

ТЕМА 3. ЛАБОРАТОРНІ ТЕСТИ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗА ПАРАМЕТРАМИ ЗГОРТАЛЬНОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІЗМУ

Система гемостазу. Гемостаз

Система гемостазу – біологічна система, що забезпечує, з одного боку, збереження рідкого стану циркулюючої крові, а з іншого, – попередження і зупинку кровотеч, шляхом формування твердої пробки. Цей комплекс реакцій називають гемостазом. Компоненти гемостазу: клітинні фактори – судини і тромбоцити; гуморальні фактори – білки плазми крові. Виконання завдань гемостазу забезпечують функціональні системи, які формуються компонентами гемостазу. Це тромбоцитарно-судинна система, або система первинного гемостазу; система згортання крові або вторинного гемостазу; система фізіологічних антикоагулянтів; система фібринолізу.

2.1 Первинний або тромбоцитарно-судинний гемостаз

2.1.1 Судини: роль у гемостазі

Первинний гемостаз реалізується в судинах, діаметр яких менше 200 мкм. Ці судини формують мікроваскулярне русло, представлене капілярами. Загальна довжина капілярів в організмі людини становить більше двох довжин екватора (більше 100000 км). З внутрішньої сторони стінки капілярів вистелені клітинами ендотелію, з'єднаними між собою "міжклітинним цементом». Залежно від функціонального стану ендотелій судинної стінки має анти- і прокоагулянтні властивості.

Антикоагулянтні властивості проявляє неушкоджений ендотелій завдяки його здатності синтезувати і постійно продукувати:

- потужний інгібітор активації тромбоцитів простациклін, оксид азоту (NO) – синергіст простацикліну;

- ендотеліни – фактори, що розширюють судини і сповільнюють швидкість кровотоку;

- тканинний активатор плазміногену (t-PA);

- 13-гідроксіоктадекадієнову кислоту (13-HODE) – інгібітор експресії рецепторів адгезії на поверхні ендотеліальних клітин;

- тромбомодулін (TM) – мембранний глікопротеїн, що зв'язує тромбін;

- гепарин – інгібітор тромбіну і реакцій його утворення;

- інгібітор серинових протеаз НЕКСІН.

Ушкоджений ендотелій (травми, васкуліти, автоімунна патологія, гіпоксії, вірусні інфекції та ін.) проявляє прокоагулянтні властивості. Прокоагулянтна активність ендотелію визначається:

- втратаю, скиданням у кровотік тромбомодуліну;

- синтезом тканинного тромбопластину;

- синтезом і секрецією інгібітора тканинного активатора плазміногену (PAI-1);

- секрецією фактора Віллебранда – VIII: WF;

- колаген, що оголився при ушкодженні судинної стінки – потужний активатор тромбоцитів.

Фактор фон Віллебранда – глікопротеїн плазми крові, відіграє важливу роль у гемостазі. Фактор фон Віллебранда пов'язує субендотеліальний колагеновий матрикс і тромбоцитарний рецептор GP Іb-IX-V і, таким чином, забезпечує прикріплення тромбоцитів до ділянки ушкодженої судини. Крім цього, фактор фон Віллебранда є носієм фактора згортання крові VIII, стабілізує його структуру і доставляє до місця ушкодження.

2.1.2 Тромбоцити, роль у гемостазі

Тромбоцити утворюються в червоному кістковому мозку гігантськими поліплоїдними клітинами – мегакаріоцитами, від цитоплазми яких вони відщеплюються у вигляді округлих або овальних плоских дисків діаметром від 2 до 4 мкм. Тривалість життя тромбоцитів людини складає 7-10 днів. Після виходу з кісткового мозку вони циркулюють у крові і частково депонуються в селезінці та печінці (близько 20-25% усіх клітин), звідки походить їх вторинний вихід у кровообіг. У крові здорових людей міститься $170-350 \times 10^9$ /л тромбоцитів. Зменшення кількості тромбоцитів до 80×10^9 /л сприяє появі кровоточивості, ризик якої різко зростає при рівні нижче 20×10^9 /л, а збільшення вище 800×10^9 /л створює загрозу розвитку тромбозів. Участь тромбоцитів у гемостазі визначається такими притаманними їм функціями: ангіотрофічна – здатністю підтримувати нормальну структуру і функцію стінок мікросудин, в тому числі життєздатність і репарацію ендотеліальних клітин; здатністю підтримувати спазм ушкоджених судин шляхом секреції (вивільнення) вазоактивних речовин – серотоніну, катехоламінів, що містяться в щільних гранулах тромбоцитів; здатністю утворювати в місці ушкодження судини тромбоцитарної пробки, що забезпечується процесами адгезії до субендотелію окремих клітин та агрегатів; участю тромбоцитарних факторів у процесі згортання крові та регуляції фібринолізу; стимуляцією процесу репарації судинної стінки в місці її ушкодження фактором зростання тромбоцитів (ФЗТ)

– цитокіном, стимулюючим розмноження і переміщення гладком'язових клітин та ендотелію, утворення колагену.

Тромбоцити – без'ядерні клітини, в гіалоплазмі яких міститься два типи гранул, вміст яких відображено у табл. 2.1.1.

Таблиця 2.1.1 – Компоненти гранул тромбоцитів

-гранули (електронно- щільні)	α-гранули	
	Компонент (Р)	Функція
АДФ – активатор тромбоцитів	Тромбоцитарний фактор активзації росту	Репарація за рахунок активності ділення фібробластів
	Трансформуючий фактор	Контроль репарації тканин

	росту (ТФР-)	
Ca ²⁺ -активація тромбоцитів	Тромбоцитарний фактор 4 (ТФ4)	Нейтралізація гепарину
Mg ²⁺ -активація тромбоцитів	-тромбоглобулін (-ТГ)	Запалення, репарація тканини
	Фактор Віллебранда (ФВ)	Адгезія тромбоцитів, носій ф. VIII
	Тромбоспондіни (TSP-1, TSP- 2)*	Адгезія та агрегація тромбоцитів
Серотонін дилатація артеріол	Фібриноген	Згортання крові, адгезія та агрегація тромбоцитів
	Фактор V	Згортання крові
Адреналін – спазм ушкодженої судини	Протеїн S	Антикоагулянт
ДОФА спазм ушкодженої судини	Альбумін	Зв'язування гормонів, токсинів, ліків
	Імуноглобуліни	Регуляція імунної відповіді

*Тромбоспондин (TSP-1) – глікопротеїд з м.м. 165 кДа. Найбільша кількість TSP-1 представлена в α -гранулах тромбоцитів і секретується в плазму

відповідь на їх активацію гормонами і цитокінами. Відомо безліч біологічних реакцій, ініційованих TSP-1: ангіогенез, апоптоз, регуляція імунної відповіді. TSP-1 утворює комплекси з колагеном, гепарином, опосередковує адгезію тромбоцитів до субендотелія.

**Тромбоспондин-2 (TSP-2) – білок сімейства тромбоспондинів з м.м. 150 кДа. Аналогічно TSP-1, він викликає безліч біологічних реакцій: проліферацію, агрегацію,

клітинну рухливість, ангиогенез, загоєння ран. TSP-2 регулює формування колагенового матриксу, впливаючи на функцію фібробластів. Також TSP-2 забезпечує взаємодію клітин з екстрацелюлярним матриксом, що можна віднести до його основної функції.

усіх перерахованих факторів специфічними для гранул тромбоцитів є два: ТФ4 – антигепариновий фактор, і β -тромбоглобулін, визначення яких у плазмі крові використовують як ранні надійні маркери активації тромбоцитів. Регуляція функцій тромбоцитів здійснюється як і всіх клітин організму, шляхом взаємодії сигнальних молекул (лігандів) з рецепторами їх мембран – глікопротеїдами (табл. 2.1.2).

Таблиця 2.1.2 – Рецептори тромбоцитів та їх ліганди

Рецептор	Ліганди	
	Первинні	Вторинні
GP IIb-IIIa	Фібриноген	Фактор Віллебранда, фібронектин, вітронектин, фібриноген
GP Ib-IX	Фактор Віллебранда	Тромбін
GP Ia-IIa	Колаген	
GP Ic-IIa	Фібронектин *	
Рецептор вітронектину	Вітронектин **	Тромбоспондин

Фібронектин (ФН) – глікопротеїн з високою м.м., що складається з двох практично ідентичних поліпептидних ланцюгів (кожна по 220 кДа). Він синтезується і секретується печінкою, нормальна концентрація циркулюючого ФН в кровотоці становить приблизно 330 мкг/мл плазми. ФН належить до сімейства адгезивних білків позаклітинного матриксу. Димерна структура дозволяє йому функціонувати як молекулярний клей, що з'єднує різні молекули завдяки його зв'язуючим доменам, що зв'язують. Плазмовий ФН виконує важливу роль у запальних, регенеративних процесах і механізмах гемостазу.

Вітронектин (ВН) – поліфункціональний глікопротеїн (м.м. 78 кДа), компонент крові та позаклітинного матриксу, виконує функції, аналогічні ФН. ВН синтезується в печінці, нормальна концентрація в плазмі складає 250-450 мкг/мл. ВН взаємодіє з комплементом, гепарином, комплексом тромбін-антитромбін.

Фізіологічна активація тромбоцитів ініціюється тільки при ушкодженні судинного ендотелію й оголенні субендотеліального позаклітинного матриксу. Першою ініціюється адгезія тромбоцитів. З рецептором GP Ib-IX специфічно зв'язується фактор Віллебранда, який другою ділянкою зв'язується з GP IIb-IIIa тромбоцитарної мембрани. Субендотеліальний колаген зв'язується з мембранним рецептором GP Ia-IIa. Адгезія ініціює активацію тромбоцитів, яка виражається в істотній зміні їх форми, незворотній дегрануляції α -гранул, агрегації тромбоцитів з утворенням гемостатичної тромбоцитарної пробки.

