Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной диагностики ИПО

Зав.кафедрой: профессор, д.м.н.
Матюшин Г.В. Проверил: доцент, к.м.н.
Анисимова Е.Н.

РЕФЕРАТ

Тема: Лабораторная оценка системы фибринолиза.

Выполнил: врач-ординатор Егоров А.А.

Специальность: Клинико-лабораторная диагностика

Красноярск 2019

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

КАФЕДРА

Кафедра кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной диагностики ИПО

Рецензия <доц. КМН Кафедры кардиологии, функциональной и клинико-лабораторной диагностики ИПО Анисимова Елена Николаевна > на реферат ординатора первого года обучения специальности Клиническая лабораторная диагностика Егорова Алексея Андреевича> по теме: < Лабораторная оценка системы фибринолиза. >.

Рецензия на реферат – это отзыв преподавателя о проведенной самостоятельной работе ординатора, который включает критическое мнение, при оценке учитываются навыки ординатора, такие как: работа с литературой, по выбранной специальности обучения, анализ степени раскрытия выбранной тематики, умение находить и интерпретировать полученную информацию, умение аргументировать основные положения и выводы и так далее. Затем преподавателю необходимо перечислить всевозможные недочеты и дать рекомендации по оценке.

Ознакомившись с рефератом, преподаватель убеждается в том, что ординатор владеет описанным материалом, умеет его анализировать и способен аргументированно защищать свою точку зрения.

Основные оценочные критерии рецензии на реферат ординатора первого года обучения специальности Клиническая лабораторная диагностика :

Оценочный критерий	Положительный/ отрицательный
1. Структурированность	+
2. Наличие орфографических ошибок	-
3. Соответствие текста реферата его теме	+
4. Владение терминологией	+
5. Полнота и глубина раскрытия основных понятий темы	+
6. Логичность доказательной базы	+
7. Умение аргументировать основные положения и выводы	+
8. Круг использования известных научных источников	+
9. Умение сделать общий вывод	+

Итоговая оценка: положительная/отрицательная

Дата:

Комментарии рецензента:

Подпись рецензента:

Подпись ординатора:

В процессе формирования гемостатической пробки активизируются механизмы, направленные на ограничение роста сгустка, постепенное растворение тромба и создание условий для нормального кровообращения. Осуществляется эта функция благодаря системе фибринолиза.

Система фибринолиза – протеолитическая система плазмы крови, ответственная за лизис фибринового сгустка, а также вовлеченная в деградацию коллагена, ангиогенез, апоптоз и связанная с другими протеолитическими системами. Центральным ферментом системы фибринолиза является плазмин, на регуляцию активации которого направлены все реакции системы фибринолиза. Фибринолиз локализует образование фибрина в месте повреждения, сдерживает избыточное фибринообразование, препятствуя окклюзии просвета сосуда. Баланс между фибринообразованием и фибринолизом способствует сохранению окончательного тромба на весь период восстановления целостности сосудистой стенки, после чего равновесие сдвигается в сторону фибринолиза и, став ненужным, тромб растворяется. Система фибринолиза, так же как и система свертывания крови – многокомпонентная протеолитическая система, в состав которой входят активаторы, ингибиторы и конечный фермент.

Основные компоненты системы фибринолиза.

Фактор	Концентрация (мг/л)	Период полувыведения	Функция
1	2	3	4
Плазминоген	200	2,2 дня	Профермент (предшественник плазмина)
Активатор плазминогена тканевого типа (t-PA)	0,005	4 мин	Протеаза, активирует плазминоген
Урокиназный активатор плазминогена (и-PA)	0,002	7 мин	Протеаза, активирует плазминоген
Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1)	0,01	8 мин	Ингибитор t-PA и и-PA
Фактор XII	30	2-3 дня	Профермент. Участвует в реакции активации плазминогена
Прекалликреин	40	—	Профермент. Участвует в реакции активации плазминогена
Высокомолекулярный кининоген	70	5 дней	Кофактор. Участвует в реакции активации плазминогена
Витронектин	350	-	Кофактор PAI-1
C1-ингибитор	180	70 ч	Ингибитор ф.XIIa. калликреина, плазмина
a_2-антиплазмин	70	3 дня	Ингибитор плазмина
a_2-макроглобулин	2500	—	Ингибитор плазмина. калликреина, урокиназы, t-PA и др.
Богатый гистидином гликопротеин	100	3 дня	Ингибитор плазмина
Аполипопротеин(а)	<70	-	Снижает фибринолиз
Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза	5	10 мин	Предшественник ингибитора (зимоген)
Рецептор урокиназного активатора плазминогена (u-PAR)	—	—	Рецептор u-PAR, модулирующий его активность
Аннексин II	—	—	Рецептор t-PA, активирующий его функцию
Рецептор LRP/o^-макроглобулина	—	—	Рецептор t-PA, способствующий его элиминации
Рецептор маннозы	—	—	Рецептор t-PA, способствующий его элиминации

Плазминоген. Плазминоген – одноцепочечный гликопротеин. Концентрация его составляет примерно 2 микромоля в литре плазмы. У женщин в последнем триместре беременности активность плазминогена повышается. Основное место синтеза плазминогена – печень, однако он обнаруживается и в эозинофилах, клетках почек, роговице. Возможно, в

этих тканях он также синтезируется. В системе циркуляции плазминоген связан с богатым гистидином гликопротеином.

Активация плазминогена осуществляется, в основном, 2 специфическими протеазами – активатором плазминогена тканевого типа и урокиназой. Кроме того, плазминоген может связываться с фибрином и активироваться в комплексе с ним. Связанный с фибрином плазмин относительно защищен от инактивации. В токе же крови плазмин очень быстро (примерно за 0,1 с) инактивируется ингибиторами.

