**Клинико-лабораторная диагностика системы гемостаза, принципы и схемы исследования.** Н.С. Кизилова г. Новосибирск 2007 год.

**Содержание:**

1. Введение 1.1 Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз 1.2. Коагуляционный гемостаз 1.2.1. Международная номенклатура факторов свертывания крови 1.2.2. Схема свертывания крови 1.3. Физиологические антикоагулянты 1.4. Система фибринолиза

2. Методы исследования системы гемостаза

3. Тесты для оценки сосудисто-тромбоцитарного компонента гемостаза 3.1. Время кровотечения 3.2. Количество тромбоцитов в крови 3.3. Индуцированная агрегация тромбоцитов

4. Скрининговые тесты для оценки плазменного звена гемостаза 4.1. Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АПТВ) 4.2. Протромбиновое время (ПВ) 4.3. Тромбиновое время (ТВ) 4.4. Концентрация фибриногена в плазмев

5. Методы определения физиологических антикоагулянтов. 5.1. Протеин С 5.2. Протеин S 5.3. Антитромбин III

6. Тесты для исследования фибринолитической системы 6.1. Время лизиса эуглобулиновых сгустков 6.2. Плазминоген и тканевой активатор плазминогена

7. Тесты активации свертывания крови 7.1. D-димеры 7.2. Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК)

8. Основные схемы обследования нарушений гемостаза 8.1. Определение причин кровоточивости 8.2. Диагностика болезни Виллебранда 8.3. Распознавание врожденных и приобретенных тромбофилий 8.4. Диагностика антифосфолипидного синдрома и выявление аутоантител, обладающих свойствами волчаночного антикоагулянта (ВА) 8.5. Актуальные вопросы диагностики острого и подострого ДВС-синдрома

9. Особенности системы гемостаза при физиологической беременности

10. Рекомендации по получению плазмы для исследования гемостаза

**Приложение 1** Устаревшие методы исследования гемостаза и их современные аналоги

**Список сокращений:** АДФ – аденозиндифосфат АНД – антикоагулянты непрямого действия АПС – активированный протеин С АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время (синоним АЧТВ) АТ – антитромбин III АФА - антифосфолипидные антитела АФС - антифосфолипидный синдром БВ - болезнь Виллебранда ВА – волчаночный антикоагулянт ВТЭ – венозный тромбоэмболизм ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови ИФА - иммуноферментный анализ КБС – коронарная болезнь сердца МИЧ – международный индекс чувствительности МНО – международное нормализованное отношение МТГФР – метилентетрагидрофолатредуктаза НГ – нефракционированный гепарин НО – нормализованное отношение ОФТ – ортофенантролиновый тест ПАИ-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа ПАИ-2 – ингибитор активатора плазминогена 2 типа ПВ – протромбиновое время ПгG2 – Простогландин G2 ПгН2 – Простогландин Н2 ПДФ – продукты деградации фибрина ПТ – протромбиновый тест ПО – протромбиновое отношение ПИ – протромбиновый индекс РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы СКВ – системная красная волчанка ТАП – тканевой активатор плазминогена ТВ – тромбиновое время ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии ФАТ – фактор активации тромбоцитов ФВ – фактор Виллебранда ЭДТА - этилендиаминтетраацетат PIVKA - Proteins Induced by Vitamin K Absence or Antagonists

**1. Введение**

Система гемостаза - биологическая система, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение жидкого состояния циркулирующей крови, а с другой – предупреждение и купирование кровотечений.

Компоненты системы гемостаза: сосудисто-тромбоцитарное звено система свертывания крови (коагуляция) физиологические антикоагулянты фибринолитическая система (тромболизис)

**1.1. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз**

В сосудисто-тромбоцитарном механизме свертывания крови участвуют сосуды, ткань, окружающая сосуды и форменные элементы крови (главная роль принадлежит тромбоцитам). Тромбоциты образуются в костном мозге из мегакариоцитов. Продолжительность их жизни около 9 суток. При недостаточном количестве тромбоцитов или их функциональной неполноценности развивается микроциркуляторный тип кровоточивости. К важнейшим функциям тромбоцитов относят адгезивно-агрегационную и ангиотрофическую. В условиях нормы эндотелий эффективно предупреждает процессы адгезии, агрегации тромбоцитов, а также реакций коагуляции. Способность эндотелия сохранять кровь в жидком состоянии обеспечивается синтезом ингибитора агрегации тромбоцитов простациклина и отрицательным зарядом эндотелиальных клеток. Кроме того, эндотелиальный белок тромбомодулин препятствует уже начавшейся коагуляции. Основной функцией тромбомодулина является инактивация тромбина и превращение (модификация) его в мощный активатор антикоагулянтной системы - протеин С. За счет этого происходит значимое снижение скорости коагуляционных реакций. Эндотелий участвует в фибринолизе за счёт синтеза и выделения в кровоток тканевого плазминогенового активатора, который активирует плазминовую систему. При повреждении мелкие сосуды спазмируются. Этот спазм обусловлен сокращением гладкомышечных клеток, он возникает рефлекторно и продлевается серотонином, тромбоксаном А2, катехоламинами и другими вазоконстрикторами, которые появляются из эндотелиальных клеток и тромбоцитов. Повреждение сосудов сопровождается быстрой активацией тромбоцитов. Эта активация обусловлена появлением высоких концентраций АДФ (из поврежденных эритроцитов и сосудов), а также появлением коллагеновых и фибриллярных структур из субэндотелия. Контакт крови с коллагеном немедленно ведёт к адгезии тромбоцитов, реализуемой с участием рецепторов GP-Ia, GP-Ib и фактора Виллебранда. Под влиянием АДФ, тромбоксана А2 и катехоламинов тромбоциты склеиваются между собой, образуя агрегаты, которые являются основой тромбоцитарной пробки. Усилению агрегации способствует тромбин, всегда появляющийся в результате свертывания крови в месте повреждения. Агглютинация и агрегация сопровождается изменением формы тромбоцитов и появлению рецепторов на мембране тромбоцитов к фибриногену (GPIIb-IIIa), благодаря чему, в присутствии ионов Са++, последний связывает между собой активированные тромбоциты. Такая связь между активированными тромбоцитами не прочна. Именно поэтому такую агрегацию называют обратимой. Образование прочной тромбоцитарной пробки следует после вторичной агрегации, которая сопровождается секрецией из тромбоцитов ПгG2, ПгH2, тромбоксана А2, ионов Са++, фактор активации тромбоцитов (ФАТ), адреналина, норадреналина, фибриногена и многих других. Секреция этих веществ обусловлена активацией актомиозиновой системы тромбоцитов, что обуславливает выделение вышеперечисленных субстанций из тромбоцитов за счёт повышения давления внутри тромбоцита. Кроме того, активация актомиозиновой системы ведет к ретракции (сокращению и уплотнению) тромбоцитарной пробки. В норме кровотечение из мелких сосудов прекращается не более чем через 5 минут.

**1.2. Коагуляционный гемостаз**

При повреждении крупных кровеносных сосудов тромбоцитарная пробка не способна остановить кровотечение. Только коагуляционный гемостаз способен остановить кровотечение из крупного сосуда. В коагуляционных реакциях принимают участие специальные белки, фосфолипиды (из тромбоцитарной мембраны), ионы кальция. Большинство белков, участвующих в коагуляции, являются проферментами (обозначаются римскими цифрами). Их активация осуществляется за счет протеолиза (они обозначаются римскими цифрами с добавлением буквы а, например, IIа, Xа, Vа и др.).

1.2.1. Международная номенклатура факторов свертывания крови

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Название фактора** | **Количество в мл (активность)** | **Достаточный минимум** | **Период полужизни** | **Избыток** |
| I. Фибриноген | 300 (170-450) мг | 50 мг | 100 ч. | 3-6 раз |
| II. Протромбин\* | 200мкг/70-130% | 80 мкг/40% | 72 - 96 ч | 2-3 раза |
| III. Тромбопластин | \_ | \_ | \_ | \_ |
| IV. Ионы Са++ | 2,3 - 2,8 ммоль/л | \_ | \_ | \_ |
| V. АС-глобулин | 25мкг/80-110% | 2,5-4мкг/10-15% | 12 - 15 ч. | 8-10 раз |
| VII. Проконвертин | 2 мкг/70-130% | 0,2 мкг/10% | 2 - 6 ч. | 10 раз |
| VIII. Антигемофильный глобулин | 50мкг/80-120% | 5-7мкг/10-15% | 7 - 8 ч. | 3-5 раз |
| IX. Кристмас-фактор | 3-4 мкг/70-130% | 4-6мкг/20-30% | 20 - 30 ч. | 4-5 раз |
| X. Стюарта-Прауэра фактор\* | 6-8 мкг/70-140% | 0,15мкг/20% | 30 - 70 ч. | 5 раз |
| XI. Предшественник тромбопластина | 7 мкг/70-130% | 15 мкг/15-20% | 30 - 70 ч. | 4-5 раз |
| XII. Хагеманна фактор | 40 мкг | не установлено | 50 - 70 ч. | неизвестно |
| XIII. Фибриназа, фибрин-стабилизирующий фактор | не установлено | 10% | 72 - 100 ч | 10 раз |
| VI фактор акцелерин исключен из номенклатуры факторов свертывания, признается лишь неактивная форма фермента – фактор V (проакцелерин), который при появлении следов тромбина переходит в активную форму. | | | | |

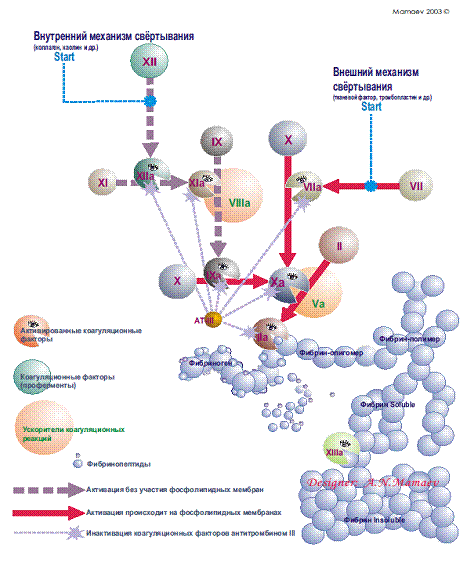
\* синтезируется в печени

Витамин"К"-зависимые факторы: II, VII, IX, X Чувствительные к тромбину факторы: I, V, VIII, XIII Факторы контакта: XII, XI, BM-кининоген, прекалликреин Факторы-сериновые протеазы: XII,XI,X,IX,VII, II, Плазмин

Дополнительные факторы: Фактор Виллебранда Фактор Флетчера Фактор Фитцжеральда

Процесс свертывания крови - это целая цепь последовательных ферментативных реакций, в которой проферменты, активируясь, способны активировать другие факторы свертывания крови. Удобно рассматривать схему коагуляции в виде каскада ферментативных реакций, условно разделенного на внутренний и внешний механизмы. Конечным продуктом коагуляционных реакций и по внешнему и по внутреннему механизму является фибрин.

1.2.2. Схема свертывания крови [А.Н. Мамаев 2003]



**Внешний механизм коагуляции.** Внешний механизм свертывания предполагает обязательное наличие тканевого фактора (фактора III), а старт коагуляции начинается с активации фактора VII. Активированный фактор VII переводит фактор X в Xа и активирует фактор IX (активация фактора IX идет медленно и существенной роли в коагуляции не играет). Затем фактор Xа переводит протромбин (II) в тромбин. Эту реакцию значительно ускоряют коагуляционный фактор Vа и фосфолипиды. Образование фибрина инициализируется по внешнему пути очень быстро (в течение секунд), что ведет к появлению первых порций тромбина, активирующих другие коагуляционные факторы (VIII, V, XIII и др.).

