**Методические рекомендации к занятию № 10**

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

**Тема:** **Клинико-биохимические методы исследования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.**

***Диагностика патологии гемостаза направлена на решение следующих задач:***

* определение причин различных видов кровоточивости и тромбозов, подбор специфических методов профилактики и лечения;
* отбор групп риска для предупреждения послеоперационных кровотечений и тромбоэмболий;
* снижение летальности и инвалидизации при неотложных и критических состояниях, протекающих с ДВС-синдромом;
* решение проблем привычного невынашивания беременности при антифосфолипидном синдроме (АФС), тромбофилиях;
* контроль безопасности и эффективности терапии антикоагулянтами, антиагрегантами, тромболитиками, средствами заместительной терапии.

**Диагностика нарушения системы гемостаза**

1. Методы исследования сосудисто-тромбоцитарного (первичного) гемостаза

2. Методы исследования коагуляционного гемостаза

3. Определение первичных физиологических антикоагулянтов

4. Исследования фибринолитической (плазминовой системы)

5. Определение маркеров внутрисосудистой активации системы гемостаза

6. Лабораторный контроль за гемостатической и антитромботической терапией

7.Диагностика антифосфолипидного синдрома

8. Молекулярная диагностика тромбофилий

9. Диагностика основных нарушений системы гемостаза

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

Исследование сосудисто-тромбоцитарного гемостаза начинают с общих тестов:

* оценка резистентности (ломкости) капилляров (манжеточная проба)
* времени кровотечения (показатель функции тромбоцитов)
* подсчета числа тромбоцитов.

Затем, при выявлении отклонений от нормы, проводят более развернутыв исследования (или одномоментно), включающие:

* Тромбоцитограмму: определение количества, размеров и степень зрелости тромбоцитов (из ОАК)
* Определение агрегационной функции тромбоцитов
* Определение фактора Виллебранда
* Определение ретракции кровяного сгустка

**1. Определение количества тромбоцитов**

**Преаналитические особенности**

Определение количества тромбоцитов возможно в венозной или капиллярной крови, стабилизированной цитратом натрия или ЭДТА. При исследовании образцов венозной крови следует использовать пластиковые вакуумные пробирки или микроконтейнеры с нанесенным на стенки мелкодисперсным порошком солей ЭДТА (для гематологических анализаторов). При получении цитратной крови следует точно соблюдать ее разведение цитратом 9:1; при значительном отклонении от нормы показателей гематокрита объем цитрата необходимо скорригировать. Пробирки с кровью важно тщательно перемешать переворачиванием или вращением (без встряхивания). Температура при транспортировке образцов крови должна быть комнатной, поскольку при охлаждении происходят активация и агрегация тромбоцитов. Подсчет тромбоцитов необходимо выполнить в течение 4 ч после взятия венозной крови.

**ИНТЕРФЕРЕНЦИИ**

В охлажденных образцах крови и при гемолизе возможно занижение количества тромбоцитов. При наличии аутоантител к тромбоцитам соли ЭДТА нередко индуцируют их агрегацию, в результате при исследовании на гематологических анализаторах может наблюдаться псевдотромбоцитопения. Проблема решается применением забуференного раствора цитрата натрия при взятии крови и определении количества тромбоцитов микроскопическим методом.

**Аналитические технологии, методики исследования**

**Микроскопический метод подсчета тромбоцитов**

Основан на подсчете тромбоцитов в камере Горяева с использованием обычного микроскопа или прибора с фазово-контрастной приставкой после разведения крови и лизиса эритроцитов раствором оксалата аммония. Метод требует опыта, напряжения зрения, концентрации внимания. Коэффициент вариации результатов исследования у опытного лаборанта достигает 10%.

**Подсчет клеток крови в гематологическом анализаторе**

Эти приборы существенно облегчают и ускоряют процедуру и повышают точность подсчета тромбоцитов. Большинство современных автоматических гематологических анализаторов позволяют определить дополнительные показатели тромбоцитарного звена: MPV, PDW, РСТ. Коэффициент вариации при подсчете тромбоцитов в гематологических анализаторах составляет менее 3-5%. На точность подсчета существенное влияние оказывают качество и надежность используемых калибраторов, а также соблюдение правил преаналитического этапа.

**ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

Для оценки качества подсчета тромбоцитов на гематологических анализаторах существуют контрольные образцы с разным содержанием этих клеток; в то же время не существует общепринятых рекомендаций по использованию этих же образцов для определения микроскопическим методом. Следует периодически контролировать воспроизводимость результатов определения количества тромбоцитов разными лаборантами.

**РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ**

У здорового человека в периферической крови содержание тромбоцитов, согласно нормам, принятым в России, колеблется в диапазоне 180-320х109/л. На гематологических анализаторах, поступивших из-за рубежа, установлены референтные значения в диапазоне 150-400х109/л. Различия норм могут быть связаны, в частности, с разными требованиями к подготовке пациентов к исследованию: в России требуется сдача крови натощак, в странах Западной Европы допускается сдача крови после завтрака.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Тромбоцитопениями считают состояния, при которых количество тромбоцитов в периферической крови составляет менее 150х109/л, тромбоцитозами — более 400х109/л, диапазоны 150-180х109/л и 320-400х109/л — «серая» зона. При сохраненной способности к адгезии и агрегации геморрагический синдром развивается лишь при количестве тромбоцитов менее 30х109/л, а угрожающие жизни спонтанные кровотечения в большинстве клинических ситуаций возможны при количестве тромбоцитов менее 15х109/л. Эти значения имеют условный характер, поскольку частота и выраженность геморрагий зависят от фонового заболевания и функциональной способности тромбоцитов.

