**Методические рекомендации к занятию № 12 - 1**

**по дисциплине «Клиническая (био)химия»**

**Тема:** **Клинико-биохимические методы исследования коагуляционного гемостаза.**

**Плазменное звено гемостаза**

Для оценки плазменной системы гемостаза в клинико-диагностической лаборатории коагулологическое исследование выполняют в основном двумя методами — **хромогенным и клотинговым**.

**Хромогенные методы основаны на образовании окрашенных продуктов. Принцип реакции** с применением хромогенных субстратов в коагулологии состоит в том, что синтетический пептид (или хромогенный субстрат) добавляют в реакционную пробу, он взаимодействует со специфическим ферментом (например, фактором свертывания), краситель высвобождается, и его количество измеряют фотометрически. По количеству высвободившегося красителя (интенсивности окраски) определяют активность искомого фактора. Фотометрию проводят в интервале длин волн 405-410 нм на фотометрах. Выполнение таких исследований ручными методами без соответствующего оборудования невозможно.

Наиболее распространенный тест с применением хромогенных субстратов — определение активности антитромбина III, плазминогена, протеина С, анти-Ха, активности гепарина. Существуют диагностические наборы для научно-исследовательской практики на определение ингибитора активатора плазминогена, ингибитора плазмина, растворимого фибриногена, фактора ХНа, хемотрипсина, фактора X, гранулоцитарной эластазы, активности ингибитора калликреина, калликреина плазмы и его активатора, трипсина и урокиназы.

Методы исследования с использованием хромогенных субстратов имеют ограничения вследствие:

• отсутствия субстратов для определения всех факторов свертывания;

• относительной сложности и трудоемкости выполнения методик;

• низкой селективности синтетических хромогенных субстратов (могут реагировать с другими протеазами плазмы крови);

• влияния большого количества внешних факторов на протекание реакции;

• высокой стоимости анализа.

Тем не менее определение активности фактора свертывания более значимо, чем измерение его количества или массы.

**Клоттинговые (от англ. clot — сгусток) методы основаны на измерении промежутка времени с момента внесения реагента**, запускающего ферментативный процесс свертывания плазмы (каскад реакций), до момента коагуляции — образования фибринового сгустка (нитей фибрина). В зависимости от присутствия в реакционной пробе тех или иных активаторов или ингибиторов, добавляемых при исследовании, оценивают активность того или иного фактора свертывания либо отдельных звеньев (путей) плазменного гемостаза.

Клоттинговые методы наиболее распространены, поскольку характеризуются:

• простотой и легкостью выполнения;

• определенной стандартизированностью;

• коротким временем выполнения;

• доступностью специализированных наборов реагентов;

• низкими затратами на исследование;

• моделированием физиологических механизмов образования сгустка (тромба).

При скрининговых исследованиях системы гемостаза применяют клоттинговые методы — протромбиновый тест, концентрация фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время, а также при расширенном обследовании — активность факторов II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, активность антитромбина, активность системы протеина С.

Основными элементами коагулологического анализа являются:

• дозирование плазмы;

• дозирование реагентов;

• измерение времени образования фибринового сгустка (для клоттинговых методов) или фотометрирование (для хромогенных методов).

Для измерения времени образования сгустка в клоттинговых тестах используют приборы, называемые коагулометрами, анализаторами свертывания крови или анализаторами показателей гемостаза. Они бывают полуавтоматическими и автоматическими. В автоматических коагулометрах все элементы аналитического процесса выполняются без участия человека. В полуавтоматических анализаторах дозирование плазмы и реагентов осуществляет лаборант, а измерение времени образования сгустка и расчеты результатов анализа выполняет прибор.

В некоторых лабораториях исследования системы гемостаза выполняют ручными методами с применением водяной бани (термостата с прозрачными стенками), все элементы аналитического процесса выполняет вручную лаборант. Ручные методы не позволяют обеспечить современные требования, предъявляемые к точности биомедицинских измерений, об этом свидетельствует статистика Федеральной системы внешней оценки качества. В связи с индивидуальными, неповторяющимися свойствами глаза визуальные измерения субъективны и характеризуются относительно большим количеством ошибок. Человеческий глаз быстро устает, поэтому при выполнении множества серий точность измерения непрерывно уменьшается. Кроме того, производительность таких исследований крайне мала.

Основополагающим различием в принципе действия коагулометров считается механизм, предназначенный для регистрации времени образования сгустка фибрина в тестируемой смеси. В основе регистрации момента выпадения сгустка в коагулометрах используется несколько принципов: механический, оптический (турбидиметрический или нефелометрический), оптико-механический (комбинация оптического и механического методов). На основе этого различия выделяют оптические, механические и оптико-механические типы коагулометров.

В коагулометрах с механическим принципом регистрации система детекции образования сгустка основана на слежении за изменением движения металлического предмета внутри измерительной кюветы. За длительность коагуляции исследуемой пробы принимается промежуток времени с момента введения в пробу реагенткоагулянта и начала движения шарика до момента его остановки образовавшимся в ходе реакции сгустком.

Анализаторы с механическим принципом регистрации: Thrombostat 2 (Behnk Elektronik, Германия), CL4 (Behnk Elektronik, Германия), STart 4 (Roche Diagnostics, Швейцария). Коагулометры с механическим принципом регистрации сгустка характеризуются высокой надежностью и простотой в обслуживании. Неоспоримым преимуществом таких коагулометров считается возможность исследования капиллярной крови, что остается актуальным в педиатрической практике и при массовом скрининговом обследовании. Однако при регистрации времени свертывания в крови ряда больных точность такого исследования существенно ниже, чем при определении времени свертывания в плазме, так как оказывает влияние величина гематокрита.

В коагулометрах с механическим принципом регистрации сгустка отсутствует автоматический запуск отсчета времени измерения при внесении стартового реагента (функция автостарта). Для запуска реакции необходим дополнительный дозатор (стартовая пипетка), соединяемый с коагулометром с помощью кабеля. Кабель снижает удобство эксплуатации. Основные проблемы применения коагулометров с механическим методом регистрации связаны с низкой плотностью образующегося сгустка при различных видах дисфибриногенемий или малых количествах фибриногена в пробе. В этих случаях, например при гепаринотерапии (концентрация фибриногена — менее 0,7 г/л), образовавшийся неплотный сгусток часто не может сразу остановить шарик, результаты получаются плоховоспроизводимыми.

В коагулометрах с оптическим принципом регистрации фибринового сгустка момент свертывания крови определяется по резкому изменению светопропускания (турбидиметрия) или рассеивания (нефелометрия) реакционной смеси на запро-граммированную величину. За длительность коагуляции исследуемой пробы принимается промежуток времени с момента введения в пробу коагулянта до момента резкого изменения оптических свойств пробы при образовании нитей фибрина.

Обычно в оптических коагулометрах в измерительной кювете используется мешалка, с помощью которой достигается гомогенность перемешивания пробы и реагента, что способствует хорошей повторяемости измерений. Основным преимуществом оптических систем измерения считается высокая чувствительность, характеризуемая способностью регистрировать образование неплотного сгустка, что бывает при приеме пациентами антикоагулянтов, а также в случаях коагулопатий (при низких концентрациях фибриногена, вплоть до 0,5-0,6 г/л).

Почти у всех коагулометров с оптическим типом регистрации старт времени коагуляции происходит автоматически в ответ на изменение оптической плотности после добавления стартового реагента. Оптические системы имеют недостаток — требуется применение оптически прозрачных реактивов, они не позволяют проводить исследования с цельной кровью.

