**Методические рекомендации к занятию № 9**

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

**Тема: Современные представления о системе гемостаза. Преаналитический этап в оценке гемостаза.**

**1. Введение**

***Система гемостаза -*** биологическая система, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение жидкого состояния циркулирующей крови, а с другой – предупреждение и купирование кровотечений.

***Компоненты системы гемостаза****:*

* сосудисто-тромбоцитарное звено
* система свертывания крови (коагуляция)
* физиологические антикоагулянты
* фибринолитическая система (тромболизис)

***1.1. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз***

В сосудисто-тромбоцитарном механизме свертывания крови участвуют сосуды, ткань, окружающая сосуды и форменные элементы крови (главная роль принадлежит тромбоцитам).  
Тромбоциты образуются в костном мозге из мегакариоцитов. Продолжительность их жизни около 9 суток. При недостаточном  количестве тромбоцитов или их функциональной неполноценности развивается микроциркуляторный тип кровоточивости. К важнейшим функциям тромбоцитов относят адгезивно-агрегационную и ангиотрофическую.   
В условиях нормы эндотелий эффективно предупреждает процессы адгезии, агрегации тромбоцитов, а также реакций коагуляции. Способность эндотелия сохранять кровь в жидком состоянии обеспечивается синтезом ингибитора агрегации тромбоцитов простациклина и отрицательным зарядом эндотелиальных клеток. Кроме того, эндотелиальный белок тромбомодулин препятствует уже начавшейся коагуляции. Основной функцией тромбомодулина является инактивация тромбина и превращение (модификация) его в мощный активатор антикоагулянтной системы - протеин С. За счет этого происходит значимое снижение скорости коагуляционных реакций.   
Эндотелий участвует в фибринолизе за счёт синтеза и выделения в кровоток тканевого плазминогенового активатора, который активирует плазминовую систему.  
При повреждении мелкие сосуды спазмируются. Этот спазм обусловлен сокращением гладкомышечных клеток, он возникает рефлекторно и продлевается серотонином, тромбоксаном А2, катехоламинами и другими вазоконстрикторами, которые появляются из эндотелиальных клеток и тромбоцитов. Повреждение сосудов сопровождается быстрой активацией тромбоцитов. Эта активация обусловлена появлением высоких концентраций АДФ (из поврежденных эритроцитов и сосудов), а также появлением коллагеновых и фибриллярных структур из субэндотелия. Контакт крови с коллагеном немедленно ведёт к адгезии тромбоцитов, реализуемой с участием рецепторов GP-Ia, GP-Ib и фактора Виллебранда.   
Под влиянием АДФ, тромбоксана А2 и катехоламинов тромбоциты склеиваются между собой, образуя агрегаты, которые являются основой тромбоцитарной пробки. Усилению агрегации способствует тромбин, всегда появляющийся в результате свертывания крови в месте повреждения. Агглютинация и агрегация сопровождается изменением формы тромбоцитов и появлению рецепторов на мембране тромбоцитов к фибриногену (GPIIb-IIIa), благодаря чему, в присутствии ионов Са++, последний связывает между собой активированные тромбоциты. Такая связь между активированными тромбоцитами не прочна. Именно поэтому такую агрегацию называют обратимой. Образование прочной тромбоцитарной пробки следует после вторичной агрегации, которая сопровождается секрецией  из тромбоцитов ПгG2, ПгH2, тромбоксана А2, ионов Са++, фактор активации тромбоцитов (ФАТ), адреналина, норадреналина, фибриногена и многих других. Секреция этих веществ обусловлена активацией актомиозиновой системы тромбоцитов, что обуславливает выделение вышеперечисленных субстанций из тромбоцитов за счёт повышения давления внутри тромбоцита. Кроме того, активация актомиозиновой системы ведет к ретракции (сокращению и уплотнению) тромбоцитарной пробки.  
В норме кровотечение из мелких сосудов прекращается не более чем через 5 минут.

***1.2.* *Коагуляционный гемостаз***

При повреждении крупных кровеносных сосудов тромбоцитарная пробка не способна остановить кровотечение. Только коагуляционный гемостаз способен остановить кровотечение из крупного сосуда.   
В коагуляционных реакциях принимают участие специальные белки, фосфолипиды (из тромбоцитарной мембраны), ионы кальция. Большинство белков, участвующих в коагуляции, являются проферментами (обозначаются римскими цифрами). Их активация осуществляется за счет протеолиза (они обозначаются римскими цифрами с добавлением буквы а, например, IIа, Xа, Vа и др.).