**Клиническое применение результатов исследования**

Тромбоцитопении широко распространены в клинической практике и могут бы как наследственными, так и приобретенными. Их этиологию уточняют на основе жалоб, анамнестических, физикальных и лабораторных данных. Весьма важно начинать диагностический поиск с исключения вторичных форм тромбоцитопений, развивающихся вследствие нарушения выработки тромбоцитов в костном мозге (гипоплазий и аплазий костного мозга, лейкозов, аномалии Мея-Хегглина, синдрома Вискотта-Олдрича), уменьшения продолжительности их циркуляции при спленомегалиях (циррозе печени, синдроме Фелти, болезни Гоше, врожденных гемолитических анемиях, тромбозе селезеночной вены, некоторых инфекционных заболеваниях и др.), заболеваниях иммунного генеза (антифосфолипидном синдроме, лекарственных тромбоцитопениях, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре) и при избыточном потреблении в ходе внутрисосудистой коагуляции (ДВС-синдроме, болезни Мошковича, гемолитико-уремическом синдроме).

Тромбоцитозы всегда носят приобретенный характер. Реактивные тромбоцитозы часто встречаются после спленэктомии, кровотечений, родов, гемолиза, хирургических вмешательств, а также на фоне онкологических, воспалительных или гнойных заболеваний. Исход подобных тромбоцитозов, как правило, благоприятный, их продолжительность зависит от особенностей фонового заболевания или состояния, а количество тромбоцитов не превышает 1000х109/л. Тромбоцитоз также возможен при миелопролиферативных заболеваниях (хроническом миелолейкозе, миелофиброзе, эссенциальной тромбоцитемии, эритремии, мегакариоцитарном лейкозе). Очень часто на фоне этих заболеваний наблюдаются нарушения реологических свойств крови и/или различные аномалии тромбоцитов. В последнем случае, а также при количестве тромбоцитов более 700х109/л у пациентов повышается риск возникновения тромбозов.

**2. Время кровотечения**

**2.1. Метод Дьюка**

Определение длительности кровотечения является способом, позволяющим уточнить состояние сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза in vivo. Методический подход был впервые предложен Милианом в 1901 г. и модифицирован Дьюком в 1910 г. Все его варианты предполагают выполнение микроразреза кожного покрова с использованием скарификатора или другого стандартного режущего устройства (с ограничением глубины раны).

**Количество тромбоцитов в крови**

Референсные значения: 170-350x109/л

СНИЖЕНИЕ ЧИСЛА тромбоцитов (<170х109/л):

• острый ДВС-синдром;

• острый лейкоз и миелодиспластические синдромы;

• гипо- и апластические анемии;

• нарушение образования в организме тромбоцитопоэтина;

• химиотерапия и лучевая терапия;

• тромботическая тромбоцитопеническая пурпура и гемолитико-уремический синдром;

• спленомегалия и гепатолиенальный синдром;

• гепарин-индуцированная тромбоцитопения;

• эклампсия и преэклампсия;

• экстракорпоральное кровообращение;

• гемодиализ у больных с хронической почечной недостаточностью, гемосорбция;

• интенсивная трансфузионная терапия;

• пароксизмальная ночная гемоглобинурия;

• иммунные формы патологии (СКВ и др. коллагенозы, АФС, иммунная тромбоцитопеническая пурпура);

• дефекты при получении крови для исследования - псевдотромбоцитопения в случае использования ЭДТА в качестве стабилизатора крови.

ПОВЫШЕНИЕ ЧИСЛА тромбоцитов (>350х109/л):

• мегакариоцитарные и миелолейкозы, эритремия;

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

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Ведущая роль в остановке кровотечений в зоне микроциркуляции (артериолах, прекапиллярах, капиллярах и венулах) принадлежит тромбоцитам. При снижении их количества или нарушении способности тромбоцитов к адгезии и агрегации часто наблюдается кровоточивость из мелких сосудов кожи и слизистых оболочек (микроциркуляторный тип кровоточивости). Такие клинические проявления очень часто сочетаются с удлинением времени кровотечения после выполнения стандартного микроразреза кожи.

**ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ**

В помещении, где выполняют исследование, температура должна быть не ниже 18 °С. При выполнении исследования методом Дьюка для улучшения кровотока рекомендуют согреть мочку уха между пальцами. Ряд медикаментов способен удлинить время кровотечения. В тех случаях, когда применялись лекарственные препараты, содержащие ацетилсалициловую кислоту, и другие нестероидные противовоспалительные средства, исследование должно быть отложено на 9-10 сут. Во избежание инфицирования место разреза обрабатывают 70% раствором этилового спирта. Важно дождаться полного испарения спирта в месте предполагаемого микроразреза, поскольку его попадание в рану приводит к преждевременной коагуляции. Результаты теста могут быть искажены под влиянием нестандартного скарификатора, неглубокого разреза кожи, наличия анемии, из-за особенностей кожных покровов пациента, эффекта преждевременного склеивания краев раны.

**2.2. Определение длительности кровотечения in vivo. Метод Айви**

Существует несколько схожих методов для оценки длительности кровотечения, наилучшей воспроизводимостью и относительно малой травматичностью отличается метод Айви. Стандартизация в этом методе достигается одинаковой глубиной кожного разреза созданием стаза в венах верхней конечности путем наложения манжеты сфигмоманометра на плечо и поддержания в ней давления на уровне 40 мм рт.ст., что предупреждает преждевременное склеивание краев раны из-за коллапса венул в области разреза. В оригинальном варианте для получения достоверных результатов наносят три разреза и вычисляют среднее время кровотечения. Разработаны и широко используются специальные устройства для нанесения стандартного разреза кожи, такие как Simplate II (два разреза длиной 6 мм и глубиной 1 мм) или Triplett bleeding time device (5 и 1 мм соответственно). При достаточном навыке исследователя коэффициент вариации метода не превышает 10%.

