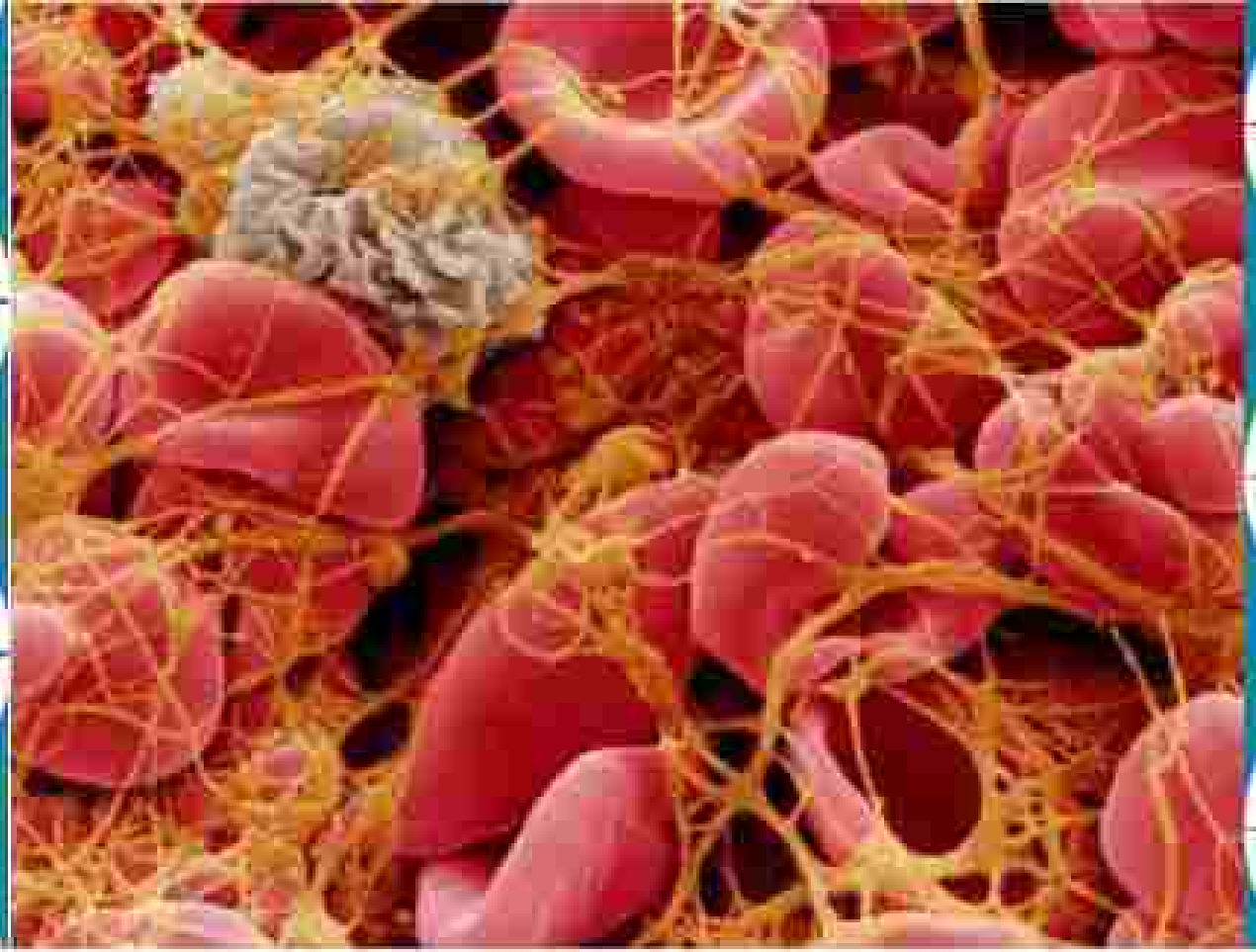
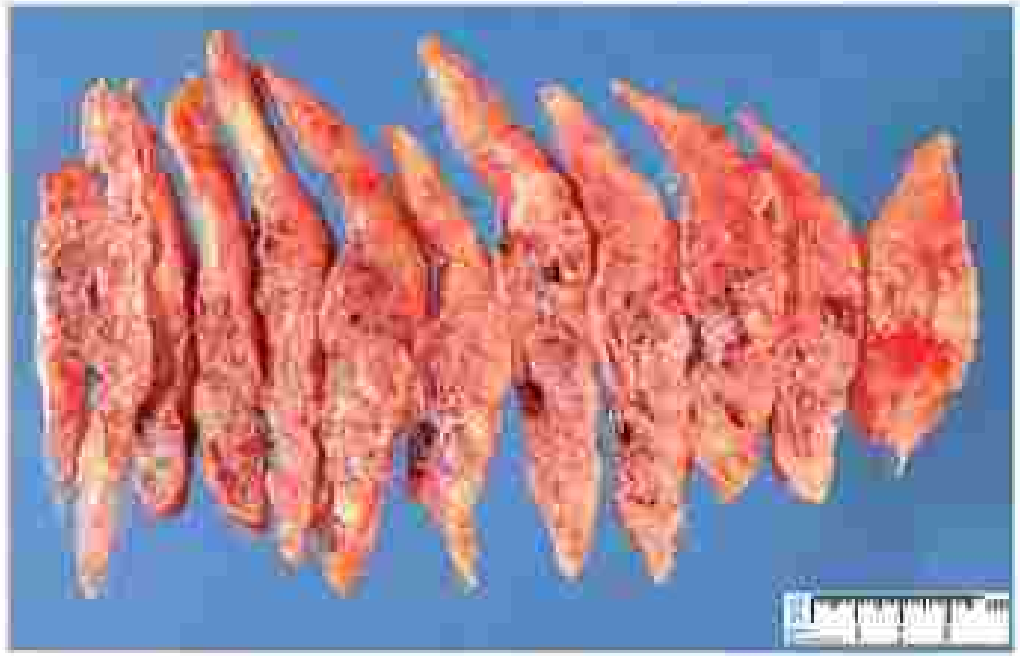