**Внутренний механизм коагуляции.** Старт коагуляции по внутреннему механизму начинается с активации фактора Хагемана (XII) и происходит на фосфолипидных мембранах тромбоцитов. Фактор Хагемана активируется коллагеном из эндотелия, адреналином и др., а затем уже активированная молекула фактора Хагемана преобразует фактор XI в XIа. В этой реакции принимает участие калликреин, который также активируется фактором XIа. В свою очередь, фактор XIа активирует фактор IX. Фактор IXа на фосфолипидных мембранах с участием фактора VIIIа и ионов Са++ путем протеолиза превращает фактор X в его активированную форму. Далее фактор Xа переводит протромбин в тромбин. Эту реакцию значительно ускоряют коагуляционный фактор Vа и фосфолипиды.

**Конечный этап коагуляции.** Переход фибриногена в фибрин происходит следующим образом: от фибриногена тромбин отщепляет 2 фибринопептида А и 2 фибринопептида В. Так образуются фибрин-мономеры. Затем формируются димеры, тримеры и олигомеры фибрина. После этого образуются фибриллы растворимого фибрина. Фибрин-стабилизирующий фактор (активированный тромбином) в присутствии Са++ превращает нестабильный, растворимый фибрин в стабильный нерастворимый фибрин. В результате этого сгусток фибрина становится резистентным к фибринолитическим агентам и с трудом разрушается другими протеолитическими веществами. Образовавшийся сгусток фибрина уплотняется за счет тромбоцитов, в большом количестве попадающих в структуру сгустка. Наступает ретракция сгустка фибрина. Сгусток, состоящий из тромбоцитов, эритроцитов и большого числа волокон фибрина, способен остановить кровотечение из крупных сосудов.

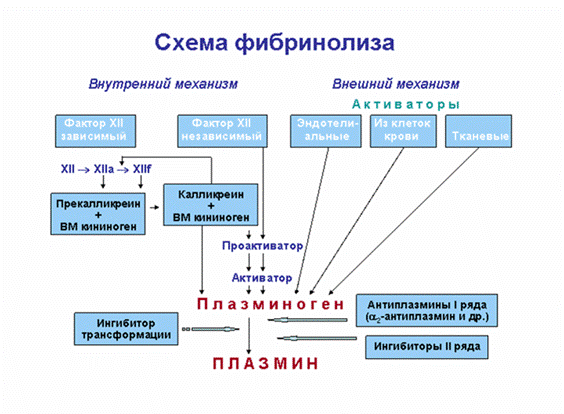
**1.3. Физиологические антикоагулянты.** Физиологические антикоагулянты разделяют на первичные и вторичные. Первичные антикоагулянты всегда присутствуют в крови, а вторичные образуются в результате коагуляционных реакций. *К первичным антикоагулянтам относятся:* антитромбин III; протеин С; протеин S;ингибитор внешнего пути свертывания (TFPI);кофактор гепарина II.Одним из основных антикоагулянтов является антитромбин III (АТ). Антитромбин III обладает мощным антикоагулянтным действием только в комплексе с гепарином. Этот комплекс надежно блокирует коагуляционные факторы IIа, IXа, Xа, XIа, XIIа и калликреин. Дефицит АТ – серьезный фактор риска развития венозных тромбозов.Другим ингибитором свертывания является кофактор гепарина II. Его действие усиливается во много раз при взаимодействии с гепарином. Однако клиническая значимость его невелика. К антикоагулянтам относится ингибитор внешнего пути свертывания (TFPI). Установлено, что он тормозит образование фактора Xа по внешнему механизму коагуляции.Антикоагулянтная система протеина С включает в себя целую цепь последовательных биохимических реакций. Образующийся в процессе коагуляции тромбин связывается на эндотелии с мембранным гликопротеином – тромбомодулином, и вследствие этого теряет всю свою коагуляционную активность, но сохраняет способность активировать протеин С. После этого активированный протеин С с протеином S в качестве кофактора, на фосфолипидной поверхности расщепляет фактор Vа и фактор VIIIа. Этот механизм эффективно предупреждает дальнейшее образование тромбина и трансформирует его в активатор антикоагулянтного механизма.Вторичными антикоагулянтами являются продукты деградации фибриногена и фибрина. Они тормозят конечный этап коагуляции.

**1.4. Система фибринолиза**

Фибриновый сгусток, образовавшийся в результате свертывания крови, в дальнейшем подвергается лизису под влиянием ферментов фибринолитической системы крови, происходит восстановление проходимости сосудов. Кроме того, фибринолитическая система контролирует заживление ран и выполняет ряд других важных функций.

*Фибринолиз включает 4 компонента:* основной фермент – плазмин; плазминоген (неактивный предшественник плазмина); активаторы плазминогена; ингибиторы плазминогена.

Активация плазминогена может происходить по внешнему и внутреннему механизму [10].



Основным активатором внешнего механизма является тканевый активатор плазминогена, синтезирующийся в эндотелиальных клетках, и урокиназа. Внутренняя активация осуществляется преимущественно комплексом ф.XIIa с калликреином (так называемый XIIa - зависимый фибринолиз). Фибринолиз может быть двух видов: первичный и вторичный. Первичный фибринолиз вызывается гиперплазминемией, при поступлении в кровь большого количества активаторов плазминогена. Вторичный фибринолиз развивается в ответ на внутрисосудистое свертывание крови, вызванное поступлением в кровоток тромбопластических веществ. Активаторы плазминогена преобразуют плазминоген в плазмин, а последний вызывает протеолиз фибрина. В результате протеолиза в кровотоке появляются продукты деградации фибрина (ПДФ). Важнейшими ингибиторами фибринолиза являются антиплазмины I ряда - ПАИ-1, ПАИ-2 и ?2-антиплазмин. Менее значимы ингибиторы II ряда – ?2-макроглобулин, антитрипсин, антитромбин III и С1-ингибитор. Большое клиническое значение имеет определение в крови одного из ПДФ, а именно D-димера, так как этот показатель является наиболее надежным маркёром образования фибрина внутри сосуда.

**Основные осложнения патологии гемостаза: 1.** *Кровотечение (при тромбоцитопении или дисфункции тромбоцитов, болезни Виллебранда, гемофилии А (В), клинической манифестации ДВС);*

**2.** *Внутрисосудистое свертывание крови (артериальные, венозные и смешанные тромбозы обусловленные тромбофилией или без нее, ДВС-синдром (острый, подострый, хронический), тромботическая тромбоцитопеническая пурпура).*  **Диагностика патологии гемостаза направлена на решение следующих задач:** *определение причин различных видов кровоточивости и тромбозов, подбор специфических методов профилактики и лечения;*

*отбор групп риска для предупреждения послеоперационных кровотечений и тромбоэмболий;*

*снижение летальности и инвалидизации при неотложных и критических состояниях, протекающих с ДВС-синдромом;*

*решение проблем привычного невынашивания беременности при антифосфолипидном синдроме (АФС), тромбофилиях;*

*контроль безопасности и эффективности терапии антикоагулянтами, антиагрегантами, тромболитиками, средствами заместительной терапии.*

**2.Методы исследования системы гемостаза**

Клинико-функциональные пробы при исследовании сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза (в условиях нашей лаборатории не проводятся): *определение ломкости микрососудов с помощью пробы манжеточной компрессии (проба Кончаловского-Румпель-Лееде); определение времени кровотечения из микрососудов без дополнительной компрессии (проба Дьюка с проколом уха и др.), либо на фоне венозного стаза (сдавление плеча манжетой до 40 мм.рт.ст. с проколами или надрезами кожи предплечья) – пробы Айви и Борхгревинка и др.*

**Лабораторные методы:** *Измерение числа и функции тромбоцитов (адгезия, агрегация) путем микроскопии или с использованием гематологических анализаторов (при скрининговых исследованиях) и агрегометров;* *Функциональные коагуляционные, или так называемые клоттинговые (по оценке времени свертывания мануально или с использованием коагулометров разных конструкций);* *Определение параметров фибринолиза;* *Амидолитические (тесты с использованием хромогенных субстратов к тромбину, плазмину, фактору Xа, XIIIа и др., и фотометров с фиксированной длиной волны измерений);* *Иммунологические методы, позволяющие выявить уровень искомого антигена или антител при АФС и др.* *Выявление генетических аномалий методом ПЦР (мутации Лейден-резистентности фактора Vа к активированному протеину С, гена протромбина G 20210, гена метилентетрагидрофолатредуктазы и др.).*

Для улучшения качества исследования системы гемостаза важно придерживаться следующих принципов. При обследовании больных необходимо выделять два последовательных этапа диагностики: первичного скрининга с использованием скрининговых тестов и – на втором этапе – проб, позволяющих уточнить диагноз. Для подтверждения диагноза в случае выявления серьезных нарушений в системе гемостаза (снижение уровня фактора Виллебранда, факторов свертывания, тромбоцитопении, дефицита или аномалии действия физиологических антикоагулянтов, наличия волчаночного антикоагулянта, выраженной тромбинемии и др.) необходимо повторное обследование. Интерпретация показателей коагулограммы должна проводиться с учетом возможного влияния принимаемых лекарственных средств и других воздействий. Например, учитывать особенности питания при контроле за лечением антикоагулянтами непрямого действия (АНД). Целесообразно отказаться от дублирующих или малоценных, а также устаревших и неточных методов исследования (приложение 1). Использование производительных и высокоточных (по сравнению с мануальными определениями) коагулометров и агрегометров, а также стандартизированных расходных материалов, является предпочтительным. В данном пособии приведены референсные значения, которые приняты в нашей лаборатории. Референсные величины могут варьировать при смене лота или производителя набора, актуальные референсные значения указываются в бланке результата анализа.

**3. Тесты для оценки сосудисто-тромбоцитарного компонента гемостаза**

При тромбоцитопениях, тяжелых тромбоцитопатиях и при дефиците фактора Виллебранда (ФВ) значительно удлиняется время кровотечения. Кровоточивость связана с недостаточностью адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов – нарушением образования в поврежденных сосудах тромбоцитарной пробки. Это может быть обусловлено либо значительным снижением количества тромбоцитов в крови, либо их дисфункцией, в основе которой чаще всего лежит отсутствие или блокада на мембране тромбоцитов рецепторов, взаимодействующих со стимуляторами (агонистами) агрегации этих клеток (ФВ, адреналином, АДФ, фибриногеном, арахидоновой кислотой и простагландинами), либо отсутствием в тромбоцитах или нарушением выхода из них компонентов гранул, содержащих эти стимуляторы агрегации. **Качественные дефекты тромбоцитов, лежащие в основе большого числа геморрагических диатезов, подразделяют на следующие группы:**  *Дезагрегационные тромбоцитопатии, обусловленные отсутствием или блокадой мембранных рецепторов этих клеток (тромбастения Гланцмана и др.); Болезни отсутствия плотных и ?-гранул; Нарушения высвобождения гранул; Нарушения образования циклических простагландинов и тромбоксана А2; Дефицит, аномалии и нарушения мультимерности ФВ; Нарушения обмена нуклеотидов и транспорта кальция.*

**3.1. Время кровотечения.** Время кровотечения - это время от момента нанесения стандартной раны кожи до момента прекращения вытекания крови. Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов и взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой. Время кровотечения не выявляет всех тромбоцитарных нарушений (такого метода вообще не существует), этот скрининговый тест позволяет заподозрить тромбоцитопатии различного генеза, болезнь Виллебранда и нарушения проагрегантных свойств сосудистой стенки. После выявления патологии нет необходимости повторять это исследование, нужно использовать более чувствительные и специфические методы. У этого метода есть серьезные недостатки:*Метод плохо стандартизируется. Результаты теста позволяют лишь предположить наличие тех или иных нарушений.**Низкая чувствительность. Отсутствие удлинения времени кровотечения не всегда позволяет исключить нарушения тромбоцитарного или сосудистого звеньев гемостаза.**Низкая специфичность не позволяет однозначно интерпретировать результаты метода.**Не соответствует современным санитарно-эпидемиологическим требованиям.*

