в период родов и послеродовом периоде. Увеличение активности АТ III, и, соответственно, индуцированная гипокоагуляция, регистрируется при холестазах, меноррагиях, а также у пациентов, получающих антикоагулянты непрямого действия.

В клинико-диагностических лабораториях АТ III определяют иммунохимическими методами, тестами с хромогенными субстратами или коагуляционными методами (см. подраздел 2.2.2.6). Продукт взаимодействия тромбина и антитромбина III (ТАТ) — неактивный комплекс, в котором оба ингредиента (тромбин и антитромбин III) быстро теряют свою активность. Увеличение ТАТ в системе циркуляции свидетельствует о развитии гиперкоагуляции с увеличением образования тромбина. Определение ТАТ иммунохимическими методами является одним из тестов в диагностике ДВС-синдрома. Клиренс ТАТ из системы циркуляции осуществляется достаточно быстро (в течение нескольких минут), поэтому присутствие ТАТ в плазме свидетельствует об образовании тромбина *in vivo* непосредственно в момент обследования. Это обуславливает информативность теста ТАТ в острых ситуациях.

Ингибитор пути тканевого фактора (ИПТФ) ограничивает синтез тромбина из протромбина за счет образования комплекса с ф.Ха и ф.ТФ+VIIa. В результате действия ИПТФ образуется полностью неактивный тетрамолекулярный комплекс ф.ТФ+VII+ИПТФ+ф.Х. Основным местом синтеза и локализации ИПТФ в организме является эндотелий капилляров, мегакариоциты и тромбоциты, а также моноциты крови, в меньшей степени — макрофаги и гепатоциты. В плазме около 90 % ИПТФ циркулирует в виде комплексов с липопротеинами (в основном низкой плотности), и только около 10 % приходится на свободную форму, обладающую наибольшей антикоагулянтной активностью. Некоторое количество ИПТФ находится в тромбоцитах и секретруется при их активации и агрегации, что повышает локальную концентрацию этого ингибитора в области тромбообразования. Высвобождение ИПТФ стимулирует фактор Ха, в резуль-

тате чего в плазме и на поверхности эндотелия образуется комплекс фактора Ха/ИПТФ, который блокирует активность прокоагулянтного комплекса ф.ТФ+VIIa. Препараты гепаринов способствуют выделению ИПТФ и увеличению его концентрации в плазме, а также усилению антикоагулянтной активности ИПТФ. Определение ИПТФ в плазме проводят методом ELISA или в тесте с хромогенным субстратом.

Система протеинов С и S включает непосредственно сам протеин С (ПС) и его кофактор протеин S (PS). Протеин С синтезируется гепатоцитами и циркулирует в кровотоке в неактивной форме. Его активация происходит при участии небольшого количества тромбина. Значительное ускорение этой реакции (примерно в 1000 раз) происходит при участии тромбомодулина — поверхностного белка эндотелиальных клеток, связывающегося с тромбином. В присутствии своего кофактора — протеина S активированный ПС расщепляет (путем протеолиза), а затем и инактивирует факторы Va и VIIa. Этот механизм эффективно предупреждает дальнейшее образование тромбина и трансформирует его в активатор антикоагулянтного механизма.

Оба естественных антикоагулянта (ПС и PS) являются важными модуляторами активации свертывания крови. Врожденный и приобретенный дефицит этих антикоагулянтов, а также развитие резистентности к ПС предрасполагает к развитию венозных и артериальных тромбозов. При этом тяжесть тромбофилии коррелирует со степенью дефицита этого белка. Гомозиготный дефицит ПС или PS встречается крайне редко и связан с летальными тромботическими осложнениями в неонатальном периоде (развитие фульминантной пурпуры или ДВС-синдрома в первые дни жизни). Тромботические проявления у пациентов с гетерозиготным дефицитом ПС или PS начинаются после 15 лет. Описана форма наследственной тромбофилии, в основе которой лежит наличие мутантного ф.V (Leiden). В результате мутации активированная форма ф.V становится резистентной к ПС и сохраняет свои прокоагулянтные свойства, способствуя большей, чем в норме, продукции тромбина. Эта патология сопровождается возникновением тромбозов сосудов различных локализаций — периферических вен, коронарных артерий, легочной артерии, вен сетчатки глаза и др. Приобретенный дефицит ПС или PS развивается при печеночной недостаточности, ДВС-синдроме, септических состояниях, нефротическом синдроме.

В клинической практике наличие и активность протеинов С и S определяют с использованием иммунохимических методов, а также методов с хромогенным субстратом (см. подраздел 2.2.2.6). Для выявления резистентности фактора Va к активированному ПС (аномалия фактора V) используются молекулярно-генетические методы (ПЦР).

Для профилактики и лечения венозных и артериальных тромбозов и тромбоемболий при различных патологических процессах, а также при

ДВС-синдроме в клинической практике используется *антикоагулянтная терапия*. Для проведения антикоагулянтной терапии используют нефракционированный гепарин, препараты низкомолекулярных гепаринов, антагонисты витамина К. *Гепарины* принято называть антикоагулянтами прямого действия. Непосредственно гепарин антикоагулянтной активностью не обладает. В крови гепарин взаимодействует с неактивной формой АТ III. В результате АТ III переходит в активное состояние и, в свою очередь, связывается с активными центрами факторов IIa, IXa, Xa, XIa и XIIa, что влечет за собой подавление их активности. Помимо этого гепарин подавляет протеолитическую активность тромбина и фактора XIII и тем самым блокирует переход фибриногена в фибрин. Ускоренное гепарином ингибирование факторов IIa и Xa в результате образования тройных комплексов (IIa+АТ III+гепарин и Xa+АТ III+гепарин) является основным механизмом антикоагулянтного эффекта гепаринов.

В группе гепаринов выделяют нефракционированные (НФГ) и низкомолекулярные (НМГ) гепарины. Первые представляют собой смесь полисахаридов, имеющих большой диапазон молекулярной массы — от 2000 до 30000 Da, тогда как молекулярная масса НМГ составляет 3000–7000 Da. Механизм действия НМГ отличается тем, что эти препараты обладают более высокой активностью в отношении фактора Xa, но не в отношении тромбина. Вследствие более короткой цепи НМГ не могут надежно образовывать комплекс IIa+АТ III+гепарин, а блокируют преимущественно фактор Xa, образуя комплекс Xa+АТ III+гепарин. Это различие в действии гепаринов оценивают по отношению активностей анти-Xa/антиIIa. Так, для препаратов НФГ это отношение составляет 1:1, а для НМГ — 2:1 до 4:1. Например, отношение ингибирующих активностей для фактора Xa и тромбина (анти-Xa/антиIIa) у фраксипарина и клексана составляет 3,7–4,1, у фракмина — до 2,0.

Препараты гепарина являются высокоэффективными антитромботическими лекарственными средствами и используются для лечения и профилактики тромботических осложнений (тромбоза глубоких вен, ТЭЛА), а также в качестве антикоагулянта при контакте крови с поверхностью оборудования аппаратов экстракорпорального кровообращения и диализных устройств. Кроме этого, препараты гепарина, особенно низкомолекулярного, широко используются при критических состояниях ряда болезней на гиперкоагуляционной фазе ДВС-синдрома. При профилактике тромбозов назначение гепарина (низкодозовый режим) предназначено для предотвращения образования тромбина. При терапии сформированного тромба гепарин используют и для инактивации тромбина, и для подавления последующего тромбинообразования. При этом гепарины с разной молекулярной массой демонстрируют разную фармакологическую активность и фармакокинетические характеристики. Так, для инактивации тромбина

достаточно минимальной длины гепариновой цепи. Короткоцепочечные (низкомолекулярные) гепарины обладают более высокой биодоступностью и медленнее, чем более длинные (нефракционированные). Антитромботическая активность НФГ широко варьирует в зависимости от врожденных и приобретенных особенностей синтеза АТ III и, соответственно, трудно предсказуема, что требует постоянного индивидуального лабораторного контроля показателей коагуляции — АЧТВ (в присутствии терапевтических доз гепарина это время удлиняется в 1,5–2,5 раза), а также содержания тромбоцитов и уровень активности АТ III. Это также диктует необходимость постоянного нахождения больного в стационаре. При этом частота возникновения осложнений, связанных с использованием НФГ выше. Так, в 1–3 % случаев на фоне введения гепарина развивается иммунная тромбоцитопения в связи с появлением аутоантител к комплексу гепарин с фактором 4 тромбоцитов. Возможно развитие кровоточивости, которая может возникать при использовании неадекватной дозировки или способа введения, а также может быть обусловлена повышенной индивидуальной чувствительностью к гепарину. При длительном (более 3 месяцев) назначении, например, при беременности гепаринотерапия может осложниться остеопорозом. Низкомолекулярные гепарины имеют несколько потенциальных преимуществ перед НФГ, включая высокую анти-Ха-факторную активность, прогнозируемый антикоагулянтный эффект, более длительный период полувыведения, лучшую биодоступность и меньшую частоту развития кровотечений. Использование НМГ не приводит к существенному увеличению времени свертывания крови, не влияет на агрегацию тромбоцитов или на связывание фибриногена тромбоцитами. Данные свойства позволяют использовать НМГ один раз в сутки, а также не требуют постоянного лабораторного контроля путем мониторинга АЧТВ. Для НМГ рекомендуется определение антиХа-активности 1 раз в начале лечения. Терапевтическая концентрация НМГ должна соответствовать уровню антиХа-активности плазмы от 0,2 до 1,5 МЕ/мл.

Антагонисты витамина К обозначаются как антикоагулянты непрямого действия. Главный механизм действия этих антикоагулянтов — блокада конечного этапа синтеза (γ -карбоксилирование) в клетках печени витамин-К-зависимых факторов свертывания крови (VII, X, IX и протромбина — II) и двух естественных антикоагулянтов — протеина С и его кофактора протеина S. (см. подраздел 1.2). В ходе карбоксилирования витамин К окисляется в эпоксид, а затем восстанавливается в активную форму с помощью фермента эпоксидредуктазы. Антикоагулянты непрямого действия (АНД) угнетают фермент, преобразующий витамин К в его эпоксидную форму, необходимую для карбоксилирования факторов свертывания крови в процессе их синтеза. В результате синтезируются частично декарбоксилированные белки со сниженной коагуляционной активностью. Скорость

снижения активности всех четырех факторов свертывания под влиянием непрямых антикоагулянтов неодинакова. Первым снижается фактор VII, время полужизни которого в плазме крови равно 2–4 часам, затем факторы IX и X, периоды полужизни которых составляют 48 часов, и последним — II (протромбин), примерно через 4 суток после начала приема АНД. В той же последовательности происходит и восстановление уровней факторов после отмены препаратов: быстро нормализуется фактор VII, позже — факторы IX и X, а затем — протромбин (через несколько дней).

Наряду с нарушением биосинтеза факторов свертывания, АНД угнетают карбоксилирование естественных антикоагулянтов — протеинов С и S. При этом снижение уровня протеина С происходит быстрее, чем снижение образования витамин К-зависимых факторов свертывания. Также АНД ингибируют эпоксидредуктазу и блокируют восстановление эпоксида витамина К в активную ферментную форму. АНД применяют в случаях, когда необходимо вызвать длительное снижение свертывания крови.

В зависимости от химической структуры выделяют производные монокумарина (варфарин, аценокумарол), дикумарина (этилбискумацетат) и индандиона (фениндион). Препараты АНД также разделяют по скорости наступления антикоагулянтного эффекта и способности кумулироваться:

- дикумарин, фепромарон, синкумар, варфарин — обладают выраженными кумулятивными свойствами, действуют они медленно (максимальный эффект наступает через 24–48 ч, а иногда и позднее);
- неодикумарин — обладает кумуляцией средней выраженности, эффект наступает через 16–18 ч;
- фенилин и омефин кумулируются — характеризуются слабой кумуляцией, проявляют свое действие через 8–10 ч после введения.

Антикоагулянты непрямого действия отличаются тем, что они могут длительно (месяцами, годами) применяться не только в стационарах различного профиля, но и в амбулаторных (домашних) условиях; кроме того, форма выпуска в таблетках и многократно дешевле, чем антикоагулянты прямого действия, которые вводятся инъекционно.

Применение АНД показано при необходимости длительной и непрерывной антикоагулянтной терапии или профилактики при наличии или угрозе рецидивирующих венозных тромбозов различной локализации, в особенности при высоких илеофemorальных тромбозах и тромбозах вен малого таза, которые определяют высокий риск ТЭЛА. Бесперывное длительное применение АНД показано при пароксизмальных или постоянных формах мерцания предсердий (особенно атеросклеротического генеза) и в случаях наличия внутрисердечного тромба, что является высоким фактором риска развития мозговых инсультов. Многолетний прием АНД показан при протезировании клапанов сердца, когда вероятность тромбоэмболических осложнений очень высока, особенно в первые несколько лет

после протезирования. Пожизненная антитромботическая терапия показана при ряде наследственных или приобретенных тромбофилий: дефицит АТ III, антифосфолипидный синдром. Пролонгированное (не менее 3 месяцев) применение АНД показано вследствие использования гепаринов у ортопедических больных после пластики суставов конечностей, при лечении переломов костей (особенно нижних конечностей) и обездвиженных больных с целью профилактики тромбоза глубоких вен и ТЭЛА.

Контроль за терапевтическим уровнем гипокоагуляции при применении АНД необходимо осуществлять по данным МНО (оптимальный уровень 2,0–3,0) (см. подраздел 2.2.2.2), что обеспечивает сравнимость и адекватный подбор дозы АНД и позволяет избежать осложнений в виде кровотечений различной клинической выраженности.

1.3.2. Система фибринолиза

Как указывалось выше, в процессе формирования гемостатической пробки активизируются механизмы, направленные на предотвращение избыточного фибринообразования и ограничение роста сгустка, а также на постепенное растворение тромба и создание условий для нормального кровообращения. Осуществляется эта функция благодаря *системе фибринолиза*.

Фибринолиз — это расщепление нитей фибрина на растворимые компоненты. Фибринолиз и восстановление стенки сосуда начинаются сразу же после образования фибринового тромба. Фибринолиз осуществляется протеолитическим ферментом плазмином, находящимся в плазме в виде неактивной формы плазминогена. Регуляция процессов фибринолиза происходит за счет сбалансированного действия активаторов и ингибиторов, содержащихся в крови и тканях. Активаторы плазминогена: тканевой активатор плазминогена (тАП), урокиназный активатор плазминогена — (урокиназа, уАП), ф.ХIIa, стрептокиназа и стафилокиназа и др. Ингибиторы плазмина/плазминогена:

- ✓ ингибиторы тканевого активатора плазминогена типа 1, 2, 3 (ИАП-1, II, III);
- ✓ α 2-антиплазмин (α 2-АП);
- ✓ α 2-макроглобулин;
- ✓ α 1-антитрипсин;
- ✓ активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (АТИФ).

Различают *первичный фибринолиз*, который наблюдается при поступлении в кровь больших количеств активаторов плазминогена, и *вторичный фибринолиз* — развивается в ответ на внутрисосудистое свертывание крови.

Процесс фибринолиза складывается из трех фаз:

1. Образование кровяного активатора плазминогена из проактиватора.
2. Превращение плазминогена в активную форму — плазмин под влиянием кровяного активатора плазминогена и других стимуляторов (урокиназа, щелочная и кислая фосфатазы и др.).
3. Расщепление плазмином фибрина до пептидов и аминокислот.

В каждой фазе фибринолитического процесса имеются свои ингибиторы и активаторы. Активация плазминогена может осуществляться по внешнему и по внутреннему механизмам (рисунок 5).

