

# 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

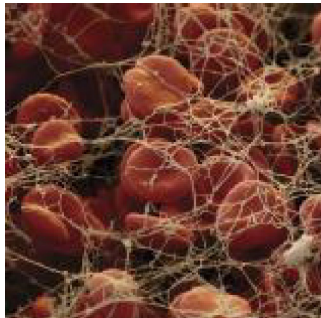
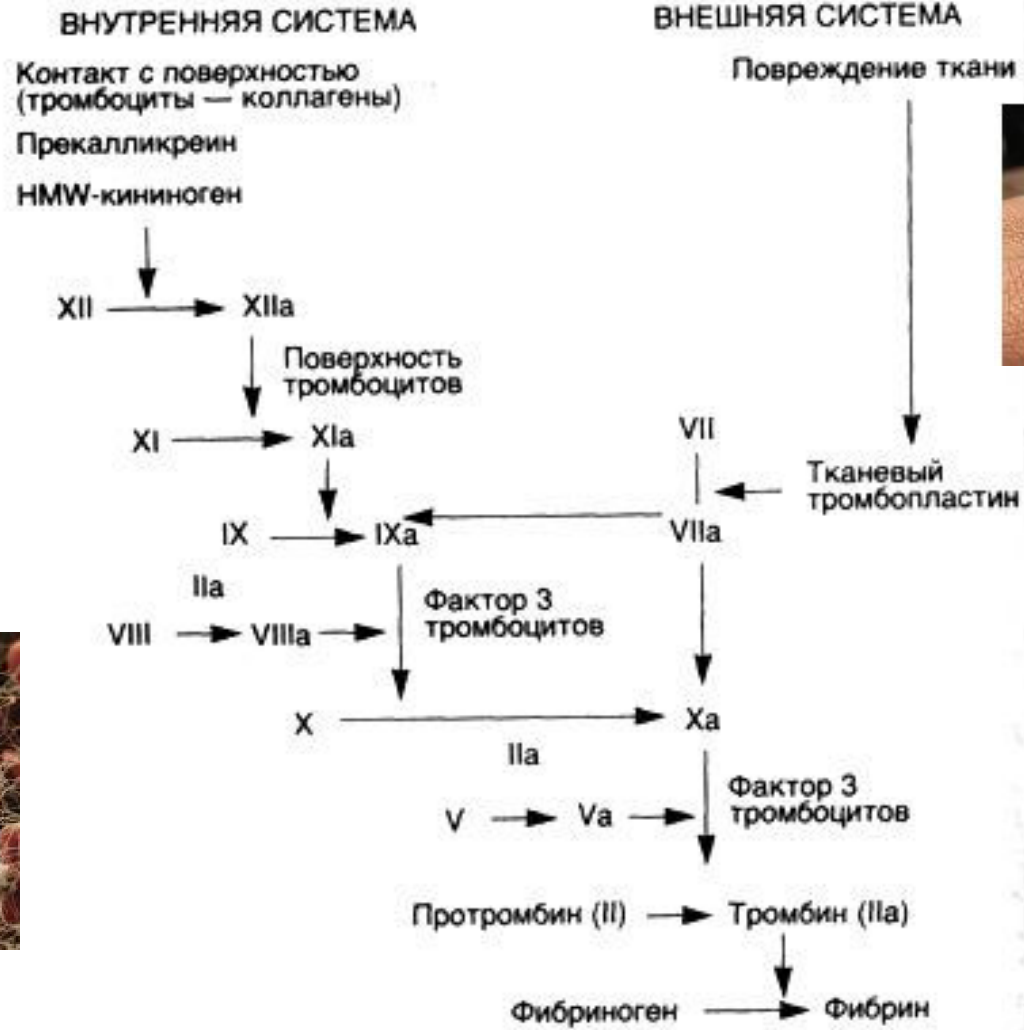
# Роберт Гвин Макфарлейн (1907-1987)



- 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

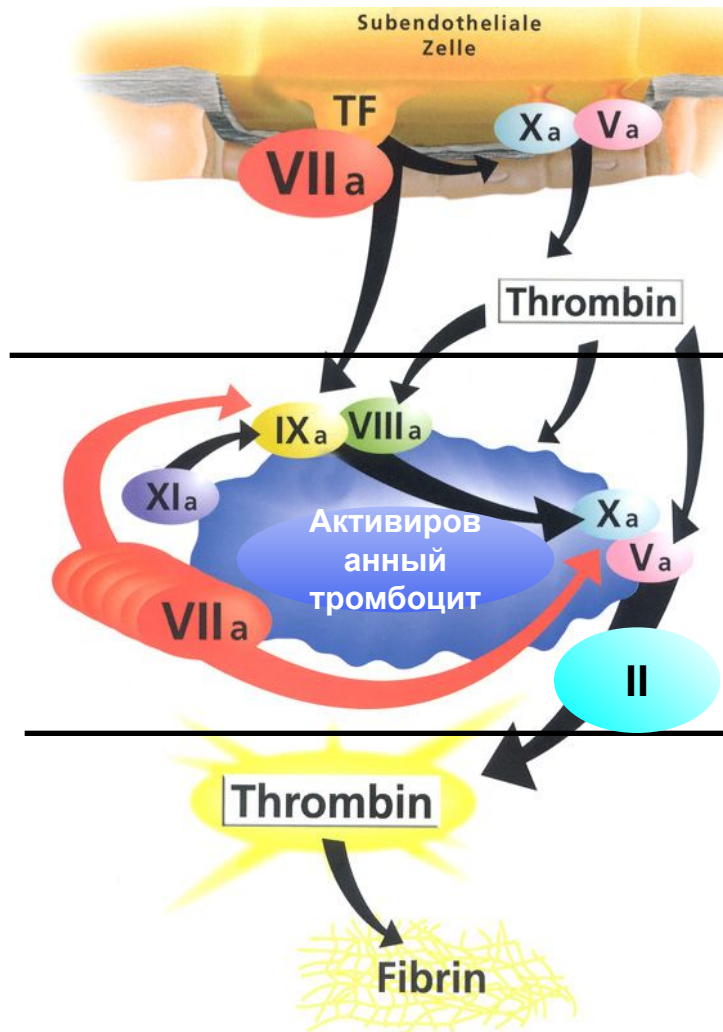
## современная клеточная теории гемостаза

- 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)