Оптико-механический принцип регистрации образования фибринового сгустка делает коагулометры универсальными: их можно использовать при работе как с цельной кровью, так и с плазмой в различных разведениях и с применением любых реактивов, в том числе непрозрачных. Существуют автоматические анализаторы, способные выполнять как клоттинговые, так и хромогенные исследования. Широкое применение таких приборов сдерживается нецелесообразностью их применения в мелких и средних лабораториях.

С каждым годом растет количество людей, принимающих оральные антикоагулянты. Принимать антикоагулянты приходится в течение длительного времени. Сложности, связанные с эффективным подбором дозы, индивидуальной переносимостью препаратов, влиянием лекарственных средств, некоторых продуктов питания на свертывание, требуют частого измерения международного нормализованного соотношения.

Для решения этой задачи существуют портативные коагулологические анализаторы — диагностика в месте наблюдения или у постели больного, или так называемые МНО-детекторы — устройства, позволяющие осуществлять контроль международного нормализованного соотношения в домашних условиях.

Наиболее частые и распространенные технические ошибки, возникающие при выполнении коагулологического анализа:

• неправильное взятие проб крови, при котором уже произошла активация процесса свертывания;

• неправильное соотношение объемов крови и антикоагулянта;

• неправильный выбор антикоагулянта (подходит только цитрат натрия 3,8% или 0,0025 М раствор);

• попадание в пробу гепарина;

• неправильная температура термостатирования при проведении клоттинговых и хромогенных тестов;

• использование несиликонизированной стеклянной посуды или многократное использование пластиковой одноразовой посуды (активация свертывания);

• использование для мытья посуды детергентов, влияющих на свертывание плазмы.

**Методы исследования коагуляционного гемостаза.**

* Время свертывания крови (по Сухареву)
* Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время (АЧТВ)
* Протромбиновое (тромбопластиновое) время
* МНО
* Тромбиновое время
* Аутокоагуляционный тест (АКТ)
* Тромбоэластография
* Определение фибриногена в плазме
* Определение плазменных факторов свертывания (II, V,VII, VIII, IX, X, XI,XIII)

**1. Время свертывания крови активированное**

Действие каолина при выполнении теста считается аналогичным появлению в кровотоке контактной поверхности — коллагена субэндотелия, искусственных клапанов сердца, протезированных сосудов, магистралей аппаратов для экстра-корпоральных методов лечения и т. д. При этом происходят последовательная каскадная активация плазменных белковых факторов внутреннего пути гемостаза, образование тромбина и формирование фибринового сгустка.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Основная задача при взятии крови — минимальное травмирование тканей, чтобы не спровоцировать высвобождение тканевого фактора. При взятии капил¬лярной крови желательно пользоваться стандартным ланцетом с круглой иглой, минимально травмирующей ткани при проколе. Во избежание искажения результатов нельзя выдавливать кровь из пальца.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест выполняют на специальных коагулометрах для цельной крови с одноразовыми картриджами, содержащими стандартное количество активатора контактной фазы — каолина. В некоторых картриджах, кроме каолина, содержится инактиватор гепарина, исключающий его влияние на результаты теста. Кровь собирают в картридж прибора с помощью специальной пипетки или капилляра и быстро перемешивают; дальнейшая процедура определения идет автоматически. Момент образования сгустка определяется по изменению сопротивления между электродами, контактирующими с кровью, и образующимся сгустком (электро-метрическое определение) или по затруднению вращения пластикового флажка в кювете (механический коагулометр).

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

В большинстве приборов результат колеблется в пределах 80-120 с, зависит от серии картриджей, условий их хранения и использования, количества и свойств каолина, интенсивности и полноты перемешивания крови с каолином, типа регистратора, температуры. В связи со стандартизацией контактной активации свертывания разброс результатов существенно меньший по сравнению с тестом времени свертывания крови.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для теста нет калибровочных и контрольных материалов (контрольной цельной крови). О качестве анализа можно приближенно судить по результатам исследования венозной или капиллярной крови нескольких здоровых людей.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение тестом времени свертывания крови свидетельствует о гипокоагуляционных сдвигах — дефиците или инактивации плазменных факторов, циркуляции антикоагулянтов, выраженной гемодилюции, гипокоагуляционной фазе диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, а также возможно при тромбоцитопении. Уменьшение тестом времени свертывания крови активированного может наблюдаться при гиперактивации плазменных факторов, но оно не является основанием для окончательного вывода о состоянии гиперкоагуляции и принятия терапевтических мер (необходимы дополнительные исследования).

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основном определение времени свертывания крови активированного проводят для контроля и регулирования уровня гепаринизации пациента во время работы искусственных органов (аппаратов искусственного кровообращения, искусственной почки, печени, гемосорбции), расчета нейтрализующей дозы протамина сульфата и оценки полноты нейтрализации гепарина. Достоинством метода является возможность исследования непосредственно у постели больного или в операционной (poin of саге — диагностика по месту лечения), а также относительная быстрота выявления больных, резистентных к гепарину, когда для достижения оптимального эффекта приходится вводить повышенные дозы препарата.

**2. Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время**

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

Определяют время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы при физиологической температуре (37 °С), в условиях стандартной активации контактной фазы, в присутствии фосфолипидов и при добавлении ионов Са2. Заменителем тромбоцитарной фосфолипидной матрицы для сборки коагуляционных ферментных комплексов служат фосфолипиды мозга, эритроцитов или сои, заменителем активационной контактной поверхности — каолин или эллаговая кислота. Благодаря отсутствию тромбоцитов в плазме и добавлению их заменителя — парциального тромбопластина — на результаты теста практически не влияют тромбоцитарные факторы. Возможно определение активированного частичного тромбопластинового времени на портативных коагулометрах со специализированными картриджами. Иногда тест обозначают как активированное парциальное тромбопластиновое время активированного частичного тромбопластинового времени, что является аналогом активированного частичного тромбопластинового времени.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза (с добавлением цитрата) и получения бедной тромбоцитами плазмы. Параметры активированного частичного тромбопластинового времени стабильны до 4 ч при комнатной температуре; при лечении гепарином исследование необходимо провести в течение 1 ч после взятия материала. Возможно хранение замороженной бедной тромбоцитами плазмы до 10-20 дней, но допустимо лишь однократное размораживание.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Составляют 20-45 с. Результаты теста активированного частичного тромбопластинового времени зависят от точности соотношения кровь/цитрат, вида и свойств фосфолипидного компонента и каолина (или эллаговой кислоты), температуры, а также от способа регистрации результатов, типа и чувствительности прибора, вида и активности реагентов, а также от типа оборудования. Каждой лаборатории рекомендуют определить свои, локальные значения нормы.

Для снижения влияния интерферирующих факторов возможна оценка результата в виде индекса активированного частичного тромбопластинового времени, диапазон нормальных значений которого составляет 0,8-1,2:

индекс АЧТВ = АЧТВ пациента / АЧТВ контрольной нормальной плазмы.

Для контроля качества чаще используют свежеразведенную референтную нормальную пулированную плазму, срок годности — 2-4 ч после разведения лиофилизированного препарата) с аттестованным значением активированного частичного тромбопластинового времени. Смешанная бедная тромбоцитами плазма от нескольких здоровых людей (годна в течение 4-6 ч с момента получения) может быть использована для оценки сходимости и воспроизводимости или как вторичный стандарт. Разброс результатов при исследовании одного образца плазмы и использовании реактивов одной серии не должен превышать 10%.

