

Лабораторная диагностика патологии системы

гемостаза



Профессор кафедры клинической
лабораторной диагностики СЗГМУ им.И.И.
Мечникова, д.м.н Л.А.Хоровская

Содержание

- 1. Что такое коагулология
- 2. Основные исторические моменты
- 3. Система гемостаза и ее функции
- 4. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз и лабораторные маркеры его оценки
- 5. Плазменный гемостаз и лабораторные маркеры его оценки
- 6. Система фибринолиза и лабораторные маркеры оценки
- 7. Скрининговые исследования в коагулологии

Коагулология

- наука и раздел клинической лабораторной диагностики, предметом изучения которой являются гемостаз и его нарушения.
- **Коагулологические исследования** – особая группа биохимических исследований, изучающая особенности свертывающей и противосвертывающей систем организма, которые включают исследование сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, активности свертывающей, фибринолитической и антикоагулянтной систем.

Рудольф Людвиг Карл Вирхов

(нем. Rudolf Ludwig Karl Virchow, 1821-1902)



«Общий курс по научной
медицине» (1856)

Детально исследовал тромбоз
Основоположник теории о
венозной эмболии

Немецкий учёный второй
половины XIX столетия, врач,
патологоанатом, гистолог,
физиолог, один из
основоположников
клеточной теории в биологии
и медицине,
основоположник теории
клеточной патологии в
медицине

Тромбозы

Триада Вирхова

Изменение состава крови
Активация коагуляции

Замедление кровотока
Иммобилизация



Повреждение эндотелия

Изменение в сосудистой стенке

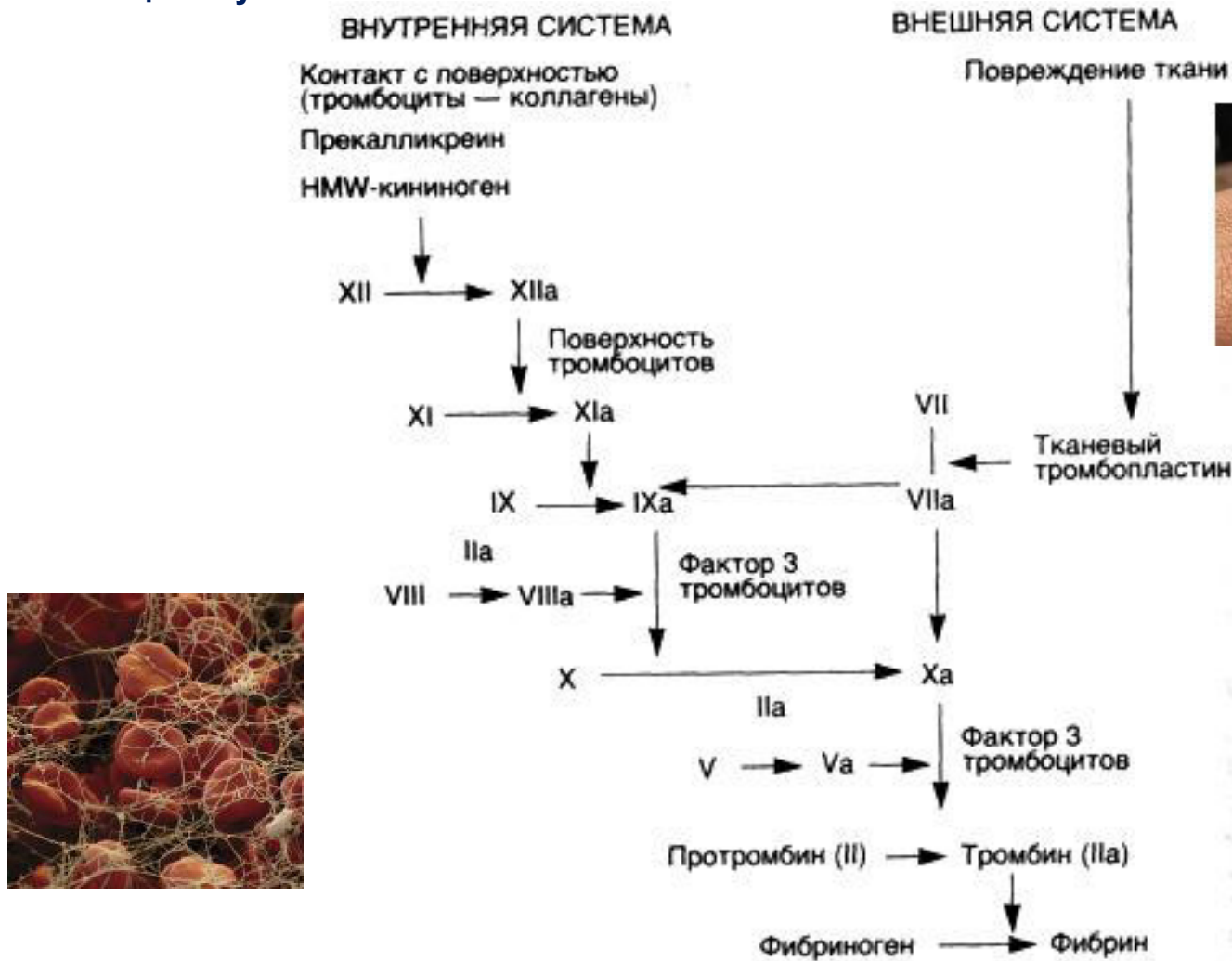
Роберт Гвин Макфарлейн (1907-1987)



- 1964 - автор энзиматического каскада свертывания крови
 - An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature, Lond.* 1964. 202,221
- Диссертация в 1938 г. о физиологическом механизме свертывания крови и его нарушениях при геморрагических состояниях.
- Золотая медаль Лондонского Университета

Схема свертываемости крови, каскад

процесс свертывания крови подразделяется на первичный, или сосудисто-тромбоцитарный, гемостаз и вторичный, или коагуляционный, гемостаз, с выделением в последнем «внешнего», «внутреннего» путей активации тромбина и «общего пути»



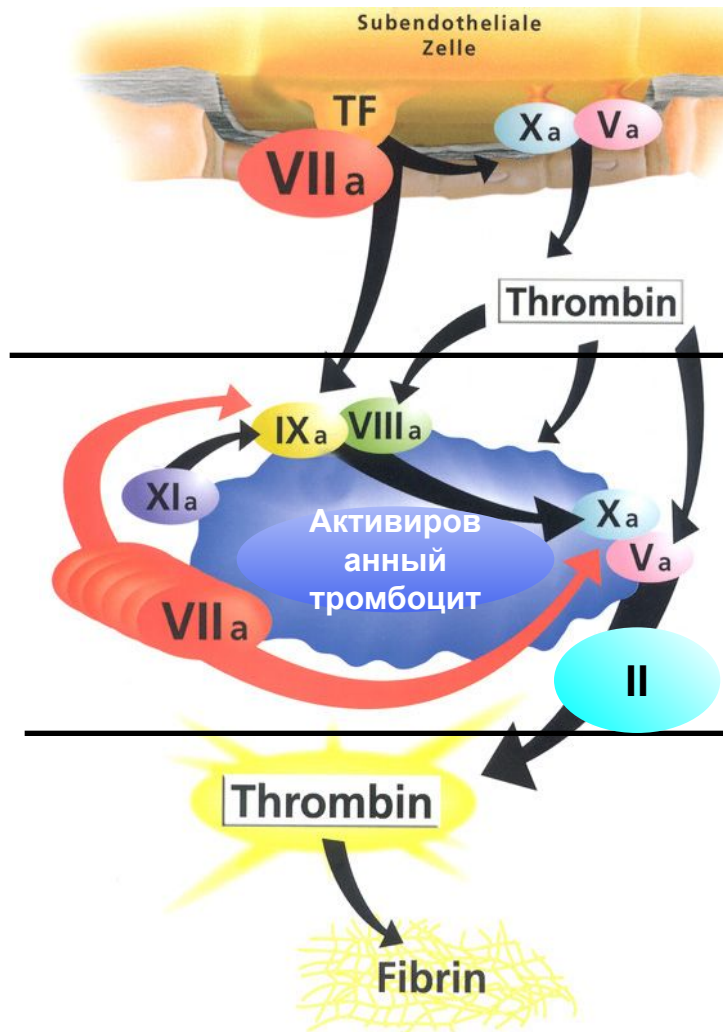
Kenneth G Mann, 2000,
Атауллаханов Ф. 1995, Hoffman M. 2001

современная клеточная теории гемостаза

- Весь каскад, кроме образования фибрина и активации свертывания, имеет регуляторное значение.
- Его целью является образование нужного количества фибрина строго в нужном месте



Плазменный гемостаз (Broze, 1995; Hoffman, 1998)