Активация тромбоцитов приводит до конформационных изменений GP IIb-IIIa, с которым связывается фибриноген, та утворює містки між тромбоцитами, формуючи агрегати. Комплекс ліганд-рецептор ініціює трансдукцію сигналу в клітині з утворенням других посередників (месенджерів): діацилгліцеролу (ДАГ), інозитолтрифосфату (ІФ3) і підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . Другі посередники активують відповідні протеїнази, які ініціюють реакції фосфорилювання/дефосфорилювання і зміну метаболізму тромбоцитів. У мембранах активованих тромбоцитів з арахідонової кислоти синтезується і надходить у мікрооточення тромбоксан А2 і фактор активації тромбоцитів (ФАТ). Обидві сполуки є потужними активаторами тромбоцитів та їх агрегації. Звільнення з гранул факторів вторинного гемостазу визначає локальне утворення тромбіну і формування ниток фібрину на поверхні агрегатів тромбоцитів, що адгезуються. Процес формування первинного тромбу, пробки в місці ушкодження судини, займає проміжок часу від 30 секунд до 3 хвилин. В умовах норми процес "установки латок" на судинах мікроциркуляторного русла здійснюється постійно, але маркери активації тромбоцитарно-судинного гемостазу в кровотоці не визначаються, оскільки процес активації носить локальний характер, обумовлений нейтралізуючою дією антикоагулянтних факторів неушкодженого ендотелію. Мембрани активованих тромбоцитів, пластинковий фактор 3 (Зпф) виконують функцію фосфоліпідної матриці, обов'язкової складової молекулярної машини активації гуморальних факторів внутрішнього і загального шляху згортання крові. Тромбоцити забезпечують поверхні для збірки та активації комплексів згортання й генерації тромбіну. Тромбін перетворює фібриноген у фібрин. Нитки фібрину пов'язують агреговані тромбоцити, забезпечуючи формування гемостатичного тромбу, який не змивається потоком крові. Отже, для реалізації первинного гемостазу необхідні субендотеліальні стінки судин, тромбоцити та два глікопротеїни плазми: фібриноген і фактор Віллебранда, які також представлені на тромбоцитах. У нормі кровотеча з дрібних судин припиняється не більше ніж через 5 хвилин.

Контрольні питання

Роль ендотелію судин у гемостазі: про- та антикоагулянтні властивості ендотелію судин.

Що являють собою тромбоцити?

Склад гранул тромбоцитів.

Рецептори тромбоцитів та їхня функція.

Назвіть ліганди рецепторів тромбоцитів.

Послідовність формування тромбоцитарного тромбу.

Зворотні та незворотні реакції при утворенні первинного тромбу.

Первинний гемостаз – це що, назвіть складові тромбоцитарно-судинного гемостазу?

2.2 Вторинний або коагуляційний гемостаз

Постійна гемостатична пробка, вторинний тромб, формується при утворенні тромбіну в процесі активації каскаду зсідання крові. Тромбін відіграє визначальну роль у виникненні, зростанні та локалізації тромбу. Він викликає необоротну агрегацію

тромбоцитів і відкладення фібрину на тромбоцитарних агрегатах у місці судинної травми. Фібрин-тромбоцитарна сіточка є морфологічним бар'єром, який запобігає витіканню крові із судини та ініціює процес репарації тканини. Активація системи згортання крові – приклад каскаду посилення сигналу з одночасною активацією та інгібуванням багатьох ферментів. Це біологічний каскад взаємозв'язаних реакцій, що протікають у складі комплексів на поверхні фосфоліпідних мембран при участі протеолітичних ферментів та їх кофакторів.

Фосфоліпідна мембрана виконує функцію матриці, що забезпечує зближення, необхідну орієнтацію та оптимальне співвідношення фермент/субстрат/кофактор і, як наслідок, прискорення реакції активації на 4-6 порядків в порівнянні зі швидкістю її протікання в розчині. На кожному ступені каскаду попередник (профермент, неактивний фактор, субстрат) перетворюється на відповідну серинову протеазу, яка каталізує перетворення наступного проферменту (свого субстрату) у серинову протеазу, наступну в каскаді згортання. На цій підставі систему згортання крові називають каскадно-комплексною з посиленням сигналу на виході.

2.2.1 Компоненти вторинного гемостазу

При ушкодженні крупних кровоносних судин зупинка кровотечі здійснюється активацією коагуляційного або вторинного гемостазу. В реакціях коагуляції беруть участь проферменти, кофактори, фосфоліпіди, іони кальцію. Більшість білків, що беруть участь у коагуляції, є проферменти (позначаються римськими цифрами). Їх активація здійснюється з використанням принципів молекулярної машини шляхом обмеженого протеолізу в складі комплексів, що включають фосфоліпіди (матриця), профермент, кофактор і фермент, іони Ca^{2+} .

2.2.1.1 Плазмові фактори

Особливість плазмових факторів – у фізіологічних умовах циркулюють у крові як проферменти. При ініціації згортання крові послідовно активуються у ферменти з утворення активного тромбіну та нерозчинного фібрину.

I, фібриноген – попередник фібрину.

II, протромбін – попередник тромбіну, який конвертує фібриноген у фібрин, активує фактори V, VIII, XI та XIII, зв'язується з тромбомодуліном для активації протеїну C. Вітамін K-залежний.

V – проакцелерін. Активується у фактор Va – кофактор ферменту Xa , який у комплексі Xa/Va /фосфоліпіди конвертує протромбін в тромбін. Присутній в α -гранулах тромбоцитів. Фактор Va інактивується активованим протеїном C в комплексі з білком S. Вітамін K-залежний.

VII – проконвертин. Зв'язується з тканинним фактором (TF) і конвертується в активну форму. Комплекс VIIa/TF активує IX та X фактори. Вітамін K-залежний.

VIII – антигемофільний глобулін. В активній формі VIIIa виконує роль кофактора ферменту IXa. Комплекс IXa/VIIIa/фосфоліпіди активує фактор X. Фактор VIIIa інактивується активованим протеїном C в комплексі з білком S (як фактор Va). Це великий білок кофактор (як фактор V). Циркулює в плазмі пов'язаним з мультимером фактора Віллебранда.

IX – Кристмас-фактор, антигемофільний фактор В, плазмовий компонент тромбопластину. Активна форма фактора IXa, як фермент він включається в комплекс IXa/VIIIa/фосфоліпід, активуючий фактор X. Вітамін К-залежний.

X – фактор Стюарта-Прауера. Активна форма фактора Xa, який є ферментом, у складі комплексу Xa/Va/фосфоліпід розщеплює протромбін до тромбіну. Вітамін К-залежний.

XI – плазмовий попередник тромбопластину. Активна форма фактора XIa, який активує фактор IX, в реакції потрібні іони Ca²⁺.

Прекалікреїн – фактор Флетчера. Активується фактором XIIa в калікреїн. Як калікреїн каталізує подальшу активацію фактора XII у фактор XIIa. Циркулює як макромолекулярний комплекс із ВМК.

Високомолекулярний кініноген (ВМК) – фактор Фіцджеральда-Фложе. Циркулює як бімолекулярний комплекс з прекалікреїном. Кофактор контактної активації калікреїну й активації фактора XII, необхідний кофактор XIIa в активації XI, попередник брадикініну, потужного судинорозширювача та індуктора скорочення гладеньких м'язів.

XII – фактор Хагемуна. Активується на контактній поверхні у фактор XIIa, активує прекалікреїн в калікреїн і фактор XI у фактор XIa – тригери внутрішнього шляху згортання крові *in vitro*.

XIII – фібринстабілізуючий фактор (фібриназа). При активації тромбіном каталізує утворення пептидних зв'язків між сусідніми мономерами фібрину, що сприяє зміцненню і стабілізації фібринового згустка.

Протеїн С. Активується тромбіном, пов'язаним із тромбомодуліном, у присутності білка S і фосфоліпідів як кофакторів, розщеплює VIIIa і Va, перешкоджаючи, таким чином, утворенню тромбіну. Вітамін К-залежний.

Протеїн S. Циркулює в плазмі як вільний білок S і як білок S, пов'язаний з C4b – білком системи комплементу. Функціонує у вільній формі і як кофактор активованого протеїну С. Вітамін К-залежний.

Протеїн Z. Не має ферментативної активності, структурно пов'язаний карбоксиглутаматними залишками декількох серинових протеаз каскаду згортання: фактори VII, IX і X (які вимагають вітамін К). Мабуть, основна роль білка Z – деградація фактора Xa. Білок Z пов'язує інгібітор протеази Xa фактора. Дані про роль у гемостазі суперечливі.

Тромбомодулін (ТМ). Поверхневий глікопротеїн ендотеліальних клітин, пов'язує тромбін; у комплексі тромбін-ТМ тромбін втрачає активність, але пов'язується з протеїном С і активує його.

2.2.1.2 Фосфоліпідні фактори

Тканинний фактор (TF) або тканинний тромбопластин. Це ліпопротеїд, який конститутивно присутній на мембрані клітин певних тканин, у тому числі периваскулярних фібробластів, клітинах граничного епітелію (наприклад, в епітеліальних клітинах шкіри, амніону, ШКТ, а також гліальних клітинах нервової системи). При патологічних станах може експресуватись на активованих моноцитах, макрофагах та активованому ендотелію судин. Присутній на деяких пухлинних клітинах. Пов'язує фактор VII, який ініціює зовнішній шлях згортання.

Прокоагулянтні фосфоліпіди – кислі фосфоліпіди (в першу чергу фосфатиділсерин), представлені на поверхні активованих тромбоцитів та інших клітин тканин. Є складовою частиною комплексів IXa/VIIIa/фосфоліпід – активатора фактора X і Xa/Va/фосфоліпід – активатора протромбіну. Функціонують як ліпідна частина тканинної тромбопластину.

2.2.2 Реакції зовнішнього шляху активації коагуляційного гемостазу Зовнішній шлях (extrinsic pathway) згортання крові ініціюється ушкодженням судини, контактом фактора VII з фосфоліпідною мембраною клітин тканини ушкодженої судини – з тканинним фактором (TF, III фактор).