Нельзя исследовать плазму, имеющую сгустки или следы гемолиза, поскольку из-за активации гемостаза активированного частичного тромбопластинового времени такой пробы может быть уменьшено. При наличии в исследуемой плазме гепарина время активированного частичного тромбопластинового времени может значительно удлиняться — до 300 с и более, вплоть до полного несвертывания. Антикоагулянт может попасть в пробу при получении крови из катетера (что крайне нежелательно) или при системном использовании гепарина. В том случае, когда избежать попадания гепарина в пробу невозможно, для исключения эффекта антикоагулянта используют АЧТВ-реагент с инактиватором гепарина либо плазму предварительно обрабатывают сорбентом гепарина и центрифугируют, сливая ее с осадка.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Удлинение активированного частичного тромбопластинового времени может свидетельствовать:

• о врожденном или приобретенном снижении количества/активности факторов внутреннего пути гемостаза (XII, XI, IX, VIII, X, V, II, фибриногена), реже — фактора фон Виллебранда. Снижение факторов IX, X и II возможно, в частности, при лечении непрямыми антикоагулянтами;

• об избытке в пробе цитрата — абсолютном (слишком большое количество добавленного цитрата) или относительном (неполное заполнение кровью пробирки со стандартным количеством цитрата);

• о наличии в пробе гепарина (при введении пациенту или попадании из катетера) или гирудина;

• о наличии в пробе некоторых инфузионных препаратов (декстранов);

• о наличии в пробе продуктов деградации фибрина/фибриногена, патологических ингибиторов плазменных факторов или антикоагулянтов волчаночного типа.

Уменьшение активированного частичного тромбопластинового времени клинического значения не имеет, поскольку часто бывает связано с погрешностями взятия и обработки крови. Диагностика гиперкоагуляционных состояний должна основываться на определении маркеров активации гемостаза и оценке конкретной клинической ситуации.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест активированного частичного тромбопластинового времени — один из базовых методов исследования коагуляционных свойств плазмы, выявляющий сдвиги внутреннего пути активации свертывания (клиническое значение имеет удлинение активированного частичного тромбопластинового времени). Определение активированного частичного тромбопластинового времени проводят для первичного выявления гипокоагуляционных сдвигов, диагностики гемофилии и мониторинга состояния больных с нарушениями свертывания крови, при диссеминированном внутрисосудистом свертывании, для контроля гепаринотерапии, выявления патологических ингибиторов. При диагностике антифосфолипидного синдрома для определения волчаночного антикоагулянта используют так называемый люпус-чувствительный АЧТВ-реагент со сниженным содержанием фосфолипидов.

**3. Протромбиновое время**

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

Исследование протромбинового времени представляет важнейший скрининговый тест для оценки системы свертывания крови. Определяют время образования фибринового сгустка в бедной тромбоцитами цитратной плазме при активации внешнего пути гемостаза тканевым тромбопластином, содержащим тканевый фактор и фосфолипиды, в присутствии ионов Са2+ при 37 °С. Источником тромбопластина могут быть эритроциты, ткани мозга или другие ткани; может быть использован и рекомбинантный тромбопластин. Возможно определение протромбинового времени цельной крови на портативных коагулометрах со специальными картриджами.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза. Оптимальным является исследование венозной крови. Капиллярная кровь менее пригодна для определения протромбинового времени, поскольку содержит непредсказуемое количество тканевого фактора, попадающего в нее при проколе пальца, что создает определенные проблемы (в частности, в педиатрии). Капиллярную кровь имеет смысл исследовать при наличии специальных портативных коагулометров, в которых время образования сгустка выражается в пересчете на эквивалент венозной крови и используются картриджи с реагентами, сводящими к минимуму влияние «собственного» тканевого фактора. Кровь из пальца берут непосредственно перед анализом, избегая давления на мягкие ткани; первую каплю удаляют ватным тампоном. Взятую кровь смешивают с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1, капилляр для взятия предварительно промывают тем же раствором цитрата.

Результаты теста протромбинового времени остаются стабильными до 24-48 ч при хранении венозной крови с цитратом при комнатной температуре в закрытых первичных вакуумных пробирках. При работе с открытыми пробирками требуется отделить плазму от клеток в течение 60 мин и провести определение протромбинового времени в течение 2-4 ч после взятия крови. Полученную плазму до исследования хранят при комнатной температуре; охлаждение до 4 °С более чем на 24 ч может привести к Холодовой активации фактора VII и уменьшению протромбинового времени.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемую плазму прогревают до 37 °С, вносят тромбопластиновый реагент с кальция хлоридом и определяют время образования фибринового сгустка (на коагулометре или вручную). При определении протромбинового времени капиллярной крови используют тот же принцип, но применяют реагенты с иной концентрацией действующих веществ, а измерение проводят вручную или на коагулометре с механическим принципом регистрации (желательно в параллельных пробах с вычислением среднего результата).

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА ПРОТРОМБИНОВОГО ВРЕМЕНИ Протромбиновая активность плазмы по Квику

Тест основан на расчетах по калибровочному графику, отражающему зависимость активности протромбинового комплекса (т. е. значения протромбинового времени) от степени разведения нормальной плазмы, выраженной в процентах. Для построения калибровочного графика определяют протромбиновое время неразведенной свежей нормальной пулированной плазмы (100%) и ее 50, 25 и 12,5% разведений. Некоторые исследователи считают нецелесообразным разведение 12,5% из-за снижения содержания фибриногена. Результаты откладывают на координатной сетке и соединяют линией.

При тестировании плазмы пациента измеряют значение протромбинового времени и по калибровочному графику определяют процент протромбина по Квику, отражающий активность факторов протромбинового комплекса в процентах к плазме здоровых людей. Современные коагулометры автоматически рассчитывают этот показатель исходя из результатов определения протромбинового времени в плазме пациента и разведениях контрольной плазмы.

**Расчетные показатели на основе протромбинового времени**

Для снижения влияния интерферирующих факторов рекомендуют одновременно определять протромбиновое время исследуемой пробы и референтной нормальной пулированной плазмы, а оценку результата проводить в виде отношений протромбинового времени. Современные коагулометры и анализаторы гемостаза автоматически рассчитывают показатели исходя из результатов определения протромбинового времени в пробе пациента и нормальной плазме.

• Протромбиновое отношение: ПО = ПВ пациента / ПВ нормальной плазмы.

• Показатель протромбинового отношения имеет прямую логическую связь с изменениями протромбинового времени плазмы пациента (удлинение протромбинового времени влечет за собой увеличение протромбинового отношения). Вместе с тем на результаты определения протромбинового отношения влияет чувствительность конкретного используемого тромбопластина к недостатку факторов внешнего пути (VII, X, V и II), что может привести к несопоставимости данных, полученных с разными партиями реагента.

• Прием антикоагулянтов непрямого действия приводит к удлинению протромбинового времени, однако измеренная степень его удлинения существенно колеблется в зависимости от используемого тромбопластинового реагента. В связи с этим Комитет по стандартизации в гематологии ВОЗ в 1983 г. принял стандартизированный показатель — международное нормализованное отношение, который рассчитывают при контроле лечения непрямыми антикоагулянтами (когда недопустимы колебания показателей протромбинового теста в зависимости от применяемых реагентов). Международное номализованное отношение вычисляют исходя из протромбинового отношения и международного индекса чувствительности используемого тромбопластина к нехватке факторов протромбинового комплекса: МНО = ПОмич.

• **Международный индекс чувствительности** для каждой серии реагента обозначается на его упаковке и обычно составляет от 1,0 до 1,6 (более низкое значение предпочтительнее). При использовании тромбопластина, не аттестованного по международному индексу чувствительности, расчет международного нормализованного отношения невозможен; в этом случае определяют протромбиновую активность по Квику.