***1.2.1. Международная номенклатура факторов свертывания крови***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Название фактора** | **Количество в мл (активность)** | **Достаточный минимум** | **Период полужизни** | **Избыток** |
| I. Фибриноген | 300 (170-450) мг | 50 мг | 100 ч. | 3-6 раз |
| II. Протромбин\* | 200мкг/70-130% | 80 мкг/40% | 72 - 96 ч | 2-3 раза |
| III. Тромбопластин | - | - | - | - |
| IV. Ионы Са++ | 2,3 - 2,8 ммоль/л | - | - | - |
| V. АС-глобулин | 25мкг/80-110% | 2,5-4мкг/10-15% | 12 - 15 ч. | 8-10 раз |
| VII. Проконвертин | 2 мкг/70-130% | 0,2 мкг/10% | 2 - 6 ч. | 10 раз |
| VIII. Антигемофильный глобулин | 50мкг/80-120% | 5-7мкг/10-15% | 7 - 8 ч. | 3-5 раз |
| IX. Кристмас-фактор | 3-4 мкг/70-130% | 4-6мкг/20-30% | 20 - 30 ч. | 4-5 раз |
| X. Стюарта-Прауэра фактор\* | 6-8 мкг/70-140% | 0,15мкг/20% | 30 - 70 ч. | 5 раз |
| XI. Предшественник тромбопластина | 7 мкг/70-130% | 15 мкг/15-20% | 30 - 70 ч. | 4-5 раз |
| XII. Хагеманна фактор | 40 мкг | не установлено | 50 - 70 ч. | неизвестно |
| XIII. Фибриназа, фибрин-стабилизирующий фактор | не установлено | 10% | 72 - 100 ч | 10 раз |

**\* синтезируется в печени**

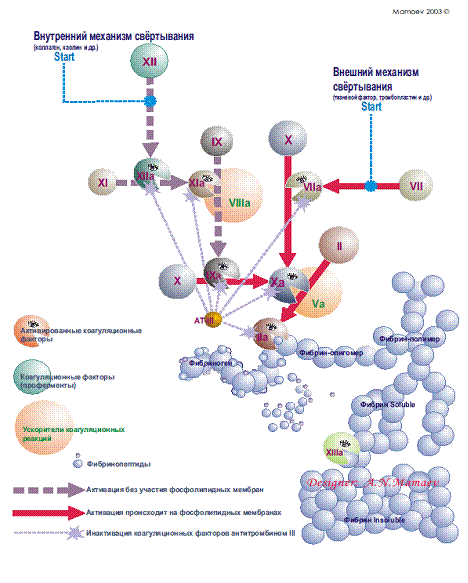
*Витамин"К"-зависимые факторы: II, VII, IX, X*   
*Чувствительные к тромбину факторы: I, V, VIII, XIII*   
*Факторы контакта: XII, XI, BM-кининоген, прекалликреин*   
*Факторы-сериновые протеазы: XII,XI,X,IX,VII, II, Плазмин*

**Дополнительные факторы:**

* Фактор Виллебранда
* Фактор Флетчера
* Фактор Фитцжеральда

Процесс свертывания крови - это целая цепь последовательных ферментативных реакций, в которой проферменты, активируясь, способны активировать другие факторы свертывания крови. Удобно рассматривать схему коагуляции в виде каскада ферментативных реакций, условно разделенного на внутренний и внешний механизмы. Конечным продуктом коагуляционных реакций и по внешнему и по внутреннему механизму является фибрин.

***1.2.2. Схема свертывания крови [А.Н. Мамаев 2003]***



**Внешний механизм коагуляции**

Внешний механизм свертывания предполагает обязательное наличие ***тканевого фактора (фактора III)***, а старт коагуляции начинается с активации ***фактора VII***. Активированный фактор VII переводит фактор X в Xа и активирует фактор IX (активация фактора IX идет медленно и существенной роли в коагуляции не играет). Затем фактор Xа переводит протромбин (II) в тромбин. Эту реакцию значительно ускоряют коагуляционный фактор Vа и фосфолипиды. Образование фибрина инициализируется по внешнему пути очень быстро (в течение секунд), что ведет к появлению первых порций тромбина, активирующих другие коагуляционные факторы (VIII, V, XIII и др.).

