Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ),

SEED Coagulation

Sysmex Educational Enhancement and Development June 2012

гепарин и механизм его действия

Гепарин — это препарат, который используется на начальных стадиях лечения пациентов с тромбозами, например, тромбозом глубоких вен. Учитывая существующий риск разрастания тромба необходимо как можно быстрее восстановить гемостатический баланс. Гепарин, ввиду своего быстродействия, идеально подходит для этой цели. Антикоагулянтный эффект проявляется почти сразу же после начала внутривенного введения гепарина. Напротив, варфарин, являющийся пероральным антикоагулянтом, не только демонстрирует отсроченный (на пару дней) антикоагулянтный эффект, но и первоначально оказывает прокоагулянтное действие. Данный прокоагулянтный эффект связан с тем, что варфарин препятствует выработке не только функциональных факторов свертывания крови II, VII, IX и X, но и естественных антикоагулянтных белков С и S. В первый день лечения варфарином уменьшается концентрация протеина С, имеющего короткий период полураспада, затем снижается концентрация факторов свертывания, что парадоксально увеличивает риск тромбообразования. Лечение гепарином обычно продолжают до тех пор, пока МНО (международное нормализованное отношение) не окажется в пределах терапевтического диапазона. Кроме того, гепарин используется для предотвращения закупорки центральных венозных катетеров и диализных трубок.

Гепарин состоит из сложных молекул, состоящих из повторяющихся углеводных остатков. Нефракционированный гепарин состоит из «смеси» углеводных молекул различной длины, в то время как низкомолекулярный гепарин содержит только короткие молекулы. Каждая молекула гепарина содержит уникальный пентасахарид с участком высокого сродства к антитромбину (АТ), ранее обозначаемому как антитромбин III или ATIII. Связываясь с AT гепарин вызывает его конформационные изменения. Это, в свою очередь, ускоряет инактивацию тромбина, FXa, FIXa и FXIa.

+

TF VII/a

 AT: Гепарин

 Комплекс

TF/FVIIa

(Va/Ca++/PL)

+

Фибриноген Фибрин

Фибрин полимер

XIIIa XIII

X ~~Xa~~

IX ~~IXa~~(VIIIa/Ca++/PL)

II ~~Тромбин~~

~~XIa~~ XI

*Рис. 1 Механизм действия гепарина. Гепарин связывается с антикоагулянтным белком антитромбином. После связывания с гепарином значительно ускоряется ингибирование факторов свертывания Xla, lXa, Xa и тромбина.*

Гепарин вводится инъекционно, подкожно либо внутривенно. При проведении системной антикоагулянтной терапии его вводят болюсно каждые 6 часов или инфузионно.

При имеющейся быстроте действия степень антикоагулянтного эффекта гепарина непредсказуема. Отчасти это связано с тем, что гепарин неспецифически связывается с различными белками плазмы крови. Связанный гепарин не может оказывать антикоагулянтного действия, что ярко проявляется в острой стадии заболевания при повышении концентрации белков острой фазы. В связи с этим пациенты, получающие гепарин, должны постоянно контролировать уровень антикоагуляции. Избыток гепарина подвергает пациента риску кровотечения, а его недостаток может усугубить уже существующее протромботическое состояние.

# Активированное частичное тромбопластиновое время

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) – второй по частоте проводимый коагуляционный тест. АЧТВ является тестом, наиболее часто используемым для контроля антикоагулянтного эффекта нефракционированного гепарина. Данный тест также часто применяется для выявления нарушений свертывания, обусловленных дефицитом факторов внутреннего пути, таких как XI, IX, VIII, V, фактор II (протромбин), и фибриногена.

Внутренний

 FXII

 FXI

 FIX (FVIII)

 (FV)

Общий

 Фибриноген

II (Протромбин)

 FX

[ПВ]

TF/FVII

Внешний

[АЧТВ]

*Рис. 2 Компоненты свертывающей системы, оцениваемые при помощи АЧТВ (обозначены синим).*

Слово «частичный» означает, что в реагенте, используемом для определения АЧТВ, отсутствует тканевой фактор, являющийся основным компонентом реагента тромбопластина, используемого для определения протромбинового времени. Присутствует, соответственно, только фосфолипидный компонент. Первоначальный тест, разработанный в 1953 г. для выявления классической гемофилии (дефицит фактора VIII), назывался частичным тромбопластиновым временем (ЧТВ) и проводился на стекле пробирки для инициации активации внутреннего пути – так называемой контактной активации. В 1961 году тест был модифицирован для ускорения процесса активации путем добавления каолина, который заменил стекло пробирки в качестве поверхности активации. Вот почему тест на свертываемость, используемый в настоящее время для оценки внутреннего пути, называется «активированным» частичным тромбопластиновым временем (АЧТВ). Термины ЧТВ и АЧТВ, по сути, взаимозаменяемы, но более целесообразно использовать термин АЧТВ.