**3.2. Количество тромбоцитов в крови**  Референсные значения: 170-350x109/л

***Снижение числа тромбоцитов (<170х109/л):***

*острый ДВС-синдром; острый лейкоз и миелодиспластические синдромы; гипо- и апластические анемии; нарушение образования в организме тромбоцитопоэтина; химиотерапия и лучевая терапия; тромботическая тромбоцитопеническая пурпура и гемолитико-уремический синдром; спленомегалия и гепатолиенальный синдром; гепарин-индуцированная тромбоцитопения; эклампсия и преэклампсия; экстракорпоральное кровообращение; гемодиализ у больных с хронической почечной недостаточностью, гемосорбция; интенсивная трансфузионная терапия; пароксизмальная ночная гемоглобинурия; иммунные формы патологии (СКВ и др. коллагенозы, АФС, иммунная тромбоцитопеническая пурпура); дефекты при получении крови для исследования - псевдотромбоцитопения в случае использования ЭДТА в качестве стабилизатора крови.*

***Повышение числа тромбоцитов (>350х109/л):***

*мегакариоцитарные и миелолейкозы, эритремия; вторичный, реактивный тромбоцитоз в случае спленэктомии (через 1-3 недели), внутриполостные кровоизлияния после оперативных вмешательств, спустя 7-10 дней от начала подострого токсико-инфекционного ДВС-синдрома, после перенесенного острого кровотечения, при злокачественных новообразованиях (предвестник опухоли легкого, поджелудочной железы) и других причинах хронического ДВС-синдома.*

**3.3. Индуцированная агрегация тромбоцитов.** При исследовании функций тромбоцитов индуктор агрегации добавляется к плазме, обогащенной тромбоцитами. Для исследования индуцированной агрегации тромбоцитов используют физиологические индукторы, такие как тромбин, адреналин, АДФ, коллаген. Кроме того, существуют специальные индукторы, такие как ристоцетин (ристомицин). Этот индуктор инициирует связывание фактора Виллебранда с мембранным рецептором Ib-IX тромбоцитов и таким образом вызывает их агрегацию. Для диагностики большинства наследственных и приобретенных тромбоцитопатий достаточно исследования функциональных параметров тромбоцитов с использованием четырех агонистов. Ими являются индукторы АДФ, адреналин, коллаген и ристомицин. Исследование агрегации на стекле менее чувствительно, чем с использованием агрегометра, однако быстро выполняется и используется при скрининге для отбора пациентов с грубыми нарушениями тромбоцитарного гемостаза (выраженной тромбоцитопенией или тромбоцитопатией) в группу риска для профилактики, например, интра- и послеоперационных кровотечений.

**Методы определения агрегации тромбоцитов:**

*с АДФ*

*с адреналином*

*с коллагеном*

*с арахидоновой кислотой*

*с тромбином*

*с ристомицином (ристоцетином)*

Большие преимущества имеет графическая регистрация процесса на агрегометре, однако выполнение исследований требует большого количества плазмы и затрат времени. Агрегометры подразделяются на оптические (турбодиметрические), регистрирующие агрегацию в богатой тромбоцитами плазме по изменению её оптической плотности, и кондуктометрические, определяющие агрегацию в цельной крови по изменению электропроводности. Результаты этих исследований позволяют диагностировать тромбоцитопатии, нозологическая принадлежность которых обусловлена характерным нарушением тех или иных функциональных свойств тромбоцитов или их сочетанием (см. таб. 1).

Таблица 1. Изменение агрегатограмм при нарушениях функции тромбоцитов.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Состояние | АДФ | Адреналин | Арахидоновая  кислота | Тромбин | Коллаген | Ристомицин |
| Референсные значения: | 8-12 с | 15-20 с |  |  | 15-20 с |  |
| Болезнь Виллебранда | Н | Н | Н | Н | Н | v |
| Синдром Бернара-Сулье | Н | Н | Н | H/v | Н | v |
| Тромбастения Гланцмана | v | v | v | v | v | +/- |
| Передозировка аспирина | v | v | v | +/- | v | +/- |
| Синдром серых тромбоцитов | v | v | H/v | +/- | v | +/- |

H – нормальная агрегатограмма, v - сниженная реакция на индуктор агрегации

ПОВЫШЕНИЕ АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ тромбоцитов характерно для претромботических состояний, идиопатического тромбоцитоза, тромбозов, инфарктов органов, атеросклероза, васкулитах, при беременности.

СНИЖЕНИЕ АГРЕГАЦИИ наблюдается при первичных и симптоматических тромбоцитопатиях, при лечении антиагрегантами. Антиагреганты отличаются по механизму действия. Одни антиагреганты (аспирин, нестероидные противовоспалительные средства) блокируют образование в тромбоцитах простагландиновых стимуляторов агрегации, в частности тромбоксана А2, другие ингибируют АДФ-рецепторы (клопидогрель), третьи нарушают транспорт ионов кальция в тромбоциты либо стимулируют образование циклического АМФ. Классификация современных антиагрегантов приведена в табл 2.

Таблица 2. Ингибиторы сосудисто-тромбоцитарного гемостаза [3]

|  |  |
| --- | --- |
| **Группы препаратов в соответствии с механизмом действия** | **Лекарственные препараты** |
| Ингибиторы циклооксигеназы (СОХ-1). Основной механизм: блокада образования циклических простагландинов | Аспирин (кардиомагнил, тромбоас), другие нестероидные противовоспалительные средства (индометацин и др.) |
| Ингибиторы тромбоксансинтетазы | Сулотробан и др. |
| Ингибиторы тромбоксансинтетазы и тромбоксановых рецепторов | Пикотамид, ридогрель и др. |
| Блокаторы тромбиновых рецепторов тромбоцитов | Ванипрост, дальтробан. |
| Блокаторы АДФ-рецепторов тромбоцитов | Тиенопиридины: тиклопидин (тиклид), клопидогрель (плавикс). |
| Антагонисты рецепторов IIb/IIIa тромбоцитов | Антительные: абсиксимаб (Reo Pro).  Пептидные: интегрилин и др.  Непептидные: тирофибан, ламофибан.  Оральные антагонисты рецепторов: имлофибан, фрадафибан. |
| Стабильные производные простациклина | Инъекционные формы: илопрост, вазопростан.  Оральные формы: берапрост. |
| Препараты комплексного действия и вазопротекторы | Пентоксифиллин (трентал), сульфин-пиразоны, дипиридамол (курантил), эндотелон, миртравен. |

**4.Скрининговые тесты для оценки плазменного звена гемостаза**

Лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза является одной из самых дорогостоящих в лабораторной практике. Выполнение всех возможных тестов для уточнения характера нарушений для всех пациентов – практически нереальная задача. Поэтому чрезвычайно важно соблюдать этапность проведения тестов, исходить из клинических данных и анамнеза пациента. На первом этапе для уточнения направленности нарушений необходимо провести тесты, отражающие состояние целых звеньев системы гемостаза. Поскольку в разных лабораториях при анализе гемостаза преследуются разные цели, перечень тестов, входящих в гемостатический скрининг для данной лаборатории, может отличаться от такового в других лабораториях. Однако существует набор рекомендуемых тестов, традиционно называемых скрининговыми для диагностики состояния системы гемостаза.

**Скрининговые тесты:** *АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время). Протромбиновое время (по Квику). Тромбиновое время и/или фибриноген.*

Скрининговые тесты на состояние внутреннего и внешнего каскада активации протромбиназы позволяют выявлять нарушения со стороны факторов-субстратов, кофакторов, ингибиторов каскада свертывания, а также действие некоторых лекарственных препаратов или аутоантител. Основным тестом на состояние внутреннего каскада свертывания плазмы является АЧТВ, на состояние внешнего каскада - протромбиновое время.

**4.1. Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ).** АЧТВ используется как скрининговый тест для оценки внутреннего каскада свертывания плазмы, скрининговой диагностики волчаночного антикоагулянта и слежения за антикоагулянтным действием гепаринов. АЧТВ – более значимый тест для первичного выявления патологии, чем протромбиновое время, так как выявляет относительно часто встречающуюся гемофилию А и В (дефицит факторов VIII и IX соответственно) и наличие волчаночного антикоагулянта.

Референсные значения АЧТВ: 28,6-33,6 с

***Укорочение АЧТВ:*** *Активация внутреннего механизма свертывания при тромбозах, тромбоэмболиях. Это может быть связано с резистентностью фактора V к активированному протеину С, повышенным уровнем фактора VIII или активированных факторов свертывания; При ДВС-синдроме (гиперкаогуляционная фаза); Возможно при нормально протекающей беременности.*

***Удлинение АЧТВ:*** *Дефицит факторов внутреннего пути свертывания (VIII - гемофилия А, IX – гемофилия В, XI, XII) при нормальных результатах протромбинового теста; Дефицит факторов II, V, X в случае сопутствующей гипокоагуляции в протромбиновом тесте; Дефицит фактора Виллебранда; Гепаринотерапия обычным, нефракционированным гепарином (НГ) (тест выявляет сравнительно низкие концентрации антикоагулянта, приблизительно от 0,05 МЕ/мл крови); Лечение антикоагулянтами непрямого действия (АНД);**ДВС-синдром (потребление факторов свертывания в фазу гипокоагуляции);**На фоне переливаний реополиглюкина, препаратов гидроксиэтилкрахмала (инфукол, валекам, НЕS);**Наличие волчаночного антикоагулянта;**Мутация фактора IX;**Дефекты при получении крови для исследования (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера).*

**4.2. Протромбиновое время.** Протромбиновое время (ПТВ) – широко используемый скрининговый тест для оценки внешнего каскада свертывания плазмы. ПВ обычно используется для определения активности ф. VII, контроля за лечением непрямыми антикоагулянтами, при скрининге системы гемостаза, а также для количественного определения фибриногена в автоматических коагулометрах. Результаты определения протромбинового времени могут быть представлены в различной форме (табл.3).

**Референсные значения ПТВ: 9,2-12,2 с**

***Укорочение ПТВ:*** *Активация внешнего механизма свертывания при различных видах внутрисосудистого свертывания крови;**Последние недели беременности, прием пероральных контрацептивов;**Лечение концентратами факторов протромбинового комплекса («Фейба», «НовоСевен» и др.).*

***Удлинение ПТВ:*** *Дефицит или аномалия факторов протромбинового комплекса (VII, X, V,II) в случаях приема антикоагулянтов непрямого действия (варфарин, синкумар, пелентан и др.). Болезни печени и желчевыводящей системы.**Лечение нефракционированным гепарином (тест реагирует лишь на сравнительно высокие концентрации антикоагулянта, примерно от 0,5 МЕ/мл крови и выше).**ДВС-синдром (потребление факторов свертывания в переходную фазу и фазу гипокоагуляции).**На фоне переливаний реополиглюкина, препаратов гидроксиэтилкрахмала (инфукол, валекам, НЕS). Наличие в крови волчаночного антикоагулянта (возможно).**Дефекты при получении крови для исследования (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера).*

Таблица 3. Формы выражения протромбинового времени

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Показатель** | **Расчёт** | **Примечание** | **Корреляция** |
| Протромбиновое время (ПТВ), сек | Время свёртывания плазмы после добавления тромбопластин-кальциевой смеси. | Не позволяет проводить сравнительную оценку результатов в связи с применением тромбопластинов различного МИЧ (cм. МНО) |  |
| Протромбиновый индекс (ПТИ), % | ПТВ нормальной контрольной плазмы (или среднее ПТВ нормального диапазона)/ПТВ плазмы пациента)х100 | Результаты теста зависят от чувствительности используемого тромбопластина. | Отрицательная – с протромбиновым отношением и МНО |
| Протромбиновое отношение (ПО), % | ПТВ плазмы пациента/ПТВ нормальной контрольной плазмы (или среднее ПТВ нормального диапазона)х100 | Результаты теста зависят от чувствительности используемого тромбопластина. | Положительная – с МНО, отрицательная – с протромбиновым индексом |
| Протромбин по Квику (%) | Аналогично ПТИ, но расчёт производится в зависимости от концентрации факторов протромбинового комплекса | Результаты теста зависят от чувствительности используемого тромбопластина. | Отрицательная – с ПО и МНО, совпадает с ПТИ в области нормальных значений |
| Протромбиновое время, выраженное через МНО - международное нормализованное отношение, латинская аббревиатура INR (International Normalized Ratio) (см. дальше по тексту). | (ПТВ плазмы пациента/ПТВ нормальной контрольной плазмы (или среднее ПТВ нормального  диапазона)isi | ISI (МИЧ) - (international sensitivity index - международный индекс чувствительности) – показатель чувствительности тромбопластина относительно международного стандарта (указывается в паспорте набора), что позволяет сравнивать между собой результаты, полученные с применением тромбопластина различной чувствительности. | |

Первые три выражения, хотя и представляются в виде цифр, но из-за отсутствия калибровки являются, по сути, качественными показателями с неопределенным масштабом. Кроме того, существенным недостатком определения протромбинового времени в секундах является низкая воспроизводимость из-за нестандартизированного тромбопластина. Поэтому нельзя сопоставлять результаты у одного пациента, полученные в разных лабораториях, на разных приборах или с тест - наборами разных серий. Выражение ПТИ в процентах не имеет смысловой нагрузки и путает врачей, так как между количеством факторов и измерением ПТВ в секундах нет прямой пропорциональной зависимости.