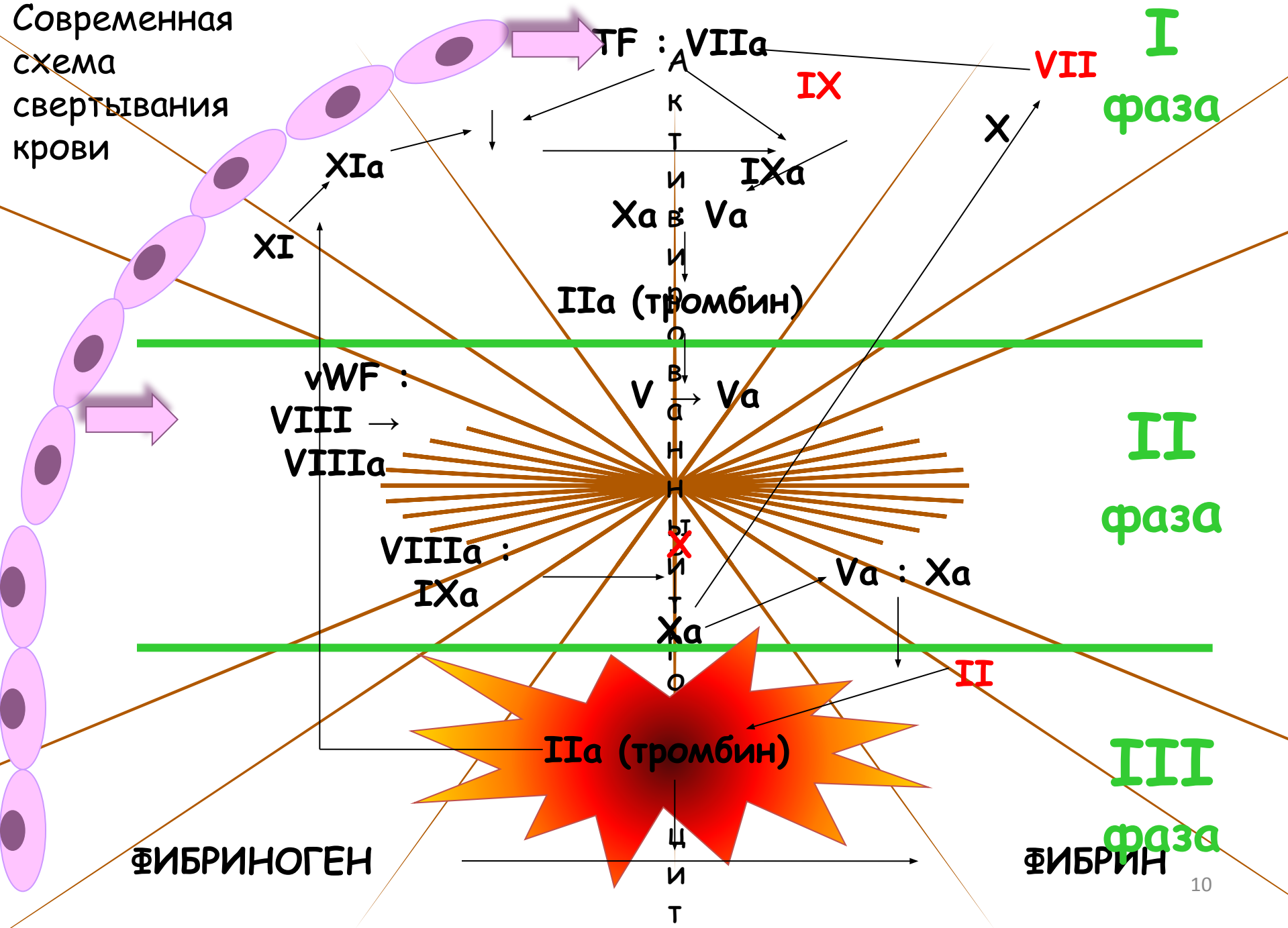


1. Initiation -  
начальная фаза

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

**Поддержание состава  
и  
жидкого состояния  
крови внутри сосуда**

**Остановка  
кровотечения**

**Восстановление  
нормальной  
структуры сосуда**

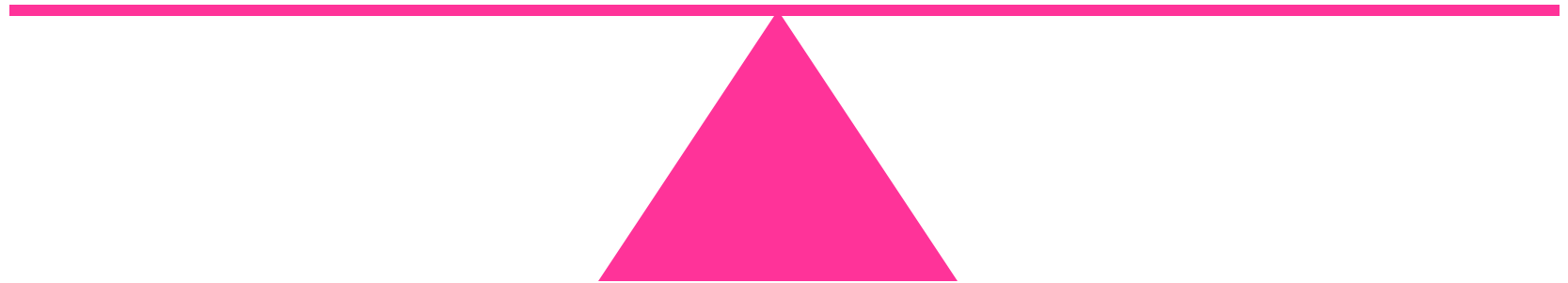
# Компоненты системы гемостаза



# 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 антикоагулянтом
- 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

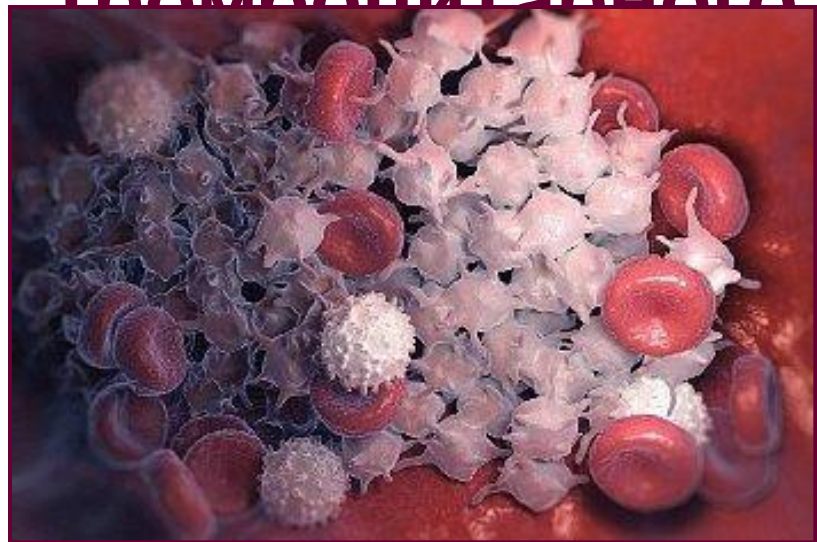
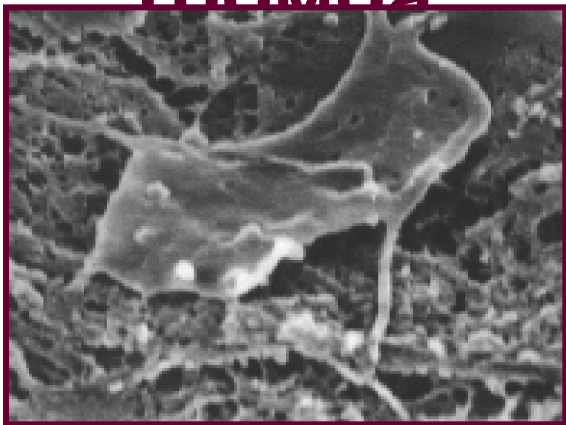
- 1. **Проявляется при нарушениях сосудистого генеза:**