• При определении **междунарожного нормализованного отношения** в пробе капиллярной крови вследствие влияния форменных элементов крови результат получается менее надежным по сравнению с анализом плазмы, поэтому без использования специальных портативных коагулометров выполнять это исследование не рекомендуют.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Протромбированное время=10-20 с (зависит от типа реагента и условий определения). Доля протромбина по Квику составляет 60-130% (зависит от препарата тромбопластина); некоторые производители указывают только нижнюю границу нормы (например, более 70%), подчеркивая, что уменьшение протромбинового времени и повышение процента протромбина клинического значения не имеют.

Протромбиновое отношение=0,85~1,2. Референтные значения для междурародного нормализованного отношения указывать некорректно, так как этот показатель должен исследоваться у больных, принимающих антикоагулянты непрямого действия; терапевтический интервал международного нормализованного отношения выбирают в зависимости от показаний к назначению препаратов.

ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Результаты теста протромбинового времени зависят от объема взятой крови по отношению к количеству цитрата в пробирке, активности препарата тромбопластина и его чувствительности к недостатку факторов VII, X, V и II, а также от температуры. При наличии гепарина в исследуемом образце протромбиновое время может значительно удлиняться — до 40 с и более; для исключения такого влияния плазму предварительно обрабатывают сорбентом гепарина и центрифугируют.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В тесте Квика калибровочный график строят для каждой новой серии исследований (на одни сутки) и каждой новой серии тромбопластинового реагента. Для обеспечения корректности результатов во всех случаях используют только свежую пулированную плазму от здоровых доноров или свежеразведенную нормальную плазму, для контроля качества — РНП-плазму. Стандартный контрольный материал ВОЗ для теста протромбинового времени отсутствует, поскольку используют различные реагенты и приборы разной чувствительности, однако производители, как правило, предлагают контрольные плазмы для конкретных условий (реагенты/оборудование). Для оценки воспроизводимости и сходимости может быть использована свежая смешанная плазма от нескольких здоровых доноров (не менее 10) или свежеразведенная лиофилизированная нормальная пулированная плазма (РНП-плазма), срок их годности — 2-4 ч с момента получения или 2 ч после разведения лиофилизированного препарата соответственно. Для повышения точности рекомендуют проводить определение на коагулометре; при исследовании параллельных проб разброс результатов протромбинового времени не должен превышать 1 с.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение протромбинового времени или снижение процента протромбина по Квику может быть связано с врожденным (редко) или приобретенным снижением активности либо дефицитом факторов внешнего пути активации свертывания или (реже) наличием их ингибиторов. Это возможно при заболеваниях печени, коагулопатиях потребления и потерях факторов, дефиците витамина К, приеме некоторых лекарственных препаратов (особенно антагонистов витамина К). При достаточном содержании факторов удлинение протромбинового времени возможно при снижении содержания фибриногена менее 1,5-1,0 г/л, а также под действием прямых антикоагулянтов, но в последнем случае тест протромбинового времени менее чувствителен по сравнению с активированным частичным тромбопластиновым временем.

Уменьшение протромбинового времени или возрастание процента протромбина по Квику не имеют клинического значения, хотя и способны отражать гиперактивность факторов внешнего пути (в том числе при нарушениях процедуры взятия крови).

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест протромбинового времени — один из базовых методов исследования коагуляционных свойств плазмы и цельной крови. Определение протромбинового времени используют для контроля лечения антикоагулянтами непрямого действия, выявления изменений количества и активности факторов протромбинового комплекса (VII, X, V и II) и оценки белоксинтезирующей функции печени. Значительное возрастание протромбинового времени часто связано с риском кровотечений.

**4. Фибриноген (концентрация)**

Фибриноген — основа для образования фибриновых сгустков — синтезируется в печени и постоянно присутствует в плазме. От его молекул под действием тромбина отщепляются фибринопептиды и образуются фибрин-мономеры, которые затем самопроизвольно полимеризуются и перекрестно «сшиваются».

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

Хронометрический метод предполагает определение времени образования фибринового сгустка при добавлении избытка высокоактивного тромбина к разведенной в 10 раз плазме (для снижения влияния антитромбиновых компонентов) при 37 °С. В этих условиях время реакции зависит в основном от концентрации фибриногена, которая определяется по калибровочному графику. Реже применяемый турбидиметрический кинетический метод сводится к двух-точечному определению скорости нарастания мутности среды при образовании фибрина после добавления к разведенной плазме тромбопластин-кальциевого реагента или препарата змеиного яда.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза и получения бедной тромбоцитами цитратной плазмы. При взятии капиллярной крови ее сразу перемешивают в пропорции 1:1 с антикоагулянтом. Материал для исследования стабилен в течение 8 ч при хранении в закрытой пластиковой или силиконированной стеклянной пробирке. Во избежание возможного искажения результатов нежелательно исследовать плазму, имеющую сгустки, следы гемолиза, а также полученную более чем за 8 ч до анализа.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Хронометрический метод требует предварительного построения калибровочного графика путем разведения стандартной нормальной плазмы буферным раствором для получения калибровочных проб, эквивалентных плазме с содержанием фибриногена от 1 до 6 г/л. Исследование проводят на коагулометре при 37 °С; к калибровочным пробам и разведенной буферным раствором в 10 раз исследуемой плазме добавляют раствор тромбина и определяют время до образования сгустка. Концентрацию фибриногена в исследуемой плазме находят по калибровочному графику. Если она превышает 5-6 г/л, для получения корректных данных рекомендуют повторить определение, разведя плазму буферным раствором не в 10, а в 20 раз, полученный результат умножить на 2.

Турбидиметрический метод схож с тестом рептилазного времени, но исследование проводят не на коагулометре, а на фотометрическом анализаторе, позволяющем определить кинетику нарастания мутности среды. Скорость помутнения при образовании фибрина зависит от исходной концентрации фибриногена в плазме, которая определяется по результатам исследования калибровочных проб (требуется многоточечная калибровка). Турбидиметрический метод используют в некоторых автоматических анализаторах гемостаза, в этом же тесте можно одновременно определить протромбиновое время.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

У взрослых — 1,8-4,0 г/л, у новорожденных — 1,2-3,0 г/л.

ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Хронометрический метод может давать некорректные результаты при дисфибриногенемии, а также при попадании в кровь большого количества гепарина (например, из венозного катетера). При исследовании капиллярной крови результат зависит от действия множества дополнительных интерферирующих факторов (форменных элементов крови, разного гематокрита), что снижает точность метода.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля качества определения фибриногена используют контрольную РНП-плазму, для калибровки - разведения стандартной плазмы либо стандартные растворы фибриногена. Разброс результатов при работе с одной и той же пробой плазмы не должен превышать 5%. Показания разных методов на одной и той же пробе плазмы могут существенно отличаться друг от друга, особенно при гипо- или гиперфибриногенемии. Именно поэтому в лаборатории рекомендуют придерживаться какого-либо одного метода, тщательно отладив его и регулярно проводя калибровку и контроль качества.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фибриноген синтезируется в печени и относится к группе белков острой фазы. Повышение его концентрации в плазме возможно при любой острофазовой реакции (воспалении, инфекциях, ожогах, травмах, в послеоперационном периоде, остром инфаркте миокарда), а также при болезнях почек, системных заболеваниях соединительной ткани, злокачественных новообразованиях и др. У здоровых женщин уровень фибриногена возрастает при беременности, введении эстрогенных препаратов и во время менструации.