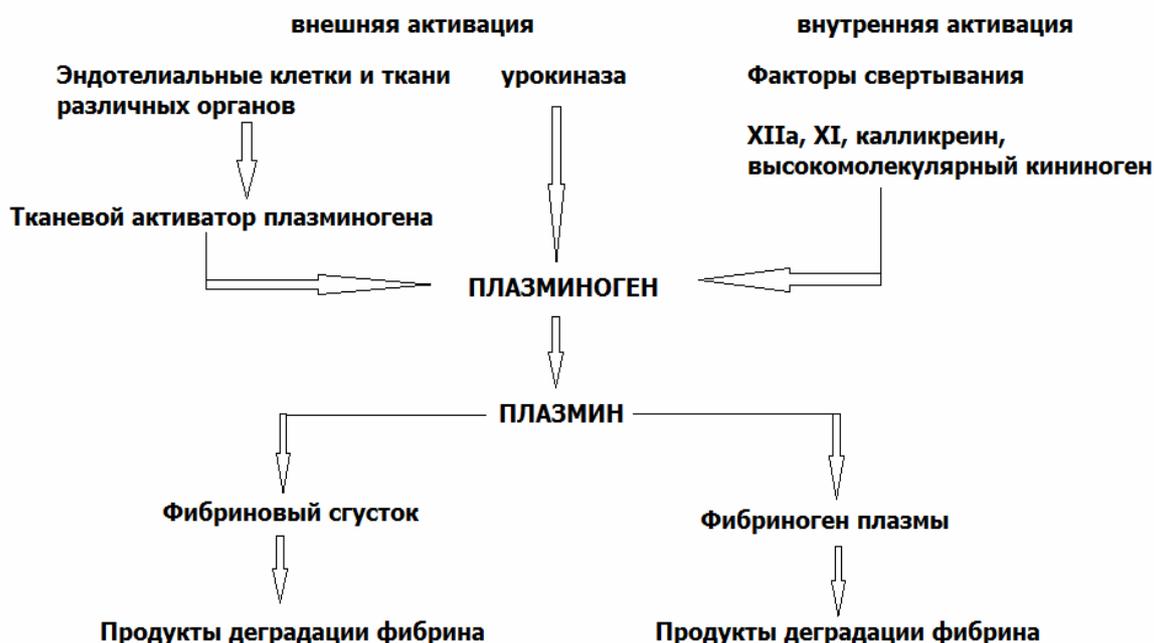


Рисунок 5 — Пути активации плазминогена (пояснения в тексте)

Внешний путь активации плазминогена обеспечивается в основном тканевым активатором плазминогена и урокиназой. Тканевой активатор плазминогена (тАП) продуцируется эндотелиальными и мезотелиальными клетками, моноцитами, мегакариоцитами, злокачественными клетками, а также содержится во многих органах и тканях (миокарде, предстательной железе, матке, печени, плаценте). Это сериновая протеаза, которая циркулирует в крови вместе со своим ингибитором и имеет высокое сродство к фибрину. Плазминоген и тАП связываются с фибриновыми нитями тромба, что сразу приводит к превращению плазминогена в плазмин.

Урокиназа (уАП) также является сериновой протеазой, продуцируется фибробластами, моноцитами, макрофагами и эндотелием, активирует плазминоген, превращая его в плазмин.

Внутренний путь активации плазминогена начинается одновременно с активацией свертывания крови и ассоциирован с взаимодействием субэндотелия, фактора свертывания XII, прекалликреина и высокомолекулярного кининогена.

Непосредственными активаторами плазминогена могут быть и экзогенные продукты — стрептокиназа (продуцируется гемолитическим стрептококком), антистрептаза (комплекс, состоящий из плазминогена и стрептокиназы стрептококка), стафилокиназа (продуцируется золотистым стафилококком).

Плазмин является очень активной и в то же время относительно неспецифичной сериновой протеазой, которая одновременно воздействует на

фибрин и фибриноген. Расщепление плазмином пептидных связей в фибрине и фибриногене приводит к образованию различных дериватов с меньшей молекулярной массой (X-, Y-, D- и E-фрагменты), которые обозначаются как ранние и поздние *продукты деградации фибрина (фибриногена)* — ПДФ (рисунок 6).

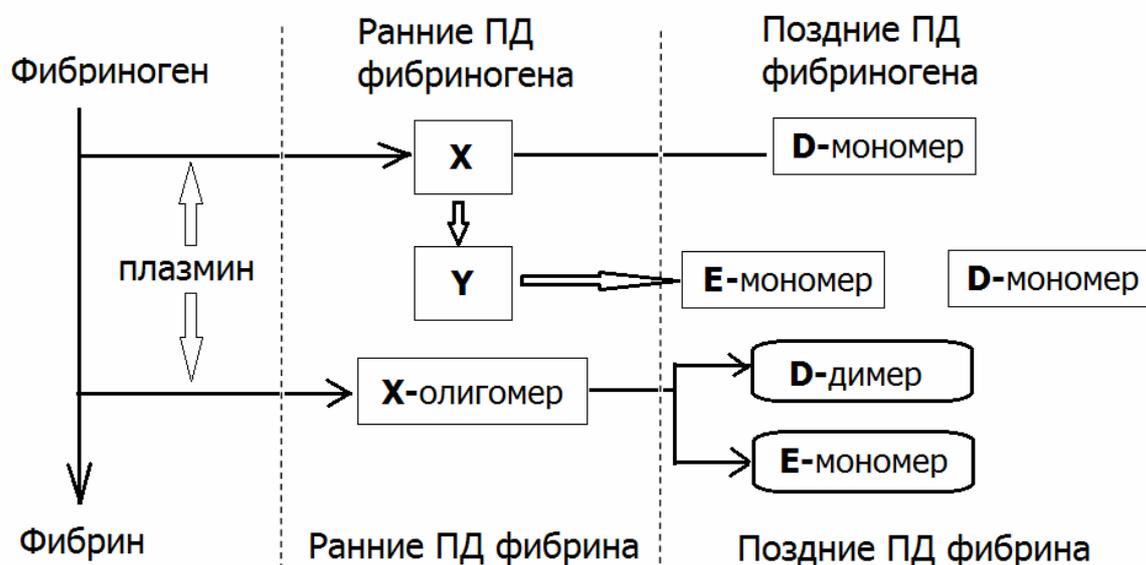


Рисунок 6 — Схема образования продуктов деградации фибрина/фибриногена

Примечание. ПД — продукты деградации. Продукты деградации фибрина/фибриногена образуются в результате расщепления фибриногена и фибрина плазмином. Вначале образуется крупномолекулярный фрагмент X, который расщепляется на фрагменты Y и D, а фрагмент Y — на фрагменты D и E. Крупномолекулярные фрагменты фибринолиза (фрагменты X и Y) получили название «ранние», а фрагменты D и E — «поздние», или конечные.

Дальнейшая судьба образовавшихся продуктов деградации фибрина/фибриногена в кровотоке различна. Ранние ПДФ — фрагменты X и Y вовлекаются в образующиеся сгустки, так как могут связываться тромбином. Ранние и поздние ПДФ (фрагменты X, Y и E, D) также способны образовывать комплексы с мономерами фибрина и циркулировать в крови в составе РФМК (или растворимого фибрина). В этом проявляется взаимосвязь фибриногенолиза и фибринолиза. Необходимо отметить, что РФМК, которые имеют в своем составе ранние и поздние ПДФ плохо включаются в фибрин и представляют собой «заблокированный» фибрин-мономер, который выключается из гемостатического процесса. Поэтому увеличение содержания РФМК может отражать нарушение процесса нормальной полимеризации фибрин-мономеров.

Ранние и поздние ПДФ удаляются печенью, почками, клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Фрагменты ПДФ обладают выраженной физиологической активностью. Они снижают агрегацию тромбоцитов и препятствуют полимеризации фибрин-мономеров, являясь, в сущности, антикоагулянтами.

При патологических процессах, сопровождающихся активацией системы свертывания крови, включение ПДФ в состав растворимого фибрина направлено на поддержание крови в жидком состоянии, препятствует отложению фибрина в сосудах и уменьшает блокаду микроциркуляции. ПДФ способны нарушать целостность или повышать проницаемость сосудистой стенки. Поэтому при некоторых клинических ситуациях кровотечения могут быть вызваны не уменьшением концентрации фибриногена, а присутствием большого количества ПДФ, формирующихся при активном фибринолизе.

При воздействии плазмينا на фибрин-полимер, который, как указывалось выше, состоит из поперечно-сшитых фибрин-мономеров (см. рисунок 4), происходит отщепление, среди других фрагментов, 2-х ковалентно связанных D-фрагментов, принадлежавших смежным молекулам фибрин-мономеров (D-димеры). В связи с тем, что D-димеры содержат только продукты деградации сшитого фибрина, они являются специфическими маркерами фибринолиза (но не фибриногенолиза!). По содержанию D-димеров в крови врач может оценить, как происходит процесс образования и распада фибрина — тромбообразование и фибринолиз. Увеличение содержания D-димеров свидетельствует об одновременной активации системы свертывания и фибринолиза. Этот маркер является одним из наиболее чувствительных тестов, указывающих на появление тромбов в магистральных сосудах и тромбоэмболий. Исследование этого показателя свертывания крови применяется в диагностике тромботических состояний, тромбоза глубоких вен, легочной эмболии, ДВС-синдрома, при осложнениях беременности.

2. ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Исследование системы гемостаза предназначено для:

- диагностики нарушений в системе гемостаза и уточнения их характера;
- решения вопроса о допустимости оперативного вмешательства;
- проведения контроля за лечением антикоагулянтами прямого и непрямого действия, а также тромболитической терапией.

Нарушения системы гемостаза могут быть как врожденными, так и приобретенными, и проявляться кровотечениями и тромбозами. Единой международной классификации патологии системы гемостаза не существует. Международным комитетом по геморрагиям и тромбозам под руководством K. Lechner, D. Barrett et J. Veltkalmp (1976) принято выделение трех больших групп гемостазиопатий по этиопатогенезу и клиническим проявлениям.

1. Геморрагические гемостазиопатии — наследственные и приобретенные:

- наследственные геморрагические коагулопатии: гемофилии А и В, редкие формы наследственных нарушений;
- приобретенные геморрагические коагулопатии — вследствие появления специфических ингибиторов к факторам свертывания, приобретенного дефицита витамина К, геморрагический синдром при заболеваниях печени и почек;

- врожденные нарушения функции тромбоцитов: болезнь Виллебранда, синдром Бернара-Сулье, тромбастения Гланцманна и др.;

- приобретенные нарушения тромбоцитарного звена.

2. Тромботические гемостазиопатии:

- наследственные факторы риска тромботических заболеваний: мутация фактора V, дефицит антитромбина III, протеинов C и S и др.;

- приобретенные факторы патологического тромбообразования: антифосфолипидный синдром; атеросклероз, аутоиммунные заболевания, сахарный диабет, онкологические заболевания и др.

3. Тромбогеморрагические гемостазиопатии:

- ДВС-синдром;

- синдром локального внутрисосудистого свертывания или локальный тромбоз — в области сосудистых аномалий: аневризма аорты, гемангиома, микро- и макроангиопатия при сахарном диабете.

Подобная клиническая систематизация применима для практического врача только в начале диагностического поиска, когда необходимо установить клиническую группу гемостазиопатий: кровотечения или кровоточивость; тромбозы и тромбоемболии; тромбогеморрагии или ДВС-синдром. Это необходимо для дальнейшего выбора логического пути лабораторного этапа диагностического поиска и определения наиболее информативных лабораторных тестов.

Лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза является одной из самых непростых и дорогостоящих в лабораторной практике. Выполнение всех возможных тестов для выявления характера нарушений системы гемостаза для всех пациентов фактически невозможно. Поэтому чрезвычайно важно соблюдать алгоритм проведения тестов, исходя из клинических данных и анамнеза пациента. После оценки клинического состояния пациента и при малейшем подозрении на тромбогеморрагические заболевания проводится лабораторная диагностика состояния системы гемостаза, которая включает в себя два последовательных этапа — скрининговый и уточняющий.

Предложено достаточно много схем применения лабораторных тестов для оценки основных гемостатических функций. Согласно рекомендациям, принятым Всероссийской ассоциацией по изучению тромбозов, геморрагий и патологии сосудов им. А. В. Шмидта – Б. А. Кудряшова и Российской ассоциацией медицинской лабораторной диагностики по лабораторным методам исследования системы гемостаза (Т. Н. Вавилова, А. Б. Добровольский, Санкт-Петербург, 2007 г.) выделены следующие группы тестов оценки системы гемостаза:

1. Оценочные тесты 1-го уровня — относятся к скрининговыми и выполняются в лабораториях первичного звена. Они включают выполнение АЧТВ, ПВ (МНО), определение содержания фибриногена по Клауссу, количества тромбоцитов, а также оценку времени кровотечения.

2. **Оценочные тесты 2-го уровня** — относятся к уточняющим тестам и выполняются в лабораториях диагностических центров и стационаров. Они включают постановку теста агрегации тромбоцитов, определение тромбинового времени, определение D-димера (или РФМК), определение времени лизиса эуглобулиновых фракций (Хагеман-зависимый фибринолиз).

3. **Дополнительные тесты** — выполняются в специализированных лабораториях и включают:

- при кровоточивости — определение активности фактора Виллебранда и факторов свертывания;
- при тромбозах — определение антитромбина III, протеинов С и S; выявление мутаций генов факторов свертывания, обнаружение волчаночного антикоагулянта подтверждающими тестами.

4. **Контроль антитромботической терапии** — проводится в лабораториях всех уровней: АЧТВ (мониторинг терапии нефракционированным гепарином), ПВ в виде МНО (антагонисты витамина К), анти-Ха активность хромогенным методом (низкомолекулярный гепарин).

5. **Экспресс-исследования в условиях оказания экстренной помощи:** количество тромбоцитов, АЧТВ, протромбиновое время, фибриноген, D-димер.

Графическое изображение или цифровое выражение результатов исследования свертывающей системы крови, в более широком смысле — всей системы гемостаза (сосудисто-тромбоцитарного, плазменного механизмов свертывания, а также фибринолиза и внутрисосудистой активации свертывания) принято называть **коагулограммой**.

Скрининговые тесты коагулограммы выполняются для первичной диагностики врожденных и приобретенных нарушений системы свертывания крови, а также контроля за антикоагулянтной терапией. К тестам скрининговой коагулограммы относятся АЧТВ, протромбиновое время, тромбиновое время, концентрация фибриногена, определение РФМК. В перечень тестов также включены определение времени кровотечения и количества тромбоцитов. Нормальные результаты скрининговых тестов позволяют исключить наличие значительных дефектов в системе гемостаза, в то время как аномальные значения конкретизируют направление дальнейшего поиска.

Коагулограмма развернутая позволяет дифференцировать близкие по механизму нарушения в системе гемостаза (например, качественные дефекты тромбоцитов, дефицит отдельных факторов свертывания крови, различные тромбофилии) и количественно оценить степень выраженности этих нарушений. Исследование включает следующие тесты: количество тромбоцитов и постановку теста агрегации тромбоцитов, АЧТВ, протромбиновое время, тромбиновое время, антитромбин III, фибриноген, РФМК, D-димер, определение активности фактора Виллебранда и факторов свертывания.

Перечень тестов коагулограммы для каждого конкретного случая зависит от клинической картины, вида предполагаемой патологии и конеч-

ной цели проводимых исследований. Часто диагноз удается установить с помощью 2–4 правильно подобранных тестов. Поэтому работа лабораторий гемостаза становится продуктивной лишь при тесном контакте с врачами-клиницистами и наличии информации о клинических проявлениях патологии у пациента. Так, при подозрении на нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза (например, петехиальный тип кровоточивости, носовые и десневые кровотечения) применяют определение ломкости микрососудов (манжеточная проба) и времени капиллярного кровотечения, подсчет количества тромбоцитов в крови, изучение их морфологии, адгезивно-агрегационной функции с различными индукторами, определение активности фактора Виллебранда в плазме крови. При подозрении на нарушения коагуляционного гемостаза исследуют АЧТВ, протромбиновое и тромбиновое время, содержание и активность отдельных факторов свертывания крови и физиологических антикоагулянтов. Фибринолиз оценивают по эуглобулиновому лизису, содержанию в плазме крови плазминогена, а также продуктов деградации фибриногена и фибрина (ПДФ, D-димер).

Следует отметить, что ряд использовавшихся ранее тестов оценки системы свертывания крови в настоящее время устарели и в большинстве лабораторий не применяются по причине их неточности и низкой информативности (таблица 2).