Активатор плазминогена тканевого типа. Активатор плазминогена тканевого типа (t-PA) является сериновой протеазой. Он высокоспецифичен; его единственным доказанным субстратом является плазминоген. Видимо, t-PA – основной физиологический активатор фибринолиза в просвете сосуда. Основным местом синтеза t-PA является эндотелий. Помимо эндотелия, t-PA синтезируется во многих других клетках: моноцитах, мегакариоцитах, мезотелиальных клетках, мышечных клетках сосудов, фибробластах сердца и др. Большая часть плазменного t-PA связана с его основным ингибитором PAI-1. Как связанный, так и свободный активатор быстро удаляются из тока крови клетками печени. Помимо активации фибринолиза, t-PA участвует в противовоспалительных реакциях, стимуляции пролиферации эндотелия. Есть данные, что t-PA может активировать ф.VII. Функция t-PA связана с наличием ряда рецепторов. Рецепторы t-PA делятся на 2 большие группы – активирующие и удаляющие. Активирующие t-PA-рецепторы располагаются на клеточных поверхностях и усиливают активацию плазминогена t-PA. Наиболее изученным активирующим t-PA-рецептором является аннексин II. Избыточная экспрессия аннексина II у пациентов с промиелоцитарным лейкозом ведет к гиперфибринолизу с геморрагическими проявлениями. В группе рецепторов, способствующих элиминации t-PA, изучены маннозный рецептор и рецептор LRP/α2-макроглобулина. Первый расположен на мембране эндотелиоцитов печени и купферовских клеток, второй работает на мембране гепатоцитов.

Урокиназный активатор плазминогена. Урокиназный активатор плазминогена (урокиназа, u-PA) найден в больших количествах в моче человека. Предшественником u-PA является белок проурокиназа, или scu-PA. Проурокиназа синтезируется в различных клетках. Особенно активно scu-PA синтезируется эпителиальными клетками почечных протоков, а также обкладочными клетками практически всех протоков, включая протоки потовых, слезных и других желез. В протоках урокиназа необходима для деградации белковых компонентов секретов. Основную работу урокиназа выполняет в тканях, способствуя деградации внеклеточного матрикса, что облегчает процессы миграции клеток. Роль урокиназы значительна во многих физиологических и патологических процессах – заживлении ран, воспалении, эмбриогенезе, метастазировании опухолевых клеток. Известен еще ряд функций урокиназы помимо активации плазминогена. Наиболее важные из них – активация ростовых факторов, модуляция миграции и инвазии клеток, оказание митогенного эффекта на клетки меланомы.

Рецептор урокиназы (u-PAR) обнаружен на моноцитах. Он способствует активации плазминогена урокиназой, что необходимо для участия моноцитов в деградации фибринового тромба. Такой же рецептор найден на тромбоцитах. Описаны 2 рецептора, элиминирующие урокиназу и комплекс урокиназасерпин из кровотока.

Другие активаторы плазминогена. Помимо указанных выше основных физиологических активаторов плазминогена, описаны другие физиологические и нефизиологические активаторы. Есть данные, что **ф.XIIa** может напрямую активировать плазминоген. Скорость активации плазминогена ф.XIIa в сравнении с эквимолярным количеством t-PA в 10 раз ниже, однако его молярная концентрация в циркулирующей крови в 5000 раз выше. Таким образом, роль прямой активации плазминогена ф.XIIa может быть достаточно высока. Другими известными активаторами плазминогена являются стрептокиназа, стафилокиназа, активатор плазминогена, выделенный из слюны летучих мышей-вампиров.

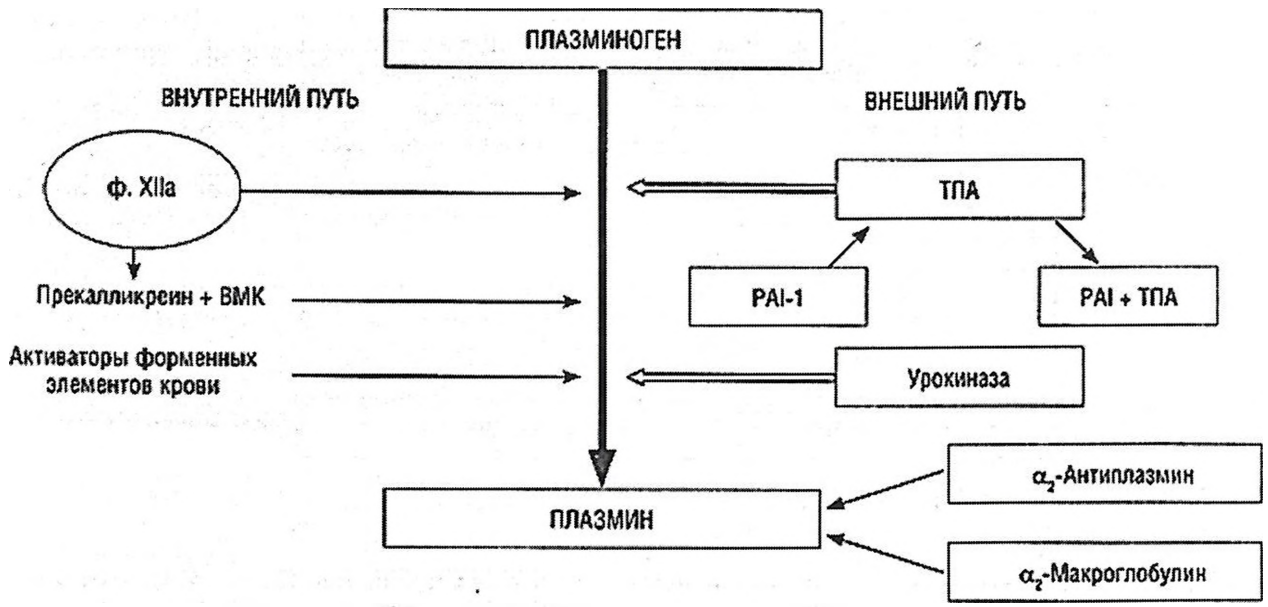
Механизм активации фибринолиза.

В фибринолизе, так же как в системе коагуляции, имеется 2 пути: внешний и внутренний путь активации плазминогена. Внешний путь активации плазминогена обеспечивается в основном тканевым активатором, внутренний путь – урокиназой.

