



Российская академия медицинских наук

Гематологический Научный Центр

НПО “РЕНАМ”

125167 Москва, Новый Зыковский пр., д. 4а

**Пособие для врачей-лаборантов
по методам исследования
ПЛАЗМЕННОГО ГЕМОСТАЗА**

**АЧТВ, протромбиновый комплекс,
тромбиновое время, фибриноген**

Москва, 2006 г.

Составители:

Генеральный директор НПО «РЕНАМ», доктор биологических наук Козлов А.А.,

зав. производством НПО «РЕНАМ», старший научный сотрудник, кандидат биологических наук Берковский А.Л.

начальник ОТК НПО «РЕНАМ», старший научный сотрудник, кандидат биологических наук Качалова Н.Д.

научный сотрудник НПО «РЕНАМ» Сергеева Е.В.;

ведущий научный сотрудник ГНЦ РАМН, кандидат биологических наук Простакова Т.М.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
АКТИВИРОВАННОЕ ЧАСТИЧНОЕ ТРОМБОПЛАСТИНОВОЕ ВРЕМЯ (АЧТВ)	5
Наборы РЕНАМ для определения АЧТВ	7
Аналитические характеристики наборов	7
Интерпретация результатов	7
Нормальные значения АЧТВ:	8
ПРОТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ	8
О стандартизации тромбопластинов	9
Протромбиновая активность по Квику	11
Наборы РЕНАМ для исследования протромбинового времени	12
Аналитическая характеристика наборов	14
Интерпретация результатов	14
Нормальные значения:	14
ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ	15
Наборы компании РЕНАМ для анализа тромбинового времени	17
Аналитические характеристики	17
Интерпретация результатов	17
Нормальные значения тромбинового времени:	17
КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФИБРИНОГЕНА ПО МЕТОДУ КЛАУССА	17
Наборы РЕНАМ для анализа фибриногена	19
Аналитические характеристики	20
Изменение содержания фибриногена при различных заболеваниях	20
Литература	21

ВВЕДЕНИЕ

Основные функции гемостаза заключаются в поддержании жидкого состояния крови и в быстром купировании повреждения сосудистой стенки.

Первыми в ответ на повреждение реагируют кровеносные сосуды и клетки: происходит спазм микрососудов, активация клеток эндотелия, активация тромбоцитов, секреция этими клетками биологически активных веществ, адгезия и агрегация тромбоцитов, образование тромбоцитарной пробки. Одновременно в процесс включаются плазменные ферментные системы, лавинообразно активирующие друг друга и обеспечивающие образование фибринового сгустка, препятствующего потере крови, и последующий его лизис, когда такая опасность исчезла. Противосвертывающие системы антитромбина III, протеина C и ряда других белков проводят регулирование механизма свертывания и фибринолиза.

Нарушение баланса взаимодействия всех этих компонентов, в том числе из-за врожденной недостаточности некоторых из них, приводит к развитию различных заболеваний (тромбоэмболических синдромов, диссеминированного внутрисосудистого свертывания, ишемии и инфарктов органов, гемофилии), нередко фатальных. Нарушение гемостаза происходит при таких видах патологии, как атеросклероз, иммунные и онкологические заболевания, акушерские осложнения, патология матери и плода, критические состояния. В процессе лечения сердечно-сосудистых заболеваний, ишемий и инфарктов органов необходим постоянный контроль за состоянием гемостаза.

Все тесты по исследованию гемостаза имеют свои естественные ограничения, так как они только моделируют *in vitro* процесс свертывания крови, который происходит в живом организме. Для моделирования *in vitro* внутреннего пути свертывания служит тест определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). В этом тесте все необходимые компоненты инициации внутреннего пути свертывания вносятся извне.

Во внешнем пути свертывания ключевое место отводится тканевому фактору - гликопротеину, связанному с мембранами и присутствующему во многих тканях. Внешний путь свертывания принято *in vitro* моделировать тестом протромбинового времени, когда к исследуемой цитратной плазме, бедной тромбоцитами, добавляют тромбопластин, представляющий собой солевой экстракт тканей, содержащий тканевый фактор и фосфолипиды.

Завершает процесс свертывания так называемый общий путь. Активированный ф. Ха превращает неактивный протромбин в гиперактивный фермент тромбин, тромбин отщепляет от молекулы растворимого фибриногена 4 фибринопептида, оставшиеся

мономеры ассоциируют в полимер фибрин, ф. XIII завершает процесс, образуя ковалентные связи внутри молекулы фибрина, что делает молекулу нерастворимой и резистентной к лизису.

К базовым тестам, которые проводятся при каждом первичном обследовании пациентов, относятся:

- АЧТВ,
- протромбиновое время;
- тромбиновое время;
- количественное определение фибриногена.

Эти тесты легко выполнимы и достоверно указывают на нарушения в плазменном компоненте гемостаза.

Несмотря на простоту выполнения этих тестов, необходимо, чтобы полученные результаты были точными и воспроизводимыми, а для этого следует обращать внимание на особенности получения проб плазмы для анализа, на правильную работу с пробами, на условия хранения проб и на использование адекватных контролей и стандартов.