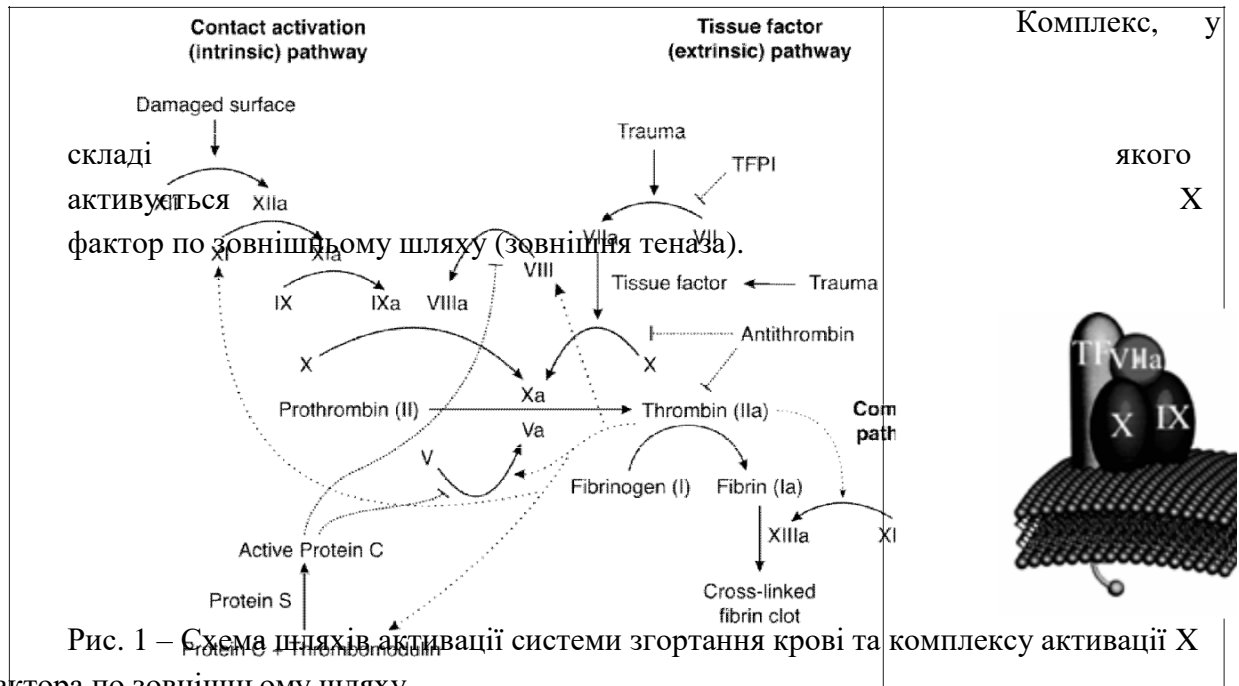


Рис. 1 – Схема шляхів активації системи згортання крові та комплексу активації X фактора по зовнішньому шляху

Схема послідовності реакцій зовнішнього шляху згортання відображена на рис. 1. На поверхні TF за участю іонів Ca^{2+} формується комплекс TF/VIIa/X/IX, у складі якого безпосередньо активується X в Xa і IX в IXa (рис. 1). Одночасно із зовнішнім шляхом активації Xa ініціюється активація внутрішнього шляху.

2.2.3 Реакції внутрішнього шляху активації коагуляційного гемостазу Внутрішнім шлях (intrinsic pathway) названий тому, що тригером його активації є початкове присутній у крові фактор (рис. 1). Внутрішній шлях включає VIII, IX, X, XI та XII фактори згортання крові, прекаліккреїн (ПК) і ВМК, а також іони кальцію. Кожна з цих складових шляху необхідна для перетворення фактора X у фактор Xa.

даний час розглядаються три моделі ініціації активації внутрішнього шляху. У відповідності з першою моделлю, реакції контактної фази активації внутрішнього шляху включають контакт прекаліккреїну, ВМК, фактора XI і XII

негативно зарядженою поверхнею фосфоліпідів циркулюючих хіломікронів, ЛДНЦ та окисленими ЛПНЦ.

При контакті плазми з негативно зарядженою поверхнею ліпідів XII фактор пов'язується з нею і автоактивується в XIIa. Фактор XIIa потім активує прекаліккреїн в

калікреїн. Калікреїн взаємно активує фактор XII. Реальна поверхня, що визначає автоактивацію фактора XIIa, невідома, однак цей процес підтримують гемутин, жирні кислоти, кристали уратів, протопорфирин, гепарин, хондроїтин сульфати суглобового хряща, ендотоксин, L-гомоцистеїн і β -амілоїдні білки. Контактна активація калікреїнової системи ініціює наступну фазу активації внутрішнього шляху. Активована молекула фактора Хагемуна (XIIa) перетворює фактор XI в XIa. У цій реакції бере участь калікреїн, який також активується фактором XIa. У свою чергу, фактор XIa активує фактор IX. Фактор IXa формує комплекс на *фосфоліпідних мембранах активних тромбоцитів*, який включає фермент Ха, кофактор VIIa, субстрат – X фактор – внутрішня теназа. Внутрішня теназа (рис. 2) в 50-100 разів активніше зовнішньої.



Рис. 2 – Комплекс активації X фактора по внутрішньому шляху (внутрішня теназа). У складі комплексу ендопептидаза IXa перетворює фактор X в його активовану форму.

Відповідно з другою моделлю, першою реакцією внутрішнього шляху є контактна активація XIIa. Друга модель згортання крові розглядає участь ВМК та прекалікреїну у активації не згортання крові, а фібринолізу.

Відповідно до третьої моделі активація XI фактора здійснюється тромбіном, який утворюється при активації зовнішнього шляху.

2.2.4 Реакції загального шляху активації коагуляційного гемостазу Утворення Ха (зовнішній та внутрішній шляхи) індукує збірку

наступного у каскаді комплексу – фермент Ха, кофермент – Va, субстрат – фактор II, фосфоліпідна матриця – мембрани активованих тромбоцитів, іони Ca^{2+} (рис. 3). Продукт цього комплексу – тромбін.

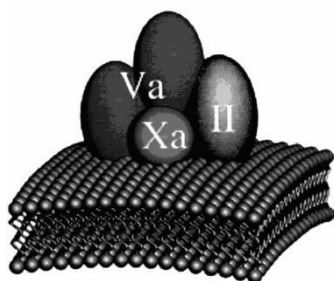


Рис. 3 – Комплекс активації II фактора, протромбіна.

У сучасній моделі згортання крові підкреслюється той факт, що для активації X фактора по зовнішньому шляху *необхідні фосфоліпіди клітинних мембран*, тканинний фактор; комплекс Ха/Va/II/ формується тільки на *мембранах активованих тромбоцитів*,

тобто тромбоцитарному тромбопластині. Час утворення тромбіну за зовнішнім шляхом – до 5 секунд. Слідові кількості тромбіну як серинової протеази з відносною субстратною специфічністю активують шляхом обмеженого протеолізу коферменти V і VIII; проферменти XI, IX і XIII.

початковому періоді активації згортання крові тромбін утворюється з відносно низькою швидкістю, потім у процесі настає перелом, і його швидкість різко зростає. Відповідно, в утворенні тромбіну виділяють дві фази – ініціації і поширення (тромбіновий спалах). Причому ці фази забезпечуються різними факторами й регулюються різними інгібіторами. Фаза ініціації забезпечується теназою зовнішнього шляху, а її основним регулятором є інгібітор шляху тканинного фактора. Фаза поширення забезпечується теназою внутрішнього шляху, її основними регуляторами є антитромбін III і протеїн C.

При згортанні крові *in vitro* утворення фібрину (згустка) відбувається приблизно в точці переходу фази ініціації у фазу поширення, коли кількість утвореного тромбіну складає ~ 5% від максимального. Додатковий тромбін, який утворюється вже після згортання фібриногену, відіграє важливу роль у стабілізації тромбів. Дефіцит факторів VIII і IX (гемофілія A або B), що визначають фазу поширення утворення тромбіну, пов'язаний із кровоточивістю,

дефіцит інгібіторів, що обмежують дію антитромбіну III або системи протеїну C, підвищує ризик тромбозів.

Перетворення фібриногену у фібрин. Специфічним субстратом тромбіну є фібриноген. Це глікопротеїн з м.м. 340 кДа. Циркулює в плазмі в концентрації ~ 2-4г/л, період напіврозпаду 4 дні, швидкість катаболізму ~ 25%. Молекула фібриногену – гексамери, що складається з трьох парних поліпептидних ланцюгів (A α , B β , γ). Синтезується в гепатоцитах під контролем трьох різних генів.

Фібриноген має доменну структуру: центральний E-домен (N-кінці трьох поліпептидів) і два D-домени (C-кінці трьох поліпептидів). Фібриноген – субстрат для утворення згустка фібрину; забезпечує агрегацію та адгезію тромбоцитів; відіграє важливу роль в загоєнні ран. У молекулі фібриногену є сайти зв'язування тромбіну, фактора XIII, тканинного активатора плазміну (ТАП), α 2-антиплазміну і сайт зв'язування тромбоцитів. Тромбін, зв'язуючись з фібриногеном, відщеплює з N-кінця 2A і 2B пептиди, залишок молекули – фібрин мономери. Фібрин мономери спонтанно полімеризуються шляхом комплементарного нековалентно зв'язування D-домену (γ ланцюга) однієї молекули з центральним E-доменом (α - і β -) сусідніх фібрин мономерів, формуючи фібринову мережу як за рахунок поздовжніх, так і суміжних комплементарних взаємодій. Продукт спонтанної полімеризації фібрин мономерів – розчинний фібрин. Фактор XIIIа каталізує утворення ковалентних пептидних зв'язків між γ - γ , γ - α та α - α ланцюгами. Продукт цієї реакції – нерозчинний фібрин – основа постійного тромбу. Клітинною складовою тромбу є тромбоцити. Вони залучені в тромб, оскільки генерація тромбіну відбувається на тромбоцитах і фібрин має сайти зв'язування тромбоцитів. Тромб закриває місце ушкодження судини. Формування тромбу по зовнішньому шляху займає 12-20 секунд, по внутрішньому – 4-10 хвилин. Згусток фібрину, що утворився, стискається, ретрагує. Ретракція тромбу забезпечується скорочувальним білком тромбоцитів тромбостенином і залежить від концентрації фібриногену. Ступінь ретракції визначає гемостатичні

властивості тромбу. Вже через 2 – 3 години згусток стискається до 25-50% від свого початкового обсягу.