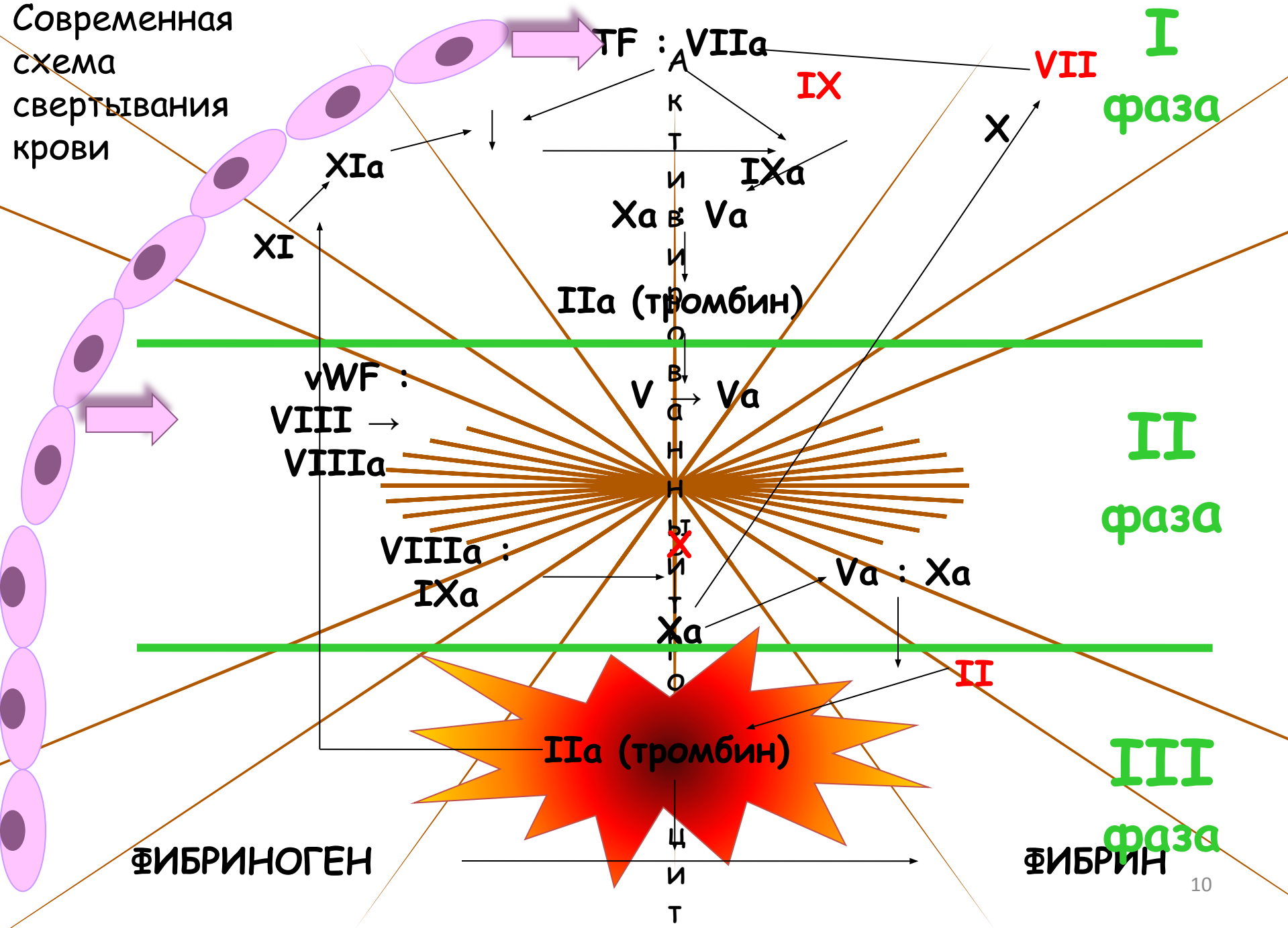


1. Initiation -
начальная фаза

2. Amplification,
Propagation - усиление и
распространение

3. Thrombin and fibrin
generation - генерация
тромбина и фибрина

Современная
схема
свертывания
крови



Профессор Вавилова Т.В.

Система гемостаза у больных с механическими искусственными клапанами : диссертация ... доктора медицинских наук, Санкт-Петербург, 2004 г.



Зав.кафедрой
Клин.лаб.д-ки и
генетики
ФГБУ
«СЗМФМИЦ»
им. В.А.Алмазова

- Роль молекулярно-генетических механизмов в формировании риска повышенного тромбообразования
- Оценка агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с ИКС в отдаленные сроки после операции фотооптическим методом
- Состояние прокоагулянтной, антикоагулянтной и фибринолитической активности у больных с механическими ИКС в отдаленные сроки после операции в зависимости от степени антитромботической защиты
- Коррекция нарушений гемостаза у больных с механическими искусственными клапанами сердца в отдаленные сроки наблюдения

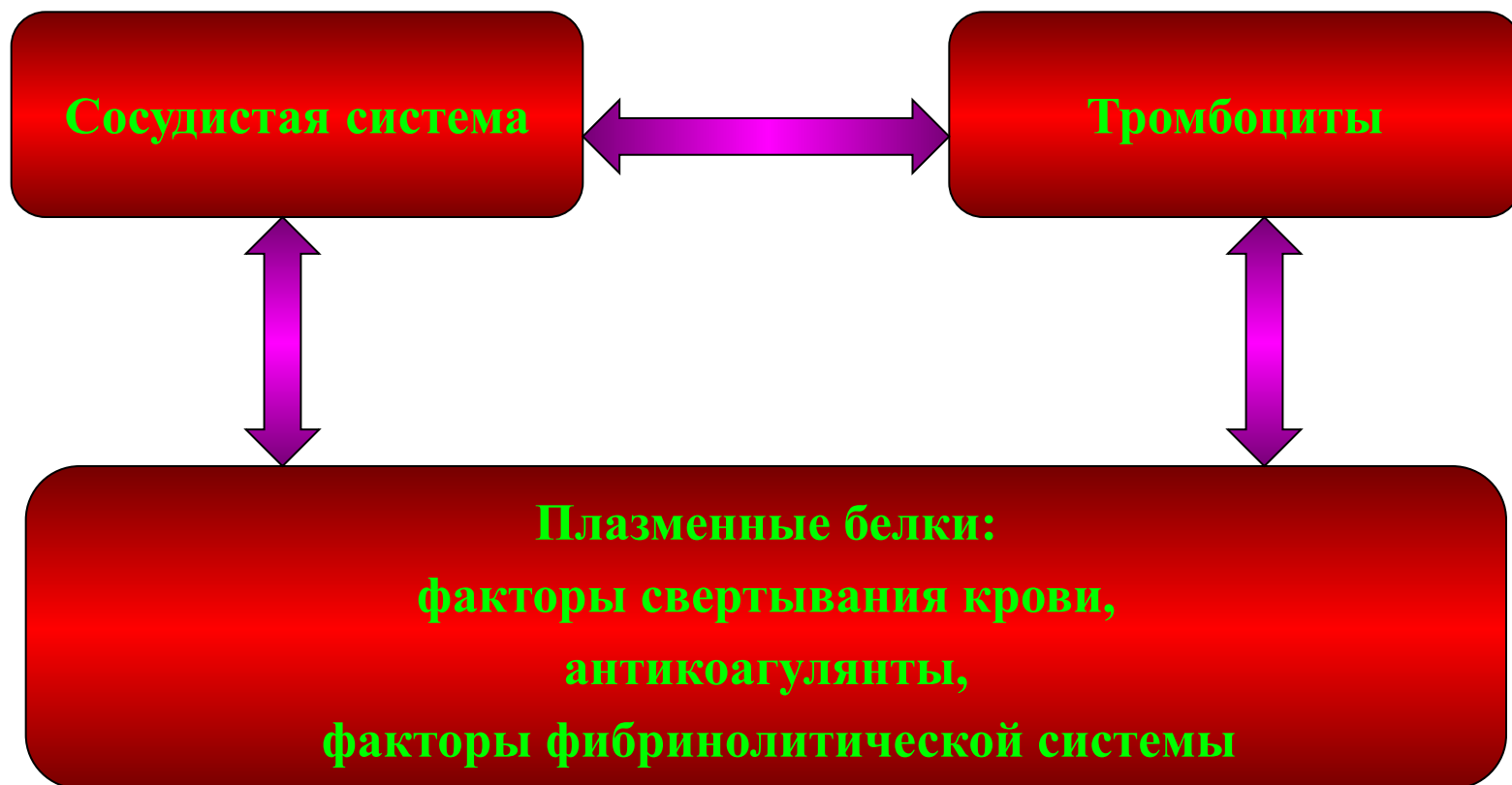
Система гемостаза

- **Система гемостаза** (haemostasis от греч. haima кровь и stasis - стояние) – совокупность биологических и биохимических механизмов, обеспечивающих сохранение жидкого состояния циркулирующей крови, поддержание целостности кровеносных сосудов и купирование кровотечения при их повреждении
- Сложная биологическая система обеспечивает сохранения крови в кровеносном русле в жидком состоянии и моментально реагирует на повреждение сосудистой стенки образованием сгустка.