**Внутренний механизм коагуляции**

Старт коагуляции по внутреннему механизму начинается с активации ***фактора Хагемана (XII)*** и происходит на фосфолипидных мембранах тромбоцитов.

Фактор Хагемана активируется коллагеном из эндотелия, адреналином и др., а затем уже активированная молекула фактора Хагемана преобразует фактор XI в XIа. В этой реакции  принимает участие калликреин, который также активируется фактором XIа. В свою очередь, фактор XIа активирует фактор IX. Фактор IXа на фосфолипидных мембранах с участием фактора VIIIа и ионов Са++  путем протеолиза превращает фактор X в его активированную форму. Далее фактор Xа переводит протромбин в тромбин. Эту реакцию значительно ускоряют коагуляционный фактор Vа и фосфолипиды.

**Конечный этап коагуляции**

Переход фибриногена в фибрин происходит следующим образом: от фибриногена тромбин отщепляет 2 фибринопептида А и 2 фибринопептида В. Так образуются фибрин-мономеры. Затем формируются димеры, тримеры и олигомеры фибрина. После этого образуются фибриллы растворимого фибрина. Фибрин-стабилизирующий фактор (активированный тромбином) в присутствии Са++ превращает нестабильный, растворимый фибрин  в стабильный нерастворимый фибрин. В результате этого сгусток фибрина становится резистентным к фибринолитическим агентам и с трудом разрушается другими протеолитическими веществами. Образовавшийся сгусток фибрина уплотняется  за счет тромбоцитов, в большом количестве попадающих в структуру сгустка. Наступает ретракция сгустка фибрина. Сгусток, состоящий из тромбоцитов, эритроцитов и большого числа волокон фибрина, способен остановить кровотечение из крупных сосудов.

***1.3. Физиологические антикоагулянты***

Физиологические антикоагулянты разделяют на первичные и вторичные. Первичные антикоагулянты всегда присутствуют в крови, а вторичные образуются в результате коагуляционных реакций.

К ***первичным антикоагулянтам*** относятся:

* антитромбин III;
* протеин С;
* протеин S;
* ингибитор внешнего пути свертывания (TFPI);
* кофактор гепарина II.

Одним из основных антикоагулянтов является антитромбин III (АТ). Антитромбин III обладает мощным антикоагулянтным действием только в комплексе с гепарином. Этот комплекс надежно блокирует коагуляционные факторы IIа, IXа, Xа, XIа, XIIа и калликреин.

***Дефицит АТ – серьезный фактор риска развития венозных тромбозов.***  
Другим ингибитором свертывания является кофактор  гепарина II. Его действие усиливается во много раз при взаимодействии с гепарином. Однако клиническая значимость его невелика.

К антикоагулянтам относится ингибитор внешнего пути свертывания (TFPI). Установлено, что он тормозит образование фактора Xа по внешнему механизму коагуляции.

Антикоагулянтная система протеина С включает в себя целую цепь последовательных биохимических реакций. Образующийся в процессе коагуляции тромбин связывается на эндотелии с мембранным гликопротеином – тромбомодулином, и вследствие этого теряет всю свою коагуляционную активность, но сохраняет способность активировать протеин С. После этого активированный протеин С с протеином S в качестве кофактора,  на фосфолипидной поверхности расщепляет фактор Vа и фактор VIIIа. Этот механизм эффективно предупреждает дальнейшее образование тромбина и трансформирует его в активатор антикоагулянтного механизма.

***Вторичными антикоагулянтами*** являются продукты деградации фибриногена и фибрина. Они тормозят конечный этап коагуляции.

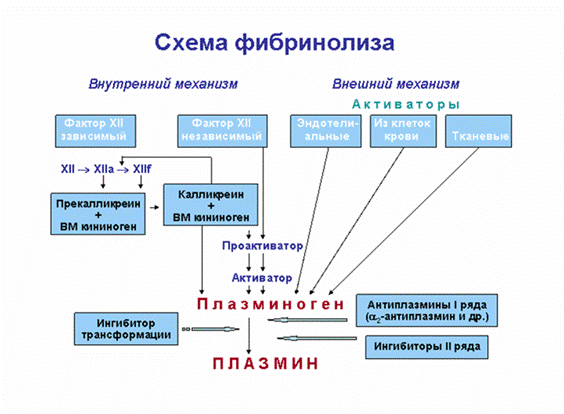
***1.4. Система фибринолиза***

Фибриновый сгусток, образовавшийся в результате свертывания крови, в дальнейшем подвергается лизису под влиянием ферментов фибринолитической системы крови, происходит восстановление проходимости сосудов. Кроме того, фибринолитическая система контролирует заживление ран и выполняет ряд других важных функций.

