

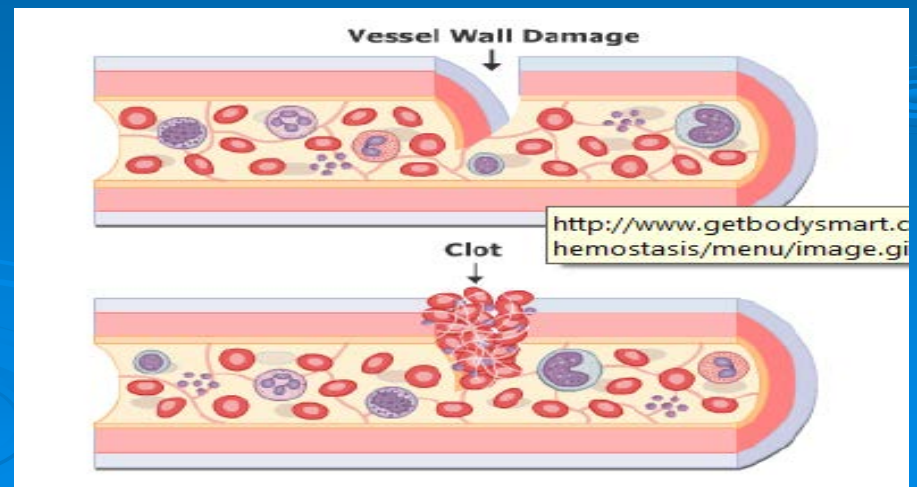


Diagnostyka układu krzepnięcia- badania koagulologiczne

Iwona Kowalczyk

Hemostaza

- Zespół procesów fizjologicznych zapewniających sprawne hamowanie krwawienia po przerwaniu ciągłości ściany naczyń krwionośnych, szczelność łoża naczyniowego i płynność krążącej krwi
- **Elementy hemostazy:** ściana naczyń krwionośnych, płytki krwi, układ krzepnięcia, endogenne inhibitory krzepnięcia oraz układ fibrynolizy.



Etapy procesów hemostatycznych

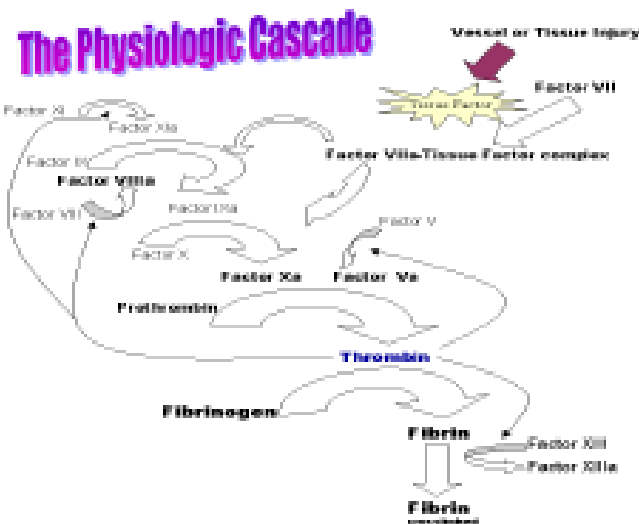
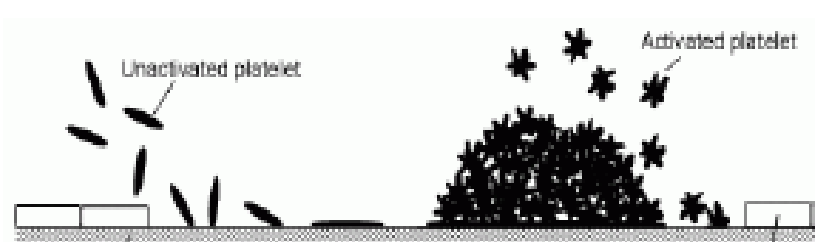
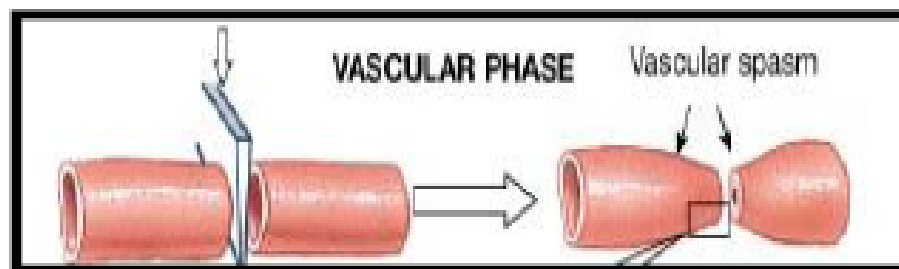
- Hemostaza pierwotna

- naczynia →
- płytki →

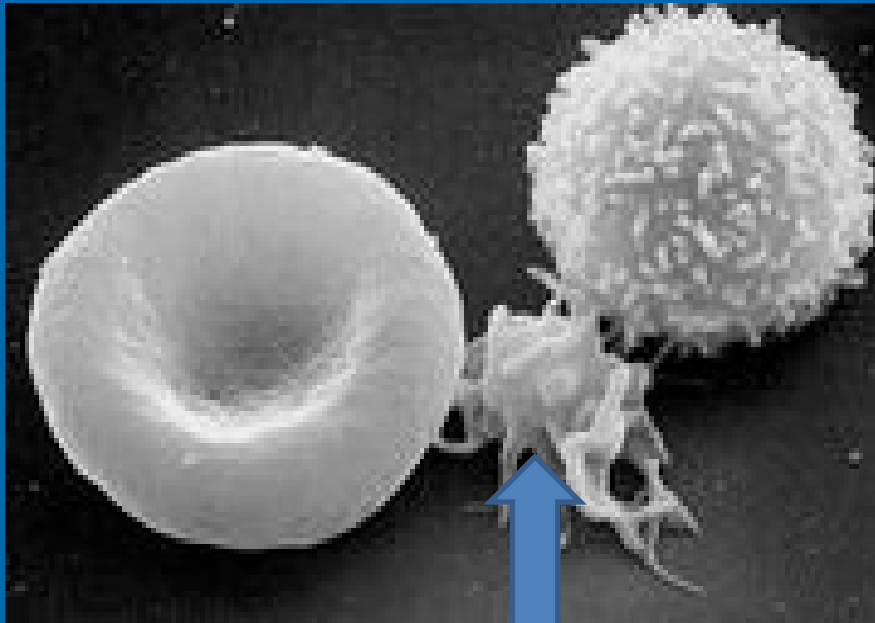
- Hemostaza wtórna

- skrzep fibrynowy →
- antykoagulacja →

- Fibrynoliza



Płytki krwi



Trombocyt po aktywacji

Są to najmniejsze (2-4 μm), bezjądrzaste elementy morfotyczne krwi powstające z cytoplazmy megakariocytów.

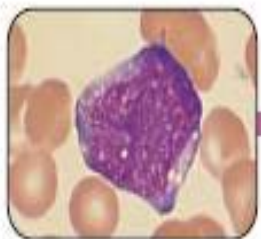
Liczbę, różnicowanie i czynność płytkotwórczą reguluje trombopoetyna.

Liczba płytek we krwi osób zdrowych wynosi 150-400 $\times 10^9/\text{l}$, a czas życia 9-10 dni. 30% płytek znajduje się w śledzionie, w których następuje ich dynamiczna wymiana z pulą trombocytów krwi.

Na powierzchni płytek znajdują się różnorodne receptory dla czynników aktywujących lub hamujących ich funkcję.

Płytki krwi

- Powstają z fragmentów cytoplazmy megakariocytów
- 150-400 000/mm³
- Ok. 30% PLT jest w śledzionie, są w równowadze z PLT krwi krążącej
- Żyją 8-12 dni, potem są usuwane z krwiobiegu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy śledziony, wątroby i szpiku kostnego
- Bezjądrowe komórki, zewnętrzna błona PLT zbudowana jest z podwójnej warstwy fosfolipidów, z nią łączy się system kanalików, które uwalniają substancje z ziarnistości α i ziarnistości gęstych



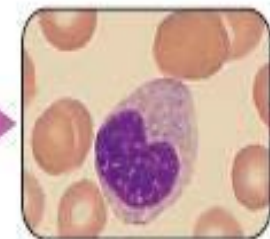
Mieloblast



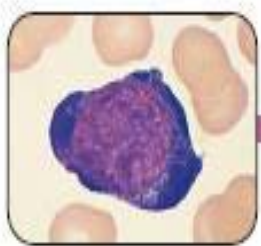
Promielocyt



Mielocyt



Metamielocyt



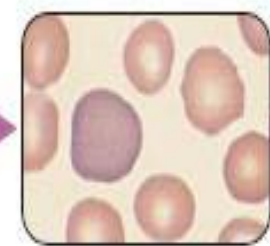
Pronormoblast (proerythroblast)