Протромбин по Квику и протромбиновое время, выраженное через МНО для ПТВ являются взаимодополняющими.

**Протромбин по Квику (%)** как и протромбиновый индекс, позволяет определять активность протромбинового комплекса плазмы пациента в сравнении с измеренным протромбиновым временем контрольной плазмы. Но при этом расчет проводится по кривой зависимости протромбинового времени от % содержания факторов протромбинового комплекса, построенной с использованием разных разведений контрольной плазмы. Такой способ представления результатов является более точным, особенно в области низких значений. Протромбиновый индекс и протромбин по Квику могут совпадать друг с другом в области нормальных значений. В зоне низких значений, рекомендованных для ведения больных, принимающих непрямые антикоагулянты, показатели этих тестов расходятся. Протромбиновый индекс 50-60% может соответствовать 30-40% протромбина по Квику. Расчет протромбина по Квику в настоящее время является общепринятым способом.

**МНО** (Международное нормализованное отношение), латинская аббревиатура **INR** (International Normalized Ratio) - дополнительный способ представления результатов протромбинового теста, рекомендованный для контроля терапии непрямыми антикоагулянтами комитетом экспертов ВОЗ, Международным комитетом по изучению тромбозов и гемостаза и Международным комитетом по стандартизации в гематологии. МНО рассчитывается по формуле:

где ISI (International Sensitivity Index of thromboplastin), он же МИЧ (международный индекс чувствительности) - показатель чувствительности тромбопластина, стандартизующий его относительно международного стандарта. МНО - математическая коррекция, при помощи которой производится стандартизация протромбинового времени, что позволяет сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях. МНО и протромбин по Квику коррелируют отрицательно - снижение протромбина по Квику соответствует повышению МНО. Для контроля уровня антикоагулянтов ВОЗ разработаны следующие рекомендации:

|  |  |
| --- | --- |
| **Клиническое состояние** | **Рекомендуемое МНО** |
| Профилактика первичного и повторного тромбоза глубоких вен и легочной тромбоэмболии | 2,5 (2,0-3,0) |
| Предоперационная подготовка: хирургические вмешательства в области бедра | 2,0 (2,0-3,0) |
| Все остальные хирургические вмешательства | 2,5 (1,5-2,5) |
| Лечение тромбоза глубоких вен, легочной тромбоэмболии и профилактика повторного венозного тромбоза. | 3,0 (2,0-4,0) |
| Профилактика артериальной тромбоэмболии, включая пациентов с искусственными клапанами | 3,5 (3,0-4,5) |

Рекомендуемые уровни гипокоагуляции при приеме варфарина: Высокий МНО от 2,5 до 3,0; Средний МНО от 2,0 до 3,0; Низкий МНО от 1,6 до 2,0.

**4.3. Тромбиновое время.** Тромбиновое время (ТВ) – определение тромбинового времени является третьим по значимости базисным скрининговым тестом. Тест характеризует конечный этап процесса свертывания – превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина, на него влияет концентрация фибриногена в плазме и наличие продуктов деградации фибрина.

**Референсные значения ТВ: 18-24 с**

**Укорочение ТВ:** *гиперфибриногенемия (фибриноген 6,0 г/л и выше); начальная (гиперкоагуляционная) фаза острого и подострого ДВС-синдрома.*

**Удлинение ТВ:** *Гепаринотерапия обычным гепарином (тест реагирует на сравнительно низкие концентрации антикоагулянта, приблизительно от 0,05 МЕ/мл крови). Гипофибриногенемия (фибриноген ниже 1,0 г/л) в случаях развития острого ДВС-синдрома и при тромболитической терапии (стрептокиназа, актилизе и др.). В последнем случае конечный этап свертывания крови ингибируется продуктами деградации фибриногена и фибрина (фрагментами D и D-димеров). Влияние других ингибиторов полимеризации фибрин-мономера (парапротеины, миеломные белки и др.). Дефекты при получении крови для исследования (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера)*

**4.4. Концентрация фибриногена в плазме.** Количественное определение фибриногена по методу Клаусса является базисным тестом исследования гемостаза. Образование фибрина и его стабилизация представляют собой финальный этап формирования тромба, при котором растворимый фибриноген превращается в нерастворимый фибрин под действием тромбина и фактора XIII. **Фибриноген** – острофазный белок. Печень синтезирует 2–5 г фибриногена в день, время полувыведения фибриногена из крови составляет около 4 дней. Концентрация его может превышать 10 г/л при тяжелых бактериальных инфекциях, при травме и тромбозе. Повышение уровня фибриногена в острой фазе воспаления, как правило, имеет транзиторный характер. У курящих людей уровень фибриногена в плазме крови несколько выше, чем у некурящих. К значительному росту фибриногена приводят заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром), коллагенозы (ревматоидный артрит, узелковый периартериит), пароксизмальная ночная гемоглобинурия, новообразования (рак легкого). При атеросклерозе наблюдается устойчивое увеличение уровня фибриногена, трудно корригируемое лекарственными препаратами. В результате риск сердечно-сосудистых заболеваний повышается с возрастанием исходного содержания фибриногена в интервале 3,0-4,5 г/л. Обнаружено, что повышение уровня фибриногена в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями предшествует развитию инфаркта миокарда и инсульта. Корреляция между уровнем фибриногена и развитием этих осложнений особенно четко прослеживается у пациентов молодого и среднего возраста. Определение уровня фибриногена – наиболее чувствительный тест для выявления бессимптомных стадий заболевания периферических артериальных сосудов.

**Референсные значения фибриногена: 2,75- 3,65 г/л**

***Снижение концентрации ФИБРИНОГЕНА:*** *Острый ДВС-синдром; Дисфибриногенемии.*

***Повышение концентрации ФИБРИНОГЕНА:***  *Инфекционные, воспалительные и аутоиммунные процессы; Подострый и хронический ДВС-синдром; Нормально протекающая беременность.*

**5. Методы определения физиологических антикоагулянтов**

**5.1. Протеин С.** Для определения протеина С разработано несколько методов: иммунохимический метод, метод с хромогенным субстратом и коагуляционный. Протеин С только в комплексе с протеином S инактивирует Vа и VIII, поэтому желательно параллельно исследовать и протеин С и протеин S.Определение протеина С с использованием хромогенного субстрата. Этот метод прост, специфичен, легко автоматизируется. Так как протеин С – витамин-К-зависимый гликопротеин, то при лечении непрямыми антикоагулянтами (антагонистами витамина К) появляются формы протеина С, которые не обладают антикоагулянтной активностью, но определяются методами с хромогенными субстратами (так называемые PIVKA-формы). Поэтому у больных, принимающих непрямые антикоагулянты, могут быть завышенными результаты определения протеина С хромогенными методами.Определение протеина С коагуляционным методом. Метод легко автоматизируется. Коагуляционный метод оценивает активность протеина С, фиксирующегося карбоксилированной частью на фосфолипидах. РIVKA -формы не функционируют в этой системе, и тест не дает ложных результатов у пациентов, принимающих непрямые антикоагулянты или имеющих дефицит витамина К.Исказить результаты теста могут такие факторы, как наличие мутации фактора V Лейден, присутствие в плазме волчаночного антикоагулянта, терапия гепарином. Для получения достоверных результатов очень важно качество используемой протеин-С-дефицитной плазмы. У некоторых пациентов, принимающих непрямые антикоагулянты, выявляются чрезвычайно низкие цифры содержания протеина С. Эти результаты могут быть связаны не только с истинным дефицитом протеина С, но и с развитием резистентности фактора Vа к активированному протеину С (АПС).Определение протеина С иммунохимическим методом. Иммунохимическое определение протеина С применяется реже, чем функциональные методы. Это объясняется тем, что данный способ выявляет только классическое снижение концентрации протеина С и не определяет его функциональную неполноценность.В некоторых случаях при лечении больных с дефицитом протеина С непрямыми антикоагулянтами у них могут возникнуть некрозы кожи в результате рикошетных тромбозов. Если антикоагулянты назначаются в высокой дозе без поддержки гепарином, то возникает состояние, при котором протеин С очень быстро снижается (в норме время его полужизни в системе циркуляции 4-6 ч). В то же время витамин-К-зависимые факторы свертывания, в том числе протромбин, остаются еще в пределах нормы (у них период полужизни 16-20 ч). Эта ситуация может усугубляться тем, что непрямые антикоагулянты начинают назначать в случае развития тромбозов или угрожающей ситуации по тромбообразованию, когда система прокоагулянтов активирована. Быстрое снижение протеина С провоцирует в этом случае массивное тромбообразование, проявляющееся вплоть до некрозов кожи. Активность протеина С следует определять до начала лечения антикоагулянтами непрямого действия и контролировать во время лечения.

**Референсные значения протеина С: 94-124%**

***Повышение протеина С:*** *отмечается во время беременности.*

***Снижение протеина С:*** *Врожденный (наследственный) дефицит или аномалии протеина С;**Геморрагическая болезнь новорожденных;**Заболевания печени с нарушением ее функции;**ДВС-синдром;**Нефротический синдром;**Синдром острой дыхательной недостаточности;**Менингококковый сепсис;**Гемодиализ;**Лечении L-аспарагиназой;**Лечении пероральными (непрямыми) антикоагулянтами (дефицит витамина К);**Послеродовый и послеоперационный период.*

**5.2. Протеин S.** Протеин S – витамин-К-зависимый белок, который является ко-фактором активированного протеина С. Это функция положена в основу всех известных коммерческих тест-систем определения протеина S. Описаны случаи как функционального, так и количественного дефицита протеина S. При проведении тестов важно помнить, что протеин S присутствует в плазме частично в свободном состоянии, частично в комплексе с С4-связывающим протеином (С4-СП), но активна только свободная форма протеина S.Определение протеина S коагуляционным методом. Для определения протеина S необходимо использовать тест-систему, содержащую очищенный активный протеин С, его субстрат – фактор Vа и дефицитную по протеину S плазму. Специфичность метода относительная, так как фактор V Лейден, высокий уровень ф.VIII и волчаночный антикоагулянт могут существенно влиять на результаты теста, а именно: с этими факторами часто проводят дифференциальную диагностику, определяя протеин S. Так как коагуляционный метод подвержен действию многих интерферирующих факторов и не стандартизирован, то предпочитают использовать иммунохимический метод.Определение протеина S иммунохимическим методом. Иммунохимический метод достаточно широко распространен. Наборы последних разработок позволяют определять «свободный протеин S» прямо без предварительной обработки. Недостатком иммунохимического метода является то, что он выявляет протеолитически неактивные формы протеина S, которые иногда появляются в плазме.