Внутренний путь активации фибринолиза. Внутренний путь активации фибринолиза начинается в комплексе реакций контактной активации свертывания крови. Калликреин активирует проурокиназу с образованием активного фермента урокиназы. Кроме калликреина, активация проурокиназы до активной двухцепочечной формы u-PA происходит под воздействием ф.XIIa и -XIa, плазмина (положительная обратная связь) и усиливается при связывании с урокиназным рецептором. В связи с этим у пациентов с дефицитом прекалликреина, XII фактора (болезнь Хагемана) или высокомолекулярного кининогена (ВМК), у которых, казалось бы, из-за недостатка плазменных факторов должна быть склонность к кровотечениям, наоборот, в результате неполноценной активации фибринолиза имеется тенденция к тромбозам. Определение u-PA для диагностики нарушений гемостаза практически не проводится, так как диагностическое значение этого фермента пока недостаточно ясно. Однако u-PA является опухолевым маркером карциномы яичника и, вероятно, других опухолей, поэтому имеются коммерческие ELISA-наборы, которые используются для определения u-PA как опухолевого маркера.

Внешний путь активации фибринолиза. Плазминоген имеет высокое сродство к выпавшему фибрину за счет присутствия на фибрине специфических лизин-связывающих участков (сайтов). Эндотелиальные клетки синтезируют и освобождают в систему циркуляции тканевой активатор плазминогена (t-PA). Изучение процесса высвобождения t-PA из клеток показало, что основным стимулятором этого является брадикинин, который отщепляется от высокомолекулярного кининогена калликреином. Таким образом, процесс активации факторов контактной фазы является основным физиологическим пусковым механизмом фибринолиза. Этот процесс резко усиливается при остановке кровотока и образовании фибрина. t-PA обладает высоким сродством к фибрину. На фибрине формируется комплекс *фибрин - тканевой активатор - плазминоген* – наиболее специфическое и эффективное действующее начало фибринолиза. Фибрин, особенно частично деградированный фибрин, служит кофактором t-PA-индуцированной протеолитической активации плазминогена. В результате образования этого комплекса плазминоген переходит в активный плазмин, который разрушает пептидные связи в фибрине/фибриногене.

Система фибринолиза



Ингибиторы фибринолиза.

α_2-антиплазмин (α_2-АП) в физиологических условиях быстро инактивирует плазмин, образуя неактивные комплексы. α_2-АП имеет высокое сродство к плазмину, взаимодействует с ним, удаляя свободный плазмин из системы циркуляции. В результате время полужизни свободного плазмина составляет всего 0,1 секунды. Если же плазмин успевает соединиться с выпавшим фибрином, то взаимодействие плазмин- α_2-АП резко снижается (примерно в 50 раз). Недостаточность α_2-АП проявляется кровотечениями, так как накапливающийся активный плазмин ускоренно разрушает фибрин и фибриноген. α_2-АП – белок острой фазы, однако при массивной активации фибринолиза, в частности при ДВС-синдроме, может наблюдаться истощение α_2-АП. Приобретенная недостаточность α_2-АП встречается значительно чаще, чем врожденная.

α_2-макроглобулин. Это неспецифический ингибитор. При активации фибринолиза образующийся из плазминогена (концентрация в плазме свыше 1,5 мкмоль) плазмин в первую очередь связывается α_2-антиплазми-ном (концентрация в плазме около 1 мкмоль). После полного насыщения α_2-антиплазмина дальнейшая нейтрализация плазмина осуществляется за счет α_2-макроглобулина. Кроме того, α_2-макроглобулин инактивирует другие ферменты системы фибринолиза: урокиназу (u-PA), тканевой активатор плазминогена (t-PA), плазменный калликреин, компоненты комплемента, бактериальные и лейкоцитарные протеазы, такие, как эластаза и катепсины.

α_1-антитрипсин. На его долю приходится более 80% антипротеазной активности крови. В сыворотке α_1-антитрипсин содержится в концентрации 1,4-3,2 г/л, или около 52 ммоль/л. Это основной ингибитор сериновых протеаз: трипсина, химотрипсина. Помимо этого, он принимает участие в инактивации плазмина, калликреина, ренина, урокиназы. Благодаря небольшим размерам он может проникать и функционировать в тканях (легкие, бронхи). α_1-антитрипсин – белок острой фазы, его выработка увеличивается при реакциях, запускаемых через фактор некроза опухолей, интерлейкин-1, интерлейкин-6, а также при высокой концентрации эстрогена в сыворотке в последнем триместре беременности, при приеме эстроген-содержащих противозачаточных препаратов.

Все три описанных ингибитора совместно предупреждают появление плазмина в системе циркуляции в свободном виде, исключая его деградирующий эффект на фибриноген, а также на факторы свертывания VIII, V и другие плазменные белки. Деятельность этих ингибиторов является важным условием поддержания гемостатического баланса.

Ингибиторы тканевого активатора плазминогена (PAI).

Ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1). Это специфический ингибитор тканевого активатора плазминогена (t-PA) и урокиназы (u-PA). Помимо этого, он подавляет активацию фибринолиза стрептокиназой. PAI-1 обнаружен в плазме и тромбоцитах. В плазме он связан с витронектином. PAI-1 синтезируется в эндотелиальных клетках. Синтез усиливается при их стимуляции липополисахаридами плазматических мембран бактерий (эндотоксином), провоспалительными цитокинами, такими, как ИЛ-1 или ФНО-α, а также тромбином. Наиболее значительная стимуляция происходит в условиях сепсиса и при обширных тромбозах PAI-1 ингибируется протеином С. Таким образом, протеин С ингибирует не только активированные факторы Va и VIIIa, но и PAI-1, проявляя, следовательно, профибринолитическую активность.

Ингибитор тканевого активатора плазминогена 2-го типа (PAI-2) обнаружен в очень низких концентрациях в плазме, но может существенно повышаться при беременности. Он в большей степени ингибирует активность u-PA, чем t-PA.