Таблица 2 — Устаревшие методы исследования нарушений гемостаза и варианты их замены

Устаревший метод	Недостатки	Современные методы
Время свертывания (венозной крови)	Низкая стандартизация	АЧТВ
Время рекальцификации	Низкая стандартизация	АЧТВ
Толерантность плазмы к гепарину	Низкая стандартизация	Тромбин-гепариновое время плазмы, определение анти-Ха-активности
Аутокоагуляционный тест (АКТ)	Низкая стандартизация	АЧТВ, активность анти-тромбина III
Бета-нафтоловый (фибриноген В), этаноловый или протаминсульфатный тесты	Качественные тесты, низкая информативность, часто ложноположительные результаты	Тесты на тромбинемии: количественное определение РФМК (растворимых фибрин-мономерных комплексов)

К устаревшим тестам также относится время свертывания цельной крови по Ли-Уайту (исключен из современных рекомендаций) в связи с низкой информативностью. Однако учитывая быстроту и простоту его выполнения, данный метод иногда используется в клинической практике как экспресс-метод диагностики нарушений гемостаза. Определение времени свертывания крови по Ли-Уайту может выполняться на базе клинических отделений вне клинико-диагностической лаборатории.

2.1. Методы оценки сосудисто-тромбоцитарного гемостаза

Патология системы сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза может быть представлена как тромбозами, так и геморрагическим синдромом. Однако наиболее часто многие заболевания сопровождается именно геморрагический синдром, отличительным признаком которого является повышенная кровоточивость. В условиях патологии первичного гемостаза возникновение геморрагического синдрома может быть обусловлено:

- нарушением сосудистой проницаемости (вазопатии);
- количественным и/или качественным дефектом тромбоцитарного звена гемостаза (тромбоцитопении, тромбоцитопатии).

Клинически геморрагический синдром при патологии сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза проявляется петехиально-пятнистым типом кровоточивости, основными проявлениями которого являются:

- петехии — мелкоточечные (диapedезные) кровоизлияния, возникающие в результате пропотевания эритроцитов через неповрежденную сосудистую стенку вследствие нарушения ее проницаемости (сосудистый компонент);
- экхимозы — кровоизлияния в кожу или слизистую оболочку, диаметр которых обычно превышает 3 мм. Возникают вследствие нарушения трофики сосуда (прежде всего за счет снижения ангиотрофической функции тромбоцитов) с последующим снижением эластичности, и в результате — нарушением целостности сосуда. Последнее влечет за собой выход форменных элементов крови за пределы поврежденного сосуда, инфильтрацию ими окружающих тканей и формирование экхимозов;
- кровотечения из сосудов микроциркуляторного русла (наиболее частыми являются десневые, носовые, реже — маточные, почечные, кишечные кровотечения).

Выбор методов оценки сосудисто-тромбоцитарного гемостаза зависит в первую очередь от клинических проявлений заболевания и склонности пациента к кровотечениям или тромбозам. Тесты оценки первичного гемостаза подразделяют на основные (базисные) и дополнительные. К наиболее распространенным базисным методам исследования первичного гемостаза относят: клинические пробы на резистентность капилляров и лабораторные методы оценки состояния тромбоцитов (время кровотечения, количество тромбоцитов, оценка агрегационной функции тромбоцитов). Дополнительными тестами являются оценка размеров, морфологии и структуры тромбоцитов, расчет тромбоцитарных индексов (тромбоцитарная формула), а также определение адгезивной (ретенционной), секреторной и ретрактильной функций тромбоцитов.

Клиническими тестами, свидетельствующими о патологии первичного звена гемостаза (прежде всего его сосудистого компонента), являются положительные клинические пробы на резистентность (ломкость) капилляров — щипка, жгута и проба Кончаловского – Румпеля-Леде (манжеточная). Последняя проба является наиболее корректной и часто используемой в клинической практике.

2.1.1. Манжеточная проба М. П. Кончаловского, Румпель-Леде

Принцип

Создают венозный стаз путем дозированного сжатия плеча манжетой от аппарата для измерения артериального давления и подсчитывают число образовавшихся петехий в верхней части ладонной поверхности предплечья и локтевого сгиба. Если количество петехий превышает норму, это говорит о снижении резистентности микрососудов.

Ход определения

На верхней части ладонной поверхности предплечья очерчивают круг диаметром 5 см. На плечо накладывают манжету для измерения артериального давления и поддерживают давление на уровне 90 мм. рт. ст. Затем манжету снимают и в течение 5 мин ждут восстановления кровообращения в конечности. После этого подсчитывают количество петехий в очерченном круге. Учитывают и появление геморагий вдоль нижнего края манжеты, которые в норме отсутствуют.

Интерпретация результатов

В норме число петехий у женщин не превышает 10; при 11–20 петехиях проба считается слабо положительной, при 20–30 петехиях — положительной, а при 30 и более — резко положительной. У мужчин в норме петехии не возникают. Возможные причины положительной пробы: тромбоцитопения, тромбоцитопатии, гиповитаминоз С, болезнь Виллебранда, прием антикоагулянтов.

2.1.2. Определение времени кровотечения

Время кровотечения (ВК) — время от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови. Оценка ВК является простым в выполнении и доступным тестом, поэтому используется в качестве скринингового исследования при подозрении на тромбоцитопатию, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки. Удлинение ВК свидетельствует о необходимости дальнейших углубленных исследований с использованием уточняющих методов. В то же время тесты оценки ВК недостаточно чувствительны (не всегда позволяют исключить нарушения тромбоцитарного или сосудистого звеньев гемостаза) и имеют низкую специфичность (не позволяют точно установить вариант нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза).

Среди большого разнообразия методических подходов определения ВК наиболее широко на практике используется метод по Айви.

Определение времени кровотечения по Айви

Принцип метода

На фоне венозного стаза (манжета, 40 мм рт. ст.) определяют время кровотечения из поперечных проколов кожи внутренней поверхности верхней части предплечья. Проколы осуществляют скарификатором для взятия крови из пальца.

В норме время кровотечения не превышает 5–8 мин при количестве тромбоцитов более $100 \times 10^9/\text{л}$. Удлинение ВК наблюдается при первичных и вторичных тромбоцитопениях. Степень изменения ВК зависит от выраженности тромбоцитопении. Так, снижение содержания тромбоцитов менее $80 \times 10^9/\text{л}$ сопровождается удлинением ВК более 10 мин (как известно, минимальный порог количества тромбоцитов для обеспечения тромбоцитарного гемостаза составляет $50 \times 10^9/\text{л}$).

ВК также удлинено при врожденных и приобретенных тромбоцитопатиях: лейкозах, уремии, опухолях печени, некоторых инфекционных заболеваниях, болезни Виллебранда, гипофибриногенемии, применении аспирина, С-гиповитаминозе.

Укорочение ВК обусловлено повышенной спастической способностью капилляров или является следствием технической ошибки при выполнении метода, поэтому диагностического значения не имеет.

2.1.3. Определение количества тромбоцитов в крови

Определение количества тромбоцитов в периферической крови можно осуществлять мануальными методами либо с помощью автоматических гематологических анализаторов.

Мануальное определение количества тромбоцитов может осуществляться прямым методом (в камере Горяева) и непрямым методом (в мазках крови).

Подсчет тромбоцитов в камере Горяева

Принцип

Определение количества тромбоцитов в 1 л крови с учетом ее разведения и объема квадрата счетной сетки камеры Горяева с применением фазово-контрастного устройства для контрастирования тромбоцитов.

Материал для исследования

Исследование можно проводить как в капиллярной крови, полученной из пальца, так и в стабилизированной цитратом венозной крови.

Реактивы: 1 % раствор оксалата аммония, который быстро и полностью лизирует эритроциты.

Ход определения

Исследуемую кровь разводят в 200 раз; для этого в сухую пробирку набирают 4 мл реактива и 0,02 мл крови. Перемешивают и оставляют на 25–30 минут для гемолиза эритроцитов. Подготавливают счетную камеру. Перемешивают разведенную кровь и заполняют камеру. Тромбоциты считают в 25 больших квадратах с помощью фазово-контрастного устройства. Тромбоциты выглядят в счетной камере в виде мелких, хорошо преломляющих свет образований.

Расчет количества тромбоцитов проводят по формуле:

$$X = a \cdot 250 \cdot 200 / 25 = a \cdot 2000,$$

где X — число тромбоцитов в 1 мкл крови; а — число тромбоцитов, сосчитанных в 25 больших квадратах; 200 — разведение крови; 25 — число сосчитанных квадратов; 250 — объем одного большого квадрата 1/250 мкл. Число подсчитанных тромбоцитов умножают на 2000.

Подсчет тромбоцитов в мазках крови (по Фонио)

Принцип

Метод основан на подсчете числа тромбоцитов в окрашенных мазках крови на 1000 эритроцитов с расчетом на 1 мкл (или 1 л) крови, исходя из содержания в этом объеме количества эритроцитов.

Реактивы: 14 % раствор сульфата магния или 6 % раствор ЭДТА.

Ход определения

Реактив набирают в капилляр Панченкова до метки «75» и вносят в пробирку, затем добавляют кровь, взятую тем же капилляром до метки «0». Содержимое пробирки перемешивают и готовят тонкие мазки. Фиксируют и окрашивают по Романовскому-Гимзе в течение 2–3 часов при использовании раствора сульфата магния и в течение 30–45 минут при применении ЭДТА. Высохшие мазки микроскопируют с иммерсионным объективом, подсчитывая количество тромбоцитов в тонких местах препарата (эритроциты должны быть расположены разрозненно) на 1000 сосчитанных эритроцитов.

Расчет: количество тромбоцитов на 1000 эритроцитов составляет А%. Зная число эритроцитов в 1 л крови, подсчитывают количество тромбоцитов в 1 л крови.

Например: При подсчете 1000 эритроцитов обнаружено 60 тромбоцитов А=60 %, количество эритроцитов у этого пациента составляет $5 \times 10^{12}/л$.

На основании имеющихся данных составляют пропорцию:

$$\begin{aligned} 60 & - 1000 \\ x & - 5 \cdot 10^{12}/л, \text{ откуда} \\ x & = 60 \times 5 \times 10^{12}/л / 1000 = 300 \times 10^9/л \end{aligned}$$

Нормальные пределы колебаний числа тромбоцитов в крови при определении ручным методом составляют $170\text{--}350 \times 10^9/л$. Ошибка метода $\pm 6,5$ %. Коэффициент вариации = 10–30 %. При определении количества тромбоцитов менее $140 \times 10^9/л$, необходимо произвести повторный подсчет, а также исследовать мазок периферической крови, в котором могут быть видимые изменения морфологии тромбоцитов.

Определение количества тромбоцитов с помощью гематологических анализаторов

Число тромбоцитов (Platelets; PL; PLT)

Автоматический подсчет тромбоцитов осуществляется в одном канале с эритроцитами. Разделение клеток происходит по величине амплитуды электрического сигнала, которая значительно меньше у тромбоцитов в связи с малыми размерами (2–4 мкм). При этом предварительного лизиса эритроцитов не требуется. В случае наличия в периферической крови больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов) или их фрагментов (шизоцитов) возникают сложности в дифференцировке этих клеток.

Для исключения ошибок при подсчете тромбоцитов в приборах, основанных на кондуктометрическом методе, используется система дискриминаторов, позволяющих определять не только высоту электрического импульса (пропорционально размеру частицы), но и ширину (длительность) импульсов. Все импульсы, соответствующие размерам частиц от 1,8 до 30,0 фл, подсчитываются как тромбоциты.

Ошибки автоматических методов подсчета тромбоцитов в виде ложного занижения результатов возникают при агглютинации и агрегации тромбоцитов (причиной агрегации часто является использование гепарина или цитрата в качестве антикоагулянта), гипертромбоцитозе (более $1000 \times 10^9/\text{л}$) вследствие превышения допустимого порога измерения PLT. Оптимальным является использование только одного стандартного антикоагулянта – K_2 ЭДТА, который дает наименьшее количество артефактов. Коэффициент вариации количества тромбоцитов для большинства современных гематологических анализаторов составляет 2–4 %.

Международные нормы количества тромбоцитов при автоматизированном подсчете находятся в диапазоне $150\text{--}450 \times 10^9/\text{л}$.

Подсчет количества тромбоцитов в крови — важная часть диагностики тромбоцитопений (уровень тромбоцитов $< 150 \times 10^9/\text{л}$) и тромбоцитозов (уровень тромбоцитов $> 450 \times 10^9/\text{л}$). Тромбоцитопения различной степени выраженности сопровождается кровоточивостью, особенности которой приведены на рисунке 7.

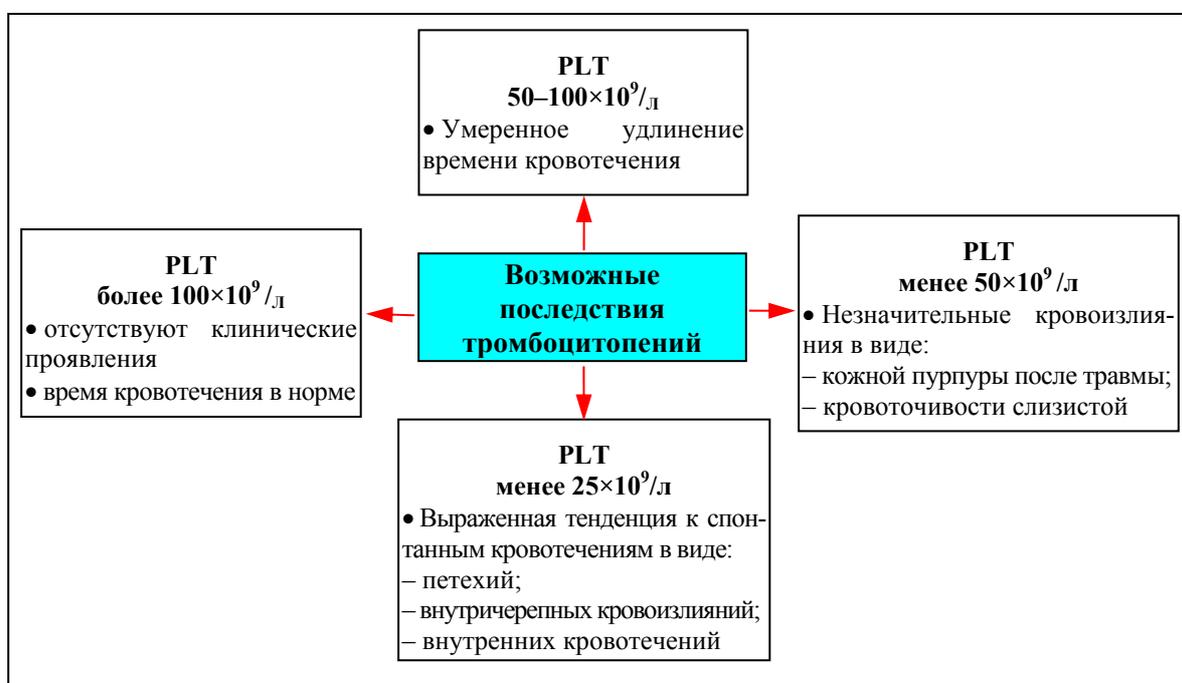


Рисунок 7 — Клинико-лабораторные проявления тромбоцитопений различной степени

2.1.4. Оценка функциональной активности тромбоцитов

Исследование агрегации тромбоцитов

Агрегация тромбоцитов — основной тест, используемый у пациентов с нормальным числом тромбоцитов, но удлинением времени кровотечения.

В настоящее время именно агрегационные исследования тромбоцитов дают наиболее важную информацию для оценки их функций.

Показания для изучения агрегационной активности тромбоцитов:

1. Диагностика наследственных и врожденных аномалий тромбоцитов.

Формы с преимущественным нарушением агрегации:

- с сохраненной реакцией высвобождения — тромбастения Гланцманна;
- с нарушенной реакцией высвобождения — «аспириноподобный» синдром;
- с дефектами гранул тромбоцитов (нарушение процесса активации тромбоцитов) — дефицит пулов хранения, синдром «серых тромбоцитов».

Формы с преимущественным нарушением адгезии:

- болезнь Виллебранда, синдром Бернара-Сулье.

2. Диагностика приобретенной патологии тромбоцитов гипо- и гиперагрегационного характера (миелопролиферативные заболевания, цирроз печени, уремия, действие лекарственных веществ и токсинов, атеросклероз, ИБС, сахарный диабет, гиперлипидемии, гиперглобулинемии, парапротеинемии).