**2.3. Моделирование длительности кровотечения (исследование in vitro с помощью прибора PFA-100)**

В последнее время появились образцы оборудования, способные оценивать адгезию и агрегацию тромбоцитов при прохождении цельной цитратной крови через искусственные капилляры, т. е. моделировать определение времени кровотечения in vitro (PFA-100). Это достигается регистрацией скорости образования тромбоцитарных агрегатов в исследуемой крови, проходящей через сменный картридж с капилляром и мембраной, на которой фиксированы коллаген и адреналин, и времени закрытия апертуры картриджа («closure time). При нарушении функции тромбоцитов, недостаточном их количестве и при болезни фон Виллебранда наблюдается удлинение времени формирования тромбоцитарной пробки. Коэффициент вариации метода не превышает 10%, но результаты зависят от гематокрита и количества тромбоцитов, что является относительным недостатком.

Приведенные варианты теста обладают невысокими диагностическими специфичностью (удлинение времени кровотечения после стандартного разреза кожи наблюдается при тромбоцитопении, тромбоцитопатии, авитаминозе С, болезни фон Виллебранда и др.) и чувствительностью (длительность кровотечения зачастую остается нормальной при тромбоцитопении, в ряде ситуаций до 50х109/л, и при легком течении болезни фон Виллебранда).

**РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ**

Зависят от применяемой методики. В оригинальном методе Айви время кровотечения в норме не превышает 8 мин, но требуется уточнять нормативы применительно к каждой лаборатории, каждому лаборанту и типу применяемого устройства для надреза кожи. При моделировании определения длительности кровотечения in vitro с использованием цитратной крови средние нормальные значения не превышают 180 с для картриджа с коллагеном и аденозиндифосфатом, 250 с — для картриджа с коллагеном и адреналином.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Результаты теста следует интерпретировать с учетом данных других анализов, а также наличия или отсутствия клинических геморрагических проявлений у обследуемого. Укорочение длительности кровотечения клинического значения не имеет и чаще свидетельствует о нестандартности процедуры или недостаточном опыте лаборанта. При тромбоцитопениях, тромбоцитопатиях и болезни фон Виллебранда время кровотечения удлиняется, при гемофилиях длительность кровотечения в большинстве случаев не отличается от нормы. Значительное удлинение времени кровотечения, не соответствующее выраженности тромбоцитопении, наблюдается при болезни Бернара-Сулье.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Тест используется как ориентировочный для выявления пациентов с нарушением сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза и болезнью фон Виллебранда; дифференцировать варианты патологии этим методом нельзя. Длительность кровотечения нередко бывает нарушена вследствие применения лекарственных препаратов, оказывающих влияние на функциональную способность тромбоцитов, но для контроля терапии антиагрегантами можно использовать только метод с моделированием определения длительности кровотечения in vitro.

**3. Агрегационная функция тромбоцитов**

**Роль агрегации тромбоцитов**

Способность тромбоцитов образовывать конгломераты служит основой формирования тромбоцитарной пробки, способствующей остановке кровотечения из мелких сосудов. Процесс формирования тромбоцитарных конгломератов протекает под действием индукторов агрегации. В физиологических условиях самым мощным индуктором агрегации тромбоцитов является тромбоксан А2, менее сильными, но не менее значимыми — аденозиндифосфат, адреналин, серотонин, гистамин, тромбин, коллаген и др. При моделировании агрегации в лабораторных условиях используют те же самые и некоторые дополнительные индукторы:аденозиндифосфат, адреналин, арахидоновую кислоту, тромбин, кальциевый ионофор А23187, коллаген, фибрин-мономер, бычий коагуляционный фактор VIII, ристоцетин и др. На практике наиболее часто используют аденозиндифосфат, адреналин, коллаген и ристоцетин.

Важнейшую роль в адгезии и агрегации играют рецепторные гликопротеиновые белки, встроенные в цитоплазматическую мембрану тромбоцитов. Рецепторы делятся на две основные группы — адгезивные и активационные. Рецепторы могут быть описаны и с помощью номенклатуры кластерной дифференциации в соответствии с антигенными свойствами и, таким образом, выявлены и классифицированы с использованием соответствующих CD-антител на проточном цитометре.

Вследствие структурной перестройки тромбоцитарной мембраны и многочисленных метаболических реакций активированные тромбоциты изменяют форму, у них появляются отростки, способствующие связыванию тромбоцитов между собой и образованию конгломератов. Собственно связующими звеньями служат фибриноген, реже фактор фон Виллебранда, фиксирующиеся на мембранных гликопротеинах GP IIb/IIIa. В процессе агрегации из тромбоцитов выделяются вещества, поддерживающие спазм сосудов в месте повреждения, вовлекающие в процесс другие тромбоциты и увеличивающие эффективность коагуляционных реакций.

**ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ**

Для определения агрегации тромбоцитов образцы венозной крови берут с цитратом натрия. Для пункции локтевой вены используются достаточно широкие иглы, через которые кровь самотеком попадает в пробирки с раствором цитрата; забирать кровь шприцем нельзя. При дозировании крови и цитрата следует учитывать значение гематокрита; при показателях менее 30 и более 55% коррекция соотношения объемов антикоагулянта и крови является обязательной, иначе результаты исследований будут искажены. Сразу после взятия кровь в пробирке тщательно перемешивают путем аккуратного переворачивания или вращения (без встряхивания). Температура при транспортировке образцов крови должна быть комнатной, поскольку при охлаждении происходят активация и агрегация клеток. Исследовать агрегацию тромбоцитов необходимо в течение 4 ч после взятия крови.