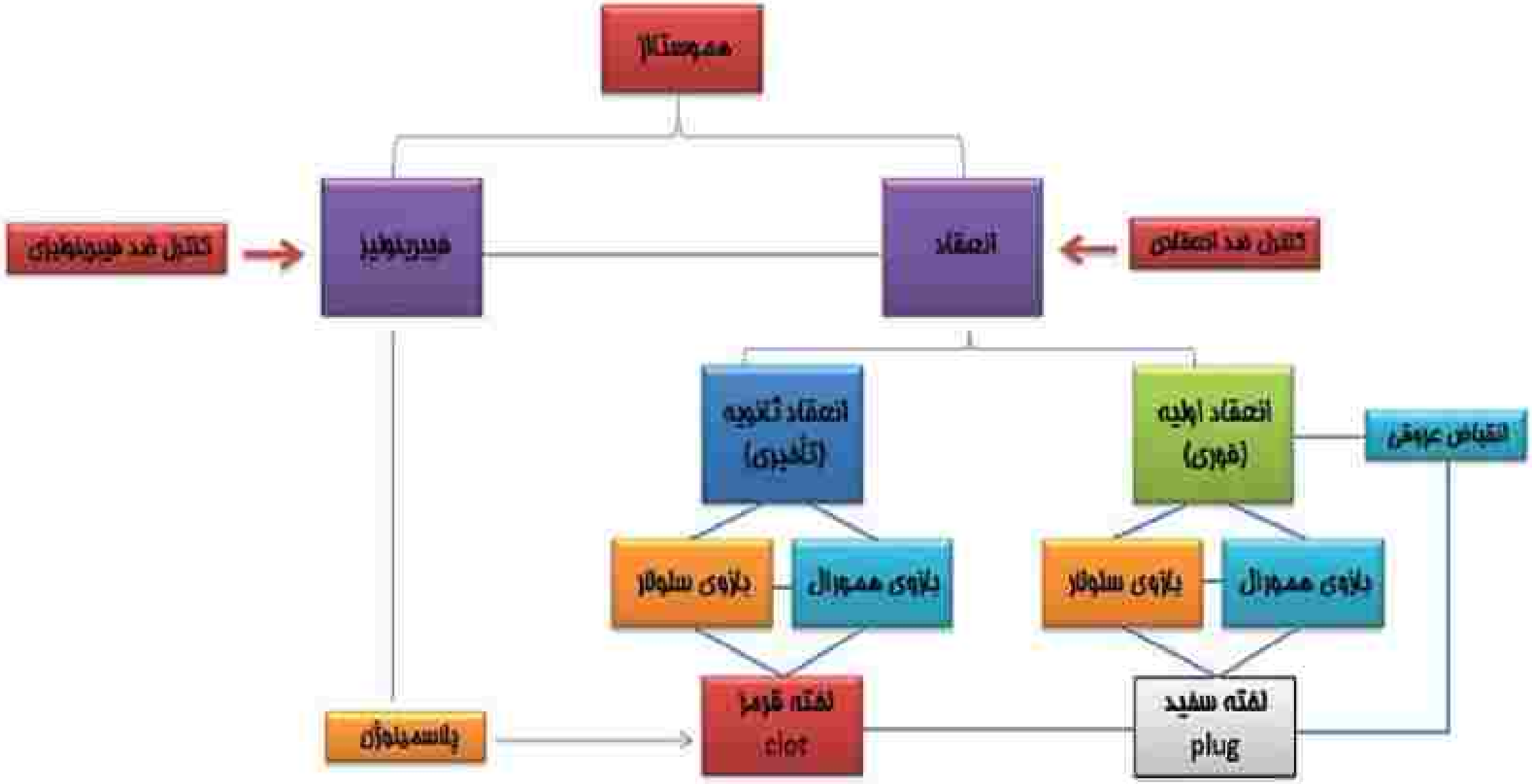
COAGULATION TESTS

N.V.SHIRAN
Ph.D of Hematology and transfusion Sciences

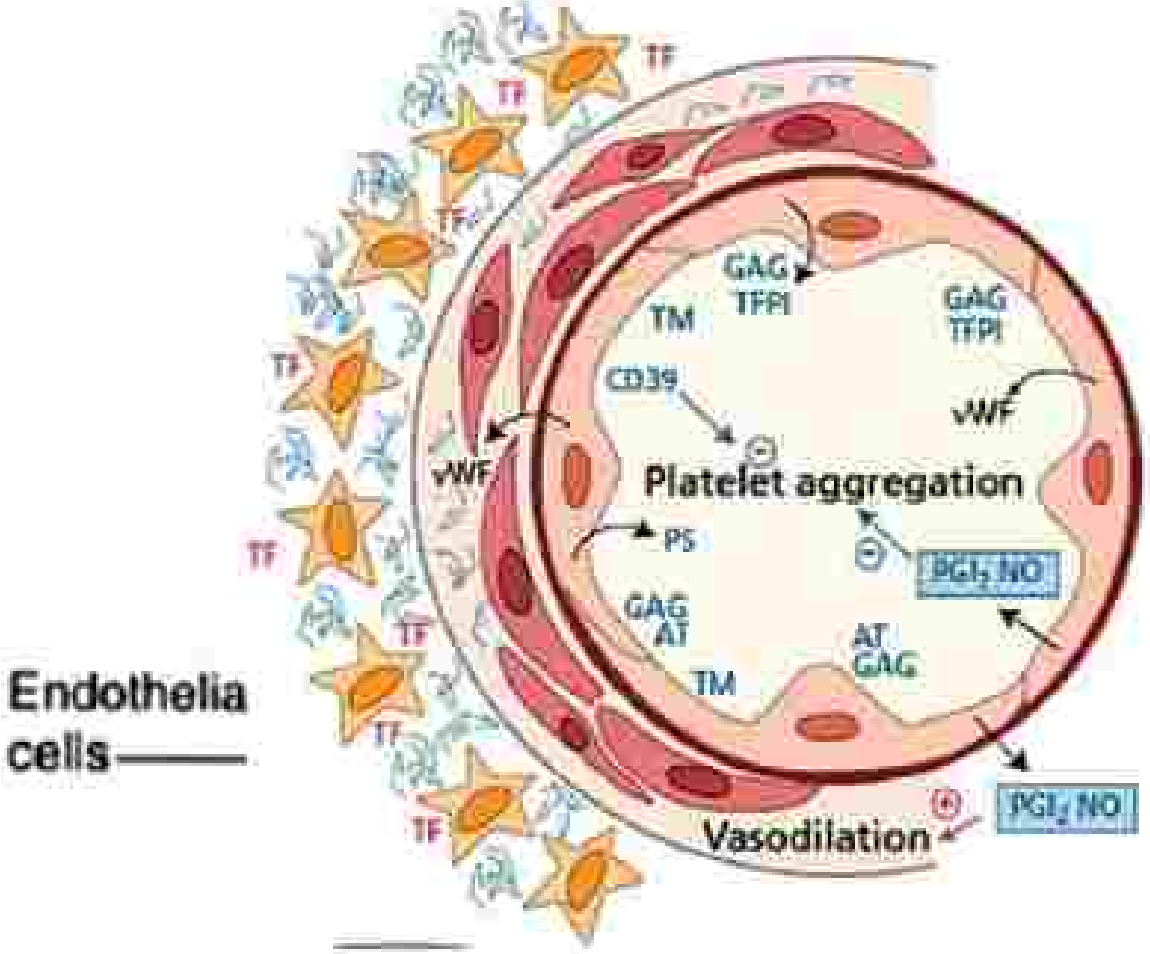


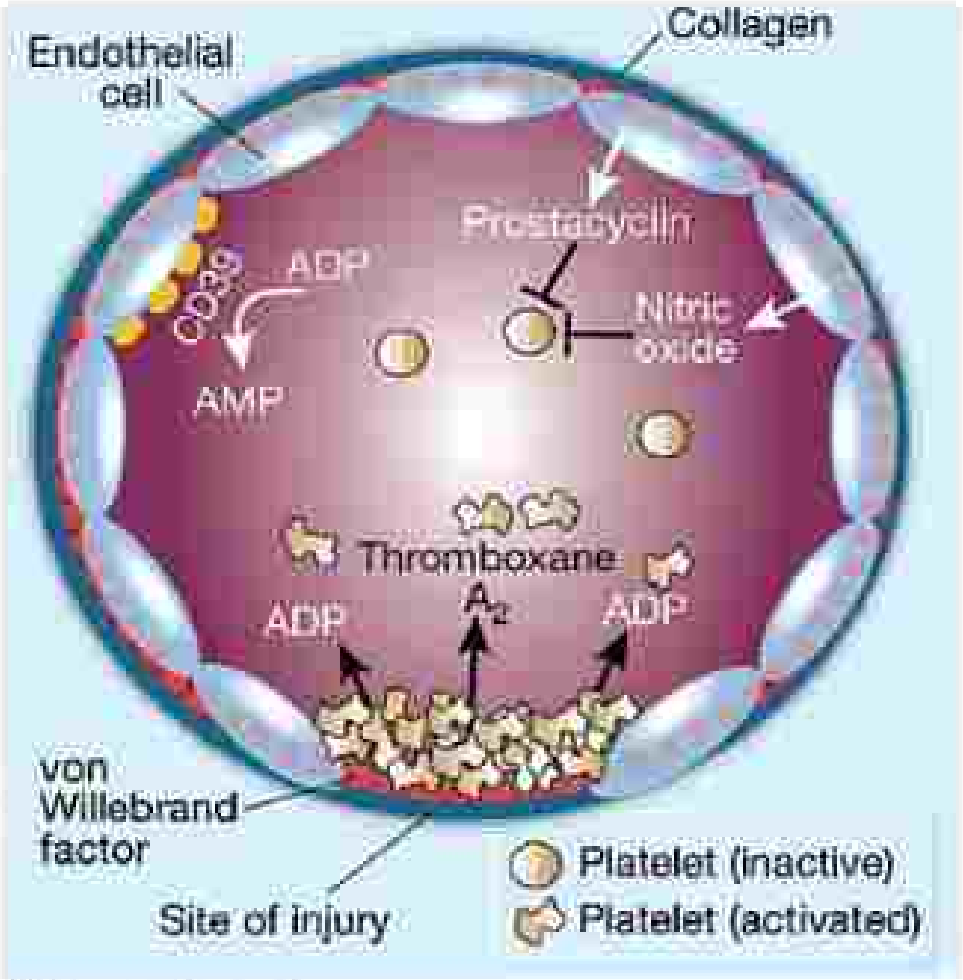
شکل ۶-۱۷ تفاوت تروموبوز قرمز با تروموبوز سفید که هر دو طی عمل جراحی از عروق بیماران خارج شدند.

شکل ۱۸-۱۵: تفاوت بیک لخته سفید (پلاک) با یک لخته قرمز (کلات) که هر دو از عروق حولی خارج شده‌اند.



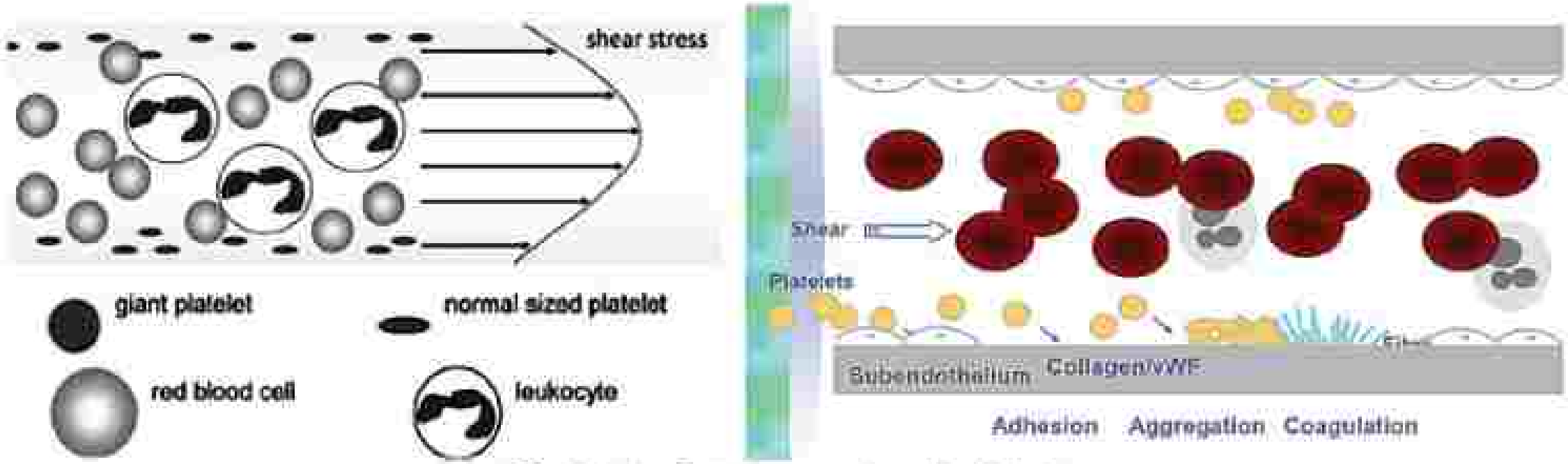
شکل ۱-۱: اجزاء مختلف سیستم هموستاز



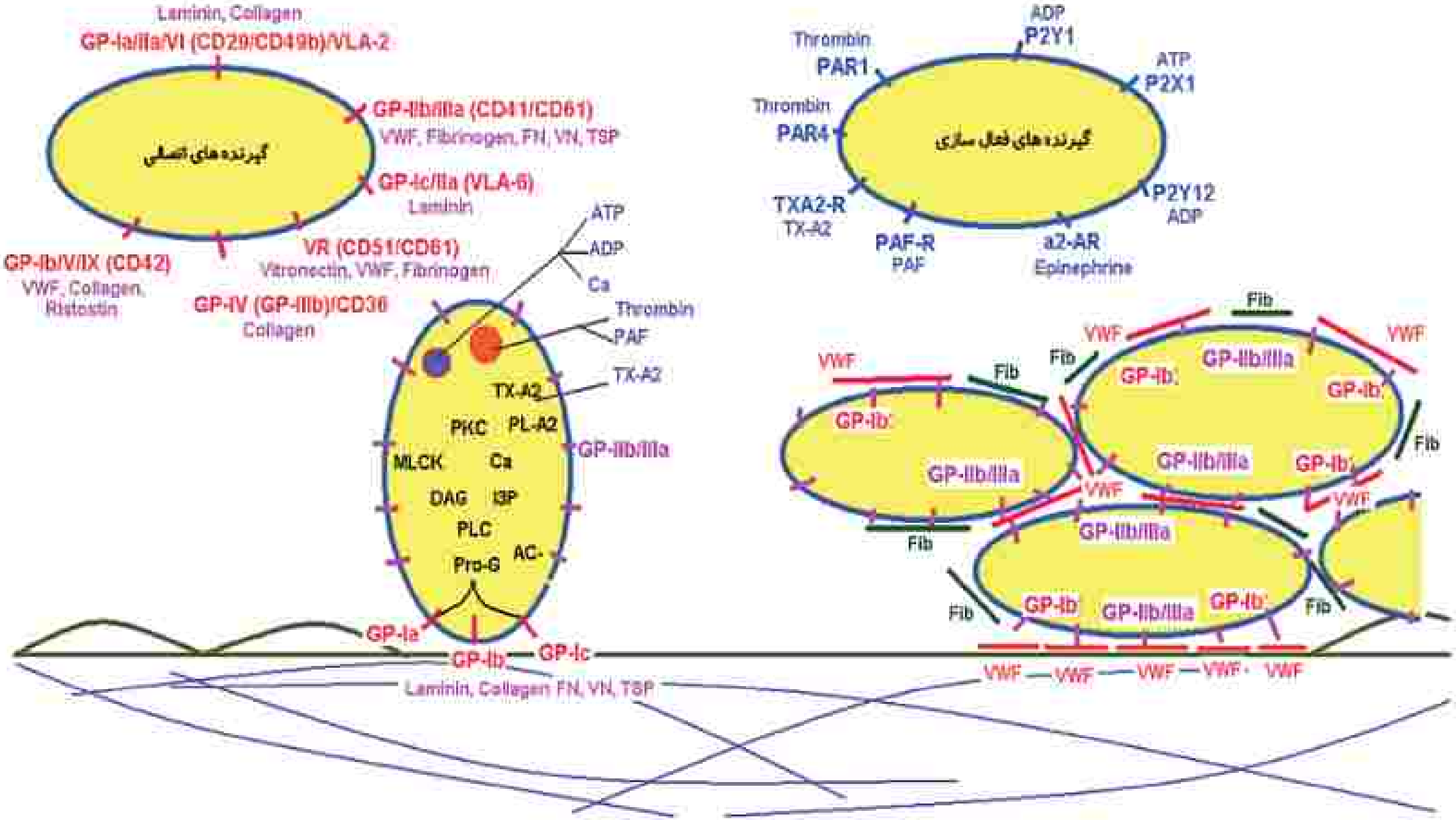


شکل ۹-۵۱: تاثیر $TX\text{-}A_2$، ADP، CD39 و NO در فعال سازی یا مهار پلاکت‌ها.

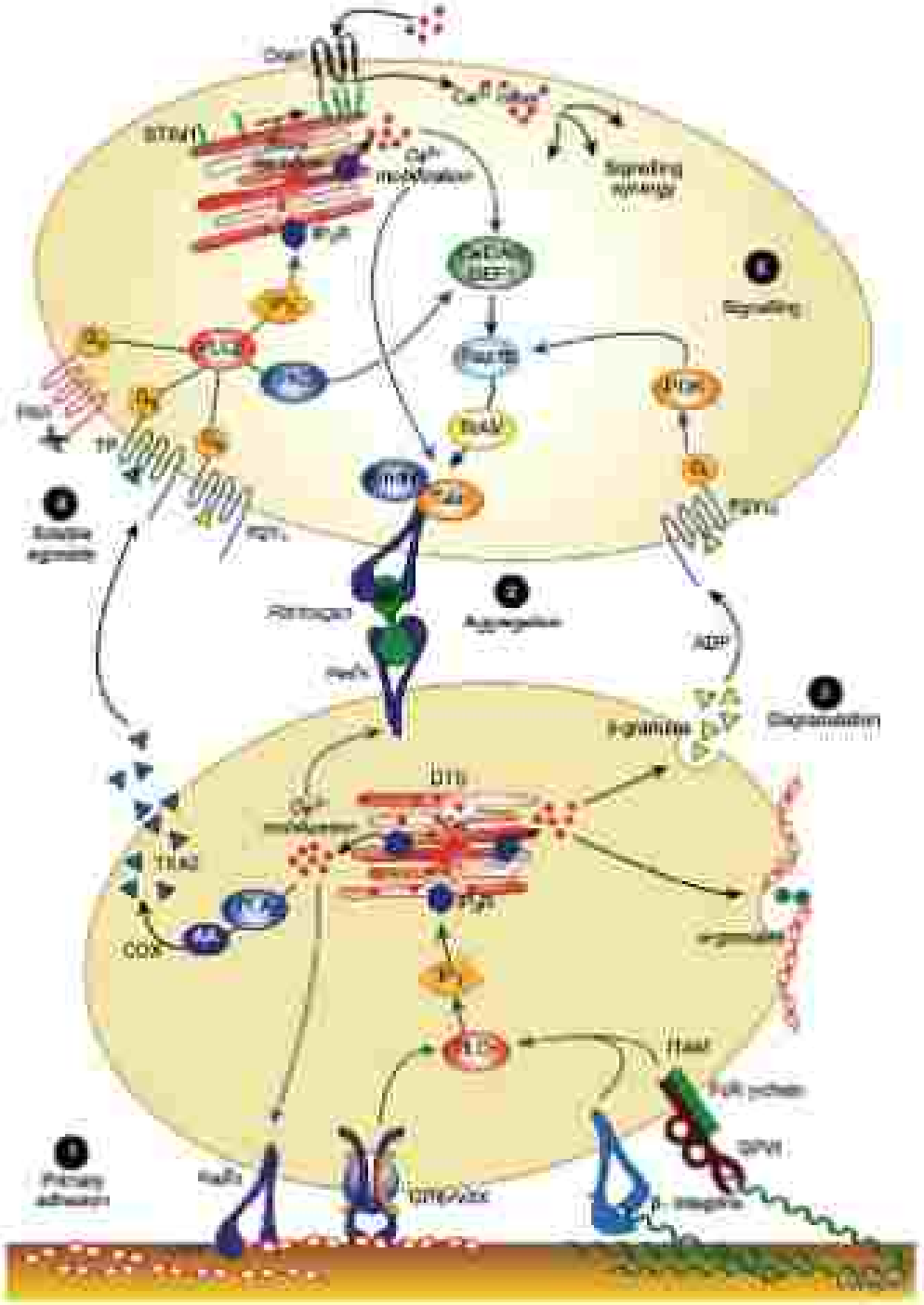
تولید ADPase/CD39 که باعث تجزیه ADP به AMP و کاهش فعال‌سازی پلاکت‌ها می‌شود. AMP نیز در ادامه توسط CD73 سطح اندوتلیوم به آدنوزین تبدیل شده و در ادامه با اتصال به رسپتور پورینرژیک P_1 (گیرنده آدنوزین) سطح پلاکت باعث افزایش بیشتر cAMP می‌شود (برخلاف P_1، گیرنده P_2 گیرنده ATP یا ADP محسوب می‌شود).