Функции гемостаза



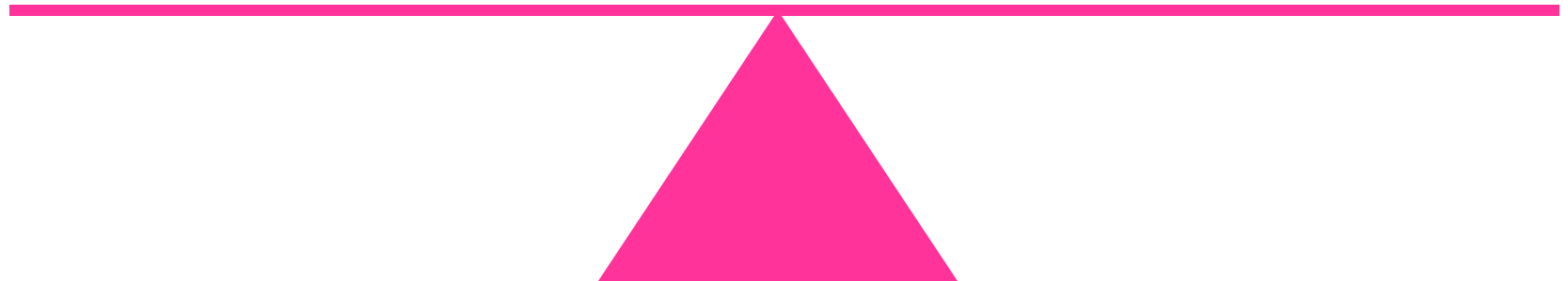
Компоненты системы гемостаза



Гемостаз

Кровотечение

Тромбоз



Структура системы гемостаза

- ***Свертывающая система***
 1. **Тромбоцитарно-сосудистый, или первичный гемостаз**
 2. **Коагуляционный (плазменный) или вторичный гемостаз**
- ***Противосвертывающая система***
 1. **Система антикоагулянтов**
 2. **Система фибринолиза**

Клинические проявления нарушений свертывающей системы крови

- **Кровоточивость – геморрагический синдром**
- **Тромбозы в венозном и артериальном русле**
- **Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания – синдром ДВС**

Основные направления работы лаборатории свертывания

- **Выявление причин кровоточивости**
- **Выявление причин повышенного тромбообразования**
- **Оценка состояния системы гемостаза при различной патологии без клинических проявлений кровоточивости или тромбообразования**
- **Контроль антикоагулянтной и антиагрегантной терапии**
- **Работа по обеспечению качества лабораторных исследований**

Основные правила проведения преаналитического этапа исследований гемостаза



Антикоагулянт

- 3,2% дигитратной формы тринатрия цитрата),
- 3,8% дигитратная форма тринатрия цитрата
- Соотношение кровь/антикоагулянт 1:9

- Исследование венозной крови натощак
- Забор венозной крови закрытым способом (желательно)
- «Щадящая» венопункция, наложение жгута не более одной минуты
- Тщательное, но медленное перемешивание с антикоагулянтom
- Хранение при температуре 18-22° С
- Быстрая доставка в лабораторию

Этапы лабораторного скрининга при оценке патологии свертывания крови

- Оценка первичного звена
- Оценка процесса коагуляции
- Нарушения антикоагулянтной системы
- Фибринолитическая система

Патология первичного или сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза

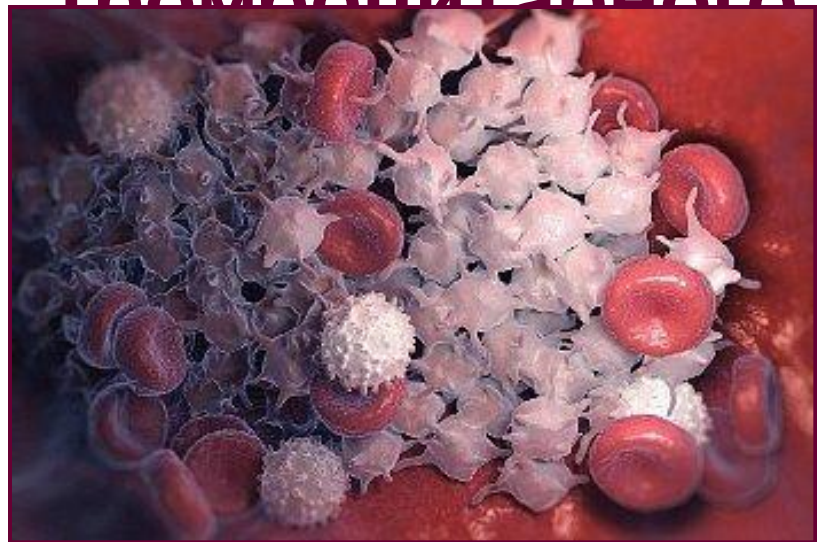
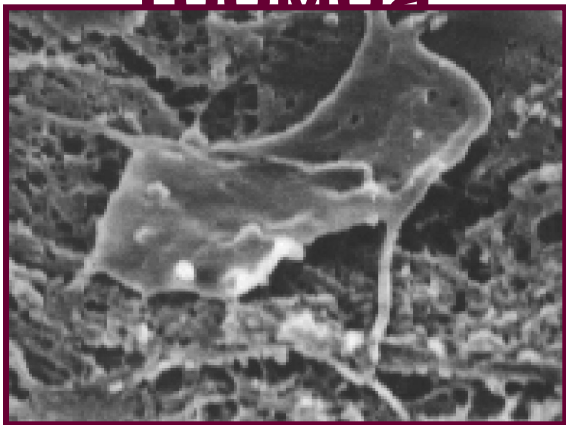
- 1. **Проявляется при нарушениях сосудистого генеза:**

Геморрагические васкулиты, поражения сосудистой стенки при атеросклерозе, сахарном диабете, гипертонической болезни, а также болезнь Рондю-Ослера, мезенхимальные дисплазии и т.д.

- 2. **При страдании тромбоцитарного звена:**
тромбоцитопении менее $150 \times 10^9/\text{л}$ и наследственная или приобретенная тромбоцитопатия (гематологические, терапевтические, иммунные заболевания, лекарственные воздействия.)

Тромбоцитарно-сосудистый гемостаз

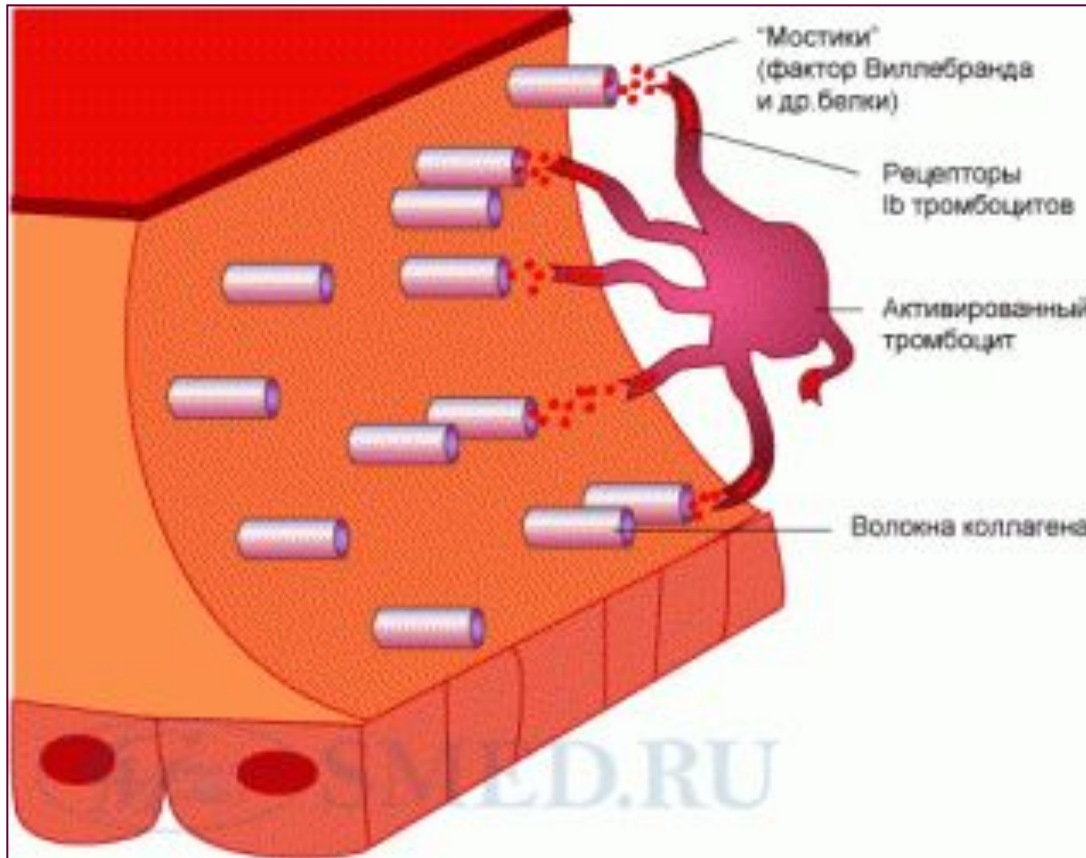
- Адгезия и активация тромбоцитов
- Агрегация тромбоцитов, реакция высвобождения.
- Уплотнение тромбоцитарного тромба



