

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ ТРОМБОЗОВ И ГЕМОРРАГИЙ
И ПАТОЛОГИИ СОСУДОВ ИМЕНИ А.А.ШМИДТА-Б.А.КУДРЯШОВА.

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ
СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
Второе издание

Москва-2011

Лабораторные методы исследования системы свертывания крови: Методические рекомендации АТГПСС им. А.Шмидта-Б.А.Кудряшова. Второе издание.2011 год.

Авторы:

Сотрудники Первого Московского медицинского университета им. И.М. Сеченова:

И.Н. Бокарев - доктор медицинских наук, профессор,

А.М. Доронина - кандидат медицинских наук,

Т.В. Козлова - доктор медицинский наук, доцент

Т.Б. Кондратьева - кандидат медицинский наук,

Л.В. Попова - кандидат медицинских наук, доцент

Сотрудник Московского государственного медико-стоматологического университета

Г.В. Аркадьева - доктор медицинских наук, профессор

Сотрудник Ярославской медицинской академии

А.В. Аршинов - доктор медицинских наук, профессор

Сотрудник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им.И.И. Мечникова

Т.В. Вавилова - доктор медицинских наук, профессор

Сотрудник кардиологического научно-производственного комплекса Росздрава

А.Б. Добровольский- доктор биологических, профессор наук.

Сотрудник Московского областного научно-исследовательского института акушерства и гинекологии

А.П. Мельников - кандидат медицинских наук.

Сотрудник Алтайского государственного медицинского университета

А.П. Момот - доктор медицинских наук, профессор.

Под редакцией

Президента Всероссийской ассоциации Тромбозов, геморрагий и патологии сосудов

им. А.А.Шмидта - Б.А.Кудряшова

Лауреата Государственной премии России,

Заслуженного деятеля науки РФ

Профессора И. Н. Бокарева.

Введение.

Изучение механизмов свертывания крови и их регуляции невозможно без использования лабораторных исследований. На сегодняшний день известны практически все факторы, принимающие участие в свертывании крови. Открыты их первичная, вторичная и третичная структуры. Обнаружены и расшифрованы гены, ответственные за формирование этих факторов.

В то же время в повседневной практике изучение процесса гемокоагуляции в организме человека осуществляется с помощью лабораторных методов, которые далеко не всегда совершенны.

Авторы данных рекомендаций поставили перед собой цель – информировать врачей о современных подходах к лабораторной диагностике нарушений в системе гемокоагуляции, определении причин кровоточивости и тромбозов, о возможностях оценки степени интенсивности внутрисосудистого микросвертывания крови, а так же о тех лабораторных показателях, которые необходимо определять при контроле за эффективностью применяемой противотромботической терапии. В основу рекомендаций положены представления всемирных организаций, объединяющих ведущих ученых мира, занимающихся изучением гемокоагуляции.

Современные представления о механизмах свертывания крови.

Процесс внутрисосудистого свертывания крови, или гемокоагуляции, происходит постоянно в течение всей жизни человека. В то же время его интенсивность бывает различной. Нарушения интенсивности внутрисосудистого свертывания крови приводят к развитию таких патологических проявлений как геморрагии, тромбозы и ДВС-синдром, который иногда называют тромбо-геморрагическим синдромом.

Гемокоагуляция внутри сосуда осуществляется при взаимодействии системы прокоагулянтов, формирующих фибрин, тромбоцитов, часто начинающих процессы свертывания крови, и системы фибринолиза, которая регулирует величину формирующегося кровяного сгустка. Активированные тромбоциты и мембраны поврежденных клеток участвуют в формировании специфических комплексов, состоящих главным образом из белков – прокоагулянтов, которые и обеспечивают сам феномен свертывания крови.

Современные представления о механизме функционирования тромбоцитарного компонента гемокоагуляции могут быть представлены следующим образом. Нормальные тромбоциты имеют дисковидную форму и в циркулирующей крови перемещаются изолированно друг от друга, не вступая во взаимодействие с эндотелием сосудов. При повреждении сосудистой стенки тромбоциты с помощью фактора Виллебранда прилипают к субэндотелиальным структурам – коллагеновым волокнам, миофибриллам, миоцитами. При этом они приобретают сферическую форму. Эта стадия обозначается термином «адгезия тромбоцитов». Через 30-60 секунд адгезированные тромбоциты выделяют в окружающую среду АДФ, серотонин, адреналин, фибриноген, фактор 4 тромбоцитов и ряд других биологически активных веществ. Происходит стимулирование агрегации тромбоцитов, под которой подразумевается их слипание друг с другом. При этом освобождение биологически активных веществ из тромбоцитов усиливается. Этот феномен обозначается как «реакция освобождения». В результате происходит быстрое образование рыхлой тромбоцитарной пробки, которая обеспечивает первичный гемостаз, но является нестойкой и может быть разрушена. В связи с этим данную фазу принято назвать обратимой агрегацией тромбоцитов. Благодаря лавинообразному нарастанию концентрации агрегатов обратимая фаза агрегации тромбоцитов переходит в необратимую. В этом существенную роль играет тромбин, образующийся в результате активации плазменных факторов свертывания крови. Сами тромбоциты способствуют активации фактора XII, образованию ак-

тивного фактора X и появлению тканевого фактора. При разрушении мембран тромбоцитов создаются условия для объединения тромбоцитарных агрегатов и уплотнения полученного сгустка. Этот феномен получил название ретракции кровяного сгустка.