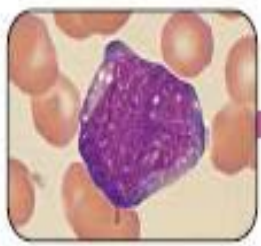
Wczesny normoblast



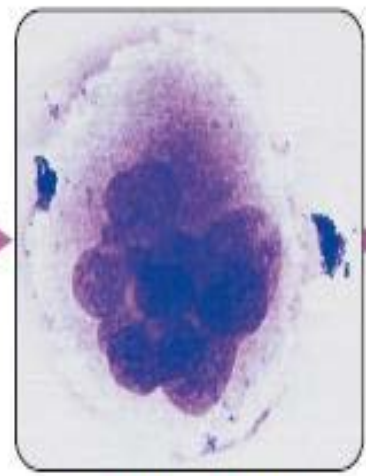
Późny normoblast



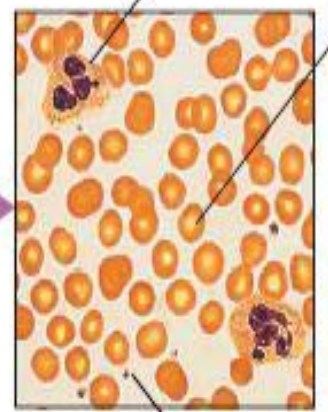
Retikulocyt



Megakarioblast

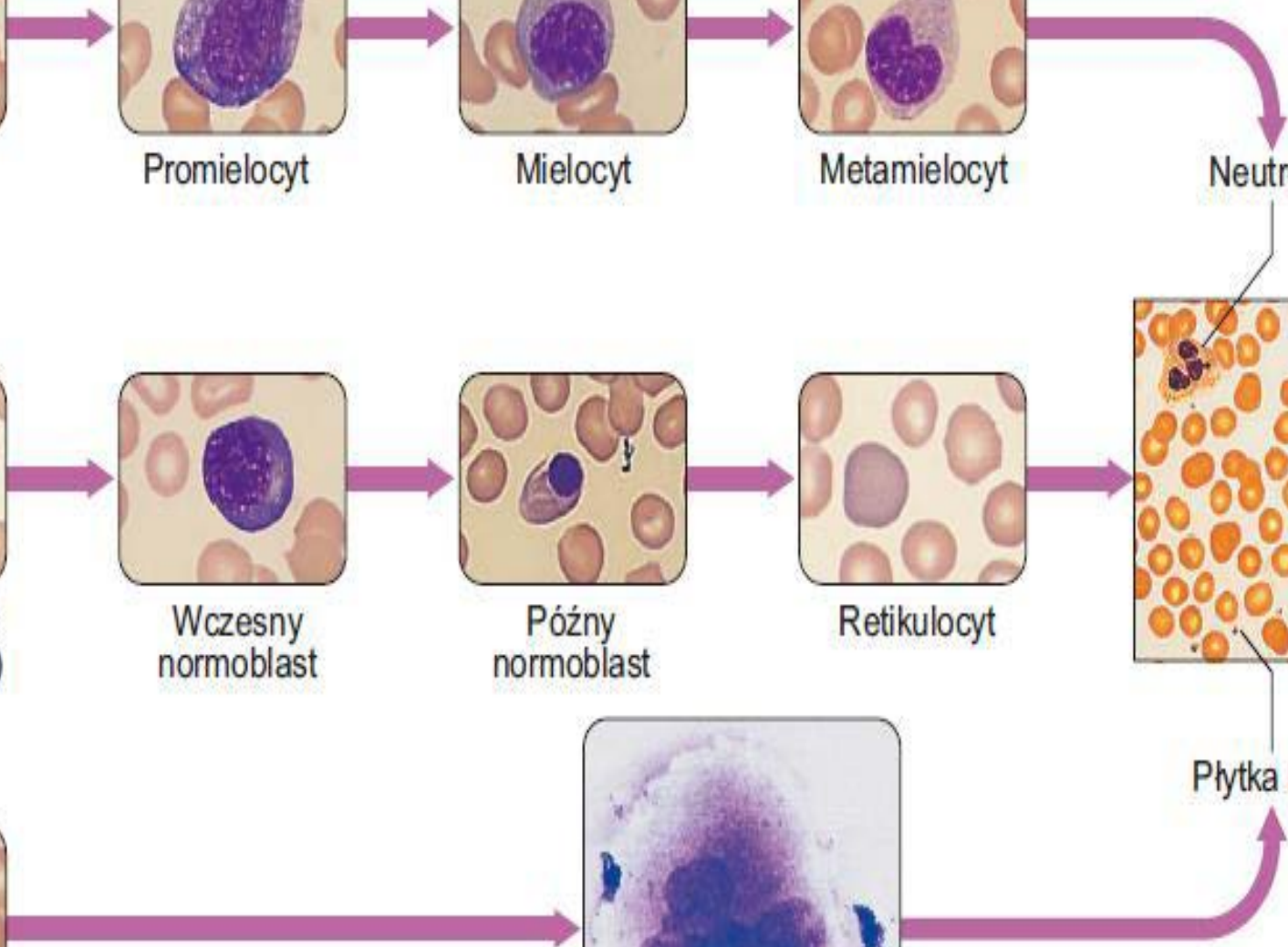


Megakariocyt



Neutrofil
Krwinka czerwona

Plytka krwi

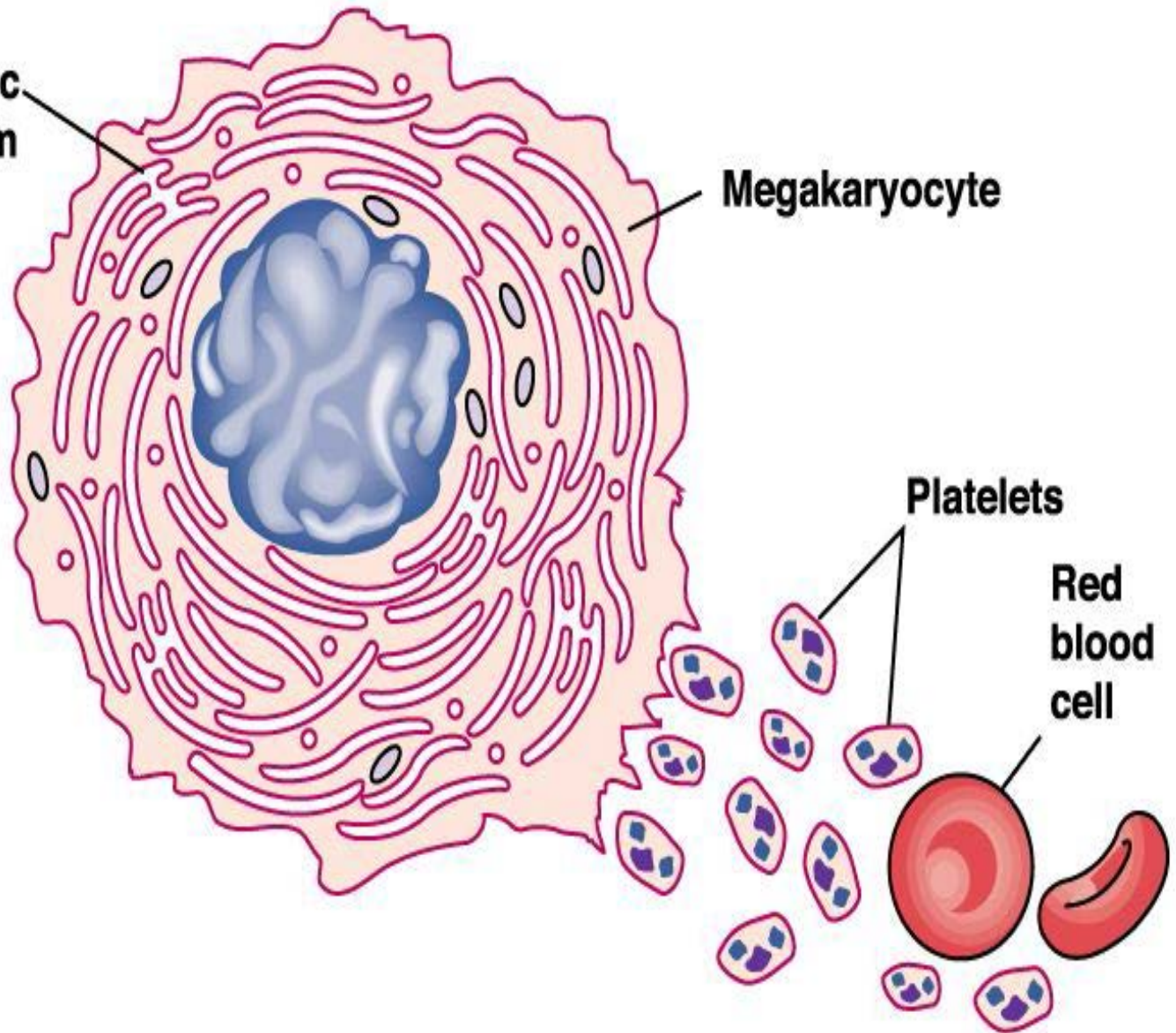


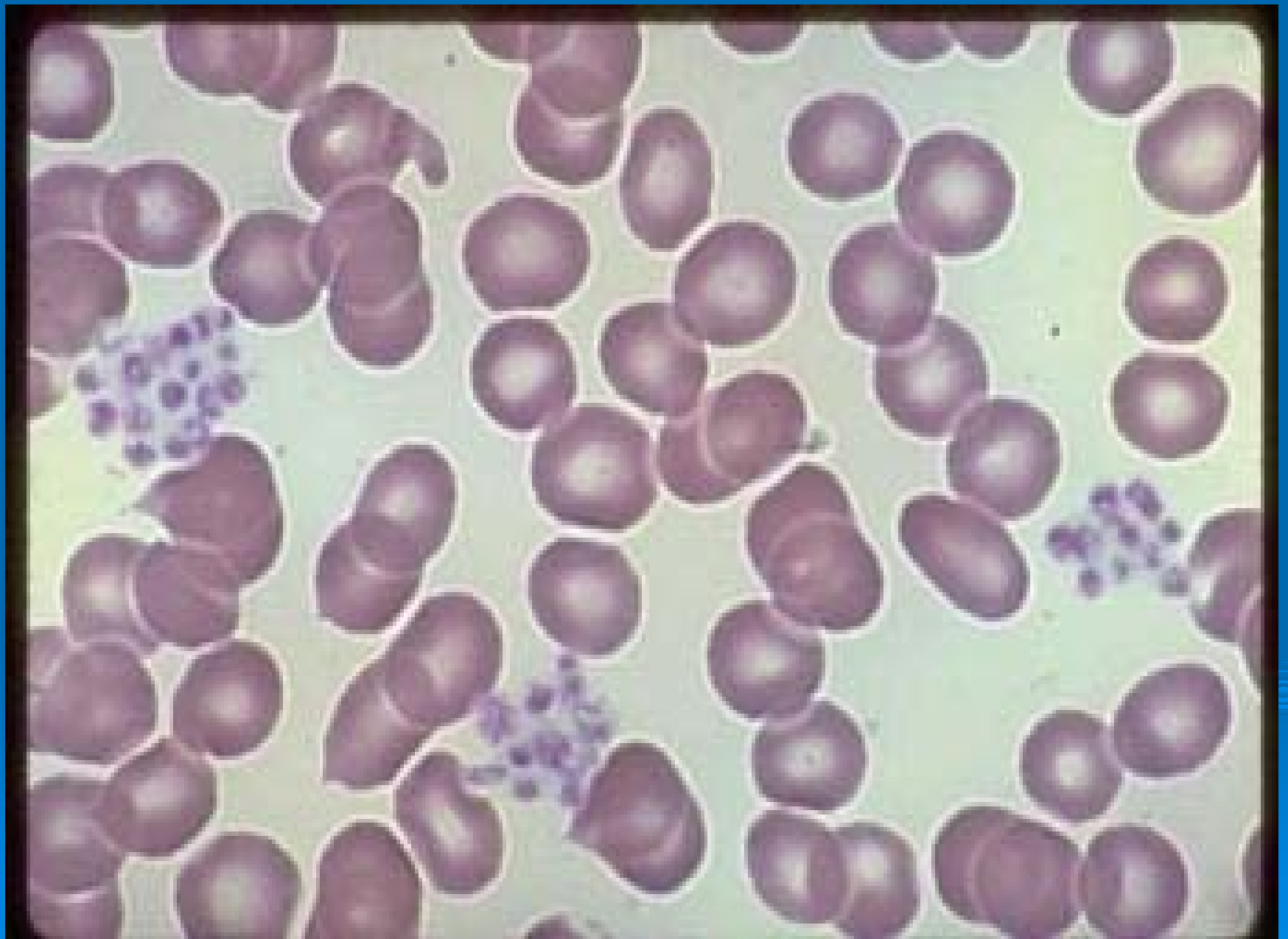
Endoplasmic reticulum

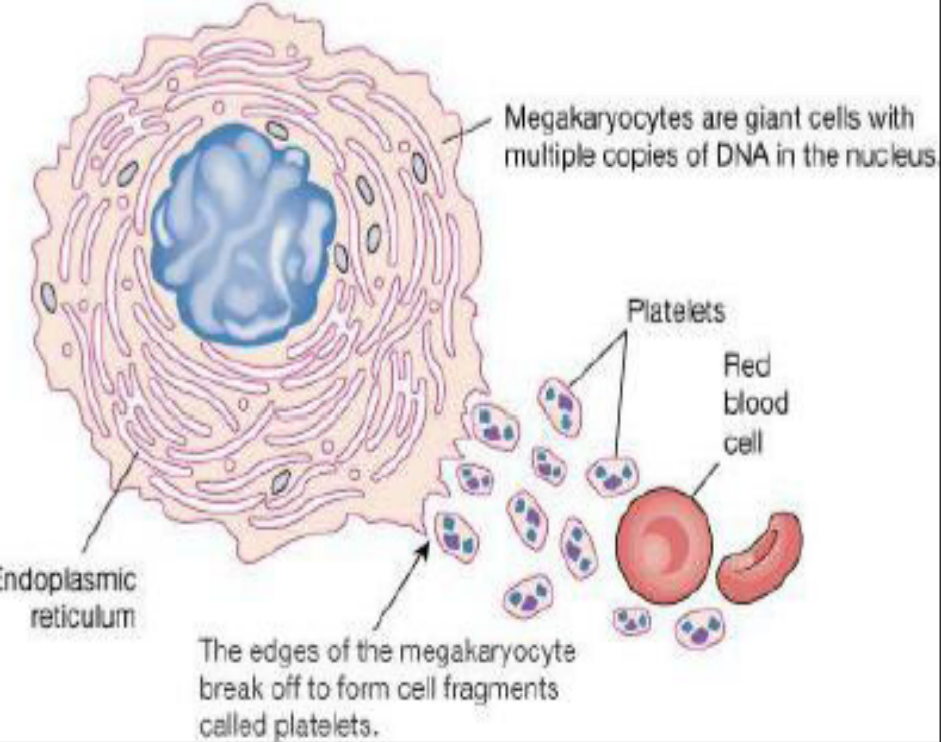
Megakaryocyte

Platelets

Red blood cell







- Od 30-50% płytek znajduje się w śledzionie (tzw. **pula śledzionowa**), gdzie również następuje ich rozkład.
- Po usunięciu śledziony - 75% płytek rozkłada wątroba.
- Reszta płytek to tzw. **pula pozaśledzionowa** obejmująca krwinki płytkowe znajdujące się w naczyniach krwionośnych.

Płytki pełnią dwie zasadnicze funkcje:

1. **Tworzą hemostatyczny czop płytkowy**, który przywraca ciągłość uszkodzonej ściany naczynia. Etapami tworzenia czopa płytkowego są: adhezja płytek do warstwy podśródbłonkowej; aktywacja płytki, zmiana jej kształtu, uwalnianie zawartości - ziarnistości (enzymów lizosomalnych); agregacja, aktywacja układu krzepnięcia na odsłanianych fosfolipidach powierzchni płytek.
2. **Biorą udział w reakcjach układu krzepnięcia**: udostępniają fosfolipidy, na powierzchni których aktywowany jest wewnątrzpochođny układ krzepnięcia; uwalniają czynnik V, przemieszczają czynnik XIII z cytozolu na powierzchnię.

