

Лабораторные исследования при сосудистой патологии

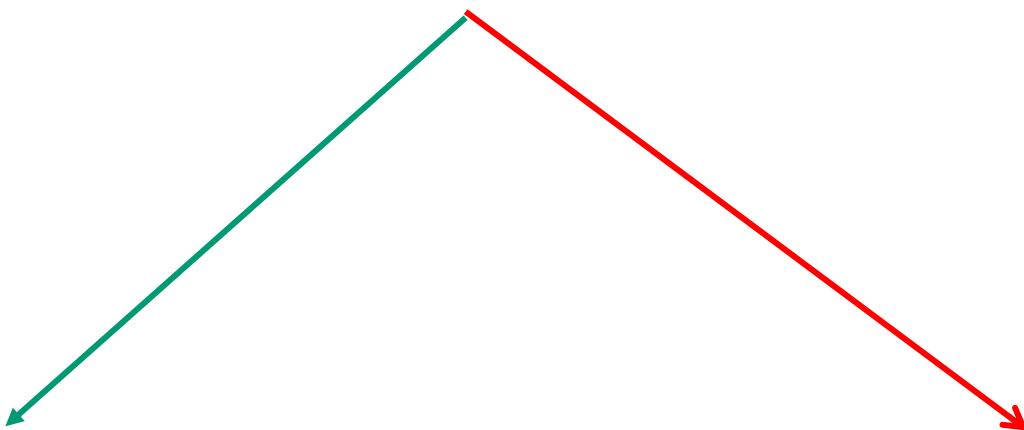
Ассистент, к.б.н. Лянг О.В.
Профессор, д.м.н. Кочетов А.Г.

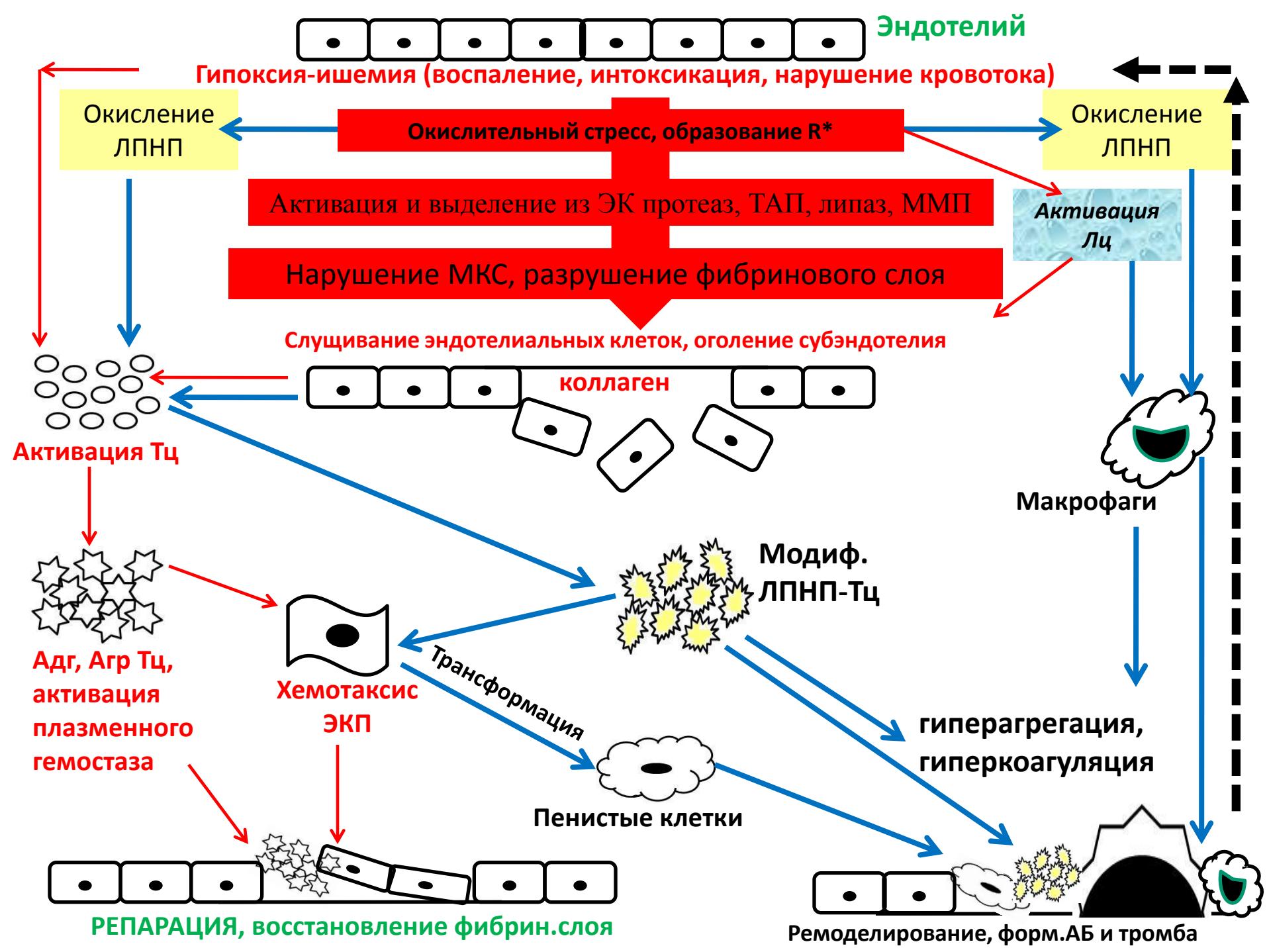
НАРУШЕНИЕ целостности эндотелиального слоя

РЕПАРАЦИЯ ЭС

восстановление

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ ЭС





Общепринято, что:

ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ эндотелия обусловлена:

- Способностью образовывать и выделять в кровь ингибитор агрегации тромбоцитов – простациклин (метаболит арахидоновой кислоты, простагландин);
- Неспособностью к контактной активации системы свертывания крови;
- Созданием антикоагулянтного потенциала на границе кровь/ткань путем фиксации на эндотелии комплекса гепарин – антитромбин III;
- Продукцией тканевого активатора плазминогена;
- Способностью удалять из кровотока активированные факторы свертывания.

Повреждение эндотелия - **ТРОМБООБРАЗОВАНИЕ** за счет:

- выделения в кровь тканевого тромбопластина и стимуляторов тромбоцитов – адреналина, АДФ, норадреналина (обладают также сосудосуживающими свойствами);
- контактной активации коллагеном и другими компонентами субэндотелия как тромбоцитов (адгезия)
- свертыванию крови (активация фактора XII);
- продукции плазменных факторов адгезии и агрегации тромбоцитов – фактора Виллебранда.

Однако оголение субэндотелия происходит постоянно, так как в день может обновляться около миллиона эндотелиальных клеток !!!

НЕПРЕРЫВНОЕ СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ ?

В общем кровотоке обнаруживается только при массивном кровотечении

Теория непрерывного свертывания крови



Д.М.Зубаиров
1966 год
Свертывание крови
при массивном
кровотечении

Равновесие «свертывание-антисвертывание» носит динамический характер, то есть непрерывно происходят активация и связанныя с ней инактивация факторов свертывания

продолжительность жизни молекулы фибриногена равна 5 минутам
существует артерио-венозная разница в концентрации протромбина, т.е. важное место в разрушении протромбина занимает ЭНДОТЕЛИЙ мелких сосудов

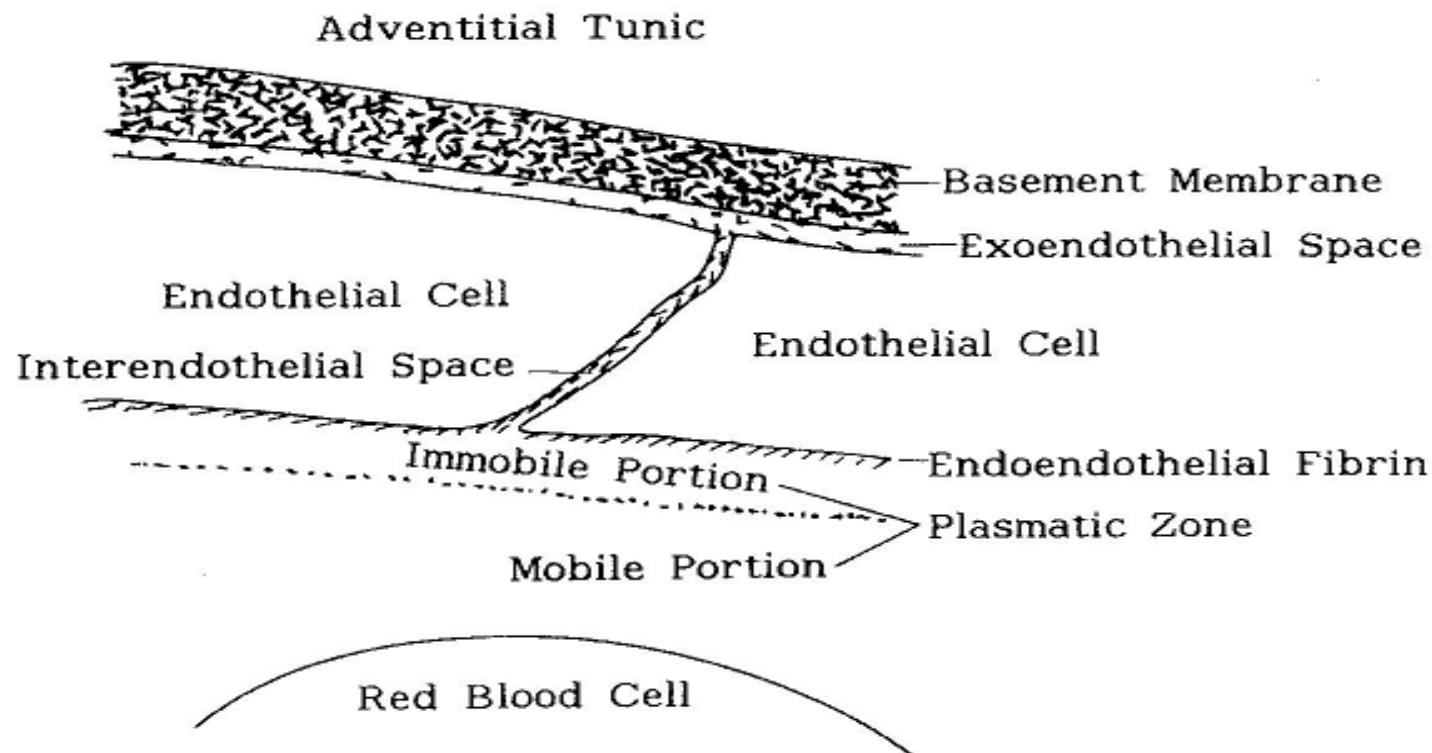
факторы свертывания потребляются в процессе внутри-сосудистого свертывания, а продукты этого свертывания поглощаются РЭС

В 1964 г. Luft, используя краситель рутений красный, продемонстрировал, что эндотелиальные клетки неравномерно покрыты тонким слоем вещества, которое состояло, как было доказано позднее Copley AL. (1983), из