Одновременно с тромбоцитами в процессе гемокоагуляции участвуют прокоагулянты – группа белков и ионы кальция, которые в процессе своего взаимодействия приводят к образованию фибрина. Именно фибрин является основой как гемостатического, так и тромботического феноменов. Прокоагулянты обозначаются римскими цифрами:

- I -Фибриноген,
- II – Протромбин,
- III – Тканевой фактор,
- IV – Ионы кальция,
- V-VI – Проакцелерин-Акцелерин,
- VII – Проконвертин,
- VIII – Антигемофильный глобулин,
- IX – Кристмас-фактор,
- X – Стюарт фактор,
- XI – плазменный предшественник тромбопластина,
- XII – фактор Хагемана,
- XIII – фибрин-стабилизирующий фактор.

Общепринятым в настоящее время является использование цифрового обозначения факторов, кроме тканевого фактора и ионов кальция, иногда фибриногена и протромбина.

Кроме указанных факторов в процессе фибринообразования принимают участие прекалликреин, обозначаемый так же как фактор Флетчера, и кининоген высокого молекулярного веса, называемый фактором Фитцджеральда.

Предполагается, что процесс формирования фибрина заключается в последовательном взаимодействии всех факторов друг с другом. При этом некоторые из них - про-энзимы превращаются в активные ферменты, а некоторые служат лишь для обеспечения взаимодействия энзима и субстрата.

Долгое время главенствовала теория наличия двух путей активации плазменного гемостаза и фибринообразования.

Внутренний путь образования фибрина предполагал первоначальную активацию фактора XII, который при участии прекалликреина и кининогена высокого молекулярного веса активирует фактор XI, далее активируются факторы IX и VIII и включают в процесс активный фактор X. Внешний путь начинался с формирования комплекса фактора VIIa и тканевого фактора, который активировал фактор X. Далее следовало формирование протромбиназы (фактор Xa + фактор Va), переход протромбина в тромбин и образование фибринового сгустка.

Дальнейшие исследования показали, что ведущая роль в инициации свертывания крови принадлежит тканевому фактору и внешнему пути формирования фибрина.

Детально собственно процесс фибринообразования может быть представлен следующим образом: первоначально происходит образование активаторов фактора XI и фактора VII. Это осуществляется через цепь взаимодействий фактора Хагемана (XII), прекалликреина и кининогена высокого молекулярного веса. На следующем этапе происходит активация факторов XI и VII. Новым в современной гипотезе фибринообразования представляется факт объединения внутреннего и внешнего путей активации фактора X, что обосновывается способностью калликреина одновременно влиять на формирование активного фактора VII.

Активация фактора IX фактором XIa приводит к возможности образования комплекса: Ca⁺⁺, фосфолипиды, фактор IXa, фактор VIII. Комплекс с фосфолипидом и ионами кальция образует также фактор VIIa. Эти комплексы активируют фактор X, который является ключевым в формировании тромбина. Комплекс фактора Xa с фосфолипидами, кальцием и фактором V воздействует на протромбин и приводит к образованию

тромбина. Сам тромбин воздействует уже на молекулу фибриногена, что приводит к образованию фибриновой сети. При этом первоначально от молекулы фибриногена отщепляются низкомолекулярные пептиды – фибринопептид А, отщепляемый от альфа-цепи фибриногена, и фибринопептид В, отщепляемый от бета-цепи. Образующиеся мономеры фибрина соединяются друг с другом и формируют фибриновую сеть (процесс полимеризации). После действия фактора XIIIа, она укрепляется, стабилизируется и приобретает законченный вид.

Генерация тромбина является ключевой реакцией гемокоагуляции. Она осуществляется в два этапа. На первом этапе, в фазе инициации, происходит образование небольшого количества тромбина, который катализирует активацию факторов свертывания. На втором этапе, в фазе распространения, происходит так называемый «тромбиновый взрыв», который приводит к формированию большого количества фибрина, определяющего размеры тромба.

Интенсивность внутрисосудистого свертывания крови контролируется противосвертывающими белками, к которым относится антитромбин, кофактор гепарина II, α_2 – макроглобулин, ингибиторы α_1 -протеазы и C1-комплемента, а так же протеин С (Си), протеин S, тромбомодулин и ингибитор пути тканевого фактора (TFPI). При этом протеин С (Си), активированный комплексом тромбин-тромбомодулин, вместе с протеином S ингибируют активированные кофакторы (Va и VIIIа), а все остальные подавляют действие самих активированных факторов. Ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) ограничивает активность фактора Xа и комплекса тканевого фактора с фактором VIIа.