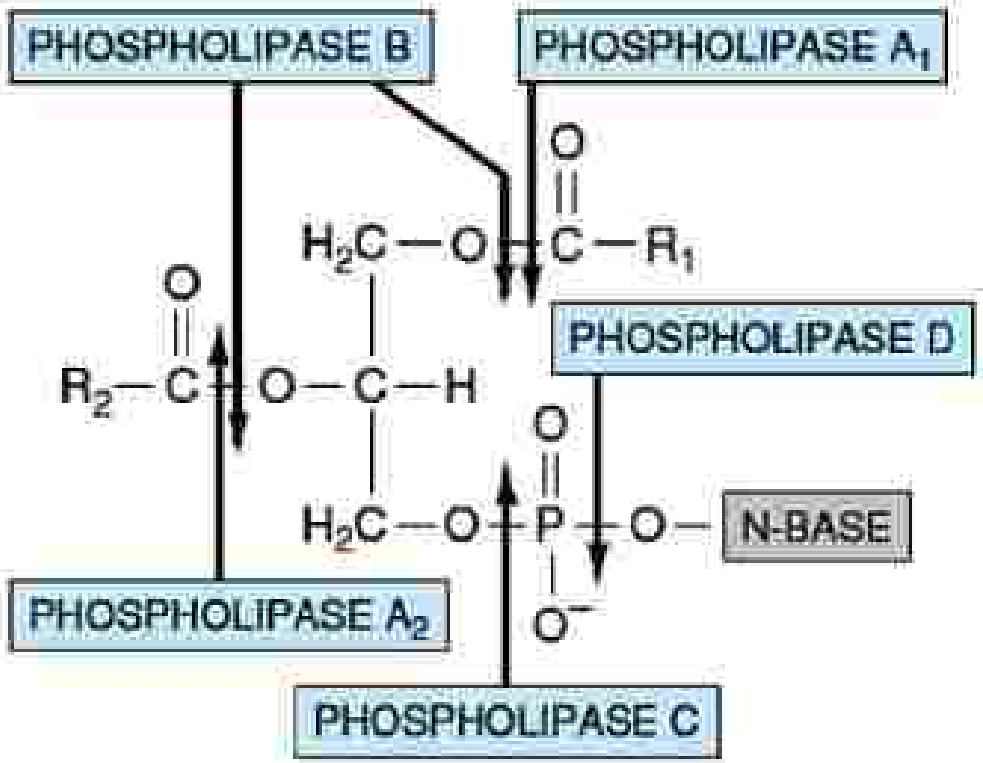


شکل ۲-۱۵: پراکنش شعاعی در عروق و نقش آن در انعقاد اولیه [۴].



شکل ۱۱۴-۵۱: مراحل اولیه اتصال و اگرگاسیون پلاکت‌ها در برخورد با کلاژن


Signaling
Fibrinogen
Aggregation
ADP
Degranulation
Primary adhesion



شکل ۳۱-۵۱: محل‌های مربوط به فعالیت هیدرولیتیک فسفولیپازها بر روی یک سوبسترای فسفولیپیدی.[۲۷]

به فعال کننده‌های پلاکت، آگونیست و به مهارکننده‌های آن، آنتاگونیست گفته می‌شود. از آگونیست‌ها می‌توان به موارد متعارف ترومبین، ADP، اپی-نفرین (آدرنالین)، یونوفر کلسیم A23187، تریپسین، ریستوستین، U46619، پلاسمین و اسید آراشیدونیک و همچنین به موارد غیرمتعارفی مثل توبرکولین، اندوتوکسین، اگزوتوکسین، سموم مارها، سروتونین، فوربول میرستات استات (PMA)، کریستال‌های اسیداوریک، متیلن بلو، فیتوهماگلوتینین (PHA)، PAF، I-PA، لستین، آنزیم‌های پاپائین، پپسین، فسفولیپاز، آلکالن فسفاتاز، سروتونین، فاکتور VIII، کمپلکس ایمنی، مونومرهای فیبرین و FDPs اشاره نمود که می‌توانند باعث ترشح و اگرگاسیون پلاکت‌ها شوند. گذشته از موارد مذکور، فشار شار بالای[1] ۱۵۰۰ S^{-1} نیز از آگونیست‌های پلاکتی محسوب می‌شود که البته مکانیسم دقیق آن مشخص نیست. از آنتاگونیست‌ها نیز می‌توان به cAMP، NO، $PG-I_2$ و داروهایی مثل NSAIDها (آسپرین، ایبوپروفن، دیکلوفناک)، کلوپیدوگرل و ... اشاره نمود که آسپرین و دیگر NSAIDها (داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی) با مهار مسیر سیکلواکسیژناز و کاهش تولید $TX-A_2$، تیئوپریدین‌ها (کلوپیدوگرل، پراسوگرل، الینوگرل، تیکاگرلور، کان‌گرلور و تیکلوپیدین[1]) با مهار ADP-Rهای P2Y12، فنوتیازین با حذف جریان کلسیم و آبسیکسی‌ماب، تیروفیبان و اپی‌فیباتاید[2] با مهار بیان سطح سلولی GP-IIb/IIIa و بلوکه کردن لیگاند RGDها (دومین متصل شونده به GP-IIb/IIIa در VWF و Fbgn) باعث مهار پلاکتی می‌شوند.

شکل ۱۹-۵۱: داروی آبسیکسی‌ماب (ضد GP-IIb/IIIa)، تیکلوپیدین (ضد P2Y12) و دسموپرسین یا DDVAP (افزایش دهنده VWF-FII)

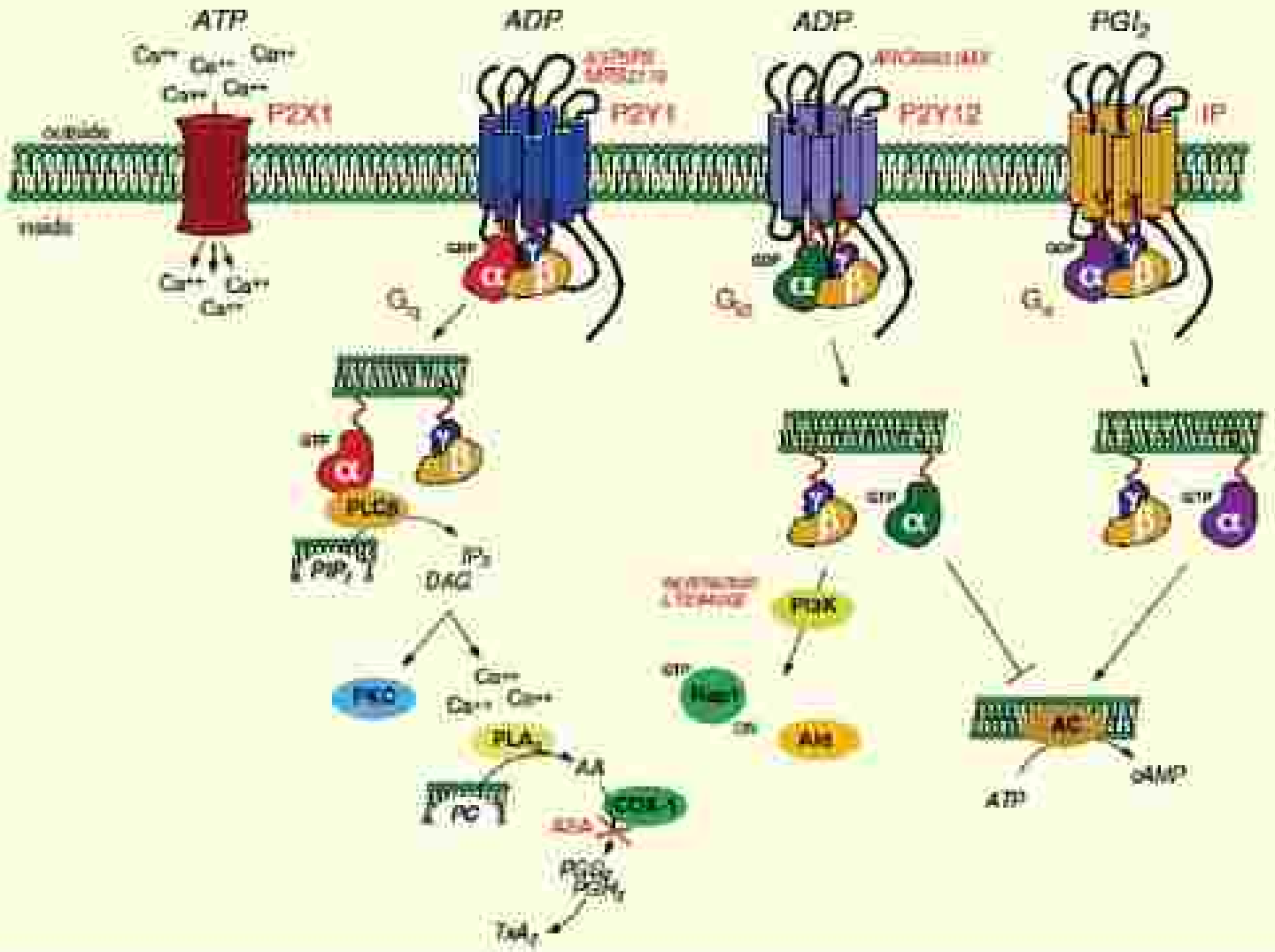
شکل ۲۰-۵۱: فرمول ساختاری داروی اپتیفیباتاید برای مهار GP-IIb/IIIa [۶].

رسپتورهای پوریناژیک یا P:

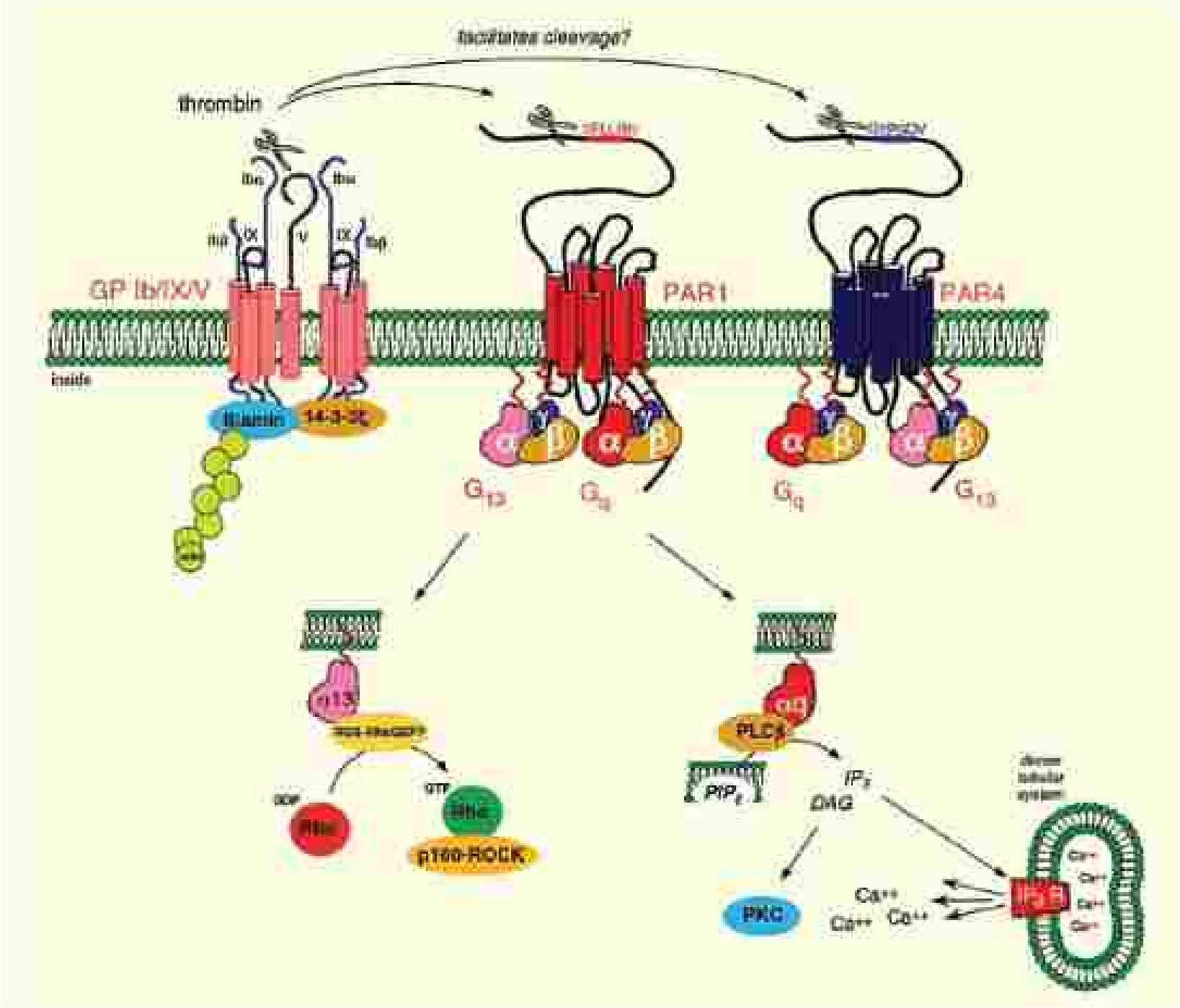
پلاکت‌ها دو نوع رسپتور پوریناژیک P1 (برای آدنین) و P2 (برای ATP و ADP) دارند که گیرنده‌های P2 به دو دسته ۱) متابوتروپیک یا P2Y و ۲) یونوتروپیک یا P2X تقسیم می‌شوند. P2Yها هپتاسپانین و متصل به Pro-G بوده و ۴۱-۵۳KD وزن دارند (بعد از گلیکوزیلاسیون) که دم NT آنها در خارج و دم CT آنها در داخل سیتوپلاسم قرار می‌گیرد ولی P2Xها دارای دو دومین TM بوده (حاوی ۵۹۵-۳۸۴ اسیدآمینه) و هر دو دم NT و CT آنها در داخل سلول قرار می‌گیرند. این گیرنده‌ها خاصیت کانالی داشته و در انتقال یون‌های ۲-۱ ظرفیتی مثل Na، K و مخصوصاً Ca نقش دارند. P2Yهای پستانداران به ۹ دسته P2Y1، P2Y2، P2Y4، P2Y6، P2Y11، P2Y12، P2Y13، P2Y14 و P2Y15 تقسیم می‌شوند که برای P2Y15 از عنوان GPR99 یا De orphanized GPR80 نیز استفاده می‌شود. P2Y5/7/8/9/10 مربوط به غیرپستانداران بوده یا اینکه حالت سنتتیک دارند. P2Y1، P2Y11، P2Y12 و P2Y13 به ADP و ATP، P2Y14 به UDP-Glucose، P2Y6 به UDP و DTP و P2Y2 و P2Y4 به دو دسته نوکلئوتید آدنینی و اورانیلی متصل می‌شوند. از طرفی دیگر، P2Y1، P2Y2، P2Y4، P2Y6 و P2Y11 در اتصال به Pro-Gq و P2Y12، P2Y13 و P2Y14 در اتصال به Pro-Gi قرار دارند که پلاکت فقط حاوی P2Y1/Gq و P2Y12/Gi می‌باشد. Gq باعث تغییرشکل پلاکت، ریلیز گرانول‌ها، اگرگاسیون سریع، موقتی و قابل برگشت و فعال شدن PLCβ (در نتیجه فعال شدن CaM، MLCK، PKC، PLA2، Rac و اسکرامبلاز) شده ولی Gi باعث مهار A.C (کاهش c-AMP) و تقویت اگرگاسیون می‌شود. امروزه اتصال P2Y12 به Pro-G12/13 نیز مطرح است که باعث فعال شدن Rho می‌شود. P2Xها نیز به ۷ دسته P2X1 تا P2X7 تقسیم می‌شوند که به صورت هموپا هتروالیگومرهای تریمریک یا هگزامریک بوده و همگی رسپتور ATP هستند (شکل۴۳-۵۱). در پلاکت فقط گیرنده P2X1 وجود داشته و بدین ترتیب سه گیرنده پوریناژیک P2Y12>>P2X1>P2Y1 در پلاکت‌ها بیان می‌شود که با اتصال به ADP و ATP باعث فعال شدن پلاکت می‌شوند.