Этапы образования тромбоцитарного тромба



Адгезия и активация тромбоцитов

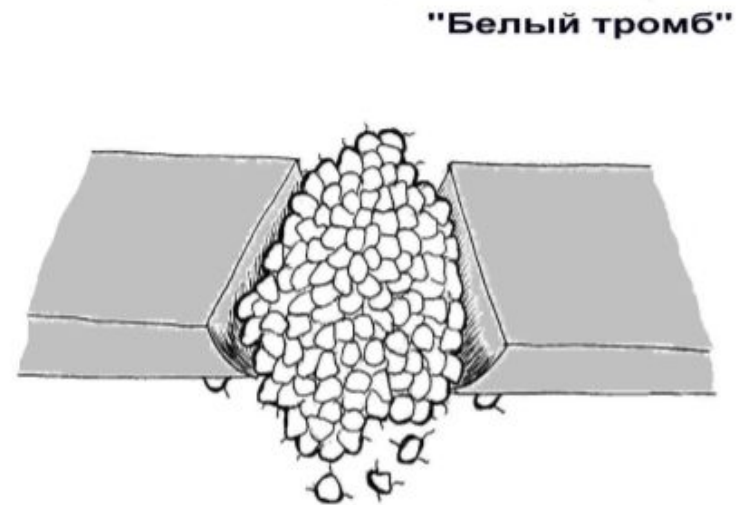
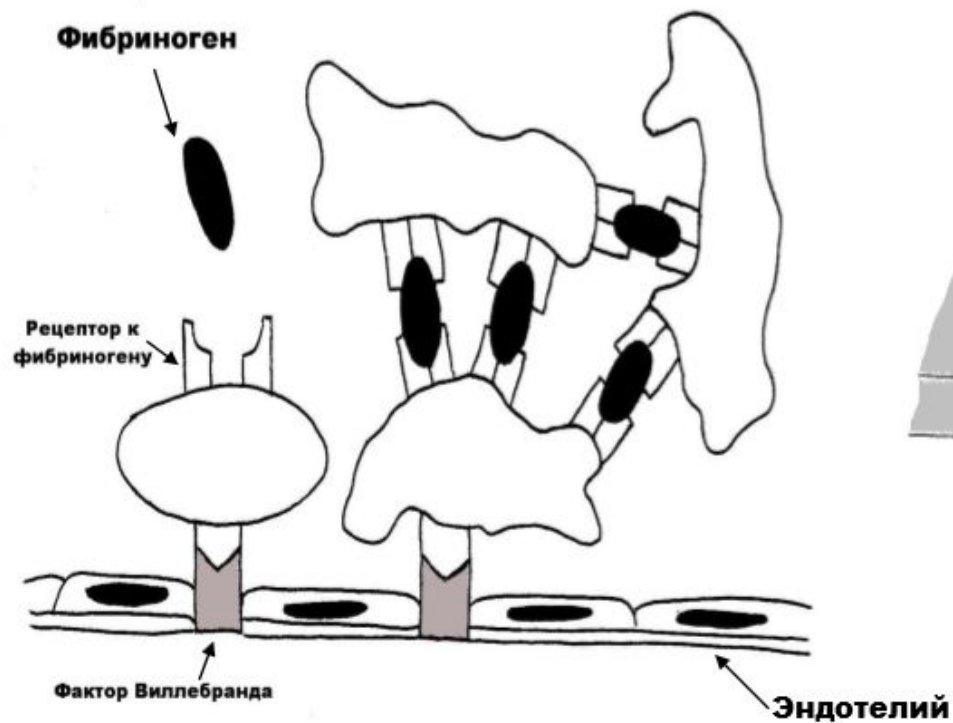


- **Участники**

1. Коллаген I и III типов,
2. Рецепторы тромбоцитов
3. Фактор Виллебранда сосудистой стенки

Агрегация -

Агрегация тромбоцитов между собой опосредуется фибриногеном; рецептором служит гликопротеид IIb/IIIa.



Лабораторные методы исследования сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза

- **Количество тромбоцитов**
- **Длительность кровотечения:**
- **Прокол пальца или мочки уха от момента травматизации до образования тромбоцитарной пробки**
 - **проба Duke, 2-4 мин,**
 - **Проба Шитиковой с наложением манжеты на плечо для венозного стаза, давление 40 мм рт.ст, норма до 4 мин.**
- **Исследование динамической функции тромбоцитов (агрегация и адгезия)**
- **Исследование активности тромбоцитов**

Подсчет количества тромбоцитов

Норма: гематологический анализатор:
 $150 - 400 \times 10^9 / \text{л}$

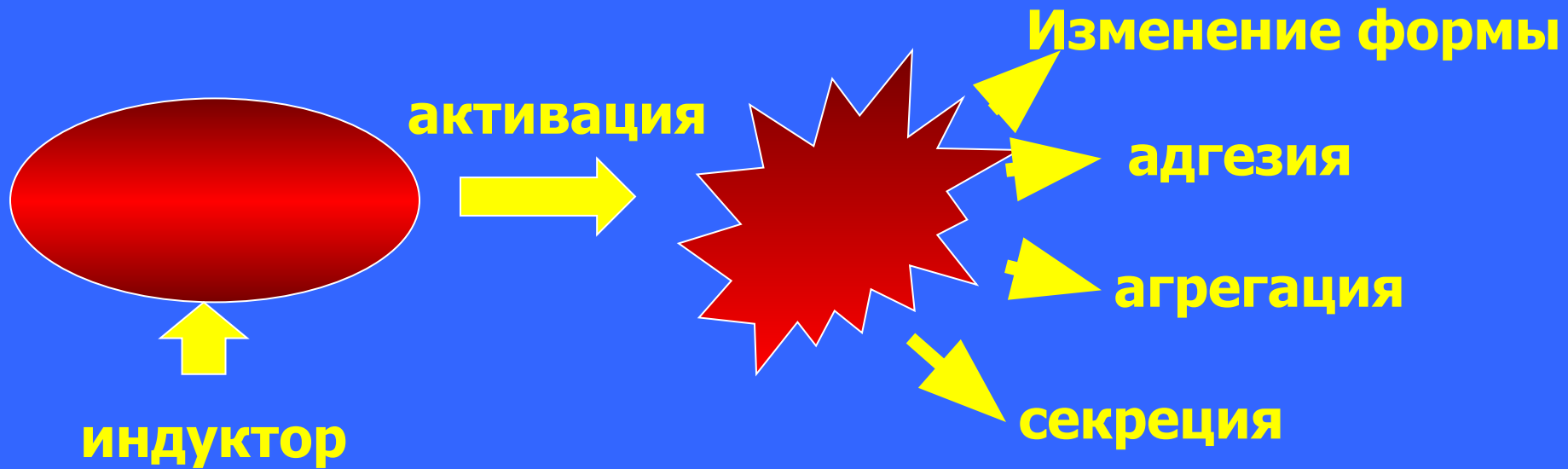
Микроскоп: 180-320 г/л

Увеличивается длительно
кровотечения
<100



Спонтанные кровотечения <20

Функции тромбоцитов



Лабораторные методы исследования активности тромбоцитов

- **Агрегация:** измерение индуцированной агрегации тромбоцитов в плазме и цельной крови (коллаген, ристомин, АДФ, светопропускание, светорассеяние, измерение импеданса)
- Добавление к плазме стимулирующих агрегацию тромбоцитов адгезию:

Коллаген и ристомин

- Добавление веществ для агрегации: коллаген, АДФ – процесс секреции из гранул тромбоцитов и агрегация

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

**1. Оценка сосудисто-тромбоцитарного звена:
Функциональная активность тромбоцитов**

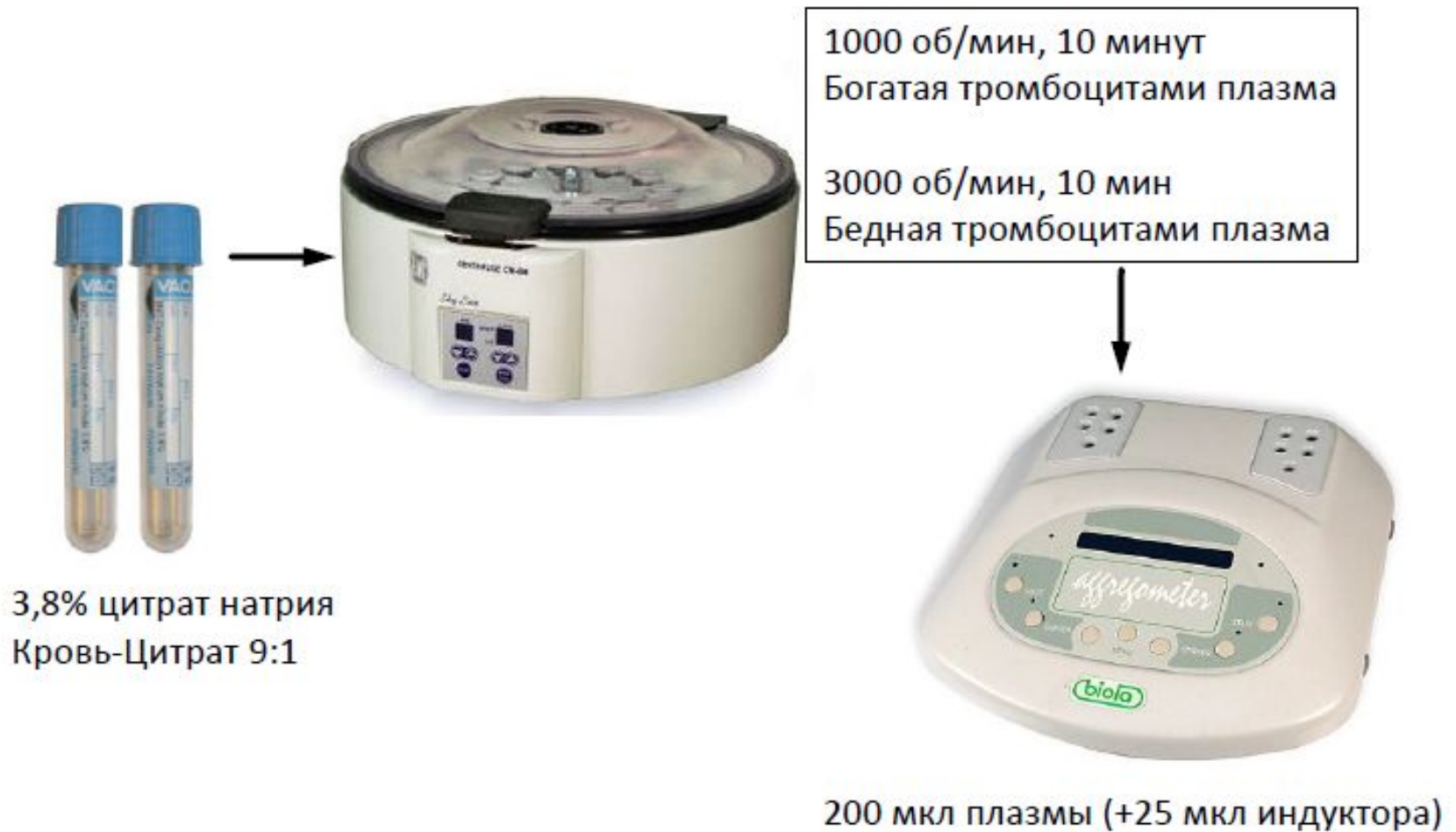
**2. Для определения генеза кровоточивости
микроциркуляторного типа**
(при наличии петехий, спонтанных синяков, носовых, десневых
кровотечений)