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

В процессе активации свертывания и формирования фибринового сгустка в крови появляются молекулы, свидетельствующие о том, что этот процесс происходит. Они обозначаются как маркеры постоянно происходящего внутри сосудистого русла процесса микросвертывания крови, который может иметь различную степень интенсивности.

Одним из таких важнейших маркеров этого процесса является D-димер. Он дает информацию о формировании в кровяном русле фибрина, укрепленного действием фибринстабилизирующего фактора (фактор XIII). Этот фибрин уже подвергся действию плазмина и расщепился с формированием D-димеров.

Уровень D-димера в плазме крови позволяет судить об интенсивности внутрисосудистой гемокоагуляции.

Существенное значение для качества лабораторных исследований имеет преаналитический этап, который включает в себя выбор и назначение теста, подготовку больного, получение, хранение и транспортировку биологического материала, непосредственную подготовку материала для выполнения исследования.

Материалом для коагулологических исследований является плазма, содержащая все компоненты системы свертывания. Строгое соблюдение правил преаналитического этапа очень важно для достоверности исследований гемостаза. Особое значение имеет процесс получения крови и первичная ее обработка. Это связано с тем, что травма сосудистой стенки и контакт крови с воздухом и поверхностью пробирки запускает цепь биохимических реакций коагуляционного каскада и активирует тромбоциты. Поэтому необходимо обеспечить максимально щадящее проведение процедуры пункции вены и быстрое смешивание пробы крови с антикоагулянтом.

По возможности осуществляется пункция вены без жгута или он может быть наложен не более, чем на одну минуту. Кровь берется в специальные пробирки, содержащие раствор цитрата натрия, с использованием вакуумной техники. Соотношение кровь: 3,8% цитрат = 9:1 при гематокрите от 0.35 до 0.55. Выраженная анемия или сгущение крови требует изменения соотношения кровь-цитрат. Соответствующие сведения должны быть сообщены в лабораторию и для исследования должна быть получена индивидуальная

пробирка с цитратом натрия.

В том случае, если выполняется открытый забор крови (не в вакутейнеры), должны использоваться пробирки из пластика, а кровь поступать из иглы прямо в пробирку с цитратом самотеком без использования шприца.

Наполнение пробирки должно точно соответствовать отмеченному уровню. После получения пробы кровь аккуратно, но тщательно перемешивается с антикоагулянтом 5-7 - кратным переворачиванием. Пробы, в которых при осмотре в лаборатории обнаруживаются сгустки или гемолиз, не принимаются в работу.

При оформлении направления следует обязательно отметить рабочий диагноз, причины исследования системы гемостаза и сведения о приеме препаратов, влияющих на свертывание крови. Это необходимо для составления правильного заключения по исследованию.

Доставка в лабораторию должна осуществляться быстро, так как для правильности выполнения коагулологических исследований существенное значение имеет интервал времени от получения материала до начала исследования – не более 2 часов. В большинстве ситуаций это обеспечить довольно сложно, поэтому при условии быстрого отделения плазмы от клеточных элементов допускается исследование коагуляционных показателей в течение 4 час. Температура хранения образцов – 18°-25°С, если не указано других условий. Редко выполняемые тесты коагуляционного гемостаза допустимо проводить после накопления замороженных образцов. Хранение плазмы при -20° С возможно до 4 недель; лучшие результаты получаются при (-40) – (-70)° С. Большинство бытовых холодильников не способно удерживать температуру -20°С, поэтому хранить образцы плазмы в морозильных камерах бытовых холодильников не рекомендуется. Перед исследованием плазму необходимо быстро разморозить в водяной бане при 37 °С и хорошо перемешать.

Диагностика причин кровоточивости, определение интенсивности внутрисосудистого микросвертывания крови и синдрома диссеминированного свертывания крови (ДВС-синдрома), а так же контроль за проведением противотромботической и гемостатической терапии не возможны без специальных лабораторных исследований.

На основе принципа метода могут быть выделены следующие группы тестов:

1. *Клоттинговые*, или хронометрические тесты, которые позволяют определить биологическую активность исследуемых факторов гемокоагуляции. Единицей измерения, применяемой в данных методах, является время формирования фибринового сгустка.
2. *Амидолитические методы* с использованием хромогенных субстратов, в ходе которых анализируется время гидролиза пептидного субстрата.
3. Методы, которые позволяют определить концентрацию исследуемого фактора с помощью применения моноклональных антител – *иммунологические* методы.

Отдельно необходимо отметить *генетические* методы, которые позволяют выявить наличие мутаций генов, определяющих формирование отдельных факторов свертывания крови и других участников фибринолиза и гемокоагуляционного процесса.

В любом случае лабораторный тест должен иметь установленную диагностическую значимость. Необходимо учитывать его чувствительность и специфичность, а так же способ калибровки и стандартизации. Кроме того, должна быть предусмотрена процедура контроля качества исследований с оценкой правильности и воспроизводимости полученных результатов.