Контрольні питання

Назвіть компоненти, що беруть участь у вторинному гемостазі.

Зовнішній шлях утворення тромбіну.

Внутрішній шлях утворення тромбіну.

Яка роль фосфоліпідних мембран в активації вторинного гемостазу?

Назвіть склад комплексів, утворення яких забезпечує активацію системи згортання крові.

Фази згортання крові і фактори, що приймають у них участь.

Послідовність реакцій перетворення фібриногену у фібрин під дією тромбіну та фібрин стабілізуючого фактора.

2.3 Система фізіологічних антикоагулянтів

Коагуляційний потенціал крові надзвичайно високий. Рідкий стан крові забезпечується балансом факторів системи згортання крові/система фізіологічних антикоагулянтів + система фібринолізу. Життєво важливо, щоб формування гемостатичного тромбу обмежувалося тільки областю ушкодженої судини. В умовах норми це досягається одночасним включенням як механізмів активації згортання крові, так і його блокування. Плазмові фактори, що попереджують та обмежують процес згортання крові, називають антикоагулянтами. Їх сукупність формує систему антикоагулянтів.

Одна група антикоагулянтів завжди присутня в крові (первинні антикоагулянти), інші утворюються як продукти процесу згортання крові (вторинні антикоагулянти). Первинні антикоагулянти включають інгібітор шляху тканинного фактора, систему протеїну С і антитромбін ІІІ.

Інгібітор шляху тканинного фактора (ТФРІ). ТФРІ – головний інгібітор, блокуючий гіперактивацію системи гемостазу при підвищених концентраціях тканинного фактора (фактор ІІІ, ТФ). ТФРІ циркулює в плазмі у вигляді комплексу з ліпопротеїдами низької та високої щільності. Близько 10% ТФРІ знаходиться в тромбоцитах, при активації їх тромбіном ТФРІ вивільняється в плазму. Тому при агрегації тромбоцитів рівень ТФРІ підвищується. ТФРІ інгібує активацію VII і X факторів. Крім того, завдяки властивостям С-кінцевого фрагмента ТФРІ з високим ступенем афінності взаємодіє з гепарином, що дозволяє йому додатково ефективно інгібувати фактор Ха.

Система протеїну С. Головний інгібітор процесів коагуляції по внутрішньому шляху – система протеїну С, в яку входять: протеїн С, тромбомодулін на мембранах ендотелію капілярів і протеїн S. Протеїн С – глікопротеїн з м.м. 62 кДа. К-залежний синтез протеїну С у вигляді зимогену здійснюється в гепатоцитах. Концентрація у здорової людини становить 230 ± 140 нг/мл. Приблизно у 10% пацієнтів, схильних до тромбозів, концентрація протеїну С значно знижена. Спадковий гетерозиготний дефіцит протеїну С

асоційований з підвищеним ризиком тромбозу вен, а загальна гомозиготна недостатність цього білка виявлена у новонароджених із швидкоплинною формою геморагічного васкуліту – хвороби Шенлейна-Геноха.

Реалізується антикоагулянтна активність системи протеїну С таким чином. При утворенні тромбіну в системі капілярів він з високим ступенем афінності зв'язується тромбомодуліном, втрачає прокоагулянтну активність і набуває здатність пов'язувати зимоген протеїну С та активувати його. Кофактор ферменту протеїну С – протеїн S, специфічні субстрати – фактори Va і VIIIa. Розщеплення VIIIa критично знижує активацію Ха по внутрішньому шляху, а протеоліз Va – генерацію тромбіну з протромбіну. Активованій протеїн С розщеплює інгібітори тканинного активатора плазміногену (ПАІ-1), сприяючи таким чином активації плазміногену (профібринолітична дія протеїну С).

Протеїн S – глікопротеїн, синтезується печінкою, вітамін К-залежний механізм синтезу. У нормі протеїн S в плазмі представлений двома формами: вільною (близько 40% від загальної кількості) і в комплексі з фрагментом комплементу C4b. Кофактором протеїну С при протеолізі Va і VIIIa є тільки вільна форма протеїну S. Дефіцит протеїнів С і S може бути вродженим і набутиим. Набутий дефіцит білків спостерігається при захворюваннях печінки, ДВЗ синдромі, дефіциті вітаміну К, лікуванні кумаринами, септичному шоку та хіміотерапії. Найпоширенішим симптоматичним проявом дефіциту протеїнів С і S є тромбоз глибоких вен, легенева емболія, втрати плоду.

Антитромбін III (АТ-III). АТ-III – альфа 2-глобулін з м.м. 58 кДа. У нормі рівень АТ-III в плазмі становить 50-150 мкг/мл (50-150%). АТ-III утворює неактивні комплекси з активованими факторами згортання, що відносяться до серинових протеаз, за винятком фактора VII. Його активність різко збільшується при взаємодії з гепарином на поверхні ендотелію. Зв'язування антитромбіну III з гепарином на 3 порядки підвищує швидкість інгібування активних факторів згортання. У кровоносних судинах активація антитромбіну забезпечується глікопротеїдами люмінальної поверхні ендотелію, що містять гепарансульфат. Зв'язування антитромбіну з цими структурами є одним із механізмів, що забезпечують антитромботичні властивості ендотелію. Недолік функціональної активності АТ-III призводить до тромботичних ускладнень.

Вторинні антикоагулянти. Вторинними антикоагулянтами є похідні взаємодії фібрин-мономерів, пептидів А і В з фібриногеном, так звані розчинні комплекси фібрин-мономерів (РКМФ). Ці комплекси блокують дію тромбіну на фібриноген і полімеризацію фібрин-мономерів, обмежуючи, таким чином, утворення фібрину. Антикоагулянтну дію мають і продукти деградації фібрину (ПДФ) плазміном. Патологічний вплив ПДФ включає антитромбінову активність, перешкоди при полімеризації мономерів фібрину, блокування активності тромбоцитів.

Контрольні питання

Дайте визначення поняттю «антикоагулянти».

Первинні та вторинні антикоагулянти.

Перерахуйте системи фізіологічних антикоагулянтів.

Механізм антикоагулянтної дії TFPI.

Склад та механізм дії системи протеїну С.

Клінічні прояви вродженого або набутого дефіциту системи протеїну С.

Антитромбін III, механізм дії.

РКМФ та ПДФ – вторинні антикоагулянти. Утворення вторинних антикоагулянтів та механізм дії.

2.4 Плазмінова (фібринолітична) система, функції в гемостазі

Тромб – тимчасова тканина, функція якої попередження втрати крові з ушкодженої судини і репарація стінки судини. У міру виконання свого призначення тромб підлягає обов'язковому видаленню для відновлення нормального кровотоку в тканині. Система, що здійснює фізіологічний лізис тромбу і попереджує їх формування в кровоносних судинах у нормі, називається плазміновою або фібринолітичною. Компонентами плазмінової системи є плазміноген (профібринолізин), плазмові та тканинні активатори плазміногену, інгібітори активаторів плазміногену, інгібітори плазміну. Центральною ланкою плазмінової системи є плазмін, який в циркулює в крові у вигляді зимогену плазміногену.

Плазміноген та шляхи його активації. Плазміноген – неактивний попередник плазміну. Це глікопротеїн, синтезується в печінці. Нормальна концентрація плазміногену в плазмі приблизно 200 мкг/мл, період напіввиведення білка – 2,2 дня. Плазміноген характеризується високою афінністю до фібрину. При утворенні фібрину плазміноген негайно зв'язується ними. У нормі активація плазміногену в плазмін здійснюється на поверхні його субстрату – фібрину, шляхом обмеженого протеолізу. Активатори плазміногену – серинові протеази. Залежно від джерела активаторів розрізняють такі шляхи активації плазміногену: внутрішній, зовнішній, екзогенний.

Активація по внутрішньому шляху індукується комплексом факторів контактної фази згортання: калікреїн, XIIa, ВМК (табл. 2.4.1)

Тригером активації плазміногену за зовнішнім шляхом служить тканинний активатор плазміногену (ТАП, tPA), джерелом якого є ендотелій мікросудинного русла і тромбоцити.

Екзогенний шлях активації плазміногену здійснюється фармакологічними препаратами, призначеними з метою лізису тромбів при тромбозах (табл. 2.4.1).

Таблиця 2.4.1 – Активатори та інгібітори плазмінової системи

Внутрішня активація	Зовнішня активація	Інгібітори	Стимулятори
Ф XIIa, XIa, ПК, ВМК	Тканинний активатор плазміну (ТАП)	ІАП-1	ПАІ-1 Тромбін, ТФР- , ІІ-1, ФНО- , глюкокортикоїди, ендотоксини
	Урокиназа одноланцюгова		
Плазміноген	Плазмін	2-антиплазмін 2-макроглобулін 1-антитрипсин Антитромбін III C1-інгібітор	
Фізіологічна активація	Урокиназа двохланцюгова	ІАП -1, ІАП-2	Інгібітор ІАП-1
Стрептокіназа, стафілокіназа, Антистреплаза	Фібриноген, фібрин	ПДФ (фібрину і фібриногену)	Активованій протеїн С

Інгібітори плазмінової системи. Головний природний інгібітор плазміну – глікопротеїн $\alpha 2$ -антиплазмін. Інгібітор пов'язує вільний плазмін у плазмі (нейтралізація плазміну); пригнічує зовнішній шлях активації плазміногену – активність калікреїну плазми і активність серинових протеаз XIIa, XIa, Pa і Xa. Зниження активності $\alpha 2$ -антиплазміну спостерігають при важких гепатитах, цирозі печінки, хронічних тонзилітах, ДВЗ синдромі, тромболітичній терапії стрептокіназою. Підвищення концентрації $\alpha 2$ -антиплазміну в крові можливо у хворих на цукровий діабет, що перенесли стрептококову інфекцію, у осіб зі злякисними новоутвореннями, гострими тромбозами, після оперативних втручань.