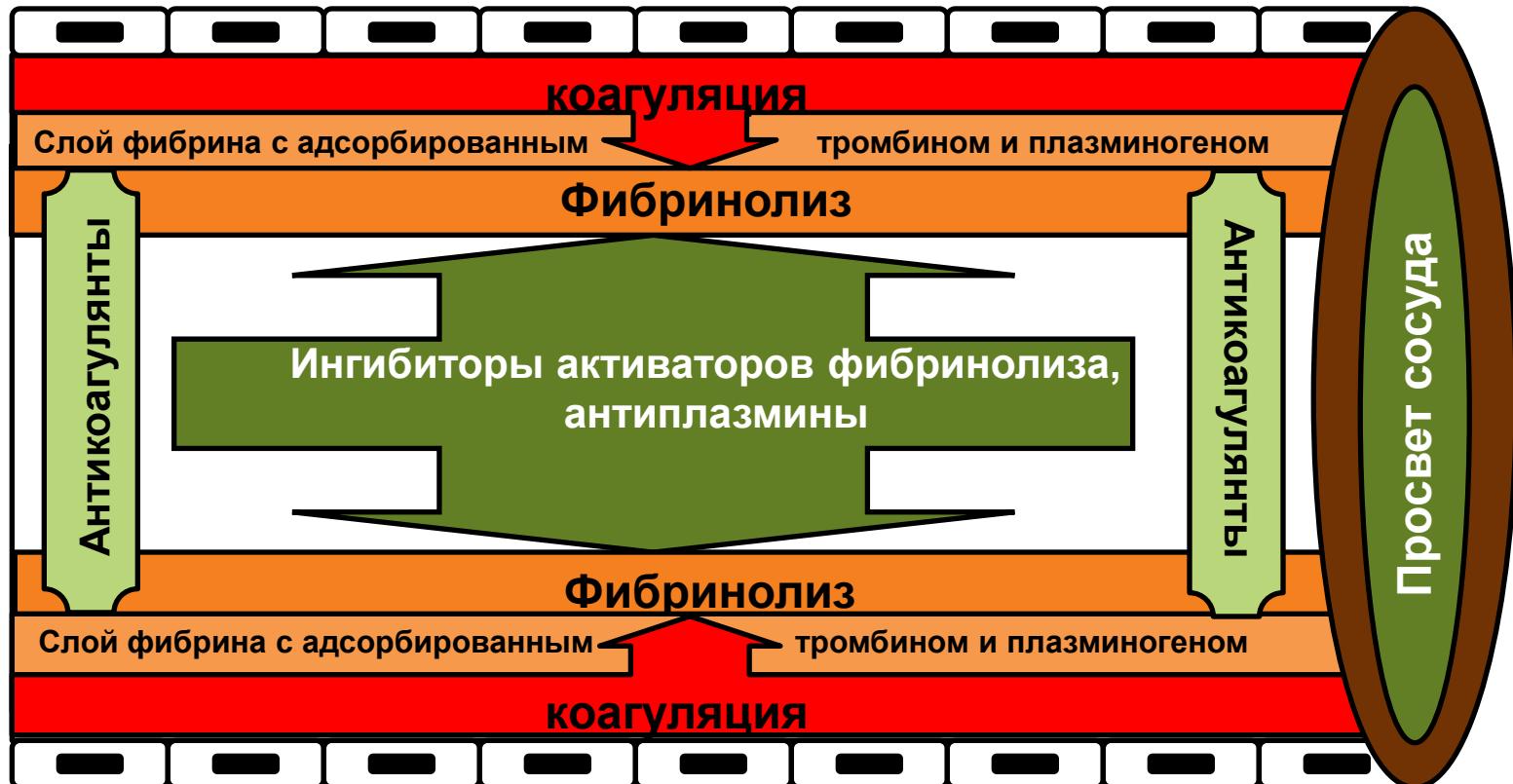
фибрина, фибрината кальция и продуктов фибринолиза

EEFL-HISTORICAL ACCOUNT

Suppl. V, 1983



Концепция внутрисосудистого функционирования системы гемостаза



Система гемостаза –
функционирование и
методы
исследования

СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА –

это биологическая система, основной функцией которой является поддержание **равновесия** между антагонистически действующими механизмами:

I - обеспечивающими сохранение крови в жидком состоянии

II - предотвращающими потерю крови путем образования тромбов

**ИНТЕГРАЛЬНАЯ СХЕМА
ПРЕДСТАВЛЕНИЙ**

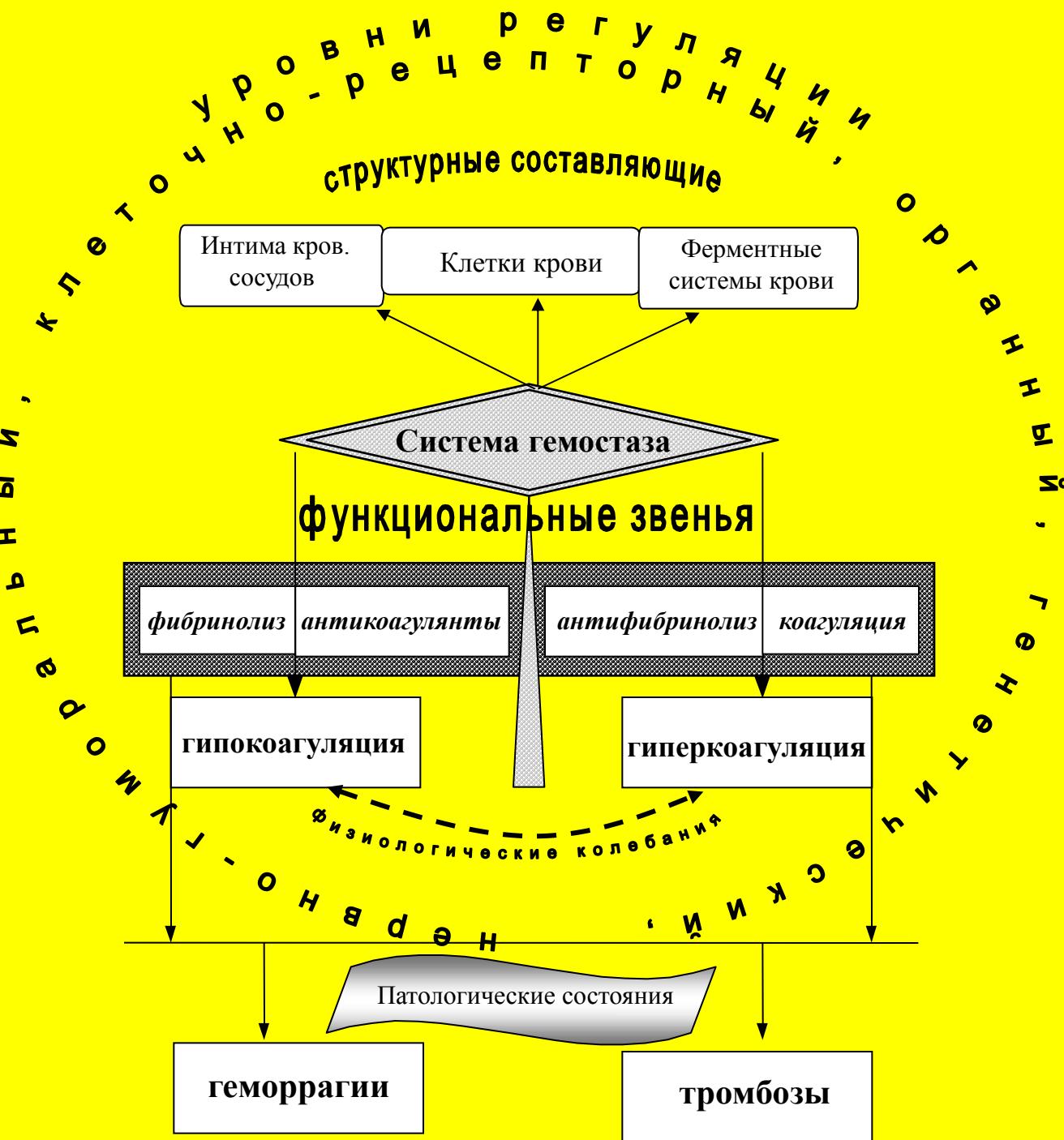
О

СТРОЕНИИ

И

ФУНКЦИОНИРОВАНИИ

СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА



КОАГУЛЯЦИОННОЕ
ЗВЕНО
СИСТЕМЫ
ГЕМОСТАЗА

Коагуляция (свертывание крови) – процесс инициации и дальнейшего взаимодействия форменных элементов крови и факторов свертывания с образованием тромбина, при достижении критического уровня которого происходит в агрегате и на поверхности агрегата форменных элементов превращение фибриногена в фибрин.

Результатом коагуляции является образование сгустка – агрегата из форменных элементов крови, укрепленного нитями фибрина.

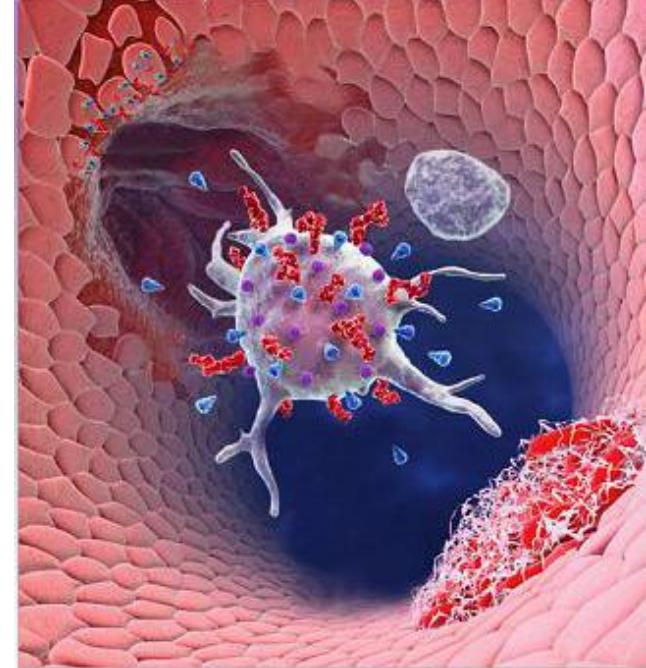
Коагуляционное звено:

1. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз
2. Плазменный гемостаз

Сосудисто- тромбоцитарный гемостаз

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (первичный, временный)

обеспечивает начальную остановку кровотечения в зоне микроциркуляции путем образования тромбоцитарной пробки в месте повреждения сосуда



1. *Повреждение сосуда, ЭНДОТЕЛИЯ*
2. *Выделение клеточных медиаторов: АДФ, серотонин, адреналин, нестабильные простагландины, тромбоцитоактивирующий фактор*
3. *Спазм сосуда, активация тромбоцитов – изменение формы тромбоцитов*
4. *Адгезия Тц (Platelet adhesion) - это прилипание тромбоцитов к компонентам субэндотелия (в частности, к коллагену) или к чужеродной поверхности (например, к стеклу)*
5. *Агрегация Тц (Platelet aggregation) - склеивание (слипание) тромбоцитов между собой под действием специфических стимуляторов – **обратимая и необратимая** (зависит от концентрации медиаторов и индивидуальной рецепторной чувствительности)*

Участие тромбоцитов в формировании тромба

Строение и функции тромбоцитов

- Тромбоциты – плоские безъядерные клетки, диаметр 1-5 мкм
- Содержание тромбоцитов в крови здорового человека составляет 180-420 тыс. в 1 мл
- Циркуляция в кровотоке – от 5 до 11 суток

Виды гранул в тромбоцитах

«Электронноплотные » гранулы	α -гранулы	Лизосомы
АДФ	трансформирующий ростовой фактор	кислые гидролазы
АТФ	фибриноген	
ГТФ	фактор V	
ГДФ	фактор VIII	
серотонин	калликреин	
Ca^{2+}	α_2 -антиплазмин	
	тромбоспондин	
	гистамин	
	тромбоцитарный фактор 4	

Функции тромбоцитов

➤ Тромбостатическая:

- Образование тромбоцитарной пробки
- Поддержание вазоспазма
- Участие в процессе свертывания крови и в регуляции фибринолиза

➤ Ангиотрофическая

➤ Репаративная

- Тромбоциты в больших количествах поглощаются эндотелием, поддерживая таким образом нормальную структуру и функцию микрососудов, их устойчивость к повреждающим воздействиям, непроницаемость по отношению к эритроцитам. В этом заключается их **ангиотрофическая функция**.
- Поэтому **патология тромбоцитов** приводит как к различным формам кровоточивости, так и к **тромбофилическому** состоянию вследствие метаболической недостаточности эндотелиальных клеток.