*Фибринолиз включает 4 компонента:*

* основной фермент – плазмин;
* плазминоген (неактивный предшественник плазмина);
* активаторы плазминогена;
* ингибиторы плазминогена.

Активация плазминогена может происходить по внешнему и внутреннему механизму [10].

******

Основным активатором **внешнего** механизма является ***тканевый активатор плазминогена****,* синтезирующийся в эндотелиальных клетках, и урокиназа. **Внутренняя** активация осуществляется преимущественно комплексом ***ф.XIIa с калликреином*** (так называемый XIIa - зависимый фибринолиз).

**Фибринолиз м**ожет быть двух видов: первичный и вторичный. Первичный фибринолиз вызывается гиперплазминемией, при поступлении в кровь большого количества активаторов плазминогена. Вторичный фибринолиз развивается в ответ на внутрисосудистое свертывание крови, вызванное поступлением  в кровоток тромбопластических веществ. Активаторы плазминогена преобразуют плазминоген в плазмин, а последний вызывает протеолиз фибрина. В результате протеолиза в кровотоке появляются продукты деградации фибрина (ПДФ).  
Важнейшими ингибиторами фибринолиза являются антиплазмины I ряда - ПАИ-1, ПАИ-2 и ?2-антиплазмин. Менее значимы ингибиторы II ряда – ?2-макроглобулин, антитрипсин, антитромбин III и С1-ингибитор.   
Большое клиническое значение имеет определение в крови одного из ПДФ, а именно ***D-димера***, так как этот показатель является наиболее надежным маркёром образования фибрина внутри сосуда.

***Основные осложнения патологии гемостаза:***

* **кровотечение** (при тромбоцитопении или дисфункции тромбоцитов, болезни Виллебранда, гемофилии А (В), клинической манифестации ДВС);
* **внутрисосудистое свертывание крови** (артериальные, венозные и смешанные тромбозы обусловленные тромбофилией или без нее, ДВС-синдром (острый, подострый, хронический), тромботическая  тромбоцитопеническая пурпура).

**Преаналитический этап исследований гемостаза**

ля исследования системы гемостаза разработаны и получили широкое распространение высокоточные приборы и надежные лабораторные методы, которые позволяют быстро и эффективно выявить нарушения, приводящие к кровоточивости или тромбозам, однако их воспроизводимость и точность значимо снижаются при несоблюдении правил и условий преаналитического этапа. Взятие образцов крови, транспортировку и их подготовку для исследования системы гемостаза следует рассматривать как важнейшие этапы получения корректных результатов, которым должно быть уделено немало внимания в любой лаборатории, выполняющей исследование системы гемостаза.

ПОДГОТОВКА ПАЦИЕНТА

Кровь для исследования гемостаза забирают утром натощак по прошествии не менее 8 ч после последнего приема пищи. Важно, чтобы взятие венозной крови проводилось в спокойном состоянии, поэтому перед венепункцией пациенту рекомендуют посидеть в течение 20-30 мин. Для получения надежных результатов при исследовании тромбоцитарного гемостаза за день до сдачи анализа пациенту следует избегать стрессов, физических нагрузок, смены режима дня и изменений в питании, приема алкоголя. Особенно тщательно необходимо соблюдать эти условия при исследовании маркеров активации тромбоцитов (р-тромбоглобулина, тромбоцитарного фактора-4). Врачу необходимо знать о лекарственных препаратах, которые назначены и вводятся пациенту, поскольку ряд медикаментов способны нарушить агрегацию тромбоцитов или вызвать изменение параметров коагуляции. В подобных ситуациях часто приходится учитывать лишь антикоагулянтный или антитромбоцитарный эффект применяемых лекарственных препаратов, поскольку выявить многие нарушения гемостаза на фоне применения антикоагулянтов или антиагрегантов невозможно.