Другий природний інгібітор плазмінової системи – глікопротеїн плазми $\alpha 2$ -макроглобулін. Інгібує плазмін та активні компоненти згортання.

Третій найважливіший природний інгібітор плазмінової система системи $\alpha 1$ -антитрипсин. Інактивує плазмін повільно, але не пов'язує його поки ним насичені $\alpha 2$ -антиплазмін та $\alpha 2$ -макроглобулін. Пригнічує згортання, надаючи потужну інгібуючу дію на фактор XIa.

Контроль активності ТАП здійснює система інгібіторів тканинного активатора плазміну (ПАІ). Найпотужніший з цієї групи ПАІ-1, відомий як ендотеліальний інгібітор активатора плазміногену або серпін Е1. Попереджує активацію плазміну як за зовнішнім, так і внутрішнім шляхом. Інші інгібітори фібринолізу: антитромбін ІІІ, який інгібує фібриноліз шляхом інгібування плазміну та калікреїну; інгібує плазмін і С1 інактиватор системи комплементу (табл. 2.4.1).

Деградація фібрину плазміном. Плазміноген є частиною будь-якого згустка, оскільки специфічно зв'язується нитками фібрину. Незалежно від шляху активації плазміногену в нормі плазмін утворюється в згустка, поступово розчиняє тромб, залишаючи час для відновлення тканин. Вільний плазмін, який надходить в плазму, негайно зв'язується антиплазміном та інактивується. При патологічних процесах коагуляції вільний плазмін циркулює в плазмі. У цій ситуації наявні антиплазміни виснажуються і плазмін здійснює протеоліз, крім фібрину фібриногену, факторів V, VIII. У процесі деградації фібрину та фібриногену плазміном утворюються специфічні фрагменти їх молекул, які називаються продуктами деградації фібрину (фібриногену) – ПДФ. Ці продукти розпаду видаляються ретикулоендотеліальною системою та іншими органами. При реакціях деградації фібрину (фібриногену) плазміном послідовно утворюються фрагменти: X, Y, D (DD димер) та E. Фрагменти X і Y називаються ранніми продуктами розпаду; фрагменти D і E – пізніми продуктами розпаду. Фрагмент утворюється першим і є найбільшим фрагментом (м.м. 250 кДа). Фрагмент X – результат розщеплення плазміном кінцевої частини альфа (α) ланцюгів у полімері фібрину. Фрагмент X розщеплюється плазміном з утворенням двох фрагментів, званих Y (YY), і проміжного комплексу (DXD). Цей комплекс при подальшому розщепленні утворює проміжні комплекси DED і DY/DY, поки, нарешті, не утворюються фрагменти E і D (DD димер). Один фрагмент D має м.м. 90000 дальтон, DD дим ер – 180000 дальтон. Наявність DD димеру в плазмі є конкретним зазначенням на фібриноліз *in vivo*, а саме на наявність внутрішньосудинного тромбіну, який призводить до формування фібрину і подальшої його деградації. В умовах патології, при появі в циркуляції ПДФ вони проявляють антитромбінову активність (X і Y), ускладнюють полімеризацію мономерів фібрину (X і Y), фрагмент E є потужним інгібітором тромбіну. Всі чотири фрагменти, але особливо з низькою молекулярною вагою, високо афінні до мембрани тромбоцитів, зв'язуються з нею і блокують функції тромбоцитів, викликаючи клінічно значущі прояви їх дисфункції, інгібування агрегації.

Роль плазміну в гемостазі. В таблиці 2.4.2 підсумовані дані про роль плазміну в гемостазі.

Таблиця 2.4.2 – Роль плазміну у гемостазі

Роль плазміну	Коментарі
Здійснює фібриноліз	Розщеплює фібрин і фібриноген з утворенням продуктів деградації X, Y, D, E

Активує внутрішній шлях згортання	Активація XII в XIIa безпосередньо посилюється плазміном
Впливає на внутрішній та загальний шляхи	Руйнує фактори VIIa і Va
Блокує перетворення фібриногену у фібрин тромбіном	ПДФ зв'язуються з фібриногеном у сайтах, атакваних тромбіном

Контрольні питання

Дайте визначення поняттю « плазмінова система».

Складові плазмінової системи.

Механізм активації плазміногену в плазмін.

Назвіть субстрати плазміну.

Чому в нормі плазмін розщеплює фібрин?

Назвіть фактори, що здійснюють контроль утворення та дії плазміну.

Назвіть послідовність реакцій утворення пептидів при розщепленні фібрину (фібриногену) плазміном.

Антикоагулянтна дія ПДФ.

2.5 Патологія гемостазу, клінічні прояви

Вроджені і набуті порушення в системі гемостазу проявляються кровотечами, тромбозами і тромбогеморагічними станами.

Кровоточивість та її типи. Залежно від переважного ураження тієї чи іншої ланки гемостазу розвивається досить характерний тип кровоточивості. Визначення типу кровоточивості дозволяє зорієнтуватися в основній причині розвитку геморагічного діатезу і намітити найбільш раціональний шлях обстеження хворого. Виділяють п'ять типів кровоточивості: гемумомний, петехіально-плямистий, змішаний, судинно-пурпурний та ангіоматозний.

Для гемумомного типу кровоточивості характерні масивні та дуже хворобливі крововиливи в крупні суглоби, м'язи, підшкірну та забрюшинну клітковину, серозні оболонки. Можливо здавлення нервових стовбурів, кровоносних судин з порушенням їх прохідності. Такий тип кровоточивості спостерігається при порушеннях у системі вторинного, коагуляційного гемостазу. Наприклад, при гемофілії, передозуванні антикоагулянтів і т.п.

Петехіально-плямистий (мікроциркуляторний) тип кровоточивості викликається кількісним або якісним дефектом тромбоцитів. Особливостями даного типу є дрібні, розмірами від точки до шпилькової головки, шкірні крововиливи, які виникають при мінімальних ударах, або ніби спонтанно, що носять назву петехій. Поряд з ними можуть з'являтися синці і синці великих розмірів – екхімози, що виникають у результаті просочування кров'ю шкіри і слизових оболонок. Вони безболісні, ненапружені, не здавлюють навколишні тканини. Множинні поверхневі петехії та екхімози не зникають при натисканні. Поверхневі порізи і подряпини супроводжуються тривалою кровоточивістю.

Поряд із шкірними проявами для тромбоцитарного дефекту характерні геморагії на слизових оболонках. Дуже часті носові та ясенні кровотечі, можуть виникати ниркові і маткові кровотечі. Дуже небезпечні хірургічні втручання на органах порожнини рота та в області носоглотки. Екстракція зубів і видалення мигдалин нерідко викликає масивні кровотечі, що загрожують життю хворого. Гематоми відсутні.

При змішаному (мікроциркуляторно-гематомному) типі кровоточивості мають місце ознаки гематомного і петехіально-плямистого типів. Однак це не просто поєднання двох типів, а переважання мікроциркуляторної кровоточивості. Гематоми в суглобах рідкісні, розташовуються в підшкірній або забрюшинній клітковині і можуть імітувати картину гострого живота, кишкової непрохідності або апендициту. Такий тип кровоточивості найчастіше спостерігається при гострому та підгострому варіантах синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ-синдром), званого також тромбгеморагічним синдромом, або коагулопатією споживання. Ураження ендотелію судин запального або імунного характеру виявляються судинно-пурпурним типом кровоточивості. Шкірні петехії та геморагічні висипання зазвичай розташовуються на шкірі нижніх кінцівок, внизу живота та тулуба. Висипання симетричні, яскраво-червоного кольору. Характерна кровоточивість із слизових оболонок різної локалізації, яка легко викликається або спонтанна. Про судинні ураження як причини геморагічного синдрому можна говорити лише за відсутності патології з боку тромбоцитів і фібриноутворення. Даний тип кровоточивості дуже типовий для геморагічного васкуліту (хвороба Шенлейна-Геноха), вузликового артеріїту, васкулітів при інфекційних захворюваннях і впливах ліків.

Ангіоматозний тип кровоточивості обумовлений кровотечею з місць, де є телеангіектазії або ангіоми. Як правило, при цьому типі геморагічного синдрому відзначаються дуже запеклі кровотечі – носові, рідше маткові, легеневі та шлунково-кишкові. Не буває спонтанних і посттравматичних крововиливів. Наявність телеангіектазій визначається відсутністю в окремих ділянках судин еластичної мембрани і м'язових волокон, тобто стінка судини складається лише з ендотелію.

Тромботичні порушення. Артеріальні та венозні тромби. У здорових людей має місце гомеостатична рівновага між прокоагулянтним потенціалом та антикоагулянтним і фібринолітичним. Численні генетичні, набуті та екологічні фактори можуть схилити чашу терезів на користь згортання, що призводить до патологічного утворення тромбів. Тромбоз може статися у венозному або артеріальному кровообігу і розвивається в результаті складної взаємодії між циркулюючими білками коагуляції, тромбоцитами і стінками кровоносних судин. Артеріальний тромбоз – це гострий інфаркт міокарда (ІМ) та мозкові інсульти. Венозні тромбози – тромбоз глибоких вен та легенева емболія. Артеріальний тромбоз зазвичай розвивається в результаті загальних судинних порушень: атеросклероз, рідше васкуліт. Згустки, що формують артеріальний тромб, називають «білими тромбами» у зв'язку з тим, що вони складаються з тромбоцитів і фібрину. Артеріальні тромби формуються в результаті розриву або тріщини атеросклеротичної бляшки. Тромби венозній системи називають червоними, вони великі за розміром і складаються в основному з фібрину, в якому заплуталися клітини крові, включаючи еритроцити. Розвиток тромбу визначають застій крові, зсув рівноваги в системі гемостазу в бік коагуляції. Венозний тромбоз може виникнути спонтанно в осіб з генетичними аномаліями, пов'язаними з гіперкоагуляцією.