При интерпретации результатов лабораторных исследований для диагностики нарушений системы гемокоагуляции необходимо основываться на современных представлениях о механизмах свертывания крови и индивидуальных сведениях о пациенте.

В настоящее время количество лабораторных тестов, с помощью которых изучаются различные звенья свертывания крови, превышает несколько сотен. Однако для практи-

ческого врача, который пытается ответить на вопросы о возможности геморрагических осложнений при проведении оперативных вмешательств, о причине уже возникшей кровоточивости или же об интенсивности внутрисосудистого свертывания крови и наличии синдрома ДВС, а так же об эффективности противотромботической терапии, количество лабораторных тестов ограничивается значительно меньшим числом.

В связи с этим мы подразделили все лабораторные тесты, с помощью которых исследуется состояние гемокоагуляции, на несколько групп в зависимости от тех вопросов, которые ставит перед собой врач.

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

1. Количество тромбоцитов
2. Время кровотечения
3. Протромбиновое время
4. Активированное частичное тромбопластиновое время
5. Определение уровня фибриногена.
6. D-димер

. Исследование времени кровотечения не является обязательным во всех случаях. Оно может быть использовано при подготовке к оперативным вмешательствам на ЛОР-органах, особенно у детей, при геморрагических проявлениях и подозрении на недостаточность гемостатической функции системы гемокоагуляции. Выполнение теста перед всеми вмешательствами а так же у больных с тромботическими осложнениями нецелесообразно.

В любом случае обязателен тщательный сбор личного и семейного геморрагического или тромботического анамнеза.

Скрининговые тесты могут быть выполнены в лабораториях первичного звена. При необходимости эти исследования могут быть централизованы, но время доставки материала в центральную лабораторию не должно быть слишком длинным, а исследования должны быть начаты в течение 4 часов с момента забора крови (см. особенности преаналитического этапа).

Вторая группа исследований представлена наборами **дополнительных тестов** для разных клинических проявлений нарушений системы гемокоагуляции и фибринолиза.

1. Кровоточивость.

Для расшифровки причины повышенной кровоточивости, наличие которой выявляется самим пациентом и заставляет его обратиться к врачу, или же вопрос о наличии которой возникает у самого врача в ходе сбора анамнеза или выявляется при осмотре, необходимо определить состоятельность тромбоцитарной функции и активность факторов свертывания крови:

1. Время кровотечения
2. Подсчет количества тромбоцитов,
3. Адгезия тромбоцитов,
4. Агрегация тромбоцитов (в т.ч. с ристомицином, АДФ, коллагеном и адреналином),
5. Определение антигена и активности фактора Виллебранда,
6. Протромбиновое время
7. Активированное частичное тромбопластиновое время,

8. Определение уровня фибриногена,
9. Определение активности факторов VIII или IX и других факторов свертывания крови
10. Определение ингибиторов факторов свертывания крови
11. Время лизиса эуглобулинового сгустка.
12. Проведение проб с дефицитными плазмами

2. Венозные или артериальные тромбозы

Для выяснения причин возникновения венозных или артериальных тромбозов следует обследовать больного на предмет наличия наследственной и приобретенной тромбофилии:

1. Количество тромбоцитов;
2. Определение активности антитромбина, протеина С (Си), протеина S; а так же отношения уровня протеина С к уровню факторов протромбинового комплекса (обычно используется фактор VII) в случае нахождения пациента на терапии анти-витаминами К
3. Определение резистентности к активированному протеину С (Си);
4. Генетическое тестирование на наличие мутации гена фактора V (мутация Лейден) и мутации гена протромбина G20210A;
5. Определение маркеров активации свертывания и повреждения эндотелия – D-димера, активности фактора VIII и антигена фактора Виллебранда;
6. Определение уровня гомоцистеина в динамике
7. Определение волчаночного антикоагулянта не менее 2х раз с интервалом не менее 12 недель
8. Выявление антител к первому домену $\beta 2$ гликопротеин 1.
9. Определение уровня Д-димера

3. Внутрисосудистое свертывание крови

Для выяснения степени интенсивности внутрисосудистого микросвертывания крови и своевременного распознавания наиболее высокой степени этого процесса, т.е. диагностики ДВС-синдрома, целесообразно провести следующие лабораторные исследования:

1. Подсчет количества тромбоцитов;
2. определением уровня фибриногена.

Данные показатели оцениваются в динамике, при их параллельном снижении и соответствии клинической картины можно говорить о развитии ДВС.

Определение *времени лизиса эуглобулинового сгустка* необходимо для оптимизации лечения данного синдрома.