Для анализа используют богатую тромбоцитами плазму. При ее получении необходимо следить за фактором осаждения (150-200 g, 5-7 мин); завышенная скорость вращения центрифуги или слишком продолжительное время центрифугирования ведут к искажению результатов. Часть взятой крови или богатой тромбоцитами плазмы центрифугируют в более жестком режиме (1000 g, 15 мин) для получения бедной тромбоцитами плазмы, используемой для разведения и в качестве точки отсчета при оценке оптической плотности.

Перед анализом необходима стандартизация количества тромбоцитов в образце. Для этого проводят предварительный подсчет клеток в плазме на гематологическом анализаторе или микроскопическим методом. В соответствии с полученными результатами богатую тромбоцитами плазму разводят бедной тромбоцитами плазмой (от того же пациента) так, чтобы итоговое количество тромбоцитов в смеси составило 150-250х109/л. При тромбоцитопениях (менее 120х109/л) воспроизводимость результатов значительно снижается.

Очень важно спросить пациента о принимаемых лекарственных препаратах, поскольку ряд медикаментов способен нарушить агрегацию тромбоцитов. Если пациент принимал препараты, содержащие ацетилсалициловую кислоту, или нестероидные противовоспалительные средства, исследование должно быть отложено на 9-10 сут с момента отмены препарата.

**ИНТЕРФЕРЕНЦИИ**

Гемолиз в образце, относительный недостаток цитрата натрия при низких значениях гематокрита, неточное определение количества тромбоцитов и, как следствие, нестандартное их количество в образце ведут к погрешностям и плохой воспроизводимости результатов. Царапины на пробирках/кюветах также могут быть причиной неточностей из-за ошибок определения оптической плотности богатой и бедной тромбоцитами плазмы. Другой причиной аналитических ошибок может быть некачественная обработка магнитных мешалок при их повторном использовании, поэтому повторное использование пластиковых кювет и магнитных мешалок недопустимо. Высокая скорость вращения магнитной мешалки индуцирует спонтанную агрегацию тромбоцитов, что ведет к завышению результатов.

**Оптический способ регистрации агрегации тромбоцитов**

В основе записи агрегатограммы лежит принцип Борна, предполагающий графическую регистрацию изменения оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы в процессе формирования тромбоцитарных агрегатов после добавления индуктора агрегации (аденозиндифосфата, адреналина, ристоцетина, коллагена и др.). Это наиболее распространенный вариант исследования, оценку тромбоцитарной агрегации осуществляют с помощью агрегометра. Несмотря на недостатки оптического метода, дифференциация нарушений агрегационной функции была разработана на основе именно его использования.

**Лазерный способ**

Агрегометром с использованием лазерного источника света измеряют светорассеяние, возникающее при попадании в луч тромбоцитарных конгломератов. Имеется возможность оценки радиуса агрегатов, а также спонтанной агрегации тромбоцитов при механическом воздействии (вращении магнитной мешалки) без добавления индуктора. Таким образом, появляется дополнительная возможность оценки гиперагрегации тромбоцитов, хотя общепризнанного стандартизированного метода пока нет. У таких приборов сохраняется возможность использования стандартного метода Борна.

**Импедансный способ**

Агрегометром с импедансным принципом регистрации определяют изменения электрических свойств цельной крови при добавлении стимуляторов агрегации. Именно поэтому из исследования исключаются этапы приготовления бедной и богатой тромбоцитами плазмы и подгонки количества тромбоцитов к стандартному уровню, что значительно сокращает время анализа и снижает количество ошибок. Графики, полученные при исследовании агрегации тромбоцитов этим способом, схожи с аналогичными «оптическими» кривыми агрегации, но временные показатели волн агрегации и их амплитуды не совпадают. Степень агрегации оценивается как электрическое сопротивление.

**РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ**

Вследствие отсутствия общепринятых диапазонов нормальных значений при измерении агрегационной функции тромбоцитов каждая лаборатория определяет нормативы самостоятельно.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Оценка показателей агрегации тромбоцитов зависит от метода регистрации этого процесса. В наиболее распространенном оптическом способе лучшую воспроизводимость демонстрируют степень агрегации (%) и угол наклона кривой. Применение низких концентраций стимуляторов агрегации дает возможность раздельно оценить первую и вторую волны агрегации, а иногда — выявить гиперагрегацию тромбоцитов. Большую ценность имеет информация о наличии или отсутствии второй волны агрегации, поскольку именно она на агрегатограмме отражает реакцию высвобождения содержимого а-гранул и плотных тромбоцитарных гранул. Для корректной интерпретации результатов желательно использовать несколько стимуляторов агрегации.

Интерпретация результатов бывает затруднена при дифференциации геморрагических состояний от сходных нарушений фазы адгезии и агрегационной функции тромбоцитов — болезни фон Виллебранда и синдрома Бернара-Сулье. В этом случае при добавлении в исследуемую богатую тромбоцитами плазму нормальной бестромбоцитарной плазмы или криопреципитата у больных с болезнью фон Виллебранда ристоцетиновая агрегация восстанавливается, а при синдроме Бернара-Сулье — не исправляется.