Тромбогеморагічний стан. Тромбогеморагічним станом називають ДВЗ-синдром. ДВЗ – неспецифічний загальнопатологічний процес, пов'язаний із надходженням у кровотік активаторів згортання крові та агрегації тромбоцитів, дисемінованим мікрозгортанням крові, активацією та виснаженням плазмових протеолітичних систем, споживанням факторів згортання крові, фізіологічних антикоагулянтів та інгібіторів фібринолізу – розвитком важкого тромбогеморагічного синдрому.

Контрольні питання

Перерахуйте типи кровоточивості.

Яке значення має знання типу кровоточивості для лікаря-лаборанта?

Тромбози.

Механізм утворення артеріальних та венозних тромбів.

ДВЗ синдром як тромбогеморагічний стан.

2.6 Лабораторні методи дослідження системи гемостазу

2.6.1 Методи дослідження тромбоцитарно-судинного (первинного) гемостазу

Дослідження системи гемостазу в пацієнта при клінічних проявах порушення в системі передбачає знання таких важливих моментів: сімейний анамнез, тривалість (недавній початок або з дитинства), тривалість кровотечі, обставини кровотечі (спонтанне, після травми або операції).

Наступне обов'язкове питання: тип кровоточивості.

В разі пролонгованого часу кровотечі при нормальній кількості тромбоцитів виконують тести:

- 1) визначення резистентності капілярів;
- 2) визначення фактора Віллебранда;
- 3) функціональні тести тромбоцитів (адгезія, агрегація).

2.6.2 Методи дослідження коагуляційного (вторинного) гемостазу Наразі для оцінки коагуляційного гемостазу використовують методи, засновані на:

фіксації часу утворення згустка (клотінг-тести);

використанні хромогенних субстратів;

реакціях взаємодії антиген-антитіло (імунохімічні реакції). Тести можуть виконуватися вручну або бути автоматизовані.

Тести, засновані на оцінці часу утворення згустка (клотінг-тести):

Час згортання цілісної крові (тест Лі-Уайта)

Принцип методу: біля ліжка хворого в пробірку відбирають 1-2 мл крові, визначають час утворення тромбу. Норма – 4-10 хвилини. Дефект тромбоцитів не позначається на часі згортання крові. Тест відображає стан балансу в системі гуморальної ланки гемостазу. Тест не дуже чутливий: час згортання подовжується при дуже значному зниженні факторів згортання (нижче 40-50%).

Активований час рекальцифікації (АЧР)

Це варіант постановки тесту Лі-Уайта, при якому кров відбирають у пробірку з каоліном, негайно перемішують і визначають час її згортання. За допомогою АВЧ ведуть контроль стану згортання в умовах операції на відкритому серці або судинах. Нормальні значення АВЧ – 120 – 180 с.

Протромбіновий час (ПЧ)

Тест визначення активності зовнішнього шляху, активності вітамін К – залежних факторів (II, VII, IX, X). Принцип методу: до цитратної плазми пацієнта додають тромбопластин і кальцію хлорид. Визначають час утворення згустка. Норма ПЧ 12-15 с. У практиці ведення пацієнтів з тромбозами прийнято визначати протромбін за Квіком у % з використанням калібрувального графіка для конкретної партії тромбопластину. Отже, ПВ за Квіком дозволяє оцінити чи є в пацієнта зниження рівня факторів протромбінового комплексу та на скільки відсотків. Вузьке місце у визначенні ПЧ – нестандартизованість тромбопластинів, отриманих із різних джерел і за різними протоколами. У рутинних дослідженнях цей недолік методу обходять шляхом визначення протромбінового індексу (ПТІ) як відношення ПЧ здорової людини до ПЧ пацієнта (ПТІ за Туголуковим).

останній час проблема вирішена таким чином. Комітет експертів ВООЗ, Міжнародний комітет з вивчення тромбозів і гемостазу та Міжнародний комітет зі стандартизації в гематології затвердили протокол отримання тромбопластину з мозку людини (загиблі в аваріях), стандарт тромбопластину, активність якого прийняли за 1. Постачальники тромбопластину зобов'язані порівнювати активність свого тромбопластину зі стандартом і розраховувати у скільки разів відрізняється їх тромбопластин від стандарту. Ця величина називається міжнародним індексом чутливості тромбопластину – МІЧ, International Sensitivity Index of thromboplastin, ISI. Тромбопластин, отриманий таким чином називають стандартизованим. Величина МІЧ наноситься на ампули ліофілізованого тромбопластину. Співвідношення значення МІЧ і ПЧ відображені в табл. 2.6.2.1

Таблиця 2.6.2.1 – Співвідношення МІЧ і ПЧ

МІЧ	ПЧ (с)
1,0 – 1,5	13 – 17
1,7 – 2,1	11– 14
2,4– 2,8	11-13

Результат визначення ПЧ у пацієнтів видають у вигляді нормалізованого міжнародного відношення (МНВ), яке розраховують за формулою 1:

Відношення зводиться у ступінь МІЧ використовуваного тромбопластину; нормальне значення МНВ 0,8-1,2. МНВ – математична корекція, за допомогою якої проводиться стандартизація ПЧ, виміряного за допомогою різних тромбопластинів, що мають різну чутливість. МНВ дозволяє лікареві оцінити результати, навіть якщо вони отримані в різних лабораторіях і ПЧ визначалося різними методами . Оптимальні межі МНВ, які повинні бути досягнуті в ході лікування непрямими антикоагулянтами, залежать від терапевтичних цілей і визначаються лікарем. У таблиці 2.6.2.2 відображені діапазони

безпечних значень МНВ в умовах застосування непрямих антикоагулянтів при терапії і профілактиці тромбозів.

Таблиця 2.6.2.2 – Критерії діагностичного моніторингу при пероральному прийомі антикоагулянтів

Показання	МНВ
Венозний тромбоз	2,0 – 3,0
Профілактика (високий ризик виникнення тромбозу при хірургічній операції)	2,0 – 3,0
Лікування тромбозу глибоких вен і легеневої емболії	2,0 – 3,0
Механічні протези клапанів серця	2,5 – 3,5
Інфаркт міокарда (для профілактики рецидиву)	2,5 – 3,5
Зворотна системна емболія	2,5 – 3,5

ПЧ – важливий тест, бо він відображує наявність та активність п'яти різних факторів згортання крові (фактори I, II, V, VII і X). Визначення ПЧ використовують при моніторингу терапії кумаринами. Тест найбільш чутливий до зміни в рівні VII фактора: він подовжується в тому випадку, коли вміст фактора VII становить 55% від нормального; фактори II і X знижуються через кілька днів.

Частково активований тромбoplastиновий час (АЧТЧ) або каолін кефаліновий час (ККЧ). Залежить від активності усіх факторів внутрішнього і загального шляху, за винятком VII і XIII. Принцип методу: визначається час згортання бідної тромбоцитами цитратної плазми пацієнта при додаванні фосфоліпиду кефаліну, каоліну та іонів Ca^{2+} . Тест стандартизований за контактною фазою каоліном – активація фактора XII, XI і за фосфоліпідами (видаляють тромбоцити пацієнта, і в надлишку додають кефалін, аналог Зпф). Нормальне значення тесту – 25-35 секунд. Використовується для моніторингу терапії гепарином і скринінгу хворих на гемофілію. Адекватна доза гепарину подовжує АЧТЧ в 2-2,5 рази в порівнянні з вихідним значенням. АЧТЧ подовжується при наявності в плазмі гепарину, інгібіторів тромбіну і ПДФ.

Тест подовжується при зниженні факторів згортання нижче 30% від нормального.

Тромбіновий час (ТЧ)

Тест для виявлення дефектів у процесі перетворення фібриногену у фібрин. ТЧ виконується в рамках дослідження епізоду кровотечі, тромбозу або невиношування вагітності, коли ПЧ і/або тест АЧТЧ пролонговані, вимірюють час згортання цитратної плазми пацієнта при додаванні тромбіну.

Пролонгування ТЧ може бути обумовлено:

низьким фібриногеном;

дисфібриногенемією;

присутністю гепарину;

наявністю в плазмі вторинних антикоагулянтів, мієломних білків, що перешкоджають як прояву активності тромбіну, так і полімеризації мономерів фібрину.

За допомогою ТЧ здійснюють моніторинг терапії гірудином і гірулоїдами: при адекватній дозі антикоагулянту ТЧ подовжено в 2-2,5 рази, МНВ і ПЧ в нормі або видовжене.

Виявлення дефіциту фактора XIII (фібрин-стабілізуючий фактор). Дефіцит фактора виявляють у тесті розчинності фібрину в 5М сечовині або 1% монохлороцтової кислоти (при нормальній активності фактора XIII згусток не розчиняється).

Тромбоеластографія (ТЕГ) – метод графічної реєстрації процесів згортання крові і фібринолізу. Дослідження здійснюють на спеціальному приладі – тромбоеластографі, результат дослідження – тромбоеластограма.

