Анализы для оценки свёртывающей системы крови

Печёрина Екатерина Юрьевна

Лаборатории Центра иммунологии и репродукции

Июль 2022

Центр иммунологии и репродукции

«Этого не может быть»

- D-димер был высокий, а теперь нормальный
- Гепарин не повлиял на гемостаз
- Пропал волчаночный антикоагулянт
- РКФМ всё время «скачет»

Центр иммунологии и репродукции

Выбор теста и условий сдачи

- Клиническая оценка пациента
- Анамнез
- Семейная история
- Принимаемые препараты

Центр иммунологии и репродукции

Преаналитика

- Выбор теста и условий сдачи
- Подготовка пациента
- Сдача биоматериала
- Обработка, транспортировка и хранение биоматериала

Центр иммунологии и репродукции

Подготовка пациента

- Учесть приём препаратов (например, антагонисты витамина К – нельзя определить дефицит протеина С и S (снизить МНО до 1.5), НФГ, НМГ и другие)
- Время суток (снижение факторов свёртывания и повышение PAI-1 ночью) и положение тела (в положении стоя относительное увеличение факторов свёртывания)
- Приём контрацептивов (повышение активности факторов свёртывания, агрегации тромбоцитов, снижение антикоагулянтов)
- Менструация
- Воспаление, травма, инфекция (усиление или угнетение фибринолиза, повышение активности и антигена ф.VIII, vWF, фибриногена, тромбоцитоз, укорочение АЧТВ, может быть снижени активности протеина С)

Центр иммунологии и репродукции

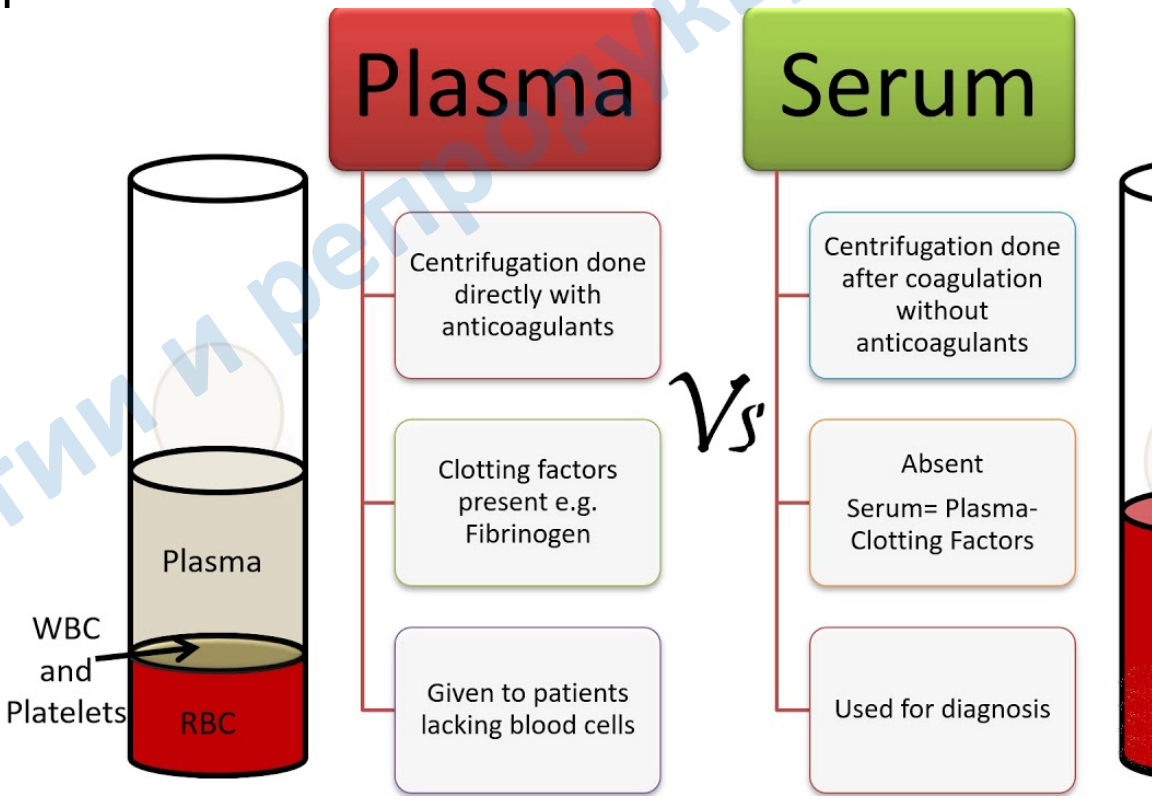
Материал для исследований системы гемостаза