3. Контроль эффективности терапии антиагрегантами
(аспирин, плавикс, клопидогрель, трентал, курантил)

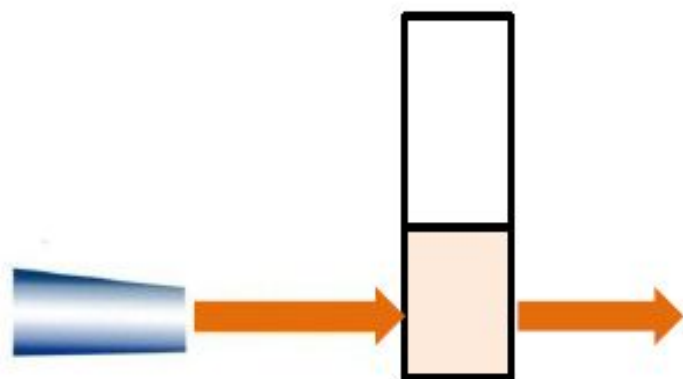
4. Для определения чувствительности к препаратам
Адреналин-агрегация



Турбидиметрический метод исследования агрегации



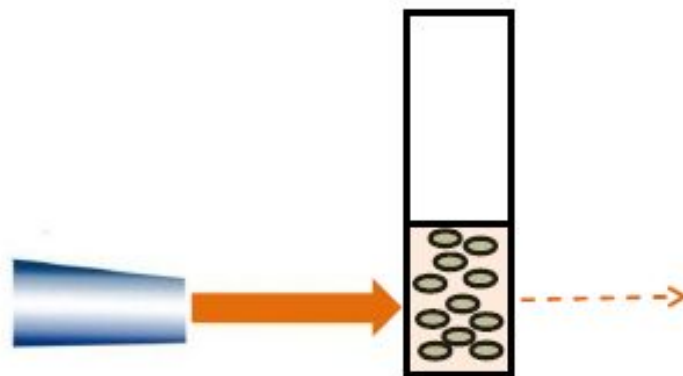
Принцип метода



Бедная тромбоцитами плазма

Светопропускание 100%

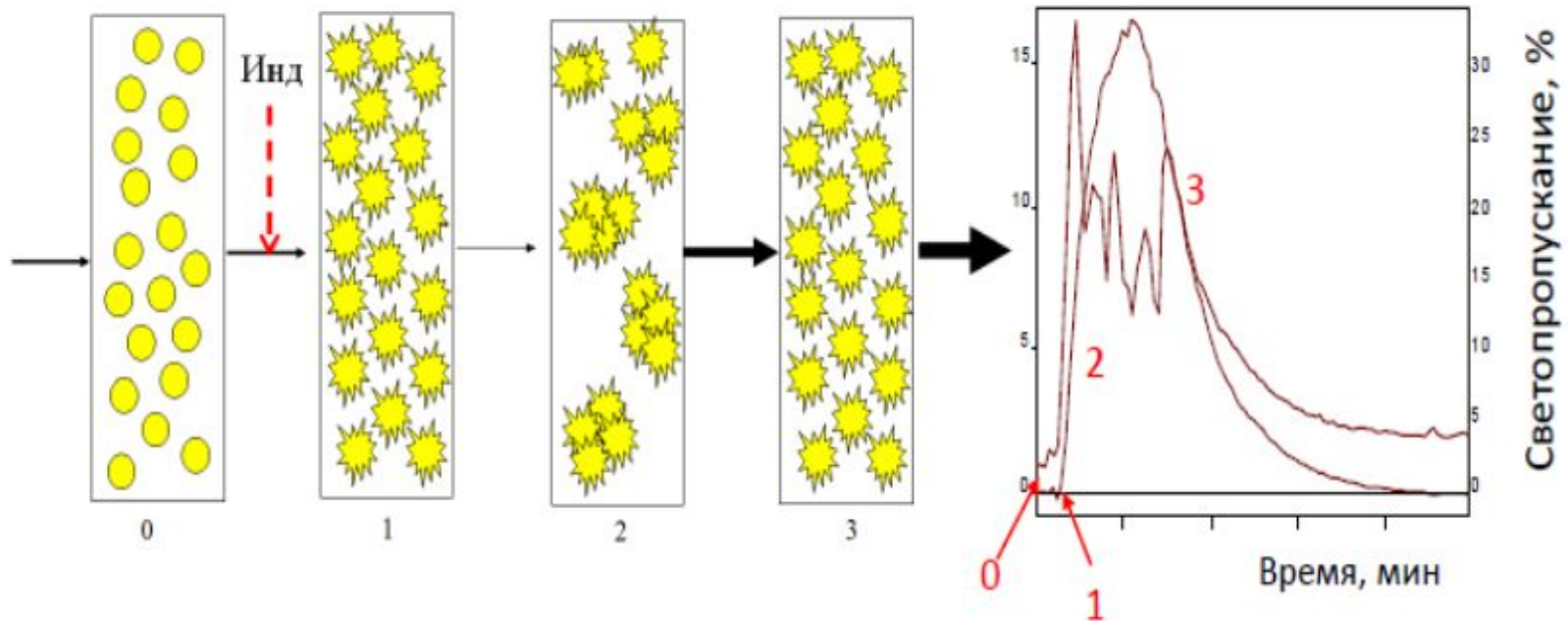
*Регистрируются изменения
светопропускания богатой
тромбоцитами плазмы после
добавления индуктора агрегации*