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

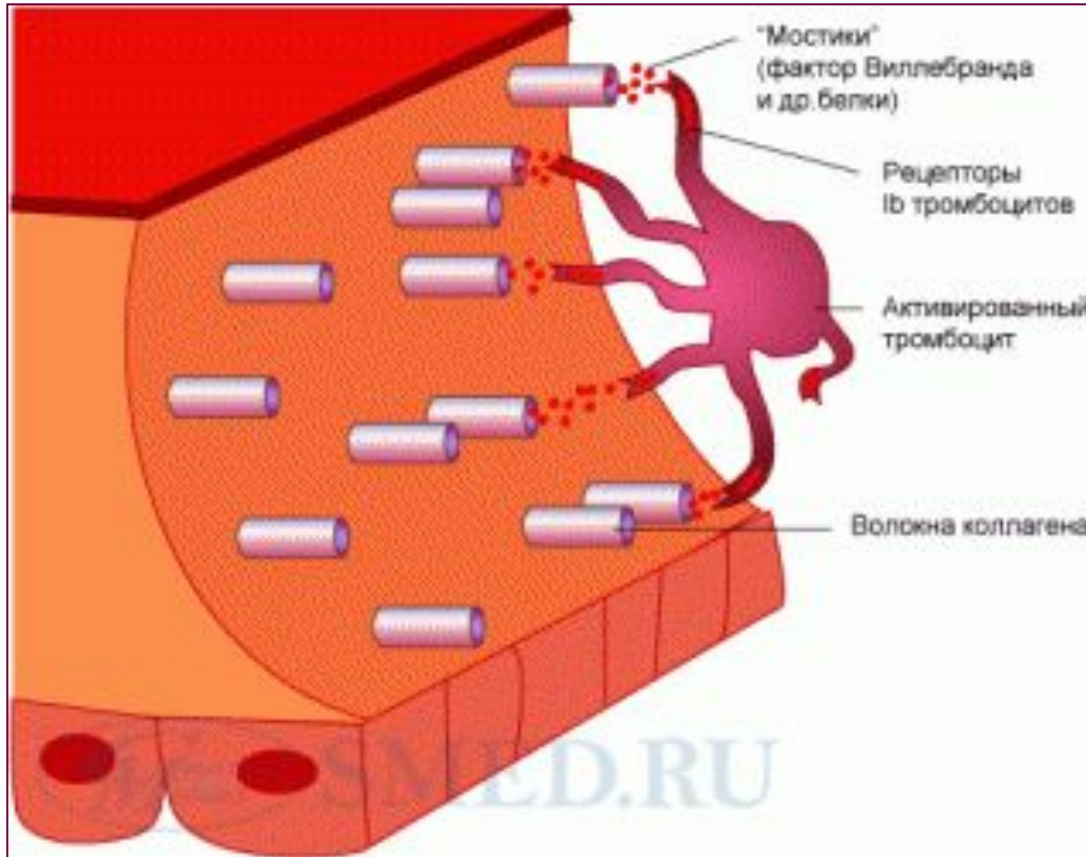
- Адгезия и активация тромбоцитов
- Агрегация тромбоцитов, реакция высвобождения.
- Уплотнение тромба