АКТИВИРОВАННОЕ ЧАСТИЧНОЕ ТРОМБОПЛАСТИНОВОЕ ВРЕМЯ (АЧТВ)

Тест АЧТВ является одним из самых информативных и самых распространенных скрининговых тестов, который чувствителен к дефициту всех факторов свертывания крови (кроме ф. VII), к гепарину, к специфическим ингибиторам (антитела к ф. VIII и IX) и к неспецифическим ингибиторам (системная красная волчанка).

Внутренний путь свертывания осуществляется внутри кровеносных сосудов при повреждении эндотелия или при появлении чужеродной отрицательно заряженной поверхности. Процесс внутреннего свертывания начинается с активации «факторов контакта»: ф. XII (Хагемана), прекалликреина и высокомолекулярного кининогена, которые связываются с коллагеном, базальной мембраной эндотелия или с отрицательно заряженной чужеродной поверхностью, образуют комплекс и взаимно активируют друг друга, что выражается в изменении молекулярной структуры каждого компонента. При этом прекалликреин превращается в калликреин, неактивный ф. XII – в ф. XIIa. Активный ф. XIIa в присутствии своего кофактора, высокомолекулярного кининогена, превращает ф. XI в ф. XIa, который в свою очередь воздействует на ф. IX, переводя его в ф. IXa. Ф. IXa, вместе с ф. VIIIa, фосфолипидами и ионами кальция образуют комплекс, который активирует ф. X и запускает процесс свертывания крови по общему пути.

В плазме крови имеются все вещества, которые необходимы для осуществления внутреннего пути свертывания: отрицательно заряженная поверхность (коллаген

поврежденной сосудистой стенки), фосфолипиды (тромбоциты), циркулирующие неактивные факторы и кофакторы.

Метод моделирования процесса внутреннего свертывания в системе *in vitro* был предложен в 1953 г. (Langdell, Wagner, Brinhou) и первоначально осуществлялся на стеклянной поверхности. Однако стекло активировало процесс по-разному в зависимости от марки, методов обработки, применяемого моющего средства. С целью стандартизации в качестве активатора (отрицательно заряженной поверхности) стали использовать каолин, целит, бентонит и ряд других веществ с отрицательно заряженной поверхностью, в последние годы – растворимую в воде эллаговую кислоту. При проведении теста используют также фосфолипиды растительного и животного происхождения или их смесь и ионы кальция для рекальцификации плазмы после действия цитрата. С целью стандартизации реакцию проводят при постоянной температуре (37°C).

Принцип метода. *Определяется время свертывания плазмы крови человека в условиях стандартизированной контактной и фосфолипидной активации процесса в системе in vitro. В этих условиях время образования сгустка фибрина зависит только от активности факторов внутреннего и общего путей свертывания.*

До настоящего времени в ряде лабораторий проводят 2 других аналогичных, но лишь частично стандартизированных теста:

ЧТВ (частичное тромбопластиновое время или кефалиновое время) и

АВР (активированное время рекальцификации или каолиновое время).

ЧТВ, кефалиновое время, определяют при добавлении в исследуемую плазму фосфолипидного компонента (кефалина) и кальция хлористого; АВР, каолиновое время, - при добавлении в исследуемую плазму фактора контакта (каолина) и кальция хлористого, тест чувствителен к волчаночному антикоагулянту.

Тест АЧТВ не имеет стандарта ВОЗ, так как для его проведения применяют различные реагенты. В качестве заменителя тромбоцитарного фактора 3 используют тромбоциты, фосфолипиды животного происхождения (мозг кроликов, быка или человека), растительные фосфолипиды (сои), смесь растительных и животных фосфолипидов, фосфолипиды из мембран эритроцитов человека: эриид, эритрофосфатид. АЧТВ-реагенты различаются также по типу и концентрации активатора, типу буфера, присутствию защитных добавок. Было установлено, что именно фосфолипидные реагенты являются тем компонентом, который преимущественно влияет на результаты АЧТВ-теста, и оптимальными являются те реагенты, в которых соотношение фосфатидил-серина и фосфатидил-холина такое же, как в факторе 3 тромбоцитов.

Учитывая, что главная функция теста АЧТВ – провести скрининг нарушений внутреннего пути свертывания, предпочтение следует отдавать реагентам, наиболее чувствительным ко многим нарушениям в системе гемостаза, в том числе к дефициту активности факторов внутреннего пути свертывания, к присутствию в плазме крови волчаночного антикоагулянта и гепарина.

Компания РЕНАМ разработала оригинальный фосфолипидный реагент эрилид для проведения АЧТВ (патент РФ № 1790604 от 22.09.1992). Эрилид представляет собой очищенный от гемоглобина компонент мембран эритроцитов человека, аналогичный по фосфолипидному составу импортному кефалину. Эрилид включен в наборы реагентов для исследования АЧТВ.