3. Оценка антиагрегантной эффективности фармакологических препаратов.

4. Подбор адекватной антиагрегантной терапии.

5. Оценка функциональной активности тромбоцитов при переливании тромбоцитарной массы.

Исследование агрегации тромбоцитов проводят на специальных приборах — агрегометрах, в которых используется турбидиметрическая детекция.

Принцип метода: агрегация тромбоцитов, вызванная добавлением индуктора, способствует их оседанию, в результате чего наблюдается увеличение светопропускания исследуемой плазмы.

Материал для исследования

Богатая тромбоцитами плазма с содержанием тромбоцитов $200\text{--}300 \times 10^9/\text{л}$ (получение плазмы: см. подраздел 2.2.1).

Агрегометр регистрирует изменение светопропускания плазмы во времени, что графически отображается в виде агрегационной кривой (агрегатогаммы) (рисунок 8).

В клиничко-диагностических лабораториях в качестве индукторов агрегации используют вещества, выделяющиеся вследствие повреждения сосудистой стенки (АДФ, коллаген), а также адреналин, арахидоновую кислоту, тромбин, ристомицин (ристоцетин), серотонин. Широкий спектр индукторов агрегации обусловлен тем, что при тромбоцитопатиях, вследствие нарушения функциональной активности тромбоцитов, изменяется их способность к ответу на различные активаторы. Для диагностики большинства наследственных и приобретенных тромбоцитопатий достаточно исследования функциональных параметров тромбоцитов с использованием трех агонистов: АДФ, коллагена и ристоцетина.

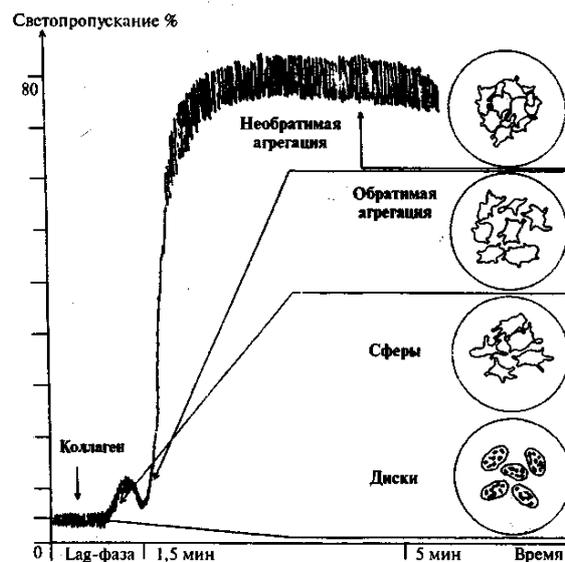


Рисунок 8 — Схема агрегации тромбоцитов под влиянием индуктора коллагена

Примечание. Начальные осцилляции кривой связаны с колебаниями светопропускания плазмы, обусловленными дискоидной формой тромбоцитов. После добавления индуктора агрегации к тромбоцитарной плазме появляется снижение кривой до нулевой отметки или ниже — «lag» фаза, обусловленная уменьшением светопропускания в результате изменения формы тромбоцитов от дискоидной к шиповидно-сферической. Следующая за ней первичная волна на агрегатограмме обусловлена появлением тромбоцитарных агрегатов, образующихся при воздействии индуктора агрегации. После окончания первичной (обратимой) агрегации крутизна агрегационной кривой понижается — за этот период из плотных гранул тромбоцитов освобождаются биологически активные вещества (АДФ, серотонин, тромбоксан A_2), вызывающие вторичную агрегационную волну (необратимую агрегацию).

Ристоцетин — гликопептидный антибиотик, выделенный из *Nocardia lurida*. Он вызывает агрегацию тромбоцитов только в присутствии фактора Виллебранда. Поэтому определение агрегации тромбоцитов с этим агонистом необходимо для диагностики одного из самых распространенных геморрагических диатезов — болезни Виллебранда.

При оценке агрегации регистрируются следующие параметры (рисунок 9):

- *степень агрегации* (MAX %) — максимальный процент агрегации, соответствует максимальному увеличению светопропускания плазмы после внесения индуктора;
- *время агрегации* (MAX TIME) — время достижения максимальной агрегации;
- *скорость агрегации* — увеличение процента агрегации (светопропускания плазмы) за 1 мин. Измеряется от начала первичной (SLP1) и вторичной (SLP2) агрегационных волн на наиболее линейном участке их подъема. SLP2 может не определяться, если вторичная волна на агрегатограмме отсутствует (монофазная кривая).
- *длительность lag-фазы.*



Рисунок 9 — Типичный вид агрегатограммы

При использовании низких концентраций агонистов (концентрация АДФ 0,5–1,0 мкмоль/л) после первой волны агрегации наступает дезагрегация и снижение волны агрегации. Применение высоких концентраций индуктора позволяет отдельно зарегистрировать первую и вторую волны агрегации (концентрация АДФ 2,5–5,0 мкмоль/л). Первая волна отражает обратимую агрегацию и частичную секрецию гранул (агрегация I), вторая волна оценивает необратимую агрегацию (агрегация II), которая представляет собой реакцию высвобождения эндогенных стимуляторов в результате полной дегрануляции тромбоцитов — выход компонентов плотных и α -гранул, образование тромбоксана A_2 . В том случае, когда вторая волна четко не регистрируется, наступление ранней дезагрегации свидетельствует, что процесс не поддерживается эндогенными агонистами, что связано либо с их малым содержанием в тромбоцитах (отсутствием гранул, нарушением образования простагландинов), либо с нарушением реакции высвобождения.

На результаты исследования влияют тип агрегометра и качество используемых реактивов. Поэтому каждая клиничко-диагностическая лаборатория устанавливает собственные референтные значения, учитывая рекомендации, изложенные в инструкции к агрегометру, и контролирует их значения при смене реактивов. Усредненные нормальные показатели агрегатограммы тромбоцитов приведены в таблице 1 приложения.

Гиперагрегация характеризуется увеличением степени и скорости агрегации, появлением монофазной кривой — слияние первичной и вторичной волн. Гиперагрегация тромбоцитов при низких и высоких концентрациях индукторов (АДФ, адреналин) характерна для предтромботических и тромботических состояний. При атеросклерозе, гипертонической болезни, инфаркте миокарда, нарушениях коронарного и мозгового кровообращения, сахарном диабете, гиперлипидемиях и других заболеваниях с тромбогенным риском может наблюдаться чрезмерно высокая АДФ-агрегация, ослаб-

ляется процесс физиологической дезагрегации. Повышение агрегационной активности тромбоцитов нередко является первым этапом внутрисосудистого тромбообразования и может служить критерием риска тромбоза.

Гипоагрегация сопровождается уменьшением степени и скорости агрегации, появлением обратимой агрегации, отсутствием вторичной агрегационной волны (при АДФ- и адреналин-индукции), увеличением lag-фазы (при коллаген-индукции). Полное отсутствие или резкое понижение агрегации тромбоцитов наблюдается при различных видах нарушений как наследственного (тромбоцитопатии), так и приобретенного характера (при лейкозах, уремии, заболеваниях печени, применении дезагрегантов).

Исследование агрегации тромбоцитов используется как уточняющий тест при наследственных и приобретенных нарушениях функции тромбоцитов (активации, адгезии, агрегации), которые приводят к характерным изменениям в агрегации. Также этот тест помогает в дифференциальной диагностике различных форм тромбоцитопатий (таблица 3).

Таблица 3 — Применение агрегатограмм для диагностики наследственных тромбоцитопатий

Патология	Агрегационный ответ							
	АДФ		Адреналин		Арахидоновая кислота	Коллаген	Тромбин	Ристомидин
	ПВ	ВВ	ПВ	ВВ				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Синдром Бернара-Сулье	N	N	N	N	N	N	N или ↓	↓
Болезнь Виллербранда*	N	N	N	N	N	N	N	↓ тип I; ↑ тип IIb
Тромбастения Гланцманна	–	–	–	–	–	–	–	N
Синдром «серых тромбоцитов»	↓	–	↓	–	N или ↓	–	N или ↓	N
«Аспириноподобный» синдром	↓	–	↓	–	↓	–	N	N

Примечание. ПВ — первая волна, ВВ — вторая волна, N — норма, ↓ — снижение, ↑ — повышение, «-» — отсутствие агрегации, * I тип болезни Виллербранда (наиболее часто встречается) характеризуется дефицитом фактора Виллербранда, при IIb типе (вариантом) отмечается снижение активности фактора, связанное с аномалией его молекулы.

2.2. Оценка коагуляционного гемостаза

2.2.1. Особенности преаналитического этапа

Материалом для коагулологических исследований является плазма венозной крови. Сыворотка для постановки тестов коагулограммы не используется, за исключением случаев, когда возможен интерферирующий

эффект ингредиентов плазмы на анализируемый показатель. Например, в сыворотке можно определять содержание продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ).

Капиллярная кровь может использоваться только для некоторых специально адаптированных методов:

- подсчет тромбоцитов;
- определение времени кровотечения;
- определение ПВ (с возможностью представления результата сразу в единицах международного нормализованного отношения — МНО) для контроля за приемом непрямых антикоагулянтов в амбулаторных и домашних условиях;
- определение АЧТВ исключительно для мониторинга гепаринотерапии;
- экстренная диагностика патологии свертывания (ДВС-синдром, острые тромботические и геморрагические состояния);
- экспресс-диагностика у детей первых месяцев жизни.

Венозную кровь получают из локтевой вены силиконированной иглой с широким просветом (внутренний диаметр 1,0–0,8–0,6 мм) без шприца (самотеком). Если забор крови проводится пластиковым шприцем, необходимо избегать вспенивания и резкого поступления крови в шприц. После этого кровь в минимальные сроки аккуратно переносят в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия.

При прокалывании иглой сосуда тканевый тромбопластин попадает с током крови в пробирку, поэтому первые 1,5–2 мл крови не годятся для проведения коагулологических тестов, а в случае необходимости забора нескольких проб у одного пациента для этих целей следует использовать вторую пробу.

В неотложных ситуациях, когда невозможно взятие крови из периферической вены, можно использовать кровь, полученную из центрального (подключичного) катетера: следует удалить первые 10–15 мл крови (использовать ее на проведение гематологических или биохимических исследований), а затем забрать кровь на коагулологические исследования. Такой способ забора применим только в тех случаях, когда в катетер не вводился гепарин. Если же через этот катетер гепарин вводился, то удаляют до 20 мл крови, а затем берут кровь на исследование гемостаза. Тем не менее даже в этом случае приоритет должны получать гепарин-независимые тесты (протромбиновое время, фибриноген, фибрин-мономеры, антитромбин), так как сохраняется высокая вероятность влияния следов гепарина на такие тесты, как АЧТВ, тромбиновое время.

В современной лабораторной практике все чаще используются системы вакуумного забора крови (вакутейнеры и вакуэты). Активация гемоста-

за в них предотвращается за счет моментального смешивания поступающей крови с раствором цитрата натрия.

При взятии капиллярной крови для коагулологических исследований прокол (кончика пальца или ушной мочки) должен быть достаточно глубоким, чтобы кровь текла самотеком, но не по коже пальца или стенке пробирки, а прямо в капилляр с цитратом, перемешиваясь с ним. Не допускается давление или сжатие. Для исследования используются первые капли крови.

В качестве антикоагулянта для коагулологических исследований используется цитрат натрия. Цитрат натрия обладает специфической способностью стабилизировать лабильные факторы свертывания (V и VIII). Кровь смешивают с 3,8 % раствором цитрата натрия строго в соотношении 9:1. Несоблюдение соотношения приводит к аналитическим ошибкам. В то же время следует учесть, что соотношение крови с раствором стабилизатора (9:1) правильно лишь при нормальном гематокритном показателе, поскольку раствор цитрата остается в плазме и не проникает в клетки крови. Поэтому при высоком гематокрите (свыше 70 %) в плазме крови создается избыточная концентрация цитрата в плазме, приводящая к «ложной» гипокоагуляции. Напротив, при снижении гематокрита (ниже 35 %), например, при анемии, обнаруживается «ложная» гиперкоагуляция и кровь при смешивании с цитратом в отношении 9:1 может свернуться в пробирке еще до исследования.

Перерасчет объема стабилизатора в соответствии с показателем гематокрита (таблица 4) позволяет избежать этой ошибки.

Таблица 4 — Соотношение объема 3,8 % раствора цитрата натрия и крови в зависимости от величины гематокрита

Гематокрит, %	Объем антикоагулянта, мл	Объем крови, мл
20–21	1,4	8,6
22–27	1,3	8,7
28–33	1,2	8,8
34–39	1,1	8,9
40–45	1,0	9,0
46–51	0,9	9,1
52–57	0,8	9,2
58–61	0,7	9,3
Более 65	0,5	9,5

Примечание. Следует учитывать, что у здоровых новорожденных (до 5 дней) в условиях физиологического эритроцитоза гематокритный показатель составляет 55–60 %.

Другие факторы преаналитического этапа, способные изменять результаты исследования коагуляционного гемостаза, и направления их влияния приведены в таблице 5.

Таблица 5 — Факторы преаналитического этапа, влияющие на показатели плазменного гемостаза (В. В. Долгов и П. В. Свиринов, 2005)

Преаналитический фактор	Влияние
Время суток	Снижение содержания факторов свертывания и повышение уровня ингибитора активации плазминогена I типа (РАI-1) в ночное время
Прием оральных контрацептивов	Повышение активности большинства факторов свертывания, агрегации тромбоцитов, снижение уровня АТ III
Длительный стаз (более 3 мин)	Увеличение фибринолитической активности, укорочение АЧТВ, ПВ, ТВ, повышение уровня фибриногена, АТ III
Стресс, физическая нагрузка	Повышение фибринолитической активности, укорочение (уровня t-РА), укорочение АЧТВ, активация ф. VIII, увеличение vWF
Положение тела	В положении стоя происходит относительное увеличение содержания факторов свертывания
Температура +18...+24 °С в течение 8 часов	Снижение активности факторов VIII, V, IX (удлинение АЧТВ)
Температура +4 °С	Увеличение активности факторов VII, XI и XII

Прием пищи не оказывает существенного влияния на параметры коагулологического исследования, в связи с чем кровь не обязательно брать строго натощак. Однако употребление жирной пищи не рекомендуется, так как жирное мясо уменьшает фибринолитическую активность. Кофе не влияет на показатели свертывания крови. Прием алкоголя накануне исследования не допускается, так как после приема алкоголя наблюдается уменьшение антитромбина и фибриногена, повышение ингибитора активатора плазминогена и уменьшение времени кровотечения. Курение приводит к увеличению агрегации тромбоцитов и их адгезии, повышению β -тромбоглобулина, tАП, активности ИАП и фибриногена, снижению ф. VII.

Интерферирующие лекарственные препараты

Кроме оральных контрацептивов (см. таблицу 5), изменение показателей системы гемостаза могут вызвать антибиотики (нарушение функций тромбоцитов, удлинение тромбинового времени); анальгетики, особенно содержащие ацетилсалициловую кислоту (ингибирование циклооксигеназы вызывает подавление, вплоть до полного отсутствия, адгезии тромбоцитов).

Физическая и эмоциональная нагрузка, положение тела

Взятие крови для коагулологических исследований необходимо производить у пациентов, отдохнувших не менее 15 минут после незначительной физической нагрузки. При мониторинге параметров коагулограммы кровь всегда нужно брать из одного и того же положения пациента.

Материал для коагулологических исследований должен быть доставлен в клиничко-диагностическую лабораторию в течение не более 1 часа с момента взятия при температуре +18... +25 °С. Транспортировка крови на большие расстояния и ее частичное встряхивание искажают результаты исследования.

Кровь нельзя хранить во льду, так как это может привести к холодовой активации фактора XII (процесс запускается через контактную фазу и развивается часто) и вызвать значительные изменения функции тромбоцитов.

Перед проведением исследования необходим входной контроль проб крови. Стабилизированная кровь не должна иметь сгустков. Кровь со сгустками и гемолизом не исследуется, так как это существенно исказит результаты исследования.