У пациентов в реанимационном отделении нельзя брать кровь из подключичного катетера, поскольку это наиболее частая причина попадания гепарина в образец крови. У пациентов в отделении гемодиализа нельзя осуществлять забор крови из артериовенозной фистулы. Однако при некоторых критических состояниях взятие крови в пробирку или вакутейнер из кубитальной вены бывает невозможно из-за снижения давления. В подобных ситуациях кровь для исследования допустимо взять из подключичного катетера, но при этом следует учитывать, что перечень выполняемых методик будет существенно ограничен вследствие возможного наличия гепарина в образце.

АНТИКОАГУЛЯНТЫ

Цитрат натрия

Цитрат натрия связывает ионы кальция и останавливает реакции свертывания. В качестве антикоагулянта для определения большинства показателей коагуляционного и тромбоцитарного звеньев системы гемостаза следует использовать 0,105-0,109 М раствор лимоннокислого натрия, который готовят растворением 3,1-3,2 г Na3 C6 H5 О7x2H2 О в 100 мл воды. Этот раствор следует хранить при температуре от +2 до +8 °С не более 48 ч. При несоблюдении температурного режима в таком растворе развивается микрофлора, вследствие чего концентрация цитрата натрия уменьшается и появляются посторонние примеси, обладающие потенциальной способностью стимулировать тромбоциты и активировать коагуляционные реакции. При наличии рекомендации фирм-производителей реагентов допустимо применение 0,129 М (3,8%) цитрата натрия, однако следует учитывать, что разные концентрации стабилизатора по-разному влияют на ряд показателей коагуляции, в том числе и на международное нормализованное соотношение. Такое влияние особенно заметно при сравнении реагентов разных производителей.

Этилендиаминтетраацетат

ЭДТА также связывает кальций, останавливая свертывание. Соли этилендиаминтетраацетата используют для стабилизации образцов, предназначенных для определения клеточного состава периферической крови на гематологических анализаторах. К2-, К3- и Nа2-соли ЭДТА в концентрации 1,2-2,0 мг/мл применяют также при дальнейшем исследовании методами иммуноферментного анализа и полимерно-цепной реакции. Недопустимо использование ЭДТА для исследования коагуляции и функциональной способности тромбоцитов.

Гепарин

Гепарин активирует плазменный антитромбин, который необратимо связывает ферментные факторы свертывания. Этот антикоагулянт традиционно применяют в иммуноферментном анализе; как правило, для стабилизации крови необходимо от 12 до 30 ЕД/мл натриевой, калиевой или литиевой соли нефракционированного гепарина. При получении плазмы для исследования ее коагуляционных свойств и функциональной способности тромбоцитов этот антикоагулянт применять нельзя.

ПРОБИРКИ

При взятии и подготовке образцов крови для исследования гемостаза следует применять меры для предупреждения активации тромбоцитов и коагуляционных реакций. Для образцов крови нельзя использовать обычные стеклянные пробирки, поскольку стекло активирует коагуляцию и сорбирует коагуляционные факторы. В течение многих лет для предупреждения этих эффектов использовали силиконирование пробирок, однако появились сведения о недостаточной способности некоторых силиконов предупреждать активацию тромбоцитов. Кроме того, эта процедура трудно стандартизируется и занимает дополнительное время. Как альтернативу силиконированию следует использовать пластиковые пробирки, однако различные сорта пластика также разнятся по способности активировать коагуляционные реакции.

Хорошие результаты дает использование вакуумных систем для взятия крови, содержащих забуференный 3,2% раствор цитрата натрия (буферизация чаще достигается добавкой лимонной кислоты). Цветовая кодировка по ISO/DIS 6710 для вакуумных систем, содержащих цитрат натрия, предусматривает светло-голубой или зеленый цвет колпачков; для пробирок с ЭДТА — лиловый или красный; для пробирок с гепарином — зеленый или оранжевый. Существуют данные о хороших результатах использования специальных CTAD-систем (со стабилизатором, включающим цитрат натрия, трифосаденин, теофиллин и дипиридамол) для определения p-тромбоглобулина, тромбоцитарного фактора-4, PAI-1, контроля гепаринотерапии по активированному частичному тромбопластиновому времи или анти-Ха, определения международного нормализованного соотношения. Однако этот стабилизатор непригоден для исследования функциональной способности тромбоцитов.