Основные причины снижения содержания фибриногена — гиперпотребление при образовании большого количества микросгустков, распад в результате действия фибринолитических препаратов (стрептокиназы и т. п.) или нарушение синтеза при тяжелой патологии печени (циррозе, острой дистрофии), а также значительная гемодилюция. Необходимо учитывать, что тяжелые гнойно-воспалительные процессы, приводящие к развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, могут способствовать повышению уровня фибриногена как острофазного белка и тем самым маскировать его усиленное потребление.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение концентрации фибриногена — базовый метод исследования коагуляционных свойств плазмы, входящий во все скрининговые схемы. Исследование проводят для выявления причины и оценки степени риска кровотечений и тромбозов. При увеличении концентрации фибриногена резко повышается вязкость крови, но ее свертывание in vitro не ускоряется. Длительно повышенная концентрация фибриногена опасна, поскольку возрастает риск тромбозов и ишемии органов и тканей. При уменьшении количества фибриногена ниже 1 г/л возможны кровотечения.

**5. Антитромбин (активность/количество)**

Антитромбин — основной естественный ингибитор свертывания крови, первичный антикоагулянт. В присутствии гепарина антитромбин связывает и инактивирует тромбин и другие активные плазменные факторы — сериновые протеазы, предотвращая неконтролируемую коагуляцию.

Активность антитромбина в исследуемой плазме определяют по его способности инактивировать вносимый извне тромбин. При определении клоттинговым методом исследуемую плазму дефибринируют путем прогревания при 56 °С, быстрого охлаждения до 20-25 °С и центрифугирования с отбрасыванием осадка, вносят в стандартный раствор тромбина и инкубируют при 37 °С. Далее эту смесь добавляют к стандартной нормальной плазме (или к стандартному раствору фибриногена) и определяют время образования фибринового сгустка на коагулометре или в водяной бане при периодическом покачивании пробирки. Активность антитромбина находят по калибровочному графику, для построения которого проводят определение времени образования сгустка при аналогичной обработке ряда последовательных разведений контрольной нормальной плазмы с известной активностью антитромбина.

При использовании хромогенного метода в исследуемую плазму, разведенную буферным раствором с гепарином для активации антитромбина, вносят стандартное количество фактора Ха (На) и инкубируют при 37 °С. Затем в реакционную смесь вводят хромогенный субстрат, по истечении определенного времени останавливают реакцию добавлением уксусной кислоты и определяют оптическую плотность исследуемых образцов при А,=405 нм против бланка (буферный раствор, инкубируемый одновременно с пробой). Активность антитромбина в исследуемой плазме находят по калибровочному графику, для построения которого по описанной выше схеме проводят определение ряда последовательных разведений плазмы-калибратора с известным содержанием антитромбина.

Возможно количественное определение антитромбина (антигена) иммунохимигескими методами: иммуноферментный анализ, иммунохемилюминесцентным анализом и др. Методы стандарти¬зированы, могут быть выполнены на автоанализаторах и дают хорошо воспроизводимые результаты, но не позволяют судить об антикоагулянтной (гепарин-кофакторной) активности антитромбина.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза и получения цитратной плазмы. Исследование проводят в течение 2-4 ч после взятия крови; при необходимости возможно однократное замораживание-оттаивание плазмы. Не допускается наличия в материале сгустков и следов гемолиза. Липемия также может повлиять на результаты хромогенного теста.

ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

При определении клоттинговым методом плазму пациентов, которым накануне взятия крови вводили гепарин, предварительно обрабатывают сорбентом во избежание искажения результатов. В то же время при использовании препарата тромбина, содержащего инактиваторы гепарина, и при условии, что концентрация гепарина в плазме крови пациента не превышает 1 МЕ/мл, предварительное его удаление из плазмы сорбентом не является обязательным. При исследовании хромогенным методом образцов плазм с повышенным содержанием липидов (мутноватых) и билирубина (иктеричных) могут быть получены заниженные результаты.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Составляют 70-130% уровня нормальной плазмы.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Проверку методики проводят путем исследования стандартной контрольной плазмы или свежей пулированной плазмы от нескольких здоровых людей. Для контроля качества используют референтную нормальную пулированную плазму (РНП-плазма), срок ее годности — 2ч после разведения лиофилизированного препарата. Для обеспечения точности результатов при исследовании клоттинговым методом рекомендуют проводить определение на коагулометре, хромогенным методом — на фотометре, биохимическом анализаторе или анализаторе гемостаза с фотометрическим каналом.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уровень антитромбина может быть снижен при врожденной недостаточности (возможно снижение как функциональной активности, так и концентрации антитромбина), при диссеминированном внутрисосудистом свертывании, поздних гестозах, тяжелых поражениях печени, приеме эстрогенов и пероральных контрацептивов, а также при лечении L-аспарагиназой и длительном применении больших доз гепарина При выраженном снижении уровня антитромбина значительно увеличивается риск развития тромбозов; срочная коррекция этого состояния осуществляется путем инфузии препаратов антитромбина или свежезамороженной плазмы. Некоторое повышение уровня антитромбина в крови вследствие ускорения синтеза в печени возможно при беременности и во время менструации.

**Протеин С (активность/количество)**

Протеин С — важнейший ферментный фактор антикоагулянтной системы. Он синтезируется печенью (синтез зависит от витамина К) и постоянно циркулирует в крови в неактивном виде. После активации комплексом «тромбин-тромбомодулин» на поверхности неповрежденных эндотелиальных клеток и тромбоцитов рассеянного склероза в присутствии своего кофактора — протеина S — частично разрушает неферментные плазменные факторы Va и Villa, сдерживая активность коагуляционных процессов. Имеются данные об участии рассеянного склероза в активации фибринолиза.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

Протеин С, содержащийся в исследуемой плазме, переходит в активное состояние после добавления специфического неферментного активатора из змеиного яда. При использовании коагуляционного (клоттингового) метода об активности рассеянного склероза судят по степени удлинения активированного частичного тромбопластинового времени в смеси дефицитной по рассеянному склерозу и исследуемой плазмы, в которой при активации рассеянного склероза происходят частичное расщепление факторов Va и Villa и уменьшение скорости коагуляционных реакций по сравнению с «чистой», дефицитной по протеину С субстратной плазмой, в которой удлинения активированного частичного тромбопластинового времени в тех же условиях практически не бывает. В хромогенном методе определяют скорость расщепления пептидного хромогенного субстрата активированным протеином С, содержащимся в исследуемой плазме; количество высвобождающегося при этом красителя прямо пропорционально активности рассеянного склероза. Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза и получения цитратной плазмы. Исследование проб должно быть проведено не позднее 2-4 ч после получения. Для более длительного хранения допускается однократное замораживание плазмы при -20 °С; оттаивание следует проводить быстро (в теплой воде), последующий анализ — в течение 1 ч. Не исследуют плазму, содержащую гепарин, имеющую сгустки и следы гемолиза.

МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании клоттинговым методом готовят смесь разведенной буферным раствором исследуемой плазмы, активатора протеина С и дефицитной по субстратной плазмы, инкубируют ее при 37 °С и определяют активированное частичное тромбопластиновое время, добавляя кальция хлорид. Количественный расчет результатов проводят по калибровочному графику, для построения которого используют разведения буфером (от 1:5 до 1:40) стандартной плазмы с известной активностью, подставляя эти калибровочные пробы взамен разведенной исследуемой плазмы и определяя их активированное частичное тромбопластиновое время с помощью коагулометра или вручную. Все исследования проводят в дублях, рассчитывая среднее значение.

При хромогенном методе в исследуемую плазму добавляют активатор протеина С и инкубируют при 37 °С. Затем в реакционную смесь вводят хромогенный субстрат, по истечении определенного времени останавливают реакцию добавлением кислоты и определяют оптическую плотность исследуемых образцов при А,=405 нм против бланка (буферный раствор, инкубируемый одновременно с пробой). Активность PC в исследуемой плазме находят по калибровочному графику, для построения которого по той же схеме проводят определение стандартной плазмы-калибратора и ряда ее последовательных разведений. Дополнительные условия построения калибровочного графика и диапазон линейности определяются фирмой-производителем.