4. Антикоагулянтная терапия

При проведении антикоагулянтной терапии необходимо иметь возможность выполнения следующих лабораторных тестов:

1. Международное нормализованное отношение – МНО (при проведении лечения оральными антикоагулянтами-антивитаминами К);
2. Активированное частичное тромбопластиновое время (при проведении лечения нефракционированными гепаринами);
3. Определение анти-Ха активности плазмы (при лечении гепаринами низкой молекулярной массы детей, беременных и при наличии почечной недостаточности);
4. Количество тромбоцитов в крови (для своевременного выявления гепарин-индуцированной тромбоцитопении);
5. Определение антител к комплексу гепарин- фактор 4 тромбоцитов (при подозрении на развитие гепарининдуцированной трромбоцитопении).

Краткая информация о клиническом значении и лабораторных особенностях определения оценочных тестов – времени кровотечения, АЧТВ и протромбинового теста.

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время.

Принцип метода АЧТВ состоит в определении времени свертывания декальцинированной плазмы после добавления к ней каолин-кефалин-кальциевой смеси. Эта смесь осуществляет активацию факторов XII, V и VIII гемокоагуляции. Таким образом, АЧТВ оценивает способность формировать фибрин посредством последовательного взаимодействия всех факторов XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I.

Исследование проводится с помощью коагулометра. Ручные методы определения не стандартизованы и являются менее точными.

Удлинение АЧТВ может иметь место при следующих обстоятельствах:

1. При врожденном или приобретенном дефекте или недостатке факторов XII, XI, VIII, IX, V, X, II, а так же фибриногена;
2. При наличии антител к перечисленным факторам свертывания;
3. При болезни Виллебранда (тяжелая форма);
4. При наличии ингибиторов к фосфолипид-зависимым реакциям, в том числе и антикоагулянта волчаночного типа,
5. При наличии гепарина в пробе крови, при передозировке кумариновых препаратов;
6. При дисфибриногенемии, или наличии ингибиторов полимеризации фибрина.

АЧТВ применяется для скрининговой оценки состояния системы гемокоагуляции, в том числе и перед операциями, он обязателен для контроля за лечением нефракционированным гепарином. АЧТВ является базовым исследованием для выявления наличия ингибиторов гемокоагуляции, в том числе волчаночного антикоагулянта, а также для оценки активности факторов VIII, IX, XI и XII.

При выполнении теста АЧТВ к используемым реагентам должны предъявляться определенные требования: они должны быть стабильны от одного образца к другому, чувствительны к дефициту факторов, реагировать на наличие гепарина, а так же быть чувствительными к наличию волчаночного антикоагулянта.

Кроме универсальных реактивов могут использоваться реактивы, которые специально адаптированы для конкретных задач, в том числе для контроля за лечением нефракционированными гепаринами и для выявления волчаночных антикоагулянтов.

Протромбиновое время (ПВ)

В основе измерения протромбинового времени лежит определение времени формирования фибринового сгустка в исследуемой плазме после добавления к ней тромбопластин-кальциевой смеси. Эта смесь активирует фактор VII и обеспечивает функционирование внешнего каскада формирования фибрина.

Так же, как и АЧТВ, исследование проводится с помощью коагулометра. Ручные методы определения не стандартизованы и являются менее точными.

Удлинение протромбинового времени имеет место при:

1. Врожденном или приобретенном дефиците факторов VII, X, V, II и фибриногена;
2. При дефиците витамина K;
3. При заболеваниях печени;
4. При терапии антикоагулянтами непрямого действия;
5. При наличии ингибиторов к указанным факторам свертывания крови и фосфолипид-зависимым реакциям.

Протромбиновый тест применяется для оценки состояния системы гемокоагуляции, в том числе и перед операциями, для оценки состояния печени, контроля за терапией антикоа-

гулянтами непрямого действия (МНО) и определения активности фактора VII (в % от нормы)

Измеряемый в тесте показатель – протромбиновое время может выражаться в секундах или в процентах протромбина по Квику (Quick), что отражает активность всего задействованного комплекса факторов свертывания.

Для контроля за лечением оральными антикоагулянтами – антивитаминами К необходимо производить определение показателя Международного Нормализованного Отношения (МНО). Для этого требуется знать международный индекс чувствительности (МИЧ) того образца тромбопластина, с помощью которого выполняется исследование. Рекомендуется использовать тромбопластины с величиной МИЧ менее 1,5. Представление результатов исследования гемокоагуляции в виде протромбинового времени больного, сопоставляемого с его значением для нормальной плазмы, или в виде % протромбина по Квику, не позволяет стандартизовать исследование при использовании различных реагентов, и, тем самым, получить сопоставимые результаты в разных лабораториях. В связи с этим данные показатели не рекомендуется применять для контроля за терапией оральными антикоагулянтами – антивитаминами К.

Определение протромбинового времени в капиллярной крови возможно при использовании комбинированных реактивов, в состав которых входят тромбопластин, фибриноген и фактор V, а так же при использовании специальных картриджей и портативных приборов. Калибровка метода определения МНО в капиллярной крови слишком трудоемкая для обычной клинико-диагностической лаборатории. В связи с этим крайне желательно, чтобы реактивы были откалиброваны их производителем.

Время кровотечения.