Ингибитор тканевого активатора плазминогена 3-го типа (PAI-3). Это, по-видимому, относительно слабый ингибитор. Он подавляет активацию плазминогена протеином С. Диагностического значения определение PAI-2 и PAI-3 пока не имеют.

Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI).

TAFI (карбоксипептидаза Y, или плазменная карбоксипептидаза B) – один из наиболее важных ингибиторов фибринолиза. Его неактивная форма – прокарбоксипептидаза Y активируется тромбином, связанным с тромбомодулином, и, вероятно, трипсином, калликреином, плазмином до активной карбоксипептидазы Y или TAFI. Механизм ингибирования фибринолиза карбоксипептидазой Y отличается от описанных выше. TAFI разрушает каталитическую поверхность фибрина (лизин-связывающий сайт), необходимую для активации плазминогена t-PA. Кроме того, в более высокой концентрации TAFI обладает прямой ингибирующей активностью по отношению к плазминогену.

TAFI играет большую роль в формировании гемостатического тромба, предотвращая его преждевременный лизис. Однако для активизации достаточного количества ингибитора необходим значительный избыток тромбина, превышающий количество, необходимое для образования фибринового сгустка. Видимо, этим объясняется повышение фибринолиза у лиц с гемофилией и дефицитом фактора XI. Определение TAFI проводится методом ELISA. Повышение TAFI зарегистрировано при тромбозах и при применении тромболитических препаратов. Обнаружена корреляция между концентрацией и активностью TAFI, с одной стороны, и временем, в течение которого лизируется сгусток крови.

Другие элементы системы фибринолиза.

Аполипопротеин(а). Аполипопротеин(а) конкурирует с плазминогеном и t-PA за связь с фибрином, что приводит к снижению активности процесса фибринолиза. Кроме того, было показано, что в присутствии аполипопротеина(а) уменьшается активация плазминогена на поверхности фибрина

Витронектин. Витронектин стабилизирует PAI-1 в его активной конформации, являясь, по сути, его кофактором, и повышает период полураспада последнего. Кроме того, он способствует клиренсу PAI-1 липопротеинами низкой плотности.

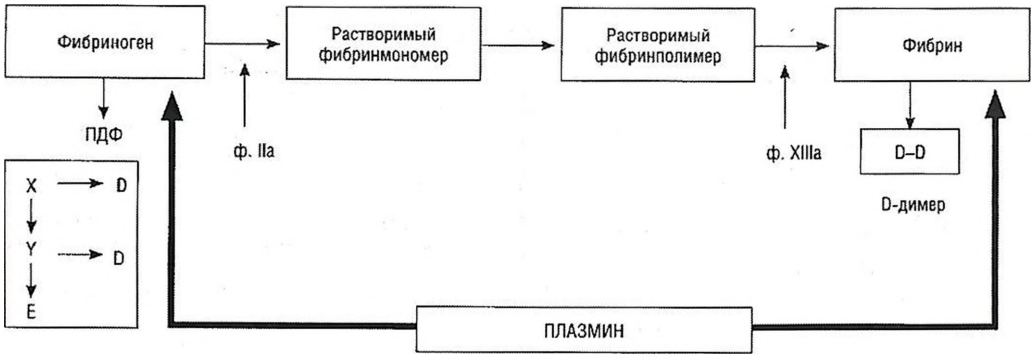
Лизис фибринового сгустка. Продукты деградации фибрина/фибриногена и D-димеры.

Плазмин является очень активной и в то же время относительно неспецифичной сериновой протеазой, которая разрушает фибрин и фибриноген. Образующиеся вследствие этого молекулы, имеющие разную молекулярную массу, обозначаются как продукты деградации фибрина/ фибриногена (ПДФ).

Продуктами деградации фибрина в основном являются комплексы DDE и D-димеры. Помимо фибрина, плазмин способен активно деградировать фибриноген, особенно в тех случаях, когда вводятся активаторы фибринолиза (фибринолитики). В результате лизиса фибриногена образуются меньшие фрагменты X, Y, D и E, а D-димеры не образуются.

Некоторые фрагменты ПДФ обладают выраженной физиологической активностью. Они снижают агрегацию тромбоцитов и нарушают полимеризацию фибрин-мономеров, являясь, в сущности, антикоагулянтами. ПДФ способны нарушать целостность или повышать проницаемость сосудистой стенки. Поэтому при некоторых клинических ситуациях кровотечения могут быть вызваны не уменьшением концентрации фибриногена, а присутствием большого количества ПДФ, формирующихся при активном фибринолизе.

Гидролиз фибрина



Плазмин-независимый фибринолиз.

В сгустке фибрин связан с активированными тромбоцитами. Те, в свою очередь, экспрессируют на поверхности Р-селектин, CD154 и другие рецепторы для лейкоцитов. Лейкоциты могут освобождать несколько протеаз, которые способны деградировать фибрин: гранулоцитарную эластазу, катепсин G, моноцитарный катепсин D и др. При протеолитическом расщеплении фибрина лейкоцитарными ферментами, так же как и при расщеплении плазмином, образуются D-димеры, которые идентифицируются коммерческими диагностикумами. Эластаза может модифицировать плазминоген, делая его более восприимчивым к активации u-PA и t-PA и менее чувствительным к α_2-антиплазмину. Фибрин, который частично деградировал под влиянием эластазы, обладает меньшей кофакторной активностью для t-PA, чем в случае деградации фибрина плазмином. Очевидно, что эластаза имеет достаточно большое значение в регуляции фибринолиза, особенно при воспалении.

Тесты для исследования фибринолитической системы.

Основным функциональным ферментом фибринолиза является плазмин. При лизисе фибринового сгустка плазминоген и его активаторы фиксируются на фибрине, где идет активное расщепление субстрата, тогда как в плазме фибринолиз слабо выражен, плазмин блокирован a_2-антиплазмином.