Наборы РЕНАМ для определения АЧТВ

Работа ручным методом и на всех типах коагулометров

Код	Наименование, состав набора, краткое описание	Число анализов
ПГ-6	Коагуло-тест - набор реагентов для определения АЧТВ, ЧТВ и АВР. Состав: лиофильно высушенный эрилид (1,0 мл) - 2 фл., легкая фракция каолина (5,0 мл) - 2 фл., 0,025 М раствор кальция хлористого (5,0 мл) - 2 фл.	100-200
ПГ-6А	Коагуло-экспресс – набор для определения АЧТВ. Состав: лиофильно высушенная смесь каолина и эрилида (2,0 мл) – 8 фл., 0,025 М раствор кальция хлористого (10 мл) – 2 фл.	160-320
ПГ-7	АЧТВ-тест - набор реагентов для определения АЧТВ, содержит фосфолипиды сои и эллаговую кислоту. Тест наиболее чувствителен к дефициту факторов свертывания и к присутствию гепарина, чувствителен к волчаночному антикоагулянту. Состав: лиофильно высушенный АЧТВ-реагент (4,0 мл), содержит эллаговую кислоту и фосфолипиды сои - 7 фл., 0,025 М раствор кальция хлористого (10 мл) - 3 фл.	280-560

Аналитические характеристики наборов

Коэффициент вариации результатов параллельных определений в одной пробе плазмы крови составляет не более 10%.

Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии не превышает 10%.

Среднее значение нормы, определенное на 50 донорах, и пределы колебаний нормы (2σ) указаны в паспорте на каждый набор.

Интерпретация результатов

По результатам теста АЧТВ определяют дефицит факторов внутреннего пути свертывания, наличие в крови ингибиторов этих факторов и антикоагулянтов. Тест

используется для диагностики и дифференциальной диагностики гемофилии, для выявления волчаночного антикоагулянта, при выборе антикоагулянта и для контроля за лечением больных с коронарной недостаточностью.

Тест не улавливает нарушения в тромбоцитах, недостаточность проконвертина, фибринстабилизирующего фактора и недостаток кальция в системе.

Удлинение теста АЧТВ может быть вызвано:

- синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС);
- заболеванием печени, где синтезируются почти все факторы свертывания крови;
- массивными гемотрансфузиями;
- введением гепарина;
- дефицитом факторов внутреннего пути свертывания;
- дефицитом витамина К;
- присутствием ингибиторов свертывания, как специфических, так и неспецифических;
- наличием волчаночного антикоагулянта;
- наличием гемофилии.

Укорочение теста АЧТВ свидетельствует о гиперкоагуляции и опасности возникновения тромбозов.

Нормальные значения АЧТВ:

- Коагуло-тест - 35-45 сек
- АЧТВ-тест – 25-35 сек
- Коагуло-экспресс – 35-45 сек

ПРОТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ

Внешний путь свертывания принято *in vitro* моделировать тестом определения протромбинового времени. Протромбиновый тест был предложен в 1935 г. A.Quick с целью анализа в системе *in vitro* активности протромбина – ф. II свертывания крови.

Позднее было установлено, что этим тестом определяется активность нескольких факторов свертывания крови (факторов протромбинового комплекса): ф. II (протромбин), ф. VII (проконвертин), ф. X (Стюарта) и ф. V (проакселерин). Для проведения теста требуется тканевый фактор (ТФ), фосфолипиды и ионы кальция.

Фактор VIIa, главный фактор внешней системы коагуляции, циркулирует в крови в активной форме, но не проявляет своей активности до контакта с ТФ. В норме ТФ

содержится только на клетках, которые не находятся в прямом контакте с кровотоком, и поэтому могут вызывать свертывание крови только после повреждения сосудов. При этом образуется двух молекулярный комплекс, который и проявляет активность фактора VIIa.

Тест на протромбин является одним из основных базовых тестов, используемых в повседневной клинической практике. Тест используют для выявления нарушений активности факторов внешнего пути свертывания, для оценки функции печени, и в первую очередь - для контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия.

Основным реагентом в тесте является тромбопластин - солевой экстракт тканей (легкие, плацента, головной мозг) животных и человека, богатый ТФ. Концентрация ТФ в тромбопластинах так велика, что активация ф. X происходит буквально за несколько секунд.

Принцип метода. *Определяется время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы в присутствии ионов кальция и избытка тканевого тромбопластина. В этих условиях время образования сгустка фибрина зависит только от активности факторов протромбинового комплекса.*

О стандартизации тромбопластинов

При лечении венозных тромбозов и тромбоэмболий легочной артерии в медицинской практике широко применяют пероральные антикоагулянты, производные индадиона (фенилин) и кумарина (варфарин). Доказана эффективность этих препаратов и для предупреждения тромбоэмболических осложнений при имплантации искусственных клапанов сердца, так как у больных этой категории повышен риск эмболий, приводящих к инсульту, особенно высока частота эмболических осложнений у больных инфарктом миокарда. В отличие от других лекарственных средств, тормозящих формирование фибрина (гепарин, дефибринаторы), пероральные антикоагулянты препятствуют образованию в гепатоцитах полноценных в коагуляционном отношении факторов II, VII, IX и X, вызывая состояние гипокоагуляции. Противотромботическое действие считается полноценным, когда снижается концентрация всех четырех факторов свертывания.