Время кровотечения следует определять по методу, предложенному Дюком (Duke). При этом требуется осуществить прокол кожи в мочке уха, так как именно здесь толщина кожи в подавляющем большинстве случаев одинакова. Исключения составляют лица, имевшие рубцевания мочек ушей вследствие нагноений после процедур по формированию отверстий для ношения сережек. Одновременно с проколом кожи включается секундомер, а капелька крови снимается фильтровальной бумажкой сразу же после ее появления. Как только капля крови не появляется, секундомер выключается и фиксируется продолжительность имевшего место кровотечения.

Метод Айви (Ivy) более стандартизирован и широко применяется за рубежом. Он заключается в нанесении царапины на переднюю поверхность предплечья. Остальная процедура такая же.

Удлинение времени кровотечения говорит о дефекте тромбоцитарного звена гемокоагуляции. Это может быть в результате уменьшения количества тромбоцитов или при дефекте их качественных характеристик – способности к адгезии, агрегации, реакции высвобождения или ретракции кровяного сгустка.

При удлинении времени кровотечения необходимо определить количество тромбоцитов в крови. При отсутствии тромбоцитопении следует констатировать тромбоцитопатию и производить специальные исследования функциональной активности тромбоцитов

Определение фибриногена.

Для определения фибриногена в клинической практике применяется несколько методов: весовой «суховоздушный» метод (в модификации Р.А. Рутберг), турбидиметрический метод, кинетический метод с использованием рептилазы, или иммунологические методы. Весовой метод в модификации Р.А. Рутберг современным требованиям не удовлетворяет и использоваться не должен.

Наиболее распространенным является метод определения фибриногена по Клауссу (Clauss). Сущность метода заключается во взаимодействии фибриногена разведенной плазмы обследуемого с тромбином, добавленным в повышенной концентрации (для исключения действия антитромбинов). В этих условиях время реакции образования сгустка зависит только от количества фибриногена. Определение фибриногена по Клауссу ручными методами (без использования коагулометра) невозможно.

Тромбиновое время.

Данный тест отражает взаимодействие тромбина с фибриногеном - конечный этап свертывания крови. При добавлении тромбина к исследуемой плазме измеряется время от момента добавления реагента до образования сгустка.

Удлинение тромбинового времени может быть следствием уменьшения количества фибриногена в плазме, нарушения структуры фибриногена (дисфибриногенемия), наличия в плазме гепарина или гепариноподобных субстанций, прямых ингибиторов тромбина (гирулог и другие препараты гирудина), а так же при наличии в плазме иных ингибиторов тромбина, в том числе продуктов деградации фибрина или фибриногена.

Проба с бариевой плазмой.

В клинической практике очень важно бывает быстро дифференцировать гемофилию А (недостаток фактора VIII) от гемофилии В (недостаток фактора IX). В основном исследование активности соответствующих факторов проводится с использованием стандартных плазм с дефицитом данного фактора (дефицитные плазмы). При отсутствии дефицитных плазм возможно использовать такой метод, как проба с бариевой плазмой.

Принцип метода состоит в том, что при добавлении к плазме сульфата бария происходит адсорбирование на ней белков протромбинового комплекса, к которым относятся факторы II, VII, IX и X, в то время как остальные факторы гемокоагуляции остаются в «бариевой» плазме количественно неизменными. В связи с этим добавление бариевой плазмы к плазме пациента с гемофилией А, т.е. с дефицитом или дефектом фактора VIII, должно приводить к нормализации удлиненного времени АЧТВ, а при наличии гемофилии В, или дефекте фактора IX, нормализации АЧТВ не происходит.

Определение фибринолитической активности крови.

Существует несколько методов оценки фибринолитической активности крови. К сожалению, точность этих методов достигается путем увеличения сложности их исполнения. Наиболее популярным остается метод определения времени **лизиса эуглобулинового сгустка**. В то же время изобретение методов с применением хромогенных субстратов позволило шире использовать такие дополнительные методы, как оценка уровня ингибитора активатора плазминогена и тканевого активатора плазминогена. Значение определения собственно плазминогена ограничивается выводами о его потреблении организмом для растворения избыточного количества фибрина в сосудистом русле. С практической же точки зрения об активности фибринолиза крови можно судить и по уровню D-димера.

Трактовка результатов скрининговых тестов

При изолированном удлинении времени АЧТВ, но при нормальных показателях протромбинового времени, ответственными за это могут быть только факторы VIII, IX, XI и XII. В этом случае выполняются следующие дополнительные исследования:

- 1) Тест смешивания плазмы обследуемого пациента и нормальной плазмы с достаточным содержанием факторов свертывания (микст-тест). При дефиците факторов

у пациента результаты микст-теста покажут нормализацию времени образования сгустка в повторно проведенном тесте АЧТВ. В случае наличия ингибиторов к факторам или волчаночного антикоагулянта АЧТВ останется пролонгированным. Определение наличия волчаночного антикоагулянта должно выполняться со специальным реагентом для АЧТВ, чувствительным к наличию данного вида ингибиторов.