Этапы образования тромбоцитарного тромба

Повреждение сосудистой стенки

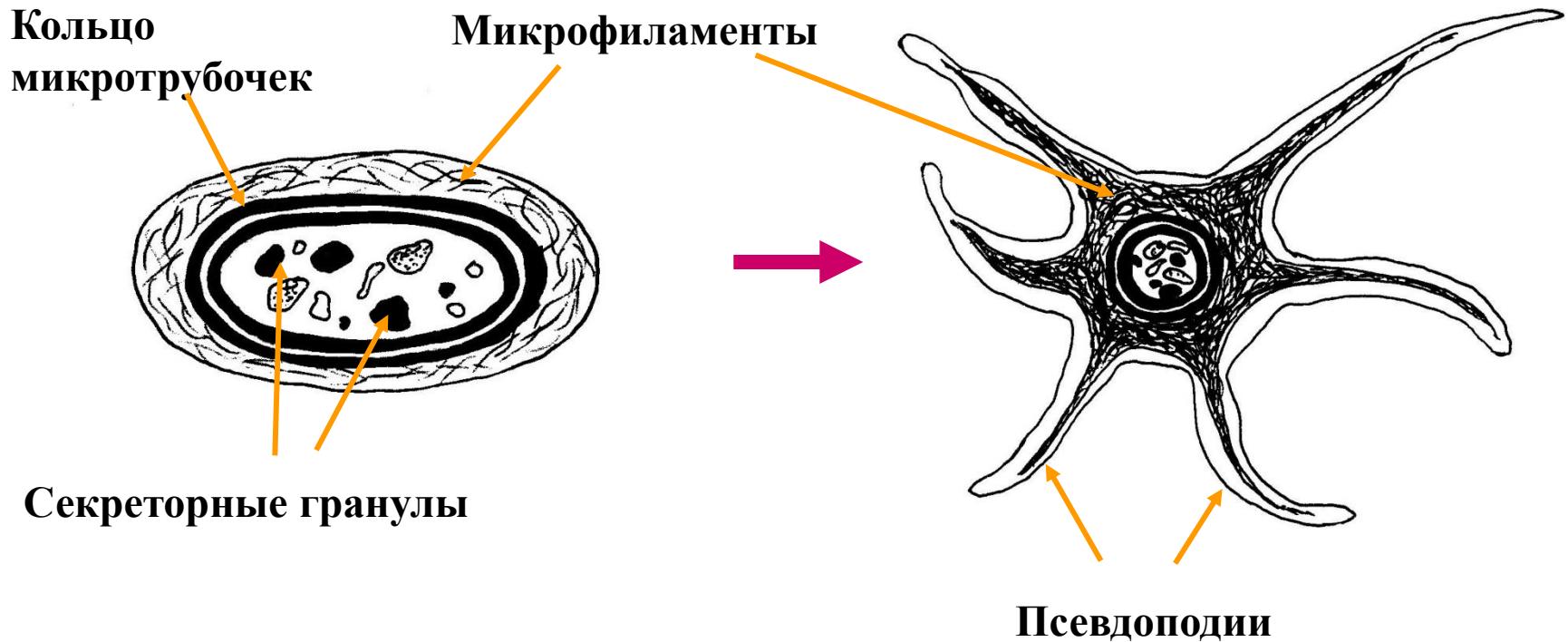


Выброс клеточных медиаторов



Активация тромбоцитов

Изменение формы тромбоцита при его активации



Этапы образования тромбоцитарного тромба

Повреждение сосудистой стенки



Выброс клеточных медиаторов



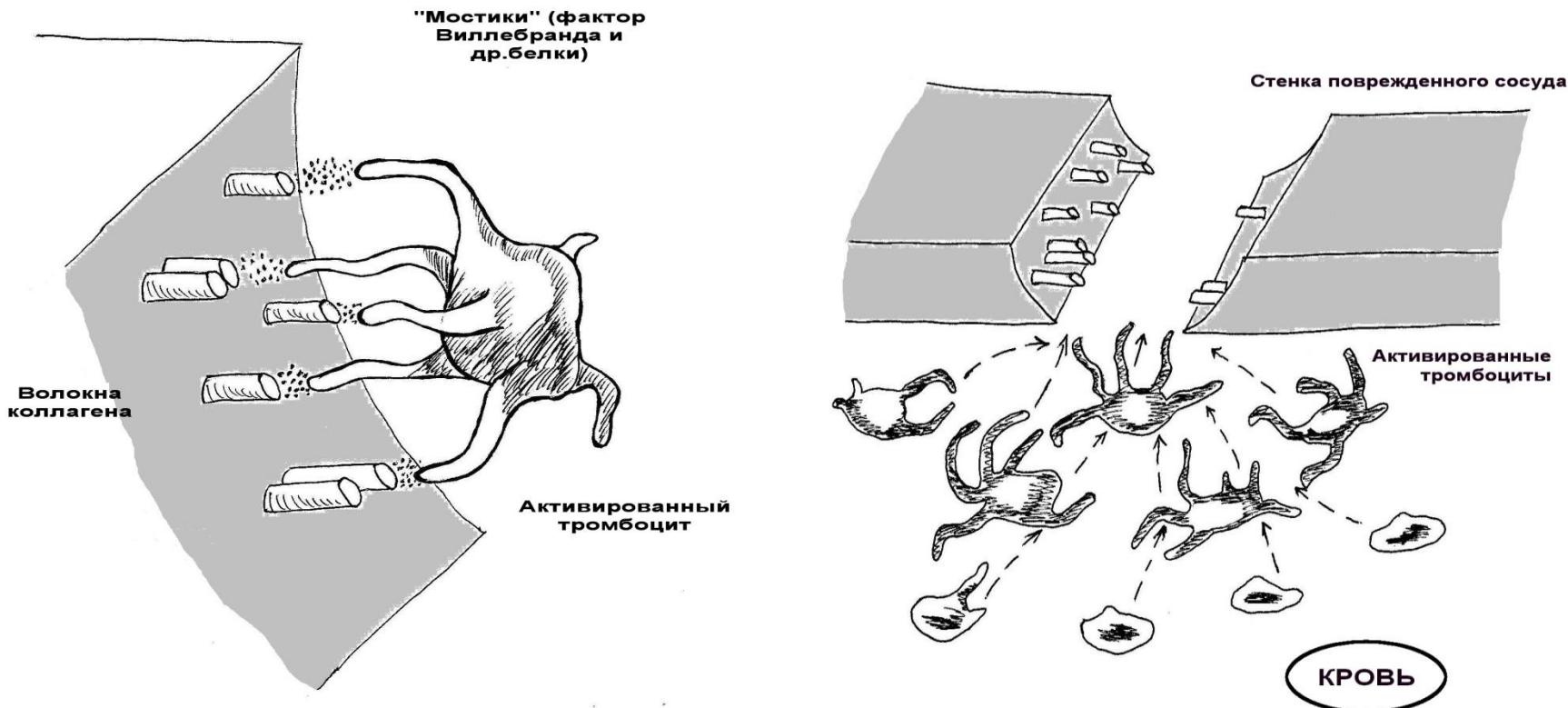
Активация тромбоцитов



Адгезия тромбоцитов

Адгезия тромбоцитов

Адгезия тромбоцитов к субэндотелиальному слою осуществляется за счет рецепторов к коллагену (гликопротеида Ia/IIa); образовавшееся соединение стабилизируется фактором фон Виллебранда, который образует мостик между волокнами коллагена и другим тромбоцитарным рецептором, гликопротеидом Ib/IX.



Этапы образования тромбоцитарного тромба

Повреждение сосудистой стенки



Выброс клеточных медиаторов



Активация тромбоцитов



Адгезия тромбоцитов



Обратимая агрегация тромбоцитов



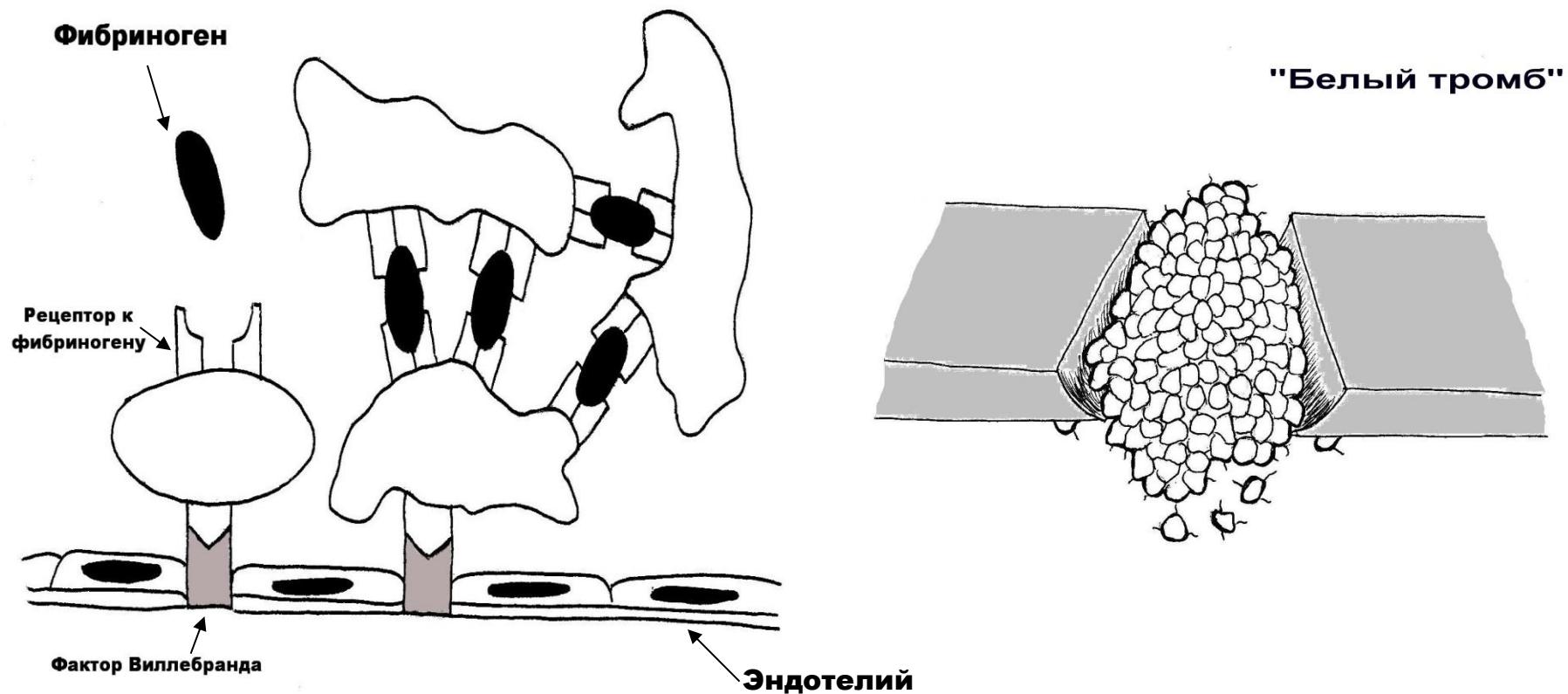
Реакция дегрануляции (высвобождения)



Необратимая агрегация

Агрегация тромбоцитов

Агрегация тромбоцитов между собой опосредуется фибриногеном; рецептором служит гликопротеид IIb/IIIa.



Реакция освобождения (высвобождения)

предшествует необратимой агрегации тромбоцитов и приводит к выделению из них индукторов агрегации (АДФ, серотонин, адреналин, нестабильные простагландины, **тромбоксан А2**, тромбоцитоактивирующий фактор).

Наряду со стимуляторами и сигнальными молекулами, попадающими в кровоток из поврежденных тканей и других форменных элементов крови, они вызывают агрегацию других тромбоцитов, которые быстро покидают кровоток и оседают на уже адгезировавших и начавших агрегировать тромбоцитах (хемотаксис).

Методы исследования сосудисто-тромбоцитарного компонента системы гемостаза

1. *in vivo* Время кровотечения по Дуке

определяется длительность кровотечения из поверхностных микрососудов мочки уха после нарушения их целостности с помощью плоского ланцета или скарификатора. Время кровотечения характеризует функциональную активность тромбоцитов и капилляров и не зависит от процессов свертывания крови. N до 4 минут.

2. *in vitro* Подсчет количества тромбоцитов

3. *in vitro* Оценка ретенции тромбоцитов на стекле

$$IP = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

ИР –индекс ретенции А – количество тромбоцитов до фильтрования, В – тоже после фильтрования.