Результаты исследования следует интерпретировать с учетом клинического статуса пациента. При геморрагическом синдроме и отсутствии нарушений агрегации тромбоцитов необходимо повторное исследование через 1-1,5 мес. При изменениях агрегации, характерных для синдрома Бернара-Сулье, тромбастении Гланцманна и другой патологии, также необходимо повторно исследовать агрегационную функцию тромбоцитов. При некоторых аномалиях тромбоцитов (синдромах Мея-Хегглина, Фехтнера, Скотта, отсутствии GP IV) агрегационная функция клеток не нарушена.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Назначая тест и оценивая результаты исследования функции тромбоцитов, необходимо иметь в виду следующие принципиальные моменты:

• индуцированная агрегация тромбоцитов значительно полезнее при выявлении недостаточной функциональной способности тромбоцитов, чем при их гиперактивности;

• наследственные тромбоцитопатии встречаются очень редко, а именно распространенность заболевания имеет подчас решающее значение для информативности метода;

• до настоящего времени не существует окончательных международных рекомендаций и стандартов по выявлению гиперактивности тромбоцитов;

• решающий вклад в результаты могут вносить особенности и ошибки на преаналитическом этапе.

Приобретенные нарушения агрегации тромбоцитов в клинической практике встречаются довольно часто и бывают более выраженными на фоне применения ацетилсалициловой кислоты, других нестероидных противовоспалительных препаратов и анальгетиков. Нарушения также возможны при лечении p-адреноблокаторами, антагонистами кальция, ксантинами и некоторыми другими препаратами, а также на фоне ряда заболеваний (почечной недостаточности, гемобластозов, интоксикаций и др.). Алкоголь и продукты питания, содержащие уксусную кислоту и другие консерванты, также способны нарушить агрегацию тромбоцитов.

Кривая агрегации тромбоцитов у здорового человека, полученная на оптическом агрегометре, часто (но не всегда) имеет двухфазный вид. При дефектах высвобождения (дефиците плотных гранул, нарушении механизма секреции) возможны отсутствие второй волны и снижение агрегации с арахидоновой кислотой. Сходные нарушения наблюдаются при ряде заболеваний (синдромах Хержманского-Пудлака, Чедиака-Хигаси, Вискотта-Олдрича, TAR-синдроме). Нарушение агрегации тромбоцитов, индуцируемой ристоцетином, служит частым лабораторным проявлением болезни фон Виллебранда. Синдром «серых» тромбоцитов характеризуется нарушением коллагеновой и тромбиновой агрегации в сочетании с наличием больших тромбоцитов. При редко встречающихся наследственных дефектах тромбоцитарных гликопротеинов (тромбастении Гланцманна, синдроме Бернара-Сулье и др.) наблюдаются нарушение адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов и, как следствие, развитие рецидивирующего геморрагического синдрома. При синдроме Бернара-Сулье нарушение ристоцетиновой агрегации часто сочетается с тромбоцитопенией (чаще до 50х109/л) и значительным увеличением размера тромбоцитов. Дифференциальная диагностика вариантов нарушения тромбоцитарной функции основана на оценке агрегации тромбоцитов с различными индукторами.

**4. Фактор фон Виллебранда**

**Характеристика структуры и свойств**

Фактор фон Виллебранда принадлежит к семейству адгезивных белков, является крупным мультимером, состоящим из 50-100 одинаковых субъединиц, имеет большую молекулярную массу (от 500 тыс. до 20 млн Да); адгезив- ность мультимеров тем выше; чем больше их молекулярная масса. Синтез этого белка осуществляется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах, димеры и мультимеры формируются из субъединиц с помощью дисульфидных связей. Мультимеры фактора фон Виллебранда хранятся в а-гранулах тромбоцитов и тельцах Вибеля-Палада эндотелиальных клеток, откуда попадают в кровь. Циркулирующие в сосудистом русле мультимеры фактора фон Виллебранда расщепляются на олигомеры, димеры и мономеры метал- лопротеиназой.

Фактор фон Виллебранда, связываясь с коагуляционным фактором VIII, защищает его от протеолиза, а также служит кофактором адгезии тромбоцитов к компонентам субэндотелия (коллагеновым волокнам, микрофибриллам), имеющим центры связывания этого мультимерного белка.

**ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ**

Содержание фактора фон Виллебранда определяется в бедной тромбоцитами цитратной плазме. При нормальных значениях гематокрита можно использовать вакуумные системы взятия крови, при значительном отклонении гематокрита от нормы венозную кровь самотеком набирают в пробирку с соответствующим количеством раствора цитрата натрия. Немедленно после взятия крови содержимое пробирки тщательно перемешивают без встряхивания и при комнатной температуре транспортируют в лабораторию. Бедную тромбоцитами плазму получают центрифугированием крови при 1000-1200 g 15 мин.

**ИНТЕРФЕРЕНЦИИ**

Гемолиз в образце, относительный недостаток цитрата натрия при низких значениях гематокрита ведут к погрешностям и плохой воспроизводимости результатов. Концентрация фактора фон Виллебранда может возрастать после физических упражнений, при стрессовых ситуациях, беременности, кровотечениях, инфекционных заболеваниях, терапии эстрогенами. У женщин в разные фазы месячного цикла возможны колебания уровня фактора фон Виллебранда; для стандартизации интерпретации данных некоторые эксперты рекомендуют для определения фактора фон Виллебранда у женщин брать кровь на 5-7-е сутки менструального цикла.

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Фактор фон Виллебранда отличается большим разнообразием аномалий, поэтому для диагностики болезни фон Виллебранда используют комплекс тестов. Базовые методы исследования предназначены для выявления дефицита или качественных аномалий фактора фон Виллебранда; они основаны на иммуноферментных технологиях и определении агрегации фиксированных нормальных тромбоцитов с ристоцетином при добавлении исследуемой бедной тромбоцитами плазмы.

**4.1. Концентрация фактора фон Виллебранда**

Основной метод определения концентрации фактора фон Виллебранда — твердофазный иммуноферментный анализ, чувствительность определения — 2% медианы референтного значения, коэффициент вариации — не более 10% (обычно 5-7%). Возможно определение фактора фон Виллебранда с помощью ракетного иммуноэлектрофореза, а также иммунотурбидиметрии (с суспензией микрочастиц, покрытых специфическими анти-ФВ-антителами; коэффициент вариации — 2-5%).