- Плазма
- Цельная кровь
- Кровь или буккальный соскоб для генетических исследований
- Сыворотка (гомоцистеин, антифосфолипидные антитела)

Центр иммунологии и репродукции

Плазма крови

- Жидкая часть крови с сохранными факторами свёртывания (в отличие от сыворотки)
- Для получения плазмы используются антикоагулянты
- Цитрат натрия обеспечивает обратимое связывание ионов кальция и стабилизирует лабильные факторы свёртывания ф.V и ф.VIII.
- Цитрат натрия 3,2% 1:9
- Другие антикоагулянты: ЭДТА (необратимо связывает Ca2+ и инактивирует ф.V и VIII), CTAD (торможение активации тромбоцитов), гепарин (стимуляция связи тромбина и антитромбина и ингибирование свёртывания крови).



Центр химфотологии и репродукции

Плазма

- Бедная и богатая тромбоцитами плазма

Центр иммунологии и репродукции

Забор крови

- Щадящая венепункция с минимальным венозным застоем
- Отдохнуть. Физическая активность, стресс (выброс t-PA и увеличение фибринолиза, укорочение АЧТВ, активация фактора VIII, увеличение vWF
- Забор крови в положении сидя (лёжа)
- Используется венозная кровь (кроме прикроватной диагностики)
- Не брать из катетера с гепарином
- Учитывать гематокрит
- Длительный стаз – укорочение АЧТВ, ПВ, ТВ, повышение уровня фибриногена, увеличение фибринолиза за счёт высвобождения белков и сосудистой стенки (t-PA, vWF), активации тромбоцитов
- Переворачивание пробирки 3-4 раза для лучшего перемешивания с антикоагулянтом
- Минимизировать время хранения проб

Центр иммунологии и репродукции

Проблемы

- Некорректное соотношение крови и антикоагулянта
- Сгустки
- Гемолиз (влияет на тесты с оптическим методом детекции

Центр иммунологии и репродукции

Тромбоцитарный гемостаз

- Время кровотечения
- Количество тромбоцитов
- Агрегация тромбоцитов
- Фактор Виллебранда

Центр иммунологии и репродукции

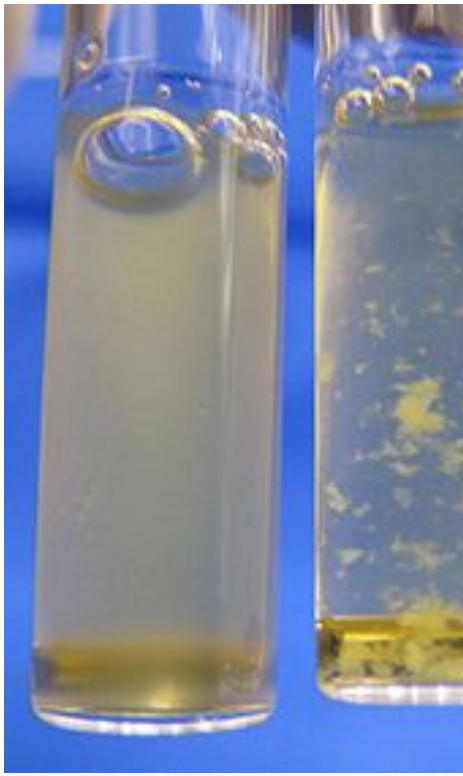
ЭДТА (этилендиаминтетраацетат)

- Для оценки тромбоцитов
- Может быть ЭДТА-зависимая тромбоцитопения
- Полиморфизм ITGB3-b: 1565 T>C ассоциирован с псевдоагрегацией