# Этапы образования тромбоцитарного тромба



# Адгезия и активация тромбоцитов



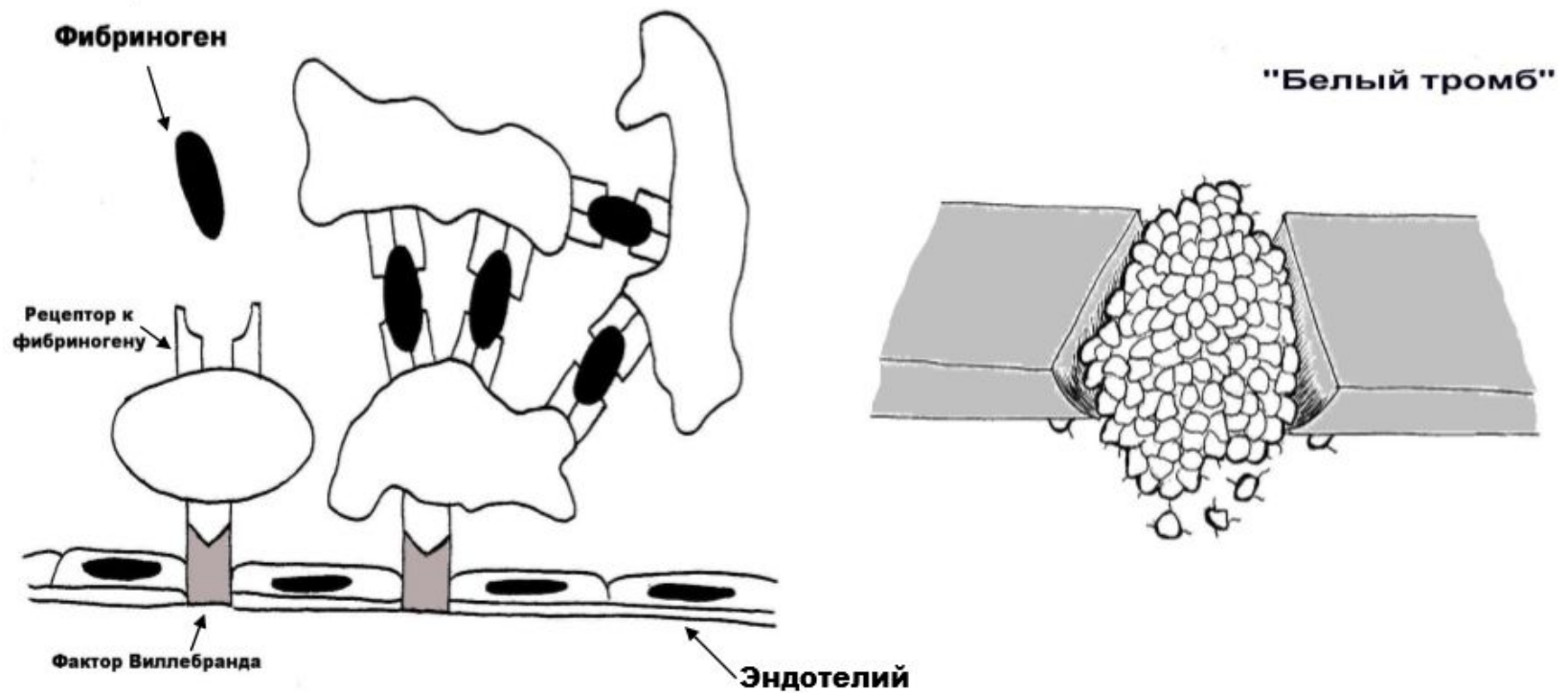
- **Участники**

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

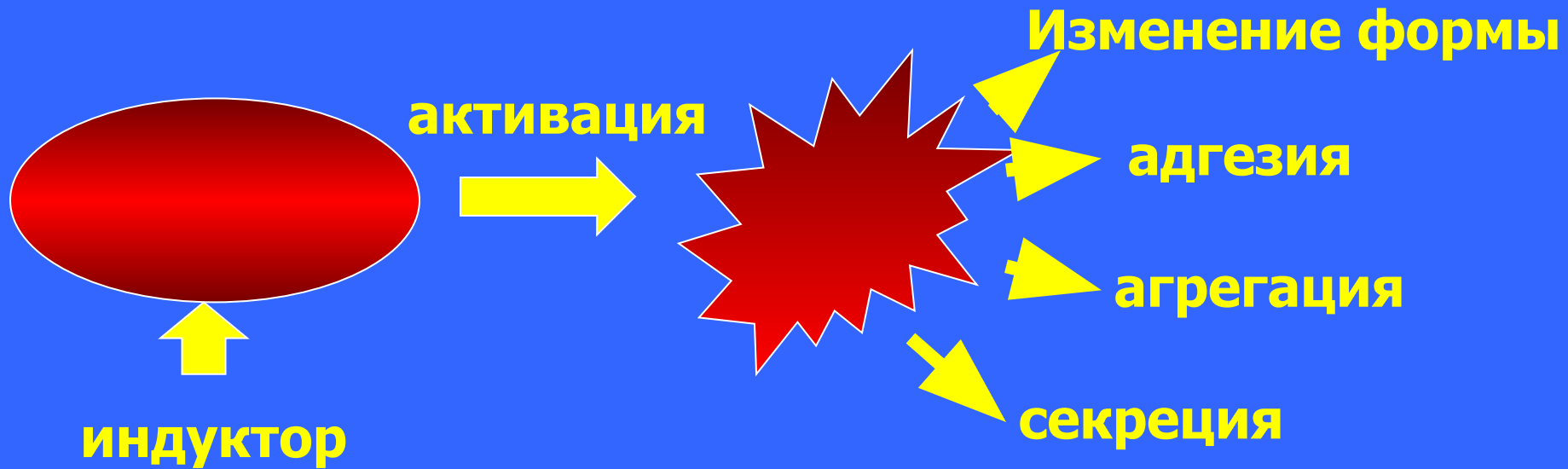
Микроскоп: 180-320 г/л

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, ристомицин, АДФ, светопропускание, светорассеяние, измерение импеданса)
- Добавление к плазме стимулирующих агрегацию тромбоцитов адгезию:

Коллаген и ристомицин

- 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



3,8% цитрат натрия  
Кровь-Цитрат 9:1



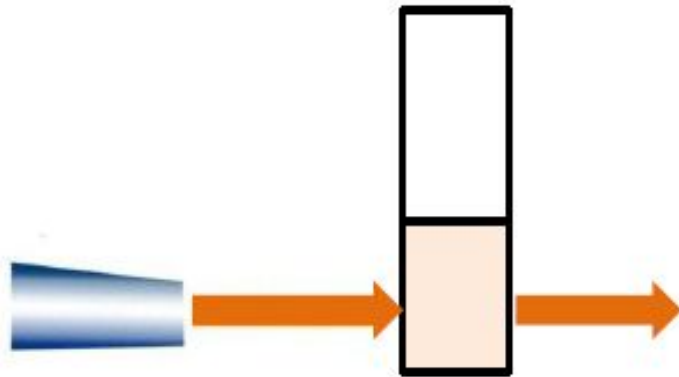
1000 об/мин, 10 минут  
Богатая тромбоцитами плазма

3000 об/мин, 10 мин  
Бедная тромбоцитами плазма



200 мкл плазмы (+25 мкл индуктора)