Трудности при лечении пероральными антикоагулянтами заключаются в необходимости выбора такой оптимальной дозы препарата, которая обеспечивала бы предотвращение тромбообразования, не вызывая при этом кровотечения. Основным методом контроля является определение продолжительности протромбинового времени (ПВ) по методу Quick. В мире используется около 30 тромбопластинов, которые получают из разных источников (кадаверный мозг человека, мозг быка, кролика или плацента человека), а также рекомбинантные реагенты. Тромбопластины варьируют по чувствительности к угнетению факторов свертывания под действием кумариновых

антикоагулянтов. Имеет значение и источник получения, и способ приготовления. Особенно варьируют тромбопластины по чувствительности к ф. VII. Чувствительный тромбопластин приводит к значительному увеличению ПВ при инаktivации факторов свертывания. Напротив, мало чувствительный реагент «не чувствует» снижения активности факторов свертывания, время свертывания (ПВ) почти не изменяется по сравнению с нормой,

Для стандартизации тромбопластинов были проведены исследования в 10 центрах под эгидой Бюро Европейского Содружества по эталонам и Международного комитета по стандартизации в гематологии. Был разработан способ сопоставления разных тромбопластинов с использованием метода определения Международного Индекса Чувствительности (МИЧ). Согласно этому методу точки на графике, соответствующие значениям ПВ для двух тромбопластинов, полученные при анализе разных проб плазмы, лежат на прямой линии, проходящей через начало координат двойной логарифмической шкалы. Наклон полученной прямой является МИЧ. Калибровки тромбопластинов была сведена к следующему. Измеряется ПВ в нормальной (2 точки) и кумариновой (6 точек) плазме, с использованием эталонного и калибруемого тромбопластинов. ПВ откладывают в двойной логарифмической шкале, причем на вертикальной оси откладывают ПВ, полученное с эталоном, на горизонтальной – ПВ, полученное с исследуемым тромбопластином. Проводят калибровочный график и математическим методом ортогональной регрессии определяют наклон полученной прямой линии, который и характеризует МИЧ. Эта модель калибровки была официально принята ВОЗ в 1983 г. Были введены следующие термины:

- Международный индекс чувствительности – МИЧ-(International Sensitivity Index – ISI).
- Международное нормализованное соотношение – МНО-(International Normalized ratio – INR) – это протромбиновое отношение (ПО), полученное с эталоном тромбопластина, имеющего МИЧ= 1,0.

При возведении значения ПО в степень МИЧ будет получено то значение МНО, которое было бы получено для данной плазмы с использованием Международного эталонного препарата тромбопластина:

$$\text{МНО} = \text{ПО}^{\text{МИЧ}}$$

Имеется обратная зависимость между чувствительностью тромбопластина и МИЧ. Чем меньше МИЧ, тем выше чувствительность реагента. По теории любой реагент может быть использован при определении МНО, если известен МИЧ. Однако на практике

показано, что лучше использовать чувствительные реагенты с МИЧ около 1,0, т.к. даже небольшое изменение ПВ отражается на МНО, если использован нечувствительный реагент. В США рекомендовано использовать реагенты с МИЧ не ниже 1,5, а лучше – не ниже 1,2.

Расчет МНО позволяет клиницисту использовать в работе таблицы соответствия МНО и необходимого и достаточного уровня антикоагулянтной терапии. Так при лечении тромбозов глубоких вен, легочной эмболии и инфаркта миокарда рекомендуемая терапевтическая область МНО составляет 2,0-3,0, а при искусственных клапанах сердца 3,0 – 4,5.

В настоящее время в связи с распространением ВИЧ и вирусов гепатита использование тромбопластинов из кадаверного мозга не рекомендуется и разработаны рекомбинантный эталон тромбопластина (rTF/95) и эталон из мозговой ткани кролика – RBT/90, оба реагента с МИЧ 1,0.

Обращаем внимание на недопустимость смешивания понятия «активность» и «чувствительность» тромбопластинов. Активность – это протромбиновое время (сек) в нормальной плазме, чем оно короче, тем тромбопластин «активнее». Однако в данном случае важнее понятие «чувствительность», которое означает, что данный реагент хорошо «чувствует» снижение уровня факторов протромбинового комплекса.

Систему МНО необходимо применять при лечении пациентов, получающих стабильную антикоагулянтную терапию. МНО нецелесообразно использовать для 3 групп больных: при скрининговом исследовании свертывающей системы, у пациентов с нарушением функций печени и у пациентов, только начавших курс лечения пероральными антикоагулянтами.

Протромбиновая активность по Квику

В ряде стран (в том числе в США) получил распространение другой, более простой способ представления результатов определения протромбинового времени, предложенный в свое время еще Квиком и получивший название “активность протромбина по Квику”.