Получение плазмы, богатой тромбоцитами

Стабилизированную кровь центрифугируют при 1000 об/мин (140–160 g) в течение 5 мин. Верхняя часть плазмы (около 75 %) отбирается пластиковой пипеткой в пластиковую или стеклянную силиконированную пробирку. Богатая тромбоцитами плазма замораживанию не подлежит.

Получение плазмы, бедной тромбоцитами

Богатую тромбоцитами плазму центрифугируют при 3000–4000 об/мин (1200–1400 g) в течение 15 мин. Такая плазма может быть при необходимости однократно заморожена. 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.

Для проведения иммунологических методов оценки гемостаза или колориметрических с применением хромогенных субстратов плазму можно заморозить при температуре 20–30°C и хранить не более 14 дней.

2.2.2. Тесты для оценки коагуляционного гемостаза

В зависимости от технологии проведения тесты оценки коагуляционного гемостаза подразделяются следующим образом:

1. Клоттинговые (АЧТВ, протромбиновый тест, ТВ и др.).
2. Амидолитические — с использованием хромогенных или флуорогенных субстратов (активность АТ III, РС и др.).
3. Иммунохимические (содержание отдельных факторов свертывания).
4. Молекулярно-биологические (выявление генетических аномалий: мутация Leiden, гомоцистеинемия, дефицит АТ).

Клоттинговые тесты (*clot* — англ. сгусток) в настоящее время наиболее распространены в клинико-диагностических лабораториях. Суть клоттинговых тестов заключается в запуске коагуляционного каскада с какого-либо уровня при помощи особого триггера (стартового реактива) и регистрации времени, необходимого для появления фибрина, как конечного продукта процесса свертывания. С помощью этих методов определяется активность отдельных звеньев системы свертывания крови и фибринолиза. Данные тесты являются скрининговыми, и способны исключить грубые нарушения системы гемостаза. Их преимуществами являются простота выполнения, невысокая стоимость, комплексный характер оценки нарушений (эффективность процесса образования тромба). Однако в то же время они обладают малой прогностической ценностью, особенно в отношении про-

гнозирования тромботических эпизодов. Так, известно, что формирование первой нити фибрина происходит при активации менее 5 % тромбина, при этом оставшиеся 95% игнорируются современными клоттинговыми тестами, таким образом не отражая реальное состояние свертывания крови *in vivo*, поскольку неадекватное количество образовавшегося тромбина может приводить как к геморрагическим, так и тромботическим осложнениям.

Амидолитические методы с использованием хромогенных и флуорогенных субстратов используются для исследования отдельных компонентов гемостаза, которые не учитываются простыми коагуляционными тестами или очень трудны для стандартизации. Хромогенные субстраты представляют собой короткоцепочечный пептид (из 3–10 аминокислот), к которому через эфирную связь пришит хромоген. Под действием протеаз (активированные факторы свертывания являются сериновыми протеазами) происходит отщепление пептида от хромогена, при этом изменяется его способность к адсорбции светового потока (рисунок 10).

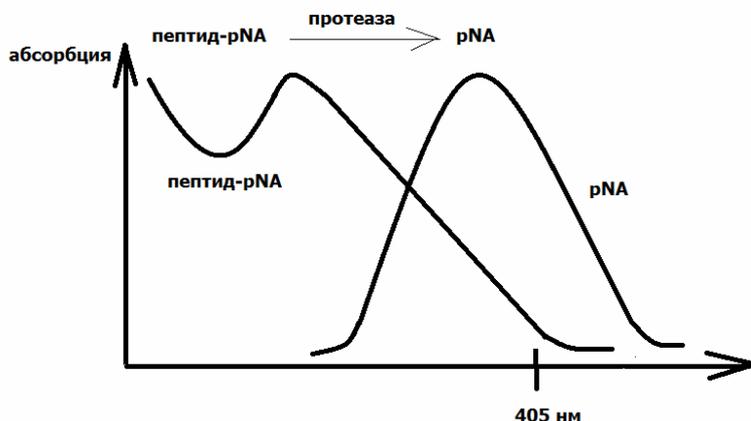


Рисунок 10 — Принцип определения активности протеазы с использованием в качестве хромогенного субстрата паранитроанилина (рНА)

Примечание. Комплекс пептид-рНА имеет максимум поглощения в области короткого ультрафиолета, а свободный рНА обладает максимальным поглощением при 405 нм. Итоговая концентрация рНА пропорциональна активности протеазы.

Методы хромогенных субстратов характеризуются высокой специфичностью и позволяют определить протеолитическую активность отдельных компонентов плазменного гемостаза, их кофакторов и ингибиторов. Эти тесты легко автоматизируются и могут выполняться на биохимических анализаторах.

Флуорогенные субстраты обладают большей аналитической чувствительностью и позволяют измерить специфическую активность компонентов гемостаза в большем диапазоне, чем хромогенные субстраты. Они могут использоваться для определения компонентов гемостаза, присутствующих в плазме в следовых концентрациях или обладающих относительно низкой активностью.

Несмотря на высокую чувствительность и специфичность амидолитические методы пока не нашли широкого применения в клинико-диагностических лабораториях, что связано, прежде всего, с высокой стоимостью тест-систем.

Иммунохимические методы основаны на реакции специфического взаимодействия антиген-антитело. Их преимуществом является возможность количественно определять концентрацию конкретного белка в отличие от клоттинговых методов и методов с хромогенными субстратами, которые определяют функциональную активность компонентов, но не их концентрацию. Кроме того, иммунохимические методы характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, легкостью автоматизации и быстротой исследования. Наиболее широко в клинической практике используются тесты латекс-агглютинации с турбидиметрической и нефелометрической регистрацией (для определения D-димеров), а также технология ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) для определения фактора Виллебранда, протеинов С и S (рисунки 11 и 12).

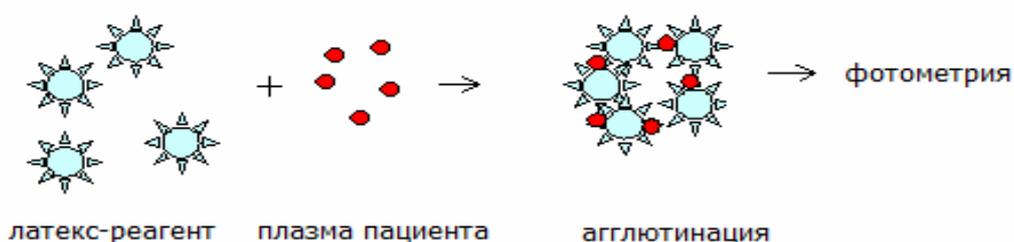


Рисунок 11 — Схема проведения теста латекс-агглютинации

Примечание. На частицах латекса адсорбированы антитела к искомому фактору. При добавлении плазмы пациента, содержащей искомый фактор (например, D-димеры) происходит перекрестное связывание латексных частиц. Результат регистрируется по степени мутности раствора (турбидиметрия).

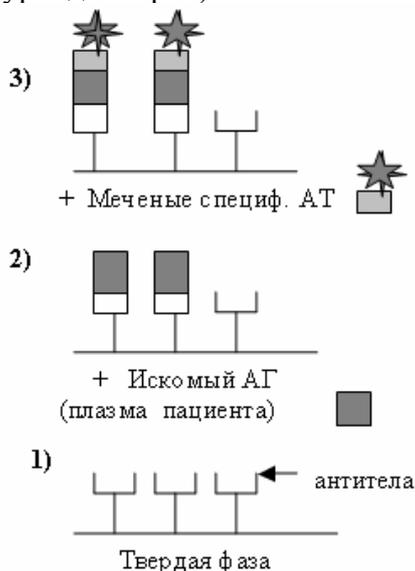


Рисунок 12 — Схема твердофазного иммунохимического анализа

Примечание. Антитела к искомому фактору (например, к фактору Виллебранда, протеинам С и S) фиксированы на твердой фазе в лунке планшета для иммуноферментного анализа. К ним добавляют плазму пациента, содержащую искомый фактор (1), инкубируют, несвязавшийся антиген удаляют отмыванием (2) и добавляют меченые специфические антитела (3), избыток которых также удаляется отмыванием. В результате реакции количество меченых антител, связавшихся с твердой фазой, прямо пропорционально количеству антигена (искомого фактора) в анализируемой пробе.

Молекулярно-биологические методы позволяют выявить наследственные нарушения свертывания крови, связанные с мутациями генов. Они используются, например, для диагностики гемофилий, болезни Виллебранда. В последние годы широкое распространение получили ПЦР-исследования для выявления генной мутации V фактора свертывания крови (фактор Лейдена), которая обуславливает резистентность к активированному протеину С. Этот вид генной мутации встречается в 10 раз чаще остальных и выявляется у 20 % молодых пациентов с венозными тромбозами и у 4 % в общей популяции.

2.2.2.1. Тесты для оценки внутреннего и общего путей свертывания крови

Активированное частичное тромбопластиновое время

Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧТВ) или каолин-кефалиновое время — клоттинговый тест, имитирует *in vitro* процесс активации внутреннего пути вторичного гемостаза, когда в результате активации факторов «контакта» (ф. XII, прекалликреина и др.), а затем ф. XI, IX+VIII и при участии фактора 3 тромбоцитов образуется активный комплекс внутреннего пути [IXa+VIIIa+Ca²⁺] (см. рисунок 3).

АЧТВ отражает нарушение активности или содержания в плазме факторов вторичного гемостаза внутреннего (XII, XI, IX, VIII) и общего (II, X, V) путей.

Принцип метода:

Регистрируют время образования фибринового сгустка после добавления кефалина и каолина. Каолин — вещество с отрицательно заряженной поверхностью — обеспечивает контактную активацию свертывания; кефалин — фосфолипидный экстракт головного мозга или мембран эритроцитов — является аналогом фактора 3 тромбоцитов и позволяет стандартизировать фосфолипидно-мембранную активацию процесса свертывания. Тест называют «частичным», так как в нем принимает участие «частичный тромбопластин» — кефалин, а не полный тромбопластин. С целью стандартизации реакцию проводят при постоянной температуре (37 °С), а для замены связавшегося с цитратом натрия кальция плазмы вносят (в качестве реагента) стандартный (0,025 М) раствор хлористого кальция.

Материал для исследования: цитратная бедная тромбоцитами плазма. Исследование должно быть выполнено в течение 2 часов от момента взятия материала. При хранении снижается стабильность пробы, особенно от больных, которым вводился гепарин. В результате резко увеличивается вариация данных АЧТВ, регистрируемых подряд из одной пробы.

Варианты постановки. Мануальный и коагулометрический.

Мануальный (или ручной) вариант заключается в оценке времени образования сгустка при выполнении исследования на водяной бане. К исследуемой плазме, взятой в пробирку, добавляют АЧТВ-реагент, встряхи-

вают и помещают в водяную баню (+37 °С) на 3 мин. После инкубации в смесь вносится раствор хлорида кальция. Определяют время формирования сгустка при периодическом покачивании пробирки.

Коагулометрический вариант выполняется на коагулометре.

Для регистрации момента выпадения сгустка в коагулометрах используются несколько принципов: механический, оптико-механический, турбидиметрический. Принцип работы *механических* коагулометров основан на захвате сгустка металлическим шариком, находящимся в кювете. При свертывании плазмы шарик начинает вращаться, момент вращения фиксируется магнитным датчиком. *Оптико-механические* коагулометры регистрируют выпадающие нити фибрина, которые меняют световой поток, проходящий через кювету и падающий на фотодиод, который связан с напряжением на лампе. По изменению напряжения на лампе регистрируется начало выпадения фибринового сгустка. *Турбидиметрические* коагулометры регистрируют момент свертывания крови по приросту оптической плотности. При свертывании плазмы происходит резкое изменение светопропускания или рассеивания. В коагулометре программируется, при каком приросте оптической плотности по отношению к исходному уровню регистрируется момент свертывания. Время от внесения в оптическую кювету индуктора свертывания до момента достижения заданной величины оптической плотности определяется как время свертывания плазмы в исследуемом тесте. Турбидиметрический принцип используется при определении показателей свертывания плазмы на многофункциональных фотометрах и биохимических анализаторах.

При постановке коагулометрического варианта АЧТВ в кювету коагулометра вносят плазму, прогревают ее при +37 °С 1 мин, потом добавляют АЧТВ-реагент и инкубируют 3 мин. После этого в смесь вносят раствор хлорида кальция и регистрируют время образования сгустка.

Результат АЧТВ-теста выражают в секундах, сравнивая время свертывания контрольной нормальной и исследуемой плазмы. В разных диагностических наборах нормальные значения АЧТВ отличаются друг от друга. Чаще всего эти показатели варьируют от 30 до 45 с (см. таблицу 2, приложение). Имеет значение техника выполнения теста (ручной вариант, на коагулометре). Время образования сгустка при постановке АЧТВ-теста на коагулометре на несколько секунд короче, чем при выполнении мануальным способом.

В практической медицине АЧТВ используется как скрининговый тест для оценки внутреннего каскада свертывания плазмы, определения присутствия волчаночного антикоагулянта и мониторинга антикоагулянтного действия гепарина.

Удлинение АЧТВ наблюдается при дефиците или аномалии факторов внутреннего пути свертывания крови, а также присутствии в крови патологических ингибиторов свертывания (ПДФ, волчаночного антикоагулянта). Дефицит факторов XII, XI, IX или VIII, либо наличие в плазме их ингибиторов можно заподозрить при удлинении АЧТВ (критическая степень изменения >50 с) на фоне нормальных показателей ПТ и ТВ. В то же время следует отметить, что в тесте АЧТВ реализуется целый набор различных

реакций плазменного гемостаза. Поэтому удлинение АЧТВ относительно нормальных значений наблюдается лишь при выраженном снижении уровня факторов (как правило, ниже 30 % от нормы).

Удлинение АЧТВ также наблюдается при лечении гепарином, который является ингибитором контактного пути коагуляции (см. выше, подразделы 1.2 и 1.3.1). В связи с этим АЧТВ-тест используется для контроля за лечением нефракционированным гепарином. Терапевтический диапазон АЧТВ у пациентов, получающих гепаринотерапию, находится в пределах 1,5–3 кратного увеличения. В связи с тем, что на результат теста могут влиять такие факторы, как время забора, промежуток времени до исследования, тип используемых реагентов и аппаратуры, каждая лаборатория должна установить свои референтные величины в отношении результатов лечения.

Укорочение АЧТВ свидетельствует об активации внутреннего пути свертывания (гиперкоагуляция), иногда определяется у больных с тромбофилией. Это может быть связано с резистентностью фактора V к активному протеину C, повышенным уровнем фактора VIII или активированных факторов свертывания. Однако чаще всего укорочение АЧТВ объясняется нарушениями работы с кровью на преаналитическом этапе.

Тест АЧТВ до настоящего времени не стандартизован ВОЗ, так как для его проведения в разных клинико-диагностических лабораториях применяют различные реагенты. В качестве заменителя тромбоцитарного фактора 3 используют тромбоциты, фосфолипиды животного происхождения (мозг кролика, быка или человека), растительные фосфолипиды (сои), смесь растительных и животных фосфолипидов, фосфолипиды из мембран эритроцитов: эрлид, эритрофосфатид.

2.2.2.2. Тесты для оценки внешнего и общего путей свертывания крови

Протромбиновый тест

Протромбиновый тест (ПТ) широко используется в повседневной клинической практике как скрининговый для оценки внешнего каскада свертывания плазмы. ПТ имитирует *in vitro* процесс активации внешнего пути вторичного гемостаза, когда при повреждении тканей в кровотоке высвобождается тканевой фактор (ф. III – ТФ) и образует комплекс с постоянно циркулирующим в кровотоке ф. VII, который, в свою очередь, активирует ф. X (рисунок 2). В роли ТФ, активирующего каскад внешнего пути свертывания, в КДЛ применяют специальный реагент — частично очищенный экстракт различных тканей животных — тромбопластин, а для замены связавшегося с цитратом натрия кальция плазмы вносят (в качестве реагента) стандартный (0,025 М) раствор хлористого кальция.