Центр иммунологии и репродукции

Агрегация тромбоцитов

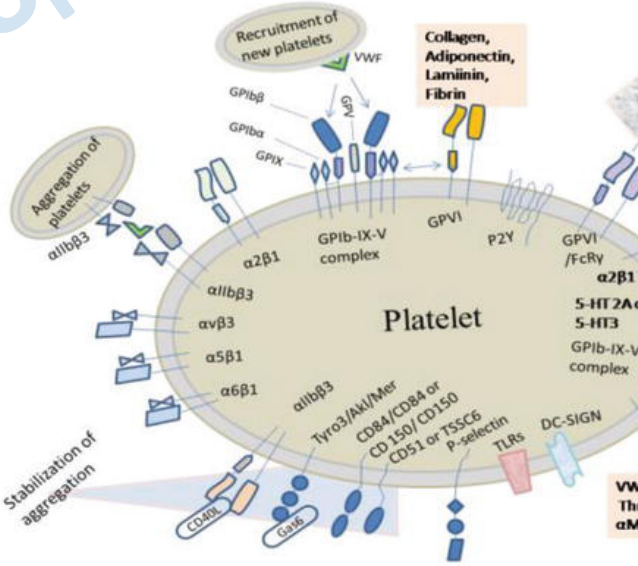
- Оптическая агрегатометрия – увеличение светопропускания при образовании агрегатов
- Импедансная агрегатометрия – изменение сопротивления между металлическими электродами при образовании агрегатов
- PFA-100/200 – образование сгустка на мембране и изменение давление в картридже (аналог времени кровотечения – нарушение первичного гемостаза, тромбоцитарной функции, фактора Виллебранда)



Центр иммунологии и репродукции

Индукторы агрегации тромбоцитов

- АДФ – изменяется форма клеток— >экспозиция рецептора фибриногена — >Ca2+-зависимая агрегация через простагландин-тромбоксановую систему и альфа-гранулы
- Адреналин (эпинефрин) – действует в цитратной плазме при снижении Ca2+ (экспрессия рецептора фибриногена, ТХА2-волна)
- Коллаген – естественная активация тромбоцитов
- Арахидоновая кислота – превращается в ПГG2, ПГН2, тромбоксан А2.
- Ристоцетин – стимулирует взаимодействие vWF с тромбоцитарным ГП Ib



Центр иммунологии и репродукции

Интерпретация результатов агрегации

Platelet Aggregation Disease State Summary	ADP		Epinephrine		Arachidonic Acid	Collagen	Thrombin	Ristocetin
	1°	2°	1°	2°				
Bernard-Soulier Syndrome	N	N	N	N	N	N	N or ↓	↓
von Willebrand Disease	N	N	N	N	N	N	N	↓*
Glanzmann's Thrombasthenia	↓	↓	↓	↓	↓	N/A	↓	N/A
Storage Pool Disorder	↓	↓ or ↓↓	↓	↓	N or ↓	↓	N/A	N/A
Aspirin Like Disorder or Aspirin Ingestion	↓	↓	↓	↓	↓	↓	N/A	N/A

N = Normal ↓ = Decreased ↓↓ = Substantially Decreased 1° = Primary Response 2° = Secondary Response

* Corrected by cryoprecipitate, Factor VIII concentrate or normal plasma; type IIB exhibits increased sensitivity to low concentrations

Центр иммунологии и репродукции

Клоттинговые тесты

- На основе оценки времени от добавления активатора до образования сгустка
- Добавляются не только активаторы, но и другие компонен
- Нельзя оценить компоненты системы фибринолиза
- Различные способы детекции: механический, оптико-механический, турбидиметрический

Центр иммунологии и репродукции

Другие типы исследований

- Тесты с хромогенными и флуорогенными субстратами для оценки активности протеаз - ферментов (антитромбин, плазминоген, протеин С, гепарин, PAI, ингибитор плазмина и другие). Влияет приём непрямых антикоагулянтов, дефицит витамина К
- Иммунохимические методы для определения концентрации конкретного белка на основе реакции антиген-антитело
- Проточная цитометрия – количество различных рецепторов, продукты клеточной активации, субпопуляции тромбоцитов и
- Молекулярно-генетические методы для определения генетической природы нарушений (Лейденская мутация, гены протромбина, интегринов, протеина С и так далее)

Центр иммунологии и репродукции

Скрининговые и расширенные тесты

- АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время) – внутренний путь
- ПВ (протромбиновое время) – внешний путь
- ТВ (тромбиновое время)
- Фибриноген

- Активность факторов II, V, VII, VIII, IX, X
- Активность антитромбина, системы протеина С
- Волчаночный антикоагулянт

Центр иммунологии и репродукции

Что влияет на клоттинговые тесты?