4. *in vitro* Оценка агрегационной активности тромбоцитов с различными концентрациями индуктора и с разными индукторами агрегации

Исследование агрегации тромбоцитов

Исследование агрегационной активности тромбоцитов:

- Оценка тромбоцитарного гемостаза
- Мониторинг антиагрегантной терапии

Методы исследования агрегационной способности тромбоцитов

Качественные

Качественный экспресс-метод визуальной оценки на предметном стекле по А.С. Шитиковой

Качественный пробирочный метод по R.M. Biggs

Гемолизат-агрегационный тест по З.С. Баркагану и Б.Ф. Архипову, В. М. Кучерскому

Количественные

Турбидиметрический метод по Борну и О'Брайену

Флуктуационный метод по З.А Габбасову

Проблема стандартизации

- Ни один из вышеперечисленных методов не является унифицированным и стандартизованным
- Каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои референсные пределы, в зависимости от прибора и реагентов

**«Золотой стандарт» –
оптическая, или световая
трансмиссионная агрегатометрия
по Борну-О'Брайену**

Турбидиметрический метод исследования агрегации тромбоцитов



3,8% цитрат натрия
Кровь-Цитрат 9:1

1000 об/мин, 10 минут
Богатая тромбоцитами плазма

3000 об/мин, 10 мин
Бедная тромбоцитами плазма

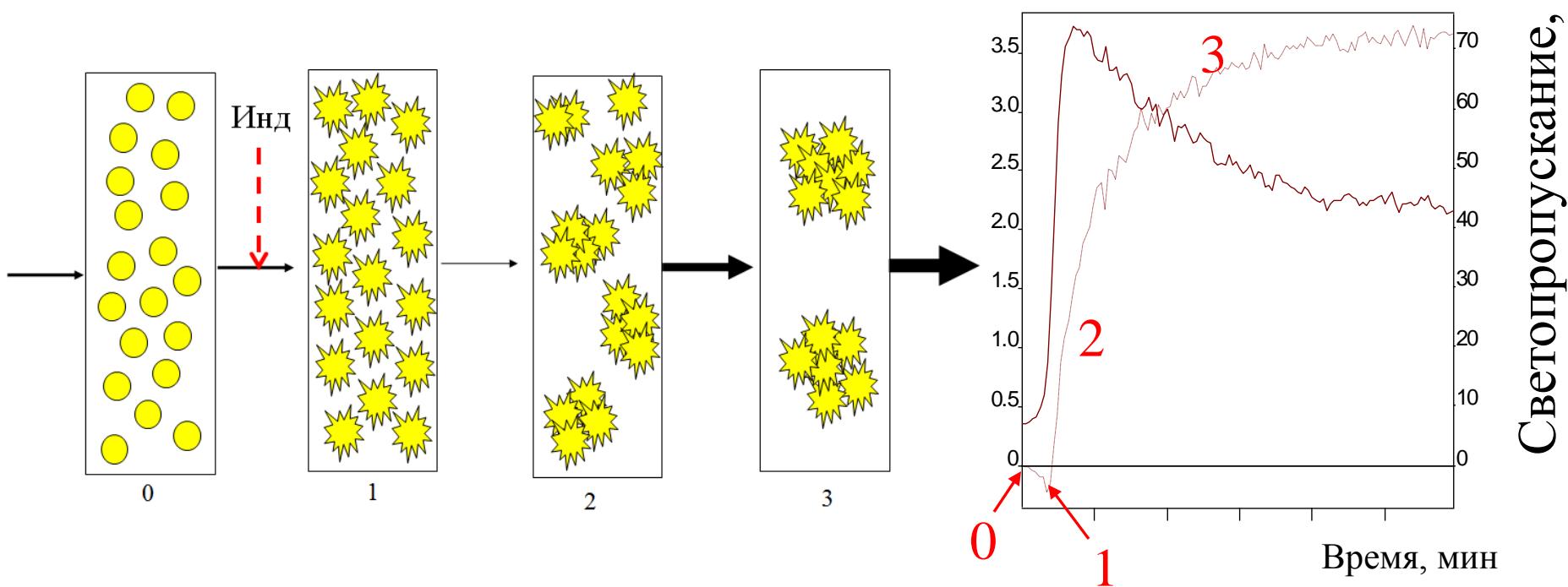


200 мкл плазмы (+25 мкл индуктора)

Исследование функциональной активности тромбоцитов



Турбидиметрический метод исследования агрегации тромбоцитов



0 – неактивированные тромбоциты

1 – фаза активации

2 – фаза индуцированной агрегации

3 – фаза высвобождения с последующей стабилизацией

Изменения функциональности тромбоцитов

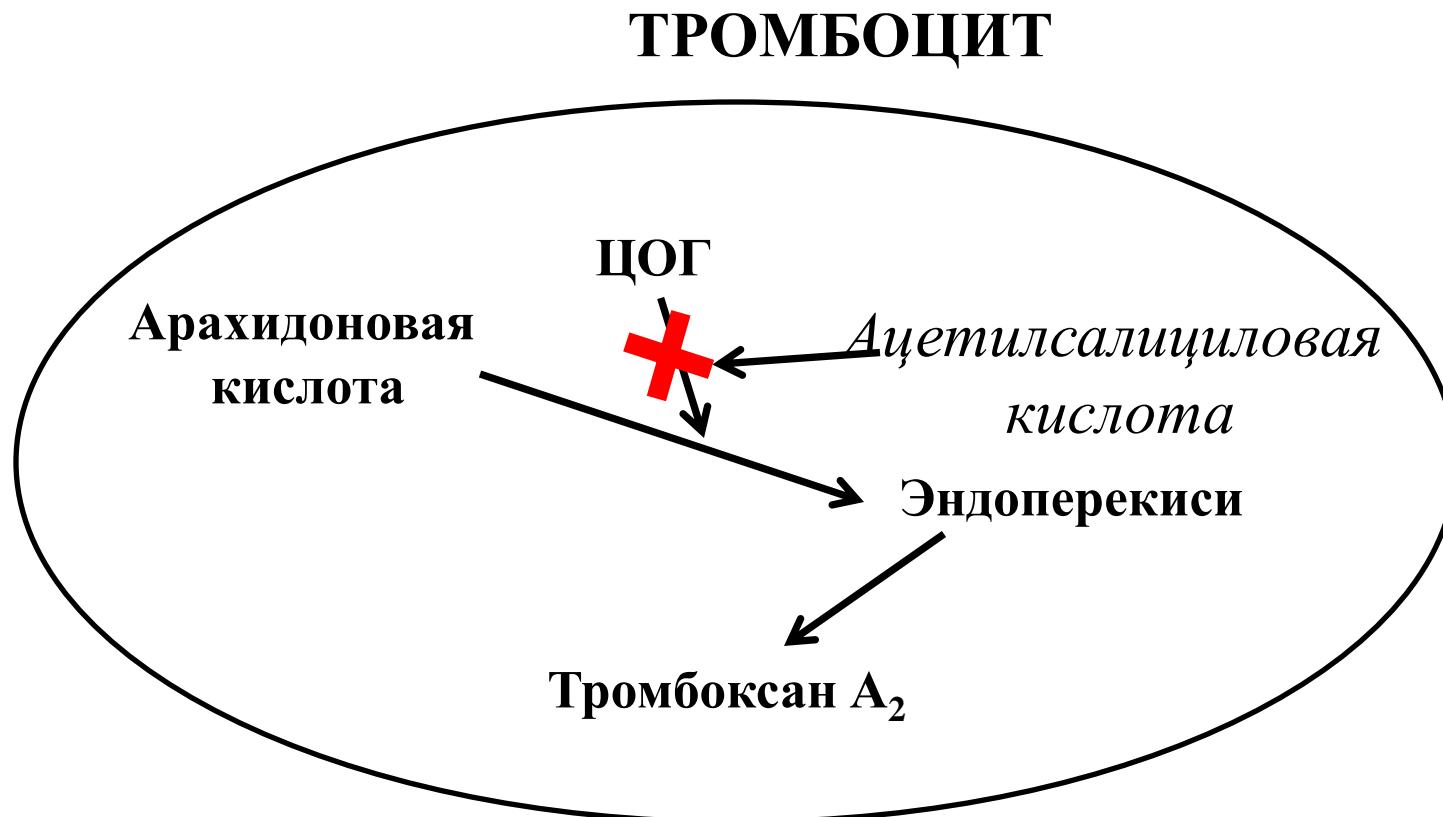
- ❖ Повышение агрегационной активности
 - ❖ Антиагреганты
 - ❖ Повышение агрегационной чувствительности
 - ❖ Антиагреганты по показаниям
 - ❖ Снижение агрегационной активности
 - 1. Оценка эффективности ААТ
 - 2. Наблюдение в динамике
 - ❖ Признаки эндотелиальной деструкции
 - ❖ Консультация с клиницистом

Группы антиагрегатных препаратов

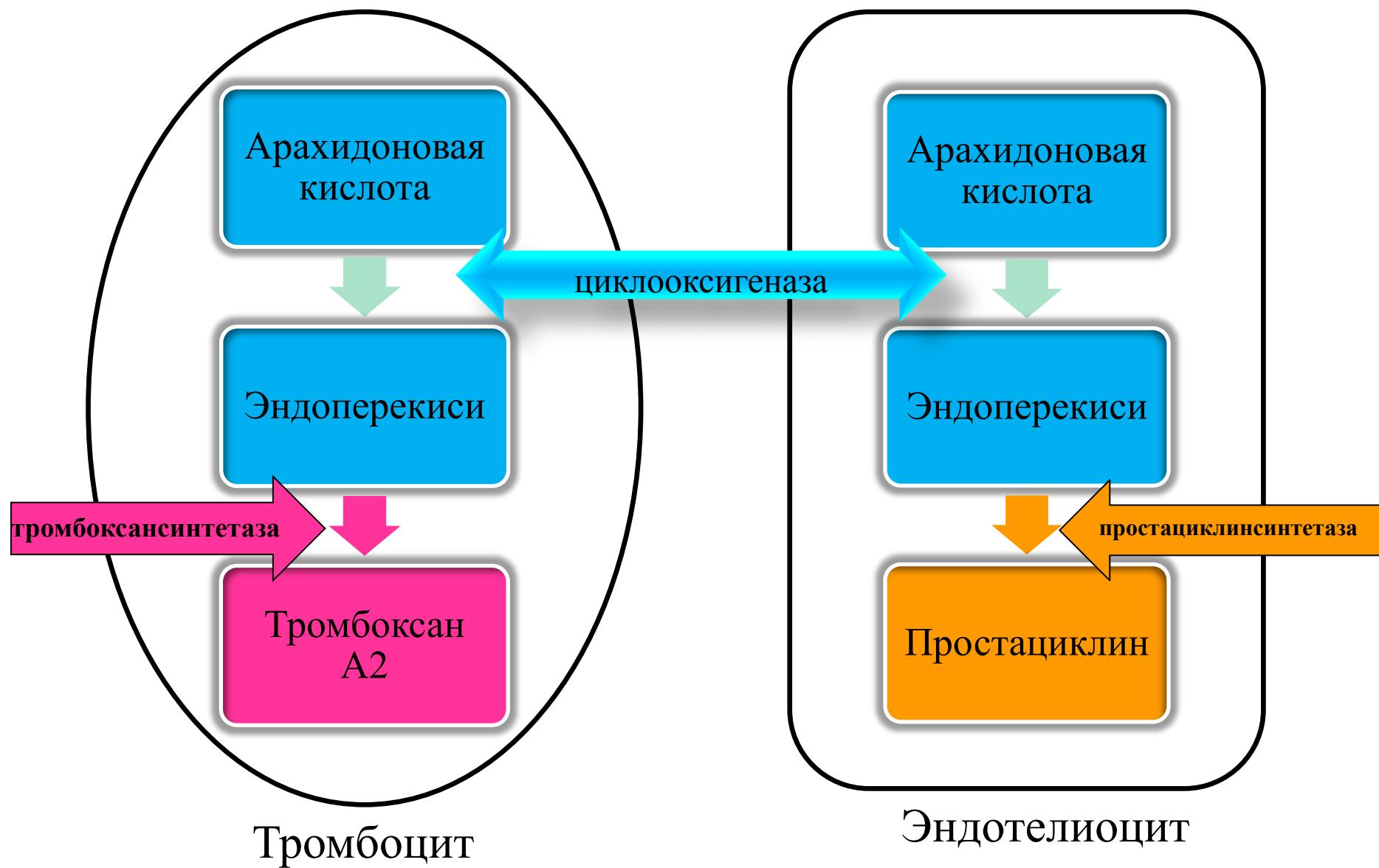
- Вещества, действующие на метаболизм арахидоновой кислоты путем ингибирования циклооксигеназы (ЦОГ)
- Ингибиторы цАМФ фосфодиэстеразы
- Антагонисты рецептора АДФ Р2Y₁₂ на тромбоцитарных мембранах
- Антагонисты гликопротеинов (GP) IIb/IIIa
- Комбинированные

Ингибиторы циклооксигеназы

Ацетилсалициловая кислота (аспирин, тромбо-асс, ацекардол, кардиомагнил, кардиаск), индобуфен, трифлюзал