**Референсные значения протеина S: 81-111%**

***Уменьшение содержания (активности) протеина S:*** *Врожденный (наследственный) дефицит;**Врожденное (наследственное) уменьшение свободной фракции протеина S;**Заболевания печени с нарушением ее функции;**ДВС-синдром;**Нефротический синдром;**Системная красная волчанка;**Лечение L-аспарагиназой;**Лечение пероральными (непрямыми) антикоагулянтами;**Прием эстрогенов (пероральных контрацептивов);**Беременность, послеродовый период;**Наличие аутоантител к протеину S.*

**5.3. Антитромбин III**

Для определения активности антитромбина III (АТ) чаще всего используют метод с хромогенным субстратом. Антитромбин расщепляет субстрат, в результате чего образуется окрашенный продукт, количество которого зависит от исходной активности антитромбина III. Существуют также иммунохимические (турбидиметрия, нефелометрия) и коагуляционные методы. Тест может применяться для мониторинга лечения гепарином. Длительная гепаринотерапия может приводить к снижению активности АТ в плазме. Лечение высокими дозами гепарина, особенно нефракционированным гепарином, приводит к транзиторному снижению АТ по механизму потребления, особенно у больных с тяжелой патологией, при критических состояниях, при ДВС-синдроме, сепсисе, злокачественных опухолях. У новорожденных уровень АТ составляет около 50 % и достигает уровня взрослых к 6 мес. Небольшое снижение АТ наблюдается в середине менструального цикла, в пред- и послеродовом периоде, при токсикозах второй половины беременности, в послеоперационном периоде. Эти сдвиги более выражены у пациентов с группой крови А (II), а также у пожилых.

Референсные значения АТ: 86 - 116%

***Снижение содержания (активности) АТ:*** *Врожденный (наследственный) дефицит или аномалии АТ (снижение активности или чувствительности к гепарину); Заболевания печени (опухоли, цирроз, алкогольный гепатит); Нефротический синдром (протеинурия свыше 5 г/л); Карцинома легких; ДВС-синдром;**Множественные травмы, тяжелые роды, поздние гестозы;**Прием эстрогенов (пероральных контрацептивов), кортикостероидов;**Лечение L-аспарагиназой.*

***Увеличение содержания (активности) АТ:*** *Во время менструации;**Острый вирусный гепатит, холестаз;**Прием анаболических стероидов;**Лечение пероральными (непрямыми) антикоагулянтами.*

**6.Тесты для исследования фибринолитической системы.**

Наиболее распространенные в клинической практике методы оценки состояния фибринолитической системы основаны на:

1) *исследовании времени и степени лизиса (растворения) сгустков крови или эуглобулиновой фракции плазмы (общеоценочные пробы);*

2) *определении концентрации плазминогена, его активаторов и ингибиторов (ТАП; ПАИ-1; ?2-антиплазмин).*

**6.1. Время лизиса эуглобулиновых сгустков / ХIIа зависимый фибринолиз.**

Определение фибринолитической активности эуглобулиновой фракции плазмы крови является важнейшим базисным методом исследования системы фибринолиза, позволяющим оценить состояние внутреннего и внешнего механизмов образования плазминогена. Метод заключается в определении времени спонтанного лизиса сгустка, образующегося из эуглобулиновой фракции бестромбоцитной плазмы при добавлении к ней раствора хлорида кальция. Существуют и другие модификации метода эуглобулинового лизиса сгустка. Например, растворение сгустка может быть значительно ускорено предварительным введением в плазму каолина — мощного контактного активатора внутреннего механизма фибринолиза, связанного с активированием комплекса факторов: фактор XII-калликреин-кининоген (“ХIIа зависимый фибринолиз”).Метод оценки эуглобулинового лизиса требует исходного содержания в плазме фибриногена, так как при снижении 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 возможно получение ошибочных результатов. В связи с ориентировочным характером и недостаточной специфичностью в последнее время вместо теста спонтанного лизиса эуглобулинового сгустка начали использовать определение отдельных факторов фибринолиза, в первую очередь плазминогена.

**Референсные значения: XIIа зависимый фибринолиз 4–10 мин**

***Укорочение времени ЛИЗИСА (активация фибринолиза):*** *Уменьшение концентрации фибриногена – гипо- и дисфибриногенемия.*

***Увеличение времени ЛИЗИСА (угнетение фибринолиза):*** *Гиперфибриногенемия.*

**6.2. Плазминоген и тканевой активатор плазминогена (ТАП)**

Определение количества плазминогена основано на гидролизе хромогенного субстрата. Определение плазминогена используют для диагностики ДВС-синдрома и тромбофилий; выявления нарушений фибринолиза; контроля лечения фибринолитическими препаратами при тромбозах, тромбоэмболиях, инфарктах. Дефицит плазминогена крайне редкое событие, чаще встречается дефицит тканевого активатора плазминогена (ТАП). Дефицит ТАП является одним из потенциальных факторов риска тромбоза, хотя клинически это подтверждается не всегда. Тканевой активатор плазминогена (ТАП) освобождается в кровоток из эндотелиальных клеток сосудистой стенки при стрессовых воздействиях, в частности при манжеточной пробе (дозированном пережатии вен). Сначала определяют базовый уровень ТАП, потом на 10-15 минут на предплечье накладывают жгут или раздувают манжетку, вызывающую венозный стаз, затем берут вторую порцию крови, в которой повторно определяют ТАП. Сравнивают результаты обеих проб. ТАП обладает высокой амидазной активностью, позволяющей эффективно использовать для его определения метод хромогенных субстратов. Определение ТАП проводится у больных с тромбофилией как часть панели тестов на выявление причины тромбофилии, особенно при нагрузочных манжеточных пробах. Повышение ТАП после инфаркта миокарда рассматривается как неблагоприятный фактор. Нарушение освобождения ТАП после венозного стаза описано у больных с тромбозами и патологией почек.

**Референсные значения плазминогена: 71-101%**

***Увеличение содержания ПЛАЗМИНОГЕНА И ЕГО АКТИВАТОРОВ:*** *Панкреатит.**Панкреонекроз.**Метастазирующий рак предстательной железы, яичников.**Метастазы меланомы.**Операции на легких, предстательной, поджелудочной железе.**Гиперкатехоламинемия (стресс, тиреотоксикоз, гипертонический криз, введение адреналина).**Патология беременности.**Терминальные и другие состояния, сопровождающиеся развитием ДВС-синдрома.**Цирроз печени.**Метастатическое поражение печени (снижение антиплазминовой и антиактиваторной функции).*

***Дефицит ПЛАЗМИНОГЕНА, чаще дефицит ТАП:*** *Рецидивирующие венозные тромбозы; Системные васкулиты; Сепсис; Нефротический синдром.*

**7. Тесты активации свертывания крови.**

**7.1. D-димеры.** D-димеры – специфические продукты деградации фибрина, входящие в состав тромба. Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием плазмина и некоторых неспецифических фибринолитиков. Концентрация D-димеров в сыворотке пропорциональна активности фибринолиза и количеству лизируемого фибрина. Этот тест позволяет судить об интенсивности процессов образования и разрушения фибриновых сгустков. Определение D-димеров проводится иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител, иммунодиффузии, методом турбидиметрии, латекс-агглютинации.Во всех методах исследования используются моноклональные антитела к эпитопам на D-димере, которые образуются при расщеплении нерастворимого фибрина плазмином. Этих эпитопов нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономерных комплексах (РФМК), поэтому D-димеры – показатель того, что в процессе фибринолиза расщепляется именно фибрин, а не фибриноген или фибрин-мономеры. Поскольку эти антитела не взаимодействуют с фибриногеном, исследования могут проводиться как в плазме, так и сыворотке. На определение D-димеров практически не оказывает влияние техника взятия крови, примесь тромбоцитов, не требуется использования ингибиторов для подавления других факторов.

**Референсные значения D-димера: 33,5-727,5 нг/мл**

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

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

**7.2.Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК).** При ряде форм патологии, характеризующихся активацией свертывания крови (ДВС, тромбозы, тромбофилии), происходит расширение пула фибриногена, в результате чего увеличевается количество растворимых фибрин-мономерных комплеков (РФМК). В последнее время стал активно использоваться ортофенантролиновый тест. С помощью ортофенантролинового теста возможно не только качественное, но и количественное определение РФМК. Гепаринотерапия с содержанием гепарина в плазме крови до концентрации 10 ед/мл не влияет на результаты теста.

**Референсные значения: (РФМК по орто-фенантролиновому тесту) - до 4,0 мг%**

***ПОВЫШЕНИЕ:*** *Активация внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром, тромбоз глубоких вен, эмболии легочной артерии);**Возможно при лечении антикоагулянтами;**Физический и психологический стрессы;**Нормально протекающая беременность;**В период новорожденности .*

**8.Основные схемы обследования нарушений гемостаза.**

При ведении пациентов с подозрением на нарушения системы гемостаза, как ни в каком другом разделе медицины, важны результаты лабораторных исследований. Многие геморрагические заболевания имеют сходную клиническую картину, однако требуют разных терапевтических подходов. Только лабораторная диагностика позволяет установить точный диагноз и назначить современную адекватную терапию. Тромботические проявления, как правило, возникают при сочетании разных протромботических факторов, как врожденных, так и приобретенных. Лабораторная диагностика позволяет выявить эти факторы и провести не только лечение развившегося тромбоза, но и фоновых изменений и предупредить рецидивы тромбозов, контролируя терапию.

**8.1.Определение причин кровоточивости.** При наличии кровотечений провести диагностический поиск для большинства видов геморрагических диатезов может помочь приведенная ниже схема (табл. 4).Ориентировочная схема обследования при определении причин кровоточивости [3]

|  |  |
| --- | --- |
| **Основной метод** | **Патология** |
| Время кровотечения по Айви | Более 10-12 мин |
| Количество тромбоцитов в крови | Менее 80-100х109/л |
| Оценка агрегационной функции тромбоцитов с использованием таких индукторов, как АДФ, адреналин и коллаген | Гипоагрегация |
| АЧТВ | Гипокоагуляция |
| ПТ – протромбиновый тест | Гипокоагуляция |
| Концентрация фибриногена | Менее 1,0 г/л |
| Дополнительные методы,  в случае наличия увеличения времени кровотечения и гипокоагуляции по АЧТВ | |
| Фактор Виллебранда | Менее 55% активности |
| Факторы VIII и IX | Менее 40% активности |

Вероятнее всего кровоточивость проявляется при сочетании или комбинации отдельных нарушений гемостаза, которые, усиливая друг друга, способствуют развитию геморрагического синдрома. Например, сама по себе гипофибриногенемия крайне редко вызывает кровотечение, но в сочетании с тромбоцитопенией/тромбоцитопатией либо дефицитом другого (других) факторов свертывания провоцирует развитие геморрагического синдрома. Такая ситуация может возникнуть при лечении тромболитиками. То же самое касается и оценки значимости тромбоцитопений различной степени выраженности. Для обеспечения тромбоцитарного гемостаза, как известно, достаточно содержания в крови 10-20?109/л этих клеток при условии, что они функционально активны и нет острой травмы (операции, родов и др.). Как правило, геморрагический синдром возникает при сочетании количественного и качественного дефектов кровяных пластинок. Это характерно, в частности, для ДВС-синдрома, когда при уровне кровяных пластинок ниже 100?109/л высока вероятность развития спонтанных кровотечений. По-видимому, в этом кроется и возможная причина разной выраженности и частоты возникновения гематом у больных гемофилией при дефиците факторов VIII или IX, в случае наличия или отсутствия сопутствующего снижения функции тромбоцитов, дисфибриногенемии и других факторов (например, при сочетании с мезенхимальной дисплазией), способствующих кровоточивости (табл 5).