ОПТИМАЛЬНОЕ СООТНОШЕНИЕ ЦИТРАТ/КРОВЬ

Поскольку большинство факторов свертывающей системы содержится в плазме, но не в эритроцитах, необходимое количество антикоагулянта зависит от показателя гематокрита у пациента. Для стабилизации образцов крови при значении гематокрита в нормальном диапазоне (от 35 до 50%) принято смешивать один объем 3,2% раствора цитрата натрия с девятью объемами крови. При отклонениях гематокрита от указанных величин следует изменить это соотношение в соответствии с формулой Ingram:

X = V х (100 - НСТ) / (595 - НСТ),

где X — добавляемый объем 3,2% цитрата, мл;

V — конечный объем пробирки для крови, мл;

НСТ — показатель гематокрита у пациента, %.

Техника венепункции

ИГЛА И ПРОБИРКА

Для получения образцов венозной крови необходимо привлекать наиболее опытных и квалифицированных процедурных медсестер, способных в течение нескольких секунд пунктировать вену с наименьшими травматичностью и болезненностью для пациента. Медсестре необходимо внимательно ознакомиться с направлением на исследование, выбрать пробирки, определить корректную последовательность их наполнения, промаркировать их и указать время взятия крови. В некоторых специализированных лабораториях на время взятия крови в помощь процедурной медсестре направляют лабораторного техника, что позволяет значительно увеличить пропускную способность процедурного кабинета, снизить вероятность ошибок дозирования цитрата при сдвигах гематокрита и неточностей маркировки проб.

Образец крови предпочтительнее брать из кубитальной вены; место прокола обрабатывают 70% спиртом и дают высохнуть. Допустимо лишь кратковременное (не более 60 с) наложение жгута на плечо, поскольку при венозном стазе происходит активация фибринолиза; после введения иглы в вену жгут тотчас же расслабляют или удаляют. Наилучшие результаты (с учетом травматичности, болезненности, универсальности, скорости наполнения пробирок) дает использование иглы с калибром 21G. Желательно не брать для исследования гемостаза первые 2-3 мл крови, поэтому их набирают в пробирку без антикоагулянта и используют, например, для получения сыворотки (биохимические, иммунологические тесты и др.). Далее пластиковые или силиконированные пробирки с предварительно добавленным цитратом наполняют кровью из иглы самотеком, сразу же закрывают и перемешивают путем 4-6-кратного переворачивания или вращения (без встряхивания). В связи с использованием игл увеличенного диаметра после венепункции в большинстве ситуаций руку пациента необходимо перебинтовать 2- 4 оборотами бинта, приложив к месту прокола марлевый тампон с 70% спиртом.

Наполнять пробирки с цитратом с помощью шприцев для инъекций нельзя, поскольку при насасывании крови и ее последующем переносе в пробирку происходит активация тромбоцитов и коагуляционных факторов вследствие контакта крови с пластиком шприца и дополнительного вспенивания, обусловленного турбулентным движением крови в шприце.

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ВАКУУМНЫЕ СИСТЕМЫ

Стандартом для клинических лабораторий, в которых исследуют показатели гемостаза, считается использование одноразовых вакуумных систем (вакутейнеров и др.), содержащих 3,2% раствор цитрата натрия. Их использование в значительной степени ускоряет, стандартизирует процедуру взятия крови и позволяет существенно снизить разброс результатов. Если кровь для исследования показателей гемостаза берут через катетеры или системы с иглой-бабочкой, необходимо обеспечить полную герметичность системы и предварительное заполнение кровью всех «мертвых» объемов — просвета самого катетера, иглы и переходника, иначе возможны частичная потеря вакуума и неполное заполнение пробирки. Для предотвращения этого, а также попадания кусочков поврежденных тканей кровь для анализа показателей гемостаза не рекомендуют брать в первую вакуумную пробирку.

В условиях выраженного сгущения крови (полицитемии, дегидратации и др.) стандартное количество цитрата в вакуумных системах оказывается избыточным для уменьшенного объема плазмы. При использовании вакуумных пробирок и уровне гематокрита у пациента выше 50% часть раствора цитрата из пробирки следует предварительно отсосать (например, с помощью инсулинового шприца). Подлежащий удалению из стандартной вакуумной пробирки объем цитрата можно определить по формуле:

Y = (V / 10) х (9 х НСТ - 405) / (595 - НСТ),

где Y — подлежащий удалению объем цитрата, мл;

V — конечный объем пробирки для крови, мл;

НСТ — показатель гематокрита у пациента, %.