Принцип метода:

Определяют время образования фибринового сгустка при добавлении избытка тканевого тромбопластина. ПТ отражает активность и содержание в плазме факторов внешнего (факторов VII) и общего (II, X) путей вторичного гемостаза.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

В практической медицине ПТ применяется для скрининга патологии системы гемостаза, мониторинга терапии непрямymi антикоагулянтами, диагностики дефицита витамина К (фактор VII является витамин К зависимым), оценки белково-синтетической функции печени.

Результаты реакции ПТ в значительной степени зависят от используемого тромбопластина. Для постановки ПТ в КДЛ применяют экстракты различных тканей, богатых тромбопластином (печень, мозг кролика, быка, свиньи, плацента человека), либо рекомбинантные и комбинированные тромбопластины (тканевой тромбопластин, разведенный в растворе фибриногена быка). Разнообразие используемых в различных лабораториях реагентов (прежде всего тромбопластина), а также множественность факторов, влияющих на результаты теста ПТ, приводят к значительной неоднородности результатов различных КДЛ и создают сложности с его стандартизацией.

В настоящее время существуют следующие способы выражения результатов ПТ:

1. Время свертывания в секундах (протромбиновое время — ПВ). Для мануального исследования нормальные значения ПВ соответствуют 12–15 с, для коагулометров — 11–14 с. Недостатком такого подхода является отсутствие стандартизации по активности и чувствительности тромбопластинов.

2. Протромбиновый индекс (ПТИ), который определяется как:

$$\text{ПВ}_{\text{контрольной нормальной плазмы}} / \text{ПВ}_{\text{пациента}} \times 100 \%$$

Данный подход учитывает активность используемого тромбопластина, в отличие от ПВ. Тромбопластины с различной активностью будут одинаково изменять как референтное ПВ, так и ПВ пациента, следовательно их отношение не будет зависеть от активности тромбопластина. Однако стандартизация по чувствительности отсутствует, точность измерения не высока.

3. Протромбиновое отношение — ПО, рассчитывается как $\text{ПВ}_{\text{пациента}} / \text{ПВ}_{\text{контрольной нормальной плазмы}}$ имеет те же недостатки, что расчет ПТИ.

4. Протромбин по Квику (Quick) предусматривает определение концентрации факторов протромбинового времени по калибровочному графику. При этом время свертывания выражается в процентах от нормы. Вследствие того, что калибровочный график (строится с использованием донорской плазмы) и исследование пациента выполняются с одним и тем же тромбопластином (той же активности), тромбопластины различной активности (использованные после калибровки) будут одинаково изменять как калибровочный график, так и ПВ плазмы пациентов. Следовательно результат исследования ПТ не будет зависеть от активности используемого тромбопластина. Графики зависимости времени свертывания от концентрации факторов протромбинового комплекса имеют форму обратной функции ($y = 1/x$). При такой оценке нормальными являются значения ПТ $\geq 70 \%$.

В отличие от ПТИ выражение результатов по Квику при помощи калибровочного графика более точно отражает концентрацию факторов в плазме. Это связано с тем, что при расчете ПТИ предполагается наличие линейной прямо пропорциональной зависимости между концентрацией факторов и величинами ПВ, а на самом деле зависимость обратно пропорциональна и нелинейна ($y = 1/x$).

Недостатком выражения ПТ в виде протромбина по Квику является искажение результатов вследствие различного наклона калибровочной кривой в зависимости от используемого для разведения плазмы буфера или физиологического раствора, нестабильность разведенной плазмы, отсутствие стандартизации по чувствительности тромбопластина. Кроме того существенным недостатком всех вышеперечисленных подходов является определение концентрации факторов протромбинового комплекса, но не их активности. В то же время у пациентов, получающих непрямые антикоагулянты, меняется именно активность факторов свертывания (синтезируются дефектные факторы, лишённые карбоксильной группы на остатках глутаминовой кислоты, что не позволяет им формировать комплексы с фосфолипидами клеточных мембран и снижает их активность). Функциональные свойства факторов снижаются и при дефиците витамина К, тогда как их концентрация не изменяется.

5. Международное нормализованное отношение (МНО или International Normalised Index — INR). Представляет собой ПО, возведенное в степень Международного индекса чувствительности (МИЧ):

$$\text{МНО} = \text{ПО}^{\text{МИЧ}}$$

Применение МНО рекомендовано ВОЗ и позволяет учесть чувствительность используемого тромбопластина, что является основой стандартизации результатов ПТ для мониторинга терапии непрямыми антикоагулянтами. Принцип стандартизации по чувствительности заключается в наличии линейной зависимости между логарифмами величин ПВ, определяемыми при помощи различных тромбопластинов.

По рекомендации ВОЗ определение МИЧ (International Sensitivity Index — ISI) является обязанностью производителей тромбопластина, которые должны определять относительную чувствительность каждой серии выпускаемых ими тромбопластинов, сравнивая ее с эталоном тромбопластина (человеческий мозговой тромбопластин), чувствительность которого принята за единицу. МИЧ определяют следующим образом:

1. При помощи эталонного и аттестуемого тромбопластинов определяют величины ПВ одних и тех же плазм (одной донорской и 6–7 плазм пациентов, получающих терапию непрямыми антикоагулянтами).

2. Полученные величины ПВ логарифмируют и строят график, нанося на ось X логарифмы величин ПВ аттестуемого тромбопластина, а на ось Y — логарифмы величин ПВ эталонного тромбопластина (рисунок 13).

3. Тангенс угла наклона полученной прямой будет равен МИЧ аттестуемого тромбопластина.

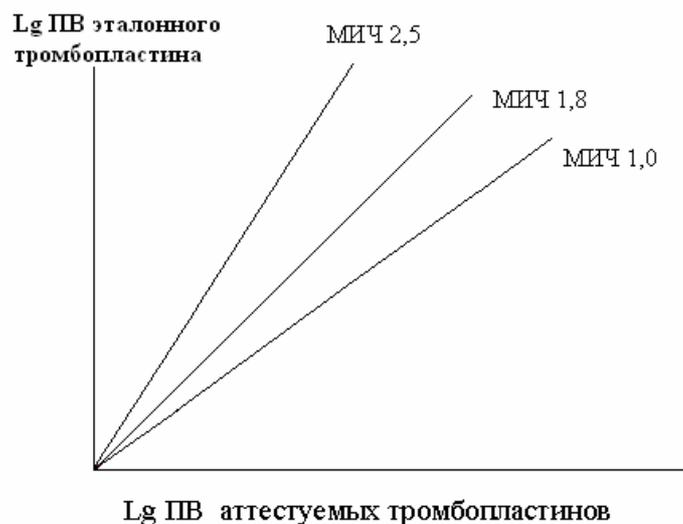


Рисунок 13 — Определение МИЧ (пояснение в тексте)

Примечание. Индекс чувствительности тромбопластинов, поставляемых на рынок различными производителями, указывается на этикетке.

Чем выше величина МИЧ тромбопластина, тем он менее чувствителен, то есть будет менее эффективно выявлять изменение активности фактора VII у пациентов, получающих терапию непрямыми антикоагулянтами путем удлинения ПВ (активность ф. VII — первой реагирует на терапию непрямыми антикоагулянтами). У наиболее часто используемых в КДЛ человеческого и кроличьего тромбопластинов МИЧ варьирует от 1,1 до 2,8 (рекомендуемая МИЧ — не более 2,0). Следует учитывать, что при возведении ПО в степень МИЧ, также возводится в степень и погрешность измерения ПВ. Это означает, что чем выше значения МИЧ у используемого тромбопластина, тем в большее число раз увеличивается ошибка результатов измерения ПВ.

Для выражения результатов в виде МНО в КДЛ определяют протромбиновое время в плазме пациента и в контрольной плазме, рассчитывают протромбиновое отношение (ПО). Для различных тромбопластинов ПО в норме колеблется от 0,7 до 1,1. Затем ПО возводят в степень МИЧ и рассчитывают МНО. В норме МНО близко к 1,0, и меньше 1,4. Современные коагулометры программируются на вычисление МНО. Возводя величину ПО в степень МИЧ используемого тромбопластина получают то значение МНО, которое было бы получено для данной плазмы с использованием международного эталонного (по чувствительности) тромбопластина.

Расчет МНО стандартизирует результаты ПТ для мониторинга терапии непрямыми коагулянтами, так как МНО переводит результаты ПТ обследуемых пациентов в единый масштаб, позволяет оценивать степень гипокоагуляции независимо от используемого тромбопластина и сравнивать результаты, полученные разными лабораториями. Поэтому определение МНО используют для обеспечения оптимизации терапии пероральными антикоагулянтами. При этом МНО поддерживают на различном уровне, в

зависимости от клинической ситуации (таблица 6). Чем выше показатель МНО, тем значительнее полученная гипокоагуляция и тем чаще и опаснее геморрагические осложнения.

Таблица 6 — Допустимые пределы МНО у пациентов, получающих не-
прямые антикоагулянты

Диапазон МНО	Показания для лечения
МНО 2,0–3,0	Профилактика и лечение венозных тромбозов и тромбозов
МНО 2,5–3,5	Лечение рецидивирующих и тяжелых тромбозов магистральных вен, тромбозов легочной артерии (ТЭЛА), имплантации искусственных клапанов сердца

Следует подчеркнуть наличие ограничений в использовании МНО в клиничко-диагностических лабораториях:

1. МНО не может использоваться на начальном этапе лечения непрямыми антикоагулянтами, так как существующие различия между разными тромбопластинами вносят слишком большие флуктуации на этом этапе, которые не могут быть компенсированы производителями реагентов.

2. МНО не используется для контроля и мониторинга состояния внешнего каскада активации протромбиназы в общей популяции пациентов, не принимающих непрямых антикоагулянтов.

Таким образом, в КДЛ целесообразно использовать 2 варианта представления результатов ПТ. Протромбин по Квику моделирует дефицит факторов и переводит результат теста в линейную шкалу, по которой можно ориентироваться в динамике факторов свертывания. Он используется для скрининга патологии системы гемостаза, на начальном этапе терапии непрямыми антикоагулянтами и для детекции нарушения белково-синтетической функции печени. МНО применяется для контроля интенсивности антикоагулянтной терапии.

Интерпретация результатов

Нормальные значения результатов ПТ приведены в таблице 2 приложения.

Удлинение ПВ (при этом значение ПТИ снижено, а ПО и МНО повышено) может наблюдаться при врожденном дефиците (менее 40% от нормы) факторов II, V, VII, X, а также при хронических заболеваниях печени с нарушением белково-синтетической функции, дефиците витамина К (холестаз, мальабсорбция, дисбактериоз). Также увеличение ПВ происходит при лечении пероральными антикоагулянтами, гипофибриногенемии (менее 0,5 г/л), дисфибриногенемии и нарушении полимеризации фибрина, ДВС-синдроме в фазе гипокоагуляции, присутствии ингибиторов свертывания (гепарин, продукты деградации фибрина).

Укорочение ПВ (при этом значение ПТИ увеличено, показатели ПО и МНО снижены) свидетельствует о состоянии гиперкоагуляции, которая может наблюдаться вследствие массивного поступления тканевого тромбопластина в кровотоки (травма, некроз), а также во время беременности и после родов.

2.2.2.3. Исследование конечного этапа вторичного гемостаза

Тромбиновое время

Тест тромбинового времени (ТВ) имитирует процесс превращения фибриногена в фибрин (см. рисунок 3). Тест позволяет определить количественные и качественные изменения фибриногена в исследуемой плазме, повышение содержания в ней физиологических (гепарин) и патологических (ПДФ, антитромбины и др.) ингибиторов тромбина и фибринообразования.

Тест ТВ целесообразно выполнять, если результаты ПТ или АЧТВ превышают нормальные значения.

Принцип метода. Определяют время свертывания плазмы под влиянием тромбина (бычьего или человеческого).

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Варианты постановки. Мануальный и коагулометрический.

Интерпретация результатов

Результат выражают в секундах, сравнивая время свертывания контрольной нормальной и исследуемой плазмы. В норме значение ТВ составляет 14–16 с (см. таблицу 2 приложения). Необходимо отметить, что пределы нормальных значений ТВ зависят от условий постановки метода и должны определяться в каждой лаборатории самостоятельно. Тест не стандартизован, в разных лабораториях могут использоваться разные концентрации тромбина.

Удлинение ТВ наблюдается при снижении уровня фибриногена (менее 1,0–0,5 г/л), избытке в крови гепарина в результате гепаринотерапии, накоплении продуктов деградации фибриногена/фибрина, наличии в крови ингибиторов тромбина и фибриногена.

Если в плазме присутствует гепарин, то комплекс гепарин-антитромбин быстро нейтрализует добавленный тромбин, и ТВ будет удлиняться. Среди скрининговых тестов ТВ — наиболее чувствительный тест на присутствие гепарина. Он может быть использован для мониторинга терапии различными дозами гепарина. В данном случае определение ТВ является тестом, дополняющим АЧТВ. На результат теста ТВ влияет меньшее число факторов, чем на АЧТВ. В то же время известно, что чувствительность ТВ к гепарину зависит от pH, свойств тромбина (происхождение и степень очистки), т. е. в значительной степени определяется составом набора реагентов.

Удлинение ТВ также может свидетельствовать об активации фибринолитической системы крови при различных состояниях — ДВС-синдроме, тромболитической терапии, заболеваниях печени и поджелудочной железы. В таких случаях обычно в крови наблюдается повышение уровней РФМК, ПДФ и D-димера.

Иногда удлинение ТВ наблюдается в присутствии аутоантител к тромбину или парапротеинов при миеломной болезни, которые препятствуют полимеризации мономеров фибрина. Ингибиторами полимеризации фибрин-мономеров могут быть IgG или IgM, которые удлиняют ТВ.

Укорочение ТВ свидетельствует об активации системы гемостаза — гиперкоагуляции (ДВС-синдром, гиперкоагуляционная стадия), а также может наблюдаться при гиперфибриногенемии.

Определение содержания фибриногена в плазме

Определение фибриногена является скрининговым тестом исследования гемостаза, используются клоттинговые и иммунологические методы. Из клоттинговых тестов наиболее широко применяют хронометрический метод по Клауссу. Это наиболее предпочтительный метод определения концентрации фибриногена на коагулометрах. Иммунологические методы позволяют произвести качественное, полуколичественное и количественное определение содержания фибриногена, однако в связи с ограничениями аналитического характера (одновременная дифференцировка, кроме нативного фибриногена, продуктов его деградации) и высокой стоимостью тест-систем они пока не нашли широкого применения в КДЛ.

Хронометрический метод по Клауссу

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Принцип

Метод основан на определении времени выпадения сгустка при добавлении очень высокой концентрации тромбина к разбавленной плазме (обычно в 10 раз). При этом логарифм времени выпадения сгустка прямо пропорционален логарифму концентрации фибриногена. В этих условиях критической для свертывания становится концентрация фибриногена. Калибровочная кривая показывает укорочение времени свертывания при увеличении концентрации фибриногена. Методика выполняема только на коагулометрах. Современные коагулометры после введения калибровочных данных рассчитывают концентрацию фибриногена автоматически.

Гепарин не оказывает влияния на результаты определения фибриногена. Основными ограничениями метода определения фибриногена по Клауссу является чувствительность результатов к гипо-, дис- и гиперфибриногенемии, а также к ПДФ, которые влияют на процесс полимеризации фибрин-мономеров и могут быть причиной ложно низких результатов.

Интерпретация результатов

Референтный диапазон для фибриногена в плазме составляет 1,8–4,0 г/л (см. таблицу 2 приложения).

Увеличение содержания фибриногена — гиперфибриногенемия — свидетельствует о повышенном риске развития главным образом артериальных тромбозов, сопровождается инфаркты различных органов. В то же время увеличение содержания фибриногена в плазме не всегда говорит о гиперкоагуляции или склонности к тромбозам. Фибриноген является белком острой фазы, поэтому повышение его концентрации наблюдается при острых воспалительных процессах любой этиологии. При тяжелых бактериальных инфекциях его содержание в плазме может превышать 10 г/л.

При атеросклерозе наблюдается устойчивое увеличение фибриногена, трудно корригируемое лекарственными препаратами, что является отражением активности воспаления, связанного с атеросклеротическим процессом. Повышенный фибриноген ассоциируется с увеличенным риском острого коронарного синдрома, например инфаркта миокарда. Корреляция между уровнем фибриногена и развитием этих осложнений особенно четко прослеживается у пациентов молодого и среднего возраста. Увеличение содержания фибриногена сопровождается бессимптомное течение начальных стадий заболеваний периферических артериальных сосудов.