Таблица 5. Классификация основных типов кровоточивости [3]

|  |  |
| --- | --- |
| **Тип кровоточивости** | **Основные виды патологии** |
| Микроциркуляторный (петехиально-пятнистый, синячковый) | Тромбоцитопении, тромбоцитопатии, болезнь Виллебранда |
| Гематомный | Гемофилии А и В |
| Смешанный (микроциркуляторно-гематомный) | ДВС-синдром (в стадии клинической манифестации), тяжелая степень болезни Виллебранда, передозировка прямых или непрямях антикоагулянтов, антиагрегантов, избыточная тромболитическая терапия |
| Васкулитно-пурпурный | Микротромбоваскулиты |
| Ангиоматозный | Телеангиэктазия, микроангиоматоз |

**8.2. Диагностика болезни Виллебранда.** Болезнь Виллебранда (БВ) относится к наиболее распространенным видам врожденных геморрагических диатезов (около 1% в популяции), передается аутосомно-доминантным путем, характеризуется количественной или качественной патологией фактора Виллебранда (ФВ) и клинически проявляется кровоизлияниями в кожу и слизистые оболочки. ФВ является белковым носителем для коагуляционного фактора VIII, защищает его от протеолиза. Для больных характерны носовые кровотечения, экхимозы, меноррагии, гематурия, чрезмерные кровотечения (в анамнезе) после незначительной травмы или хирургического вмешательства (при тонзилэктомии, удалении зуба). Заболевание выявляется в одной семье у лиц обоего пола, причем кровоточивость чаще обнаруживается у женщин. Перечисленные факторы дополняют диагностику и позволяют различить БВ и легкую форму гемофилии А, при которой эти симптомы отсутствуют.Подозрение на БВ может быть вызвано приведенной выше клинической картиной и удлинением показателей двух скрининговых («глобальных») тестов – время кровотечения и АПТВ. В последнем случае гипокоагуляция может быть обусловлена более или менее выраженным снижением активности фактора VIII в сочетании со снижением ФВ. Снижение уровня ФВ может быть одним из проявлений мезенхимальной геморрагической дисплазии.

**Классификация и патогенез болезни Виллебранда.**

В соответствии с общепринятой классификацией (Sadler, 1994) БВ подразделяется на 3 типа, тип 2- на 4 подтипа: **1-й тип** – наследственное заболевание с частичным дефицитом ФВ в крови и нормальным распределением мультимеров ФВ; **2-й тип** – наследственная патология с качественным изменением ФВ. Второй тип разделяют на 4 подтипа: *подтип 2А* - характеризуется снижением мультимеров ФВ большой и средней молекулярной массы; *подтип 2В* – большие мультимеры ФВ снижены, увеличена аффинность к тромбоцитарному гликопротеину 1b и снижена аффинность к другим рецепторным гликопротеинам; *подтип 2М* – характеризуется сниженной ристомицин-кофакторной активностью при нормальном количественном и качественном составе мультимеров ФВ; *подтип 2N* – качественные варианты ФВ со значительным снижением аффинности к ф. VIII **3-й тип** – практическое отсутствие ФВ в крови.

При градации степени тяжести БВ исходят из обычной клинической характеристики – частоты и степени выраженности кровотечений.

Таблица 6. Клинические особенности и диагностические признаки болезни Виллебранда [2]

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Подтипы** | **Частота встречаемости** | **Клинические особенности** | **Диагностика** |
| тип 1 | 1-30:1000; наиболее распространенный вариант БВ (>70% всех случаев). | Легкие и умеренные признаки кровоточивости; аутосомно-доминантный тип наследования с неполной пенетрантностью (примерно 60%). | Антиген ФВ, активность ФВ и ф. VIII снижена пропорционально (20-50%). Все фракции мультимеров представлены пропорционально. |
| подтип 2А | Приблизительно 10-15% всех клинически значимых случаев БВ. | Легкие и умеренные признаки кровоточивости; чаще аутосомно-доминантное, но возможно и аутосомно-рецессивное наследование с более полной пенетрантностью, чем при 1 типе. | Вариабельное снижение антигена ФВ, активности ФВ и ф. VIII, отсутствие высоко и среднемолекулярных мультимеров ФВ. |
| подтип 2В | Довольно редкий вариант (<5% всех клинически значимых случаев БВ). | Легкие и умеренные признаки кровоточивости; чаще аутосомно-доминантное наследование с более полной пенетрантностью, чем при 1 типе. | Возможно снижение антигена ФВ и ф. VIII; уменьшение высокомолекулярных мультимеров, положительная агрегация с низкими концентрациями ристомицина, легкая и умеренная тромбоцитопения. |
| подтип 2М | Редкий тип (единичные описания). | Тяжесть геморрагических расстройств различна; аутосомно-доминантный тип наследования. | Вариабельное снижение антигена ФВ и ф. VIII. Активность ФВ снижена относительно антигена, несмотря на присутствие высокомолекулярных мультимеров ФВ. |
| подтип 2N | Встречается редко. | Разнообразные по тяжести геморрагические нарушения. Клинические нарушения сходны с нетяжелыми формами гемофилии А. Наследование аутосомное. | Активность антигена ФВ и ФВ различны, часто нармальные. Диспропорционально снижен ф. VIII. Как правило, нормальное распределение мультимеров, снижение или отсутствие фактора VIII связывающего активность ФВ. |
| тип 3 | 1-5:1 000 000 | Тяжелые геморрагические нарушения; аутосомно-рецессивное наследование. | Антиген ФВ, активность ФВ и ф. VIII значительно снижены или не определяются. |

Лабораторная диагностика БВ осложняется тем, что ФВ является белком острой фазы воспаления и его уровень возрастает во время стресса, физической нагрузки, беременности, при приеме гормональных контрацептивов, а также после хирургического вмешательства. Следовательно, такая диагностика наиболее информативна при отсутствии перечисленных воздействий и состояний. С другой стороны, помимо генетических форм могут наблюдаться симптоматические (вторичные) варианты БВ (синдром Виллебранда) в связи с нарушениями гормонального статуса у женщин, при стрессовых реакциях.

**Алгоритм диагностики болезни Виллебранда [2]**

***Основные методы диагностики*** *Время кровотечения.**Число тромбоцитов.**АПТВ.**Активность фактора VIII.*

***Подтверждающие тесты*** *Ристоцетин-кофакторная активность ФВ с использованием агрегометра**Антиген фактора Виллебранда (методом ИФА)**Ристомицин-индуцированная агрегация тромбоцитов для диагностики подтипа 2В, при котором она повышена либо в норме*

***Специальные тесты*** *Коллаген-связывающая активность ФВ**Исследование мультимерного состава ФВ**Определение тромбоцитарного ФВ**Молекулярно-генетическая диагностика мутаций гена ФВ методом ПЦР**Определение с использованием хромогенного субстрата*

**8.3.Распознавание врожденных и приобретенных тромбофилий.** Проблема патологического тромбообразования – одна из важнейших терапевтических проблем в развитых странах. Ишемическая болезнь сердца, тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА), тромбозы глубоких вен – патологические состояния, приводящие к тяжелой инвалидности и гибели человека.При лечении таких пациентов лабораторный контроль состояния гемостаза – важнейший фактор успеха.Как правило, тромбофилия – комбинированное состояние, возникающее вследствие действия нескольких патогенетических факторов. ***Основные патогенетические факторы тромбофилии:*** *Повреждение эндотелиальных клеток с обнажением тромбогенных субэндотелиальных структур.**Активация тромбоцитов циркулирующими агонистами либо вследствие взаимодействия тромбоцитов с субэндотелиальными структурами или фактором Виллебранда.* *Активация свертывания крови.**Резистентность к антикоагулянтам или дефицит антикоагулянтов.**Снижение активности фибринолиза.**Реологические нарушения и стаз.*

**КЛАССИФИКАЦИЯ ТРОМБОФИЛИЙ (З.С. БАРКАГАН 1996, 2000 ГГ.)**

***I. Гемореологические формы тромбофилии.*** *Полицитемии и полиглобулии (идиопатические, гипоксические, дегидратационные, лейкемические).**Нарушение формы, объема, деформируемости эритроцитов (в т.ч. гемоглобинопатии). Повышение вязкости плазмы (парапротеинемии, гиперфибриногенемии).*

***II. Тромбофилии тромбоцитарного происхождения.*** *Тромбоцитемии (первичные, симптоматические, в т.ч. неопластические).**Гиперагрегационные формы (синдром "вязких" тромбоцитов первичный и при атеросклерозе, сахарном диабете, приёме гормональных контрацептивов).**Повышение продукции или активности (мультимерности) фактора Виллебранда.*

***III. Тромбофилии, обусловленные дефицитом или аномалиями физиологических антикоагулянтов.*** *Антитромбин III.**Кофактор гепарина II****.*** *Протеин С****.*** *Протеин S****.*** *Увеличение уровня тромбомодулина в плазме*

***IV. Тромбофилии, связанные с дефицитом или аномалиями плазменных факторов свёртывания крови.*** *Аномалия фактора V (мутация Лейден) – АПС резистентность. Симптоматические формы АПС резистентности (антифосфолипидный синдром и др.). Мутация протромбина G 202110А . Дефицит фактора XII (прекалликреина) . Дисфибриногенемии .*

**V. Тромбофилии, связанные с повышением и/или гиперактивацией плазменных факторов свёртывания.** *Повышение уровня фактора VIII свыше 150%.* *Гиперактивация фактора VII часто при коронарной болезни сердца (КБС) у больных с тромбозами.**Высокий уровень фактора XI.**Высокий уровень фактора IX.**Гиперпродукция XIII фактора.*

**VI. Тромбофилии, обусловленные нарушениями фибринолиза.** *Дефицит или аномалии плазминогена***.** *Сниженное высвобождение тканевого активатора плазминогена (ТАП)***.** *Избыточное высвобождение ПАИ 1***.** *Избыток ?2-антиплазмина***.**

***Тромбофилии, аутоиммунного и инфекционно-иммунного генеза*.** *АФС (первичный и вторичный)***.** *При иммунных тромбоваскулитах***.** *При системных иммунных заболеваниях (болезнь Бехчета)***.** *При гипертрофической миокардиопатии***.** *При инфекционно-иммунных заболеваниях (гемолитико-уремический сидром, затяжной бактериальный эндокардит)***.**

***Тромбофилии при обменных заболеваниях*.** *При гипергомоцистеинемии***.** *При сахарном диабете***.** *При ожирении***.** *При подагре***.** *При гиперлипидемиях***.**

***Лекарственные формы тромбофилии.*** *Приём оральных контрацептивов.**При длительной гепаринотерапии (тромбоцитопения, рикошетный тромбоз при дефиците антитромбина III.**При лечении непрямыми антикоагулянтами кумаринами – варфарином (на фоне дефектов в системе протеина С)***.** *При лечении тромболитиками (истощение плазминогена)***.** *При лечении ?-аспарагиназой.*

***Особые формы.*** *При гемолитико-уремическом синдроме****.*** *При болезни Мошкович****.*** *Онкотромбозы (синдром Труссо)****.*** *При микроангиопатической гемолитической анемии*

Таблица 7.