2) Выявление ингибиторов факторов VIII, IX, XI, XII.

При отсутствии ингибиторов производится определение активности факторов VIII, IX, XI, XII с помощью дефицитных плазм, или определение антигенов факторов VIII, IX, XI, XII с применением моноклональных антител.

При изолированном удлинении протромбинового времени, но нормальных показателях ВК и АЧТВ, можно подозревать нарушения во внешнем пути гемокоагуляции, то есть дефицит или повреждение фактора VII. Для определения причины нарушения активности данного фактора в первую очередь следует исключить наличие ингибиторов к фактору VII. Это делается также при помощи теста смешивания. При дефиците фактора VII добавление к исследуемой плазме нормальной плазмы в объеме всего лишь 1/10 от исследуемой приводит к нормализации протромбинового времени. Если нормализация протромбинового времени происходит только при добавлении к исследуемой плазме равного объема нормальной плазмы, констатируется наличие ингибиторов к фактору VII.

При отсутствии ингибиторов следует произвести определение уровня активности фактора VII с дефицитными плазмами или же с помощью моноклональных антител к антигену фактора VII.

Удлинение показателей протромбинового времени и АЧТВ при нормальном показателе времени кровотечения может свидетельствовать о нарушении функции факторов V, X, I, II. В этом случае первоначально выполняется тест на наличие ингибиторов к факторам V, X, II. При отсутствии таковых определяется активность или антиген этих факторов с помощью дефицитных плазм или с помощью моноклональных антител.

Удлинение времени кровотечения при нормальных показателях АЧТВ и протромбинового времени позволяет заподозрить нарушения тромбоцитарного звена гемостаза, которое может быть обусловлено снижением количества тромбоцитов в циркулирующей крови или нарушением функции тромбоцитов.

После констатации удлинения времени кровотечения, которое следует определять при проколе мочек обеих ушей, в первую очередь производится подсчет количества тромбоцитов. При отсутствии *тромбоцитопении* но удлиненном время кровотечения, следует заподозрить наличие *тромбоцитопатии*, то есть нарушения функция кровяных пластинок.

В этом случае необходимо определить, какая конкретная функция тромбоцитов нарушена. Производится это при помощи следующих тестов:

1. Оценка адгезивной и агрегационной способности тромбоцитов по агрегатограммам с использованием следующих индукторов - АДФ, адреналина, коллагена, ристоцетина;
2. Оценка ристоцитин-кофакторной активности тромбоцитов;
3. Оценка фактора Виллебранда (антиген);
4. Оценка ретракции кровяного сгустка.

Удлинение времени кровотечения встречается во многих случаях болезни Виллебранда. Диагностика болезни Виллебранда производится на основании выявленного дефекта агрегации тромбоцитов с ристоцетином, или же на основании констатации снижения в крови исследуемого уровня фактора Виллебранда. Тип болезни Виллебранда определяется на

основании изучения уровня и активности фактора Виллебранда и его способности формировать мультимеры.

Все исследования тромбоцитарной функции проводятся в специализированных лабораториях, имеющих соответствующее оборудование (агрегометр) и опытный персонал. Оптимальным является консультирование пациента сотрудником лаборатории.

Отдельным направлением в оценке состояния системы гемостаза является определение риска или причин уже развившегося тромбоза. Оценочные тесты не информативны для выявления тромбофилии. При оценке риска возникновения венозных и артериальных тромбозов следует учитывать возможность существования наследственных тромбофилий, роль которых определена во многих исследованиях, в том числе их значимость показана и в российской популяции.

Наиболее существенным дефектом, повышающим риск тромбозов в 20-50 раз, является дефицит антитромбина. Несколько меньшее значение имеет недостаток протеина С и протеина S. Для выявления этих наследственных дефектов используются не генетические, а функциональные тесты – определение активности антикоагулянтов в плазме крови.

Значимыми тромбофилическими мутациями признаны мутация гена фактора V (мутация Лейден, основная причина резистентности к активированному протеину C) и мутация гена протромбина G20210A. Эти дефекты определяются молекулярно-генетическими исследованиями, встречаются в российской популяции у 1-6% населения и увеличивают риск тромбозов в 2-10 раз. Значимость других генетических дефектов (полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена 1 типа, мутации гена фибриногена, тромбоцитарных рецепторов и др.) безоговорочно не доказана, они встречаются в здоровой популяции значительно чаще и в меньшей степени ассоциированы с тромбозами. Полиморфизм гена метилентетрагидрофолат редуктазы (МТГФР) и других генов фолатного цикла должен рассматриваться в качестве тромбофилического маркера лишь в случае одновременного повышения уровня гомоцистеина в крови. У больных с артериальными тромбозами перечисленные наследственные тромбофилии выявляются значительно реже, чем у больных венозным тромбозом, однако также должны приниматься во внимание.