- Нарушения со стороны факторов, кофакторов, ингибиторы свёртывания
  - ПВ – дефицит VII, X, V, протромбина, дефицит фибриногена, ПДФ, парапротеины
  - АЧТВ – дефицит XII, XI, IX, VIII, X, дефицит фибриногена
  - ТВ – свойства и концентрация фибриногена
  - Аутоантитела (влияние ВА на АЧТВ)
- Активация гемостаза
- Нарушение забора крови
- Приём препаратов (ПВ - антагонисты витамина К, ингибиторы АЧТВ – НФГ, ТВ – гепарин, ингибиторы тромбина)

Центр иммунологии и репродукции

Протромбиновое время (ПВ, PT, INR)

- Протромбиновое время в секундах
- Протромбин по Квику – по калибровочному графику
- Протромбиновое отношение – ПВ пациента/ПВ референсной нормальной плазмы – не используется
- Протробиновый индекс – ПВ референсной нормальной плазмы/ПВ пациента - не используется
- МНО – ПО в степени МИЧ (международный индекс чувствительности тромбопластина)

Центр иммунологии и репродукции

Удлинение ПВ – снижение ПК, повышение МНО

- Заболевания печени
- Препараты антагонистов витамина К
- Дефицит витамина К
- Ингибиторы свёртывания (гепарин в высокой дозе, ПДФ)
- Дефицит факторов VII, X, V, протромбина
- Гипо-, дисфибриногенемия
- ДВС синдром
- Препараты ингибиторы фактора Ха

Центр иммунологии и репродукции

АЧТВ (АРТТ)

- Активатор контактной фазы и фосфолипиды
- Чувствительность к гепарину
- Может быть чувствительность к волчаночному антикоагулянту (АЧТВ чувствительный к ВА)

Центр иммунологии и репродукции

Удлинение АЧТВ

- Дефицит II, V, XII, XI, IX, X, VIII
- Дефицит фибриногена
- Лечение гепарином
- Наличие волчаночного антикоагулянта, ПФД
- Болезнь Виллебранда (снижение активности ф.VIII)
- ДВС-синдром