**4.2. Ристоцетин-кофакторная активность фактора фон Виллебранда**

Обработанные формалином тромбоциты теряют способность к образованию агрегатов в ответ на действие большинства индукторов, однако добавка ристоцетина и исследуемой плазмы во взвесь таких тромбоцитов обычно приводит к их быстрой агрегации. Ее выраженность прямо зависит от наличия фактора фон Виллебранда в плазме, поэтому при снижении концентрации этого протеина или его качественной неполноценности агглютинация выражена слабо или вовсе отсутствует. Для количественного определения ристоцетин-кофакторной активности необходим агрегометр; полуколичественный метод предполагает визуальную оценку времени появления агрегатов в смеси разведенной исследуемой плазмы, ристоцетина и обработанных формалином тромбоцитов. Коэффициент вариации обоих методов — не более 10%.

**4.3.** **Активность плазменного фактора VIII**

Поскольку в норме фактор фон Виллебранда, образуя комплекс с коагуляционным фактором VIII, защищает его от протеолиза, при многих вариантах болезни фон Виллебранда активность фактора VIII из-за быстрой деградации снижается. Для определения содержания фактора VIII оценивают время свертывания смеси дефицитной по этому фактору субстратной плазмы, АЧТВ-реагента и разведенной исследуемой плазмы после инкубации и добавления кальция хлорида. Результаты исследования важны для диагностики субтипа 2N болезни фон Виллебранда, поскольку при этом варианте патологии значительно снижается активность антигемофильного глобулина.

**4.4.Коллагенсвязывающая активность фактора фон Виллебранда**

Адгезия тромбоцитов к коллагеновым волокнам субэндотелия реализуется через мембранный рецептор GP Ib-V-IX в присутствии фактора фон Виллебранда, поэтому при аномалиях этого мультимерного протеина или его недостаточном количестве связывание тромбоцитов с коллагеном нарушается. Для определения коллагенсвязывающей активности используют модифицированный метод иммуноферментного анализа, в котором фактор фон Виллебранда, содержащийся в исследуемом материале, фиксируется в покрытых коллагеном лунках планшета и впоследствии связывается с конъюгатом антител к фактору фон Виллебранда пероксидазой. После отмывки и добавления хромогенного субстрата появляется окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству и коллагенсвязывающей способности фактора фон Виллебранда в исследуемом образце. Несмотря на то что метод определения коллагенсвязывающей активности является иммунологическим, его результаты свидетельствуют о функциональной активности фактора фон Виллебранда. Коэффициент вариации метода не превышает 15%.

**4.5. Агрегация тромбоцитов с ристоцетином**

Нарушение агрегации тромбоцитов, индуцируемой ристоцетином, является частым лабораторным признаком болезни фон Виллебранда, в частности типа 2В, при котором наблюдается аномально высокая агрегация в ответ на добавление низких концентраций ристоцетина. При других аномалиях фактора фон Виллебранда этот метод имеет вспомогательное значение, поскольку агрегация с обычной концентрацией ристоцетина может быть нарушена при различных вариантах заболевания. Воспроизводимость исследования ристоцетиновой агрегации зависит от модели агрегометра и профессиональной подготовки персонала.

**ОБЕСПЕЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

В настоящее время доступны контрольные материалы с аттестованными значениями концентрации фактора фон Виллебранда. Учитывая различие методик определения этого протеина, необходимо тщательно выверить вариант исследования, для которого был аттестован контрольный образец.

**РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ**

Диапазон концентраций и активности фактора фон Виллебранда у здоровых людей довольно широк; нормативы зависят от варианта методики, оборудования, группы крови, реактивов и т. д. Референтные пределы указываются в инструкции к наборам реагентов, но многие производители диагностических наборов, особенно основанных на тромбоцитарной агрегации, рекомендуют лабораториям самим установить собственный диапазон нормальных значений. У пациентов с I группой крови уровень фактора фон Виллебранда примерно на 10% ниже, чем при других группах крови, и это нужно учитывать при диагностике болезни фон Виллебранда.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Результаты исследования концентрации и активности фактора фон Виллебранда следует интерпретировать с учетом данных, полученных разными методами, а также (что очень важно) с учетом клинических проявлений заболевания у пациента и анализа наследственности.

При 1-м типе этого заболевания наблюдается количественный дефект фактора фон Виллебранда, поэтому бывают сниженными результаты иммунологических и функциональных методов его определения. При 2-м типе синтезируются аномальные молекулы фактора, поэтому иммунологические методы часто показывают нормальное содержание фактора фон Виллебранда, а данные функциональных тестов, основанные на агрегации тромбоцитов с ристоцетином, значимо нарушены. Многие лабораторные методики при разных типах заболевания демонстрируют сходные результаты. Для более эффективной дифференциации качественных и количественных нарушений ранее был предложен показатель соотношения (Ratio) ристоцетин-кофакторной активности и концентрации антигена фактора фон Виллебранда; снижение этого показателя менее 0,7 свидетельствует о 2-м типе болезни фон Виллебранда.