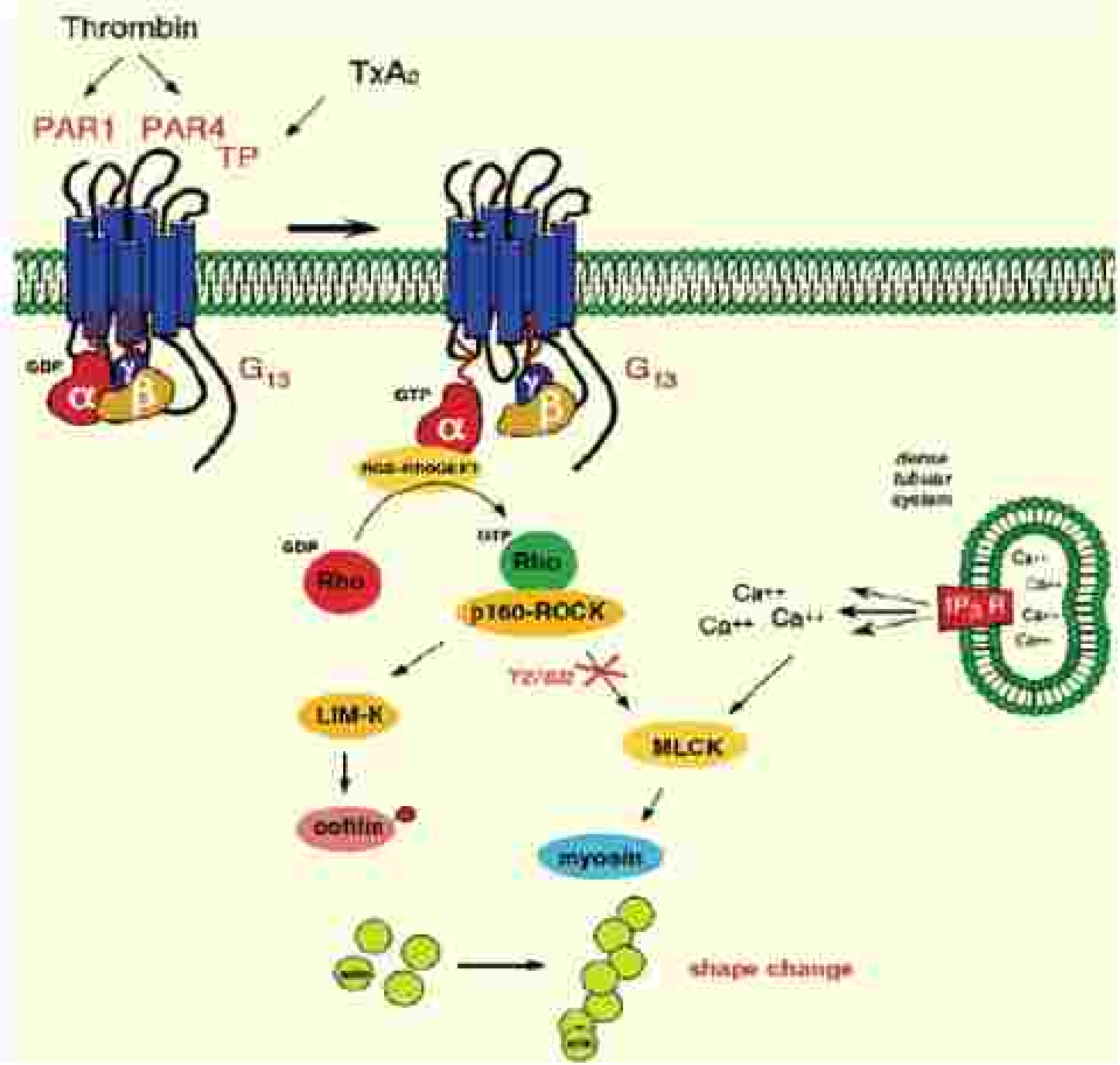
جدول ۷-۵۱: خصوصیات انواع گیرنده‌های پوریناژیک انسان

نوع	زیرنوع	لیگاند	ساختار	خاصیت	انواع
P1	-	آدنین	-	-	-
P2	P2Y	ADP، ATP، UTP، UDP، UDP-Glc	هپتاسپانین متصل به Pro-G	متابوتروپیک	P2Y1، P2Y2، P2Y4، P2Y6، P2Y11، P2Y12، P2Y13، P2Y14 و P2Y15
	P2X	ATP	کانال کلسیم	یونوتروپیک	P2X1، P2X2، P2X3، P2X4، P2X5، P2X6، P2X7

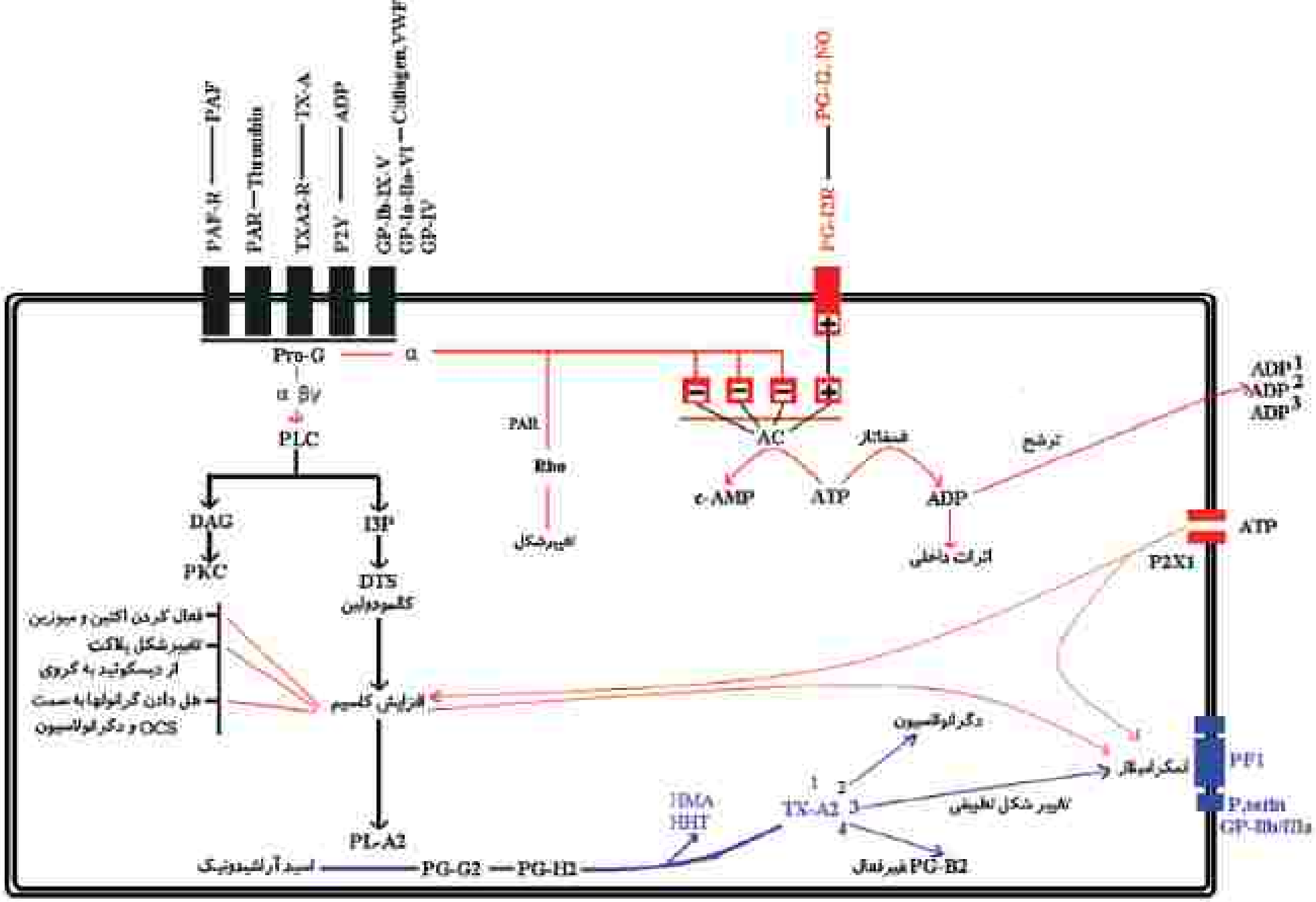


شکل ۲۲-۱۵: مسیر فعال سازی پلاکت توسط رسپتورهای پورینرژیک (P2X1، P2Y1 و P2Y12) که عمدتاً با افزایش کلسیم داخل سلولی باعث فعال‌سازی پلاکت می‌شوند. P2X1 طی تحریک با ADP مستقیماً باعث ورود کلسیم شده ولی P2Y1 با فعال کردن Gq و آزاد کردن Gαq باعث تحریک PLCβ و تولید IP3 و DAG می‌شود که IP3 با تحریک DTS و DRR باعث افزایش کلسیم و تحریک PLA2 جهت تولید AA می‌شود. مسیر COX-1 می‌تواند توسط آسپیرین (ASA) مهار گردد. در مورد P2Y12 تحریک آن توسط ADP باعث آزاد شدن Gαi2 و Gβγ می‌شود که اولی باعث مهار AC و دومی باعث تحریک PI3K و در نتیجه تحریک Akt و Rap1 می‌شود ولی عملکرد عکس آن توسط PGI2 و تحریک گیرنده IP صورت می‌گیرد که از طریق تحریک Gs باعث فعال شدن AC، افزایش cAMP و مهار پلاکت می‌شود. اینتگرین‌ها (گلیکوپروتئین‌های گرانول، پروتئین گرانول، الیوگرانول، تیمالگرانول، لکن گرانول و تیمالگلیکوپروتئین) و ADP-R با مهار AC، P2Y12 و دو ترتیب ATP/SPS و MRS2179 با مهار P2Y1 باعث مهار پلاکت می‌شوند. داروی دراسایس و LY294002 نیز باعث مهار PI3K می‌شوند [۱۷].