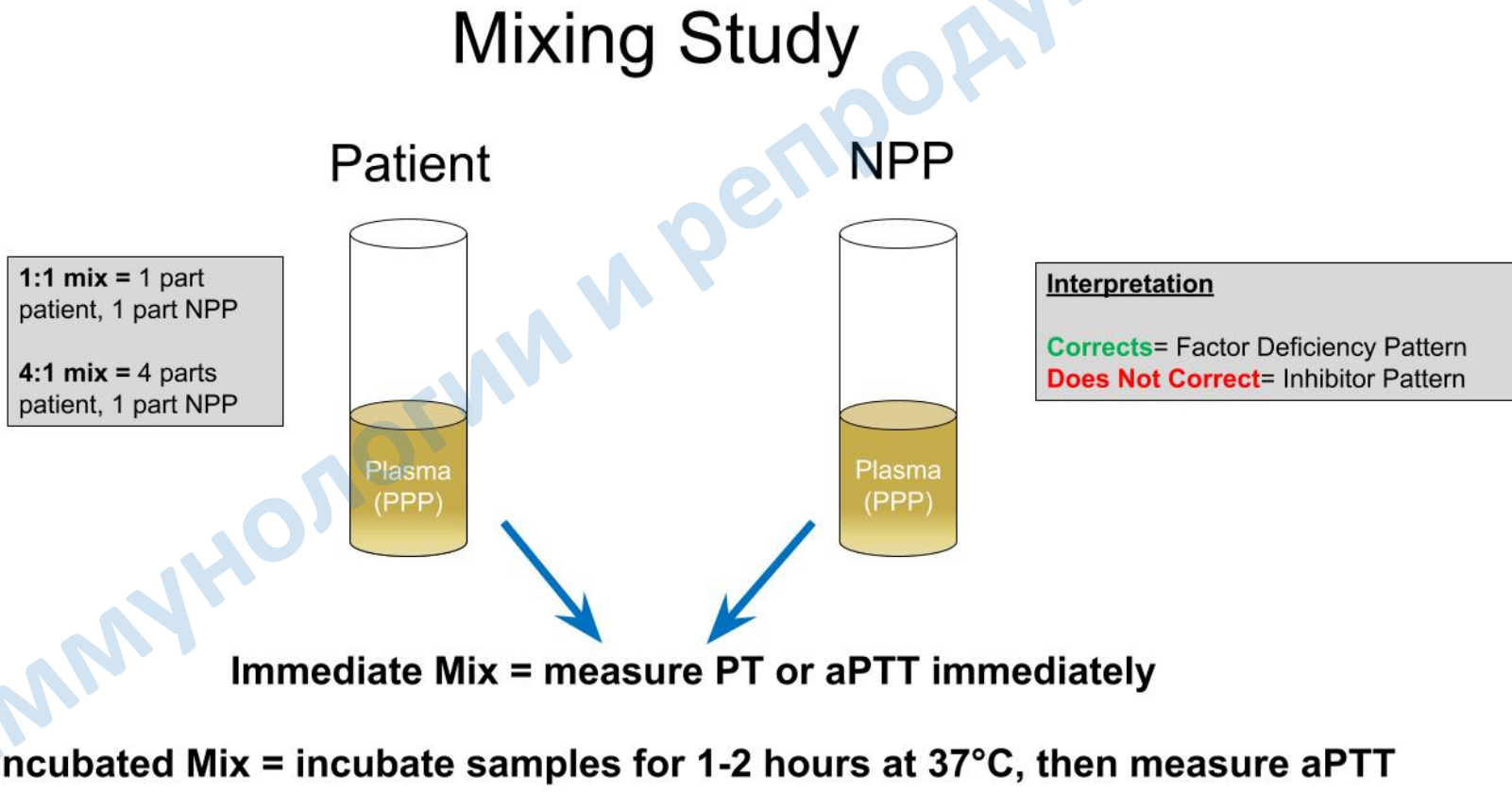
Центр иммунологии и репродукции

Фибриноген

- Белок острой фазы
- Повышение при инфекциях, травмах, заболеваниях почек, коллагенозах, новообразованиях, атеросклерозе, курении, беременности.
- Фибриноген по Клауссу - Определение времени свёртывания при добавлении избытка тромбина
- ПФД влияют на полимеризацию фибрин-мономеров —> ложн низкие результаты
- Турбидиметрический метод – изменение мутности
- Иммунохимические методы – с поликлональнгыми и моноклональными антителами

Центр иммунологии и репродукции

Тесты смешивания



Центр иммунологии и репродукции

Определение антикоагулянтов

- Протеин С
  - коагуляционный – активация протеина С (протак из яда щитомордника) —> инактивация **Va**, VIIIa—>удлинение АЧТВ —>сравнение с плазмой без протеина С
  - с хромогенным субстратом (активация протеина С – протак)
  - иммунохимический
- Небольшое повышение во время беременности, уменьшение после родов и после операций
- Снижение: врожденное, заболевания печени, острая дыхательная недостаточность, менингококковый сепсис, ДВС, гемодиализ, антагонисты витамина К

Центр иммунологии и репродукции

Резистентность к протеину С

- Врожденная – мутации фактора V - лейденская мутация, кембрдижская мутация, HR2-гаплотип
- Гетерозиготный (het) вариант лейденской мутации ассоциируется с увеличением риска тромбозов в 5 - 10 раз, гомозиготный (hom) дефект с увеличением риска в 50 – 100 р
- Приобретённая – волчаночный антикоагулянт, беременность, антагонисты витамина К, увеличчение активности фактора VI