Спонтанный эуглобулиновый лизис – традиционный метод оценки фибринолиза. В кислой среде при низкой температуре происходит осаждение эуглобулиновой фракции белков плазмы, содержащей фибриноген, факторы свертывания, плазминоген и его активаторы. Ингибиторы фибринолиза выпадают в осадок в незначительном количестве (около 2%). После растворения эуглобулиновой фракции и образования фибринового сгустка определяют время его лизиса, что отражает фибринолитическую активность плазмы.

Укорочение времени лизиса эуглобулинов (активация фибринолиза) отмечается при:

- уменьшении концентрации фибриногена (гипо- и дисфибриногенемия);
- увеличении содержания плазминогена и его активаторов – панкреатит, панкреонекроз, мета стазирующии рак предстательной железы, легкого, яичников, метастазы меланомы, операции на легких, предстательной, поджелудочной железе, гиперкатехоламинемия (стресс, тиреотоксикоз, гипертонический криз, введение адреналина), шок, патология беременности, терминальные и другие состояния, сопровождающиеся развитием ДВС-синдрома, цирроз, рак, метастатическое поражение печени (снижение антиплазминовой и антиактиваторной функции).

Увеличение времени лизиса эуглобулинов (угнетение фибринолиза) отмечается при:

- гиперфибриногенемии;
- врожденной а-, гипо- или дисплазминогенемии;
- дефиците плазминогена и его активаторов – рецидивирующие венозные тромбозы, системные васкулиты, сепсис, нефротический синдром, гипокоагуляционная стадия ДВС-синдрома, цирроз печени (нарушение синтеза плазминогена).

Тест может применяться при фибринолитической терапии для контроля эффективности лечения. Метод требует учета исходного содержания в плазме фибриногена, так как при снижении фибриногена время лизиса укорачивается, что трактуется ошибочно как гиперфибринолиз. При гиперфибриногенемии время лизиса удлиняется. Поэтому при отклонениях содержания фибриногена в плазме, а также неполноценной полимеризации фибрина и гепаринемии возможно получение ошибочных результатов. В связи с ориентировочным характером и недостаточной специфичностью в последнее время вместо теста спонтанного лизиса эуглобулинового сгустка начали использовать определение отдельных факторов фибринолиза, в первую очередь плазминогена.

Определение плазминогена. Референтные величины содержания плазминогена в плазме крови — 80–120%. Дефицит плазминогена – один из потенциальных факторов риска тромбоза, хотя клинически это подтверждается не всегда.

При добавлении стрептокиназы (бактериальный препарат, который используется как тромболитик) к разведенному образцу исследуемой плазмы образуется плазминоген-стрептокиназный комплекс, который обладает ферментативной активностью и способен расщеплять хромогенный субстрат. Ферментативная активность комплекса плазминоген-стрептокиназа не подавляется α_2-макроглобулином и α_2-антиплазмином. Тесты, в которых сначала переводили плазминоген в плазмин, а затем пытались определить активность плазмина, не получились надежными, так как свободный плазмин мгновенно инактивируется α_2-антиплазмином, присутствующим в пробе.

Определение α_2-антиплазмина. α_2-антиплазмин – самый быстрый «реактивный» ингибитор плазмина, он не позволяет присутствовать плазмину в крови в свободном виде. α_2-антиплазмин, помимо плазмина, ингибирует активаторы плазминогена – урокиназу (u-PA) и тканевой активатор (t-PA). Референтные величины содержания α_2-АП в плазме крови — 80–120%.

Дефицит α_2-антиплазмина встречается относительно редко, но если возникает, то это сопровождается тяжелым геморрагическим синдромом, проявляющимся диапедезными кровотечениями. Основной причиной кровотечений является присутствие свободного плазмина, который разрушает все тромбы и деградирует фибриноген. Определение α_2-антиплазмина вместе с определением ингибитора тканевого активатора плазминогена типа 1 (PAI-1), XIII фактора можно рассматривать как тесты 2-го уровня, которые необходимо выполнять, если скрининговые тесты (ПВ, АЧТВ, ТВ и определение функции тромбоцитов) нормальны, а больной страдает кровотечениями.

Уменьшение содержания (активности) α_2-антиплазмина наблюдается при:

- врожденном (наследственном) дефиците;
- заболеваниях печени (нарушается синтез α_2-антиплазмина);
- ДВС-синдроме;
- лейкозах;
- нефротическом синдроме;
- интенсивной тромболитической терапии, которая может вызвать потребление α_2-антиплазмина.

После экстракорпорального кровообращения с использованием АИК может наблюдаться истощение α_2-антиплазмина, что приводит к гиперфибринолизу, сочетающемуся с истощением фибриногена, деградацией плазмином плазменных белков (в том числе факторов гемостаза), разрушением тромбоцитов и кровотечениями.

Принцип определения α_2-антиплазмина подобен технологиям определения других ингибиторов фибринолиза. Так как происходит быстрая инактивация плазмина α_2-антиплазмином, то стадия ингибирования и стадия измерения стартуют практически одновременно (что позволяет повысить специфичность метода при сниженной активности ингибитора в плазме).

Принцип определения α_2-антиплазмина хромогенным методом.
ПАП - комплекс плазмин-α2-антиплазмин

Ингибирование	$\text{Плазмин}_{\text{избыток}} + \alpha_2\text{-АП}_{\text{проба}} \longrightarrow \text{ПАП} + \text{плазмин}_{\text{остаток}}$
Измерение	$\text{Плазмин}_{\text{остаток}}$ + хромогенный субстрат $\longrightarrow$ pNA

Определение ингибитора активатора плазминогена типа 1 (PAI-1). PAI-1 в качестве основного ингибитора урокиназы (u-PA) и тканевого активатора (t-PA) играет важную роль в

контроле за активностью фибринолиза. Определение PAI-1 часто включается как один из тестов профиля (панели) оценки тромбофилии. У больных с кровотечениями неясного генеза с нормальными скрининговыми тестами дефицит PAI-1 может быть причиной патологии. Истинный дефицит выявляется относительно редко, но сопровождается тяжелыми кровотечениями.