Składniki ziarnistości wewnątrzpłytkowych

➤ Ziarnistości α :

- białka swoiste płytek krwi-czynnik płytkowy 4(PF4) i β -trombomodulina
- Czynniki krzepnięcia i fibrynolizy: fibrynogen, cz V, wielkocząst kininogen HMWK, cz XI, białko C i S
- Białka adhezyjne: cz von Willebranda

Ziarnistości gęste:

ADP , ATP, serotonina, jony wapnia

- W miejscu uszkodzenia naczynia krwionośnego w ciągu kilku sekund przylegają płytki krwi, z których uwalniane są czynniki zlepiające dalsze płytki w agregaty oraz serotonina i tromboksan – odpowiedzialne za skurcz uszkodzonego naczynia.
- **Hemostaza pierwotna** to powstanie płytkowych czopów hemostatycznych, zasklepiających światło przeciętego naczynia. Uszkodzona ściana naczyniowa jest źródłem czynnika tkankowego TF zwanego tromboplastyną tkankową

- Czynniki tkankowe inicjują aktywację krzepnięcia krwi, którego wynikiem jest powstanie skrzepu fibrynowego.
- Fibryna tworzy sieć splatającą i wzmacniającą płytkowy czop hemostatyczny. Jest to etap **hemostazy wtórnej**.
- Zadaniem endogennych inhibitorów krzepnięcia, do których zalicza się -antytrombinę III (ATIII), białko C (PC) i białko S (PS), jest ograniczenie narastania czopu hemostatycznego
- Czop hemostatyczny, który powstaje w niewłaściwym miejscu i jego rozwój nie jest kontrolowany to jest- **zakrzep**

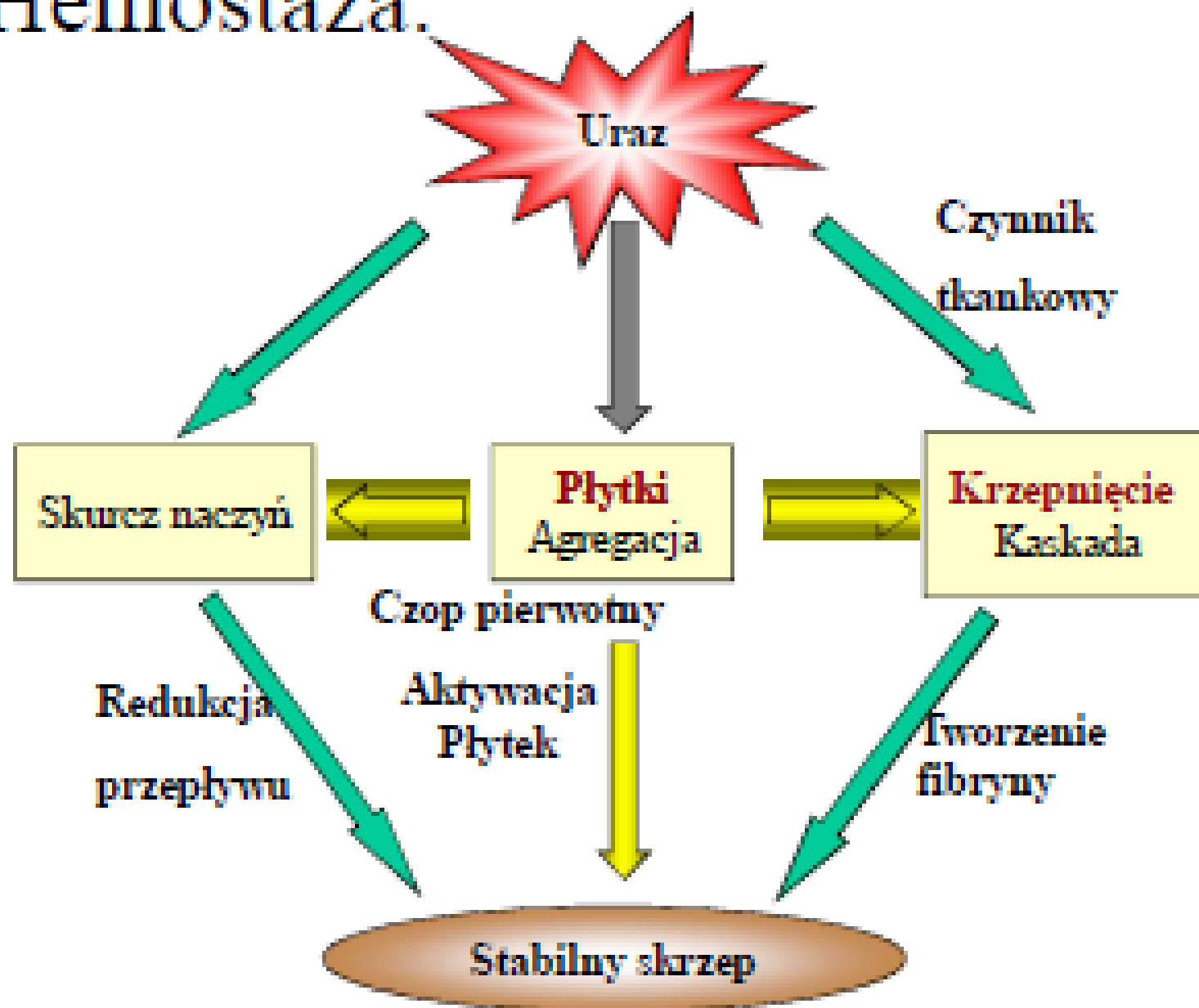
- Rolą **układu fibrynolizy** jest rozpuszczanie śródnaczyniowych złogów fibryny i utrzymanie drożności łoża naczyniowego.
- **Hemostaza to proces trójfazowy** złożony z:
 - **hemostazy pierwotnej** – angażującej naczyń i płytki krwi , trwającej 3-5 minut i zakończonej wytworzeniem czopu płytkowego
 - **procesów krzepnięcia**- aktywowanych przez czynnik tkankowy TF w układzie zewnątrzpochodnym oraz na powierzchni fosfolipidów płytkowych (ukł.wewnątrzpochodny), wykorzystującego czynniki osoczowe i czynnik płytkowy 3, trwającego 5-10 minut i zakończonego wytworzeniem fibryny wzmacniającej czop płytkowy (skrzep ostateczny)

- Fibrynolizy – trwającej 48-72 godzin i powodującej rozpuszczenie złogów fibryny przez plazminę i usunięcie elementów czopa przez komórki żerne

Istotą procesu krzepnięcia jest:

- # przekształcenie rozpuszczalnego białka – fibrynogenu – w początkowo rozpuszczalną i niestabilną, a następnie w nierozpuszczalną sieć fibryny.

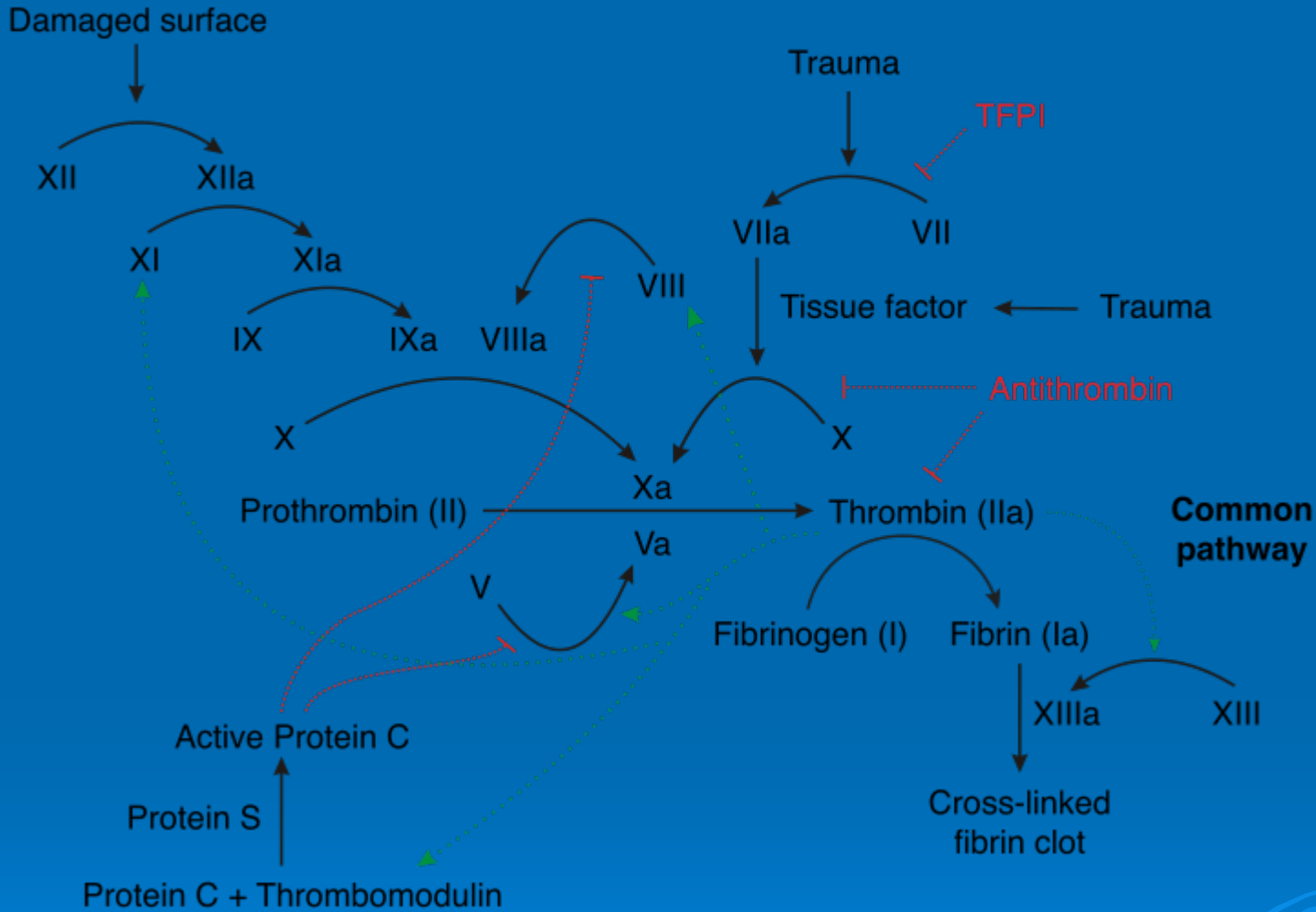
Hemostaza:



- W warunkach fizjologicznych *in vivo* procesy hemostazy pierwotnej, krzepnięcia i fibrynolizy są nierozdzielnie połączone a głównym aktywatorem krzepnięcia jest **czynnik tkankowy TF**, pochodzący z uszkodzonych tkanek.