При использовании этого метода строится калибровочный график зависимости протромбинового времени от суммарной активности факторов протромбинового комплекса в разведенных растворах нормальной плазмы. В неразведенной свежей плазме активность факторов протромбинового комплекса принимается за 100%. При тестировании исследуемой плазмы больного прямо по калибровочной кривой определяют “процент протромбина по Квику”. У здоровых доноров процент протромбина по Квику колеблется от 70 до 130%, у больных снижается до 25%.

В нашей стране было принято определять протромбиновый индекс - процентное отношение протромбинового времени здорового человека к протромбиновому времени больного, т.е. вычислять значение, обратное общепринятому за рубежом. При этом совершенно не принимают во внимание чувствительность используемого для анализа тромбопластина. К сожалению, метод определения протромбинового индекса до настоящего времени применяется в нашей стране, хотя он не несет необходимой информации.

Результаты исследования протромбинового времени выражают как:

- протромбиновое отношение, отношение ПВ больного к ПВ нормы;
- протромбиновый индекс, отношение ПВ нормы к ПВ больного, %;
- процент протромбина по Квику - доля активности исследуемой плазмы от нормы, определенная по калибровочному графику разведений нормальной плазмы;
- в единицах МНО.

Наборы РЕНАМ для исследования протромбинового времени

Компания РЕНАМ выпускает 4 типа лиофильно высушенных тромбопластинов, полученных из головного мозга кроликов.

Во-первых, это тромбопластины, аттестованные по МИЧ, которые предназначены для определения дозы не прямых антикоагулянтов.

Во-вторых, это тромбопластины в смеси с кальцием, аттестованные по МИЧ, также для определения дозы не прямых антикоагулянтов.

В третьих, это тромбопластины, не аттестованные по МИЧ - для скрининговых исследований.

В четвертых, это тромбопластин-кальциевая смесь, не аттестованная по МИЧ для скрининговых исследований.

Кроме того, разработан набор реагентов для определения протромбинового времени в капиллярной крови.

Код	Наименование, состав набора, краткое описание	Число анализов
ПГ-1	Тромбопластин - очищенный экстракт мозга кроликов, лиофильно высушенный (2,5 мл), водорастворимый. Для определения ПВ, протромбина по Квику, протромбинового индекса в плазме. Общеклиническое, скрининговое тестирование.	25-50
ПГ-2	Диагем П - набор реагентов для определения ПВ, протромбина по Квику и протромбинового индекса в плазме. Состав: тромбопластин, лиофильно высушенный (4,0 мл) – 6 фл., раствор CaCl_2 (5,0 мл) – 4 фл.	150
ПГ-3	Тромбопластин МИЧ 1,5. Тромбопластин с аттестованным МИЧ	25-50

	(ISI) менее 1,5, лиофильно высушенный (2,5 мл). Контроль за лечением непрямыми антикоагулянтами.	
ПГ-4/1	Тромбопластин с кальцием - готовая к употреблению лиофильно высушенная смесь тромбопластина и CaCl_2 (8,0 мл). Для определения ПВ, протромбина по Квику и протромбинового индекса в плазме.	40-80
ПГ-5/1	Ренампластин МИЧ 1,1-1,2. Готовая к употреблению лиофильно высушенная смесь тромбопластина и CaCl_2 (8,0 мл). Для определения ПВ, МНО, протромбина по Квику и протромбинового индекса в плазме. Контроль за лечением непрямыми антикоагулянтами.	40-80

КГ-1	Диакap-П – набор реагентов для определения протромбинового времени, протромбинового отношения, протромбинового индекса и МНО в капиллярной крови. Состав: Ренампластин, лиофильно высушенный (4,0 мл) – 9 фл., консервант для взятия капиллярной крови (5,0 мл) – 1 фл.	360-720
П-9	Кальций хлористый – 0,025 М титрованный раствор – 1 фл.	

РЕНАМПЛАСТИН является усовершенствованным реагентом, в котором содержится и тромбопластин, и кальций, что упрощает метод анализа протромбинового времени. Для Ренампластина определен МИЧ. Тест ПВ можно проводить ручным методом или с использованием электромеханических или фотооптических коагулометров.

Состав Ренампластина: лиофилизированный солевой экстракт мозга кролика с добавлением ионов кальция, стабилизаторов и консервантов, МИЧ - 1,1-1,2.

Капиллярная кровь. Определение протромбинового времени удобно проводить в капиллярной крови, получаемой из мякоти пальца. Однако в крови содержатся форменные элементы крови, которые влияют на процесс свертывания. Учитывая это, в набор реагентов Диакap-П, кроме Ренампластина, включен специальный консервант крови в виде концентрированного раствора.

Аналитическая характеристика наборов

Коэффициент вариации результатов определений - не более 10%.

Чувствительность тромбопластина - не менее 12,5 % протромбина по Квику.

Интерпретация результатов

Удлинение протромбинового времени связано с:

- введением пероральных антикоагулянтов;
- заболеванием печени;
- дефицитом витамина К;
- ДВС;
- наследственным дефицитом протромбина, ф. VII, ф. X или ф. V.

Укорочение протромбинового времени связано с опасностью тромбозов.