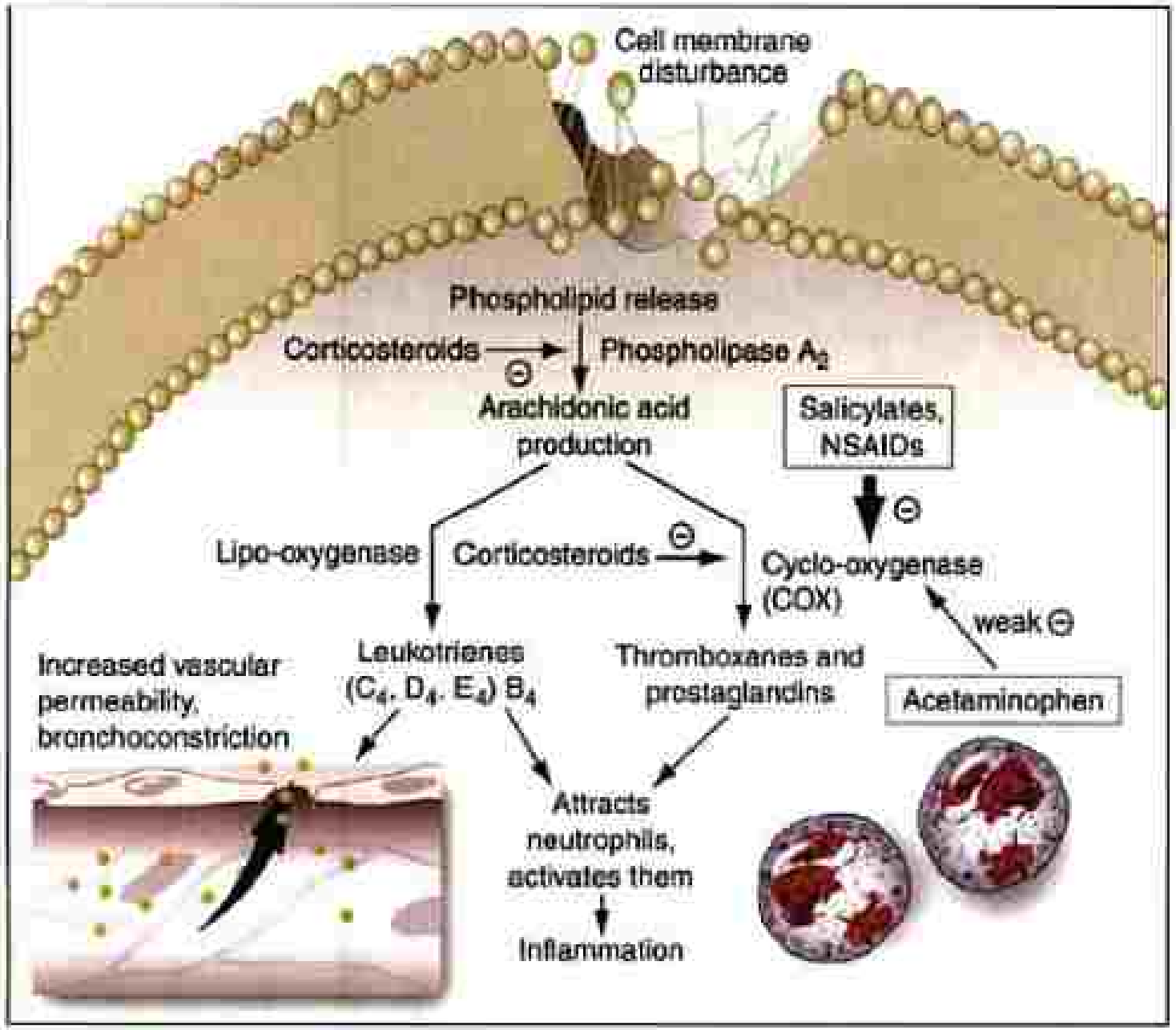

facilitates cleavage?
thrombin
GP Ib/IX/V
PAR1
PAR4
inside
14-3-3ζ
α
β
γ
G_{12}
G_q
G_{13}
α13
p160-ROCK
GDP
GTP
Rho
PLCβ
PIP_2
IP_3
DAG
PKC
Ca^{++}
IP3R



شکل ۲۴-۵۱: مسیر فعال سازی پروتئین G12/13 پلاکتی توسط ترومبین [۱۷]

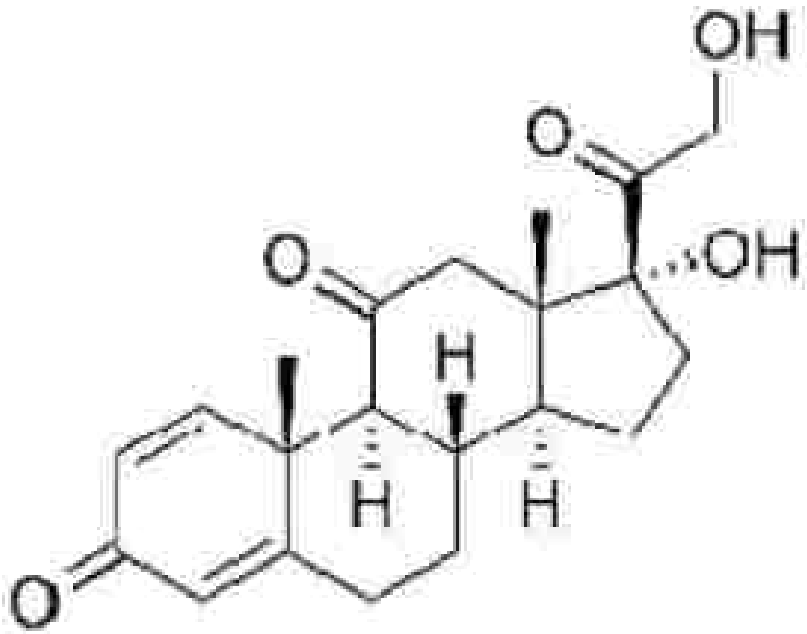


شکل ۳۰-۱۵: نمایی شماتیک از مسیر فعال سازی پلاکت توسط رسپتورهای مختلف آگونیست‌ها (در منابع جدیدتر، برای PAR1 و PAR4 فقط گیرنده G13 و Gq در نظر گرفته شده است).



شکل ۳۶-۵۱: جایگاه اثر داروهای ضد التهاب استروئیدی (کورتون‌ها) و غیراستروئیدی (NSAIDها) بر روی مسیرهای COX و LOX. تصویر سمت چپ متعلق به دکتر فیلیکس هافمن، کاشف آسپرین می‌باشد [۶].

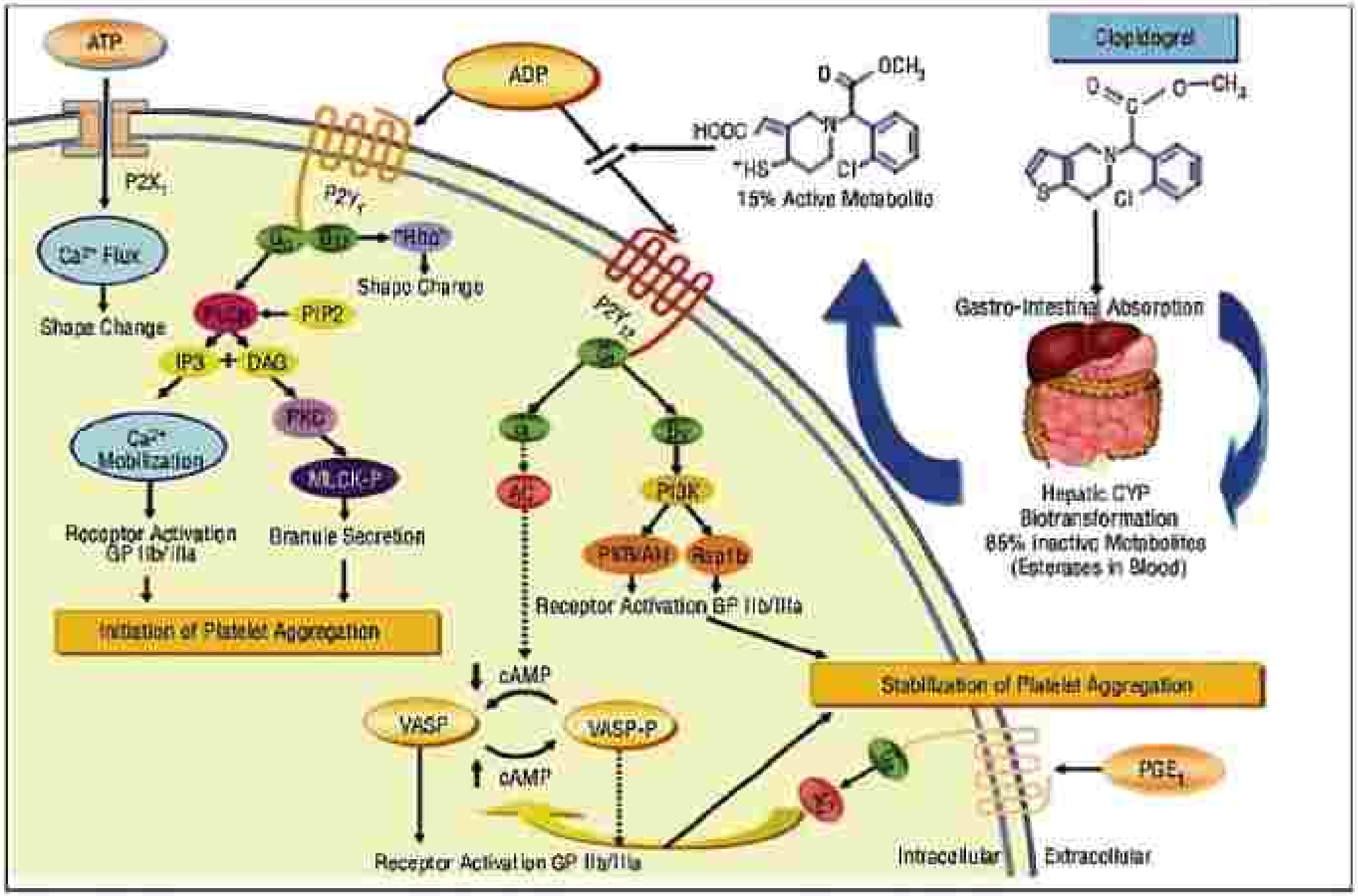
شکل ۴۹-۵۱: فرمول ساختاری آسپرین و کاشف آن دکتر فیلیکس هافمن (۱۹۴۶-۱۸۶۸) شیمی‌دان اهل مونیخ آلمان



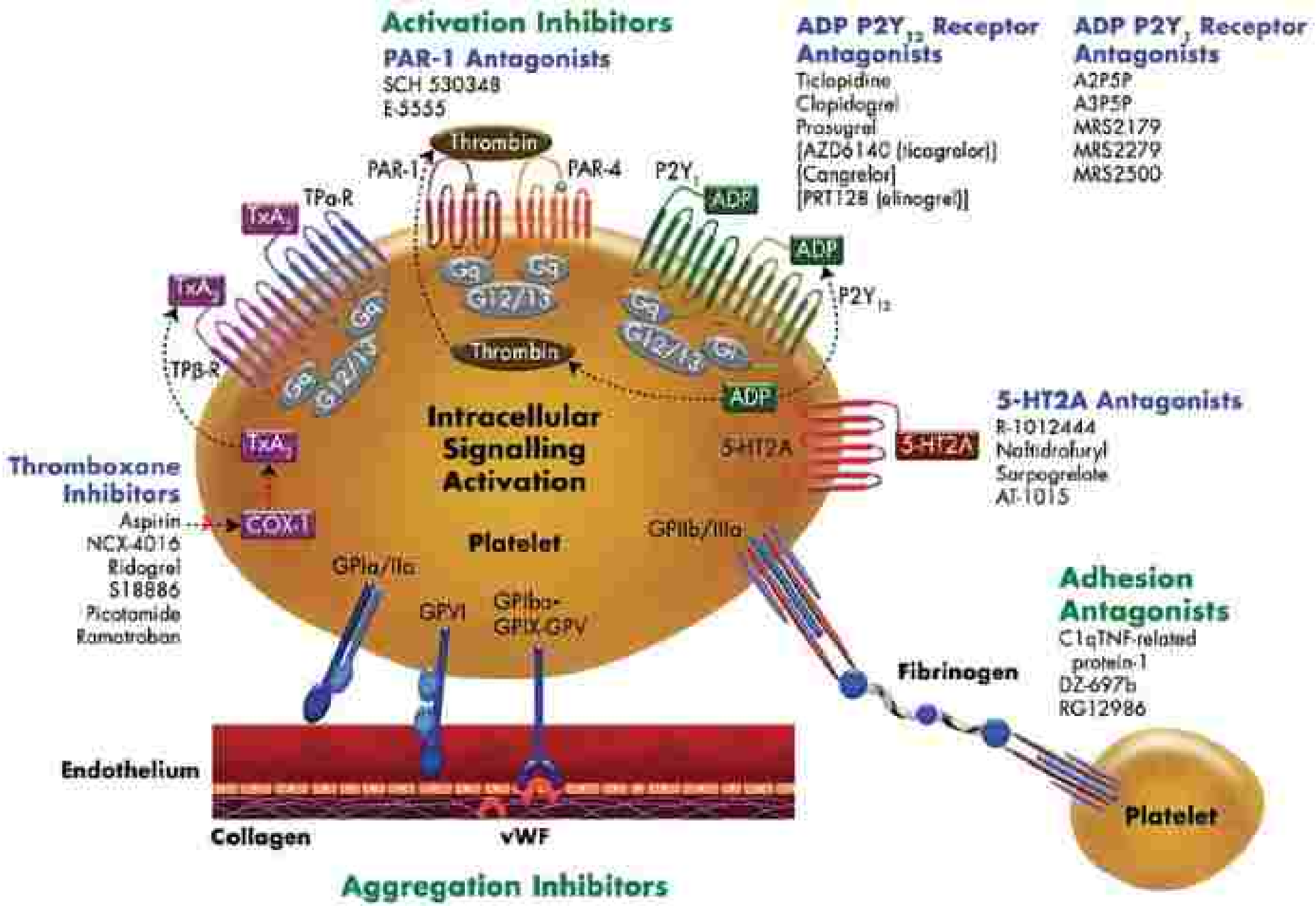
شکل ۳۷-۱۵: فرمول عمومی ساختار داروهای کورتیکواستروئید مثل پردنیزون، پردنیزولون، بتامتازون، کتالوگ، متیل پردنیزولون، دگزامتازون [۶].