Повышение PAI-1 встречается достаточно часто, так как PAI-1 – белок острой фазы. Это имеет клиническое значение, так как является причиной рецидивирующего венозного тромбоза и отмечается часто у мужчин в преклонном возрасте. PAI-1 повышается при: инфекционных и воспалительных процессах; послеоперационном периоде; злокачественных опухолях; ожирении; гипертриглицеридемии; лечении дексаметазоном. У больных с инфарктом миокарда персистирующий подъем PAI-1 рассматривается как неблагоприятный прогностический признак.

Определение PAI-1 состоит из нескольких этапов. На первом этапе необходимо инактивировать ингибиторы плазмина – α_2-антиплазмин и α_2-макроглобулин. Затем используется общий принцип определения остаточной активности добавленного в избытке фактора, который должен подавляться исследуемым ингибитором.

Принцип определения ингибитора тканевого активатора плазминогена типа 1 (PAM) хромогенным методом. u-PA - урокиназа, t-PA - тканевой активатор

Инактивация интерферирующих ингибиторов	Обработка пробы кислотой и змеиным ядом ⟶ инактивация α_2-антиплазмина и α_2-макроглобулина
Ингибирование	u-PA или t-PA + PAI-1 ⟶ неактивный комплекс с ингибитором + остаточная активность u-PA или t-PA
Индикаторная реакция	Остаток u-PA или t-PA + плазминоген ⟶ плазмин + хромогенный субстрат ⟶ pNA

При использовании u-PA метод в техническом исполнении несколько проще, чем при использовании избытка t-PA, и может быть автоматизирован на современных анализаторах.

Содержание PAI-1 в системе циркуляции подвержено суточным ритмам, поэтому пробы при системном анализе необходимо брать в одно время, лучше по утрам. Кроме того, PAI-1 – один из самых неустойчивых белков плазмы, поэтому определение необходимо проводить сразу после взятия крови, транспортировка может привести к потере активности PAI-1 в пробе. Завышенные результаты теста можно получить при увеличении активности PAI-2. Этот ингибитор повышается при беременности, поэтому в данном случае исследование PAI-1 описанным выше методом может дать ложные результаты. В последнее время активно используется определение PAI-1 методом ELISA или комбинацией иммунохимических и функциональных методов.

Определение тканевого активатора плазминогена (t-PA). Тканевой активатор плазминогена (t-PA) освобождается в кровоток из эндотелиальных клеток сосудистой стенки, где он синтезируется. Поэтому диагностика дефицита t-PA основывается не только на определении концентрации t-PA в крови, но и на способности освобождаться из сосудистой стенки при стрессовых воздействиях, в частности при манжеточной пробе (дозированном пережатии вен).

Сначала определяют базовый уровень t-PA, потом на 10-15 минут на предплечье накладывают жгут или раздувают манжетку, вызывающую венозный стаз, затем берут вторую порцию крови, в которой повторно определяют t-PA. Сравнивают результаты обеих проб. Из-за быстрой инактивации тканевого активатора плазминогена PAI-1 и другими ингибиторами пробы крови необходимо немедленно закислить, чтобы предупредить инактивацию t-PA in vitro. В настоящее время выпускаются специальные пробирки с кислым антикоагулянтом.

t-PA имеет суточный ритм, поэтому его необходимо определять так же, как PAI-1. t-PA обладает высокой амидазной активностью, позволяющей эффективно использовать для его определения метод хромогенных субстратов. Однако при низких концентрациях t-PA в плазме требуется проведение дополнительных процедур непрямого определения активности фермента через плазминоген и использование растворимого фибрина. Определение t-PA проводится у больных с тромбофилией как часть панели тестов на выявление причины тромбофилии, особенно при нагрузочных манжеточных пробах. Повышение t-PA после инфаркта миокарда рассматривается как неблагоприятный фактор. Нарушение освобождения t-PA после венозного стаза описано у больных с тромбозами и патологией почек.

Принцип определения тканевого активатора плазминогена (t-PA) хромогенным методом

Инактивация ингибиторов	Закисление пробы крови сразу после взятия от пациента
Определение	$t\text{-}PA_{проба}$ + плазминоген $\xrightarrow{\text{растворимый фибрин}}$ плазмин Хромогенный субстрат $\longrightarrow$ pNA

Определение D-димеров. D-димеры – специфические продукты деградации фибрина, входившего в состав тромба. Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием плазмина и некоторых неспецифических фибринолитиков. Концентрация D-димеров в сыворотке пропорциональна активности фибринолиза и количеству лизируемого фибрина. Этот тест позволяет судить об интенсивности процессов образования и разрушения фибриновых сгустков. Определение D-димеров проводится иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител, иммунодиффузии, методом турбидиметрии, латекс-агглютинации. Во всех методах исследования используются моноклональные антитела к эпитопам на D-димере, которые образуются при расщеплении нерастворимого фибрина плазмином. Этих эпитопов нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономерах, поэтому D-димеры – показатель того, что в процессе фибринолиза расщепляется именно фибрин, а не фибриноген или фибрин-мономеры. Поскольку эти антитела не взаимодействуют с фибриногеном, исследования могут проводиться как в плазме, так и в сыворотке. Так как D-димеры – не стандартизованный аналит, то разные методы могут показывать разные результаты, несмотря на то, что используются специфические антитела и калибраторы. На определение D-димеров практически не оказывает влияние техника взятия крови, примесь тромбоцитов, не требуется использования ингибиторов для подавления других факторов. Референтные величины концентрации D-димеров в плазме крови — менее 0,25 мкг/мл (250 мкг/л).

Повышение уровня D-димеров в крови определяется при возникновении венозных тромбозов, атеротромбозе, тромбоэмболии легочной артерии, ДВС-синдроме, после операций, особенно при большом операционном поле и других состояниях с повышенным образованием фибрина. D-димеры достаточно долго циркулируют в крови, время их полувыведения составляет более 24 ч, повышение D-димеров может персистировать в течение нескольких недель после острого тромбоза. Уровень D-димеров повышен у больных с тромбозом глубоких вен бедра, с тромбоэмболией легочной артерии, он может повышаться после обширных хирургических вмешательств, травм, при онкологических заболеваниях. На значение D-димеров влияют такие факторы, как величина тромба, время от начала клинических проявлений до назначения антикоагулянтной терапии, прием антикоагулянтов, на фоне которых уровень D-димеров постоянно снижается. Поэтому более важной для исключения диагноза тромбоза является отрицательная диагностическая значимость теста. Причем для разных тестов отрицательная диагностическая значимость колеблется от 78 до 100%, она выше у более чувствительных методов, что характерно для ИФА-диагностики. D-

димеры определяются в моче, но их появление интерпретируется как маркер почечной дисфункции.