Богатая тромбоцитами плазма

Светопропускание 0%

Низкая концентрация индуктора



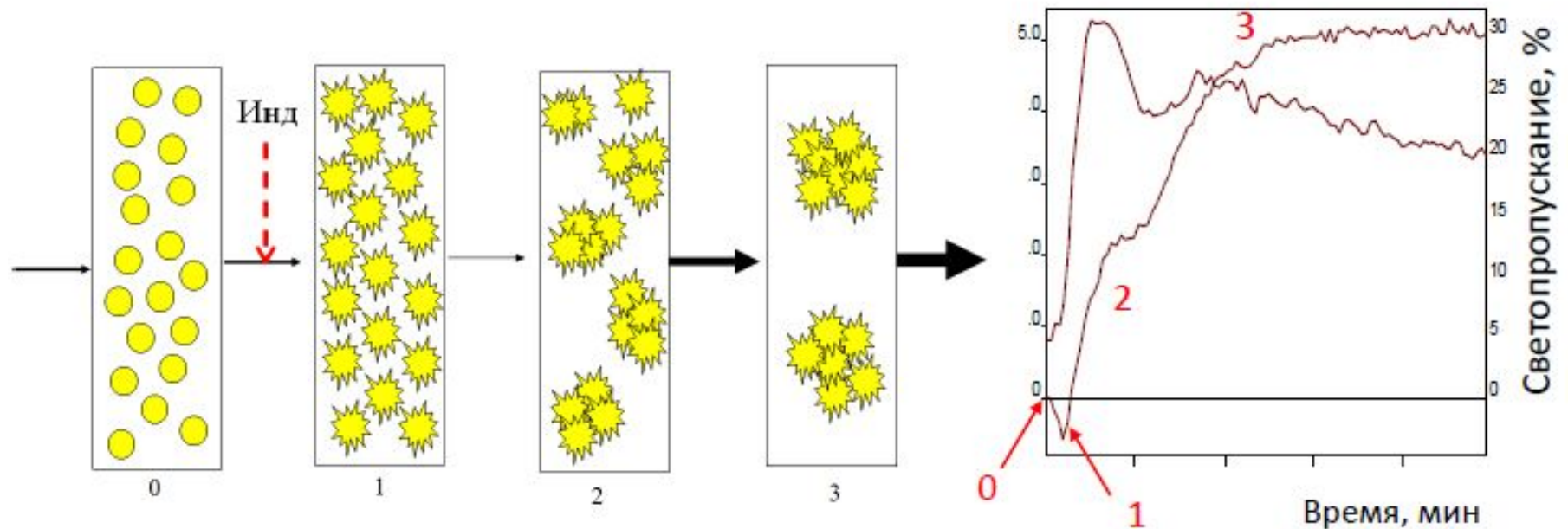
0 – неактивированные тромбоциты

1 – фаза активации

2 – фаза индуцированной агрегации

3 – фаза дезагрегации с последующей стабилизацией

Высокая концентрация индуктора агрегации

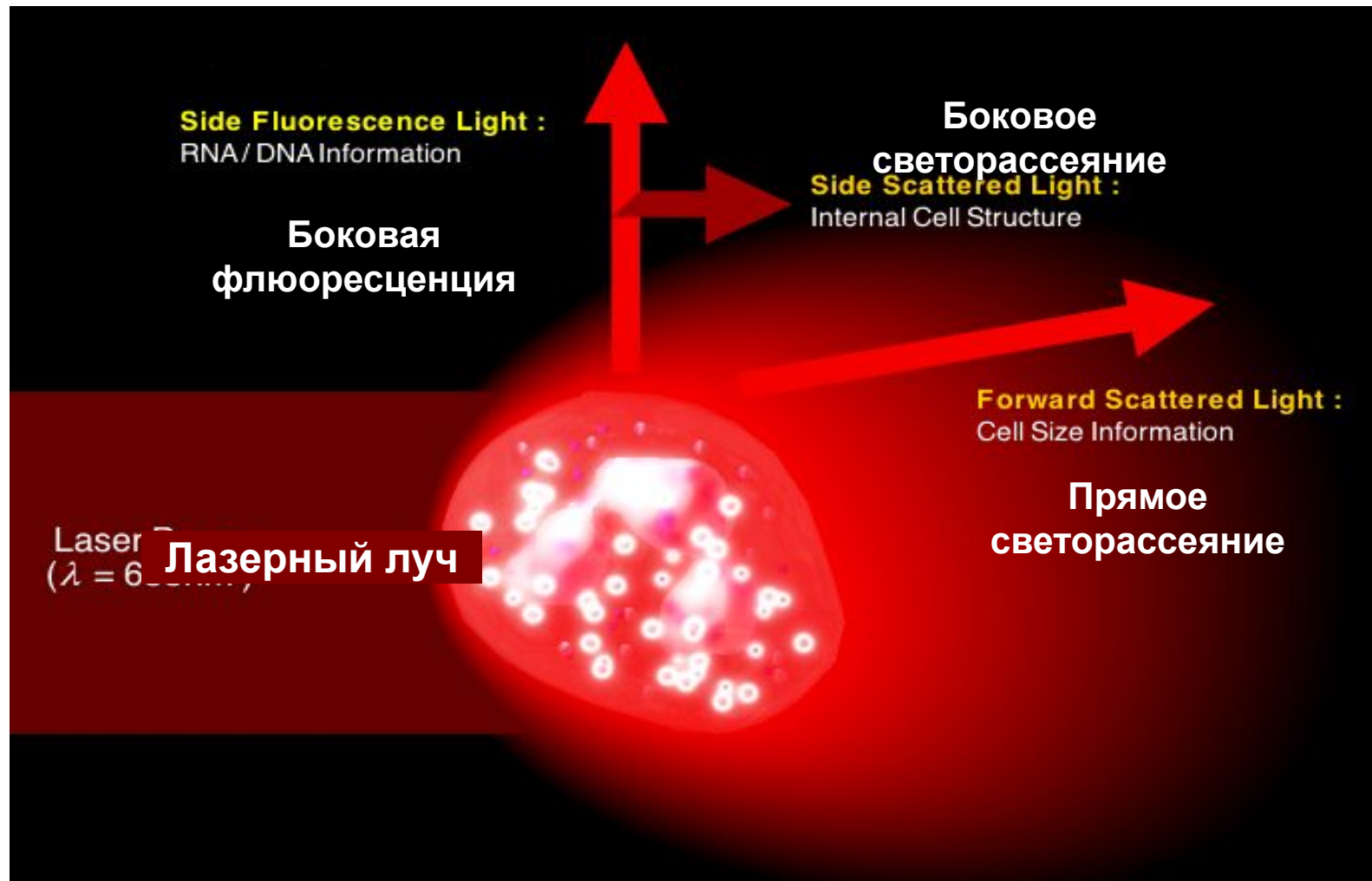


- 0 – неактивированные тромбоциты
- 1 – фаза активации
- 2 – фаза индуцированной агрегации
- 3 – фаза высвобождения с последующей стабилизацией

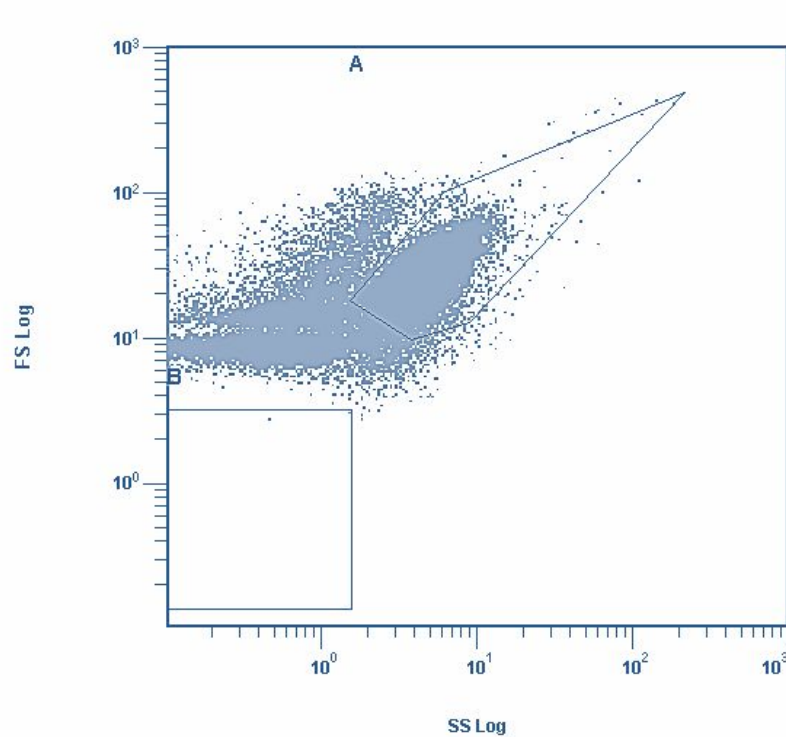
Возможные методы определения активности тромбоцитов

- Морфофункциональная оценка внутрисосудистой активации тромбоцитов
- Проточная цитометрия для исследования микрочастиц, тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов, рецепторов тромбоцитов ...
- Выявление и количественная характеристика плазменных маркеров активации тромбоцитов

Проточная цитофлуориметрия



Проточная тромбоцитометрия

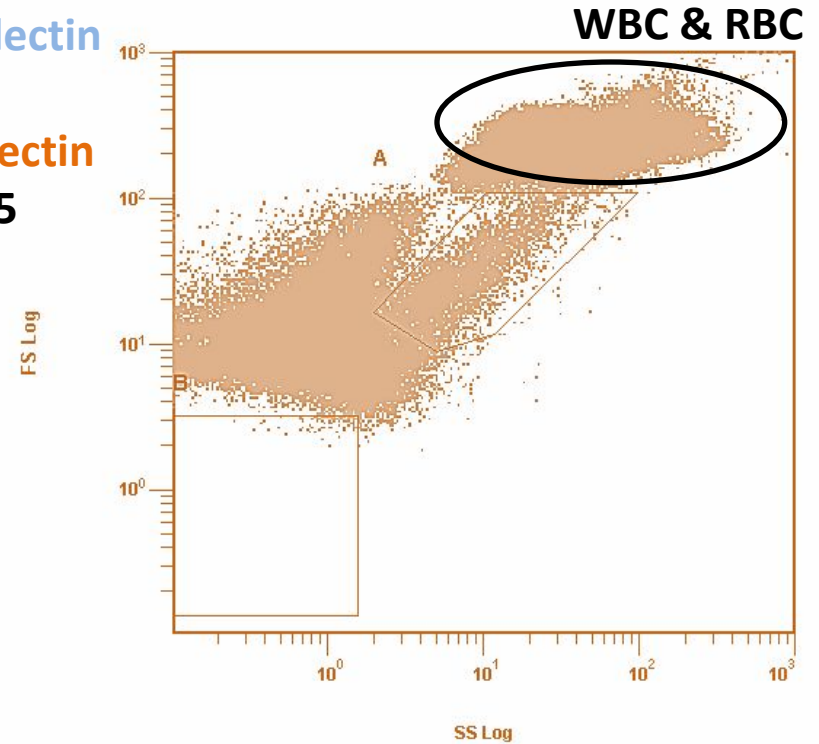


MFI&P-selectin

vs.