Краткосрочные и хронические факторы риска венозного тромбоэмболизма (ВТЭ)

|  |  |
| --- | --- |
| **Краткосрочные провоцирующие**  **факторы** | **Хронические риск факторы** |
| травмы ног  хирургические вмешательства  беременность  рак, метастазы  гипсование ног  иммобилизация > 3 дней  воздушные перелеты > 12 часов  оральные контрацептивы  гормональная заместительная терапия  острые инфекции (сепсис) | венозный тромбоэмболизм (ВТЭ) в анамнезе  сердечная недостаточность  обструктивная болезнь легких  мембранозный нефрит  нефротический синдром  антифосфолипидный синдром  тромбофилии, семейный анамнез  миелопролиферативные заболевания  пароксизмальная ночная гемоглобинурия  легочная гипертензия  гемиплегия, параплегия  ожирение  болезнь Крона  венозная недостаточность  полиглобулия  эритроцитозы |

**Важнейшие проявления и осложнения тромбофилий:**

*тромбоэмболии, ишемии и инфаркты;*

*невынашивание беременности и внутриутробная гибель плода;*

*злокачественная пурпура новорожденных;*

*кратное возрастание риска тромбоэмболий при беременности, гиперлипидемиях, хирургических вмешательствах;*

*высокий риск метастазирования злокачественных образований;*

*значительное повышение риска развития лекарственных тромбозов (контрацептивы, лечение цитостатиками);*

*увеличение риска тромбозов при всех видах полиглобулии и больших потерях жидкости.*

**Первичный лабораторный скрининг тромбофилий и отбор групп риска для профилактики тромбозов и ТЭЛА.**

*Гемореология (полиглобулия и др.).*

*Количество тромбоцитов (более 500x109/л).*

*Активация и гиперагрегация тромбоцитов.*

*АПТВ, кроме гипокоагуляционных форм (гиперкоагуляция).*

*Концентрация фибриногена (свыше 5 г/л).*

*Уровень фактора VIII (свыше 150%).*

*Уровень РФМК в плазме (свыше 10 мг%).*

*Активность антитромбина III (менее 70%).*

*Уровень протеина С и S (нормализованное отношение менее 0,8 (в парус-тесте, Барнаул)).*

*Волчаночный антикоагулянт (наличие в плазме).*

*Уровень гомоцистеина в крови (по ИФА выше 11 мкг/мл).*

*Нарушение фибринолиза (снижение плазминогена и его активаторов, повышение ингибиторов ПАИ-1; ?2-антиплазмина).*

*ПЦР – диагностика (наличие мутации Лейден, протромбина или тетрагидрофолатредуктазы).*

**8.4. Диагностика антифосфолипидного синдрома и выявление аутоантител, обладающих свойствами волчаночного антикоагулянта (ВА).** Антифосфолипидный синдром (АФС) известен как приобретенный аутоиммунный процесс, в основе которого лежит образование в организме в высоком титре бимодальных аутоантител, взаимодействующих с отрицательно заряженными мембранными фосфолипидами и связанными с ними гликопротеинами. Среди мембранных фосфолипидов основными мишенями антифосфолипидных антител (АФА) являются несущие отрицательный заряд кардиолипин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидиловая кислота, а из белковых компонентов – ?2-гликопротеин-1, аннексин V и протромбин (фактор II).Большинство длительно действующих АФА принадлежат к классам IgG и IgM. Они блокируют фосфолипидно-белковые комплексы как свободных фосфолипидных микровезикул плазмы крови, так и лабилизированных клеточных мембран эндотелия, тромбоцитов и других клеток. Это проявляется, с одной стороны, снижением тромборезистентности эндотелия и активацией тромбоцитарного гемостаза, а с другой – дисбалансом в системе коагуляционного гемостаза. Последний характеризуется развитием тромбофилического статуса in vivo, при котором активация факторов Vа, Xа и протромбина сочетается с депрессией противосвертывающих механизмов, в частности в системах протеина С (вариант вторичной резистентности фактора Vа к АПС), тромбомодулина и фибринолиза. Эти нарушения проявляются in vitro развитием гипокоагуляции в так называемых фосфолипидзависимых тестах. Эта же гипокоагуляция выявляется с помощью комплекса специальных лабораторных методик и обозначается как эффекты АФА, обладающих свойствами ВА.

**КЛАССИФИКАЦИЯ АФС [3]**

***Первичный АФС:*** *политромботический синдром, нарушение мозгового кровообращения, особенно у лиц молодого возраста;*

*привычное невынашивание беременности и внутриутробная гибель плода (упорно повторяющиеся выкидыши при отсутствии акушерско-гинекологической патологии);*

*аллергия к лекарственным препаратам (хинидин, гидролазин, фенотиазин, кокаин, прокаинамид).*

**Вторичный АФС:** *на фоне аутоиммунных заболеваний (системная красная волчанка (СКВ), узелковый периартериит, ревматоидный артрит, системная склеродермия, иммунный тиреоидит);*

*на фоне злокачественных новообразований (солидные опухоли, тимома, карциномы, гематологические опухоли);*

*на фоне инфекционных и инфекционно-иммунных заболеваний (болезнь Лайма, бронхиальная астма, ВИЧ-инфекция, стафилококковая, стрептококковая инфекция);*

*в связи с другими причинами (терминальная стадия почечной и печеночной недостаточности);*

**Другие варианты АФС:**

*катастрофический;*

*гипопротромбинемический;*

*микроангиопатический;*

*на фоне ДВС-синдрома.*

**Клинико-лабораторные признаки АФС**

Для постановки диагноза «Антифосфолипидный синдром» требуется наличие у пациента как минимум одного клинического и одного лабораторного признаков.

**I.Клинические признаки АФС**

***При первичном АФС:*** *Немотивированные рецидивирующие тромбозы сосудов (чаще вен) у 70-75% больных, в том числе тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА).*

*Расстройства мозгового кровообращения (тромботический инсульт, мигренеподобные немотивированные головные боли, нарушение зрения, памяти, парезы, эпи-синдром).*

*Фетоплацентарная недостаточность с невынашиванием беременности (привычные, чаще поздние выкидыши, внутриутробная гибель плода).*

*Кровоточивость микроциркуляторного типа (20-25% больных).*

*Склонность к развитию ДВС-синдрома.*

*Тромбоцитопения с повышенной агрегацией тромбоцитов.*

*Гипокоагуляция крови, особенно в фосфолипид-чувствительных тестах, выполненных на бедной тромбоцитами плазме.*

*Ложноположительная реакция Вассермана.*

*Наличие вирусной инфекции (вирус гепатита В, цитомегаловирусы, вирус Эпштейн-Барр).*

*Наличие сопутствующих признаков других иммунных процессов (артралгии, аллергии к лекарствам, укусам насекомых, пищевым продуктам), не позволяющих отнести выявленную совокупность симптомов к четко очерченной нозологической форме.*

***При вторичном АФС:*** *Развитие АФС на фоне уже имеющегося иммунного (СКВ, узелковый периартериит, геморрагический васкулит и др.; примерно в 25-35% случаев при СКВ) или опухолевого (лимфосаркома, лимфогранулематоз, миеломная болезнь) процесса.*

*Поливалентная гаптеновая лекарственная аллергия.*

**II. Лабораторные критерии АФС**

*Антитела к ?2-гликопротеину-1 (IgG и/или IgM изотипа) в сыворотке или плазме, обнаруживающиеся в двух и более случаях с интервалом повторного анализа не менее 6 недель.*

*Волчаночный антикоагулянт (ВА) обнаруживается в плазме в 2-х или более образцах с промежутком не менее 6 нед (согласно руководству Международного общества по тромбозу и гемостазу).*

*Определение антикардиолипиновых антител (IgG и/или IgM изотипа) в сыворотке или плазме крови в двух или более случаях с интервалом повторного анализа не менее 6 недель.*

*Специфичность диагностики по антителам различна: антитела против ?2-гликопротеина-1 демонстрируют большую специфичность, чем антитела к кардиолипину или другим фосфолипидам. Основной недостаток ИФА заключается в том, что нельзя разграничить антитела, обладающие или не обладающие свойствами волчаночного антикоагулянта. Поэтому данный вид диагностики является вспомогательным и не может заменить распознавание ВА на базе коагуляционных тестов. Однако в 3-10% случаев у больных с АФС обнаружение антител к ?2-гликопротеину-1 является единственным лабораторным проявлением.*

**Этапы выявления волчаночных антикоагулянтов**

Скрининговые фосфолипидчувствительные тесты

АПТВ

тест с разведенным ядом гадюки Рассела (со скрининговым реагентом)

тест ингибирования разведенного тканевого тромбопластина

каолиновое время свертывания бедной тромбоцитами плазмы (БТП)

Тест на смешивание плазмы больного с контрольной нормальной плазмой для исключения дефицита факторов свертывания (при наличии гипокоагуляции)

АПТВ

**Тесты коррекции имеющейся гипокоагуляции фосфолипидами**

Подтверждающие тесты на ВА

тест с разведенным ядом гадюки Рассела (со специальным реагентом)

тест нейтрализации тромбоцитами

**8.5.Актуальные вопросы диагностики острого и подострого ДВС-синдрома.** Отдельная задача ставится клиницистами перед лабораторией при распознавании и контроле за лечением такого спутника многих критических состояний, как ДВС-синдром. ДВС-синдром – неспецифический общепатологический процесс, связанный с поступлением в кровоток активаторов свертывания крови и агрегации тромбоцитов, диссеминированным микросвертыванием крови, активацией и истощением плазменных протеолитических систем, потреблением физиологических антикоагулянтов и факторов свертывания крови, образованием в зоне микроциркуляции микросгустков и агрегатов клеток крови, следствием чего является развитие блокады микроциркуляции в органах-мишенях, гипоксии, дистрофии и глубокой дисфункции этих органов. Данные нарушения сопровождаются интоксикацией организма продуктами тканевого распада, вторичной эндогенной бактериемией и развитием тяжелого тромбо-геморрагического синдрома.

**Основные звенья патогенеза ДВС-синдрома.**

*начальная активация гемокоагуляционного каскада и тромбоцитов эндогенными факторами: тканевым тромбопластином, лейкоцитарными протеазами, продуктами распада тканей, опухолевыми прокоагулянтами;*

*персистирующая тромбинемия с повышением уровня ее маркеров в крови (РФМК и D-димеров);*

*истощение системы физиологических антикоагулянтов со значительным снижением содержания в плазме антитромбина III, протеина С, плазминогена и повышением уровня тромбомодулина в плазме крови;*

*системное поражение сосудистого эндотелия и снижение его антитромботического потенциала;*

*образование микросгустков крови и блокада микроциркуляции в органах-мишенях (мозг, надпочечники, почки, печень, желудок и кишечник (субсиндром полиорганной недостаточности) с развитием дистрофических и деструктивных нарушений в них).*

*активация фибринолиза в зоне блокады микроциркуляции и истощение его резервов в общей циркуляции;*

*потребление факторов гемокоагуляции и тромбоцитопения (и - патия) потребления, приводящие к системной кровоточивости и терминальной гипокоагуляции вплоть до полной несвертываемости крови (геморрагическая фаза синдрома);*

*нарушение барьерной функции слизистой оболочки желудка и кишечника с трансформацией асептического ДВС-синдрома в септический;*

*вторичная тяжелая эндогенная интоксикация.*

Менее четко очерчен хронический ДВС-синдром, при котором длительная волнообразно текущая фибринация сопровождается персистирующей тромбинемией, выраженной дисфункцией органов-мишеней при минимальной и зачастую моноорганной геморрагической симптоматике, но с одновременным возникновением тромбозов магистральных вен.