При дифференциации субтипов заболевания необходимо учитывать следующие особенности:

• низкие показатели ристоцетиновой агрегации часты при количественном дефекте и субтипах качественного нарушения 2А и 2М;

• высокая ристоцетиновая агрегация тромбоцитов малыми дозами индуктора за счет увеличения аффинности фактора фон Виллебранда к рецептору GP Ib характерна для субтипа 2В;

• нормальные показатели ристоцетиновой агрегации тромбоцитов и значительное нарушение связывания фактора фон Виллебранда с фактором VIII, что проявляется существенным снижением активности фактора VIII, бывают при субтипе 2N заболевания (нередко снижение фактора VIII при этом субтипе настолько выражено, что приходится дифференцировать заболевание от гемофилии А);

• тромбоцитарный вариант болезни фон Виллебранда, схожий по клинико-лабораторным проявлениям с субтипом 2М, является следствием мутации a-цепи GP lb (при этом нарушении повышена аффинность аномального тромбоцитарного рецептора к высокомолекулярным мультимерам фактора фон Виллебранда, вследствие чего концентрация этого протеина снижается);

• дополнительную информацию дает исследование мультимерности фактора фон Виллебранда.

При 1-ми 3-м типе болезни исследовать мультимерность фактора фон Виллебранда нет необходимости, поскольку результаты предсказуемы. Но при А- и В-вариантах 2-го типа заболевания это исследование помогает выявить тип нарушения мультимерности, что необходимо при дифференциации заболевания. Повышение концентрации фактора фон Виллебранда свидетельствует о дисфункции эндотелия или его повреждении при сердечно-сосудистой и других видах патологии.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

Оценка фактора фон Виллебранда может быть использована при двух принципиально различных ситуациях — дифференциальной диагностике болезни фон Виллебранда и оценке эндотелиальной дисфункции.

Диагностика болезни фон Виллебранда — задача, требующая дорогостоящего оборудования, значительного времени и профессиональных навыков. Тем не менее это очень важно, поскольку при данной патологии в ряде случаев существенно ухудшается качество жизни пациентов, а в других ситуациях это заболевание неожиданно проявляется массивными, нередко угрожающими жизни геморрагиями во время операций, родов, при травмах и других состояниях у пациентов, считавших себя здоровыми. Имеются сообщения о гибели больных от неконтролируемого кровотечения при этой патологии. Наиболее часто опасные для жизни кровотечения наблюдаются при 3-м типе заболевания.

Знание типа болезни фон Виллебранда дает возможность выбора терапии, посколь-ку некоторые гемостатические препараты обладают разной эффективностью при лечении и профилактике кровотечений у пациентов с различными вариантами этого заболевания. Например, препараты на основе DDAVP дают неплохие результаты при 1-м типе заболевания, противопоказаны при субтипе 2В и бесполезны при 3-м типе.

Использование фактора фон Виллебранда в качестве маркера эндотелиальной дисфункции основано на факте, что фактор фон Виллебранда синтезируется и хранится в клетках сосудистой выстилки, повреждение эндотелия практически всегда сопровождается повышением содержания фактора фон Виллебранда в плазме крови. В этом случае информативно только исследование антигена фактора фон Виллебранда, отражающего его концентрацию. Повышение содержания фактора фон Виллебранда может отражать негативные прогностические тенденции при сердечно-сосудистой патологии, сахарном диабете, патологии почек, гестозах и других заболеваниях.

**5. b-Тромбоглобулин**

**Характеристика структуры и свойств вещества**

Тромбоглобулины — группа иммунологически идентичных протеинов, отличающихся друг от друга лишь количеством аминокислотных остатков в цепи. В мегакариоцитах и неактивированных тромбоцитах содержатся два основных вещества из этой группы — РВР и CTAP-III. Еще один представитель этой группы веществ — p-тромбоглобулин — в интактных тромбоцитах отсутствует и образуется в них лишь после активации и агрегации.

**Роль b-тромбоглобулина в физиологических процессах**

p-Тромбоглобулин (р-ТГ) появляется в крови в результате высвобождения из а-гранул тромбоцитов, где он накапливается и хранится. Окончательно физиоло¬гическая роль этого протеина не определена; имеются сведения о его способности тормозить образование простациклина, выступать в качестве регулятора функции гранулоцитов при повреждении сосуда и служить мощным хемоаттрактантом для фибробластов.

**ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ**

Должны быть приняты меры для предупреждения активации тромбоцитов при взятии и обработке образцов крови. За день до сдачи крови пациенту следует избегать стрессов, физических нагрузок, приема алкоголя, смены режима дня и изменений в питании. Кровь берут утром натощак (не менее чем через 8 ч после последнего приема пищи), в спокойном состоянии пациента. Перед венепункцией пациенту рекомендуют отдых в течение 20-30 мин. Венозный стаз перед венепункцией должен быть максимально ограничен, вакуумные пробирки не применяют. Для пункции вены используют иглы с широким просветом (не менее 21G) для того, чтобы кровь могла идти самотеком; первые 3-4 мл для анализа не используют.

Кровь набирают в специальные пробирки со стабилизатором CTAD (цитрат натрия, аденозин, теофиллин и дипиридамол). Для того чтобы избежать влияния вакуума и турбулентности на образец крови, рекомендуют открыть пробирку для уравновешивания давления, наложить жгут только для поиска вены, пунктировать вену иглой, удалить первые 2 мл крови, только после этого собрать необходимый объем крови самотеком в пробирку. Пробирку с кровью немедленно помещают на тающий лед и дают ей охладиться не менее 15 мин. Центрифугирование проводят не позднее 1 ч после взятия крови в криоцентрифуге при температуре 2-8 °С в течение 20 мин при 2500 g. Из средней части пробирки отбирают 1/3 объема супернатанта для повторного центрифугирования в тех же условиях и получения бестромбоцитной плазмы, используемой для исследования. Все эти меры предназначены для того, чтобы избежать активации тромбоцитов на преаналитическом этапе, а также исключить попадание в исследуемый образец обломков клеток. Образцы плазмы можно хранить при комнатной температуре в течение 4 ч, при -20 °С — не более 4 нед; оттаивание замороженной плазмы проводят на водя¬ной бане при 37 °С в течение 20 мин.