داروهای ضد ADP-R نوع P_2Y_{12}:

این داروها از نسل تیئوپریدین[1] هستند که به چهار نسل اوّل (تیکلوپیدین)، دوّم (کلوپیدوگرل)، سوّم (پراسوگرل و الینوگرل) و چهارم (کان‌گرولر: آنالوگ ATP و تیکاگرلور: سیکلوپنتیل‌تریازولوپیریدین) تقسیم شده و همگی در پیش‌گیری از ACS/PCI[2]، MI و مرگ ناشی از آنها نقش دارند. کلوپیدوگرل یک پیش‌دارو است که ۸۵٪ آن توسط استرازهای خون غیرفعال شده ولی در نهایت ۱۵٪ آن توسط سیتوکروم P450 (CYP) به فرم فعال تبدیل و به صورت غیرقابل برگشت ADP-R: P2Y12 را مهار می‌کند. آنتاگونیست‌هایی مثل PG-E1 با افزایش فعالیت A.C باعث افزایش مقدار c-AMP می‌شوند که باعث تحریک فسفریلاسیون وابسته به c-AMP‌ی پروتئین VASP شده و بدین ترتیب با تشکیل VASP-P باعث مهار بیان GP-IIb/IIIa می‌شوند. برعکس، ADP با اتصال به P2Y12 باعث فعال شدن Pro-Gαi می‌شود که با مهار A.C باعث کاهش c-AMP و در نتیجه باعث کاهش فسفریلاسیون VASP[3] می‌شود، در نتیجه VASP باعث فعال شدن GP-IIb/IIIa شده و پلاکت‌ها را فعال می‌سازد. درمقابل، زیرواحد βγ و Gα12 باعث فعال شدن PI3K و متعاقب آن، PKB/AKT[4] و Rap-1b می‌شود که در ادامه با فعال کردن GP-IIb/IIIa باعث تثبیت اگرگاسیون پلاکت‌ها می‌شود. گیرنده P2Y1 نیز در اتصال به ADP فعال می‌شود، ولی برخلاف P2Y12، زیرواحد Gαq آن باعث فعال شدن پروتئین Rho (عامل تغییرشکل سلول) و زیرواحد βγ آن با تحریک PLBβ باعث تبدیل PIP2 به DAG و I3P می‌شود. I3P با تحریک پمپ I3PR در DTS باعث افزایش کلسیم و درنتیجه فعال شدن $PL-A_2$، تولید $TX-A_2$، ریلیز پلاکتی، فعال شدن اسکرامبلاز و تغییر تطبیقی غشاء (بیان GP-IIb/IIIa) شده ولی DAG با فعال کردن PKC باعث فسفریلاسیون و فعال‌سازی MLCK-P[5] (عامل تغییرشکل، هل دادن گرانول‌ها و دگرانولاسیون پلاکت) می‌شود. به‌طور کلی گیرنده‌های P2Y (مثل P2Y1 و P2Y12) باعث تغییرشکل سلول، افزایش کلسیم داخلی، فعال شدن اسکرامبلاز، افزایش بیان PF3، اگرگاسیون و ریلیز گرانول‌ها می‌شوند ولی گیرنده P2X1 نوعی کانال کاتیونی برای کلسیم محسوب می‌شود که اتصال ATP به آن باعث تغییرشکل سلولی مستقل از مسیر سیکلواکسیژناز و تسهیل اثر دیگر آگونیست‌ها می‌شود. تیکلوپیدین نیز دارای اثرات مشابه کلوپیدوگرل بوده ولی می‌تواند باعث نوتروپنی شود.



شکل ۴۳-۱: مسیر فعال سازی پلاکت توسط تأثیر ADP و ATP بر روی رسپتورهای پورینرژیک P و سه گانه P2X1,P2Y1,P2Y12 که می‌توانند توسط داروی کلوپیدوگرل مهار شوند.


Activation Inhibitors
PAR-1 Antagonists
SCH 530348
E-5555
ADP P2Y12 Receptor Antagonists
Ticlopidine
Clopidogrel
Prasugrel
[AZD6140 (ticagrelor)]
[Cangrelor]
[PRT128 (elinogrel)]
ADP P2Y1 Receptor Antagonists
A2P5P
A3P5P
MRS2179
MRS2279
MRS2500
Thrombin
PAR-1
PAR-4
P2Y1
ADP
TPα-R
TxA2
TxA2
TPβ-R
Gq
G12/13
Gi
P2Y12
Thrombin
ADP
5-HT2A
5-HT2A
Intracellular Signalling Activation
Platelet
TxA2
COX-1
Thromboxane Inhibitors
Aspirin
NCX-4016
Ridogrel
S18886
Picotamide
Ramatroban
GPIb/IIIa
GPIa/IIa
GPVI
GPIbα-GPIX-GPV
5-HT2A Antagonists
R-1012444
Naftidrofuryl
Sarpogrelate
AT-1015
Adhesion Antagonists
C1qTNF-related protein-1
DZ-697b
RG12986
Fibrinogen
Endothelium
Collagen
vWF
Platelet
Aggregation Inhibitors

داروهای مهارکننده مستقیم ترومبین (DTI):

از این مجموعه می‌توان به لپیرودین یا هیرودین (رفلودان)، آرگاتروبان، بی‌والیرودین (آنژیوماکس) و اکزاتنا (زیملاگاتران)[1] اشاره نمود که به‌جز مورد آخر، مابقی دارای تأییدیه FDA هستند. این داروها بدون نیاز به AT-III یا HCF-II و با اتصال به یک یا چند جایگاه خاص از ترومبین، یعنی جایگاه فعال، جایگاه شناسایی سوبسترا (اگزوسایت ۱) یا جایگاه اتصال به فیبرین (اگزوسایت ۲) قادر به مهار مستقیم ترومبین هستند که برای این منظور مهار یک یا هردو جایگاه فعال یا اگزوسایت 1 الزامی است. آرگاتروبان و اکزاتنا با اتصال به جایگاه فعال، بی‌والیرودین با اتصال به اگزوسایت ۱ و هیرودین با اتصال به هردو جایگاه باعث مهار ترومبین و مسیر مشترک انعقادی می‌شوند. از داروهای مهارکننده مستقیم فاکتور X (نه ترومبین) هم که نیازی به مونیتورینگ ندارند، می‌توان به dabigatran، rivaroxaban، Apixaban، Betrixaban، Derexaban و Edoxaban اشاره نمود.

شکل ۳۴: نحوه عملکرد ضدانعقادهای مستقیم ترومبین (DTI) اتصال هیرودین غیرقابل برگشت و اتصال آرگاتروبان برگشت پذیر است.

جدول ۴-۱۰: داروهای ضد آترومبوز که در طی مراحل مختلف کارایی در بیماری شناخته [۲۸]

Mechanism(s) Of action	Drug	Status*	Inhibition of
ADP receptor antagonists	Clopidogrel (oral)	Approved	Activation
	Prasugrel (oral)	Phase III	Aggregation
	Cangrelor (iv)	Phase III	
	AZD6140 (oral)	Phase III	
COX inhibitors	Aspirin (oral)	Approved	Activation
	NCX 4016	Experimental	Aggregation
GP IIb/IIIa inhibitors	Abciximab (iv)	Approved	Aggregation
	Eptifibatide (iv)	Approved	Adhesion
	Tirofiban (iv)	Approved	
Phosphodiesterase inhibitors	Dipyridamole (oral)	Approved	Activation
	Cilostazol	Off label	Aggregation
	Sildenafil	Off label	
Thromboxane receptor/synthase inhibitors	Terbogrel	Off label	Activation
	[illegible]	Experimental	Aggregation
	BM-573	Experimental	
PI receptor agonists	Ticagrelor	Off label	Aggregation
	Regrelor	Off label	Activation
PAF antagonists	Apafant	Approved	Aggregation
	Pegdinetib	Experimental	Activation
Thrombin inhibitors	Dabigatran	Off label	Aggregation
	Argatroban	Off label	Activation
	Bivalirudin	Off label	
	Ximelagatran	Phase III	
GP IV antagonists	5B4	Experimental	Adhesion
Collagen receptor antagonists	JAQ1/17	Off label	Aggregation
			Activation
P-selectin inhibitors	PSL-K5	Experimental	Adhesion
Selective serotonin reuptake inhibitors	Sertraline	Off label	Activation
			Aggregation
Inhibitors of megakaryocytopoiesis	Hydroxyurea	Approved	Platelet production
	Anagrelide	Approved	
Inhibitors of FcγRIIA	IgG	Approved	Platelet consumption
Stimulators of megakaryocytopoiesis	Thrombopoietin	Approved	Increased platelet production
	AMG 531	Phase III	

*Summary of the different antiplatelet agents in clinical use or under development. "Off label" indicates that the drug is approved for uses other than as an antiplatelet agent.

بیماری‌های سیستم انعقاد اولیه:

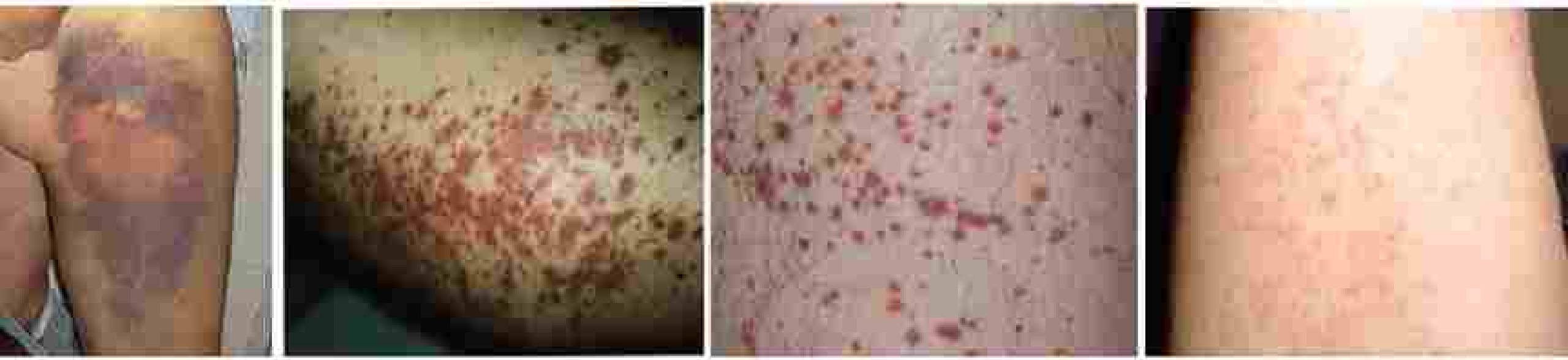
این دسته از بیماری‌ها علل مختلفی داشته و چندین بعد از اختلالات خونی، عروقی و متابولیسمی را از نظر ارثی، اکتسابی، ایمونولوژیکی و محیطی بررسی و علت‌یابی می‌کند. بیماری‌های سیستم انعقاد اولیه از دیدگاه اتیولوژی به چند دسته تقسیم می‌شوند:

۱- علل عروقی: مثل سندرم‌های مارفان، اهلر-دانلوس، اوسلر-وبر-رندائو (OWR)، سودوگزانتوما الاستیکم، اسکوروی و هیپراستروئیدی

۲- علل پلاکتی: اختلال کمی (ترومبوسیتوپنی) و یا کیفی (نقص عملکرد پلاکتی)

۳- اختلالات پروتئینی: مثل اختلالات VWF (VWD و TTP) و اختلالات فیبرینوژن (کمی و کیفی)

در بیماری‌های انعقاد اولیه اختلال کمی یا کیفی در تعداد یا عملکرد پلاکت باعث عدم توانایی آنها در درزگیری فضای بین اندوتلیوم عروقی شده و در نتیجه خونریزی‌های زیرجلدی کوچکی (زیر ۳mm) در سطح پوست ایجاد می‌شود که به آنها پتشی[1] گفته می‌شود. پتشی‌ها در فرم جوان خود قرمز تا بنفش و در فرم کهنه خود آبی تا قهوه‌ای رنگ بوده و به فرم بزرگتر پتشی‌ها، پورپورا (۱۰-۳ mm) گفته می‌شود. گاهی لکه‌های پورپورا به هم متصل شده و فرم بزرگ‌تری را به خود می‌گیرند که به آنها اکیموز[2] (>1cm) گفته می‌شود. گاهی نیز به دلیل تروما و ضربه شدید به پوست، یک خونریزی زیرجلدی بزرگ و کبود رنگی ایجاد می‌شود که به آن هماتوم[3] یا کبودی[4] گفته می‌شود و بیشتر به دلیل ضربه شدید یا اختلال در انعقاد ثانویه ایجاد می‌شود تا نقص پلاکتی و عروقی. برخلاف سه مورد قبلی، هماتوم اغلب برجسته بوده و با پارگی مویرگ‌های زیرپوستی و تجمع خون مایع یا لخته شده همراه می‌باشد. خونریزی و پارگی مویرگ‌ها اگر در سطح پوست نباشد، باعث هماتوم نشده، بلکه منجر به خونریزی داخلی می‌شود که قابل مشاهده نمی‌باشد. به ایجاد هماتوم در مفاصل دست یا پا نیز همارتروز گفته می‌شود که اغلب در بیماری هموفیلی و برخی انواع VWD دیده می‌شود. گاهی عروق خونی در اثر بروز یک تومور خوش‌خیم در اندوتلیوم دچار التهابات شدید و کلاف مانند می‌شوند که به آن همانژیوم گفته می‌شود که فرم سطحی آنها باعث ایجاد لکه‌های بنفش کوچک یا بزرگ برجسته در سطح پوست می‌شود[5]. لازم به ذکر است، افزایش سطح مس خون، مسمومیت با مس، کم‌کاری کبد، کاهش سرولوپلاسمین و افزایش سطح استروژن نیز می‌توانند آنژیوماهای کوچکی را در سطح پوست ایجاد کنند [۳۷].