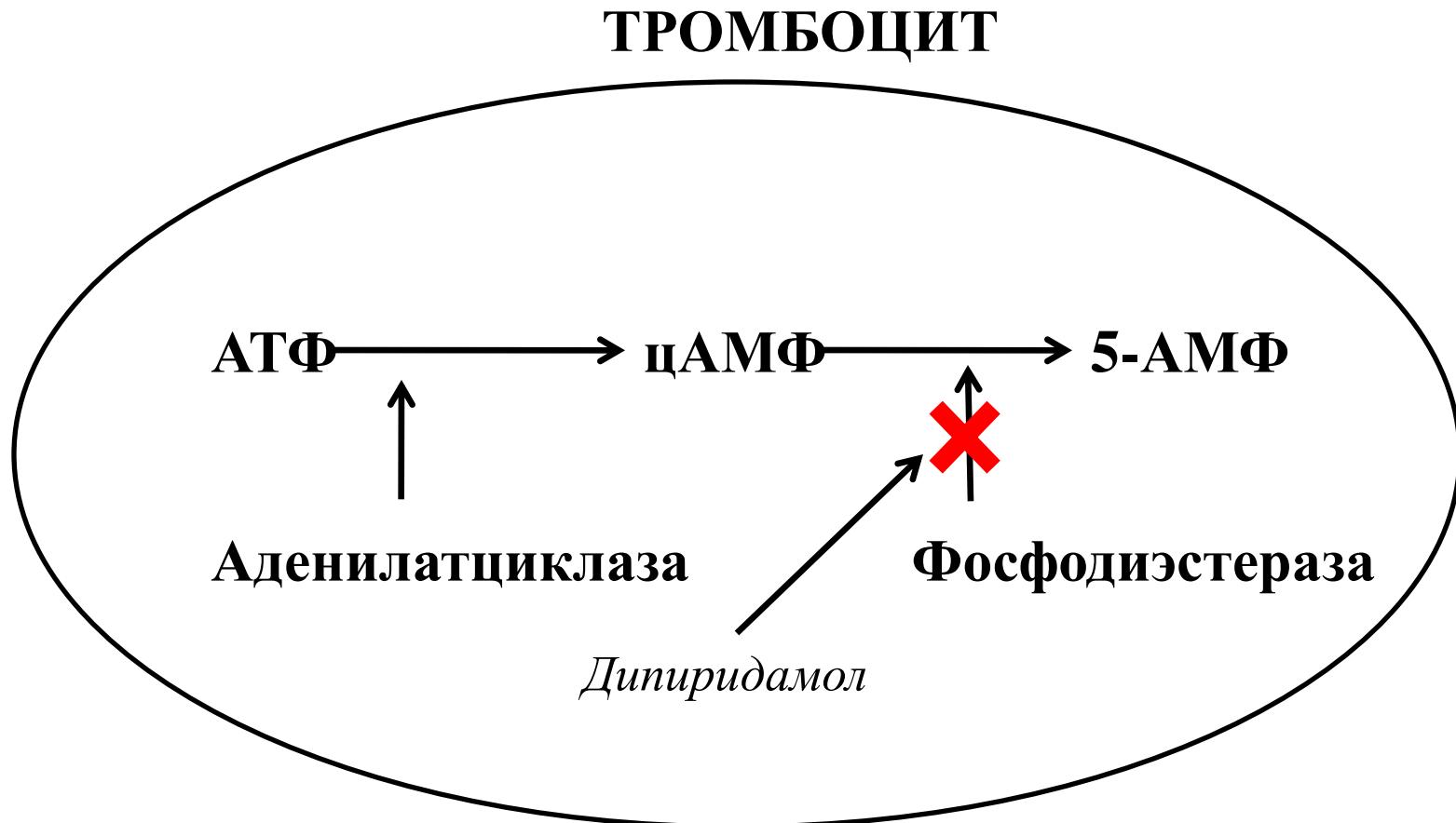


Каскад арахидоновой кислоты



Ингибиторы цАМФ-фосфодиэстеразы

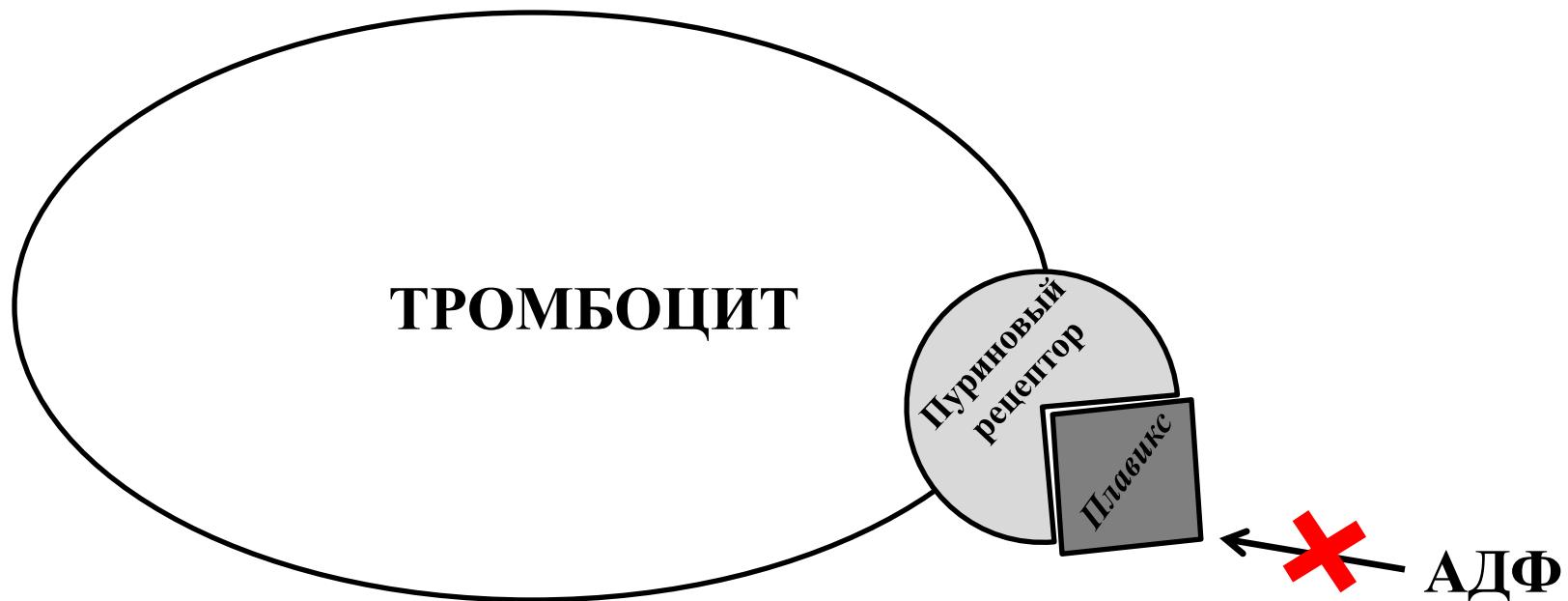
Дипиридамол (курантил), пентоксифиллин (трентал)



Антагонисты рецептора АДФ P2Y₁₂

Необратимые ингибиторы активности P2Y₁₂ - клопидогрел (плавикс), тиклопидин (тиклид), празугрел

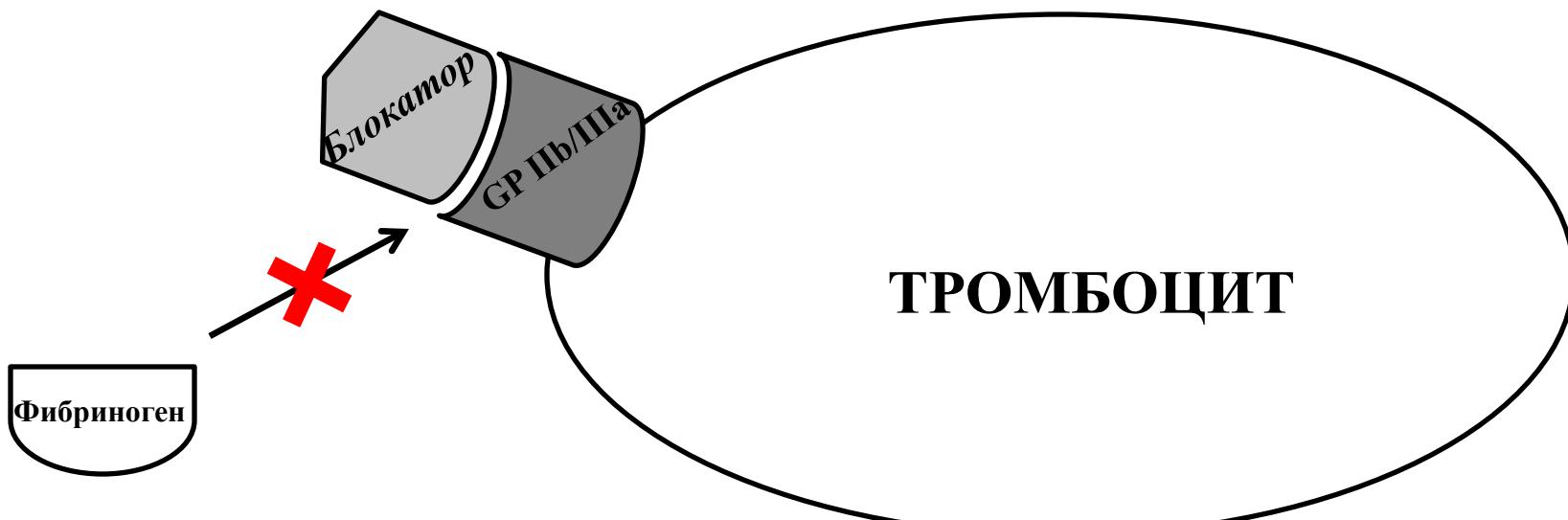
Обратимые антагонисты — AZD6140 (для перорального применения) и ARC69931MX (кангрелор) для внутривенного использования



Блокаторы рецепторов GP IIb/IIIa

Для внутривенного введения — абсиксимаб (Реопро), эптифибатид (интегрилин), тирофибан (агграстат)

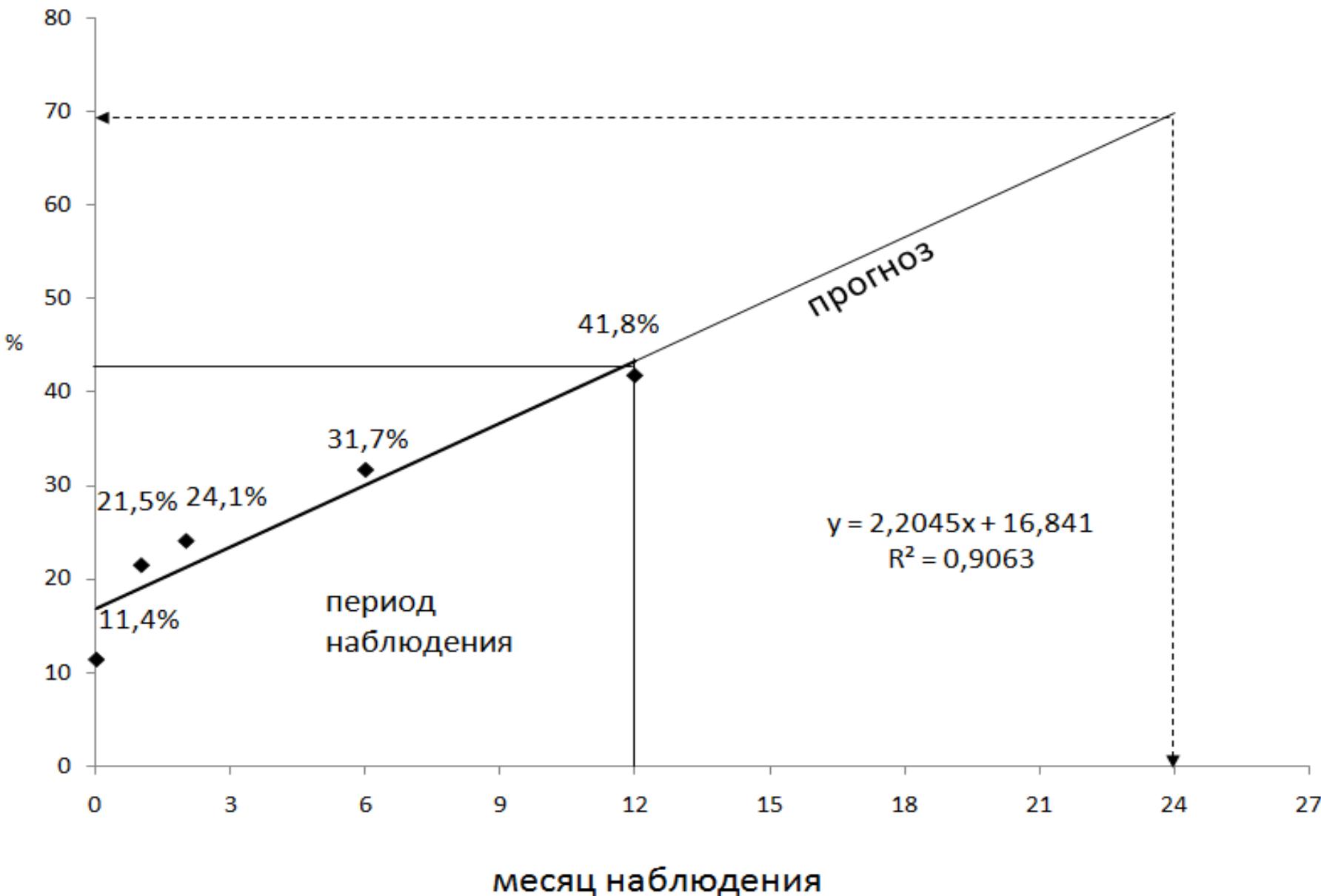
Для перорального применения — ксимелофибан, орбофибан, сибрафибан, лотрафибан и др. *Исследования не подтвердили клиническую эффективность этих препаратов.*