Снижение концентрации фибриногена в плазме — гипофибриногенемия — характерна для врожденного дефицита фибриногена, гипокоагуляционной стадии ДВС-синдрома, а также отмечается при нарушениях белково-синтетической функции печени. Гипофибриногенемии могут вызвать некоторые лекарственные препараты (вальпроат натрия, фибраты, фенобарбитал, стрептокиназа, урокиназа, L-аспарагиназа). Следует помнить, что при выраженной гипофибриногенемии изменены результаты всех предшествующих тестов коагулограммы: удлинено АЧТВ, протромбиновое и тромбиновое время, что связано с замедленным образованием фибрина из фибриногена, единственным источником которого в этих тестах является плазма больного.

Дисфибриногенемия — качественный дефицит фибриногена, который характеризуется выработкой фибриногена, имеющего функциональные нарушения. Дисфибриногенемия может сопровождаться геморрагическим синдромом, а в некоторых случаях — тромбозами в сочетании с кровотечениями. При наследственных формах патологии большинство пациентов являются гетерозиготными. Приобретенные формы дисфибриногенемии могут наблюдаться при заболеваниях печени или реакциях острой фазы воспаления. Поскольку клоттинговый тест по Клауссу оценивает функциональную активность фибриногена, а иммунохимические тесты — его содержание в плазме, при дисфибриногенемии наблюдаются расхождения в результатах этих тестов — гипофибриногенемия по Клауссу, но нормальное содержание фибриногена в иммунохимических тестах.

2.2.2.4. Тесты оценки состояния фибринолитической системы

Лизис эуглобулинов — XIIa-калликреин-зависимый фибринолиз

В свернувшейся крови здоровых лиц фибринолиз выражен слабо, что связано с высоким содержанием антиплазминов и других ингибиторов. В связи с этим, фибринолитическую активность исследуют в эуглобулиновой фракции плазмы крови, в процессе получения которой фибриновый сгусток отделяют от ингибиторов фибринолиза.

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Принцип метода

Из плазмы крови в кислой среде выделяют эуглобулиновую фракцию белков, содержащую плазминоген, фибриноген и факторы свертывания и

не содержащую ингибиторов фибринолиза. Для получения эуглобулиновой фракции к плазме добавляют уксусную кислоту и каолин и инкубируют 30 мин на водяной бане при +37 °С. При добавлении к эуглобулиновой фракции плазмы активатора каолина происходит активация факторов контактной фазы: переход ф. XII в ф. XIIa, преобразование прекалликреина в калликреин и превращение пламиногена в плазмин. Затем смесь центрифугируют. Полученную надосадочную жидкость сливают, пробирку осушают опрокидыванием на фильтровальную бумагу. Осадок эуглобулинов разводят и помещают пробирку на водяную баню, добавляют хлорид кальция, осторожно перемешивают и регистрируют время полного растворения сгустка. При осаждении эуглобулиновой фракции плазмы основные ингибиторы фибринолиза, (α_2 -антиплазмин и др.) остаются в надосадочной жидкости и удаляются. Поэтому эуглобулиновый лизис отражает активность фибринолиза в условиях исключения ингибирующего действия антиплазминов. Его скорость отражает активность пламиногена и степень его активации в плазме. При добавлении кальция хлористого образуется сгусток фибрина, который лизируется плазмином за 5–12 мин. Время от момента образования сгустка до его растворения выражает фибринолитическую активность исследуемой плазмы крови.

В норме полный лизис эуглобулиновой фракции происходит в течение 5–12 мин.

Интерпретация результатов

Удлинение времени лизиса свидетельствует о снижении уровня или недостаточной активации участвующих в реакции компонентов: ф. XII, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена, пламиногена. Нарушения XIIa-зависимого фибринолиза выявляются при многих видах патологии: у больных с тромбозами, при синдроме ДВС, заболеваниях печени, аутоиммунных заболеваниях.

Укорочение времени лизиса эуглобулинов свидетельствует об активации фибринолиза и увеличении содержания пламиногена и его активаторов, а также может отмечаться при гипо- и дисфибриногенемии.

Тест может применяться для контроля за эффективностью фибринолитической терапии. Для правильной трактовки результатов теста необходим учет исходного содержания в плазме фибриногена, так как при снижении концентрации фибриногена время лизиса укорачивается, что трактуется ошибочно как гиперфибринолиз. При гиперфибриногенемии время лизиса удлиняется. Поэтому при отклонениях содержания фибриногена в плазме, а также неполноценной полимеризации фибрина и гепаринемии возможно получение ошибочных результатов.

В связи с ориентировочным характером и недостаточной специфичностью теста спонтанного лизиса эуглобулинового сгустка, в современных лабораториях он заменяется на определение отдельных факторов фибринолиза, в первую очередь пламиногена.

Определение плазминогена фотометрическим методом с применением хромогенного субстрата

Материал для исследования

Цитратная бедная тромбоцитами плазма

Принцип метода

При добавлении стрептокиназы к разведенному образцу исследуемой плазмы образуется плазминоген-стрептокиназный комплекс, который обладает ферментативной активностью и способен расщеплять хромогенный субстрат (см. подраздел 2.2.2), в результате чего высвобождается паранитроанилин (pNA), дающий желтое окрашивание раствора. Скорость гидролиза нитроанилиновой связи хромогенного субстрата зависит от активности плазминогена в образце. Регистрируют изменение оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 405 нм. Схематически ход реакции представлен на рисунке 14.

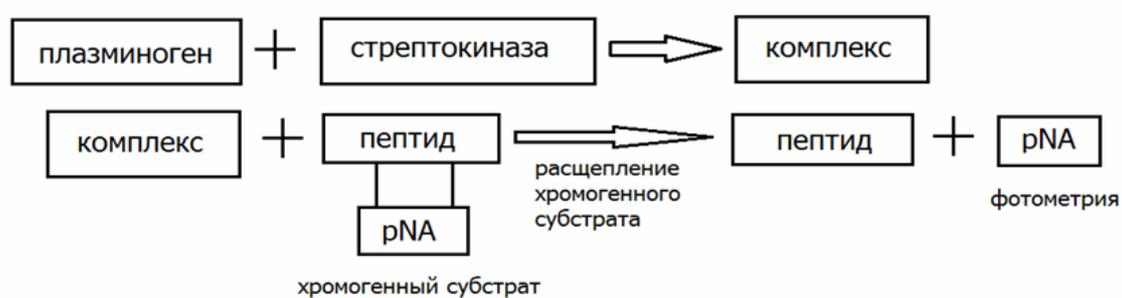


Рисунок 14 — Принцип определения плазминогена хромогенным методом (пояснения в тексте)

Оценка результатов

Результат выражают в процентах по отношению к норме. В нормальной плазме активность плазминогена составляет 75–140 %.

Определение плазминогена используется в диагностике тромбофилий, мониторинге ДВС-синдрома, для контроля за лечением тромболитиками (при тромбозах, тромбоэмболиях, инфарктах органов). Сниженный уровень плазминогена является маркером риска тромбообразования.

2.2.2.5. Тесты активации свертывания крови и фибринолиза

В современной клинической лабораторной диагностике определяют следующие маркеры активации свертывания крови и фибринолиза:

- растворимые фибрин-мономерные комплексы (растворимый фибрин);
- ранние и поздние продукты распада фибрина и фибриногена (ПДФ);
- D-димер.

Для выявления РФМК в клинической практике используются следующие тесты:

- паракоагуляционные тесты (этаноловый, протаминсульфатный и оффантролиновый);
- определение фибринопептида А.

Паракоагуляционные тесты

Принцип основан на феномене неферментативного свертывания продуктов растворимого фибрина (или РФМК) при добавлении к плазме, в которой они содержатся, 50 % раствора этанола или 1 % раствора протаминсульфата.

Этаноловый тест

Материал для исследования

Цитратная богатая тромбоцитами плазма.

Принцип. Тест основан на появлении желеобразной массы (паракоагулята) в плазме через 10 мин (при температуре +18...+25 °С) после добавления к ней 50 % этанола.

Оценка результатов

Положительной считается проба, в которой желеобразный сгусток появляется через 10 мин после добавления этанола. Более позднее образование геля и сгустка не учитывается. Положительная проба указывает на наличие в плазме активного тромбина и свидетельствует о циркуляции в крови РФМК (комплексов фибрин-мономеров с фибриногеном и фибринопептидами А и В), которые под действием тромбина сворачиваются и находящийся в них фибриноген включается в структуру фибринового сгустка. Проба менее специфична для РФМК, которые имеют в своем составе ПДФ, и не способны свертываться тромбином.

Ошибки при выполнении теста

При проведении теста при температуре воздуха выше +26 °С результат может быть ложноотрицательным, в связи с чем при высокой температуре воздуха в помещении требуется термостатирование.

В случае выраженной гипофибриногемии (менее 0,5 г/л) этаноловый тест может стать отрицательным, при значительной гиперфибриногемии (выше 6,0 г/л) — ложноположительным.

Этаноловый тест является простым экспресс-тестом, позволяющим выявить повышенное содержание в плазме крови РФМК. Однако способ является качественным, что значительно снижает его информативность.

Протаминсульфатный тест

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Принцип. Появление в плазме сгустка при добавлении протаминсульфата свидетельствует о наличии в ней неполимеризующихся (заблокированных) РФМК, имеющих в своем составе ранние и поздние ПДФ. В норме тест отрицательный.

Необходимо отметить, что протаминсульфат связывается с гепарином, поэтому у больных, получавших гепарин, протаминсульфатный тест дает отрицательный результат.

В настоящее время этаноловый и протаминсульфатный тесты определения РФМК считают устаревшими и редко используют в лабораторной практике.

Орто-фенантролиновый тест

Материал для исследования. Цитратная богатая тромбоцитами плазма

Принцип. При добавлении к исследуемой плазме о-фенантролина появляются хлопья, представляющие собой РФМК.

Оценка результатов

Тест проводится полуколичественным способом. Реакция считается положительной, если в плазме в первые 150 секунд регистрируются хорошо видимые в проходящем свете хлопья и зерна паракоагулята. Отмечают время их появления в секундах и по таблице, которая строится на основе калибровочного графика, определяют РФМК в исследуемой плазме.

В норме паракоагуляция в плазме в о-фенантролиновом тесте определяется в интервале от 70 до 150 с или вообще не определяется. Это соответствует содержанию РФМК от 3 до 4 мкг/100 мл.

Появление хлопьев паракоагулята в течение первых 50 секунд свидетельствует о высоком содержании РФМК в плазме, что характерно для активации свертывания крови. Тест используется для диагностики нарушений свертывания крови, а также при мониторинге антикоагулянтной терапии.

Преимущества теста

Среди всех паракоагуляционных тестов данный метод является наиболее чувствительным (более 85 %), а также позволяет провести полуколичественную оценку уровня РФМК в плазме.

Определение фибринопептида А

Относится к прямым, коротко живущим маркерам тромбинемии, и его определение часто применяется в зарубежной диагностической практике. Для определения ФП А используются иммунохимические методы (ELISA). В норме содержание ФП А в плазме ≤ 3 нг/мл. ФП А — очень чувствительный тест на потребление фибриногена, и является показателем активности тромбина. Тест используется в комплексе с другими маркерами (Д-димер, ПДФ, РФМК) для выявления повышенной склонности к свертыванию крови и тромбообразованию. Концентрация ФП А повышается при различных заболеваниях с тромбоэмболией.

Определение продуктов деградации фибрина/фибриногена

Для определения ПДФ в КДЛ наиболее широко используются метод латекс-агглютинации и твердофазного иммуноферментного анализа

Определение ПДФ методом латекс-агглютинации

Принцип

Тест основан на способности частиц латекса, покрытых антителами к ПДФ, агглютинировать при смешивании с сывороткой крови, содержащей ПДФ. Тест проводят с разными разведениями исследуемой сыворотки.

Материалом для исследования является сыворотка крови.

Оценка результатов

Уровень ПДФ измеряется, исходя из наибольшего разведения образца сыворотки, в котором еще определяется агглютинация частиц латекса. По-

лученный результат умножают на чувствительность диагностикума (приводится в инструкции к набору).

В норме содержание ПДФ не превышает 10 мкг/мл (при определении методом латекс-агглютинации); при определении иммуноферментным методом — 15–25 мкг/мл.

Повышенный уровень ПДФ свидетельствует о гиперфибринолизе и наблюдается при тромбозах, тромбоэмболиях, ДВС-синдроме, а также при лечении фибринолитиками.

Определение D-димера

D-димер является наиболее специфичным и информативным маркером образования и растворения фибриновых сгустков, широко применяемым в клинической практике.

Определение содержания D-димера основано на использовании моноклональных антител, которые распознают антигенные детерминанты только D-димера. Таких эпитопов нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономерах. D-димер — показатель того, что в процессе фибринолиза расщепляется именно фибрин, а не фибриноген или фибрин-мономеры. Поскольку специфические антитела не взаимодействуют с фибриногеном, исследования могут проводиться как в плазме, так и в сыворотке. На определение D-димера практически не оказывает влияние техника взятия крови, примесь тромбоцитов, не требуется использования ингибиторов для подавления других факторов.

Основные методы определения D-димера:

1. Полуколичественное мануальное определение в тесте агглютинации частиц латекса, покрытых специфическими моноклональными антителами. D-димер определяется в плазме. Существует метод, основанный на применении биоспецифических антител, взаимодействующих с областью сшивки и поверхностным белком мембран эритроцитов. В присутствии D-димера эти антитела вызывают агглютинацию собственных эритроцитов больного. Тест выполняют в цельной капиллярной крови, результат получают через несколько минут после взятия крови.

2. Количественное определение иммунохимическими методами: ELISA, иммунохемилюминесценция, иммунотурбидиметрия или иммунонефелометрия.

Референтный диапазон D-димера плазмы для большинства используемых тест-систем 20–500 мкг/л (нг/мл). Необходимо отметить, что референтные диапазоны зависят от используемой тест-системы и значительно различаются в различных КДЛ. Ложнозавышенные результаты теста может давать значительное присутствие D-мономера (см. рисунок 6), которые являются продуктами первичного фибриногенолиза, и ревматоидный фактор.

В клинической практике основным показанием к определению D-димера является исключение диагноза тромбоза глубоких вен/тромбоэмболии ле-

точной артерии, что особенно важно для амбулаторных пациентов с наличием характерных клинических симптомов. В этих случаях определение D-димера используется как скрининговый тест первой линии. Значения выше пороговых (500 мкг/л) характерны для венозной тромбозной эмболии (диагностическая чувствительность 100 %, специфичность 45 %). Концентрация D-димера ниже 500 мкг/л исключает венозную тромбозную эмболию (отрицательное прогностическое значение 99 %) и устраняет необходимость дальнейшего обследования (ультразвуковое исследование).

Следует отметить, что клиническая информативность исследования D-димера для диагностики тромбоза глубоких вен зависит от клинических особенностей пациентов. С одной стороны, тест высоко чувствителен для раннего выявления внутрисосудистого формирования сгустка. Однако, вследствие его низкой специфичности, у стационарных пациентов с инфекционными заболеваниями, раком и после любого хирургического вмешательства возможно получение ложноположительных результатов.

Содержание D-димера является ценным показателем для мониторинга состояния пациента во время и после лечения антикоагулянтами при возвратном тромбозе глубоких вен. Уровни последовательно уменьшаются в ходе лечения, и значение D-димера ниже 500 мкг/л имеет высокое отрицательное прогностическое значение в отношении повторения тромбоза.

ДВС-синдром сочетается с увеличением содержания D-димера, но его уровни не связаны с исходами заболевания.

2.2.2.6. Определение первичных физиологических антикоагулянтов

Методы оценки активности антитромбина III

Для определения антитромбина используются различные подходы:

- метод с хромогенным субстратом;
- клоттинговый метод (оценка интенсивности инактивации стандартных доз тромбина с регистрацией времени свертывания плазмы);
- иммунохимический метод (количественное определение содержания в плазме антитромбина с применением стандартных антисывороток к АТ).