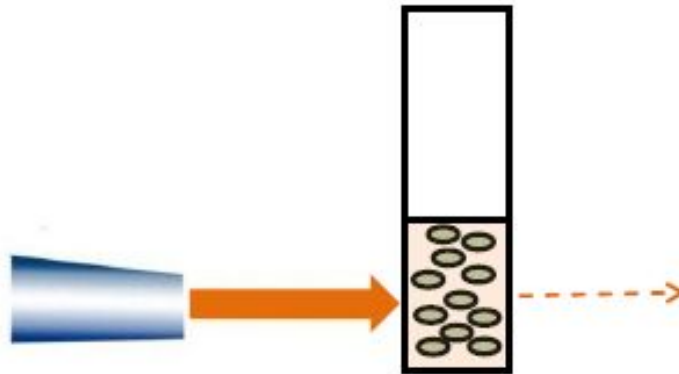
# Принцип метода



Бедная тромбоцитами плазма

Светопропускание 100%

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

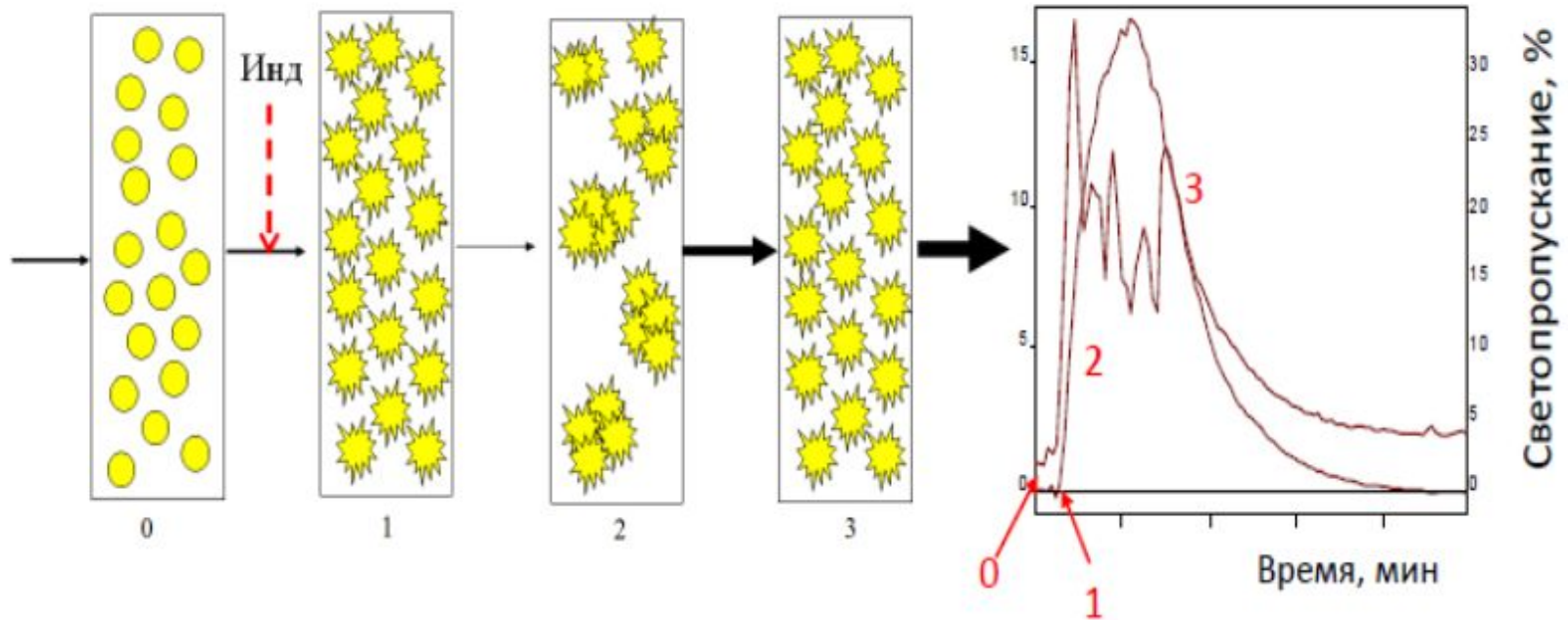


Богатая тромбоцитами плазма

Светопропускание 0%



# Низкая концентрация индуктора



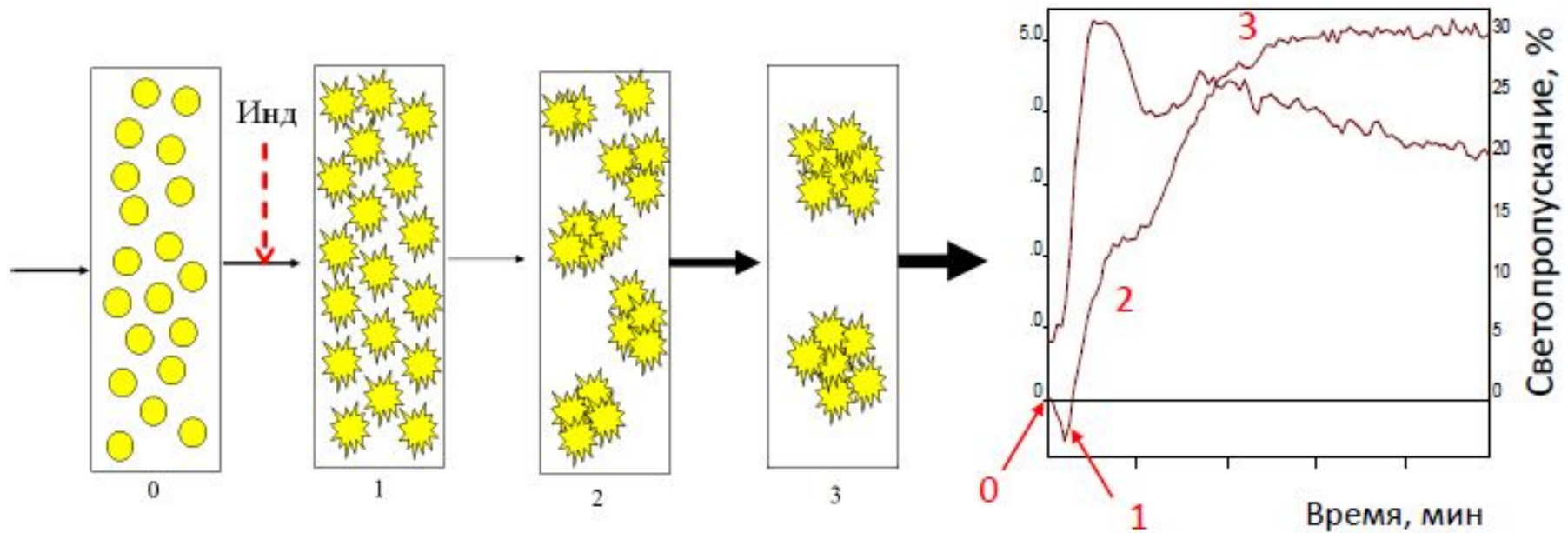
0 – неактивированные тромбоциты

1 – фаза активации