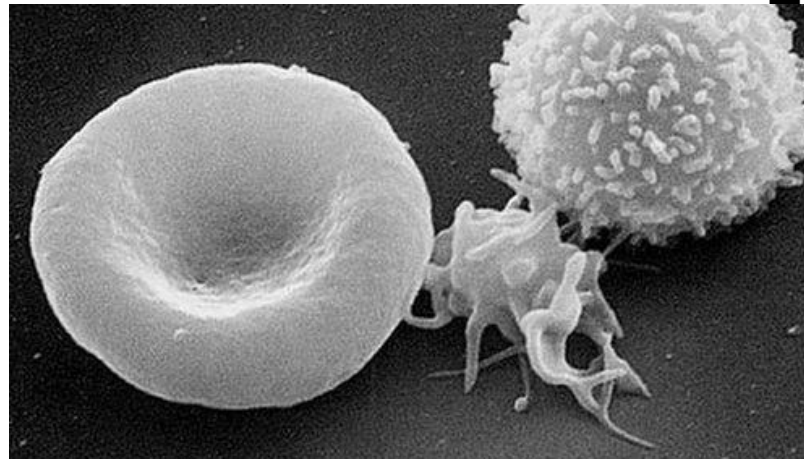
MFI&Pselectin

$P > 0,05$



Плазма Богатая Тр

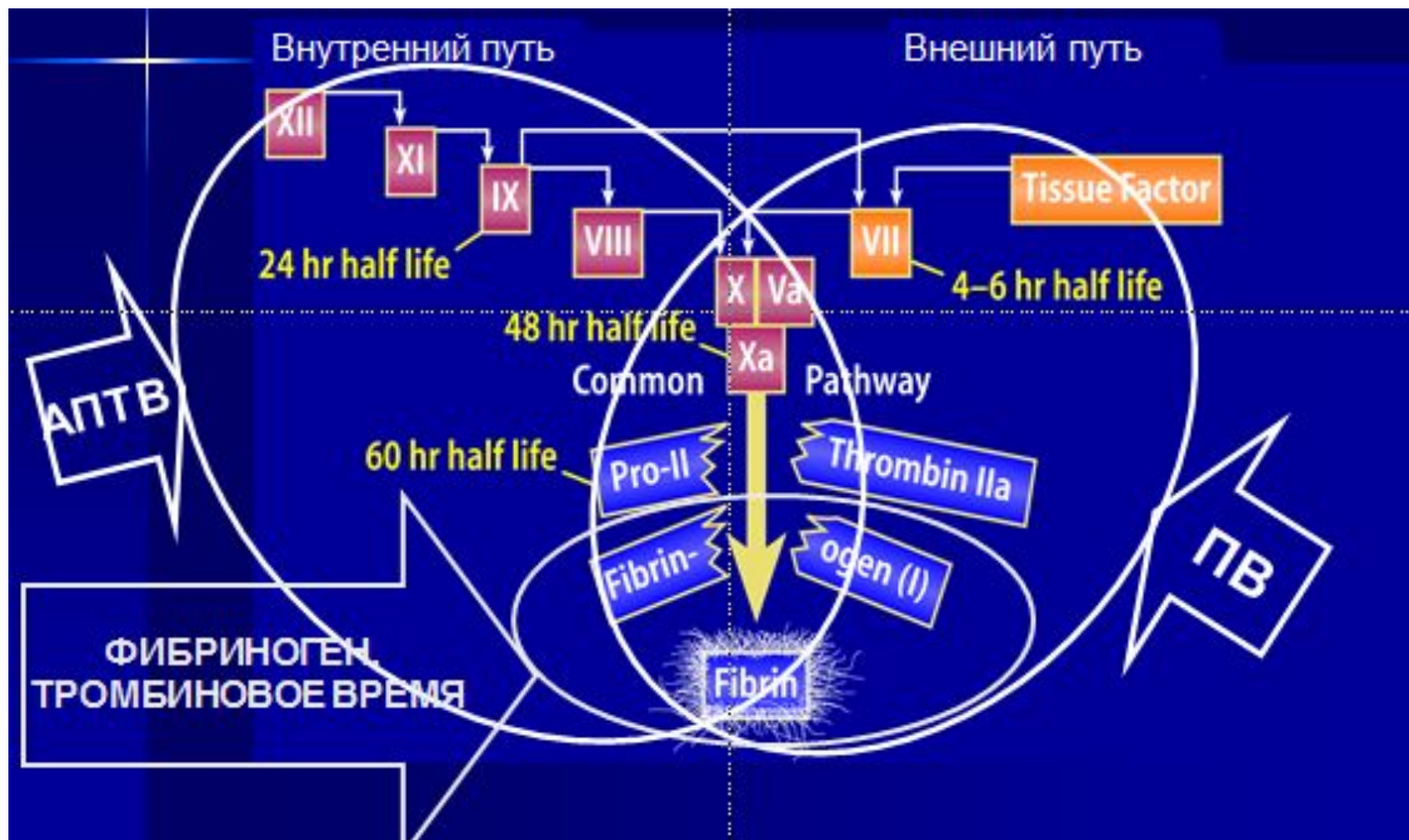
Цельная венозная кровь



Компоненты плазменного гемостаза

- **Свертывающее звено**
- **Противосвертывающее звено
(эндогенные антикоагулянты)**
- **Фибринолитическое звено**

Плазменный гемостаз



Наиболее распространенные в лаборатории тесты патологии коагуляционного звена гемостаза

- Общая коагуляционная активность: время свертывания по Ли-Уайту
- Тест, характеризующий в основном **внутренний путь** образования протромбиназы - Активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время (**АПТВ / АЧТВ**)
- Тест, характеризующий **внешний путь** образования протромбиназы – протромбиновое время (ПВ) и протромбиновый индекс (**ПТИ**)
- Тесты, характеризующие **конечный этап свертывания**, II и III фазу: тромбиновое время (ТВ) и концентрация фибриногена в плазме (**Ф**)
- Тесты, характеризующие непосредственно активность факторов свертывания – **VIII, IX, XIII** и т.д.

Протромбиновое время (ПВ)

- Это тест на полноценность внешнего механизма коагуляции.
- Контроль терапии непрямыми антикоагулянтами (варфарин)
- Тест определяет дефицит факторов II, V, VII, X или фибриногена.
- 9,2-12,2 с

Протромбиновое время (ПВ)

- период, в течение которого в плазме полностью формируется кровяной сгусток под воздействием тромбина.

Показатели на основе ПВ

- Протромбиновый индекс (ПТИ) - показывает отношение протромбинового времени донора к показателю плазмы пациента. Он выражается в процентном соотношении и должен составлять 95-100%.
- Международное нормализованное отношение (МНО)

Контроль антикоагулянтной терапии в соответствии с международными критериями

Международное
Нормализованное
Отношение

$$\text{МНО} = \left(\frac{\text{ПВ}_{\text{пациента}}}{\text{ПВ}_{\text{норм. плазмы}}} \right)^{\text{МИЧ}}$$

МИЧ = Международный Индекс
Чувствительности

МНО — 0,85-1,2

МИЧ – значение ПО,
Которое было
бы получено
для данного образца
плазмы
при использовании
тромбопластина
Международного стандарта
ВОЗ, индекс чувств. кот. 1,0
МИЧ=0,94-2,8 для разных
тромбопластинов

ПО/ПТИ
(80-110%)
ПВ пац/ПВ
станд
ПВ (12-20с)

Целевое значение МНО при терапии варфарином



Определение МНО:

1. Венозная кровь
2. Период подбора дозы – через 36 часов и далее 2 раза в неделю
3. Поддерживающая доза – не реже 1 раза в месяц

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

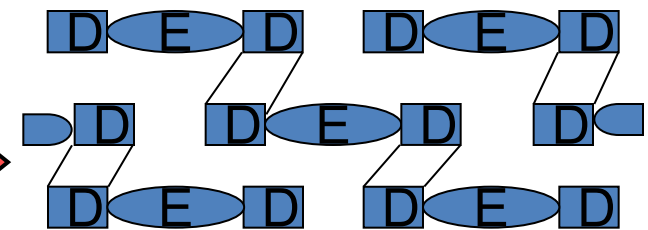
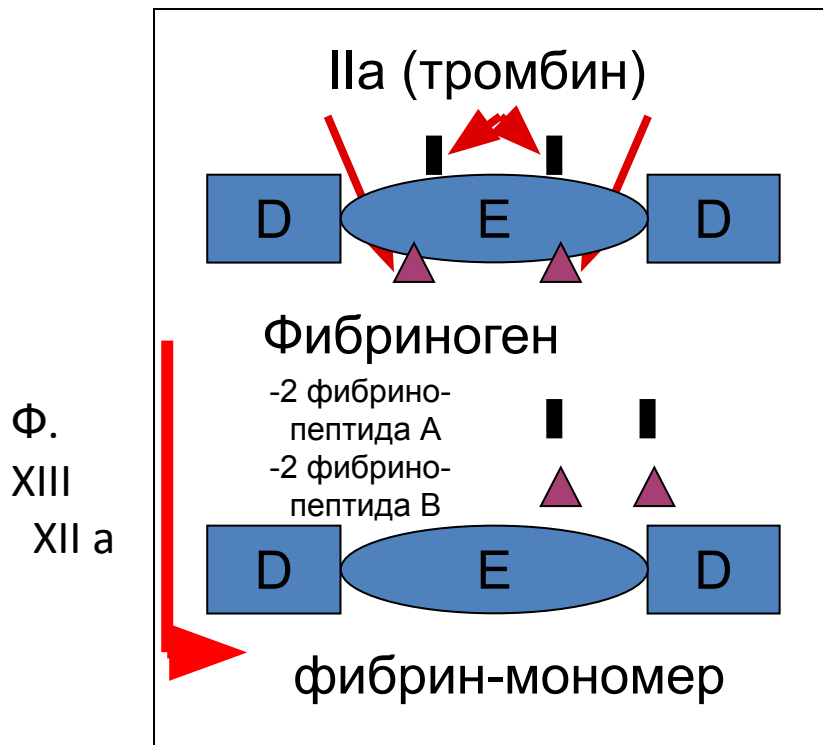
- Один из самых распространенных и информативных тестов оценки внутреннего пути гемостаза
- Мониторинг прямыми антикоагулянтами (гепарин)
- Отражает изменение активности факторов VIII, IX, XI, XII, прекалликреина и высокомолекулярного кининогена

Тромбиновое время (ТВ)