Иммуноферментное определение проводят на планшетах с фиксированными моноклональными антителами, с которыми связывается PC из добавляемой исследуемой плазмы. После отмывки и добавления конъюгата анти-РС-антител с пероксидазой образуются «сэндвич»-структуры, которые окисляют хромогенный субстрат при инкубации с перекисью водорода. Степень окраски реакционной среды, зависящая от количества PC в образце плазмы, определяется спектрофотометрически при > или =450 нм. Расчет проводят по калибровочному графику, построенному по данным исследования ряда разведений референтной плазмы.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Составляют 70-140% уровня нормальной плазмы.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уменьшение активности и/или концентрации PC свидетельствует о нарушениях его синтеза (врожденной недостаточности, периоде новорожденности и пожилом возрасте, тяжелой патологии печени), либо о быстром расходовании, либо об аномалиях структуры и функциональной неполноценности (действие варфарина). Очень низкие показатели активности PC могут наблюдаться на фоне лечения варфарином. Небольшое повышение содержания протеина С возможно при беременности и приеме эстрогенных препаратов, а также при некоторых заболеваниях почек.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Врожденная недостаточность PC является тромбофилическим состоянием и требует профилактических мер для предупреждения тромбозов. Снижение активности протеина С до 50% нормы и ниже на фоне терапии антикоагулянтами непрямого действия может приводить к кожным некрозам (варфариновым некрозам), которые встречаются нечасто, но протекают тяжело. В связи с этим использование непрямых антикоагулянтов у пациентов с дефицитом PC следует проводить с особой осторожностью под контролем активности протеина С; при необходимости — с восполнением его дефицита свежезамороженной плазмой или препаратом рекомбинантного PC.

Плазминоген (количество/максимальная активность)

Плазминоген — главный компонент фибринолитической системы — синтезируется в печени и почках и постоянно находится в крови. Образующийся из плаз-миногена под действием активаторов плазмин разрушает фибриновые сгустки и способствует восстановлению кровотока.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

После максимальной активации стрептокиназой плазминогена в исследуемой плазме определяют скорость расщепления пептидного хромогенного субстрата (по нарастанию окраски реакционной среды, метод фиксированного времени). Количество образуемого при этом окрашенного вещества прямо пропорционально количеству активности плазминогена. Для определения количества плазминогена можно использовать и метод иммуноферментного анализа.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Те же, что в тесте лизиса зуглобулинов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение проводят на фотометре, биохимическом анализаторе или анализаторе гемостаза с фотометрическим каналом. Исследуемую бестромбоцитарную плазму разводят буферным раствором, добавляют стрептокиназу и инкубируют при 37 °С. Затем в реакционную смесь вводят хромогенный субстрат и по истечении определенного времени останавливают реакцию добавлением уксусной кислоты. Свежеразведенную стандартную нормальную плазму с известным количеством плазминогена, входящую в набор, обрабатывают по такой же процедуре, пробу-бланк — так же, как стандартную, но без добавления стрептокиназы. После остановки реакции определяют оптическую плотность исследуемого и стандартного образцов против бланка при А=405 нм и вычисляют количество плазминогена (активность плазмина) в исследуемом образце в процентах стандартной плазмы.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Составляют 75-135% уровня стандартной плазмы; при определении ИФА-методом — около 200 мкг/мл.

ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

На результаты исследования влияют лекарственные препараты — ингибиторы протеолиза (контрикал, трасилол и др.). Прием эстрогенсодержащих препаратов, стимулирующих синтез белков (в том числе плазминогена) в печени, также может отразиться на результатах теста.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Проверку качества реактивов и методики проводят путем исследования свежеразведенной лиофилизированной контрольной плазмы.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Абсолютное снижение уровня плазминогена почти всегда связано с его гиперпотреблением в результате активации фибринолиза, сопровождающей диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, массивные и/или длительные тромбозы, тромбоэмболии, инфаркт миокарда и др., а также процедуру тромболизиса. Врожденное снижение концентрации плазминогена часто сочетается с его функциональной неполноценностью и является тромбофилическим состоянием. Гипоплазминогенемия может также развиваться при хронической тяжелой патологии печени и почек; в то же время к концу беременности, при инфекциях, воспалительных процессах, опухолях, травмах концентрация/активность плазминогена может нарастать.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест используют для оценки состояния фибринолиза и резерва плазминогена у пациентов. Лечение активаторами плазминогена (стрептокиназой, урокиназой, алтеплазой и др.) может быть эффективным только при его достаточном уровне в крови; для экстренного восполнения плазминогена можно ввести свежезамороженную плазму.

Тканевый активатор плазминогена

Тканевый активатор плазминогена — важный ферментный фактор фибринолитической системы, основной активатор плазминогена на поверхности фибри-нового сгустка. Тканевый активатор плазминогена синтезируется и секретируется клетками эндотелия. Время его полужизни в кровотоке — около 5 мин (захватывается клетками печени), в плазме крови — дольше. Потеря активности тканевого активатора плазминогена происходит при связывании с избытком ингибитора активатора плазминогена, также секретируемым эндотелиальными клетками; в кровотоке в основном обнаруживают стабильные неактивные комплексы. Уровень тканевого активатора плазминогена увеличивается с возрастом, после физических нагрузок и стрессов.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

Хромогенный метод основан на определении степени активации стандартного количества плазминогена тканевым активатором, содержащимся в исследуемой разведенной плазме. В дальнейшем плазмин расщепляет хромогенный субстрат с образованием окраски, интенсивность которой измеряется на фотометре или био-химическом анализаторе методом фиксированного времени.

Иммуноферментный метод с моноклональными антителами позволяет определять количество как свободной, так и связанной формы тканевого активатора плазминогена (антигена). В состав набора входит плазма-калибратор, уровень тканевого активатора плазминогена в которой соотнесен с международным стандартом.

Комбинированный метод, сочетающий классический твердофазный иммуноферментный анализ с хромогенным методом, позволяет определять активность и количество тканевого активатора плазминогена. Комбинированный метод основан на использовании антител, не влияющих на функциональную активность тканевого активатора плазминогена и иммобилизованных в лунках микропланшета. Их используют для связывания тканевого активатора плазминогена, содержащегося в плазме, с поверхностью лунок. После первой инкубации несвязавшиеся компоненты плазмы удаляются промывкой. Затем в лунки добавляют субстратный раствор для определения активности, содержащий Glu-плазминоген, CNBr-фрагменты фибриногена и хромогенный субстрат плазмина. Связавшийся тканевый активатор плазминогена активирует Glu-плазминоген с образованием плазмина. В результате реакции между плазмином и хромогенным субстратом плазмина образуется окрашенный продукт. Интенсивность развившегося окрашивания, пропорциональную количеству активного тканевого активатора плазминогена в исследуемом образце, измеряют фотометрически. После измерения раствор для определения активности удаляют промывкой и в лунки добавляют конъюгат моноклональных антиЧРА-антител, распознающих обе формы тканевого активатора плазминогена — активную и связанную с пероксидазой хрена. По окончании инкубации антителами и промывки в лунки добавляют субстрат, в результате чего образуется окрашенный продукт. Интенсивность окрашивания пропорциональна общей концентрации тканевого активатора плазминогена в тестируемом образце, на этой стадии определяется как свободная форма тканевого активатора плазминогена, так и комплекс.

