**Методические рекомендации к занятию № 11**

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

**Тема:** **Клинико-биохимические методы исследования системы фибринолиза**

**Методы исследования активности
фибринолитической системы**

1) общеоценочные методы и

2) методы определения отдельных компонентов фибринолитической системы:

* плазмина — фермента, расщепляющего фибрин,
* при некоторых условиях уровень фибриногена и другие факторы свертывания крови,
* плазминогена — неактивного предшественника плазмина,
* активаторов плазминогена,
* ингибиторов активации плазминогена
* ингибиторов плазмина и др.

**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.

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.

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 500 нг/мл (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 диссеминированном 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.