# Реагенты АЧТВ

Реагенты АЧТВ состоят из двух основных компонентов: активатора и источника фосфолипидов. Активатор представлен частицами (каолин, целит или диоксид кремния) либо находится в растворимом виде (эллаговая кислота).

Роль активатора заключается в создании отрицательно заряженной поверхности, необходимой для активации так называемых контактных факторов. Факторы контакта включают высокомолекулярный кининоген (ВМК), прекалликреин и фактор XII (FXII). Калликреин образуется из прекалликреина под действием ВМК. Во время этой контактной фазы FXII активируется в FXIIa с помощью ВМК и калликреина и, в свою очередь, превращает FXI в FXIa. Калликреин образуется из прекалликреина под действием ВМК. Фосфолипиды необходимы для обеспечения поверхности для сборки теназного комплекса (FIXa-FVIIIa), который превращает FX в FXa, и протромбиназного комплекса (FXa-FVa), превращающего протромбин в тромбин. Состав фосфолипидов может существенно различаться. Фосфолипид может быть животного или растительного происхождения, а также может быть изготовлен синтетическим путем в процессе получения процессе чистой формы.

Разнообразие в концентрации и составе реагентов АЧТВ приводит к большим различиям в их чувствительности к гепарину, дефициту факторов свертывания крови и волчаночным антикоагулянтам (см. ниже). На чувствительность также влияет тип детекции, используемый автоматизированной системой, например, механический против оптического. Ввиду отсутствия единообразия состава и реакционной способности реагентов АЧТВ абсолютно необходимо, чтобы каждая лаборатория имела надежный механизм контроля качества и устанавливала свой собственный эталонный диапазон для интерпретации результатов АЧТВ, полученных на месте. При выборе реагента необходимо учитывать первичные показания для проведения теста, т.к. некоторые реагенты разработаны с учетом чувствительности или нечувствительности к волчаночным антикоагулянтам.

# Волчаночный антикоагулянт

Волчаночный антикоагулянт представляет собой аутоантитело, направленное против фосфолипидно-белкового комплекса. Название «антикоагулянт» означает, что данные антитела имеют тенденцию вызывать пролонгацию фосфолипид-зависимых тестов на свертываемость крови, таких как АЧТВ. Однако это название является неправильным, поскольку оно связано с тромботическими эпизодами и невынашиванием беременности у пациентов с фоновым аутоиммунным заболеванием.

# Проведение ручного теста на определение АЧТВ

Тест выполняется на водяной бане с теми же условиями, что и ПВ, за исключением того, что требуемые реагенты представляют собой реагент АЧТВ, такой как Actin FS© или Actin FSL© и хлорид кальция.

* 1. Выбор реагента АЧТВ

Реагент Actin FS reagent содержит эллаговую кислоту в качестве активатора и очищенные фосфатиды сои в качестве фосфолипида. Actin FSL содержит аналогичный активатор, но другие фосфолипиды, а именно смесь фосфатидов сои и мозга кролика. Actin FS – АЧТВ реагент общего назначения, в то время как Actin FSL целенаправленно чувствителен к обнаружению волчаночного антикоагулянта. Для рутинного тестирования рекомендуется Actin FS. Actin FS выпускается в жидкой форме со сроком годности около 2 лет и объемом флакона 2 мл или 10 мл. Стабильность реагента после вскрытия следующая:

■ 1 неделя: 2-8°C при хранении закрытым;

■ 2 дня: 15°C (в анализаторе)

■ 24 часа: при 37°C при хранении закрытым (на водяной бане).

* 1. Хлорид кальция

Хлорид кальция является важным реагентом для АЧТВ теста. Ионы кальция удаляются из плазмы во время сбора образца в пробирки с цитратом натрия. Этап рекальцификации в АЧТВ запускает каскад свертывания.

* 1. Методика

■ Убедитесь, что температура воды в водяной бане составляет 37°C. Это очень важно, поскольку факторы свертывания крови представляют собой ферменты, разработанные для оптимальной работы при температуре тела.