Определение д-димера

Диагностическая значимость определения D-димера состоит еще и в том, что позволяет помочь в дифференциальной диагностике венозного тромбоза в трудных диагностических случаях при малой и средней клинической вероятности тромбоза глубоких вен и/или ТЭЛА. Отсутствие повышения D-димера дает возможность исключать эти заболевания. Определение D-димера совместно с оценкой клинической картины позволяет почти на 30% снизить назначение сложных и дорогостоящих инструментальных обследований больного.

Оценка уровня D-димера в качестве показателя эффективности антитромботической терапии в настоящее время находится в стадии изучения. Следует иметь в виду, что у больных со старыми структурированными тромбами уровень D-димера может быть в пределах нормы. В связи с этим для принятия решения о дальнейшей тактике лечения больного результаты определения данного теста должны сопоставляться с оценкой клинической картины и данными визуализации.

В заключение необходимо отметить, что такие тесты, как время свертывания крови, время рекальцификации, тромботест (метод оценки потенциала гемостаза на основании внешнего вида образовавшихся хлопьев или нитей фибрина в процессе рекальцификации), а так же аутокоагуляционный тест могут выявлять некоторые дефекты системы свертывания, однако не имеют никаких преимуществ перед тестом АЧТВ. В то же

время из-за отсутствия стандартизации они обладают малой чувствительностью и специфичностью. В связи с этим их использование в клинической лабораторной практике в качестве тестов, оценивающих состояние гемостаза, **не рекомендуется**.

Паракоагуляционные тесты, такие как этаноловый, протаминасульфатный, β-нафтоловый, которые предлагалось ранее использовать для определения растворимого комплекса фибрин-мономера, обладают слишком низкой чувствительностью и специфичностью, и не удовлетворяют современным требованиям, предъявляемым к лабораторным тестам. Орто-фенантролиновый тест, как показатель существования в крови растворимого комплекса фибрин-мономера (РФМК), так же имеет указанные недостатки

Таким образом, обобщая вышеизложенное на основании современных представлений о физиологии свертывания крови и понимания патогенетических механизмов его нарушений, могут быть сделаны следующие рекомендации по использованию лабораторных тестов в повседневной практике лабораторий лечебно-профилактических учреждений:

Оценочные тесты 1-го уровня – выполняются в лабораториях первичного звена	
Количество тромбоцитов, время кровотечения, АЧТВ, протромбиновый тест, фибриноген по Клауссу	
Оценочные тесты 2-го уровня – выполняются в лабораториях диагностических центров и стационаров	
Агрегация тромбоцитов, тромбиновое время, D-димер, РФМК, лизис эуглобулиновых фракций	
Дополнительные тесты – выполняются в специализированных лабораториях	
При кровоточивости	При тромбозах
Фактор Виллебранда – активность и антиген, Факторы гемостаза, Тесты разведения (микст-тесты), Исследование агрегации тромбоцитов	Антитромбин, протеины С и S, аРС-резистентность
Факторы свертывания – активность	Генетический анализ – фактор V _L , мутация протромбина G20210A, гомоцистеин, волчаночный антикоагулянт (в соответствии с рекомендациями ISTH – Международного общества о тромбозах и гемостазе), антифосфолипидные антитела
Контроль антитромботической терапии – выполняются в лабораториях всех уровней	
Нефракционированный гепарин – АЧТВ Антагонисты витамина К – МНО	

В тех случаях, когда лаборатория **не специализируется** на исследованиях системы гемостаза, могут быть использованы оценочные и некоторые дополнительные тесты. Остальные предложенные исследования – в соответствии с технологическими и экономическими возможностями. Однако лечащему врачу и больному в любом случае должна быть предоставлена информация о целесообразности проведения всего комплекса исследований и даны рекомендации о возможном месте их выполнения.

В последние годы широкое распространение получили методы прикроватной диагностики. К ним относятся те исследования, которые могут быть выполнены непосредственно в отделении или в кабинете врача не специально обученным персоналом, а любым медицинским работником. Более высокая стоимость такого тестирования компенсируется

быстротой получения ответа и возможностью немедленно изменить или назначить лечение с последующим контролем.

К методам прикроватной диагностики относятся портативные коагулометры для определения времени активированного свертывания крови в кардиохирургии, АЧТВ, протромбинового времени, оценки функции тромбоцитов.

Разработаны специальные портативные коагулометры, позволяющие выполнять исследование капиллярной крови, взятой из пальца, с определением протромбинового времени и расчетом МНО, и предназначенные для контроля за терапией антагонистами витамина К в домашних условиях самим больным. Подобная тактика широко используется во всем мире и показывает высокую эффективность в отношении снижения числа геморрагических осложнений и эпизодов рекуррентных тромбозов и эмболий. Сведения о портативных коагулометрах представлены на сайте Международной Ассоциации безопасного мониторинга больных, получающих АНД (ISMAAP) www.ismaap.org.

В реанимационных отделениях при критических ситуациях может быть использован метод интегральной оценки гемокоагуляции, включая плазменный и тромбоцитарный гемостаз, и фибринолиза – тромбоэластометрия.