- Оценка резистентности: АЧТВ с protac / АЧТВ без protac

Центр иммунологии и репродукции

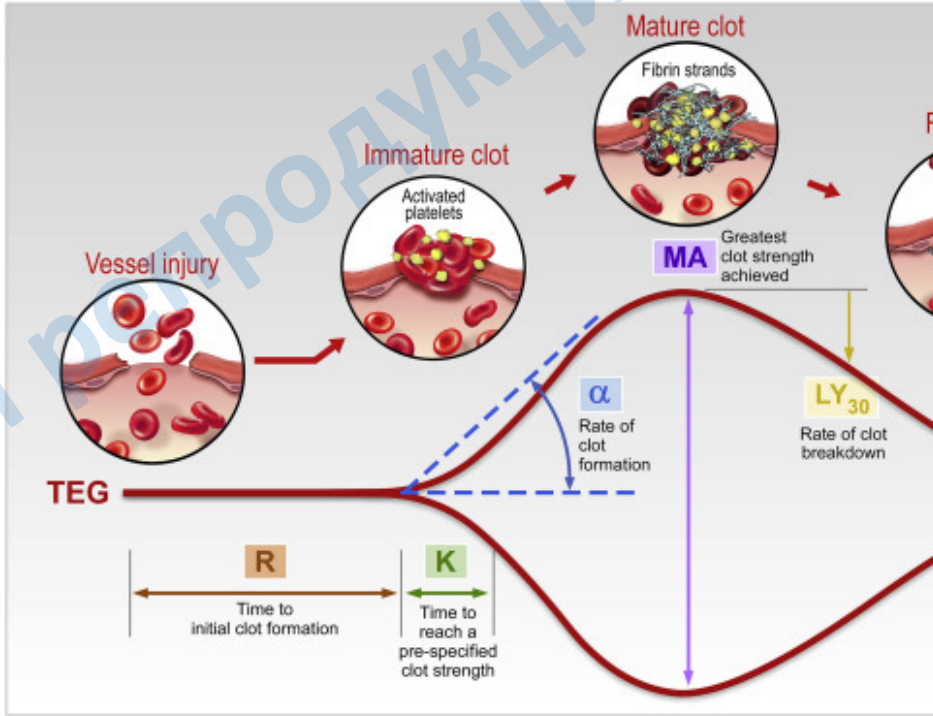
Глобальные тесты гемостаза

- Тест генерации тромбина
- Тромбоэластография (тромбоэластометрия)
- Тромбодинамика

Центр иммунологии и репродукции

Тромбоэластография (ТЭГ)

Фиксация колебаний стержня в кювете с образцом после активации свёртывывания.
Используется цитратная кровь.
Цельная кровь, богатая и бедная тромбоцитами плазма.
оценка гепарина, фибринолиза, тромбоцитопатии, гиперкоагуляция, гипокоагуляции.

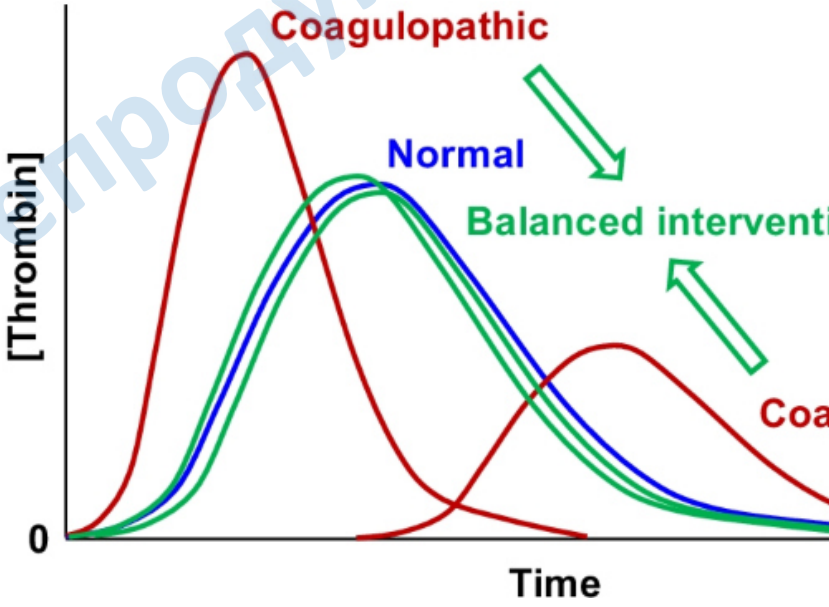


	R-time (R)	K-time (K)	Alpha angle (α)	Maximum Amplitude (MA)
Definition	Time to first deviation from baseline	Time for tracing to reach 20 mm amplitude	Angle between baseline and tangent line that intersects initial deviation	Maximum deviation of tracing from baseline
Controlling Pathways	Coagulation cascade	Fibrinogen cleavage Fibrin polymerization	Fibrinogen cleavage Fibrin polymerization	Fibrinogen activity Platelet count / quality
Interpretation	↑ = hypocoagulable ↓ = hypercoagulable			↓ = hypocoagulable ↑ = hypercoagulable
Therapeutic Implications	↑ = administer fresh frozen plasma	If K time is ↑ or alpha angle is ↓, then: administer cryoprecipitate or fibrinogen concentrate		↓ = administer platelets

Центр иммунологии и репродукции

Тест генерации тромбина (ТГТ)

- Активация гемостаза в плазме
- Тромбин расщепляет флуорогенный субстрат—>регистрация флуориметром кривой генерации тромбина
- Гипо-, гиперкоагуляция, действие лекарственных препаратов, антикоагулянты, гемостаз при беременности, ДВС-синдром.