Определение активности антитромбина в тесте с хромогенным субстратом

Материал для исследования. Цитратная бедная тромбоцитами плазма.

Принцип

Метод основан на способности антитромбина инактивировать ф.Ха или тромбин. При добавлении определенного количества тромбина или ф.Ха к тестируемой цитратной плазме часть добавленного фермента инактивируется имеющимся в анализируемой пробе антитромбином. Остаточную активность ф.Ха определяют по степени гидролиза хромогенного субстрата. Регистрируют изменение оптической плотности на фотометре при длине волны 405 нм.

Определение активности АТ III проводится с целью диагностики наследственного и приобретенного дефицита этого физиологического антикоагулянта, приводящего к развитию тромбозов и ДВС-синдрома.

В норме активность антитромбина III составляет 85–130 %. Снижение активности антитромбина III наблюдается при тромбофилии, а также в процессе развития ДВС-синдрома, тяжелых поражениях печени. Выявление сниженной активности АТ III — менее 50 % при повторном обследовании указывает на высокий риск патологического тромбообразования. При этом тромбозы при дефиците АТ локализуются как в венозной, так и в артериальной системе.

Схема метода определения активности антитромбина с использованием ф.Ха приведена на рисунке 15.

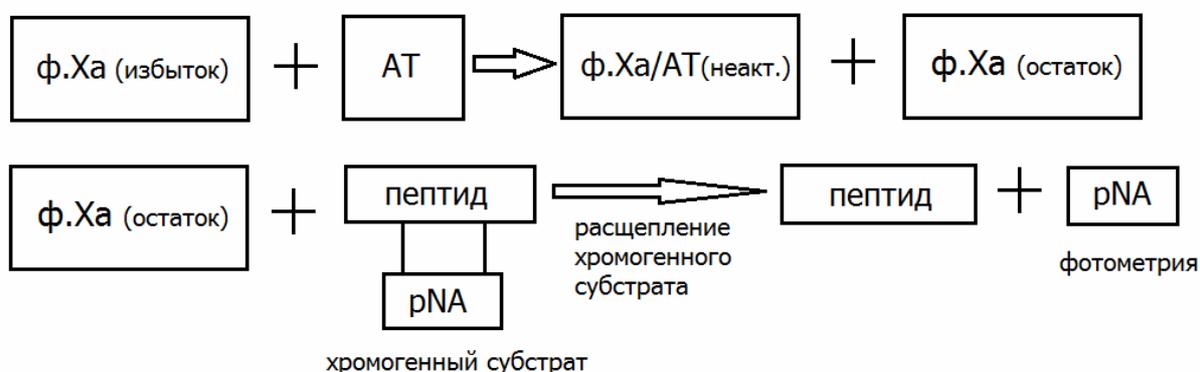


Рисунок 15 — Принцип определения антитромбина (АТ) хромогенным методом с использованием ф.Ха (пояснение в тексте)

Определение антикоагулянтной активности, связанной с протеином С

Протеин С циркулирует в крови в виде профермента, под действием комплекса тромбин-тромбомодулин в процессе свертывания крови протеин С активируется и действует как антикоагулянт, вызывая протеолиз факторов Va и VIIIa в присутствии своего кофактора – протеина S (см. подраздел 1.3.1). Нарушения в системе протеина С являются причиной развития тромбофилий и могут быть обусловлены тремя основными причинами – дефицитом протеина С, дефицитом протеина S или резистентностью ф. Va к действию активированного протеина С. Глобальную скрининговую оценку этих дефектов выполняют коагуляционным методом в тесте АЧТВ до и после внесения в плазму активатора протеина С. Специфическим активатором протеина С является яд змеи щитомордника, обозначаемый как «протак» (Protac).

Скрининг нарушений в системе протеина С

Материал для исследования.

Цитратная бедная тромбоцитами плазма

Принцип

Функциональную активность этого антикоагулянта проводят после его активации ферментом из яда *Agkistrodon contortrix* (змеи щитомордника) — протаксом, представляющим собой комплекс тромбин-тромбомодулин. Под действием протакса протеин С активируется и действует как антикоагулянт, вызывая протеолиз факторов Va и VIII в присутствии своего кофактора — протеина S. В результате удлиняется время свертывания плазмы в тесте АЧТВ, который выполняют до и после внесения в плазму активатора протеина С (рисунок 16).

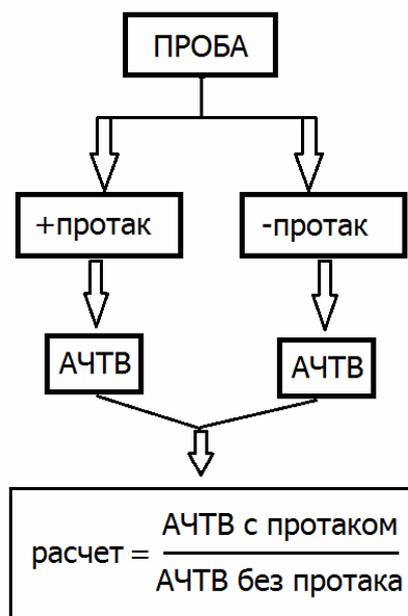


Рисунок 16 — Принцип определения протеина С коагуляционным методом

Примечание. После добавления к исследуемой пробе активатора протеина С протакса выполняют тест АЧТВ. Параллельно определяется АЧТВ без активации исследуемой плазмы, т.е. в отсутствии протакса. Рассчитывают отношение АЧТВ с протаксом/АЧТВ без протакса.

Результаты анализа представляют в виде нормализованного отношения (НО):

$$\text{НО} = \frac{(\text{АЧТВ с протаксом} / \text{АЧТВ без протакса}) \text{ пациента}}{(\text{АЧТВ с протаксом} / \text{АЧТВ без протакса}) \text{ стандартной плазмы}} \times \text{НО плазмы-калибратора}$$

где НО плазмы-калибратора указано в паспорте диагностического набора.

В норме НО превышает 0,7. Значения НО ниже 0,7 свидетельствуют о наличии нарушений в системе протеина С и могут быть обусловлены дефицитом протеина С, протеина S, а также резистентностью фактора Va к действию активированного протеина С (наличие мутации гена фактора V). Указанные нарушения являются основными причинами развития тромбофилий. Для выявления конкретной причины изменения результатов данного теста проводят дополнительные исследования.

Определение резистентности ф. Va к действию активированного протеина С

Резистентность к действию активированного ПС обусловлена мутацией гена ф. V (Лейден). Эту патологию можно выявить при проведении коагуляционного теста с протактом, который производится так же, как и в предыдущем методе, только плазму пациента разбавляют в соотношении 1:5 дефицитной по ф. V плазмой. При внесении активатора ПС в смесь нормальной и дефицитной по ф. V плазмой время свертывания в тесте АЧТВ удлинится примерно в 2 раза, НО превышает 0,8. Если имеется резистентность ф. Va к активированному ПС, удлинение АЧТВ выражено меньше, значения НО ниже 0,8. Тест имеет специфичность для выявления резистентности ф. Va к действию активированного протеина С примерно в 80 %, неполная специфичность связана с влиянием на результат других факторов, в частности с подавлением активности ф. VIII. Окончательное подтверждение наличия мутации Лейдена проводят с помощью ПЦР-диагностики.

Определение активности протеина С

Для определения ПС разработано несколько методов: иммунохимический метод (твердофазный иммуноферментный анализ, ракетный иммуноэлектрофорез), метод с хромогенным субстратом и коагуляционный вариант.

Иммунохимическое определение ПС позволяет выявить только классическое снижение концентрации ПС и не определяет его функциональную неполноценность. В связи с этим чаще используются функциональные методы определения активности ПС — коагулометрический или в тесте с хромогенным субстратом.

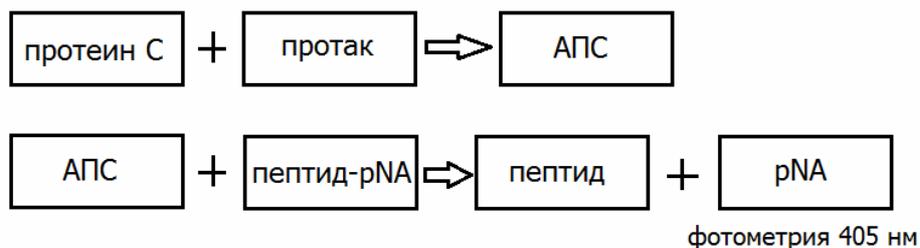
Коагулометрическое определение активности ПС проводится в тесте с протактом. При этом пробы пациентов сопоставляются с дефицитной по ПС плазмой, которая входит в состав диагностического набора. Результат оценивается по калибровочной кривой, активность ПС выражают в процентах к норме.

Принцип теста с использованием хромогенного субстрата основан также на активации ПС протактом с последующим определением (кинетическим методом или методом конечной точки) изменения оптической плотности пробы. Активированный протактом ПС разрушает нитроанилиновую связь хромогенного субстрата, в результате в пробе происходит накопление пара-нитроанилина (pNA). Количество высвобождаемого pN прямо пропорционально активности ПС в плазме. Измерение производят при длине волны 405 нм (рисунок 17).

Результат вычисляют по формуле, активность ПС выражают в процентах:

$$\text{ПС, \%} = \frac{A_{\text{образца}} \times \text{ПС}_{\text{стандарт-плазмы}} (\%) }{A_{\text{стандарт-плазмы}}}$$

где $A_{\text{стандарт-плазмы}}$ — оптическая плотность в пробе с известным значением ПС; $\text{ПС}_{\text{стандарт-плазмы}} (\%)$ — активность ПС в стандартном образце плазмы (значение дается фирмой-производителем); $A_{\text{образца}}$ — оптическая плотность в исследуемом образце плазмы пациента.



АПС — активированный протеин С

Рисунок 17 — Принцип определения активности ПС в тесте с хромогенным субстратом (пояснение в тексте)

В норме активность ПС составляет 70–140 %. Снижение активности ПС свидетельствует о недостаточности ПС, приобретенной или наследственно обусловленной, наблюдается при тромбозах (тромбофилиях), при приеме непрямых антикоагулянтов, тяжелых поражениях печени, ДВС-синдроме.

Определение активности протеина S

Проводится клоттинговым методом. Тест-система содержит исследуемую плазму, активированный ПС, субстрат его действия — ф. Va и дефицитную по протеину S плазму. Регистрируют время свертывания крови в тесте АЧТВ после добавления хлорида кальция. Результат, полученный в секундах, переводится в активность ПS в % по калибровочной кривой. В норме активность ПS составляет 65–140 %. Снижение активности ПS характерно для тромбофилии, обусловленной снижением синтеза этого белка. Симптоматические формы дефицита ПS характерны для тяжелых поражений печени, ДВС-синдрома, наблюдаются при приеме непрямых антикоагулянтов.

Приложение

Таблица 1 — Параметры агрегатограммы тромбоцитов практически здоровых лиц

Индуктор агрегации и показатель агрегации	Значение ($X_{cp} \pm \sigma$)
<i>Концентрация АДФ 1 мкмоль/л:</i>	
Степень агрегации, %	21,92 ± 1,41
Время агрегации, с	126,71 ± 4,24
Скорость агрегации, %/мин	23,74 ± 2,29
<i>Концентрация АДФ 2,5 мкмоль/л:</i>	
Степень агрегации, %	30,67 ± 4,9
Время агрегации, с	174,20 ± 14,19
Скорость агрегации, %/мин	27,76 ± 2,26
<i>Концентрация адреналина 2,5 мкмоль/л:</i>	
Степень агрегации, %	61,55 ± 5,87
Время агрегации, с	180,33 ± 8,60
Скорость агрегации, %/мин	24,02 ± 1,90
<i>Концентрация ристомицина (ристоцетина) 1 мг/дл:</i>	
Степень агрегации, %	40,88 ± 4,52
Время агрегации, с	177,18 ± 5,03
Скорость агрегации, %/мин	19,44 ± 2,71

Таблица 2 — Параметры практической коагулограммы

Фаза свертывания	Тесты	Показатели в зависимости от состояния системы гемостаза		
		норма	опасная зона гипокоагуляции (кровоточивость)	опасная зона гиперкоагуляции (тромбоз)
Первичный гемостаз – сосудисто-тромбоцитарный	Количество тромбоцитов	150–450×10 ⁹ /л	<100×10 ⁹ /л	>450×10 ⁹ /л
Вторичный гемостаз: I фаза — протромбинообразование	АЧТВ, с	35–45	>50	<30
II фаза — тромбинообразование	ПВ, с	12–14	>14	<12
	ПТИ, %	75–110	<75	>110
	Процент активности факторов протромбинового комплекса по Квику	70–120	<0	>120
	МНО, ед.	0,8–1,2	>1,2	<0,8
III фаза — фибринообразование	ТВ, с	14–18	>18	<14
	Фибриноген, г/л	1,8–4,0	<1,8	>4,5
	РФКМ, мг/л	<40	–	>45
Антикоагулянты	Антитромбин, %	80–130	–	–
	Протеин С, %	70–140	–	–
	Протеин S, %	70–140	–	–
Фибринолиз	ПДФ, мг/л	<15	–	–
	D-димер, мкг/л	20–500	–	>500
	Эуглобулиновый лизис, мин	180–240	–	–

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексеева, Л. А.* ДВС-синдром: руководство / Л. А. Алексеева, А. А. Рагимов. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 120 с.
2. *Баркаган, З. С.* Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. — М.: Ньюдиамед, 2008. — 292 с.
3. *Вавилова, Т. В.* Рекомендации по лабораторным методам исследования системы гемостаза / Т. В. Вавилова, А. Б. Добровольский // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. — 2007. — № 7. — С. 49–52.
4. *Дмитриев, В. В.* Практическая коагулология / В. В. Дмитриев. — Минск: Бел.наука, 2004. — 544 с.
5. *Долгов, В. В.* Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В. В. Долгов, П. В. Свиринов. — М. – Тверь: Триада, 2005. — 227 с.
6. *Иванов Е. П.* Руководство по гемостазиологии / Е. П. Иванов. — Минск: Беларусь, 1991. — 302 с.
7. Гемостазиология в клинической и лабораторной практике: учеб. пособие / В. С. Камышников [и др.]. — Минск: Адукацыя і выхаванне, 2011. — 320 с.
8. *Камышников, В. С.* Методы клинических лабораторных исследований: учебник / В. С. Камышников, О. А. Волотовская, А. Б. Ходюкова; под ред. В. С. Камышникова. — М.: Медпресс-информ, 2009. — 752 с.
9. *Кишкун, А. А.* Руководство по лабораторным методам диагностики / А. А. Кишкун. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 800 с.
10. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: ГЭОТАР-Мед, 2004. — 512 с.
11. Пособие по изучению адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов / А. Л. Берковский [и др.]. — М., 2007. — 30 с.
12. *Blair, P.* Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates / P. Blair, R. Flaumenhaft // Blood Reviews. — 2009. — Vol. 23. — P. 177–189.
13. *Hiller, E.* Basic Principles of Haemostasis / E. Hiller // Modern Haematology: Biology and Clinical Management. — New Jersey: Humana Press, 2007. — P. 327–345.
14. *Mosesson, M. W.* Fibrinogen and fibrin structure and functions / M. W. Mosesson // J. Thrombosis and Haemostasis. — 2005. — Vol. 3. — P. 1894–1904.
15. Normal haemostasis / G. Kemball-Cook [et al.] // Postgraduate Haematology. — London: Blackwell Publishing, 2005. — P. 783–808.

Учебное издание

Ярец Юлия Игоревна
Новикова Ирина Александровна

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ
СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА**

**Учебно-методическое пособие
для студентов 4 курса медико-диагностического факультета
медицинских вузов**

Редактор ***Т. М. Кожмякина***
Компьютерная верстка ***А. М. Терехова***

Подписано в печать 14.02.2014.
Формат 60×84¹/₁₆. Бумага офсетная 65 г/м². Гарнитура «Таймс».
Усл. печ. л. 4,19. Уч.-изд. л. 4,58. Тираж 100 экз. Заказ № 40.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/46 от 03.10.2013.
Ул. Ланге, 5, 246000, Гомель.