■ Разогрейте реагенты (Actin FS и кальция хлорид) до 37°C (разлить количество каждого реагента, необходимое для запланированного количества анализов, в отдельные пробирки и поместить их в штатив на водяной бане).

* Добавьте 100 μL плазмы пациента в стеклянную пробирку of patient plasma to a glass test tube и поместите в стойку на водяной бане.
* Добавьте 100 μL реагента АЧТВ Actin FS, хорошо перемешайте и инкубируйте 3 мин на водяной бане. Это позволяет оптимально организовать фазу контактной активации каскада свертывания.
* Добавьте 100 μL хлорида кальция, немедленно хорошо перемешайте и начинайте искать нити фибрина. Продолжайте вращать пробирку в воде, температура реакции должна оставаться на уровне 37°C. Аккуратно наклоняйте пробирку, поднимая ее из воды, и постоянно проверяйте наличие сгустков.
* Как только появятся нити фибрина, остановите секундомер и запишите время.
* В идеале тест следует проводить в двух повторах, а записывать среднее значение.
* Повторите тест с контрольной плазмой.

**Активатор эллаговой кислоты создает отрицательно заряженную поверхность**

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

FXII Prekallikrein (HMWK)

FXIIa

Калликреин

}

3 мин инкубация

FXI FXIa

Ca++

FIX FIXa

FVIIIa PL – Ca++

FX

}

Время (с) от CaCl2

FXa

FVa PL – Ca++

до образования сгустка

Протромбин Тромбин

сгустка = АЧТВ

Фибриноген

Фибрин

Фаза рекальцификации

Добавление CaCI2 (образование фибрина)

Фаза контактной активации Добавление АЧТВ реагента (активация FXII до FXIIa)

*Рис. 3 Стадии АЧТВ реакции (PL = phospholipid)*

# Интерпретация результатов АЧТВ

Результаты АЧТВ записываются в секундах и интерпретируются по отношению к нормальному эталонному диапазону, который должен устанавливаться каждой лабораторией на месте, но в среднем составляет ~ 24–36 секунд. Удлиненное время предполагает дефект во внутреннем или общем путях свертывания. Это может быть связано либо с количественным дефицитом, либо с аномальной функцией, либо с ингибитором одного или нескольких факторов свертывания крови. Наиболее распространенным ингибитором является гепарин.

При использовании АЧТВ для мониторинга терапии гепарином в идеале исходное значение должно быть определено до начала терапии гепарином. Целевое значение АЧТВ для пациента, принимающего гепарин, в 2 раза должно превышать исходное значение. Поскольку пациенты часто начинают терапию гепарином без первоначального определения исходного значения, увеличение АЧТВ в 1,5–2,5 раза от нормы считается терапевтическим эффектом. В этом случае за норму принимается значение, полученное для контрольной нормальной выборки.

У пациентов, не получавших гепарин, АЧТВ почти всегда проводится вместе с протромбиновым временем, и результаты интерпретируются одновременно. Обнаружение удлиненного АЧТВ требует дальнейшего обследования. Поскольку АЧТВ является скрининговым тестом, оценивающим сохранность внутреннего механизма свертывания крови, важно определить, какой фактор каскада дефектен. Самый быстрый способ выяснения этого — проведение «тестов коррекции».

# Тесты коррекции АЧТВ

Целью тестов коррекции является определение того, связана ли основная причина пролонгации с дефицитом одного или нескольких факторов свертывания крови, а также с ингибитором. Тесты коррекции также называют «исследованиями смешивания», поскольку исследуемый образец плазмы пациента смешивается в соотношении 1:1 с нормальной плазмой. Используемая нормальная плазма чаще всего берется из объединенной нормальной плазмы (PNP), которая, как следует из названия, готовится путем объединения плазмы нескольких здоровых людей. Затем эту плазму делят на аликвоты по 3–5 мл и замораживают для последующего использования. Это обеспечивает лабораторию единым источником нормальной плазмы для исследований смешивания и других лабораторных исследований.