Эффективность антиагрегантных препаратов

- Препарат эффективен, доза адекватна → Продолжение терапии
- Препарат эффективен :
 - Чрезмерно
 - Недостаточно→ Коррекция дозы
- Препарат неэффективен → Коррекция терапии

Количество аспиринорезистентных пациентов в постгоспитальном периоде



Рекомендации по проведению мониторинга антиагрегантной терапии

- Отмена приема нестероидных противовоспалительных препаратов за 1,5 недели перед исследованием
- Исследование концентрации тромбоцитов в цельной крови перед выполнением агрегатограммы

Рекомендации по проведению мониторинга антиагрегантной терапии

Агрегатограмма выполняется:

- До начала терапии
- Через 3 дня после начала терапии
- 1 раз в месяц в первые 3 месяца
- 1 раз в 3 месяца в дальнейшем

Сосудисто-тромбоцитарный и плазменный (вторичный, окончательный) коагуляционный гемостаз тесно связаны друг с другом. Так, активированные тромбоциты ускоряют процесс свертывания, а продукты свертывания (например, тромбин) активируют тромбоциты.

2. Плазменный гемостаз

многоэтапный ферментативный процесс, в котором участвует ряд белков – протеаз, ионы кальция, а также неферментные белки-акцепторы, обеспечивающие взаимодействие факторов свертывания на фосфолипидных матрицах, конечным результатом которого является образование нерастворимого фибринового сгустка

2.1 Многоступенчатый этап условно состоящий из 2 путей «внутреннего» и «внешнего», приводящий к активации протромбина и превращения его в активный фермент – тромбин

2.2 Конечный этап, в котором под влиянием тромбина из фибриногена образуется фибрин

Внутренний путь

Внешний путь

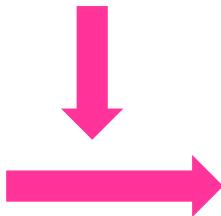
ПРОТРОМБИНАЗА

Протромбин

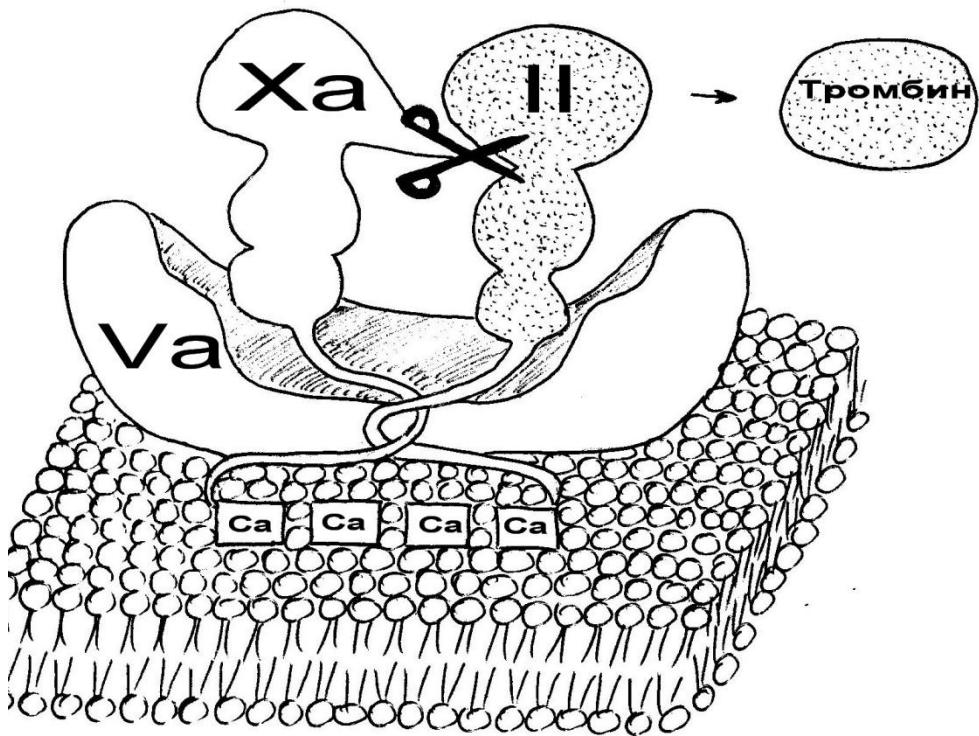
Тромбин

Фибриноген

Фибрин

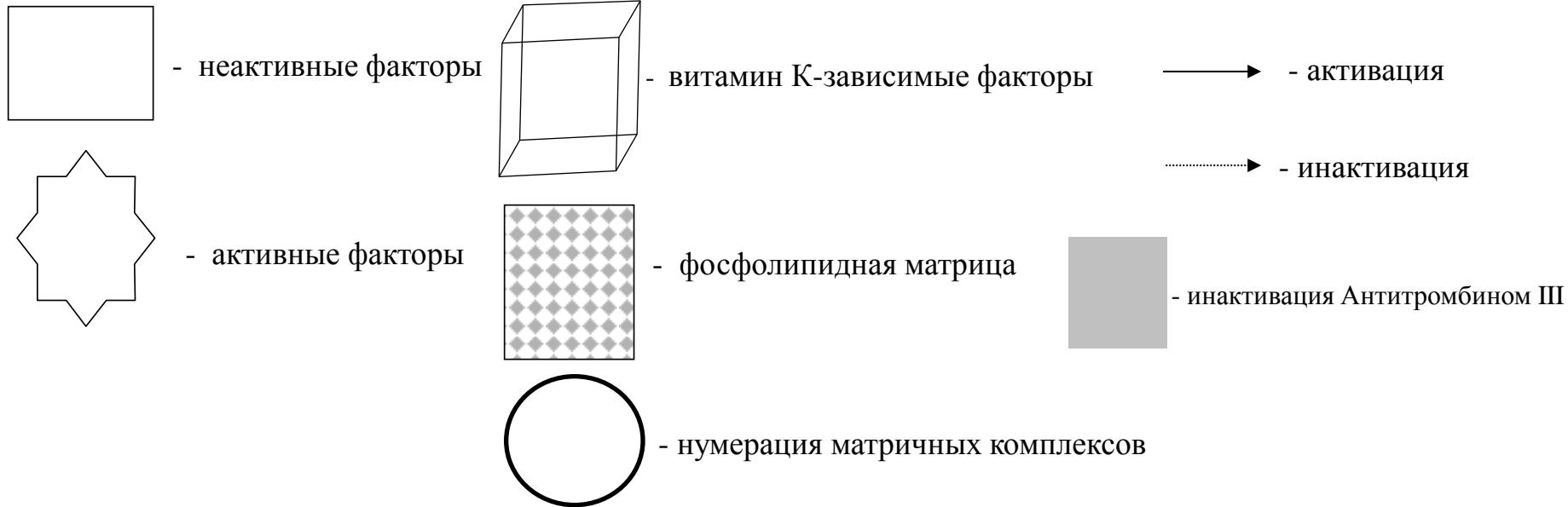


Протромбиназный комплекс

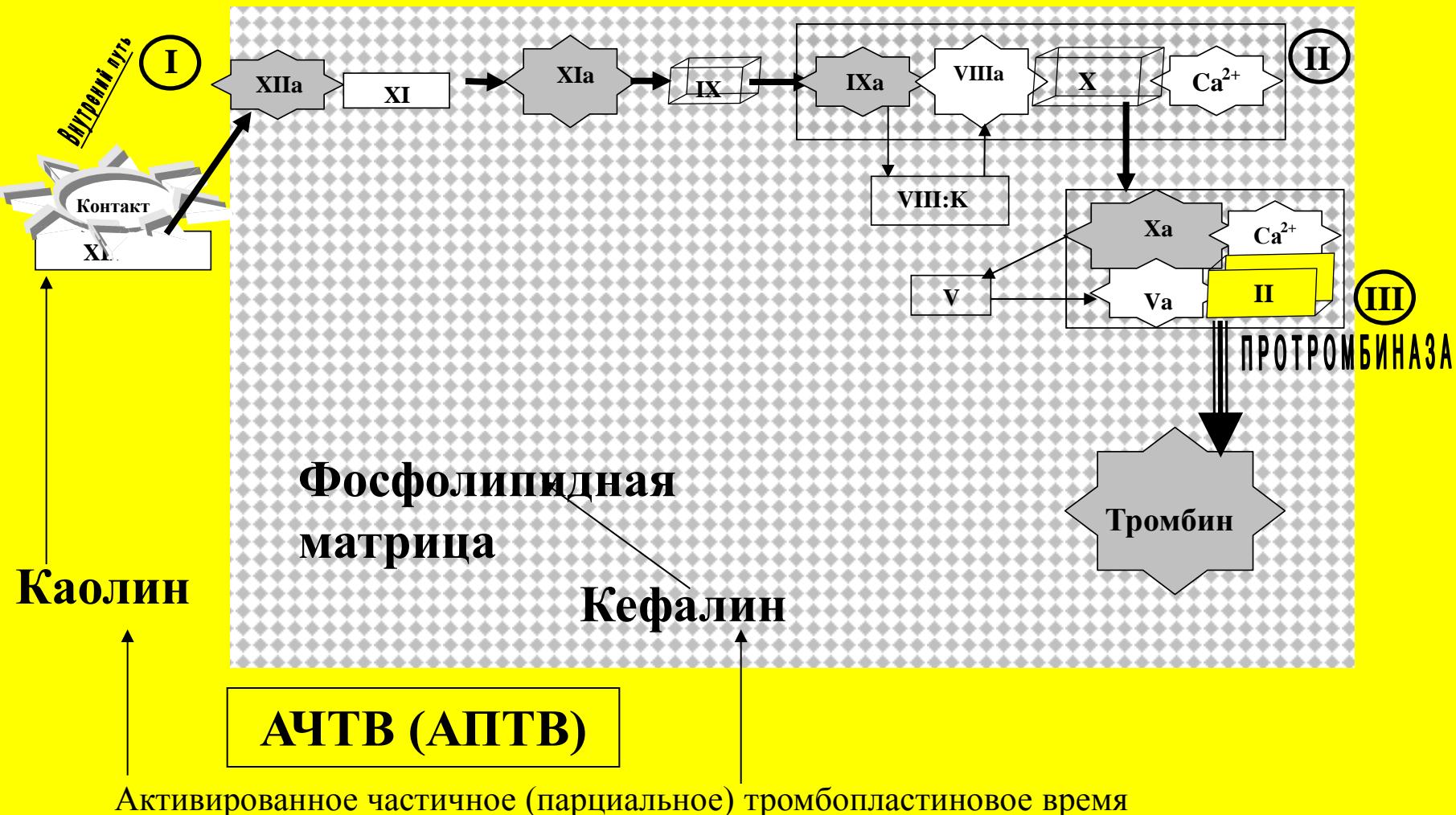


Результатом внешнего и внутреннего пути свертывания является образование активного протромбиназного комплекса, состоящего из ф. Р₃ (фосфолипидов-фосфолипопротеиновой матицы), ионов Са²⁺, ф.Ха и ф. Ва. Протромбиназный комплекс катализирует превращение **протромбина в тромбин** – ключевой фермент свертывания.