Основна частина приладу – кювета з нержавіючої сталі, в неї опускається металевий циліндр, підвішений на чутливому реєструвальному пристрої. Кювету заповнюють досліджуваною кров'ю (плазмою), опускають у неї циліндр. При дослідженні кювета здійснює коливальні рухи навколо вертикальної осі. При зортанні крові згусток прилипає до стінок кювети і циліндра. У міру утворення та поступового ущільнення згустка циліндр здійснює коливальні рухи з відповідною амплітудою. Обертальні рухи циліндра реєструють на фотоплівці або на папері. При повному утворенні згустка коливання циліндра максимальні. У міру розчинення згустка (фібриноліз) амплітуда коливань циліндра зменшується. Аналіз тромбоеластограми ведуть відповідно з інструкцією до приладу. Тромбоеластограма відображує безперервний профіль всіх етапів утворення згустка, забезпечуючи більш точну картину процесу коагуляції в природних умовах. Тест дозволяє оцінити стани: норми, тромбоцитопенії, дисфункції тромбоцитів, дефіцит факторів згортання, фібриноліз, гіперкоагуляцію.

Визначення окремих факторів згортання (фактори II – XII).

Хромогенний аналіз. Зараз ідентифікація та ступінь дефіциту білків згортання крові визначаються з використанням імунологічних методів: твердофазного імуоферментного аналізу та кількісного імуоелектрофорезу. Активність окремих факторів згортання визначають за допомогою хромогенного аналізу. Хромогенний аналіз – по суті ферментний аналіз, розроблений на початку 1970-х років. У хромогенному аналізі використовують синтетичні субстрати, які складаються з кольорових хімічних речовин – хромогенів, пов'язаних з амінокислотним залишком пептиду, зв'язок якого специфічно розщеплюється ферментом коагуляційного каскаду. У складі пептиду хромоген знаходиться в забарвленій формі. У результаті дії ферменту хромоген звільняється, забарвлює інкубаційну суміш. Інтенсивність забарвлення визначають з використанням спектрофотометрії. Хромогенні субстрати схожі за структурою на рідні субстрати ферменту, що визначає вибірковість їх дії. Інші переваги хромогенних аналізів включають стабільність реагенту та адаптованість до широкого діапазону інструментів в автоматизованій лабораторії хімії або імунології. Селективність хромогенного субстрату для конкретного ферменту залежить від відносної концентрації ферменту в зразка, умов проведення реакції (наприклад, рН, температура, тип буфера і його концентрація, іонна сила), наявності інгібіторів, розчинності субстрату, його стабільності та інших факторів. Кращі субстрати мають високу спорідненість до ферменту. Найбільш поширений хромоген пара-нітроанілін (ПНА).

Для визначення багатьох факторів згортання використовують хромогенний субстрат фактора X. Наприклад, VIII фактор є кофактором IX фактора. Активованій фактор IX

активує фактора X, який гідролізує свій хромогенний субстрат з визволенням ПНА. Якщо аналіз проводити в умовах належного контролю, інтенсивність забарвлення відображує кількість VIII фактора. Хромогенний метод характеризують хороша точність, відсутність впливу вовчакових антитіл, гепарину та інших антикоагулянтів. У продажу є хромогенні субстрати для тромбіну, ТАП, урокінази, IX, X і XII факторів зсідання крові та ін.

Визначення концентрації фібриногену. Кінцева мета активації системи згортання в умовах норми – формування тромбу шляхом перетворення розчинного фібриногену в нерозчинний фібрин. Гемостатичні властивості тромбу в першу чергу залежать від концентрації фібриногену. Фібриноген – переважаючий за Вмістом білок згортання плазми. Його нормальний рівень у плазмі 2,0 – 4,0 г/л. Кількісне визначення фібриногену плазми відіграє важливу роль у діагностиці та лікуванні багатьох коагулопатій. Крім того, оскільки рівень фібриногену плазми збільшується в пацієнтів з інфарктом міокарда та інсультом, визначення фібриногену важливо для оцінки ризику тромбозу. Фібриноген – білок гострої фази, його визначення в післяопераційному періоді дозволяє попередити ускладнення запального характеру.

Для кількісного визначення фібриногену запропоновано безліч різних методик, свідчення яких часто вельми значно відрізняються одне від одного і тому мало порівнянні. У практиці вітчизняних лабораторій використовується гравіметричний метод Рутберга. Він заснований на перетворенні фібриногену у фібрин тромбіном або тромбопластином; фібрин, що утворився, після підсушування фільтрувальним папером зважується.

Недоліки методу. Перший – помилково занижені результати (аж до повної незгортаємості, що імітує афібриногенемію) при гепаринізації та накопиченні в плазмі ПДФ, блокуючих полімеризацію фібрин-мономерів (ДВЗ синдроми). Метод, по суті, визначає не вміст фібриногену в плазмі, а кількість фібриногену, яка згортається під впливом тромбіну.

Другий недолік цього методу криється в тому, що при порушеннях згортання крові часто утворюється дуже пухкий, що легко розпадається і втрачає свої частини, згусток, або утворюється безліч дрібних згустків. У подібній ситуації зібрати весь фібрин, що утворився, без значних втрат дуже важко, що вносить суттєву помилку в результати дослідження. Паралельне використання різних коагулянтів дозволяє виявити значну частину заблокованого фібриногену.

практиці зарубіжних лабораторій використовують оптичний метод визначення фібриногену (кінетичний метод Клауса).

Принцип методу: з використанням спектрофотометрії визначають час згортання розведеної цитратної плазми надлишком тромбіну. Розведення плазми необхідно тому, що при перетворенні фібриногену у фібрин тромбіном лінійна залежність швидкості реакції від концентрації фібриногену зберігається до 1 г/л, великі концентрації фібриногену насичують тромбін. Отже, час згортання пропорційно концентрації фібриногену при його низьких концентраціях. Ця кінетична особливість тромбіну використовується для визначення його концентрації за каліброваним графіком у координатах: концентрація фібриногену – оптична щільність. Кінетичний аналіз є швидким, економічним, може бути повністю автоматизованим. Високі, не терапевтичні, рівні гепарину або гирудину можуть вплинути на показники вмісту фібриногену, як і в пацієнтів з високим рівнем фібринолітичної активності. ПДФ завищують показники оптичної щільності, а отже, і вміст фібриногену.

Дослідження плазмінової системи. Евглобуліновий фібриноліз. Тест евглобулінового фібринолізу відображає загальну фібринолітичну активність плазми, баланс активатори/інгібітори плазмінової системи.

Принцип: визначають час повного лізису евглобулінового згустка, який отримують з евглобулінової фракції, тобто фракції, яка осаджується з плазми 1% оцтовою кислотою. Фракція відносно вільна від інгібіторів фібринолізу. Осад розчиняють і додають кальцій для формування згустка фібрину. Отриманий згусток служить субстратом плазміну, який утворюється з плазміногену під дією активаторів. Згусток інкубують при 37°C, оцінку фібринолізу здійснюють візуально протягом 30 хв. Підвищення фібринолітичної активності характерно для ДВЗ, захворювань печінки, післяопераційного періоду, злоякісних новоутворень, у жінок при прийомі контрацептивів, під час менструацій. Лізис евглобулінового згустка знижений при вагітності через підвищення концентрації фібриногену та інгібітору активатора плазміногену. Лізис згустка швидше, ніж за 30 хв., вказує на стан гіперфібринолізу. Якщо фібриноген вище 6 г/л, то час лізису збільшується, при зниженні вмісту фібриногену невеликий згусток лізується нормальною фібринолітичною системою швидше, тому результати важко інтерпретувати.

Час лізису згустка скорочується при дефіциті фактора XIII, оскільки утворений згусток фібрину погано зшитий і більш швидко лізується. Тромбоцити пролонгують час лізису у зв'язку з їх антиплазміновою активністю, тому тест виконується на плазмі, бідній тромбоцитами. Тест можна ставити для хворих, які отримують гепарин, оскільки він віддаляється в процесі осадження евглобулінів. Одна з проблем, пов'язана з цим тестом, – відсутність стандартизації. Буфер готується в порядку виконання тесту, а ступінь протеолізу залежить від рН; визначення стану згустка є суб'єктивним. У практиці лабораторій гемостазу виконання тесту доручають завжди одному й тому ж лаборанту, тест повинен виконуватися у двох паралелях. Результат – середнє двох визначень.

Визначення вмісту $\alpha 2$ -антиплазміну. Основний інгібітор плазміну визначають або за допомогою хромогенного методу, або імуноферментного аналізу (ІФА). При використанні хромогенного методу визначають залишкову активність плазміну в плазмі крові. При наявності в циркуляції $\alpha 2$ -антиплазміну весь плазмін пов'язаний з ним в неактивний комплекс. Чим більше вільного плазміну в циркуляції, тим менше $\alpha 2$ -антиплазміну, тим інтенсивніше розщеплюється хромогенний субстрат плазміну, тим вище колір р-нітроаніліну. Таким чином, поглинання р-нітроаніліну при 404 нм зворотно пропорційно вмісту $\alpha 2$ -антиплазміну.

Тест-системи ІФА дозволяють визначити вміст $\alpha 2$ -антиплазміну. Принцип ІФА методу: на твердій фазі фіксують плазмін, потім вносять досліджувану плазму, $\alpha 2$ -антиплазмін утворює комплекс з плазміном, вільний антиплазмін відмивають, в лунки планшета вносять моноклональні антитіла до $\alpha 2$ -антиплазміну, не пов'язані антитіла відмивають, додають антитіла до антитіл, мічені пероксидазою хрому, знову відмивають, додають субстрат пероксидази, реакцію зупиняють відповідно до кольору позитивного контролю, інтенсивність забарвлення визначають за допомогою фотометра. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту $\alpha 2$ -антиплазміну. Зниження рівня $\alpha 2$ -антиплазміну може відігравати важливу роль у збільшенні потужності фібринолізу. Визначення $\alpha 2$ -антиплазміну корисно при лікуванні тромбозів, гострої легеневої емболії, захворюваннях печінки.