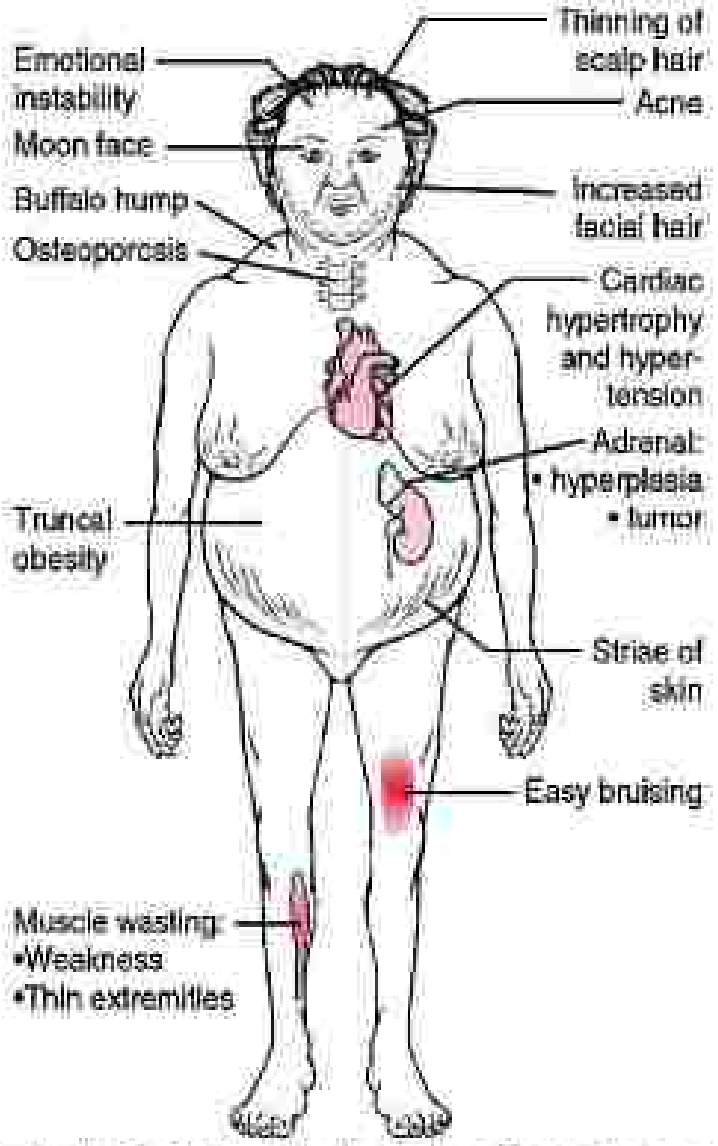


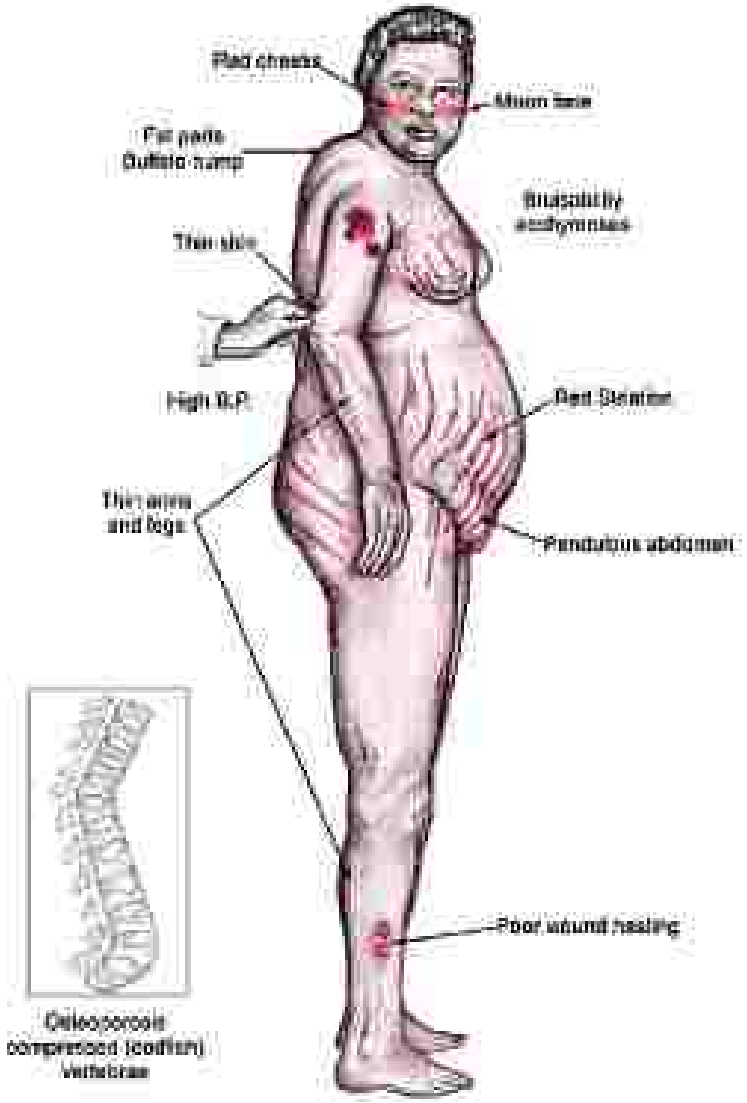
شکل ۱-۵۲: از راست به چپ: پتشی، پورپورا، اکیموز و هماتوم که همگی آنها غالباً در اندام‌های انتهایی-تحتانی مثل زانو، قوزک پا، ساق پا، دست و گاهاً در شانه و پشت دیده می‌شوند.

شکل ۲-۵۲: انواع مختلف هماتزیوم کوچک و سطحی که تصویر ۴ در اثر افزایش مس خون ایجاد شده است.

شکل ۳-۵۲: پوپورای اورتواستاتیک و پورپورای منتشر صورت و پلک [۳۷]

شکل ۴-۵۲: پورپورای یا اکیموز پیری [۳۷]





C - Central obesity, Cervical fat pads, Collagen fibre weakness, Comedones (acne)
U - Urinary free cortisol and glucose increase
S - Striae, Suppressed immunity
H -Hypercortisolism, Hypertension, Hyperglycemia, Hypercholesterolemia, Hirsutism, Hypernatremia, Hypokalemia
I - Iatrogenic (Increased administration of corticosteroids)
N -Noniatrogenic (Neoplasms)
G -Glucose intolerance, Growth retardation

شکل ۲: ۵۴- علایم بالینی در سندرم کوشینگ [۶]

شکل ۸-۵۲: خونریزی پری فولیکولار در اسکوروی [۳۷]

شکل ۹-۵۲: اکیموز و التهاب شدید لثه در بیماری اسکوروی مزمن

شکل ۱۴-۵۲: پورپورای هنوخ شونلاین. این بیماری پوست، بافت همبند، کلیه، گوارش، بیضه و مفاصل و ندرتاً CNS را درگیر می‌سازد.

شکل ۱۶-۵۲: حساسیت پوستی به داروی آلوپوریتول که خود را با پورپورا، راش و سندرم استیون-جانسون (افزایش حساسیت و آپوپتوز کراتوسیت‌های پوست و مخاط به دارو و عفونت) نشان می‌دهد.

معروف‌ترین آنها آلرژی به آلوپوریتول یا زیلوپریم(داروی ضد نقرس) است که ائوزینوفیلی، گاهاً پان‌سیتوپنی، راش پوستی (سندرم استیون-جانسون، TEN یا DRESS)[1]، پورپورای وسیع جلدی و نقص عملکرد کلیوی می‌دهد. پنی سیلین، سولفاناميد، سفالوسپورین، ریفامپین، باربی‌تورات و دیورتیک‌ها نیز در درجات بعدی قرار دارند.

شکل ۱۷-۵۲: لکه سرخ در بیماری تیفوئید (عفونت با سالمونلا تایفی) که شبیه پورپورا دیده می‌شود.

شکل ۱۸-۵۲: پورپورای فولمینانت کشنده که اغلب در بستر کمبود یکی از پروتئین‌های ضد انعقادی مثل Pro-C یا یک سپتی‌سمی رخ می‌دهد.

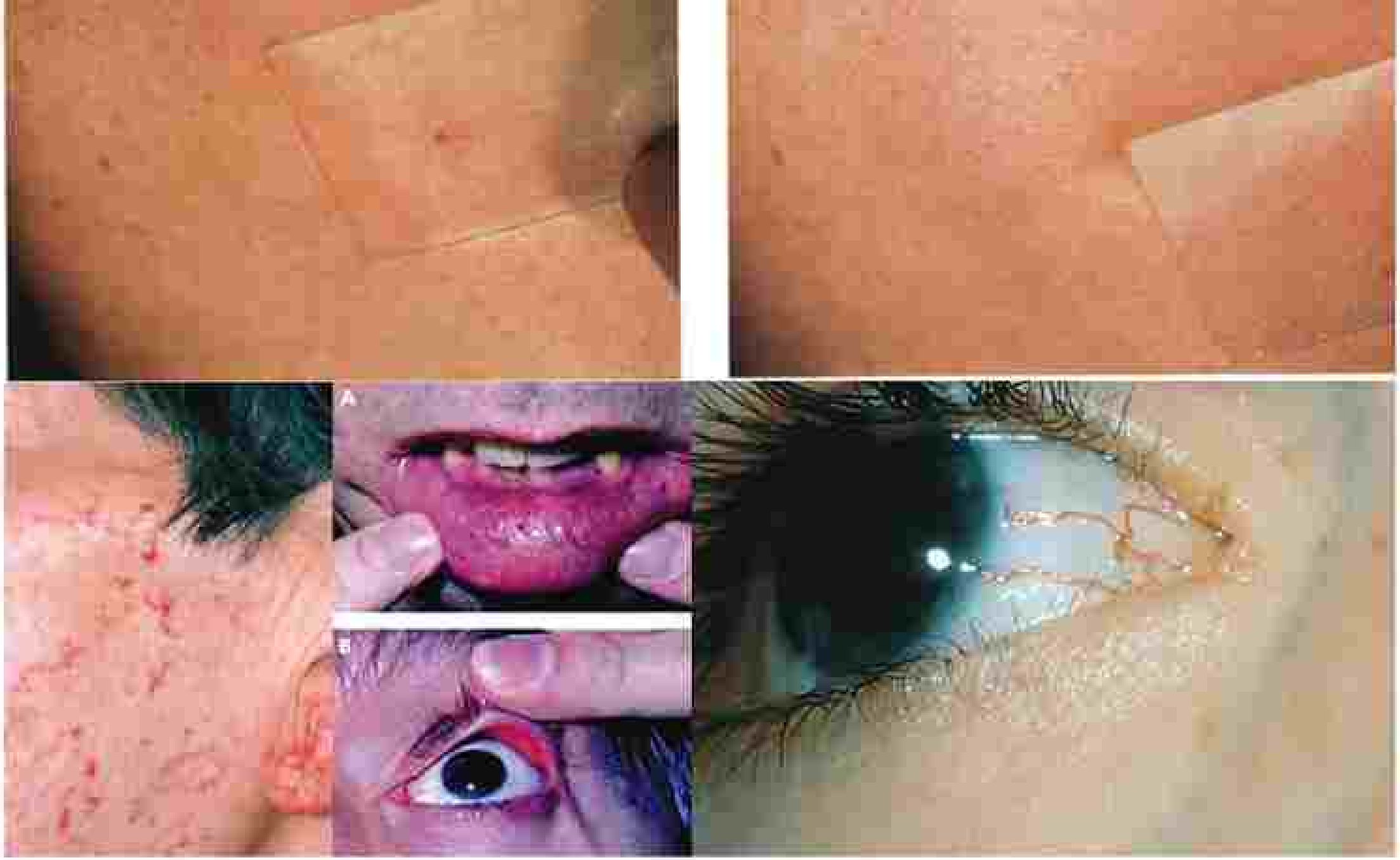
شکل ۲۰-۵۲: واکنش واترهوس فردریکسون در مننگوکوک

شکل ۲۱-۵۲: راش پوستی شبه پروانه در بیماری لوپوس که در اکثر موارد به دلیل ترومبوسیتوپنی و اختلال عملکرد پلاکتی با پورپورا نیز همراه می‌باشد.