О способности тканевого активатора плазминогена высвобождаться из клеток сосудистой стенки при дозированном венозном стазе свидетельствует результат манжеточной пробы: на плечо накладывают манжету тонометра, раздувают ее до 40 мм Hg и держат 10-15 мин; до и после процедуры берут кровь и определяют в плазме уровень тканевого активатора плазминогена или скорость фибринолиза.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Можно использовать цитратную или ЭДТА-плазму, полученную у пациента утром натощак; исследование должно быть проведено не позднее 8 ч с момента взятия крови или 4 ч после размораживания. Тканевый активатор плазминогена неустойчив, для предупреждения его быстрого ингибирования in vitro пробы крови подкисляют (выпускаются пробирки с кислым антикоагулянтом). На результаты иммуноферментного анализа не влияют гепарин в концентрации до 2 МЕ/мл и ИАП-1 — до 100 нг/мл.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Более 10 нг/мл. При стимуляции уровень тканевого активатора плазминогена возрастает до 15 нг/мл.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возрастание концентрации тканевого активатора плазминогена наблюдается при остром инфаркте миокарда, инсульте, заболеваниях печени, сепсисе и др. Быстрое увеличение концентрации тканевого активатора плазминогена как за счет выброса из клеточных депо, так и за счет ускорения синтеза вызывается венозной окклюзией, физической нагрузкой, введением десмопрессина, катехоламинов и может повышать фибринолитическую активность. Вместе с тем при медленном нарастании плазменной концентрации повышенный уровень тканевого активатора плазминогена (антигена) часто сочетается с высоким уровнем ИАП-1, что сопровождается снижением фибринолитического потенциала плазмы.

Уровень тканевого активатора плазминогена бывает снижен у пациентов с тромботическими нарушениями (тромбозом глубоких вен, инфарктом миокарда, ишемическим инсультом), злокачественными новообразованиями и тяжелым сепсисом. Снижение тканевого активатора плазминогена часто ведет к недостаточности фибринолиза и является фактором риска развития тромбозов. Определение тканевого активатора плазминогена проводят для выявления причины тромбофилии у больных, а также в ходе терапии активаторами фибринолиза (алтеплазой и др.) Выявлена прямая связь между уровнем тканевого активатора плазминогена (антигена) и степенью риска развития и прогрессирования сердечно-сосудистой патологии; повышение тканевого активатора плазминогена после инфаркта миокарда рассматривается как маркер дисфункции эндотелия и неблагоприятный прогностический фактор. Нарушение высвобождения tPA из сосудистого эндотелия после венозного стаза описано у больных с тромбозами и патологией почек.

Повышенные уровни tPA-антигена и активности тканевого активатора плазминогена. Такие результаты свидетельствуют об увеличении выброса тканевого активатора плазминогена, который не сбалансирован соответствующим усилением выброса PAI-1. Это указывает на пер-вичный гиперфибринолиз и, вероятно, приведет к образованию плазмина, расходу ингибиторов плазмина и деградации других белков плазмы, таких как фибриноген и фактор VIII.

Повышенный уровень tPA-антигена и нормальная активность тканевого активатора плазминогена. Такой результат отражает длительное накопление тканевого активатора плазминогена из-за снижения его деградации в печени. Это может наблюдаться при различных заболеваниях печени. Если повышение уровня антигена нейтрализуется одновременным повышением уровня ингибитора PAI-1, заметным остается только повышение уровня антигена тканевого активатора плазминогена. Кроме того, к значительному повышению уровня tPA-антигена при низкой или слабоповышенной активности тканевого активатора плазминогена может приводить гепариновая терапия.

Сниженные tPA-антиген и tPA-активность. Такой результат может быть безошибочно получен только при тестировании образцов плазмы при венозной окклюзии. Такие образцы плазмы должны показывать повышение как активности, так и антигена. Если и активность, и антиген понижены в таких образцах, это свидетельствует о неспособности организма пациента адекватно реагировать на данный тип стимуляции. Приблизительно 10% всех пациентов, страдающих тромбозом, попадают в эту группу.

Сниженная tPA-активность при нормальном уровне tPA-антигена. Аналогично предыдущему случаю такой результат может наблюдаться только при тестировании образцов плазмы с ожидаемыми высокими значениями tPA- активности и tPA-антигена, например при венозной окклюзии. У таких пациентов происходит нормальная секреция tPA-антигена в ответ на венозную окклюзию или иную стимуляцию. Однако слишком высокий уровень PAI-1 нейтрализует увеличившуюся активность тканевого активатора плазминогена, в результате чего наблюдается высокий уровень комплекса. Приблизительно 20% пациентов с тромбофилией попадают в эту группу.

Ингибитор активатора плазминоген

Ингибитор активатора плазминогена — основной фактор, связывающий и ингибирующий как тканевый, так и урокиназный активаторы плазминогена, — секретируется эндотелиальными клетками. Ингибитор активатора плазминогена также может высвобождаться из тромбоцитов. Синтез ингибитора активатора плазминогена значительно усиливается при повреждении эндотелия, что приводит к замене антикоагулянтного потенциала эндотелия на прокоагулянтный.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

Двухэтапный хромогенный метод определения ингибитора активатора плазминогена основан на добавлении к исследуемой плазме стандартного количества тканевого активатора; при этом активность последнего частично подавляется присутствующим в плазме пациента ингибитора активатора плазминогена. Оставшаяся активной часть тканевого активатора активируется добавленным в избытке плазминогеном; образовавшийся плазмин гидролизуется хромогенным субстратом с образованием окраски (ее интенсивность обратно пропорциональна содержанию ингибитора активатора плазминогена). Параллельно проводят исследование стандартной контрольной плазмы.

Иммунохимигескими тестами можно определить как общую концентрацию антигена ингибитора активатора плазминогена (классическим ИФА-методом), так и активную (свободную) форму ингибитора активатора плазминогена по ее способности связываться с молекулами тканевого антигена, иммобилизированными в лунке планшета, и с конъюгатом пероксидазы с моноклональными антителами к ингибитору активатора плазминогена. Тесты специфичны, на их результаты не влияют другие ингибиторы.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Ингибитор активатора плазминогена неустойчив, поэтому анализ необходимо проводить в кратчайшие сроки после взятия крови, лучше с использованием CTAD-пробирок (с добавлением стабилизаторов для гемостаза). Особое внимание уделяют режиму получения цитратной бестромбоцитной плазмы, поскольку ингибитор активатора плазминогена может дополнительно высвобождаться из тромбоцитов. Плазму переносят в пластиковые пробирки и хранят на льду до исследования. Уровень ингибитора активатора плазминогена в утренней пробе крови вдвое превышает его концентрацию в крови, взятой днем.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Общий ИАП-1 — 2-40 нг/мл (рост уровня с возрастом), свободный (актив¬ный) - 1-7 ЕД/мл.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ, ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ингибитор активатора плазминогена - белок острой фазы, его концентрация в плазме возрастает вместе с интерлейкином-1. Повышенный уровень ингибитора активатора плазминогена отмечается после травм и операций, при венозных тромбозах, воспалении, инфекционных процессах и сепсисе, злокачественных опухолях, ожирении, болезнях печени, инфаркте миокарда и коронарных заболеваниях, синдроме привычного невынашивания беременности, а также при лечении глюкокортикоидами. Некоторое повышение ингибитора активатора плазминогена (одновременно с тканевый антигеном) возможно при нормальной беременности. Уровень общего ингибитора активатора плазминогена1 более 100 нг/мл и активность свободного ингибитора активатора плазминогена выше 20 ЕД/мл могут указывать на снижение фибринолитической активности и повышенный риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и тромботических осложнений. Прогрессирующий подъем ингибитора активатора плазминогена при остром инфаркте миокарда является неблагоприятным прогностическим признаком и свидетельствует о дисфункции эндотелия.