Визначення продуктів деградації фібрину. Виявлення та напівкількісну оцінку продуктів деградації фібрину (ПДФ) і D-димерів здійснюють у реакціях латекс-аглютинації. При визначенні ПДФ частинки латексу сенсibiliзують поліклональними антитілами до ПДФ, а D-димерів – моноклональними антитілами до D-димеру. При наявності в плазмі крові пептидів, специфічних антигенів моноклональних антитіл, відбувається реакція антиген-антитіло, з утворенням преципітату, появу якого фіксують або візуально, або використовуючи метод нефелометрії чи турбодиметрії.

Специфічним маркером внутрішньосудинного розщеплення фібрину (не фібриногену) є D-димер. D-димери – продукти деградації плазміном фібрину, зшитого активним фактором XIII. Таким чином, вимір зшитих продуктів розпаду, на відміну від загальних ПДФ – конкретна оцінка ступеня фібринолізу. У більшості турбодиметричних методів визначення D-димерів використовуються латексні кульки або інші мікрочастинки, покриті моноклональними антитілами, специфічними для D-димерів або фрагмента D фібрину, але не фібриногену. Підвищення вмісту D-димерів спостерігається при ДВЗ, легеневій емболії, артеріальних і венозних тромбозах, сепсисі, цирозі печінки, раку та після оперативних втручань. Однак, аналіз D-димерів використовується в основному в оцінці пацієнтів з підозрою на тромбоемболічні захворювання, особливо тромбоемболії легеневої артерії та тромбозу глибоких вен. При неефективній тромболітичній терапії тести на ПДФ позитивні, а на D-димер – негативні. Продукти деградації фібриногену та фібрину присутні на пізніх термінах вагітності та близько 48 годин після операцій.

Скринінг циркулюючих інгібіторів факторів згортання крові та антикоагулянтів. Пролонгування часу тестів згортання (ПЧ, АЧТЧ та/або ТЧ) вказує на наявність дефіциту фактора зовнішнього чи внутрішнього шляху або присутність інгібітору згортання крові. Перший крок у з'ясуванні причин подовження часу згортання – тест змішування плазм. Мета тесту змішування плазмів – з'ясування можливості виправлення подовженого часу згортання додаванням до досліджуваного зразка рівного об'єму пулу цитратних нормальних плазмів. Навіть глибокий дефіцит VIII фактора згортання крові (1% VIII фактора, який зустрічається при важкій формі гемофілії), буде виправлений при змішуванні до нормального діапазону, адже 50% рівень будь-якого фактора дає нормальні значення часу згортання крові.

Якщо мала місце корекція, то проводять процедуру виявлення дефіциту конкретного фактора згортання крові. Відсутність корекції часу згортання крові в змішаному тесті вказує на наявність речовини, яка перешкоджає згортанню.

Виявлення конкретного інгібітору – складне завдання, оскільки існує декілька різних типів інгібіторів (так званих «циркулюючих антикоагулянтів»). Конкретні інгібітори – це імуноглобуліни специфічні до фосфоліпідів (вовчаковий антикоагулянт) або до конкретних факторів згортання крові (інгібітори факторів). До неспецифічних інгібіторів, що впливають на процес згортання крові, відносяться ПДФ фібрину і фібриногену, деякі патологічні антитіла, такі як моноклональні парапротеїни, лікарські препарати (гепарин). Для з'ясування типу інгібітору необхідні клінічні дані. Так при вовчакових антитілах відсутні кровотечі, а при антитілах до факторів згортання крові часті кровотечі. Як правило, при антитілах до факторів згортання при тривалій преінкубації суміші час згортання досягає нормальних значень, при специфічних антитілах час згортання практично не корегується. Часткова корекція часу згортання вказує на циркулюючі антитіла до факторів

згортання. Наявність гепарину і неспецифічних інгібіторів може бути підтверджено іншими тестами коагуляції, таких як тромбіновий час згортання і рептилазний час. Вовчакові антитіла визначають з фосфоліпід-чутливим тестом – час згортання цитратної плазми, розбавленою отрутою гадюки Рассела. Отрута гадюки Рассела безпосередньо активує X фактор, минаючи фактор VII зовнішнього шляху, а також контактні і антигемофільні фактори внутрішнього шляху.

Розрізняють негайні мікст-тести – тести часу згортання (ПЧ, АЧТЧ або ТЧ) проводять негайно після змішування рівних кількостей тестованої плазми і пулу донорських плазмів. Більшість факторів швидко реагують інгібіторами, негайно гальмують згортання крові і не потребують інкубації. Навпаки, інгібітори фактора VIII і деякі вовчакові антикоагулянти є слабкими і/або залежними від часу – повільно реагують інгібітори, і вимагають інкубації суміші плазмів 1:1 при кімнатній температурі або 37°C протягом одного або двох годин. За наявності гепарину в крові або в пробірці тромбіновий час корегують шляхом додавання толуїдинового синього, який специфічно зв'язує гепарин, або визначають рептилазний час (рептилаза не чутлива до гепарину та не інгібується антитромбіном III). Якщо тести з толуїдиновим синім і рептилазний час подовжені, то мають місце проблеми полімеризації фібрину: або через дисфібриногенемію, або гальмування полімеризації білками мієломи, або ПДФ.

2.7 Алгоритм лабораторних досліджень при порушенні гемостазу Дослідження при кровотечах включають тести:

Аналіз специфічного фактора згортання крові.

Проби на функціональний стан тромбоцитів (адгезія, агрегація, секреція, прокоагулянтна активність).

Аналіз ФВ (кількість і функція).

Визначення інгібітора (наприклад, визначення вовчакового антикоагулянту або інгібітора специфічних факторів VIII або IX).

Скринінгові проби на ДВЗ (ПЧ, АЧТЧ, кількість тромбоцитів, рівень фібриногену і визначення ПДФ або D-димеру).

Проби на визначення порушень фібринолізу (евглобуліновий фібриноліз).

Специфічні проби на активацію згортання крові (визначення маркерів тромбінемії та фібринолізу).

Скринінг тести дослідження при тромбозах включають:

ПЧ;

АЧТЧ;

ТЧ.

Лабораторну діагностику патогенезу тромбозів необхідно проводити після того як мине гострий тромботичний стан; у стабільних хворих, які не отримують антикоагулянти – через 1-2 тижні після закінчення підтримуючої терапії антикоагулянтами, яка проводилася протягом 6 місяців.

Лабораторне тестування дефіциту АТIII, ПС та PS показано хворим у віці до 40 років з обтяженим анамнезом – визначається концентрація і функція кожного інгібітору.

Скринінг-тести діагностики гострого ДВЗ синдрому.

В таблиці 2.7.1 відображено скринінг-тести та їх значення при гострому

ДВЗ.

Таблиця 2.7.1 – Скринінг-тести та їх значення при гострому ДВЗ синдромі

Показники	ДВЗ	Норма
Кількість тромбоцитів	<150 000	150000 – 400 000/мкл
ПЧ	>15с	12-14с
АЧТЧ	>37с	25-38 с
Фібриноген	< 1,50г/л	1,50-3,50 г/л
ПДФ	>20 мкг/мл	2-10 мкг/мл
D-димер	Позити вний	Негативний

8 Преаналітичні аспекти дослідження гемостазу

Підготовка пацієнта. При дослідженні тромбоцитарно-судинного гемостазу пацієнт повинен:

- уникати фізичної активності до взяття крові;
- утриматися від куріння і напоїв з кофеїном. При оцінці функції

тромбоцитів:

- за 7-10 днів до тесту на маркери тромбофілії не використовують антиагреганти; за 7 днів до дослідження не використовують вітамін К антагоністи.

Правила взяття крові для досліджень гемостазу. Лабораторна діагностика порушень гемостазу вельми чутлива до дотримання відомих правил взяття, зберігання та підготовки крові для дослідження. Безумовне значення для якісного обстеження мають адекватна підготовка хворого до здачі крові, сама методика кровопускання і стабілізації крові. Стан стресу (психологічного або фізичного) може викликати підвищення агрегаційних властивостей тромбоцитів і тромбінемію. У деяких клінічних ситуаціях, наприклад, при шоку, витяг крові з ліктьової вени важко здійснити через низький тиск. Спроби повільно набрати кров за допомогою шприца часто закінчуються невдачею – кров згортається. У таких випадках можна вдатися до взяття крові з підключичного катетера, проте варто пам'ятати про можливість забруднення такої крові гепарином. Кров беруть вранці натщесерце з ліктьової вени голкою з широким просвітом (0,8 мм). Можливе лише короткочасне накладення джгута. Використання шприца неприпустимо через активацію тромбоцитів та факторів згортання турбулентним рухом крові та її змішування з повітрям (спінювання). Використання вакуумних пробірок, призначених для отримання венозної крові, стабілізованої цитратом у співвідношенні 9:1, має великі переваги через гарну стандартизацію процедури і відповідність санітарним нормам, але у разі істотних відхилень гематокриту при анемії або поліглобулії (поліцитемії) їх використання не рекомендовано. При високому гематокриті (понад 70%) у плазмі крові створюється надмірна концентрація цитрату, що призводить до «помилкової» гіпокоагуляції; навпаки, при зниженні гематокриту (нижче 35%), наприклад при анемії, виявляється «помилкова» гіперкоагуляція,

і кров при її змішуванні з цитратом у відношенні 9:1 може згорнутися в пробірці ще до дослідження.

При підозрі на захворювання, що супроводжуються анемією або поліглобулією, рекомендовано перед здачею крові на параметри гемостазу провести дослідження показника гематокриту. Перерахунок об'єму стабілізатора відповідно до показника гематокриту дозволяє уникнути цієї помилки (табл. 2.7.1).

Таблиця 2.7.1 – Співвідношення об'ємів 3,8% розчину цитрату натрію і крові залежно від величини гематокриту

Показник гематокриту	Об'єм цитрату, мл	Об'єм крові, мл
20-21	1,4	8,6
22-27	1,3	8,7
28-33	1,2	8,8
34-39	1,1	8,9
40-45	1,0	9,0
46-51	0,9	9,1
52-57	0,8	9,2
58-60	0,7	9,3
Вище за 65	9,5	0,5