Contact activation (intrinsic) pathway

Tissue factor (extrinsic) pathway



aktywatory
wewnętrzne

XII \Rightarrow XIIIa

Prekalikreina

Kalikreina

aktywatory
zewnętrzne

XI \Rightarrow XIa

IX \Rightarrow IXa

VIII + IXa + FL + Ca⁺⁺

VII + cz. tkankowy + Ca⁺⁺ \Rightarrow VIIa

VII

X \Rightarrow Xa

Xa + V + FL + Ca

Protrombina

Trombina

XIII \Rightarrow XIIIa

Fibrynogen

Fibryna

Fibryna
stabilizowana

Na fosfolipidach (FL)
błon komórkowych
powstają kompleksy
enzymatyczne:

> tenaza
VIIIa + IXa + FL + Ca⁺⁺

> protrombinaza
Xa + Va + FL + Ca⁺⁺

Czynnik tkankowy = tromboplastyna tkankowa

DROGA ZEWNĄTRZPOCHODNA

TROMBOPLASTYNA TKANKOWA
czynnik III

+ Ca^{2+}

CZYNNIK VII

TROMBOPLASTYNA TKANKOWA
czynnik III

Ca^{2+}

CZYNNIK VIIa

+

+

CZYNNIK IX → CZYNNIK IXa

CZYNNIK VIII

Ca^{2+}

+

CZYNNIK X → CZYNNIK Xa

WSPÓLNA DROGA KRZEPNIĘCIA

TOR ZEWNĄTRZ-
POCHODNY

TOR WEWNĄTRZ-
POCHODNY

+

CZYNNIK X → CZYNNIK Xa

Błona trombocytu

Ca²⁺

CZYNNIK Xa

CZYNNIK V

CZYNNIK II

Ca²⁺

+

CZYNNIK IIa

CZYNNIK XIIIa

CZYNNIK XIII

+

Fibryna II
nierozpuszczalna

Fibryna I
wodorozpuszczalna

Fibryna
monomer

Krótką charakterystyka niektórych czynników krzepnięcia

Czynnik	Charakterystyka
Czynnik I	Fibrynogen – glikoproteina złożona, stęż. ok. 3-4 g/l. Również białko ostrej fazy – poziom rośnie w procesach zapalnych.
Czynnik II	Protrombina – stęż. 200 mg/l. Może być aktywowana przez modyfikację konformacyjną przez koagulazę gronkowcową, co może być elementem DIC w sepsie.
Czynnik III	Czynnik tkankowy (TF) – tromboplastyna tkankowa
Czynnik IV	Jony wapnia
Czynnik V	Proakceleryna - glikoproteina ułatwiająca aktywację protrombiny.
Czynnik VII	Prokonwertyna – czynnik trwały. Jest syntetyzowany w wątrobie zależnie od wit. K.
Czynnik VIII	Czynnik antyhemofilowy A. Niedobór powoduje chorobę von Willebranda.

Krótką charakterystyka niektórych czynników krzepnięcia

Czynnik	Charakterystyka
Czynnik IX	Czynnik Christmasy i przeciwhemofilowy B. Syntetyzowany w wątrobie zależnie od wit. K. Dziedziczenie sprzężone z płcią. Niedobór wywołuje łagodniejszą formę hemofilii – hemofilię B.
Czynnik X	Czynnik Stuarta – Prowera. Syntetyzowany w wątrobie zależnie od wit. K. łączy drogę zewnątrz i wewnątrzpochodną układu krzepnięcia.
Czynnik XI	Czynnik przeciwhemofilowy C. W osoczu krąży w kompleksie z HMWK.
Czynnik XII	Czynnik Hagemanna. Aktywacja czynnika kontaktu prowadzi do uruchomienia układu krzepnięcia.
Czynnik XIII	Czynnik Laki-Lorand'a. Czynnik stabilizujący fibrynę.

1. **Białkowe czynniki krzepnięcia**, które możemy podzielić na 3 grupy:

a) czynniki zespołu protrombiny - II-protrombina; VII-prokonwertyna - czynnik stabilny; IX-czynnik Christmаса - przeciwhemofilowy B (PTC - *Plasma Thromboplastin Component*), X-czynnik Stuarta i Prowera

b) czynniki wrażliwe na trombinę - I-fibrynogen, V-proakceleryna, VIII-czynnik przeciwhemofilowy A, XI-czynnik Rosenthala (według Gailaniego i Brozego), XIII-fibrynaza (transglutaminaza osoczowa)

c) czynniki kontaktu: XII-czynnik Hagemana, **prekalikreina** (czynnik Fletchera), **HMWK** - czynnik Fitzgeralda (kininogen wielkocząsteczkowy) – nie są konieczne do aktywacji procesów krzepnięcia *in vivo*, ale uczestniczą w regulacji procesów fibrynolitycznych i generacji peptydów oddziałujących na naczynia (np. bradykininy).

2. **Jony wapnia** (czynnik IV).

3. **Czynnik tkankowy**, tromboplastyna tkankowa (TF, czynnik III).

Czynnik	Synonim	Rola w krzepnięciu
I	Fibrynogen	Prekursor fibryny
II	Protrombina	proenzym
III	Czynnik tkankowy	Kofaktor
IV	Jony wapniowe	
V	Proakceleryna	Kofaktor
VI	Akceleryna- aktyw. forma cz V	
VII	Prokonwertyna	proenzym
VIII	Czynnik przeciwhemofilowy A	kofaktor
IX	Czynnik przeciwhemofilowy B	proenzym

X	Czynnik Stuarta	Proenzym
XI	Czynnik przeciwhemofilowy C	Proenzym
➤XII	Czynnik Hagemana-Cz. kontaktu	Proenzym
XIII	Czynnik stabilizujący fibrynę	Proenzym
Prekali- kreina	Cz Fletchera	Proenzym
WK	Cz Fitzgeralda	kofaktor

- Mechanizmem zapłonowym dla szlaku wewnątrzpochodnego jest **aktywacja cz XII** w kontakcie z ujemnie naładowaną powierzchnią – którą *in vivo* jest kolagen odsłonięty w wyniku uszkodzenia ściany naczyń
- Do szybkiej aktywacji cz XII niezbędna jest prekalikreina i wielkocząsteczkowy kininogen – WK
- Następuje kaskadowy proces uczynniania kolejnych cz krzepnięcia

- Uruchomienie układu zewnątrzpochodnego inicjuje tromboplastyna (cz. tkankowy) uwalniana do krwi z uszkodzonych tkanek.
- aktywacja cz. VII (prokonwertyny) prowadzi do aktywacji fazy krzepnięcia wspólnej dla ukł. zewnątrzpochodnego i wewnątrzpochodnego.
- faza ta obejmuje aktywację cz. Stuarta X i cz. V (proakceleryny), przejście protrombiny w trombinę II, a następnie częściową degradację fibrynogenu z utworzeniem monomerów fibryny a następnie pod wpływem zaktywowanego cz XIII – powstaje fibryna stabilizowana.

Zasady pobierania krwi do badań układu krzepnięcia:

- pobiera się krew żylną, po 15-minutowym odpoczynku,
- nie bada się krwi pobranej z cewnika wprowadzonego na stałe do żyły, bo próbka może zawierać heparynę-hamującą krzepnięcie krwi (stosowaną do przemywania cewnika),
- materiałem do badań jest osocze , stosunek obj krwi do obj roztworu koagulantu powinien wynosić **9:1**. Cytrynian trójsodowy kompleksuje jony wapnia , stabilizuje labilne cz krzepnięcia –V i VIII.
- badania ukł. krzepnięcia powinny być wykonywane natychmiast po odwirowaniu próbki, dopuszcza się wykonanie badania do 2 godzin od pobrania.

Metody pomiarowe stosowane w badaniach układu krzepnięcia:

- ogólne – czynnościowe (ocena funkcji naczyń i płytek)
- ogólne- koagulometryczne (ocena wykrzepiania, aktywności danego białka)
- immunologiczne- z użyciem specyficznych przeciwciał
- biochemiczne chromogenne
- diagnostyki molekularnej

Podstawy diagnostyki skłonności do krwawień:

- Wywiad, badanie przedmiotowe daje informacje czy to jest skaza z zaburzeń naczyniowo-płytkowych czy osoczowych
- Krwawienia powierzchowne, z dziąseł i nosa to najczęstsze defekty płytkowo-naczyniowe
- Krwawienia rozległe, opóźnione i przedłużone krwawienia domięśniowe i donarządowe (artropatie w hemofiliach)- zaburzenia osoczowe

➤ Diagnostyka laboratoryjna w przypadku pacjenta ze skłonnością do krwawień ma na celu różnicować zaburzenia:

- naczyniowe,
- płytkowe,
- osoczowe.



Czas krwawienia:

- Klasyczne badanie zaburzeń hemostazy, obecnie wykonywane rzadko, zastępowane przesiewowymi badaniami czynności płytek
- Jest to czas od momentu wystandaryzowanego zranienia skóry do chwili ustania wypływu krwi-ocenia hemostazę pierwotną *in vivo*
- Jest miarą czynności krwinek płytkowych- ilości i ich funkcji adhezyjno-agregacyjnych oraz naczyń; nie zależy od procesów krzepnięcia
- Jest testem przesiewowym dla wrodzonych i nabytych zaburzeń czynnościowych płytek

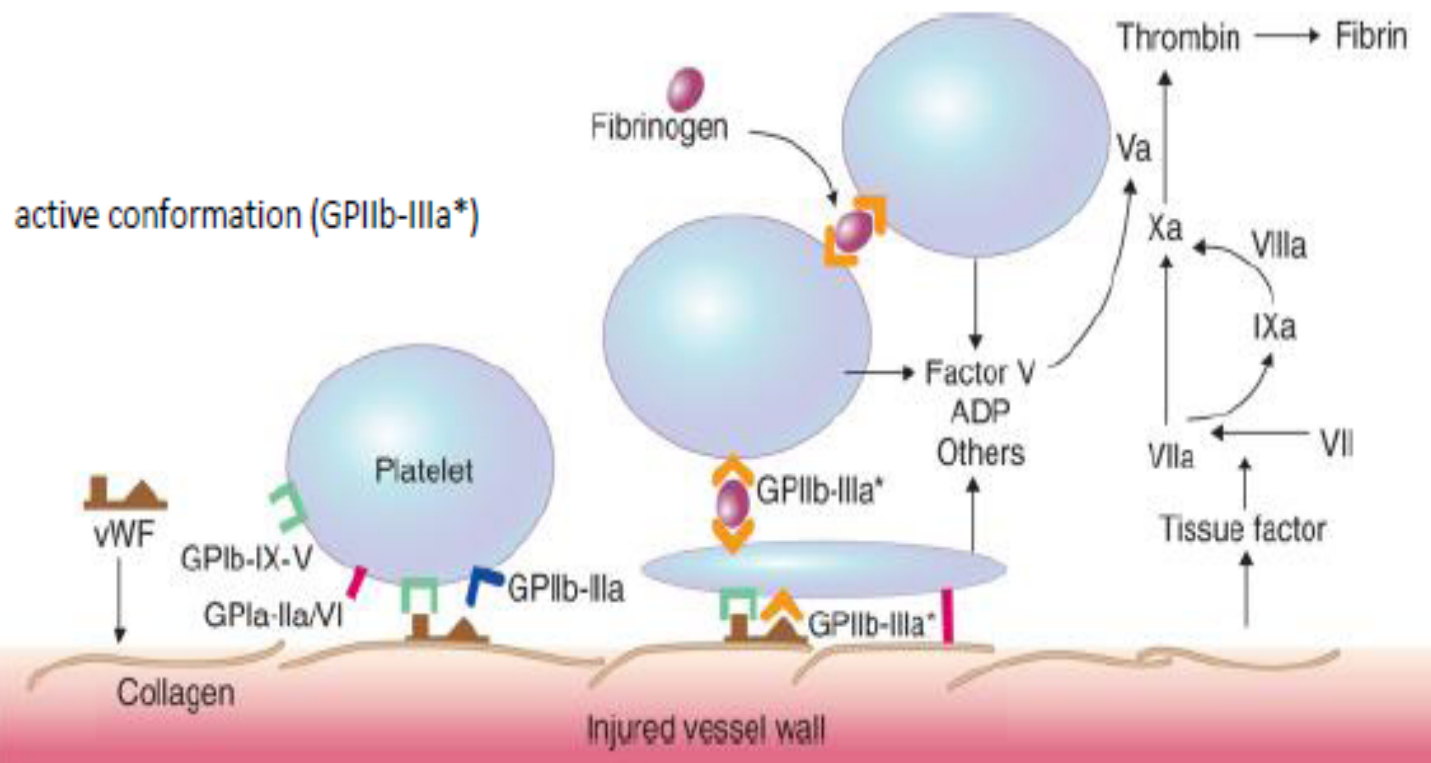
- **Czas krwawienia pomocny jest w diagnostyce choroby von Willebranda**
- Wartości prawidłowe: czas krwawienia nie powinien przekraczać 7 minut (420 s)
- Jest **przedłużony** w małopłytkowościach, w białaczkach, marskości wątroby, niektórych chorobach zakaźnych, skazach naczyniowych, przy stosowaniu leków zaburzających funkcję płytek

Częściej zamiast czasu krwawienia wykonywany jest **czas okluzji**- test funkcji płytek, który diagnozuje defekty płytkowe lub płytkowo-osoczowe (Ch. Willebranda)

Czynnik von Willebranda

- Odgrywa ważną rolę w pierwotnej i wtórnej hemostazie
- Glikoproteina syntezowana w komórkach śródbłónka naczyniowego i megakariocytach
- Pełni podwójną rolę w hemostazie: bierze udział w tworzeniu płytkowego czopu hemostatycznego, pośrednicząc w adhezji PLT w miejscu uszkodzenia naczynia oraz tworzy kompleks z cz VIII chroniąc go przed proteolityczną degradacją i eliminacją z krwioobiegu