Центр иммунологии и репродукции

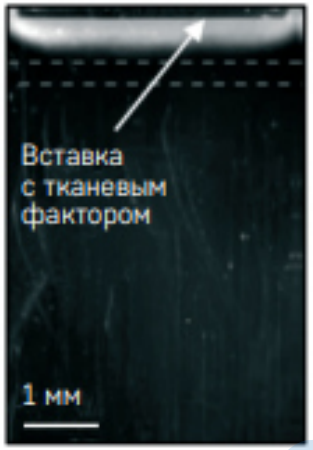
Тромбодинамика

- Активация свёртывания крови тканевым фактором на стенке канала —>рост фибринового сгустка—>фиксация видеокамерой и расчёт параметров:
  - Время задержки
  - Скорость роста
  - Наличие спонтанного тромбообразования
  - Склонность к гиперкоагуляции

  - Плазма

Центр иммунологии и репродукции

Фотографии фибринового сгустка в тесте тромбодинамики, характерные для различных состояний системы свертывания

Состояние гемостаза	Гипокоагуляция	Норма	Гиперкоагуляция	Выраженная гиперкоагуляция со спонтанными сгустками
Фотография сгустка в конце исследования (на 30-й минуте)				
Примеры причин изменения гемостаза	Гемофилия, эффекты антикоагулянтов	Здоровый донор	Сепсис, послеоперационная гиперкоагуляция	Гиперкоагуляционная фаза ДВС-синдрома

Центр иммунологии и репродукции

Маркеры активации свёртывания крови

- D-димеры
- Фактор Виллебранда
- Активность фактора VIII
- Фибриноген

Центр иммунологии и репродукции

D-димеры

- Продукты деградации фибрина, которые образуются под действием плазмина в процессе фибринолиза
- Период полувыведениея больше 24 часов
- Есть много разных методов, с разной степенью чувствительности и специфичности
- Разные единицы измерения! 1 нг/мл FEU= 2 нг/мл DDU
- Пороговые значения разные
- У лиц старше 50 лет концентрация D-димеров возрастает

Центр иммунологии и репродукции

Фактор Виллебранда

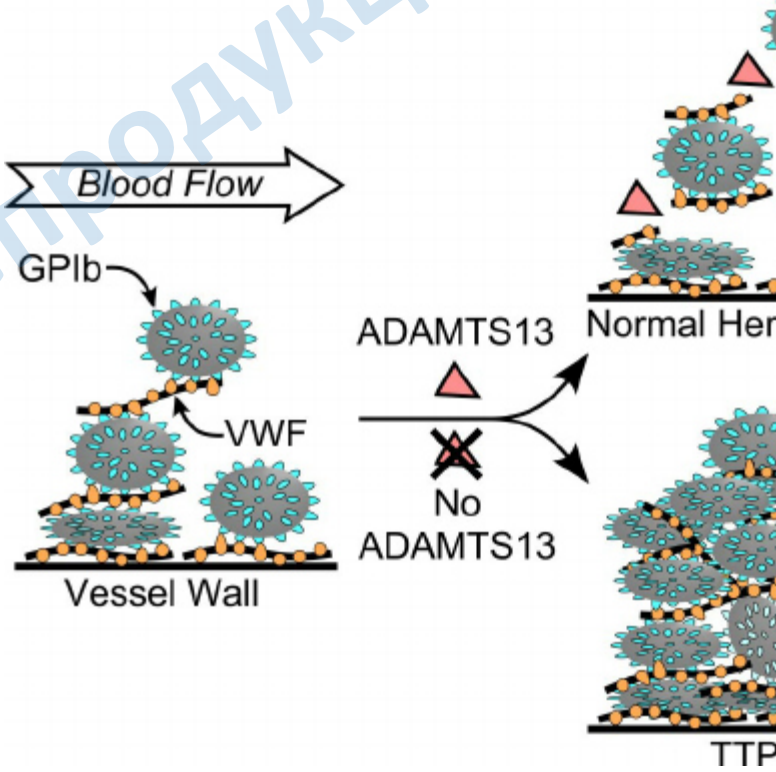
- Повышение – тромбинемия, повреждение эндотелия, активации тромбоцитов при онкологии, гемобластозах, миелопролиферативны заболеваниях, иммунных заболеваниях, диабете, гипертонии.