Продукты деградации фибрина/фибриногена (ПДФ) определяются традиционно в общей группе с использованием поликлональных антител. При этом антитела могут взаимодействовать с эпитопами фибриногена, поэтому требуется не только использование сыворотки, но и полное удаление фибриногена с добавлением к крови тромбина или змеиного яда с тромбиноподобным эффектом. В последнее время для метода ELISA стали использовать моноклональные антитела к неоэпитопам, которые образуются при деградации фибрина или фибриногена под влиянием плазмина. Тем не менее трудно дифференцировать ПДФ, образующиеся при деградации фибрина из тромба, от ПДФ, сформировавшихся при деградации фибриногена, особенно при использовании активаторов фибринолиза. Для определения ПДФ широко распространен метод латекс-агглютинации. Этот метод легко автоматизируется, но характеризуется относительно низкой специфичностью.

Положительная проба на содержание ПДФ в плазме/сыворотке свыше 0,5 мкг/мл указывает на:

- ДВС-синдром;
- тромбоз глубоких вен;
- тромбоэмболию легочной артерии;
- метастазы в легкие, рак яичников;
- фибринолитическую терапию.

Тромбин-антитромбиновый комплекс (ТАТ). Определение ТАТ – новый тест в диагностике ДВС-синдрома, он активно внедряется в практику клинико-диагностических лабораторий. Клиренс ТАТ из системы циркуляции достаточно быстрый, он удаляется в течение нескольких минут. Поэтому присутствие ТАТ в плазме свидетельствует об образовании тромбина in vivo непосредственно в момент взятия крови на исследование и о возможности истощения антикоагулянтов. В методе ELISA на твердую фазу нанесены антитела к тромбину. После отмывки проявляющие антитела связываются с антитромбином, присутствующем в ТАТ, оценка количества ТАТ проводится по интенсивности цветной реакции. Определение ТАТ очень информативно в острой ситуации, непосредственно при тромбообразовании. В этом плане определение ТАТ по диагностическому значению схоже с определением фибринопептида А (ФПА), однако для ТАТ менее критичными являются требования к процедуре взятия крови. Иногда тест с некоторыми модификациями используется для определения антитромбина (АТ).

Фрагменты протромбина F1+2 – также новый тест, он отражает активность превращения протромбина в тромбин с участием протромбиназного комплекса (фактор Xa, фактор Va, фосфолипиды и Ca2+), который формируется при активации системы плазменного гемостаза. Определение F1+2, так же как ТАТ, проводится с целью диагностики состояния гиперкоагуляции, которое может быть значимым при остром и хроническом ДВС, тромбозе глубоких вен бедра, эмболии легочной артерии, злокачественных опухолях и острых миелоидных лейкозах (протекающих с активацией системы свертывания), наличии факторов риска тромбоэмболии, остром инфаркте миокарда и последующей тромболитической терапии. Исследование F1+2 полезно использовать при мониторинге лекарственной коррекции состояния гиперкоагуляции, в частности при лечении гепарином и концентратами антитромбина. Определение ТАТ и F1+2 характеризуется высокой аналитической чувствительностью, поэтому их увеличение можно зарегистрировать до появления клинических признаков ДВС-синдрома. F1+2, в отличие от ТАТ, имеют относительно продолжительный период циркуляции в системе кровотока. Состояние гиперкоагуляции можно зарегистрировать с помощью как ТАТ, так и F1+2, тогда как состояние гипокоагуляции можно выявить только по уменьшению F1+2. Поэтому определение F1+2 проводится иногда с целью мониторинга антикоагулянтов непрямого действия, эффективности профилактического подкожного или внутривенного введения гепарина. Определение F1+2 можно использовать для решения вопроса о назначении/неназначении

терапевтических вмешательств у пациентов с дефицитом антикоагулянтов и при беременности в случае риска возникновения тромбозов.

Фибринопептид А (ФПА, FPA). ФПА отщепляется от молекулы фибриногена тромбином, поэтому при тромбинемии количество ФПА в плазме увеличивается. Определение ФПА достаточно давно используется как маркер активации гемостаза. В современных наборах используется метод ELISA с моноклональными антителами. ФПА – очень чувствительный тест на потребление фибриногена. Его концентрация повышается при различных заболеваниях сопровождающихся активацией свертывающей системы: ДВС-синдром, ТЭЛА, тромбоз глубоких вен, инфаркт миокарда, злокачественные новообразования и др. Референтные величины содержания фибринопептида А в плазме < 3 нг /мл. Результаты теста очень сильно зависят от процедуры взятия крови, даже небольшие отступления от прописанной схемы могут вызвать значительные сдвиги в уровне ФПА в пробе.

Растворимые фибринмономерные комплексы (РФМК). При ряде форм патологии, характеризующихся активацией свертывания крови (ДВС, тромбозы, тромбофилии), происходит расширение пула фибриногена. В норме в крови из пула фибриногена присутствует практически только сам фибриноген в количестве 1,8-3,5 г/л. Все остальные продукты находятся в минимальном количестве, которое практически не определяется лабораторными тестами. При ДВС-синдроме за счет свободного тромбина происходит постоянный процесс трансформации фибриногена в фибрин с появлением в крови фибринопептидов А и В, накоплением мономеров фибрина. Активация фибринолиза сопровождается повышенным образованием ПДФ. ПДФ взаимодействуют с фибрин-мономерами, увеличивая количество растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК). РФМК – это фибрин-мономеры и олигомеры, а также их комплексы с ПДФ.