Нормальные значения:

- протромбиновое время – 14-18 сек
- процент протромбина по Квику – 70-130%
- МНО – 0,85 – 1,15
- протромбиновый индекс – 90-105%

ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ

Определение тромбинового времени является третьим по значимости базисным скрининговым тестом. Тест характеризует конечный этап процесса свертывания – превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина, на него влияет концентрация фибриногена в плазме и наличие продуктов деградации фибрина. Удлинение тромбинового времени может быть вызвано молекулярными аномалиями и снижением уровня фибриногена (менее 1,0 г/л), избытком в крови гепарина в результате гепаринотерапии, накоплением продуктов деградации фибрина, парапротеинемией, наследственной и приобретенной дисфибриногенемией, наличием ингибиторов тромбина и фибриногена.

Для дифференциальной диагностики проводят количественное определение фибриногена, продуктов деградации фибрина, пробу с протаминсульфатом и др., позволяющие уточнить диагноз. Образование сгустка не происходит в терминальной стадии ДВС-синдрома, а также при внутривенном введении большой дозы гепарина..

Ключевым реагентом при проведении теста является реагент тромбин, который должен быть выделен в максимально очищенном виде, и сохранять свою активность при выделении и лиофильном высушивании. При проведении тест используют тромбин с активностью 3 МЕ/мл и 6 МЕ/мл. Для исследования плазмы, не содержащей гепарин, как правило, используют тромбин с активностью 3 МЕ/мл. При работе с гепаринизированной плазмой необходимо использовать тромбин с активностью 6 МЕ/мл.

Следует отметить, что при использовании тромбина с активностью 3 МЕ/мл время свертывания должно лежать в диапазоне 16-21 (± 5) сек, а при использовании тромбина с активностью 6 МЕ/мл время свертывания должно находиться в более узком диапазоне 9-13 (± 2) сек.

Таким образом, принято в первом случае считать патологией отклонение от нормы более, чем на 5 сек, во втором случае – на 2 сек.

Принцип метода *определения заключается в том, что при добавлении тромбина к цитратной плазме время образования сгустка фибрина зависит только от количества и активности фибриногена в данной плазме, от активности тромбина и от наличия ингибиторов. Реакция проходит в одну стадию.*

В соответствии с новой моделью гемостаза образование тромбина является центральным событием процесса свертывания крови. Небольшое количество ф. Ха, образованное выделившимся при травме тканевым фактором и ф. VIIa, приводит к образованию очень небольшого количества тромбина, которое легко разрушается антитромбином III.

Сигнал сразу усиливается, когда тромбин связывается с тромбоцитами. При этом неактивный ф. V преобразуется в активный ф. Va - кофактор, необходимый для образования комплекса ПРОТРОМБИНАЗЫ на активированной мембране тромбоцитов.

Тромбин также высвобождает ф. VIII от связи с фактором Виллебранда и переводит его в ф. VIIIa., который является основным компонентом комплекса ТЕНАЗЫ, который также располагается на поверхности тромбоцитов.

Ф. IIa переводит ф. XI в XIa, что приводит к активации ф. IX в ф. IXa. И, наконец, именно тромбин активирует тромбоциты и тем завершает образование комплексов ТЕНАЗЫ и ПРОТРОМБИНАЗЫ.

Укрепление этих комплексов на поверхности тромбоцитов быстро приводит к образованию достаточного количества ф. IIa для поддержания активации тромбоцитов. Тромбоциты активируются как при прилипанию к коллагену, так и под действием тромбина.

Таким образом, небольшое количество тромбина, образованное при повреждении тканевых клеток, с помощью реакций обратной связи и в присутствии тромбоцитов существенно возрастает. Затем при образовании мультиферментных комплексов на поверхности активированных тромбоцитов количество тромбина уже многократно увеличивается и распространяется по всему организму. Конечный результат – образование большого количества тромбина и длительная активация тромбоцитов, что приводит к превращению неактивного и растворимого фибриногена плазмы крови в нерастворимый полимер фибрин.

Тромбин – это витамин К зависимая протеиназа с ММ 37 000 D.. Тромбин имеет много функций: он активирует кофакторы V и VIII, активирует ф. XI, способствует активации, агрегации и дезинтеграции тромбоцитов, активирует ф. XIII, и только тромбин превращает растворимый фибриноген плазмы в нерастворимый фибрин.

Тромбин выделяют из плазмы крови с помощью тромбопластина, который превращает неактивный протромбин плазмы в активный фермент тромбин. Затем следуют этапы хроматографической очистки от примесей, которые значительно повышают удельную активность тромбина. Удобно готовить для анализов 2 раствора тромбина: стабилизированный раствор тромбина, который допускается хранить в течение месяца при температуре 2-8°C и рабочий раствор тромбина, который используется в течение 2 ч в день изготовления.