- **Не только фактор!**
- Антиген фактора фон Виллебранда (vWF:Ag);
- ристоцетин-кофакторная активность (vWF:Rco);
- антиген II фактора фон Виллебранда (vWF:AgII);
- коллаген-связывающая активность фактора фон Виллебранда (vWF:CB);
- фактор фон Виллебранда-фактор VIII связывающий тест: vWF:VIII

Центр иммунологии и репродукции

ADAMTS-13

- Протеиназа, расщепляющая фактор фон Виллебранда.
- Недостаток активности – из-за дефицита или ингибитора
- Во время беременности ADAMTS-13 снижается, одновременно нарастает фактор Виллебранда



Центр иммунологии и репродукции

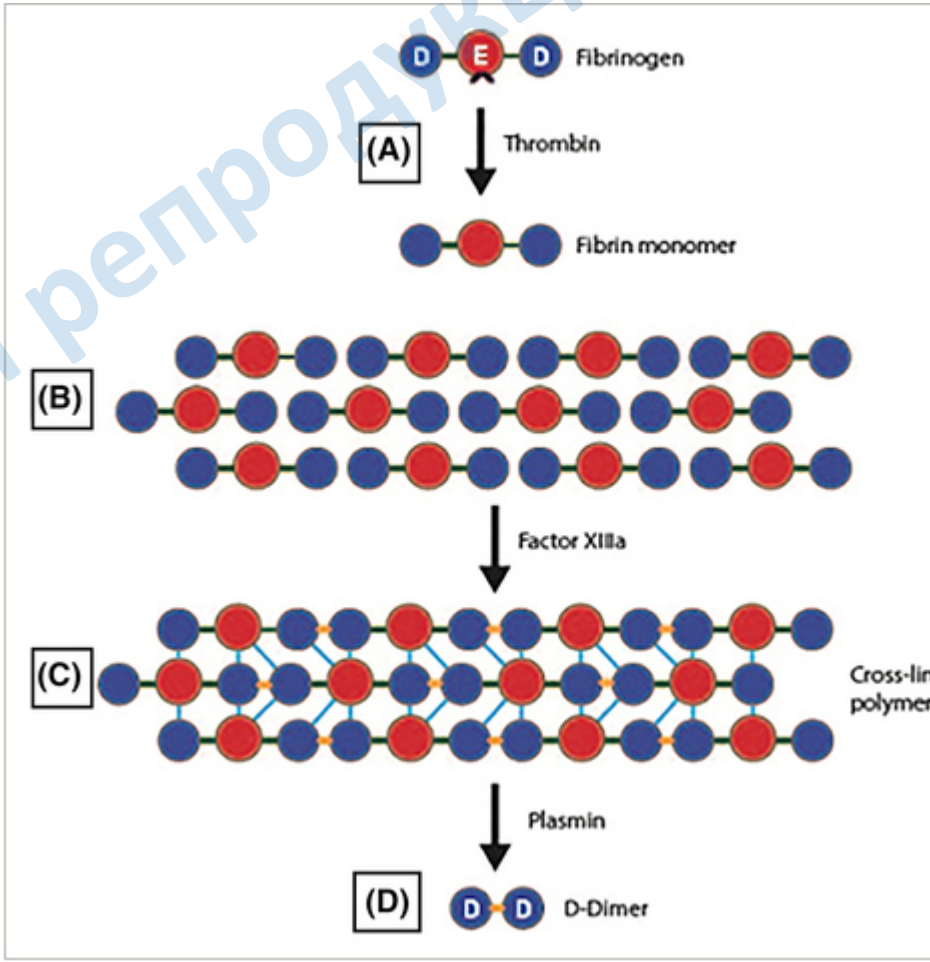
Фрагменты протромбина 1+2

- Отражает активность превращения протробмина в тромб
- Диагностика гиперкоагуляции
- Сам тромбин невозможно измерить количественно, и поэтому используют другие маркеры.
- Фрагмент 1 + 2 имеет период полураспада около 1 часа и удаляется из крови печенью.

Центр иммунологии и репродукции

Мономеры фибрина

- ~~РКФМ~~
- Мономеры фибрина – промежуточный продукт на пути формирования фибрина



Центр иммунологии и репродукции

«Это может быть, и я знаю, почему»

Спасибо за внимание!

Центр иммунологии и репродукции