Каскадно-матричная схема функционирования плазменного звена коагуляции и ее взаимосвязей с основными компонентами системы гемостаза



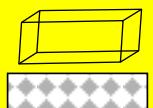
Внутренний путь
образования
протромбиназы



- неактивные факторы



- активные факторы



- витамин К-зависимые факторы



- фосфолипидная матрица



- нумерация матричных комплексов



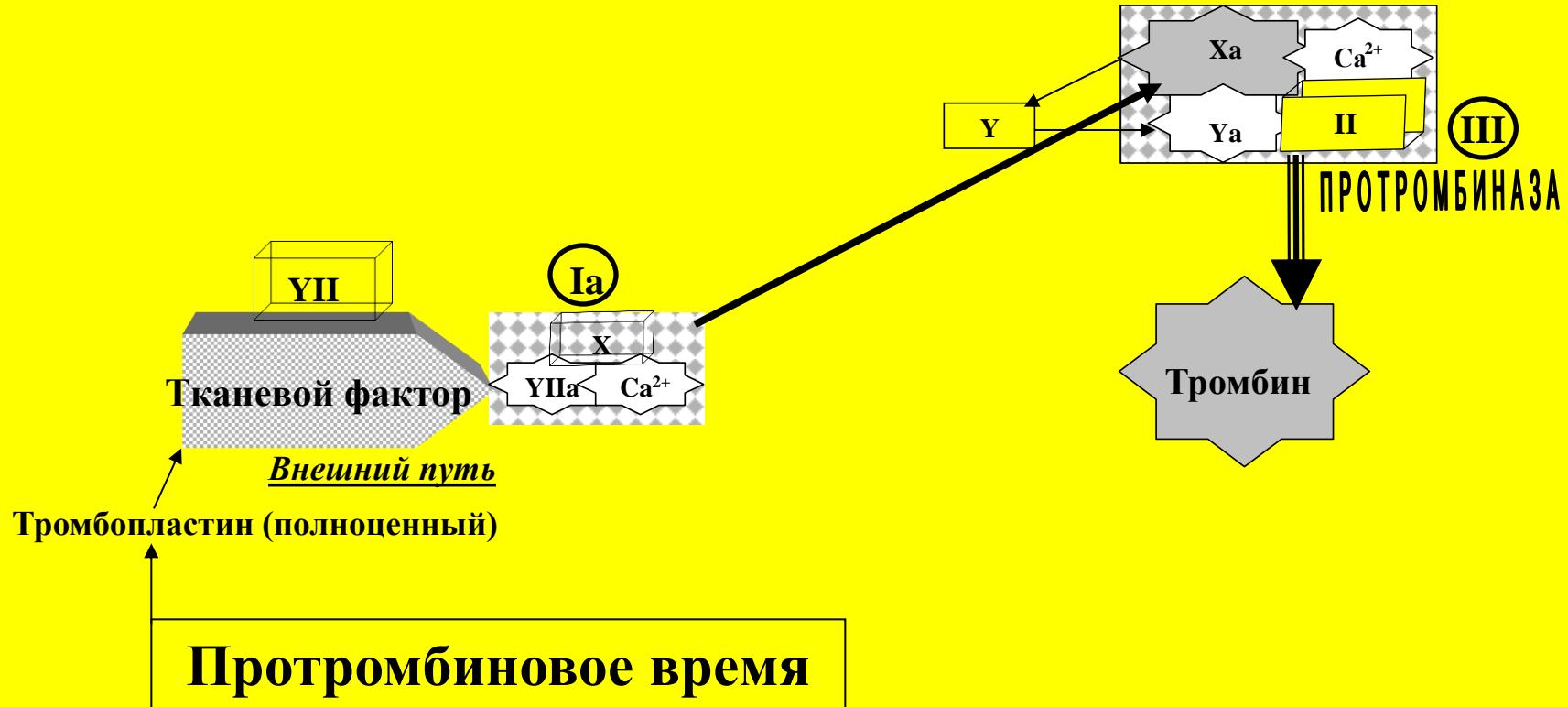
- активация



- инактивация

- инактивация Антитромбином III

Внешний путь
образования
протромбиназы



Каскадно-матричная схема функционирования плазменного звена коагуляции и ее взаимосвязей с основными компонентами системы гемостаза



- неактивные факторы



- активные факторы



- витамин К-зависимые факторы



- фосфолипидная матрица



- нумерация матричных комплексов



- активация



- инактивация



- инактивация Антитромбином III

Способы выражения протромбинового времени (ПВ)

1. ПВ в секундах

2. Протромбиновый индекс: (N 80-120%)

$$ПИ = \frac{ПВ\text{донора}}{ПВ\text{больного}} \times 100$$

3. ПВ по Квику (активность факторов протромбинового комплекса по кривой разведения донорской плазмы) N 70-110 %

4. Протромбиновое отношение: (N 0.8-1.2)

$$ПО = \frac{ПВ\text{больного}}{ПВ\text{донора}}$$

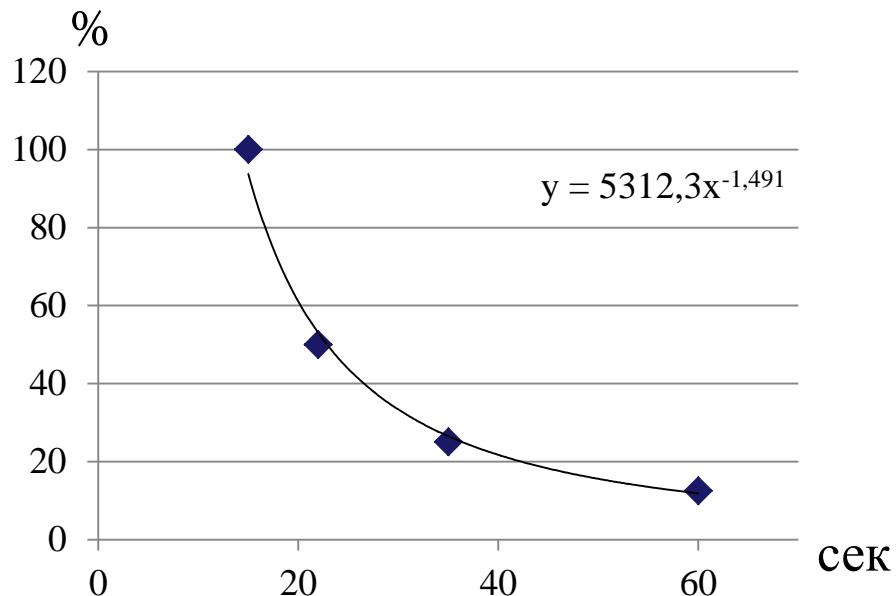
5. Международное Нормализованное Отношение: N 0.9-1.3

$$MНО = \left(\frac{ПВ\text{больного}}{ПВ\text{донорской} \cdot \text{пул-плазмы}} \right)^{\text{МИЧ}}$$

$$\text{ПВ}_{\text{донора}} = 15 \text{ с}$$

$$\text{ПВ}_1 = 13; \text{ ПВ}_2 = 17; \text{ ПВ}_3 = 23$$

Протромбин по Квику



$$\text{ПВ}_1 \text{ по Квику} = 115\%$$

$$\text{ПВ}_2 \text{ по Квику} = 77\%$$

$$\text{ПВ}_3 \text{ по Квику} = 49\%$$

Протромбиновый индекс

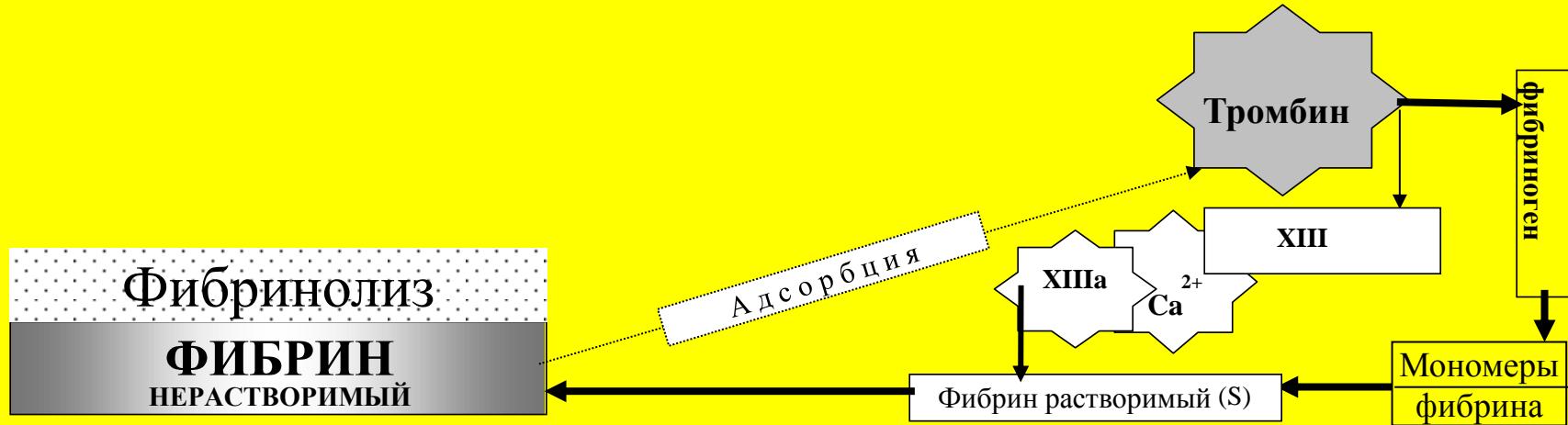
$$\text{ПТИ} = \frac{\text{ПВ донора}}{\text{ПВ больного}} \times 100\%$$

$$\text{ПТИ}_1 = 115\%$$

$$\text{ПТИ}_2 = 88\%$$

$$\text{ПТИ}_3 = 65\%$$

Конечный этап –
образование
фибрина



Каскадно-матричная схема функционирования плазменного звена коагуляции и ее взаимосвязей с основными компонентами системы гемостаза