Наборы компании РЕНАМ для анализа тромбинового времени

Код	Наименование, состав набора, краткое описание	Число анализов
ПГ-9	Тромбин-тест - набор реагентов для определения тромбинового времени. Состав: стабилизатор (этиленгликоль) (0,5 мл) – 1 фл., тромбин человека, лиофильно высушенный (1,0 мл) – 2 фл.	200 -400
ПГ-9А	Тромбин-реагент для определения тромбинового времени. Состав: тромбин с активностью 9-10 МЕ/мл, лиофильно высушенный (2,0 мл) – 9 фл.; Растворитель для тромбин-реагента, концентрат (5,0 мл)-1 фл.	600

Аналитические характеристики

Коэффициент вариации результатов определения - не более 10%.

Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии не превышает 10%.

Интерпретация результатов

Удлинение тромбинового времени происходит при:

- гипофибриногенемии, связанной с ДВС или наследственной или приобретенной патологией;
- повышенной концентрации продуктов деградации фибриногена/фибрина;
- присутствии в крови гепарина;
- с парапротеинемией;
- с наличием в крови ингибиторов тромбина или фибриногена;
- дисфибриногенемии, связанной с заболеванием печени или при наследственной патологии.

Укорочение тромбинового времени свидетельствует о риске тромбозов.

Нормальные значения тромбинового времени:

- тромбин с активностью 6 МЕ/мл – 8-12 сек
- тромбин с активностью 3 МЕ/мл – 13-18 сек

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФИБРИНОГЕНА ПО МЕТОДУ КЛАУССА

Количественное определение фибриногена является базисным тестом исследования гемостаза. Тест проводится при гиперфибриногенемиях, связанных с тяжестью воспалительных, иммунных, деструктивных процессов, с риском развития гипервискозного

синдрома, артериальных тромбозов и инфарктов органов. Снижение концентрации фибриногена наблюдается при остром ДВС-синдроме, при лечении фибринолитиками, при врожденных гипо- и дисфибриногенемиях.

Фактор I свертывания крови - фибриноген ($M_w=340\ 000\ D$) – является гликопротеином и находится в растворенном состоянии в плазме крови и в тканях всех позвоночных животных. Образование фибрина и его стабилизация представляют собой финальный этап формирования тромба, при котором растворимый фибриноген превращается в нерастворимый фибрин под действием тромбина и фактора XIII.

Молекула фибриногена состоит из 6 полипептидных цепей: A α 2 B β 2 γ 2, связанных 29 дисульфидными связями. Образование из растворимого фибриногена нерастворимого полимера фибрина представляет собой высокоорганизованную последовательность взаимодействия целого ряда веществ. Механизмы этого процесса пристально изучаются уже более 40 лет, но до настоящего времени не все известно. Было установлено, что тромбин отщепляет от молекулы фибриногена A и B фибринопептиды, оставшиеся фибрин-моно-меры начинают полимеризоваться, образуя сначала димеры, потом тетрамеры, олигомеры и так далее до образования полимера растворимого фибрина. В последней стадии растворимый фибрин стабилизируется ковалентными связями под действием ф. XIII и становится нерастворимым.

Фибриноген синтезируется в печени и имеет много функций: принимает участие как в свертывании крови, так и при агрегации тромбоцитов, определяет вязкость крови и влияет на взаимодействие форменных элементов крови с сосудистой стенкой. Фибриноген – это белок острой фазы, его концентрация увеличивается при острых ситуациях: травме, инфекции, воспалении, операции и т.п.

Концентрация фибриногена возрастает с возрастом, а также при ожирении, у больных атеросклерозом, сахарным диабетом, у курящих, при инфаркте миокарда, канцерогенезе, нефрозе.

Возрастание в крови содержания фибриногена приводит к риску возникновения атеросклероза коронарных, мозговых и внемозговых артерий и к увеличению смертности.

Все вышесказанное свидетельствует о необходимости точного определения содержания фибриногена в плазме крови. Разработаны различные методы определения фибриногена: кинетический, весовой, коагулометрический и др. Весовой метод основан на измерении фибриногена в фибриновом сгустке путем взвешивания последнего на торсионных весах (метод Рутберг). На растворении сгустка и количественном спектрофотометрическом определении белка основан метод Белицер и соавт. Следует отметить, что метод Рутберг достаточно прост в исполнении, но дает очень большую

ошибку определения, и результат тестирования напрямую зависит от умения лаборанта. Метод Белицера и соавт. более точен, но сложен и длителен по исполнению.

Метод Клаусса был предложен автором в 1957 г.

Принцип метода основан на особенностях кинетики реакции фибриноген-тромбин, когда исследуемую плазму крови разбавляют в 10 раз с целью снижения влияния ингибиторов тромбина (антитромбина III и др.). В этих условиях при высоких концентрациях тромбина и низких концентрациях фибриногена время реакции образования сгустка зависит только от количества фибриногена.

Метод Клаусса очень прост в исполнении, определяет только активный фибриноген, метод точен и стандартен, широко применяется за рубежом.

Единственный недостаток метода – невозможность работы ручным методом, т.к. образуемый сгусток плохо различим визуально. Однако любые механические или опτικο-механические коагулометры позволяют получить точные и воспроизводимые результаты исследования фибриногена по Клауссу. Как показали наши исследования, в плазме доноров содержание фибриногена колеблется от 1,8 до 3,5 г/л. Для работы на оптических коагулометрах в инкубационную смесь вносят специально разработанный мелкодисперсный каолин.