Для выявления растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) в КДЛ традиционно использовали так называемые паракоагуляционные («гельобразующие») тесты - этаноловый и протаминсульфатный. Однако из-за качественной оценки результатов они малоинформативны. Различные модификации протаминсульфатного теста с количественным и полуколичественным представлением результата мало точны и плохо воспроизводимы. Протаминсульфат связывается с гепарином, поэтому у больных, получавших гепарин, протаминсульфатный тест дает отрицательный результат. В настоящее время эти тесты можно считать устаревшими.

О-фенантролиновый тест основан на регистрации времени появления хлопьев или зерен паракоагулянта при добавлении к исследуемой плазме раствора О-фенатролина; на черном фоне в проходящем свете визуально определяют время появления хлопьев паракоагулянта. Полуколичественную оценку проводят сопоставлением времени (если оно менее 120 с) с концентрацией РФМК по специальной таблице. Чем меньше время, тем выше содержание фибрин-мономерных комплексов. Хлопья не должны образовываться в первые 70 – 120 с наблюдения (отрицательный результат теста, концентрация РФМК<35-40 мг/л). Положительный результат является признаком тромбинемии и наблюдается при активации свёртывания, тромбофилических состояниях (в том числе при злокачественных новообразованиях), при тромбозах, тромбоэмболиях и ДВС-синдроме.

Гепаринотерапия с содержанием гепарина в плазме крови до концентрации 10 ед/мл не влияет на результаты теста. Ложное повышение может наблюдаться попадании в пробирку первых капель крови, содержащих фрагменты тканей, и недостаточно быстром перемешивании с антикоагулянтом. Возможно искажение результатов теста при парапротеинемии, инфузии некоторых белковых препаратов и кровезаменителей. Завышенные значения могут быть у беременных и новорожденных.

Ортофенантролиновый тест более чувствителен, чем другие паракоагуляционные тесты. Однако при остро протекающих (катастрофических) формах ДВС с глубокой гипофибриногенемией показатели паракоагуляционных тестов могут снижаться.

Маркеры активации гемостаза

Показатель	Характеристика	Диагностическое значение
D-димеры	Продукты, образующиеся при лизисе фибрина под влиянием плазмина. Накапливаются при активации гемокоагуляции и фибринолиза	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, оценка эффективности тромболитической терапии
TAT – тромбин-антитромбиновый комплекс	Комплексы взаимодействия тромбина и антитромбина. Отражают количество образующегося тромбина в системе циркуляции за короткий период	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
F1+2 – фрагменты протромбина	Указывают на активацию протромбина фактором Ха и на образование тромбина *in vivo*. Отражают количество образующегося тромбина в системе циркуляции за длительный период	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением гепарином и непрямыми антикоагулянтами. Наследственный или приобретенный дефицит ингибиторов
РФМК	Фибрин-мономеры и олигомеры, а также их комплексы с ПДФ. Отражают активность тромбина *in vivo*	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
ФПА – фибринопептид А	Продукт протеолиза фибриногена. Отражает активность тромбина *in vivo*	Выявление/исключение ДВС, тромбоза глубоких вен, эмболии легочной артерии, контроль за лечением антикоагулянтами
ПДФ	Продукты деградации фибрина/фибриногена под влиянием плазмина	Определяют состояние гиперфибринолиза, повышаются у больных с тромбозами (реактивный фибринолиз) и ДВС, при лечении фибринолитиками
ПАП – плазмин-α_2-антиплазминовый комплекс	Отражает образование плазмина *in vivo*	Выявление гиперфибринолиза или реактивного фибринолиза, ДВС, инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии
PF4 – фактор 4 тромбоцитов, **β-TG** – β-тромбоглобулин	Метаболиты, освобождаемые из тромбоцитов в плазму. Отражают активацию тромбоцитов *in vivo*	Диагностика гиперактивного состояния тромбоцитов, артериального тромбоза, повреждения сосудов, инсульта
vWF – фактор Виллебранда	Освобождается из эндотелиальных клеток. Маркер повреждения эндотелиальных клеток	Диагностика поражения сосудистой стенки, фактор риска инфаркта миокарда и инсульта
TM	Мембранный белок в эндотелиальных клетках, в плазме – маркер повреждения эндотелия	Диагностика повреждения сосудистой стенки, ДВС-синдрома
ф.XIIa	Активный фактор XII, указывает на активацию контактной фазы	Фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний

Изменение некоторых показателей активации гемостаза при патологии

Заболевание	TAT	F1+2	ФПА	D-димеры	PF4	TM	ПАП
ДВС-синдром	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Активация фибринолиза	–	–	–	↑	–	–	↑
Состояние гиперкоагуляции	↑	↑	↑	↑	↑	–	–
Предтромботическое состояние	–/↑	–/↑	–/↑	↑	↑	↑	–
Инфаркт миокарда	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Малигнизация	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	–	–/↑
Антифосфолипидный синдром	–/↑	–/↑	–/↑	–/↑	↑	–/↑	–
Иммунная тромбоцитопеническая пурпура (ИТП)	–	–	–	–	↑	–	↑
Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура	↑	↑	↑	↑	↑	–	–

Список Литературы:

1. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. В.В. Долгов, П.В. Свирин. Москва 2015 г.
2. Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний. Учебное пособие. Под редакцией: проф. Н.Н.Петрищева проф. Л.П.Папаян. Санкт- Петербург 1999
3. «Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство» под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова, 2016 г
4. «Руководство по лабораторным методам диагностики» А. А. Кишкун, 2007 г.
5. Руководство по лабораторным методам диагностики. А. А. Кишкун, 2014 г.
6. Медицинская лабораторная диагностика. Программы и алгоритмы. Руководство для врачей под. ред. А.И. Карпищенко, Москва 2014 г.
7. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике, под. ред. А.И. Карпищенко, Москва 2015 г Медицинская лабораторная диагностика, программы и алгоритмы. Под ред. проф. Карпищенко А.И., Интермедика, 2011 г.