**Этиологические формы острого и подострого ДВС-синдрома.**

***Инфекционно-септические:***

*бактериальные;*

*вирусные;*

*токсически-шоковый (в том числе при абортах).*

***Травматические и при деструкциях тканей:***

*ожоговый;*

*синдром длительного сдавления;*

*массивные травмы;*

*при некрозах тканей и органов (острая токсическая дистрофия печени, некротический панкреатит, острый инфаркт миокарда и др.);*

*при остром внутрисосудистом гемолизе, в том числе при переливаниях несовместимой крови;*

*при травматичных операциях;*

*при массивных гемотрансфузиях;*

*при гемобластозах, прежде всего при остром промиелоцитарном лейкозе;*

*при острой лучевой болезни.*

***Акушерские и гинекологические:***

*при эмболии околоплодными водами (особенно инфицированными);*

*при ранней отслойке и предлежании плаценты;*

*при атонии и массаже матки;*

*при внутриутробной гибели плода и его ретенции;*

*при эклампсии.*

***Шоковые (при всех терминальных состояниях).***

***В процессе интенсивной химиотерапии.***

***При трансплантации органов.***

**Причинами хронического (затяжного) ДВС-синдрома чаще всего являются следующие виды патологии:** *хрониосепсис, включая затяжной септический эндокадит;*

*хронические иммунные и иммунокомплексные болезни;*

*хронические вирусные заболевания (гепатит, ВИЧ и др.);*

*опухолевые процессы (рак, лимфомы, лейкозы и др.).*

Диагностика ДВС-синдрома строится прежде всего на ситуационной основе, с выявлением всех возможных условий и видов патологии, в том числе и критических состояний, при которых развитие этого синдрома является закономерным, с учетом проявлений его клинической манифестации и данных лабораторного обследования больных. Все эти три подхода имеют самостоятельное значение и дополняют друг друга. Так, например, острый ДВС-синдром нередко дебютирует с профузного кровотечения, сопровождает шок любой этиологии, быстро приводит к полиорганной недостаточности, и эти ситуации нуждаются не в лабораторном подтверждении диагноза и неоправданной потере времени, а в скорейшей патогенетической терапии. Роль лабораторной диагностики при этом представляется важной для уточнения тяжести и этапа развития данного синдрома по степени потребления основных компонентов системы гемостаза (тромбоцитов, фибриногена, физиологических антикоагулянтов (антитромбина III, протеина С)), а так же в подборе и оценке эффективности проводимой терапии. Тем не менее в отдельных случаях, например при подостром течении ДВС-синдрома, роль лабораторной диагностики по известным критериям (табл. 6) становится определяющей, особенно в тех случаях, когда его клинические признаки (полиорганная недостаточность, кровоточивость) еще мало выражены или запаздывают. Ориентировочная схема обследования для диагностики острого и подострого ДВС-синдрома [3] Таблица 8.

|  |  |
| --- | --- |
| **Метод** | **Патология** |
| Количество тромбоцитов в крови | Чаще тромбоцитопения |
| АЧТВ | Фазовые изменения |
| Протромбиновое время | Фазовые изменения |
| Тромбиновое время | Фазовые изменения |
| Уровень растворимого фибрина (или РФМК) и D-димера в плазме | Повышение |
| Концентрация фибриногена | Широкий диапазон значений |
| Активность антитромбина III | Менее 70 % |

Преобладающее значение в лабораторной диагностике ДВС-синдрома принадлежит не выявлению гипер- или гипокоагуляционного сдвига и гипофибриногенемии (которая характерна лишь для молниеносных форм патологии и терминальной фазы глубокой несвертываемости крови), а выявлению тромбоцитопении, высокого уровня маркеров тромбинемии (растворимого фибрина и D-димера) и, что важно, потребления физиологических антикоагулянтов, степень снижения которых, наряду с глубиной тромбоцитопении и выраженностью клинических проявлений, отражает тяжесть ДВС-синдрома. Следует избегать перегруженного списка методов, иногда рекомендуемых для экспресс -диагностики ДВС-синдрома, поскольку это задерживает ответ, снижает информативность и своевременность реальной диагностики. При распознавании и мониторировании острых и подострых ДВС-синдромов всегда необходимо учитывать возможное влияние на результаты исследований гепаринемии (при анализе крови, полученной через гепаринизированный катетер или при терапии гепарином), гемодилюции, наблюдающейся при массивной инфузионной терапии, гиперцитратемии и ряда плазмозаменителей, особенно реополиглюкина.

**9.Особенности системы гемостаза при физиологической беременности.**

Важную роль в поддержании нормальной деятельности фето-плацентарной системы играет система гемостаза. Изменения в системе гемостаза беременной в сторону гиперкоагуляции являются физиологическими и связаны с появлением маточно-плацентарного круга кровообращения. Гиперкоагуляция при беременности – физиологическое состояние, которое обеспечивает эффективную имплантацию яйцеклетки, адекватное соединение плаценты с маткой и остановку кровотечения во время родов. Однако необходимо учитывать, что при беременности повышен риск венозных тромбозов и эмболии легочных артерий. При физиологическом течении беременности изменения показателей системы гемостаза начинают регистрировать не раньше, чем со второго месяца беременности, затем изменения прогрессивно увеличиваются вплоть до родов. Скрининговые тесты ПВ, АПТВ указывают на развитие гиперкоагуляции. **Отдельные показатели гемостаза чаще всего меняются следующим образом [2, 6]:** *увеличиваются концентрация фибриногена;*

*повышается концентрация дериватов фибриногена – продуктов деградации фибрина и фибриногена, растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК);*

*наиболее значительным является угнетение фибринолиза во 2-м и, особенно, в 3-м триместре беременности. Количество плазминогена, активатора фибринолиза (ТАП) повышается. Угнетение фибринолиза связано с существенным увеличением ингибиторов: ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (ПАИ-1), который освобождается из эндотелиальных клеток, и особенно ингибитора активатора плазминогена 2-го типа (ПАИ-2), который нарабатывается плацентой. Ингибирование фибринолиза при беременности – основная причина сдвига гемостатического баланса к гиперкоагуляции и формированию предтромботического состояния;*

*по мере развития беременности происходит постепенное снижение активности антитромбина III;*

*имеет место некоторое повышение факторов IX, X и протромбина, содержание ф.VII и ф.VIII;*

*содержание фактора XIII имеет тенденцию к снижению.*

После родов все показатели гемостаза возвращаются к норме примерно за 6 недель.

**10.Рекомендации по получению плазмы для исследования гемостаза**.

Лабораторная диагностика нарушений гемостаза весьма чувствительна к соблюдению известных правил взятия, хранения и подготовки крови для исследования. Безусловное значение для качественного обследования имеют адекватная подготовка больного к сдаче крови, сама методика кровопускания и стабилизации крови. Состояние стресса (психологического или физического) может вызвать повышение агрегационных свойств тромбоцитов и тромбинемию. В некоторых клинических ситуациях, например при шоке, извлечение крови из локтевой вены затруднительно из-за низкого давления. Попытки медленно набрать кровь с помощью шприца часто заканчиваются неудачей – кровь свертывается. В таких случаях можно прибегнуть к взятию крови из подключичного катетера, однако следует помнить о возможности загрязнения такой крови гепарином. Кровь берут утром натощак из локтевой вены иглой с широким просветом (0,8 мм). Допустимо лишь кратковременное наложение жгута. Использование шприца недопустимо из-за активации тромбоцитов и факторов свертывания турбулентным движением крови и ее смешивания с воздухом (вспенивания). Использование вакуумных пробирок, предназначенных для получения венозной крови, стабилизированной цитратом в соотношении 9:1, имеет большие преимущества из-за хорошей стандартизации процедуры и соответствия санитарным нормам, но является малоприемлемым в случае существенных отклонений гематокрита при анемии или полиглобулии (полицитемии). При высоком гематокрите (свыше 70%) в плазме крови создается избыточная концентрация цитрата, приводящая к «ложной» гипокоагуляции, напротив, при снижении гематокрита (ниже 35%), например при анемии, обнаруживается «ложная» гиперкоагуляция, и кровь при ее смешивании с цитратом в отношении 9:1 может свернуться в пробирке еще до исследования. При подозрении на заболевания, сопровождающиеся анемией или полиглобулией, рекомендовано перед сдачей крови на параметры гемостаза провести исследование показателя гематокрита. Перерасчет обьема стабилизатора в соответствии с показателем гематокрита позволяет избежать этой ошибки (табл. 9). **Кроме того, существуют специальные требования пробоподготовки для отдельных тестов:**

*Из-за быстрой инактивации тканевого активатора плазминогена ТАП ингибиторами пробы крови необходимо немедленно закислить, чтобы предупредить инактивацию ТАП in vitro. В настоящее время выпускаются специальные пробирки с кислым антикоагулянтом.*

*Ингибитор активатора плазминогена 1 типа ПАИ-1 - один из самых неустойчивых белков плазмы, поэтому определение необходимо проводить сразу после взятия крови, транспортировка может привести к потере активности ПАИ-1 в пробе. Содержание ПАИ-1 в системе циркуляции подвержено суточным ритмам, поэтому пробы при системном анализе необходимо брать в одно время суток, лучше по утрам.*

*При назначении определения волчаночного антикоагулянта по возможности необходимо отменить больному прием гепарина за 2 дня и отменить кумариновые препараты за 2 недели до взятия крови, так как присутствие этих препаратов в крови может давать ложноположительные результаты. Если отменить данные препараты невозможно, о их приеме необходимо указать на направлении.*

*Активность протеина С следует определять до начала лечения антикоагулянтами непрямого действия и контролировать во время лечения.*

Соотношение объемов 3,8%-ного раствора цитрата натрия и крови в зависимости от величины гематокрита. Таблица 9.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Гематокрита, %** | **Объем цитрата, 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 |
| 58-60 | 0,7 | 9,3 |
| Более 65 | 0,5 | 9,5 |

Литература. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., 2001. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М., 2005. Момот А.П. Патология гемостаза принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. СПб., 2006. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М., 2006. Папаян Л.П. Новое в представлении процесса свертывания крови // Трансфузиология. 2004. Т. 5, № 3. С. 7-22. Сидельникова В.М., Кирющенков П.А. Гемостаз и беременность. — М.: Триада-Х, 2004. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. СПб.: ГМУ, 2000. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Editors: Robert W. Colman and others. 2001. Hemostasis and Thrombosis 2nd Edition. T.G. DeLoughery. Landes Bioscience p.218. 2004. [www.coagulometers.ru](http://www.coagulometers.ru) [www.trombozu.net](http://www.trombozu.net)

Приложение 1

Устаревшие методы исследования гемостаза и их современные аналоги [3

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Метод исследования** | **Недостаток** | **Современный метод** |
| Подсчет количества тромбоцитов в мазке крови по Фонио (на 1000 эритроцитов) | Низкая точность определений, но метод информативен при оценке морфологии тромбоцитов в случае дифференциальной диагностики тромбоцитопатий | Определение числа тромбоцитов в крови с помощью гематологического анализатора либо фазово-контрастной микроскопии в камере Горяева |
| Определение времени свертывания крови | Низкая стандартизация | АЧТВ |
| Определение времени рекальцификации | Низкая стандартизация | АЧТВ |
| Аутокоагуляционный тест\* | Низкая стандартизация | АЧТВ+ определение активности АТ III |
| Фибриноген В, этаноловый тест, протаминсульфатный тест | Малоинформативное, качественное выражение результатов («+» или «-»), возможность получения ложных результатов | Тесты на маркеры тромбинемии. Наиболее доступный орто-фенантролиновый тест (РФМК) с количественным выражением результатов |
| Определение толерантности плазмы к гепарину (на базе теста рекальцификации бедной тромбоцитами плазмы) | Низкая точность (нестандартизированность) и длительность определений, влияние на результаты разнообразных нарушений внутреннего механизма свертывания | Оценка чувствительности плазмы к гепарину на основе тромбин-гепаринового времени свертывания со стандартной активностью тромбина и гепарина |
| Концентрация фибриногена в плазме по Р.А. Рутберг (гравиметрический вариант) | Низкая стандартизация, возможность ложного занижения результатов при гипофибриногенемии и, наоборот, завышения при гиперфибриногенемии; грубое нарушение санитарных норм работы с плазмой крови | Концентрация фибриногена в плазме (хронометрический вариант по Клауссу) с использованием коагулометра любой конструкции |
| Определение активности фактора XIII по лизису фибринового сгустка в растворе 5М мочевины | Низкая чувствительность (выявляется только патология с активностью фактора 1-2% от нормы), влияние на результаты исследования концентрации фибриногена | Фотометрическое определение активности с применением специфических к фактору XIIIа субстратов |

\* Остается методом выбора для использования в неонатологии