При низком (<35%) значении гематокрита, напротив, следует предварительно добавить дополнительное количество цитрата в пробирку, подсчитав его по той же формуле (отбросив знак «минус»). Однако скорригировать объем цитрата в вакуумных пробирках без нарушения вакуума весьма сложно, и стандартные инструкции производителей вакуумных систем подобной возможности не предусматривают. В связи с этим, поскольку грубые сдвиги гематокрита в диагностической практике встречаются нечасто, при их наличии бывает проще взять кровь с помощью иглы не в вакуумную, а в обычную пластиковую пробирку, предварительно добавив в нее цитрат в соответствии с приведенной выше формулой.

**Транспортировка и промежуточный контроль образцов**

Следует сократить до минимального интервал времени между взятием образца крови из вены и центрифугированием. До центрифугирования кровь следует хранить при комнатной температуре (от +18 до +24 °С). Недопустимо хранить образцы крови в холодильнике и тем более их замораживать. При охлаждении образцов до 12 °С и ниже начинается холодовая агрегация тромбоцитов. Маркированные образцы транспортируют в лабораторию в специальном контейнере. В том случае, если образцы крови необходимо отправить в другое лечебное учреждение, их нужно транспортировать в термоконтейнере, но без хладагентов. В зимнее время термоконтейнер не позволит образцам охладиться до 12 °С, а в летнее время — перегреться. Направление на исследование или иную медицинскую документацию не следует помещать в контейнер с образцами.

Перед центрифугированием необходимо визуально проверить полученные для исследования пробы крови (маркировку, наличие гемолиза, липемии и сгустков). Образцы, содержащие сгустки, бракуются. Для визуального выявления «подсвертывания» необходимо медленно наклонить пробирку с образцом; при правильных взятии и обработке крови происходит равномерное ее перетекание, соответствующее углу наклона пробирки, и на стенках не остается багровых образований овальной или иной формы.

**Получение плазмы**

БОГАТАЯ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМА

Цитратная плазма, богатая тромбоцитами, получается при центрифугировании стабилизированной цитратом крови при 150 g в течение 5 мин. Торможение центрифуги должно быть плавным. Сразу же после центрифугирования богатую тромбоцитами плазму переносят в пластиковые пробирки пипетками со сменными наконечниками и используют для исследования агрегационной функции тромбоцитов, которое следует выполнить в течение 2 ч после взятия крови. Замораживание образцов богатой тромбоцитами плазмы недопустимо.

БЕДНАЯ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМА

Цитратная плазма, бедная тромбоцитами, обычно еще содержит тромбоциты, но в малых количествах. Для ее получения стабилизированную кровь или плазму, богатую тромбоцитами, центрифугируют при 1700-1900 g в течение 15 мин без охлаждения, а затем надосадочную жидкость переносят в пластиковые пробирки.

БЕСТР0МБ0ЦИТНАЯ ПЛАЗМА

Подобный режим центрифугирования считается достаточным для большинства коагуляционных тестов. Однако в ряде ситуаций, например при определении волчаночного антикоагулянта, проведении dRVV-теста или при необходимости замораживания и хранения материала, требуется бестромбоцитная плазма. Ее получают путем повторного центрифугирования плазмы, бедной тромбоцитами, при 1700-1900 g в течение 15 мин. Следует осторожно относиться к рекомендациям центрифугировать образцы крови с ускорением более 2500 g и охлаждением, поскольку при увеличении центробежной силы и снижении температуры возможно разрушение клеток крови.

**Хранение образцов плазмы**

Желательно, чтобы функция как тромбоцитарного, так и коагуляционного звена гемостаза была исследована в течение 2 ч после взятия крови у пациента. В большинстве ситуаций обеспечить это довольно сложно, поэтому при условии быстрого отделения плазмы от клеточных элементов допускается исследование коагуляционных показателей в течение 4 ч. Редко выполняемые тесты коагуляционного гемостаза допустимо проводить после накопления замороженных образцов. Хранение плазмы при -20 °С возможно до 4 нед; лучшие результаты получаются при хранении при температуре от -40 до -70 °С. Большинство бытовых холодильников неспособны удерживать температуру -20 °С, поэтому хранить образцы плазмы в них не рекомендуют. Перед исследованием плазму необходимо быстро разморозить на водяной бане при 37 °С и хорошо перемешать.