2 – фаза индуцированной агрегации

3 – фаза дезагрегации с последующей стабилизацией

# Высокая концентрация индуктора агрегации

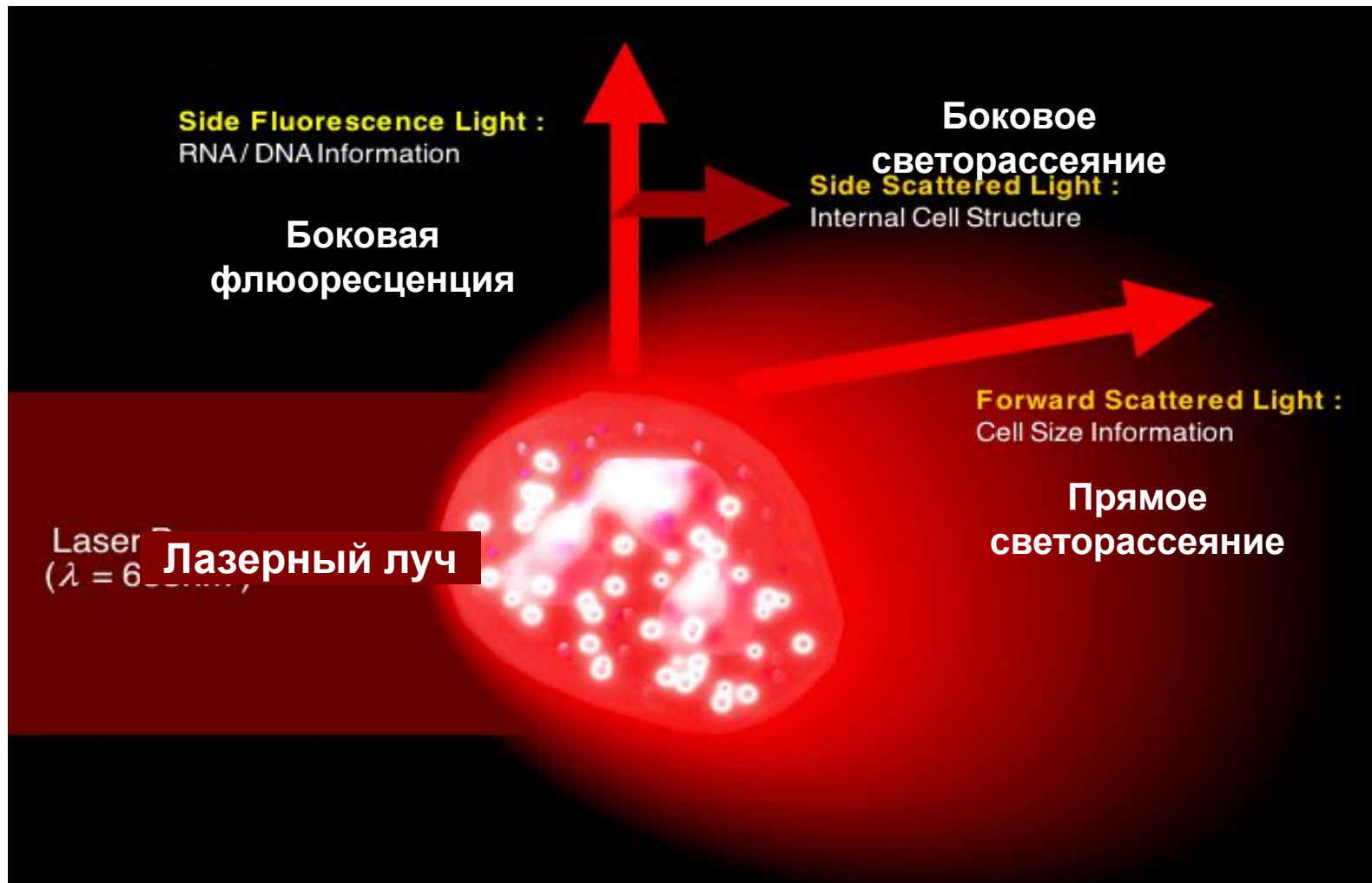


- 0 – неактивированные тромбоциты
- 1 – фаза активации
- 2 – фаза индуцированной агрегации
- 3 – фаза высвобождения с последующей стабилизацией

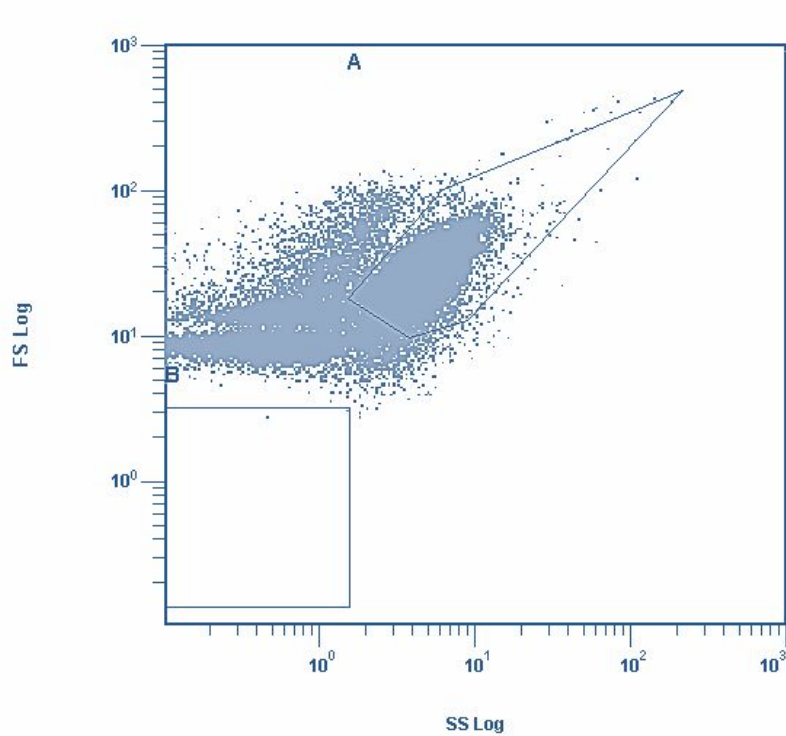
# Возможные методы определения активности тромбоцитов