- Choroba dziedziczona autosomalnie dominująco (rzadko recesywnie), niezależnie od płci spowodowana niedoborem lub nieprawidłowym funkcjonowaniem czynnika von Willebranda (vWF).
- Niedobór vWF jest spowodowany mutacją genu kodującego czynnik, zlokalizowanego na chromosomie 12 (12p13.2).
- vWF jest multimeryczną glikoproteiną pełniącą funkcję kofaktora adhezji płytek krwi do włókien kolagenu podścieliskowej tkanki łącznej



vWF chroni czynnik przed proteolityczną degradacją w osoczu

Klasyfikacja choroby von Willebranda

wg. Medycyna Praktyczna, Zalecenia PTHIT 12, 2008 oraz 2011

Typ	Charakterystyka	Postać kliniczna (krwawienia)
1	Częściowy niedobór ilościowy , proporcjonalne obniżenie antygenu i aktywności	Łagodna lub umiarkowana
2A	Niedobór jakościowy : upośledzona adhezyjna funkcja płytek, zmniejszenie ilości/brak dużych multimerów	Różna
2B	Niedobór jakościowy : wzrost powinowactwa vWF do płytkowej GP Ib/IX, nieprawidłowe/brak dużych multimerów	Różna
2M	Niedobór jakościowy : obniżenie powinowactwa vWF do płytkowej GP Ib/IX, brak zmian multimerowych	Różna
2N	Niedobór jakościowy : spadek powinowactwa vWF do czynnika VIII	Różna
3	Całkowity niedobór ilościowy z dużym obniżeniem aktywności czynnika VIII	Ciężka

Kliniczne objawy vW

- Krwawienia z dziąseł, nosa, błon śluzowych przewodu pokarmowego i dróg oddechowych
- ☒ Podskórne krwawe wylewy
- ☒ Krwawienia po ekstrakcji zębów i zabiegach chirurgicznych
- ☒ Przedłużające się, obfite krwawienia miesięczne oraz powikłania okołoporodowe
- ☒ Wylewy do stawów i mięśni, u około połowy chorych, zwykle bez objawów artropatii.
- **Objawy klasycznej, wrodzonej choroby von Willebranda łagodnieją z wiekiem, natomiast nasilające się objawy w wieku starszym mogą być związane z rozwojem nabytej postaci choroby. po ekstrakcji zębów i zabiegach chirurgicznych**

Schemat badania pacjenta z cechami skazy krwotocznej:

1. Wywiad rodzinny+ cechy krwawienia
2. Badanie fizykalne - cechy krwawienia, choroby towarzyszące
3. Badania przesiewowe i uzupełniające:

płytkowe i naczyniowe:

- Liczba PLT
- Rozmaz krwi
- Czas krwawienia
- -cytometria przepływ.

krzepnięcia:

- APTT
- PT, TT
- fibrynogen
- ozn czynników,
inhibitory
- cz vW

fibrynolizy:

- DD, TT
- plazminogen
- antyplazmina

osoczowe

spowodowane niedoborami poszczególnych osoczowych czynników krzepnięcia



płytkowe

spowodowane ilościowym lub jakościowym uszkodzeniem płytek krwi; stanowią ok. 2/3 wszystkich skaz krwotocznych

małopłytkowość



naczyniowe

rzadko prowadzą do poważniejszych krwawień, gdyż funkcja płytek krwi jest prawidłowa a układ osoczowy sprawny

plamica Schönleina-Henocha



Obraz kliniczny skaz krwotocznych



Obraz kliniczny	Zaburzenia płytkowe	Niedobory osoczowych czynników krzepnięcia
Lokalizacja krwawienia	Skóra i błony śluzowe	Tkanki miękkie
Krwawienie po delikatnych urazach	Tak	Czasami
Wybroczyny	Obecne	Brak
Plamica	Zmiany niewielkie, powierzchowne	Zmiany duże i wyczuwalne palpacyjnie
Wylewy stawowo-mięśniowe	Rzadko	Często
Krwawienia po zabiegach operacyjnych	Łagodne i umiarkowane	Ciężkie, opóźnione

Diagnostyka łagodnych skaz krwotocznych

Greaves M.: J Haemost. Thromb. 2007, 5, 167

Zaburzenia hemostazy pierwotnej

Nabyte:

- Leczenie p-płytkowe
- Trombocytopenie
- Schorzenia hematologiczne
- Ciężka niedomoga nerek

Wrodzone:

- Choroba von Willebranda
- Jakościowe defekty płytkowe

Zaburzenia krzepnięcia/fibrynolizy

Nabyte

- Choroby wątroby
- Niedobory wit. K
- Leczenie antykoagulantami
- Inhibitory czynników

Wrodzone

- Niedobory czynników np. V, VII...XI...
- **Niedobór czynnika XIII**
- **Niedobór alfa₂antyplazminy**

Jatrogenne !!!

Osoczowe zaburzenia hemostazy - wrodzone

- ✿ **Hemofilia A i B**
- ✿ **Choroba von Willebranda**
- ✿ **Niedobory poszczególnych czynników krzepnięcia**

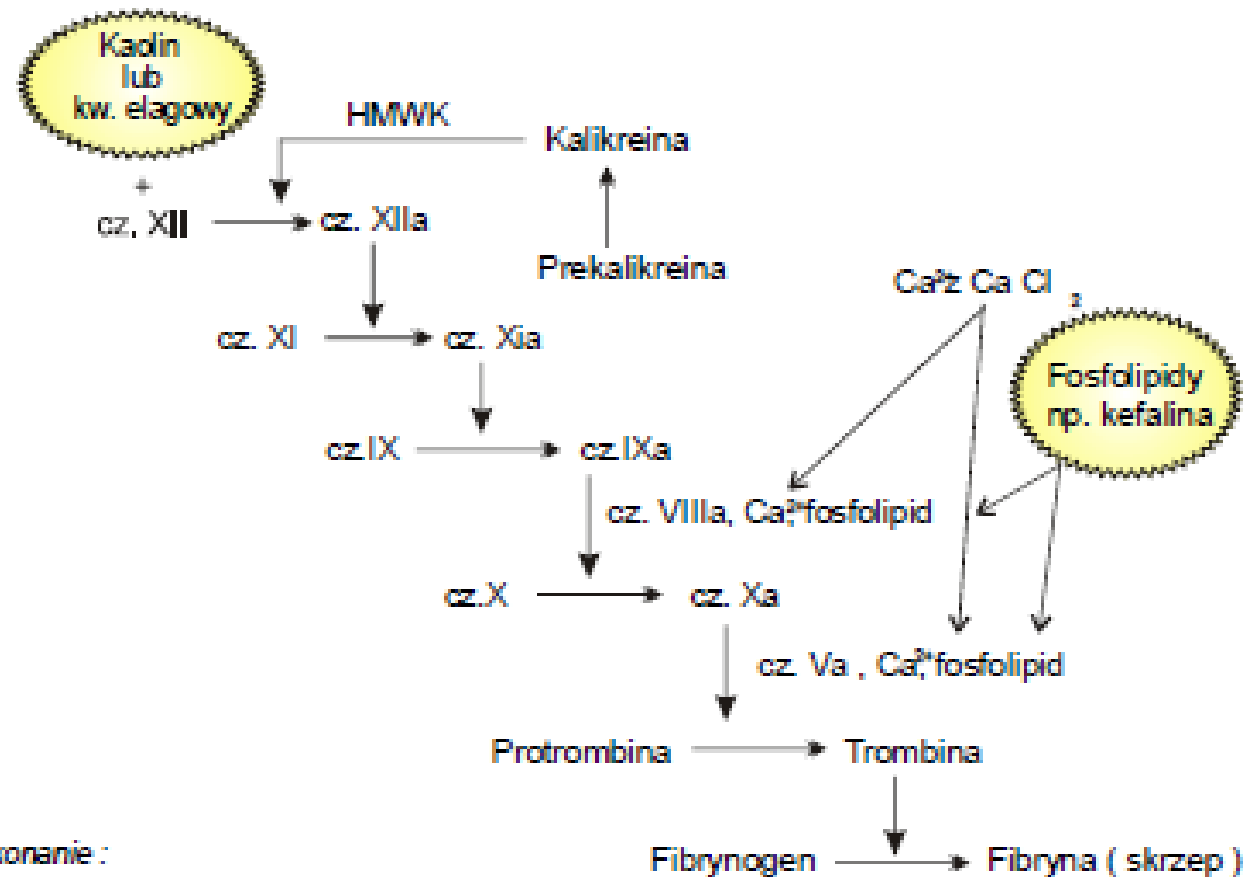
Osoczowe zaburzenia hemostazy - nabyte

- ✿ **Niedobór witaminy K (np. leczenie doustnymi antykoagulantami)**
- ✿ **Choroby wątroby**
- ✿ **DIC**
- ✿ **Obecność krążących antykoagulantów**
- ✿ **Leczenie heparyną**
- ✿ **Masywne przetoczenia krwi**

Badania oceniające wewnątrz-, zewnątrzpochodną i wspólną drogę kaskady krzepnięcia:

- Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji-
APTT - miara wewnątrzpochodnego
ukł. aktywacji protrombiny
- zależy on od zawartości w osoczu czynników : **II, V, VIII, IX, X, XI, XII** i fibrynogenu, nie zależy od liczby **PLT**

Zasada oznaczania czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT)



Wykonanie :

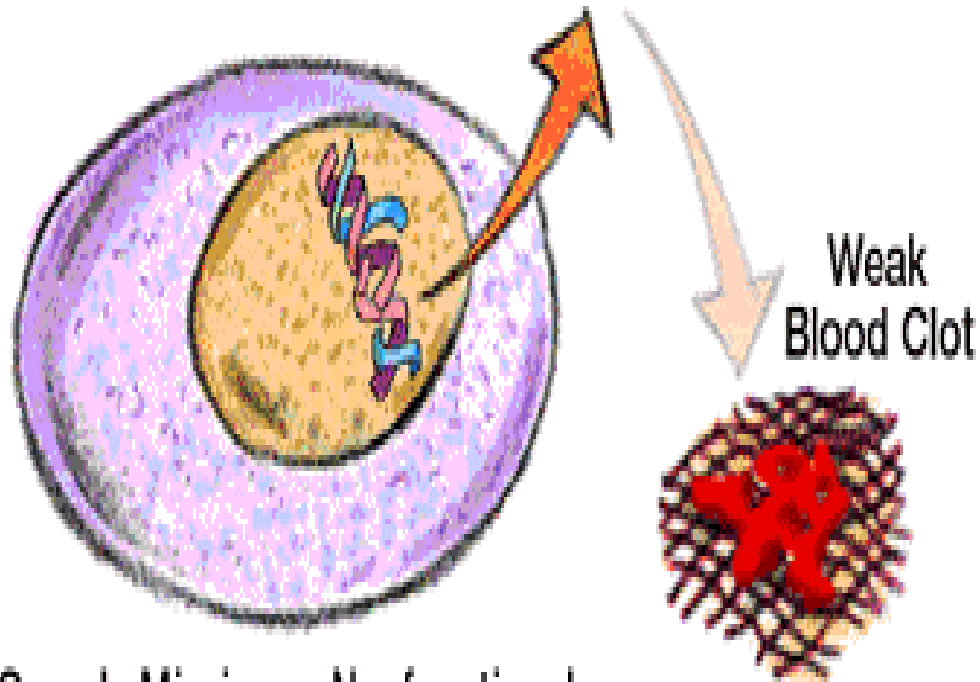
- 0.1 ml osocza
- 0.1 ml odcz. do APTT
(np. kaolin + fosfolipidy
+ Ca Cl₂)

37°C, zmierzyć czas (sek.)