**ИНТЕРФЕРЕНЦИИ**

Ложное завышение уровня р-ТГ возможно в образцах плазмы, содержащих клетки (такие образцы следует повторно отцентрифугировать) или высокие уровни липидов. Результаты исследования часто завышаются при почечной недостаточности. Уровень р-ТГ может также изменяться при тромбоцитозах и тромбоцитопениях. Причиной неточных результатов и ошибок исследования может быть несоблюдение температурного режима при хранении реагентов.

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В основе определения р-ТГ лежит принцип твердофазного иммуноферментного анализа со связыванием антигена и антител, поэтому специфичность и чувствительность достаточно высоки. Коэффициент вариации не превышает 15%.

**РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ**

Не более 80 мкг/л, или 10-50 МЕ/мл (зависит от метода исследования). В некоторых лабораториях верхняя граница нормальных значений может быть иной; возможно сформировать контрольную группу и самостоятельно определить диапазон нормальных значений.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

р-ТГ — один из наиболее чувствительных и объективных маркеров активации тромбоцитов, можно использовать в оценке тромбофилических состояний наряду с маркерами активации свертывания. Уровень р-ТГ повышается при стимуляции тромбоцитов in vivo и in vitro коллагеном, иммунными комплексами и другими веществами, способными вызвать агрегацию. Низкие значения уровня р-ТГ могут служить вспомогательным диагностическим критерием дефицита тромбоцитарных а-гранул. При тромбоцитопениях и тромбоцитозах уровень р-ТГ зависит от количества тромбоцитов.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

Определив повышение уровня р-ТГ в плазме, можно установить гиперагрегацию тромбоцитов при различных патологических состояниях — инфаркте миокарда, венозном тромбоэмболизме, искусственных клапанах сердца, периферических рас-стройствах кровообращения, сахарном диабете, раке и др. Применение антиагрегантов снижает концентрацию р-ТГ, поэтому тест можно использовать в качестве дополнительного для контроля эффективности лечения этими препаратами.

**6. 11-дегидротромбоксан В2**

**Характеристика структуры и свойств вещества**

Тромбоксан А2 — представитель группы простагландинов, синтезируемый в раз-личных клетках организма, в том числе и в тромбоцитах. Период полужизни этого вещества составляет около 30 с, поэтому мониторинг продукции тромбоксана А2 in vivo обычно проводят косвенно, по определению тромбоксана В2 в плазме крови, или более стабильного метаболита - 11-дегидротромбоксана В2 в моче.

**Роль тромбоксана в физиологических процессах**

Предшественником тромбоксана А2, как и ряда других простагландинов и лей- котриенов, служит арахидоновая кислота, накапливаемая в клетках при актива¬ции фосфолипаз. Под действием циклооксигеназы-1 арахидонат превращается в короткоживущие простагландины и далее — в тромбоксан А2 при участии тромбоксансинтетазы. Образуемый и высвобождаемый тромбоксан А2 вызывает быструю необратимую агрегацию тромбоцитов и дополнительный спазм сосудов малого калибра. При метаболизме этого вещества в печени образуется тромбоксан В2, далее — 11-ДГТ В2, удаляемый из организма с мочой.

**ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ**

Концентрацию 11-ДГТ В2 наиболее часто исследуют в утренней порции мочи. До ее сдачи пациенту следует избегать стрессов, физических нагрузок, приема алкоголя, смены режима дня и изменений в питании. Для предупреждения образования тромбоксана и его метаболитов in vitro в образцы мочи можно добавлять ингибиторы простагландинсинтетаз (индометацин). Для дозирования образцов важно использовать одноразовые наконечники.

**ИНТЕРФЕРЕНЦИИ**

В образцах мочи, содержащих лейкоциты и эритроциты, возможно ложное завышение уровня 11-ДГТ; такие образцы следует отфильтровать либо повторно центрифугировать. Другие возможные причины неточностей и ошибок — несоблюдение температурного режима при хранении реагентов и засорение каналов промывателей.

**МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для определения 11-ДГТ используют радиоиммунный анализ с меткой 1251, а также твердофазный иммуноферментный анализ. Аналит в исследуемом биоматериале и добавляемый конъюгат 11-ДГТ с щелочной фосфатазой конкурентно связываются с поликлональными антителами в лунках микропланшета; после промывки, добавления хромогенного субстрата, инкубации и остановки реакции определяется степень окраски, обратно пропорциональная содержанию 11-ДГТ в пробе. При исследовании мочи во избежание эффекта разведения в ней одновременно определяют концентрацию креатинина, результат выражают в пересчете на ммоль или грамм креатинина.

**РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ**

У здоровых людей диапазон концентраций 11-ДГТ в моче составляет 40-240 нг/ммоль креатинина (350-2100 нг/г креатинина). При возможности рекомендуют сформировать контрольную группу и самостоятельно определить диапазон нормальных значений для каждой лаборатории.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Уровень 11-ДГТ В2 служит наиболее объективным биохимическим показателем аспиринрезистентности, о чем свидетельствуют высокие значения аналита в моче на фоне лечения препаратами, содержащими ацетилсалициловую кислоту. О чувствительности к аспирину может свидетельствовать 50% снижение уровня 11-ДГТ в моче на фоне приема внутрь 325 мг аспирина в сутки.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Значение определения 11-ДГТ в моче для оценки чувствительности к аспирину описано в разделе, посвященном лабораторному контролю антитромботической терапии. Кроме того, определение 11-ДГТ В2 можно использовать для оценки активации тромбоцитов при разных заболеваниях. Доказана связь высоких значений аналита в моче с развитием осложнений атеросклероза — инфарктов, инсультов и др., в том числе у пациентов, получающих антиагрегантную терапию.