- неактивные факторы



- активные факторы



- витамин К-зависимые факторы



- фосфолипидная матрица



- нумерация матричных комплексов



- активация

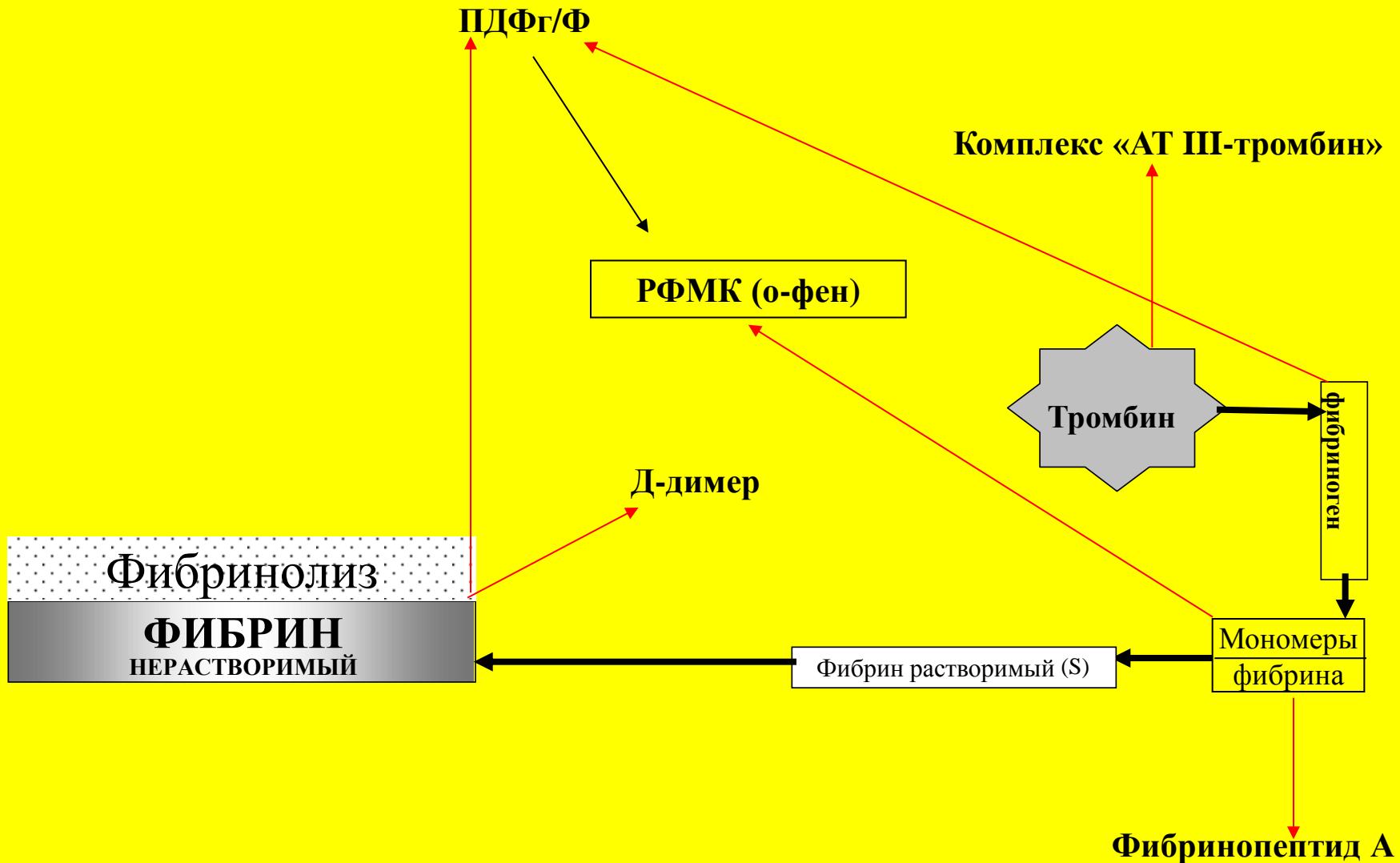


- инактивация



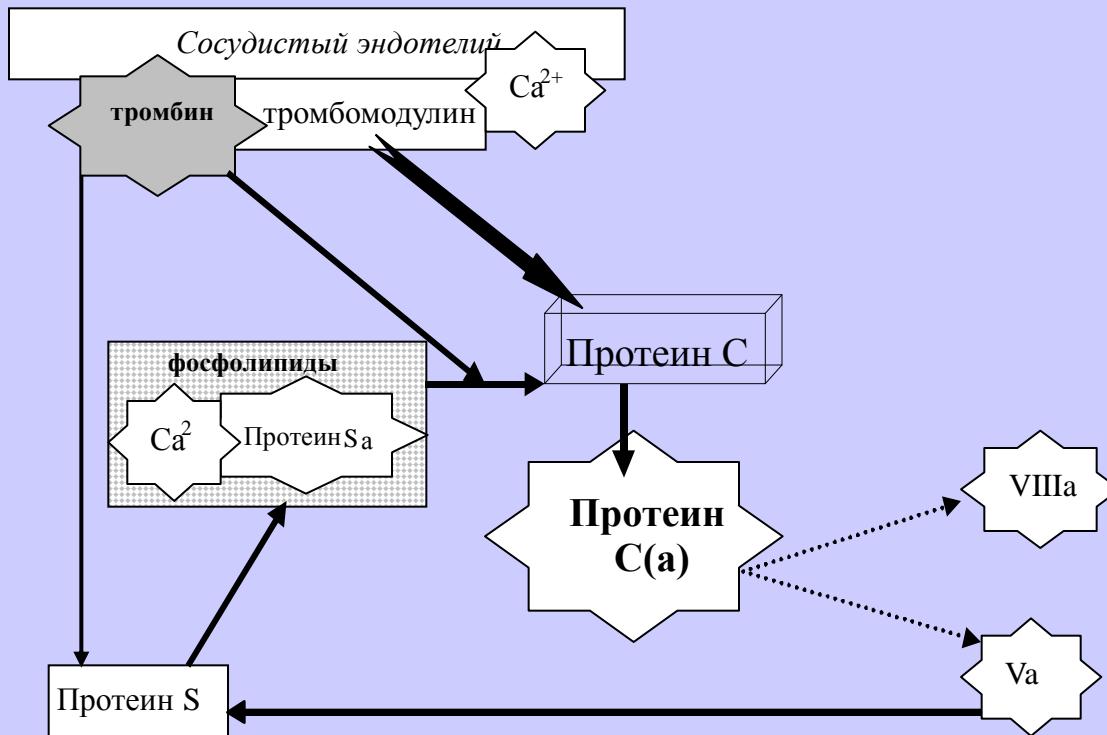
- инактивация Антитромбином III

ОСНОВНЫЕ МАРКЕРЫ ТРОМБИНЕМИИ



Естественные антикоагулянты

Система протеина С – быстро реагирующий АК



Функционирование системы протеина С



- неактивные факторы



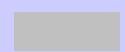
- активные факторы



- витамин К-зависимые факторы



- фосфолипидная матрица

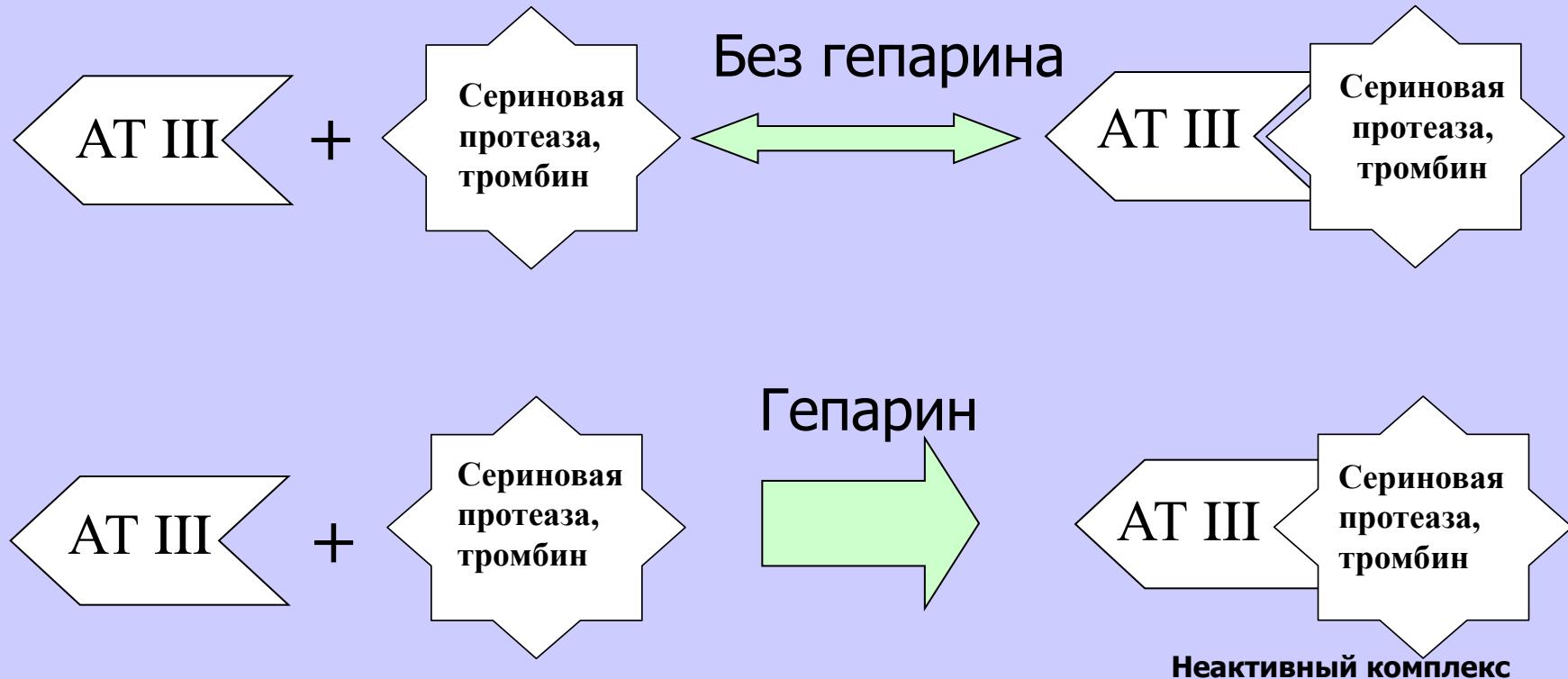


→ - активация

.....→ - инактивация

- инактивация Антитромбином III

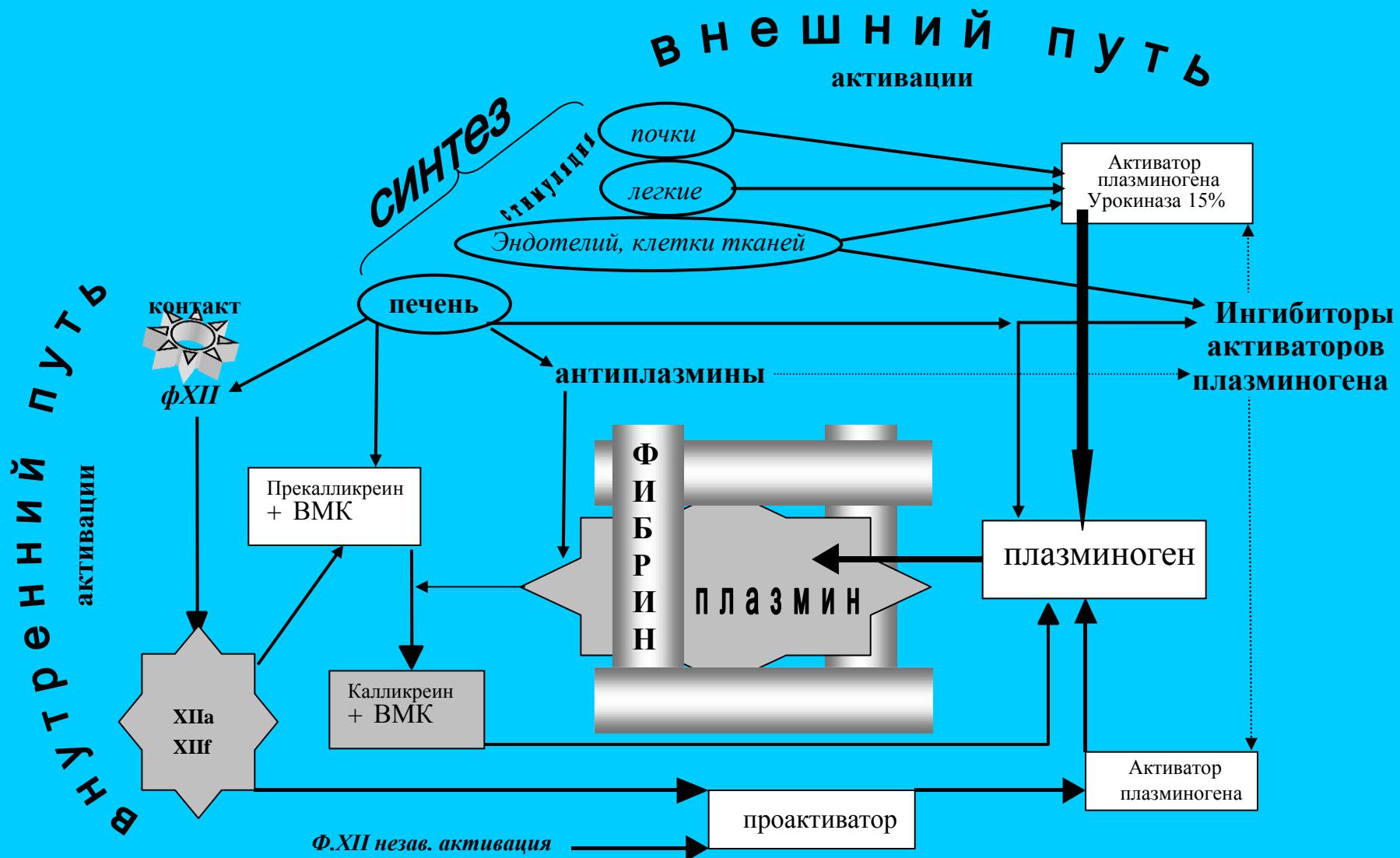
Антитромбин III – медленно реагирующий АК



На долю Антитромбина III приходится 75-90 % всей спонтанной антикоагулянтной активности крови.

АТ III образует комплексы с Xa, XIa, IXa, V, VIII факторами и тромбином - ПРОТЕАЗАМИ. В присутствии гепарина реакция ускоряется в 2000-3000 раз и становится необратимой.

Фибринолиз и антифибринолиз



**Функционирование
ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО и
АНТИФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО
звеньев гемостаза**

Суммарный средний индекс тромбогенности (ССИТ)

$$ITj = \frac{N}{A}$$

$$ITi = \frac{\sum ITj}{nj}$$

$$CCIT = \frac{\sum ITi}{ni}$$

N – средний показатель нормы

A – показатель больного

nj – количество показателей в данном звене гемостаза

ITi – индекс тромбогенности по данному звену

гипокоагуляция < 0,85-1,1 у.е. < гиперкоагуляция