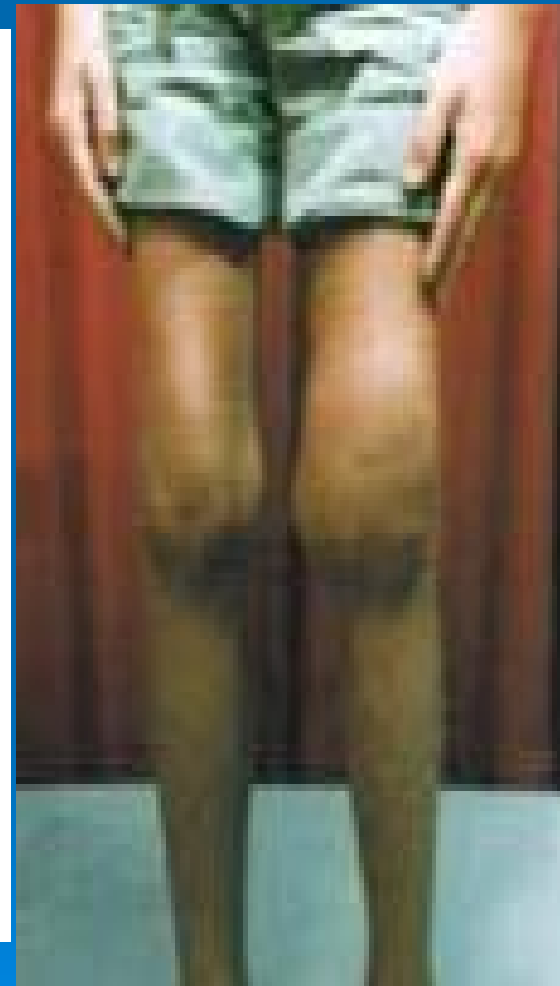
APTT- przedłużony w:

- Hemofiliach typu :
 - A - wrodzony niedobór cz. VIII
 - B - wrodzony niedobór cz. IX
- Wrodzonych niedoborach cz. II, V, X, XI, XII
- Niedobór fibrynogenu
- Niektórych postaciach ch von Willebranda
- Obecności inhibitorów krzepnięcia
(heparyna, krążące antykoagulanty)
- wydłużenie APTT jest zauważalne przy niedoborach cz. krzepnięcia rzędu 40-50% normy

No Factor VIII
or Factor IX Produced



Gene Is Missing or Nonfunctional



Haemophilia

Hemofilia A – spowodowana mutacją w *locus* Xq28 powodującą niedobór VIII czynnika krzepnięcia krwi (czynnika antyhemolitycznego); klasyczna hemofilia.

Hemofilia B – mutacja w *locus* Xq27.1-q27.2, niedobór IX czynnika krzepnięcia krwi (czynnika Christmаса).

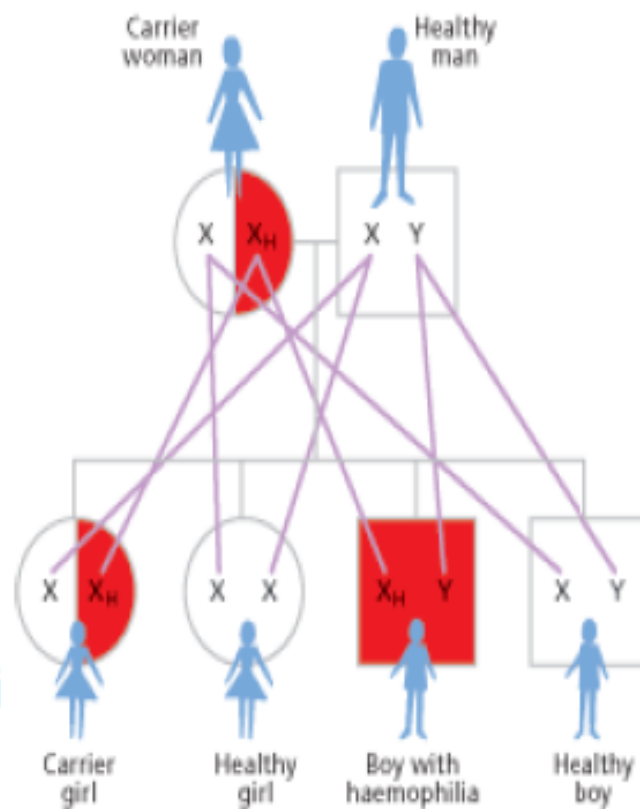
Hemofilia C – mutacja w *locus* 4q35, niedobór XI czynnika krzepnięcia krwi (czynnika Rosenthala), najczęściej w populacji Żydów Aszkenazyjskich

Objawy:

- krwawienia spontaniczne lub wtórne do urazów lub operacji (w zależności od postaci choroby – ciężka lub łagodna)
- krwawienia dostawowe (bolesność, obrzęki)
- krwiomocz
- krwawienia śródczaszkowe (najgroźniejsze dla życia)
- krwawienia z błon śluzowych (z nosa, krwiopłucie)
- krwawienia pooperacyjne, po ekstrakcji zęba

Leczenie:

- substytucja czynnika VIII (hemofila A) lub IX (hemofilia B)



Łączna częstość hemofilii A i B w populacji wynosi około 1:12 000. Hemofilia A jest 4 do 8 razy częstsza niż hemofilia B.

APTT ↑

liczba płytek, czas N
krwawienia, PT

APTT- prawidłowy:

- Naczyniowych i płytkowych skazach krwotocznych,
- Niewielkich zaburzeniach wewnątrz- i zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia (łagodne postaci hemofilii)

Skrócenie APTT nie ma znaczenia diagnostycznego

APTT nie zależy od liczby PLT

- **APTT** – test przesiewowy dla wewnątrzpochodnej i wspólnej drogi ukł. krzepnięcia
- **wskazane przed zabiegami chirurgicznymi, bo pozwala na identyfikację pacjentów chorych na hemofilię**
- Po inkubacji osocza z odczynnikiem do APTT zawierającym mieszaninę fosfolipidów i aktywatorów czynników kontaktu dodaje się chlorek wapnia i mierzy czas do wytworzenia skrzepu
- Wynik pomiaru zależy od zawartości czynników kontaktu oraz czynników **VIII i IX**.

- Wykonuje się dwa pomiary APTT, a następnie wylicza średnią
- Różnica między wynikami obu pomiarów nie powinna być większa niż **10%**
- Pomiar APTT zalecany jest do lab. kontroli leczenia **heparyną niefrakcjonowaną wielkocząsteczkową UFH** - jest ona lekiem przeciwzakrzepowym, stosowanym u pacjentów z żylną i tętniczą zakrzepicą, w profilaktyce żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej; terapeutyczne stężenie heparyny we krwi odpowiada **1,5-2,5- krotne** przedłużenie APTT w porównaniu do wartości przed leczeniem

- Leczenie **heparynami niskocząsteczkowymi LMWH** prowadzące do wybiórczej inaktywacji **cz Xa**, nie wpływa na wartości APTT i nie wymaga regularnego monitorowania
- Metodą z wyboru w monitorowaniu leczenia LMWH jest oznaczanie aktywności anty-Xa
- W szczególnych przypadkach: ciąża, przewlekłe choroby wątroby i nerek, powikłania krwotoczne lub zakrzepowe, dzieci, osoby starsze należy oznaczać aktywność anty-Xa

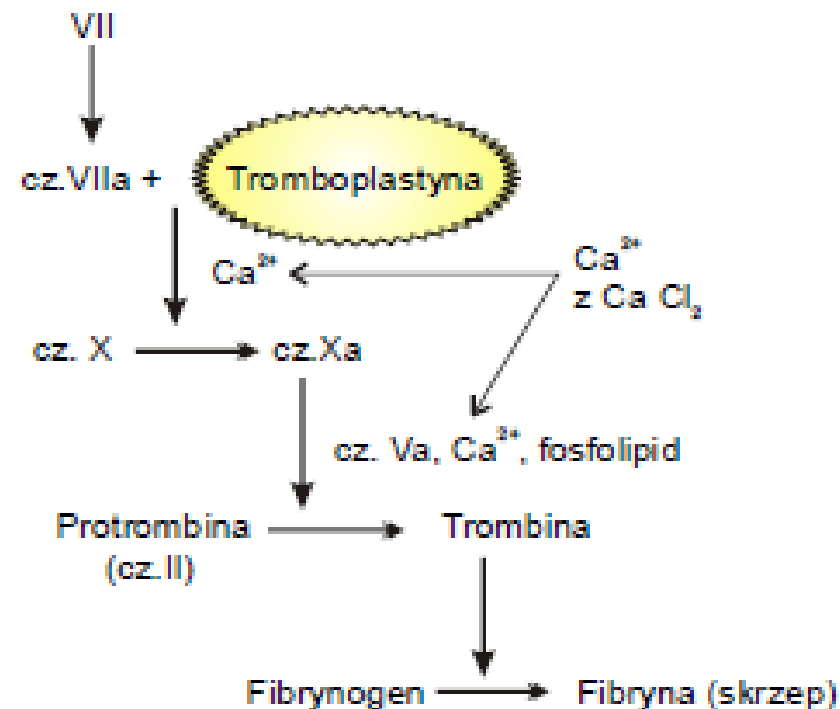
Czas protrombinowy- PT

- Jest miarą zewnątrzpochodnego układu aktywacji protrombiny
- Zależy od zawartości **protrombiny, czynników V, VII, X i fibrynogenu**, nie zależy od pozostałych cz. krzepnięcia i liczby PLT
- Jest badaniem z wyboru do monitorowania terapii przeciwzakrzepowej antagonistami witaminy K; wart. prawidłowe od 11 do 14 s i zależą od aktywności używanej tromboplastyny

- PT określa czas krzepnięcia osocza po dodaniu tkankowej tromboplastyny-
czyli czynnika tkankowego, który w kontakcie z cz VII uczynnia zewnątrzpochodny układ krzepnięcia a następnie przekształcenie fibrynogenu w fibrynę



Zasada oznaczania czasu protrombinowego (PT)



Wykonanie :

- 0.1 ml osocza
- 0.1 ml tromboplastyny (+ CaCl₂)

37°, zmierzyć czas (sek)

Sposoby wyrażania wyniku PT

- Najczęściej wynik wyraża się jako procentowy wskaźnik czasu protrombinowego :

[czas PT kontrolny (s) : czas PT osoby badanej (s)] X 100%

lub jako współczynnik czasu PT:

czas PT osoby badanej (s) : czas PT kontrolny(s)

- U chorych leczonych doustnymi antykoagulantami PT powinien być wyrażony w postaci **INR- międzynarodowego współczynnika znormalizowanego**

Sposoby wyrażania czasu protrombinowego (PT)

Czas	Sekundy (s)
Wskaźnik (%)	$\frac{PT (s) \text{ wzorcowe}}{PT (s) \text{ badane}} \times 100 \%$
% aktywności tzw. wskaźnik Quicka	Obliczany z krzywej rozcieńczeń osocza prawidłowego
• współczynnik R	$\frac{PT (s) \text{ badane}}{PT (s) \text{ wzorcowe}}$
INR Międzynarodowy współczynnik znormalizowany	R ISI (międzynarodowy index czułości)

Uwaga: różnice metodyczno-aparaturowe!

INR

- Oblicza się go ze wzoru:
- $INR = (\text{współczynnik czasu PT}) \text{ do potęgi ISI}$, gdzie ISI to międzynarodowy wskaźnik czułości trombolastyny
- Na przykład:

jeśli czas PT osoby badanej = 38s, czas PT osocza kontrolnego = 15s, a $ISI = 1,35$, to $INR = (38/15) \text{ do potęgi } 1,35 = 2,5$ do potęgi $1,35 = 3,4$.