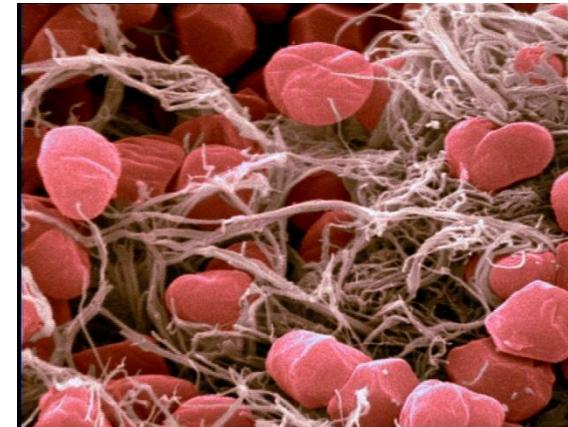
- тест отражает величину периода, в течение которого происходит продуцирование фибрина из фибриногена.
- Определение тромбинового (тромбированного) базируется на скорости, с которой происходит образование тромба в цитратной плазме под воздействием ионов кальция.
- Возможно контролировать лечение препаратами ингибиторов ф. II А (дабигатран)

Формирование фибрина

фибриноген - белок, который вырабатывается печенью и содержится в плазме



Перекрестно-сшитый фибрин



Скрининговые коагуляционные тесты гемостаза (оценка свертывания крови)

- **Время кровотечения**
- **Количество тромбоцитов**
- **ПВ**
- **АПТВ**
- **Концентрация фибриногена**

Антикоагулянтная система крови

Естественные антикоагулянты

Первичные

АТ III

Гепарин

Протеин С

Протеин S

Тромбомодулин

Вторичные

АТ I

АТ IV

АТ VI

(нарушают
полимеризацию фибрина
ингибируют агрегацию Tr)

Оценка противосвертывающей системы гемостаза

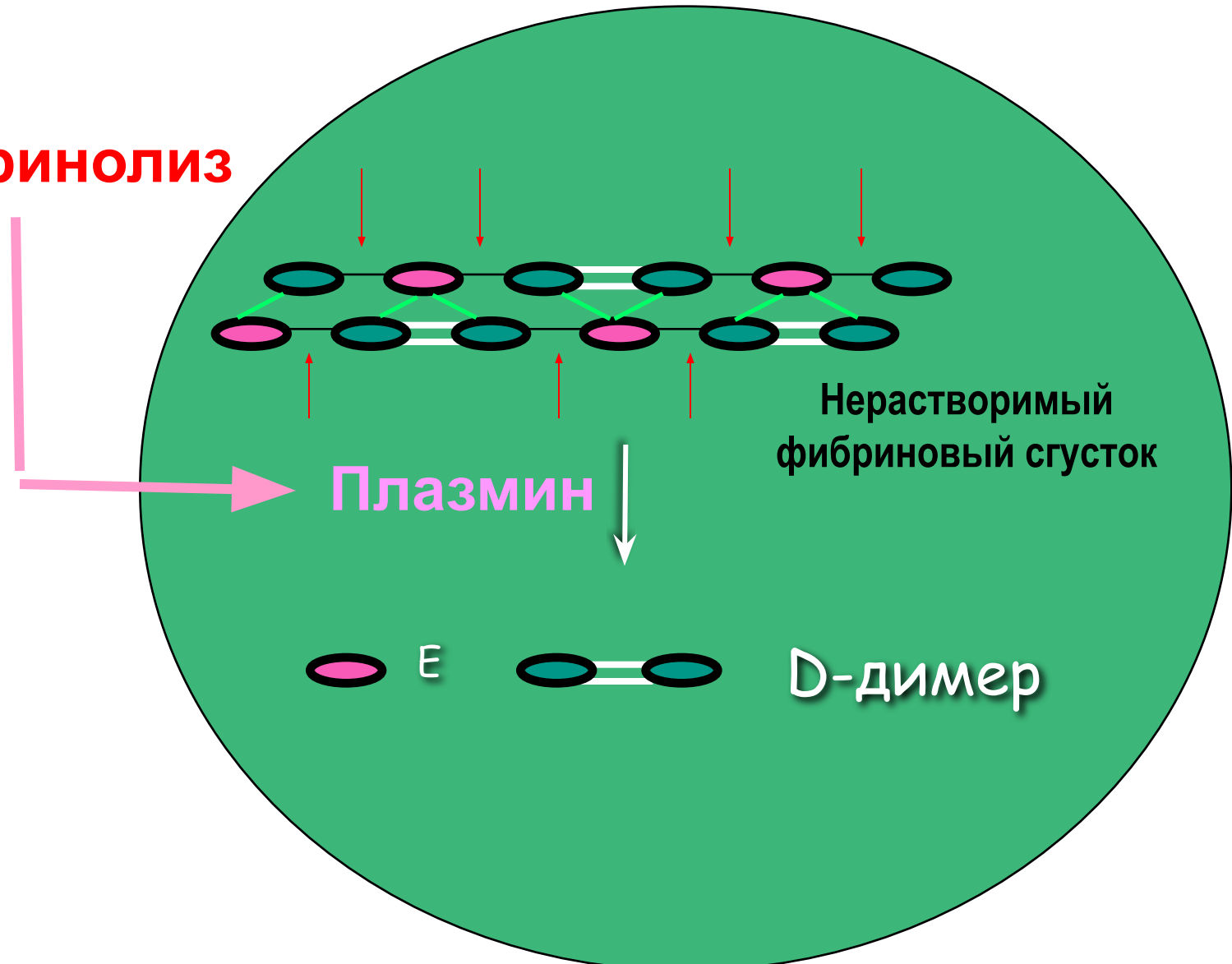
Ингибиторы факторов свертывания – естественные антикоагулянты

- **Антитромбин III**
 - ингибитор тромбина, фХа, фIХа
- **Протеин С (РС)**
 - вит.К-зависим, инактивирует тромбин, фVa, фVIIIa, косвенно активирует фибринолиз
- **Протеин S (PS)**
 - вит.К-зависим, кофактор РС
- **Ингибитор внешнего пути свертывания (TFPI)**
 - Первичная регуляция коагуляции за счет нейтрализации ф.Х тканевым фактором, ингибирование VIIa
- **Кофактор гепарина II**
- **и др.**

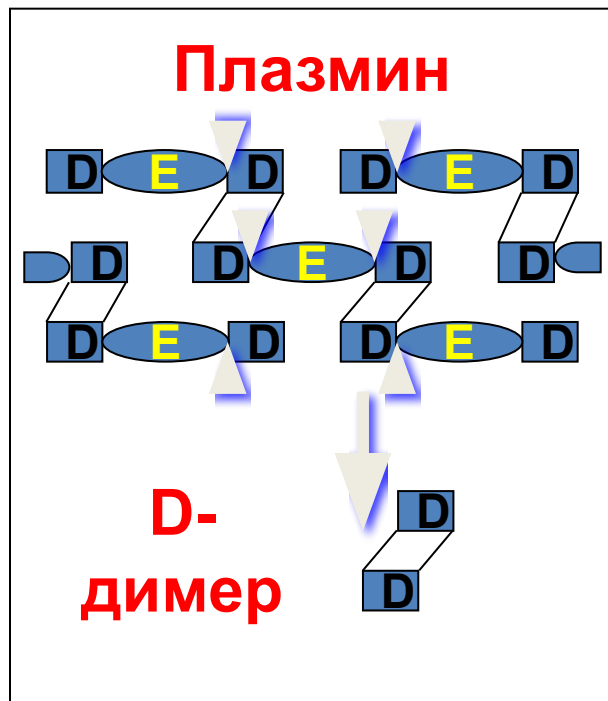
Основные участники фибринолиза

- Ключевой фермент – **плазминоген**
- Расщепление молекулы плазминогена тканевым активатором плазминогена или урокиназой ведет к образованию **плазмина**
- Плазмин – осуществляет протеолиз кровяного сгустка, в результате чего образуются фрагменты
- одним из фрагментов которого является **D-димер**
- **Плазмин** и фибриноген до его продуктов деградации

Фибринолиз



Диагностическое и прогностическое значение определения D-димеров



- Фибринолиз активируется при повышенном тромбообразовании

Ингибиторы фибринолиза

- Ингибитор активатора плазминогена первого типа (PAI-2)
- Активируемая тромбином карбоксипептидиза (TAFI)
- α 2-антиплазмин
- α 2-макроглобулин
- Антитрипсин
- Антитромбин III
- C1-ингибитор

Скрининговая коагулограмма

- Количество тромбоцитов
- Длительность кровотечения
- АЧТВ
- ПВ
- Фибриноген
- D-димер

Лабораторная диагностика при кровоточивости

Скрининговые тесты при кровоточивости

- количество тромбоцитов,
- мазок периферической крови,
- время кровотечения,
- АПТВ,
- протромбиновое время (МНО),
- фибриноген,
- D-димер

Дополнительные тесты при кровоточивости

- фактор Виллебранда – активность, антиген,
- функциональная индуцированная активность тромбоцитов,
- тромбиновое время,
- активность факторов (VIII, IX)

Лабораторная диагностика при повышенном тромбообразовании

Скрининговые тесты при повышенном тромбообразовании

- количество тромбоцитов,
- АПТВ,
- протромбиновое время (индекс, МНО),
- фибриноген,
- D-димер,
- скрининговый тест на волчаночный антикоагулянт

Дополнительные тесты при повышенном тромбообразовании

- морфофункциональная оценка активации тромбоцитов,
- антитромбин III, протеин С,
- волчаночный антикоагулянт и аФЛ антитела,
- гомоцистеин,
- молекулярно-генетическое исследование

Благодарю!

All you need is coagulation :)

#PoctLQD Coagulation is like love. Everyone talks about it, but no one really understands it...