D-димер

D-димер — продукт распада фибринового сгустка — представляет собой моле-кулярные фрагменты поперечно сшитого фибрина, образуемые при его про- теолитической деградации активным плазмином. В структуре D-димера имеются D-D-связи (поперечные сшивки), которые отсутствуют в фибриногене, фибринмономере и рыхлом фибринполимере. D-D-связи образуются в результате действия фактора XIIIa, уплотняют фибриновый сгусток и не разрушаются плазмином.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза и получения цитратной плазмы. На определение D-димера мало влияют погрешности техники взятия крови и примесь тромбоцитов. Не рекомендуют исследовать плазму, в которой образовались сгустки in vitro. Возможно определение D-димера в сыворотке, но только при условии полного свертывания крови и предотвращения фибринолиза во взятом образце (что достаточно трудно обеспечить). При получении сыворотки, во избежание новообразования D-димера in vitro, сгусток необходимо быстро извлечь; к пробе крови можно предварительно добавить ингибитор фибринолиза (е-аминокапроновую кислоту).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение D-димера в плазме или сыворотке проводят методами латекс-агглютинации, иммунохроматографии (мембранной иммунодиффузии), иммунотурбидиметрии с усилением пластиковыми частицами, иммунохемилюминесценции; в цельной крови — исследованием агглютинации эритроцитов пациента в присутствии биспецифичных антител к D-димеру и поверхностному белку эритроцитарных мембран. Для полуколичественной оценки в тесте латекс-агглютинации определяют наибольшее разведение плазмы или сыворотки, дающее видимую агглютинацию латексных частиц с фиксированными на них моноклональными антителами к D-димеру. В иммунохроматографическом полуколичественном тесте при связывании D-димера с конъюгатом антитело-золото интенсивность окрашивания тестовой зоны на картридже сравнивают со специальной цветовой шкалой.

Для точной количественной оценки результатов используют рефлектометрические приборы, позволяющие определить содержание D-димера с точностью до 0,1 мг/л в интервале от 0,1 до 20,0 мг/л. Используют также иммуноферментный метод с латексным усилением, обладающий высокими аналитическими характеристиками. В целом для анализа D-димера предпочтительнее количественные методы, позволяющие вести временной мониторинг анализа. Результаты характеризуются достаточно высокой специфичностью благодаря использованию иммунных методов. ИФА-метод характеризуется более высокой чувствительностью по сравнению с турбидиметрией и иммунохроматографией, поэтому этот метод оптимален для мониторинга уровня D-димера, за исключением случаев неотложных состояний. Описана возможность искажения результатов полуколичественного теста при ревматоидном факторе.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

В количественных тестах — 110-300 нг/мл, или менее 0,5 мг/л; в качественных тестах D-димер у здоровых людей не выявляется (ниже минимального уровня).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значительное повышение D-димера наблюдается при диссеминированноv внутрисосудистоv свертываниb крови (начиная с ранних стадий), тромбоэмболии легочной артерии, артериальных и венозных тромбозах, а также после травм и хирургических операций (особенно на крупных костях и суставах). Уровень D-димера бывает повышен при инфаркте миокарда, тромболитической терапии, некоторых инфекционных заболеваниях и злокачественных новообразованиях. Возможен некоторый рост уровня D-димера при беременности, сахарном диабете, длительной иммобилизации, в пожилом возрасте и т. д. D-димер является достаточно инерционным показателем ввиду отно¬сительно длительной циркуляции в кровотоке (период полувыведения — более 24 ч).

Чувствительность теста в диагностике венозного тромбоэмболизма очень высока — 90-97%, специфичность же невелика (60-70%). Таким образом, отрицательный результат анализа или значение ниже точки cut-off практически всегда свидетельствует об отсутствии тромбов в кровеносном русле. Ложноотрицательные результаты редки (при очень малом размере тромба, угнетении фибринолиза и/или резком дефиците плазмина). При оценке результатов исследования, особенно количественного, нужно учитывать, что повышение уровня D-димера указывает на образование фибрина и его лизис плазмином, а в каком отделе сосудистого русла, в каком объеме и по какой причине это произошло — необходимо решать в каждом конкретном случае.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная цель исследования D-димера — исключение наличия тромбов в сосудистом русле (при дифференциальной диагностике тромбоза глубоких вен нижних конечностей, тромбоэмболии легочной артерии и др.). Его можно применять как тест первой линии, т. е. у всех больных с подозрением на венозный тромбоэмболизм, с последующим проведением дополнительных исследований у пациентов с положительными результатами теста на D-димер. Другой стратегический подход — предварительная оценка по балльным шкалам. При высокой клинической вероятности тромбоза или эмболии измерение D-димера не проводят, а сразу выполняют дополнительные диагностические процедуры и начинают активную антикоагулянтную терапию; при средней или низкой вероятности диагноза измеряют уровень D-димера и в зависимости от полученного результата принимают решение о дальнейших действиях. Тест можно использовать в диагностике диссеминированного внутрисосудистого свертывания и при определении эффективности антитромботической терапии. При отсутствии срочности (не в ургентной ситуации) значение имеет только количественное определение D-димера.

Растворимые фибрин-мономерные комплексы

Образование фибрин-мономеров — начальная реакция формирования сгустка; количество фибринолиза зависит от степени тромбинемии. В процессе физиоло-гической активации фибринолиза продукты деградации фибрина и фибриногена образуют комплексы с фибрин-мономерами, в результате формируются растворимые фибрин-мономерные комплексы.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

РФМК-тест — паракоагуляционная проба, позволяющая оценить содержание в плазме крови растворимых фибрин-мономерных комплексов, способных преципитироваться в присутствии некоторых химических агентов. В зависимости от активатора преципитации обозначают конкретный метод выявления РФМК. В частности, о-фенантролиновый метод основан на регистрации времени появления хлопьев или зерен паракоагулята при добавлении к исследуемой плазме раствора о-фенантролина, при этом скорость образования хлопьев зависит от концентрации растворимых фибрин-мономерных комплексов. В стеклянной пробирке при комнатной температуре и непрерывном покачивании смешивают исследуемую плазму с раствором о-фенантролина; на черном фоне в проходящем свете визуально определяют время появления хлопьев паракоагулята. Полуколичественную оценку проводят сопоставлением времени (если оно менее 120 с) с концентрацией растворимых фибрин-мономерных комплексов по специальной таблице; чем меньше время, тем выше содержание фибрин-мономерных комплексов. Оценка результатов субъективна, и в целом точность метода невысока.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза и получения цитратной плазмы. Ложноположительные результаты возможны при попадании в пробирку первых капель, содержащих фрагменты тканей, и недостаточно быстром перемешивании с антикоагулянтом. Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки и полученной более чем за 2-4 ч до анализа. Возможно искажение результатов при парапротеинемии, инфузии некоторых белковых препаратов и кровезаменителей. Завышенные значения могут быть у беременных и новорожденных.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Хлопья не должны образовываться в первые 70-120 с наблюдения (отрицательный результат пробы, концентрация растворимых фибрин-мономерных комплексов — <35-40 мг/л).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Положительный результат является признаком тромбинемии и наблюдается при активации свертывания, тромбофилических состояниях (в том числе при злокачественных новообразованиях), а также при тромбозах, эмболиях и диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови. По результатам РФМК-теста судят об активности свертывания крови, а по динамической оценке уровня растворимых фибрин-мономерных комплексов — о развитии процесса и эффективности терапевтических мероприятий. Однако ввиду невысокой чувствительности, отсутствия калибровочных и контрольных материалов и субъективности оценки результатов РФМК-тест можно рассматривать только как ориентировочный. Применение паракоагуляционных тестов нецелесообразно при доступности современных стандартизированных методик оценки активации свертывания и фибринолиза.