Затем АЧТВ повторяют для смеси 1:1 пациент/PNP. Добавление PNP к образцу пациента направлено на замену любых факторов свертывания крови, которые могли отсутствовать или быть снижены в образце пациента. Если бы это действительно было причиной первоначального удлинения АЧТВ, то АЧТВ нормализовалось бы, или, по крайней мере, стало бы значительно короче. Если АЧТВ в смеси не корригируется, то основная причина его первоначального удлинения, вероятно, связана с присутствием ингибитора. Объяснение этому заключается в том, что любой ингибитор, присутствующий в плазме пациента, будет в равной степени ингибировать факторы свертывания добавленного PNP, следовательно, АЧТВ остается удлиненным.

1. Подозрение на дефицит фактора свертывания крови

Если исследования смешивания выявят коррекцию, следующим шагом будет определение того, какой фактор/факторы могут быть дефицитными. Поскольку проведение анализа фактора свертывания крови недешево, порядок тестирования выбирается на основе совместной интерпретации результатов ПВ, АЧТВ и исследований смешивания каждого из них. Если АЧТВ удлиняется, но ПВ в норме, то это убедительно свидетельствует о том, что дефект лежит во внутреннем пути с участием факторов FXII, FXI, FIX или FVIII. Если ПВ в норме, то можно с уверенностью заключить, что имеется изолированный дефицит фактора (множественные дефициты неизменно будут иметь пролонгированное ПВ, поскольку FVII имеет самый короткий период полувыведения). Если у пациента в анамнезе были кровотечения, наиболее частым дефицитом будет FVIII, затем FIX, затем FXI. Дефицит FXI встречается редко, в основном, у евреев-ашкенази. Первичный дефицит FVIII и FIX является причиной гемофилии А и В соответственно, которая встречается только у мужчин. Дефицит FVIII может возникать при тяжелой болезни фон Виллебранда, которая встречается у обоих полов. Приобретенная гемофилия может возникать из-за ингибиторов этих факторов, но это происходит исключительно редко. Обычно это медленно действующие ингибиторы АЧТВ, которые требуют длительной инкубации (2 ч вместо стандартных 3 мин). В таком случае АЧТВ обычно корректируется, поскольку в плазме в первую очередь проявляется дефицит фактора, а не ингибитора, который будет мешать PNP в исследовании смешивания. Если дефицит фактора не выявлен, дефект может быть связан с факторами активации контакта, прекалликреином или ВМК. Коррекция АЧТВ при использовании реагентов с целитом, диоксидом кремния или каолином в качестве активатора и увеличении времени инкубации до 10 минут свидетельствует о дефиците прекалликреина. Дефицит прекалликреина и ВМК не выявляется при использовании эллаговой кислоты, поскольку этот активатор гораздо сильнее, чем другие.

1. Предполагаемый ингибитор

Чаще всего ингибитором является гепарин, даже если в анамнезе нет гепаринизации. Источником гепарина обычно являются центральный венозный катетер или образец крови, взятый гепаринизированным шприцем перед помещением в пробирку с цитратом. Одним из способов подтверждения этого является проведение теста на тромбиновое время, который показывает заметное удлинение в присутствии гепарина, но не является чувствительным к другим ингибиторам. Если гепарин исключен, следует заподозрить волчаночный антикоагулянт. Тестирование на волчанку включает подтверждение того, что увеличение времени свертывания происходит из-за фосфолипид-зависимого антитела, показывая нормализацию при добавлении избытка фосфолипида.

# Парадоксально удлиненные результаты АЧТВ

Удлиненное АЧТВ не всегда свидетельствует о склонности к кровотечениям. Дефекты так называемых контактных факторов активации т. е. ВМК, прекалликреина и FXII также могут привести к удлинению АЧТВ, но эти дефициты не связаны с нарушениями кровотечения. Напротив, некоторые состояния, которые парадоксальным образом приводят к удлинению АЧТВ, связаны с тенденцией к тромбообразованию. FXII и другие контактные факторы не играют роли в активации каскада свертывания in vivo. Они участвуют в активации фибринолиза, следовательно, их дефицит приводит к протромботической тенденции, что было задокументировано для дефицита FXII. Г-н Хагеман, у которого впервые был описан дефицит FXII (также известного как фактор Хагемана), погиб от легочной эмболии. Еще одной причиной парадоксально удлиненного АЧТВ, как упоминалось ранее, являются волчаночные антикоагулянты.

*Compiled by*

Dr. Marion Münster

**Sysmex Europe GmbH**

Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Germany, Phone +49 40 52726-0 · Fax +49 40 52726-100 · info@sysmex-europe.com · [**www.sysmex-europe.com**](http://www.sysmex-europe.com/)