Wartość **ISI** danej serii trombolastyny jest podawana w ulotce do preparatu

Wartości prawidłowe **INR: 0,9 – 1,2;**

wskaźnik PT : **80-120%**

INR - zakresy terapeutyczne w leczeniu doustnymi antykoagulantami (AD)

Zakres INR	Sytuacja kliniczna
2.0-2.5	Zapobieganie zakrzepicy żyłnej (po zabiegach operacyjnych)
<u>2.0-3.0</u>	Zator tętnicy mózgowej Leczenie zakrzepicy żył głębokich Stany niedokrwienne mózgu
3.0-3.5	Nawroty zakrzepicy żyłnej i zatoru tętnicy płucnej Choroby naczyń tętniczych Stany po zabiegach kardiochirurgicznych (zastawki, by-pass)



Uwaga: różnice INR do kilkunastu % w grupie INR > 4.0

Interpretacja PT

- Czas PT jest wydłużony (INR podwyższony, wskaźnik PT obniżony) w:
 - **wrodzonych niedoborach czynników II, V, VII, X**; w przypadku niedoboru cz II, V, X przedłużeniu ulega także APTT
 - przewlekłych chorobach miąższu wątroby,
 - niedoborach witaminy K,
 - rozsiane krzepnięcie śródnaczyniowe DIC,
 - choroba krwotoczna noworodków,
 - w obecności inhibitorów krzepnięcia- heparyna, produkty degradacji fibrynogenu, krążące antykoagulanty u chorych z toczeniem rumieniowatym

Nabyte niedobory czynników krzepnięcia



DIC- koagulopatia ze zużycia

➤ DIC charakteryzuje się:

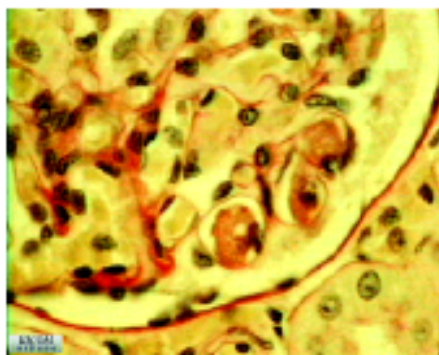
- aktywacją układu krzepnięcia i, w następstwie – układu fibrynolizy
- generacją dużych ilości trombiny i plazminy

DIC nie jest jednostką chorobową jedynie zespołem objawów towarzyszących różnym schorzeniom

Przyczyny

1. Powikłania położnicze i ginekologiczne
2. Wstrząs
3. Infekcje
4. Choroby nowotworowe
5. Hemoliza
6. Uszkodzenia tkanek
7. Anomalie naczyń

Posocznica



■ Uwalnianie tromboplastyny tkankowej

- zawały
- hemoliza
- białaczki promielocytowe
- „katastrofy” położnicze
- nowotwory
- jady węży
- choroba kesonowa

■ Zniszczenie endotelium

- INFEKCJE
- posocznica meningokokowa
- gorączki krwotoczne - EBOLA
- zapalenia naczyń
- zatrucie ciążowe

■ Czynniki, które powodują jedno i drugie

- Wstrząs
- posocznice Gram (-)
- duże zabiegi chirurgiczne
- oparzenia
- urazy

Przebieg DIC



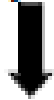
Aktywacja układu krzepnięcia (bez zmian laboratoryjnych)



Zużycie cz. krzepnięcia, mikrozakrzepy w drobnych naczyniach



Zużycie PLT, fibrynogenu i cz. krzepnięcia (oraz inhibitorów krzepnięcia),



Niedobór PLT, czynników (w tym fibrynogenu), aktywacja fibrynolizy



Wtórne objawy krwawienia ← uczynnienie fibrynolizy



OSTRY

PODOSTRY

PRZEWLEKŁY

Etiologia DIC

Napływ do łożyska aktywatorów protrombiny:

- **powikłania położnicze, np. przedwczesne odklejenie łożyska**
- **operacje na narządach bogatych w TF, np. płuca, stercz, trzustka**
- **jawna hemoliza, np. błędne przetoczenie krwi**
- **jady węża**
- **rozpadające się guzy, ostra białaczka promielocytowa**

Pośrednia aktywacja krzepnięcia przez mediatory, np. toksyny bakteryjne:

- **posocznica, zwłaszcza Gram-ujemna**

Kontaktowa aktywacja endogennego układu krzepnięcia:

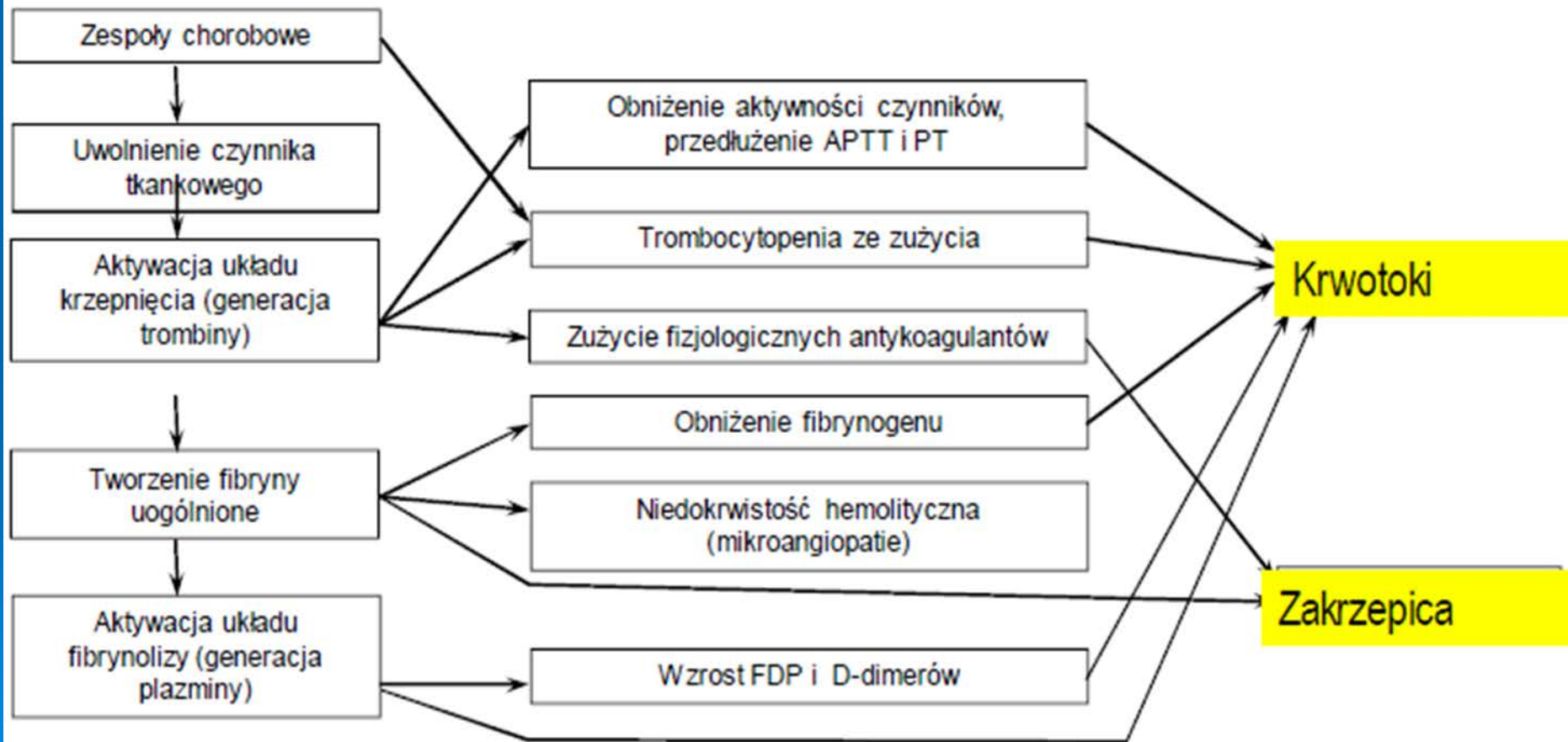
- **krążenie pozaustrojowe**
- **zaburzenie mikrokrążenia we wstrząsie**

Patofizjologia DIC

Przyczyny

Wykładniki laboratoryjne

Objawy kliniczne



Kliniczne objawy koagulopatii

🦋 Skaza krwotoczna:

- broczenie,
- krwinkomocz (krwiomocz),
- krwawienia z dróg rodnych lub oddechowych,
- krwiste stolce, wymioty,
- krwawienie z ran

🦋 Zespół defibrynacji:

- broczenia,
- bóle brzucha i okolicy krzyżowej, bezmocz,
- sinica, drgawki, śpiączka

🦋 **Plamica** – wybroczyny na powierzchni skóry (zakrzepica drobnych naczyń skóry = wynaczynienia), zmiany krwotoczno-martwicze w narządach

🦋 **Purpura fulminans, zespół Waterhouse-Friedrichsena**



Nerka w DIC

Badania laboratoryjne różnicujące ostrą i przewlekłą formę DIC

	Ostry DIC	Przewlekły DIC
Liczba płytek	↓ (umiarkowanie)	↓ (nieznacznie)
Czas protrombinowy	↑	N/nieznaczny ↑
aPTT	↑	N/↓
Czas trombinowy	↑	N/nieznaczny ↑
Fibrynogen	↓	↑/N/nieznaczny ↓
Produkty degradacji fibryny	tak	tak
Czynnik V i VIII	↓	N

Skrócenie czasu PT nie ma znaczenia diagnostycznego

- U chorych ze znacznie przedłużonym PT w wyniku
- leczenia antykoagulacyjnego należy spodziewać się
- przedłużonego APTT (obniżona aktywność cz IX)

Interpretacja wyników oznaczeń PT i APTT:

PT	APTT	wnioski
prawidłowy	wydłużony	niedobór cz VIII (hemofilia A lub choroba von Will.), IX, XI, XII, prekalikreiny lub WK, krążący antykoagulant
wydłużony	prawidłowy	niedobór cz VII, złożony niedobór cz zależnych od witaminy K -zespołu protrombiny (choroby wątroby, leczenie doust.antykoagul.)
wydłużony	wydłużony	niedobór fibrynogenu, zmniejszenie aktywności cz: II, V lub X., zaburzenia krzepnięcia w ch.wątroby, DIC, wpływ heparyny

Wpływ leków na procesy krzepnięcia

- Badania koagulologiczne zmieniają się pod wpływem antykoagulantów, pochodnych kwasu salicylowego i doustnych środków antykoncepcyjnych
- Krzepnięcie krwi hamują salicylany, sulfamidy, leki steroidowe i niektóre antybiotyki
- witamina K, penicylina, niektóre leki neuroleptyczne i epinefryna mogą powodować nadkrzepliwość

- Istnieją trzy główne grupy leków przeciwzakrzepowych o różnym mechanizmie działania: heparyny (niefrakcjonowana), antagoniści witaminy K i leki defibrynujące.
- Mechanizm działania heparyny:
- **Heparyna**, pod postacią soli sodowej, hamuje krzepnięcie krwi na skutek zwiększania działania antytrombiny III.
- Antytrombina III jest alfa 2 globuliną wytwarzaną w wątrobie. Antytrombina III tworzy nieodwracalne kompleksy z trombiną w wyniku czego obydwa te białka unieczynnają się, zaburzając zależne od trombiny szlaki krzepnięcia. Heparyna przyspiesza unieczynnianie trombiny zależne od antytrombiny III.
- Doustne antykoagulanty (antagoniści witaminy K) hamują zależną od witaminy K syntezę w wątrobie osoczowych czynników krzepnięcia II, VII, IX, X.
- Leki defibrylujące zmniejszają stężenie fibrynogenu

Heparyna to kofaktor jednego z najważniejszych naturalnych inhibitorów kaskady krzepnięcia – antytrombiny i działa hamująco na wszystkie etapy, głównie na fazę przejścia protrombiny w trombinę.