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

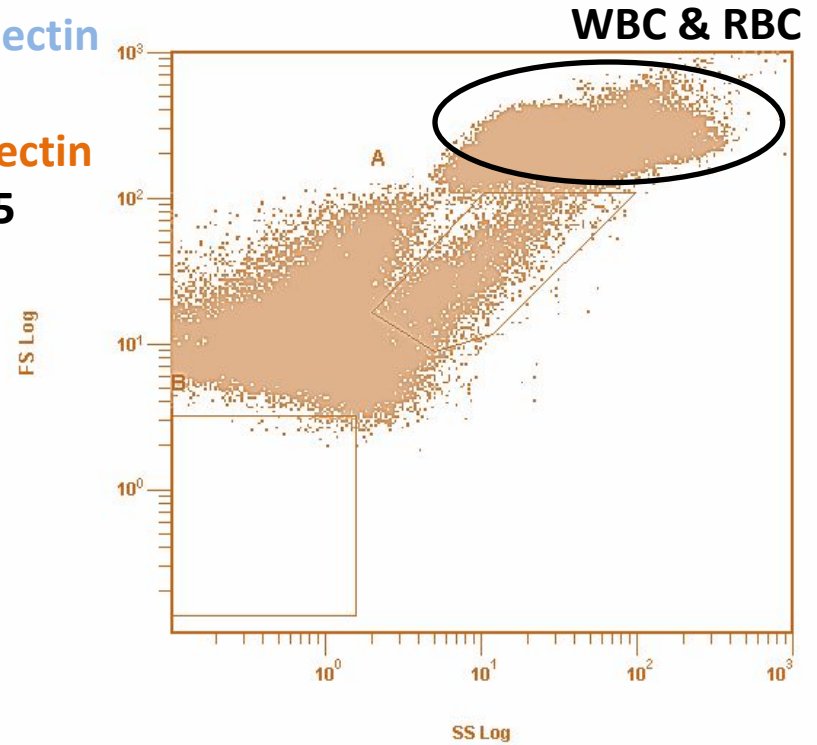
# Проточная цитофлуориметрия



# Проточная тромбоцитометрия

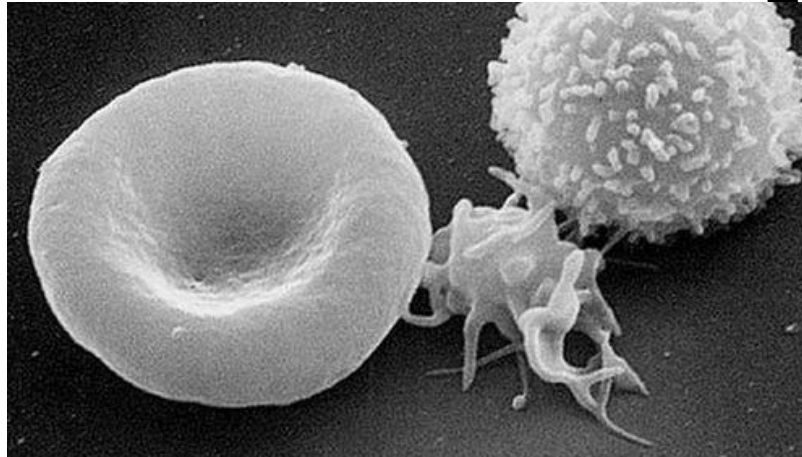


MFI&P-selectin  
vs.  
MFI&Pselectin  
P>0,05



Плазма Богатая Тр

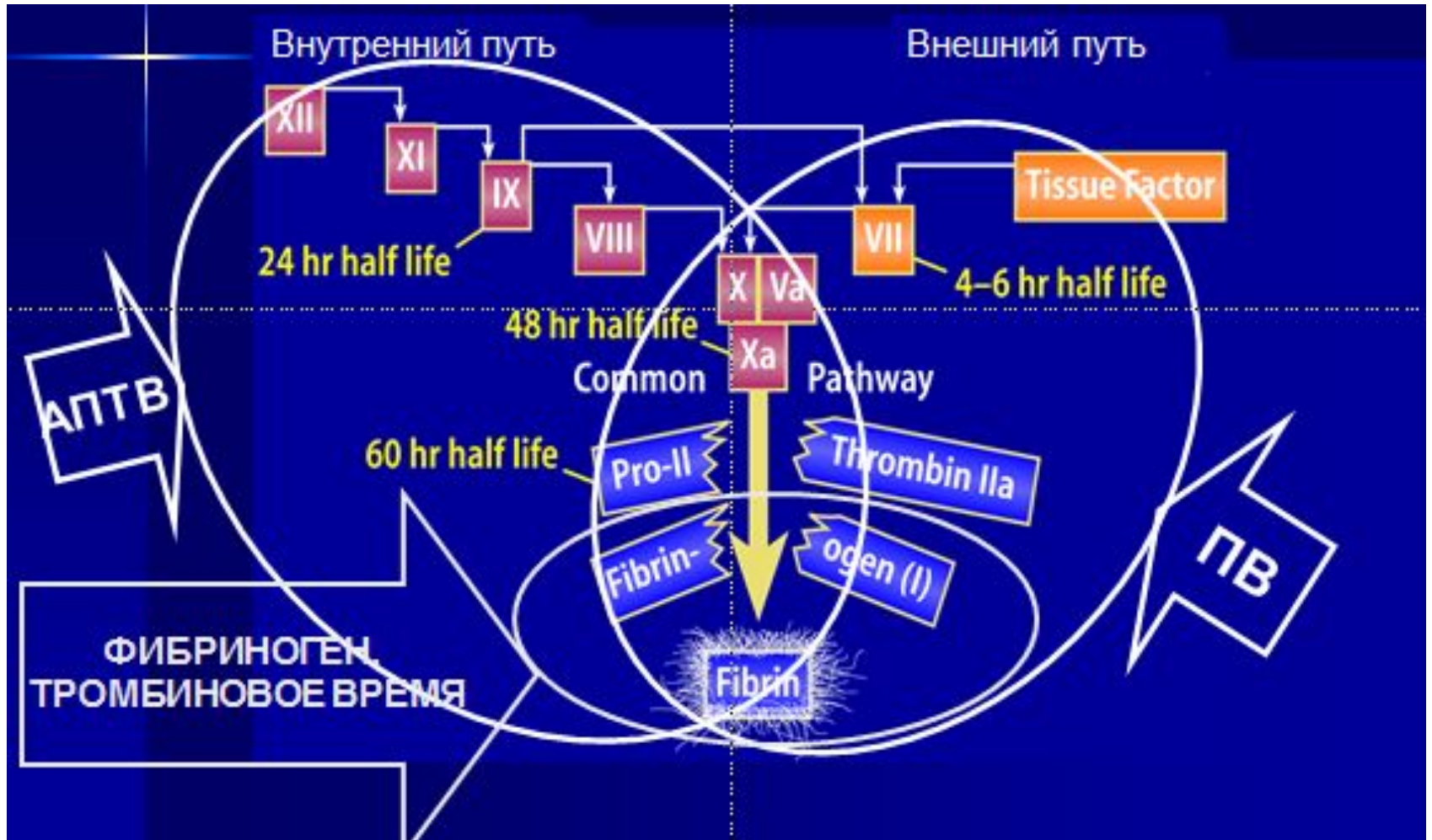
Цельная венозная кровь



# **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

**М** еждународное  
**Н** ормализованное  
**О** тношение

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

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**

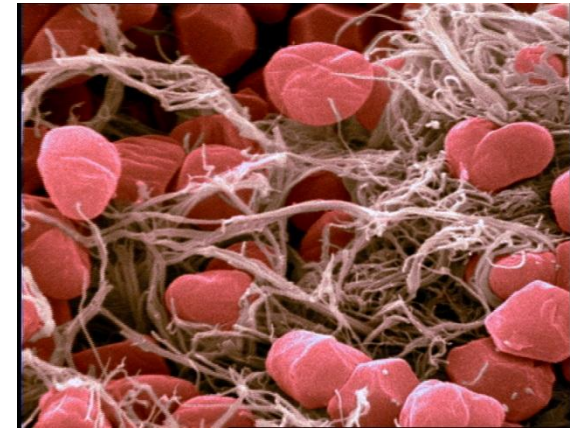
- Один из самых распространенных и информативных тестов оценки внутреннего пути гемостаза
- Мониторинг прямыми антикоагулянтами (гепарин)
- Отражает изменение активности факторов VIII, IX, XI, XII, прекалликреина и высокомолекулярного кининогена