Наборы РЕНАМ для анализа фибриногена

Компания РЕНАМ производит **Фибриноген-тест**-набор реагентов для количественного определения фибриногена по методу Клаусса, набор **Оптифибриноген-тест** для работы на оптических коагулометрах и набор **Диакап-Ф** для капиллярной крови.

Код	Наименование, состав набора, краткое описание	Число анализов
ПГ-10	Фибриноген-тест. Работа на механических анализаторах. Состав: тромбин, лиофильно высушенный (2,0 мл) – 8 фл., концентрат имидазолового буфера (5,0 мл) – 1 фл., плазма-калибратор, лиофильно высушенная (1,0 мл) – 1 фл.	160-320
ПГ-11	Оптифибриноген-тест. Работа на оптических анализаторах. Состав: тромбин, содержащий легкую фракцию каолина, лиофильно высушенный (2,0 мл) - 8 мл, концентрат имидазолового буфера (5,0 мл) – 1 фл., плазма-калибратор, лиофильно высушенная (1,0 мл) – 1 фл.	160-320
КГ-2	Диакап-Ф – набор реагентов для определения количества фибриногена в капиллярной крови (модифицированный метод Клаусса). Состав: тромбин, лиофильно высушенный (2,0 мл) -3 фл., консервант для капиллярной крови (концентрат) (2,0 мл) – 1 фл., имидазоловый буфер (2,0 мл) – 1 фл., плазма-калибратор, лиофильно высушенная (1,0 мл) – 1 фл.	60-120

Аналитические характеристики

Линейность определяемых значений содержания фибриногена в плазме крови человека в диапазоне концентраций от 0,6 до 5,0 г/л, отклонение от линейности - не более 5%.

Коэффициент вариации результатов определения - не более 5%.

Чувствительность метода - 0,8 – 0,9 г/л в зависимости от метода регистрации.

Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии - не более 5%.

В норме содержание фибриногена в плазме крови колеблется от 1,8 до 4,0 г/л.

Изменение содержания фибриногена при различных заболеваниях

Заболевание	Содержание фибриногена, г/л
Атеросклероз	3,9±1,1
Претромботическое состояние	4,5±0,2
Сахарный диабет тип I	4,2±0,2
Сахарный диабет тип II	3,9±0,2
Хроническая почечная недостаточность	3,45±0,7
Синдром хронического легочного сердца	4,5±0,2
2 триместр беременности	4,19±0,6
3 триместр беременности	5,35±1,4
Нормальные роды	4,92±2,0
Преэклампсия	5,1±0,8
Рак разной локализации	4,7±0,2

Литература

1. Берковский А.Л., Васильев С.А., Козлов А.А., Сергеева Е.В. Влияние состава АЧТВ-реагентов на их чувствительность при определении факторов свертывания. Клиническая лабораторная диагностики, 2000, № 4, с. 34-38.
2. Добровольский А.Б., Косырев А.Б. Протромбиновый тест: методика выполнения и клиническое значение. II. Информационный бюлл. Ассоциации медицинской Лабораторной Диагностики, М., 1995, 34-38.
3. Дугина Т.Н., Косырев А.Б. Стандартизация протромбинового теста: проблема контрольной плазмы. Лабораторная медицина 2003, № 6.
4. Качалова Н.Д. Стандартизация определения протромбинового времени и активности фактора VIII в плазме крови. Автореферат канд. дисс., 33 стр., Москва, 2002.
5. Качалова Н.Д., Климович Л.Г., Берковский А.Л., Простакова Т.М., Козлов А.А. Опыт применения отечественных тромбопластинов с аттестованным международным индексом чувствительности при лечении тромбофилий. Клиническая лабораторная диагностика, 2002, № 6, с.13-16.
6. А.А.Козлов, Н.Д.Качалова, Т.М.Простакова. Определение фибриногена по Клауссу. Производственная трансфузиология на рубеже XXI века. Научно-практ. конф. 1999 г., с .63-64.
7. Biggs R. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis. 1976.
8. Carr M.E., Martin E. J. Evolving Techniques for Monitoring Clotting in Plasma and Whole Blood Samples. Review. Clin. Lab. 2004, v. 50, p. 539-549.
9. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haemat., 1957, 17, 237-246.
10. Dacie J.V., Lewis S.M. Investigation of haemostasis. Activated partial thromboplastin time. In: Practical Haematology, 1995, 308-309.
11. Dacie J.V., Lewis S.M. Investigation of haemostasis. Prothrombin time. In: Practical Haematology, 1995, 307-308.
12. Kirkwood T.B.L., Lewis S.M. Требования к тромбопластинам и плазме, используемым для контроля за пероральным применением антикоагулянтов (пересмотр 1982). Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. 33 доклад, серия технических докладов 687, 1985, с. 77-99.
13. Quik A.J. Hemorrhagic diseases and thrombosis. Philadelphia: Lea and Fabigar; 1966.