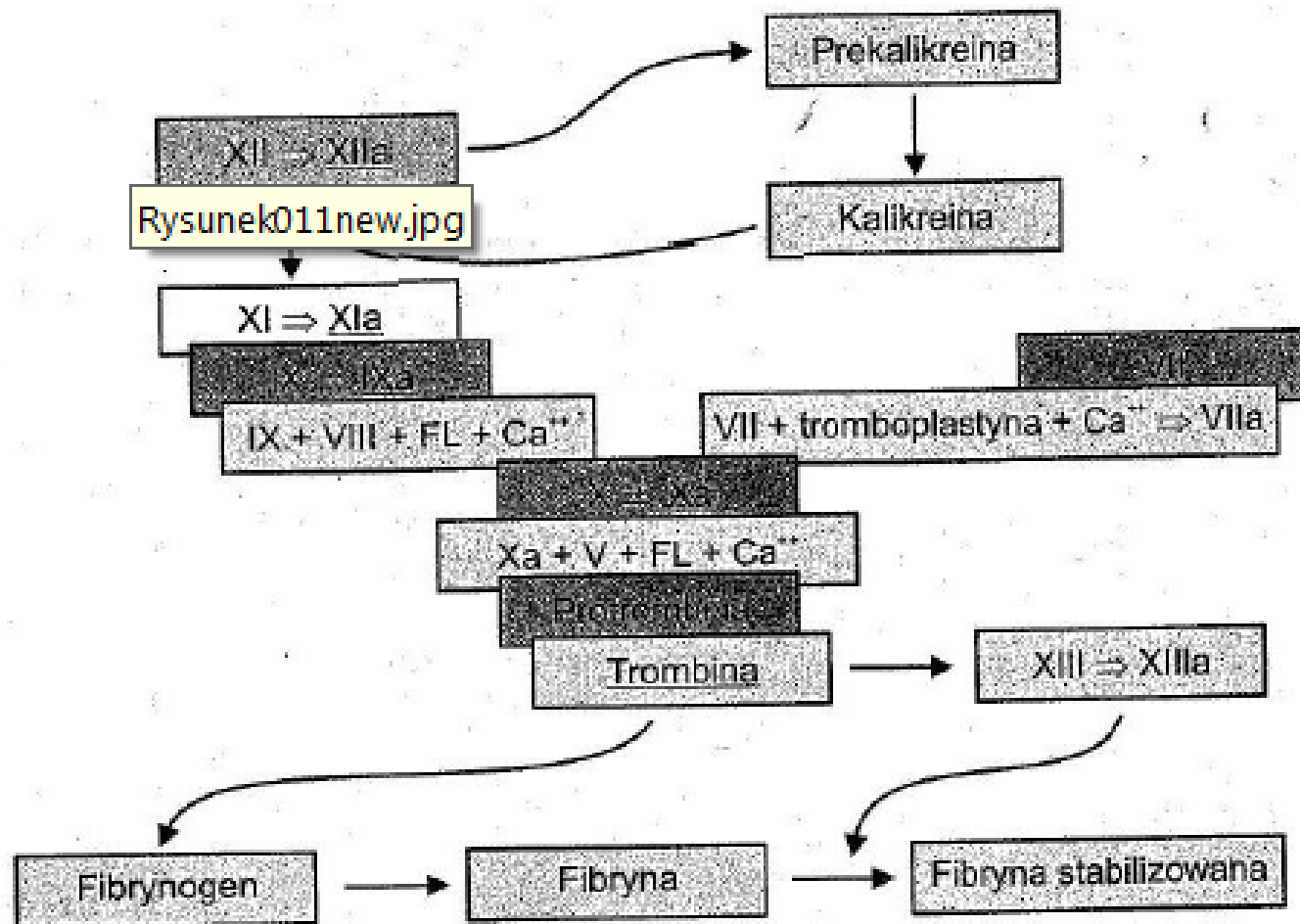
Najpowszechniejszym sposobem monitorowania leczenia **heparyną niefrakcjonowaną** jest oznaczenie czasu aPTT.

Heparyna frakcjonowana

Ma większe powinowactwo do **czynnika Xa** i znacznie mniejsze działanie inaktywujące trombinę (IIa) niż heparyna niefrakcjonowana.

Frakcjonowanie heparyny pozwala na uzyskanie leku o większej dostępności biologicznej.

Podawanie w standardowych dawkach nie wymaga monitorowania hemostazy, ale należy okresowo kontrolować liczbę płytek krwi.



Heparyna działa na aktywne formy czynników krzepnięcia: XIIa, XIa, IXa, Xa i trombinę.

Doustne antykoagulanty powodują powstawanie nieaktywnych prekursorów czynników krzepnięcia syntetyzowanych w wątrobie: VII, IX, X i protrombiny.

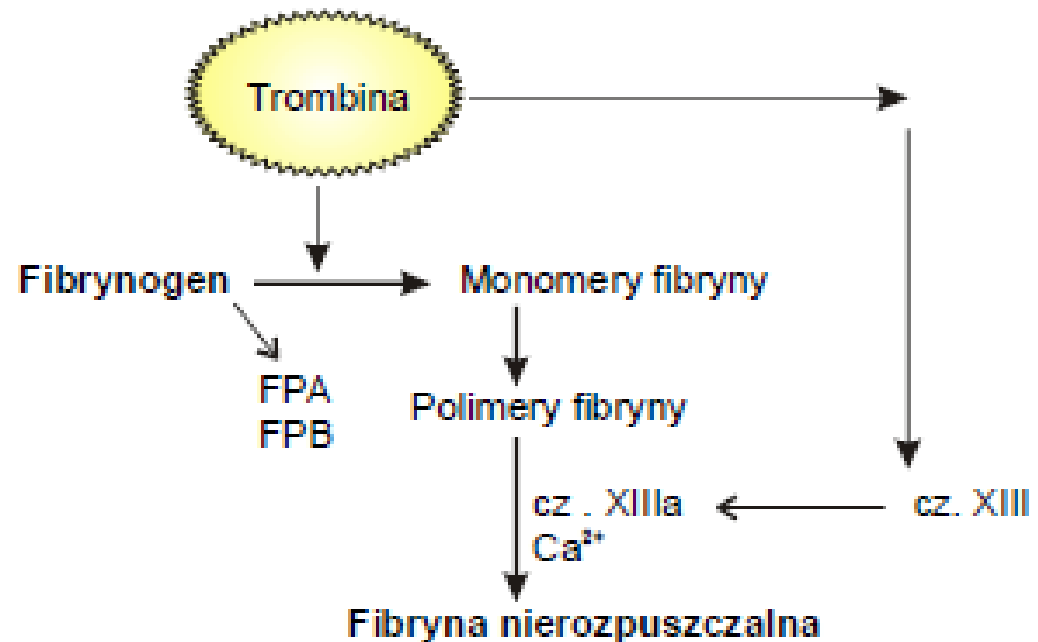
Ryc. 5.1. Mechanizm działania heparyny i doustnych antykoagulantów.

- **Kwas acetylosalicylowy** – hamuje cyklooksygenazy co powoduje zmniejszenie wytwarzania trombosanu A i prostaglandyn w płytkach, które silnie pobudzają agregacje.
- W płytce jest to zablokowanie nieodwracalne już w małych ilościach kwasu i utrzymuje się przez okres życia płytki czyli 8-12 dni

Badania oceniające wspólną drogę krzepnięcia- czas trombinowy TT

- Jest miarą przejścia fibrynogenu w fibrynę i nie zależy od wewnątrz- i zewnątrzpochodnego układu aktywacji protrombiny
- Odzwierciedla reakcje zachodzące między trombiną i fibrynogenem
- Zależy od stężenia fibrynogenu, obecności nieprawidłowego fibrynogenu, aktywności antytrombin oraz polimeryzacji i stabilizacji fibryny
- Wartości prawidłowe : 16-21s i zależą od aktywności użytej trombiny

Zasada oznaczania czasu trombinowego (TT)



FPA , FPB - fibrynopeptydy A i B

Wykonanie :

- 0.1 ml osocza
 - 0.1 ml trombiny
- 37°C, zmierzyć czas (sek)

- **Czas trombinowy jest przedłużony w:**
- hipofibrynogenemiach- DIC, marskość i inne choroby wątroby, przy wartościach fibrynogenu bliskich 0 g/L osocze nie krzepnie
 - dysfibrynogenemiach,
 - obecności immunologicznych inhibitorów trombiny,
 - zaburzeniach polimeryzacji fibryny- obecność produktów degradacji fibrynogenu FDP/DD,
 - leczeniu heparyną, hirudyną,

- Czas trombinowy jest **prawidłowy** w hemofilii A, hemofilii B oraz chorobie von Willebranda
- Jest wykorzystywany do wykrywania heparyny w osoczu

Interpretacja wyników oznaczeń APTT, PT i TT u pacjenta z objawami skazy krwotocznej

Rodzaj zaburzenia	Badania uzupełniające	APTT	PT	TT
Niedobór czynników VIII, IX, XI, choroba von Willebranda	Oznaczenia w/w czynników, próby korekcyjne (APTT)	P	N	N
Niedobór czynnika VII, złożone niedobory czynników K-zależnych (niewielkie)	Oznaczenia czynników II, VII, X	N	P	N
Niedobór II, V, X, złożone niedobory czynników K-zależnych (znaczne), zaburzenia po masywnych transfuzjach	Oznaczenia w/w czynników, próby korekcyjne (APTT)	P	P	N
Hypo- i dys-fibrynogenemie, choroby wątroby, DIC, obecność heparyny	Oznaczenia fibrynogenu, D-dimerów, FDP, czas batroksobinowy (reptylazowy), testy parakoagulacji	P	P	P

Fibrynogen

- Syntezowany w wątrobie, uczestniczy w tworzeniu skrzepu- cz I, rozpuszczalny prekursor fibryny
- Niedobór jego i innych cz krzepnięcia, obserwuje się w przewlekłych chorobach wątroby
- Jest białkiem ostrej fazy i rośnie w procesach zapalnych- wpływ na wynik OB
- Wartości prawidłowe : **1,8-3,5 g/L**
- Jego wartości na górnej granicy normy 3,5-4 g/L są uważane za **marker rozwoju miażdżycy**-uważanej jako przewlekły proces zapalny

- Najczęstsza metoda do jego oznaczania-metoda Claussa, opisana w 1957r
- Czas krzepnięcia rozcieńczonego osocza po dodaniu wysokich stężeń trombiny jest odwrotnie proporcjonalny do stężenia fibrynogenu
- Badanie to jest miarą wspólnej drogi w kaskadzie krzepnięcia

- Stężenie fibrynogenu jest fizjologicznie podwyższone w czasie miesiączki i w ciąży
- Do wzrostu fibrynogenu dochodzi w :
 - Przebiegu chorób nerek
 - Kolagenozach, np. toczeń rumieniowaty,
 - Zawale serca i udarze mózgu,
 - Nocnej napadowej hemoglobinurii
 - Plamicy zakrzepowej małopłytkowej
 - Stosowaniu niektórych leków, np. środki antykoncepcyjne

- **Hiperfibrynogenemia**- niezależny czynnik ryzyka zawału mięśnia sercowego, udaru niedokrwiennego mózgu i miażdżycy naczyń obwodowych

Obniżone stężenie fibrynogenu w:

- Wrodzonych niedoborach fibrynogenu
- Chorobach wątroby
- DIC
- Mononukleozie zakaźnej
- Leczeniu trombolitycznym np. streptokinazą, urokinazą oraz innymi lekami



D-dimery jako produkty degradacji fibryny:

- Powstają podczas trawienia złogów ustabilizowanej fibryny przez plazminę
- Określanie stężenia DD ma szczególne znaczenie w rozpoznawaniu DIC i zakrzepicy żył głębokich, zatorowości płucnej, a nawet drobnych zatorów czy zakrzepów np. w zawale serca
- Dostępne są zestawy do ich oznaczania metodą ELISA lub lateksową z monoklonalnym przeciwciałem

Metody immunoenzymatyczne

➤ Klasyczna ELISA



➤ ELISA automatyczna (np. test VIDAS, bioMérieux) –



Metody lateksowe



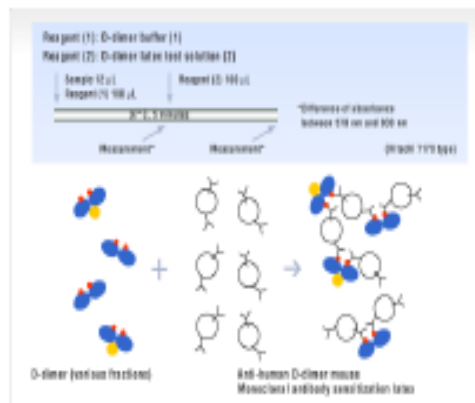
Negative
D-Dimer
(no agglutination)



Weakly Positive
D-Dimer



Strongly Positive
D-Dimer



Metody aglutynacji pełnej krwi

➤ SimplyRED – przeciwciała o podwójnej specyficzności: przeciwko antygenowi erytrocytów i D-dimerom



- Metody półilościowe lub jakościowe np.. metody lateksowe w oznaczaniu DD- nie dają wystarczającej czułości w porównaniu do metod ilościowych (ELISA)
- Zwiększone stężenie dimeru D występuje w:
 1. DIC
 2. Zakrzepica żył głębokich
 3. Zator tętnicy płucnej
 4. Niektóre nowotwory złośliwe-przerzuty do płuc, rak jajników
 5. W czasie leczenia trombolitycznego =upłynnianie zakrzepów
 6. Po zabiegach operacyjnych

Interpretacja stężenia D-dimerów

- Stwierdzenie podwyższonego stężenia D-dimerów nie upoważnia do rozpoznawania żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (mają małą swoistość)
- Natomiast prawidłowe ich stężenie z dużym prawdopodobieństwem wyklucza obecność zakrzepicy- wysoka czułość

Niezbędne informacje znajdują się w:

Dembińska-Kieć A., Naskalski J., „Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej”; Elsevier Urban&Partners, Wrocław 2013:

Str. 577-600 – 14.1 *Wprowadzenie do podstaw diagnostyki hematologicznej*

Str. 603-611 – 14.8 *Monitorowanie leczenia przeciwkrzepliwego i fibrynolitycznego*

Str. 613-615 – 14.9 *Diagnostyka zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC)*