# Тромбиновое время (ТВ)

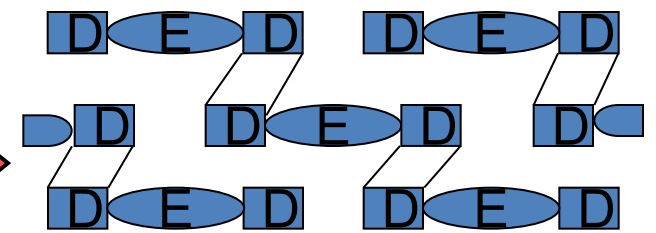
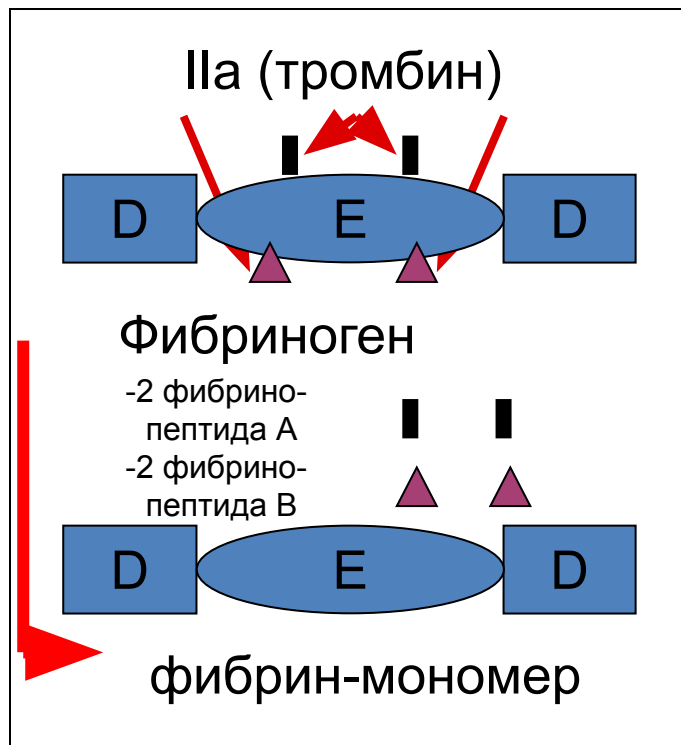
- тест отражает величину периода, в течение которого происходит продуцирование фибрина из фибриногена.
- Определение тромбинового (тромбированного) базируется на скорости, с которой происходит образование тромба в цитратной плазме под воздействием ионов кальция.
- Возможно контролировать лечение препаратами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

# Формирование фибрина

фибриноген - белок, который вырабатывается печенью и содержится в плазме



Ф.  
XIII  
XII a



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

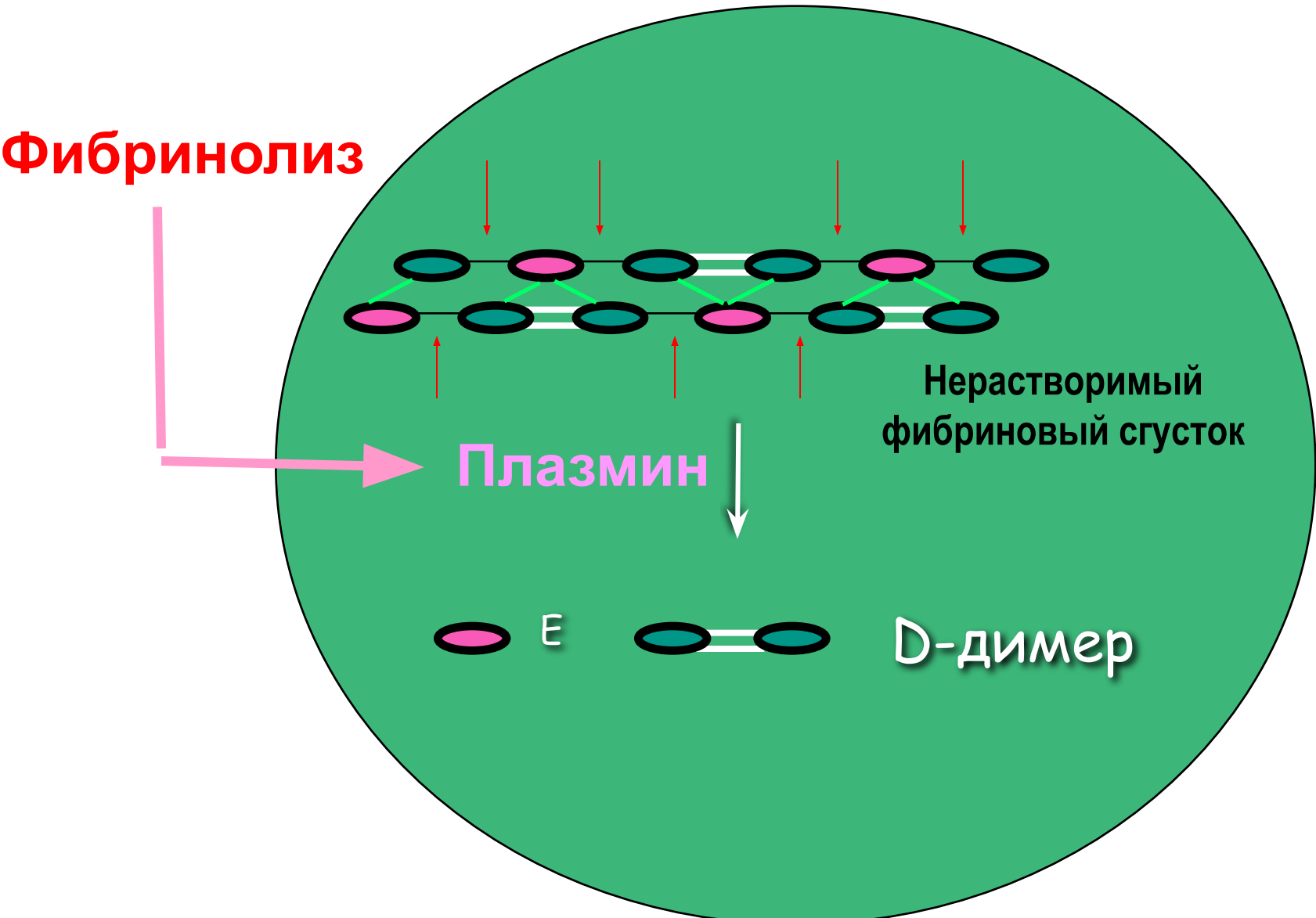
## Ингибиторы факторов свертывания – естественные антикоагулянты

- **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 (РАI-2)
- Активируемая тромбином карбоксипептидиза (ТАFI)
- $\alpha$ 2-антиплазмин
- $\alpha$ 2-макроглобулин
- Антитрипсин
- Антитромбин III
- С1-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...