شکل ۲۵-۵۲: منظره پورپورا و خونریزی زیرناخن در کراپوگلبولینمی (سمت چپ) و در ماکروگلبولینمی والدنشتروم (سمت راست)

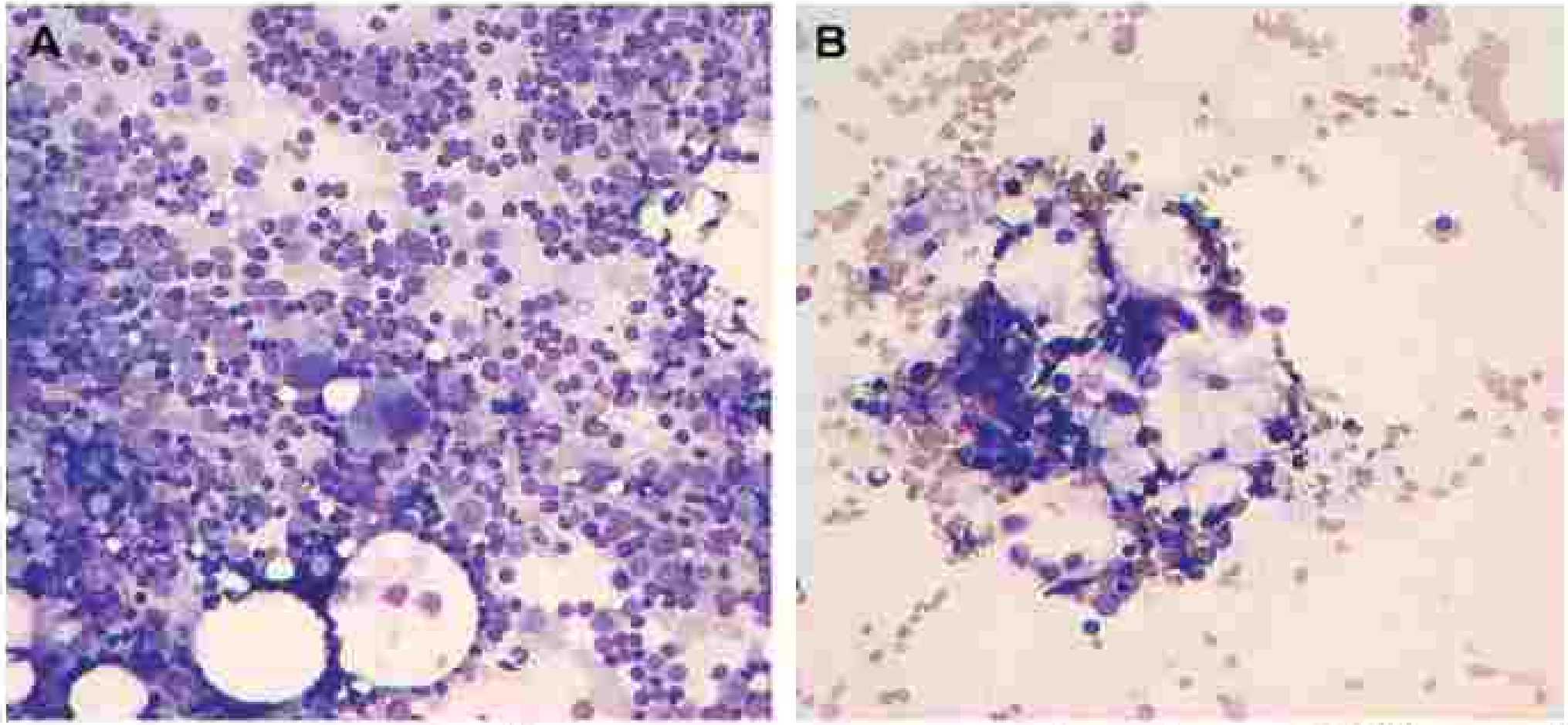
شکل ۳۸-۵۲: ملفورمیشن آرترو-وئوس (AVM) در کبد، مخاط و مغز بیمار مبتلا به HHT که بهترین روش شناسایی آنها می‌تواند MRI باشد.

شکل ۳۹-۵۲: تلانژکتازی پوستی و مخاطی در لب، زبان، دهان و سطح پوست بیمار مبتلا به HHT

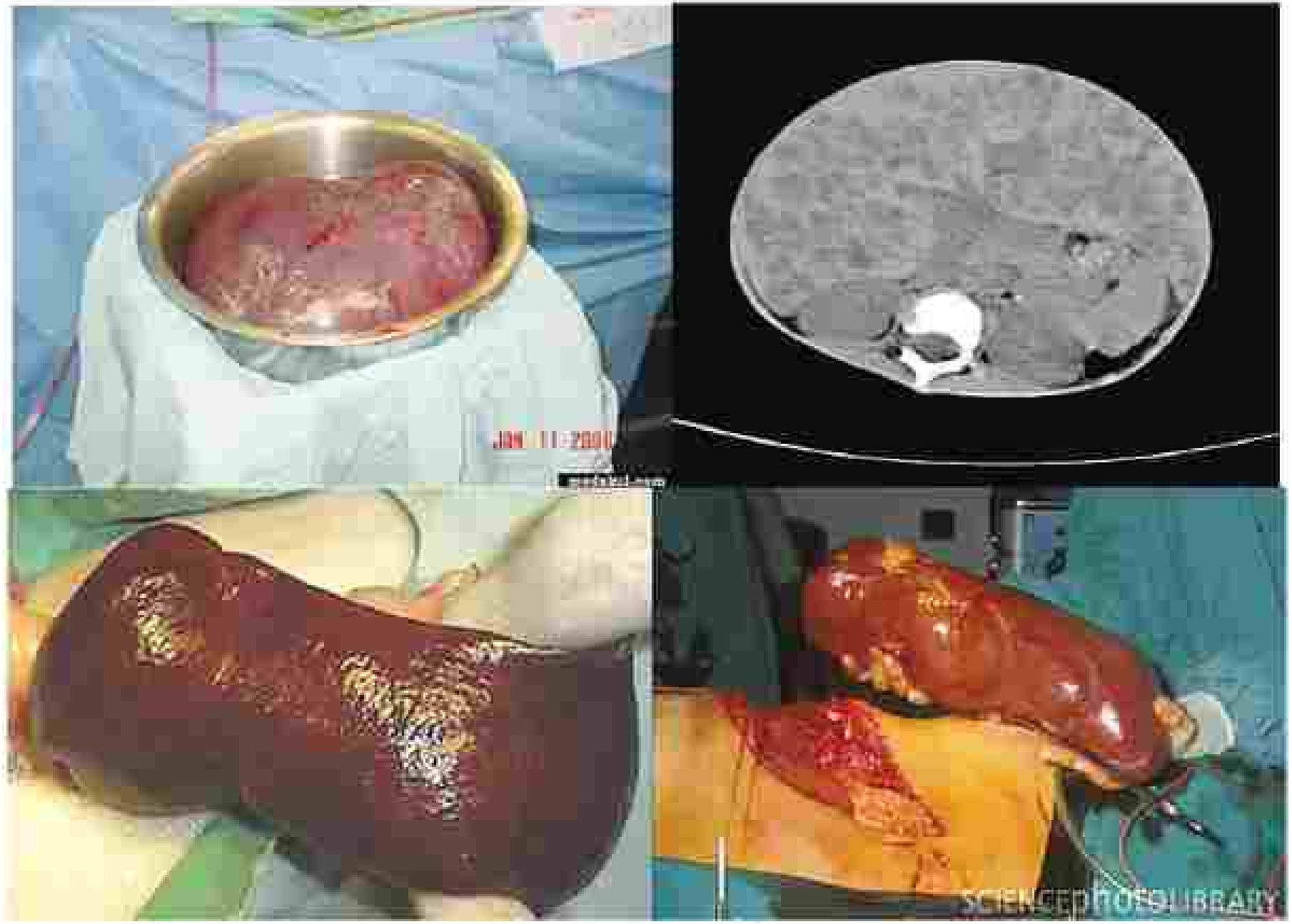


شکل ۴۰-۵۲: تصویری از تلانژکتازی ارثی یا سندرم OWR که متفاوت از پورپورا هستند. تلانژکتازی با فشار دست یا لام موقتاً محو می‌شود (شکل بالا)[۳۷]

شکل ۶۱-۵۲: پتشی و پورپورای شدید در نوزاد مبتلا به CAMT

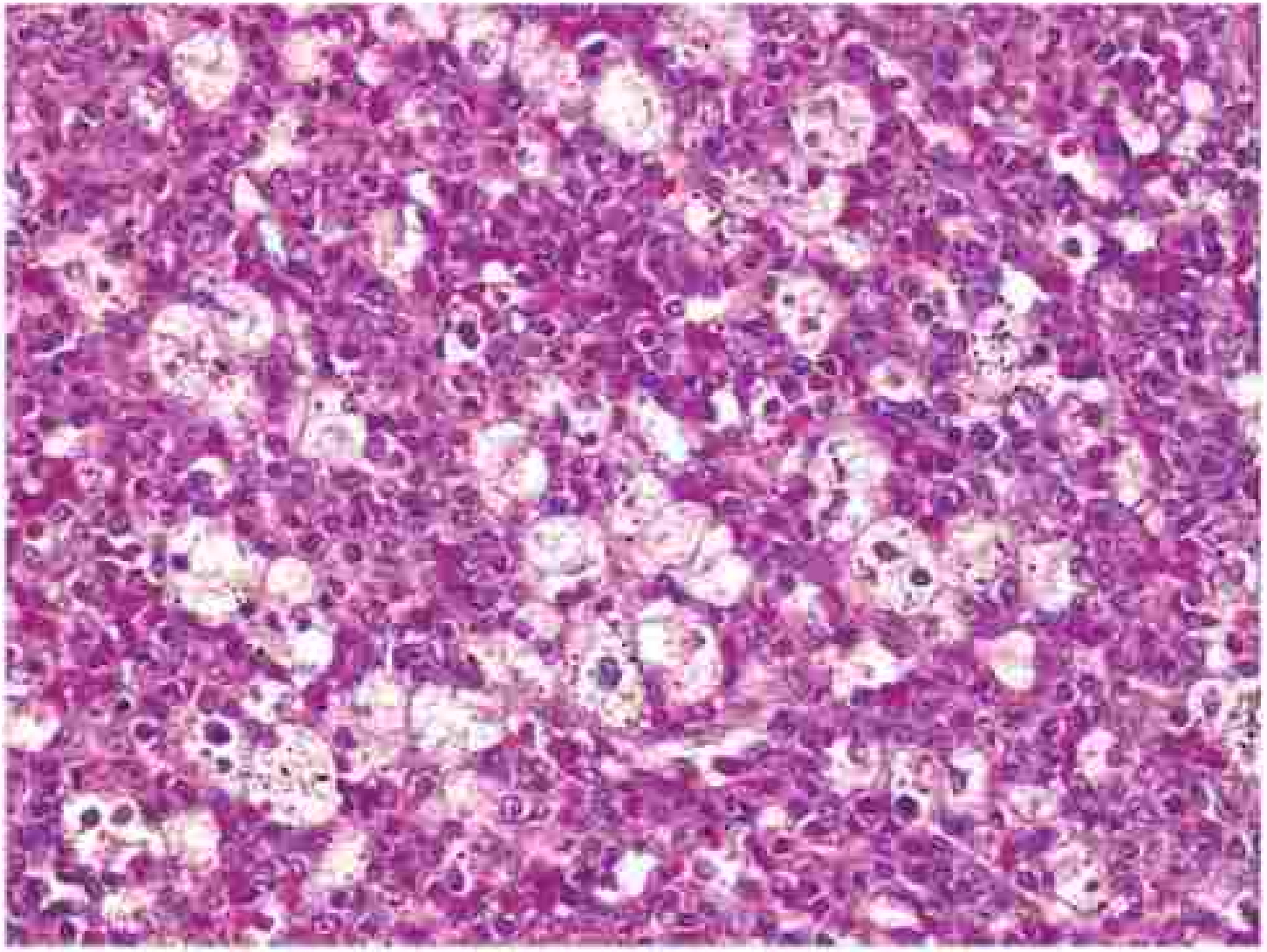


شکل ۶۳-۵۲-BM نوزاد مبتلا به CAMPT که در تصویر A فقط دو مگاکاریوسیت هیپولوبوله (ماه سوم نوزادی) و در تصویر B هیچ مگاکاریوسیتی دیده نمی‌شود (ماه هفتم). به دلیل اثر آنتی-آپوپتوتیک TPO در هماتوپوئز، یک دیس‌پلازی سه رده‌ای نیز در این بیماران دیده می‌شود.



شکل ۸۷-۵۳: تصاویر مختلف از اسپلنومگالی‌های حجیم که در اکثر موارد با اسپلنکتومی توتال درمان می‌شوند.

شکل ۹۸-۵۲: علایم پتشی، پورپورا، کیست‌های خونی در مخاط دهان و خونریزی‌های مخاطی در بیمار مبتلا به ITP



شکل ۹۹-۵۲: منظره BM از بیمار مبتلا به ITP که افزایش مگاکاریوسیت‌های صاف و بدون جوانه با سیتوپلاسم آبی و کم گرانول را به همراه پتشی‌های وسیع پوستی نشان می‌دهد.

آزمایشات هموستاز اولیه شامل موارد زیر هستند:

۱- شمارش دستی یا دستگاهی پلاکت و بررسی گستره خون محیطی (PBS)

۲- تست زمان خونروی[1] (BT) یا معادل دستگاهی آن، تست PFA-100

۳- تست زمان انعقاد خون تام[2] (CT)

۴- تست تورنیکت یا تست کارو

۵- تست اگرگاسیون پلاکتی با دستگاه اگریگومتر

۶- تست انقباض یا توکشیدگی لخته

۷- تعیین عیار آنتی بادی ضد پلاکت (تست هارینگتون)

۸- میزان کمی و کیفی فاکتور VWF

۹- اندازه گیری مواد مترشحه از پلاکت‌ها در زمان انعقاد (ATP، سروتونین و DMA)

۱۰- بررسی توانایی اتصال پلاکت‌ها به تیله‌های کوچک شیشه‌ای یا تست رتانسیون پلاکتی برای غربال‌گری سندرم برنارد سولیر

۱۱- فلوسایتومتری و ایمونوسیتوشیمی برای بررسی مارکرهای سطحی یا سیتوپلاسمی

۱۲- بررسی میزان PF3 برای تشخیص سندرم اسکات

۱۳- دیگر تست‌های متفرقه

Tube Top Colors: Additives and Uses

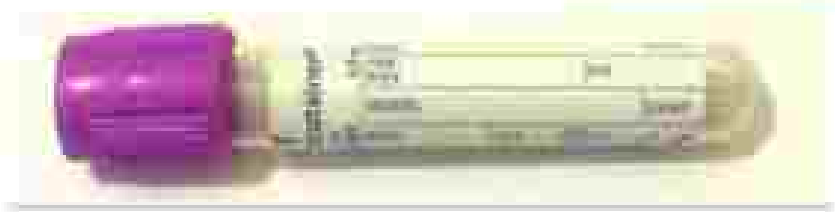
Common Blood Collection

Color (Additive		Color (Additive	
Red (None)		Yellow (SPS-Sodium Polyanetholesulfonate)	
Red Marble Top or Gold (Clot activator and gel for serum separation)		Yellow Marble Top or Orange Thrombin	
Light Blue (Sodium Citrate		Light Green Lithium heparin and gel for plasma separation	
Green (Sodium Heparin or Lithium Heparin		Pink (EDTA)	
Lavender (EDTA ethylenediamine teraacetic acid)		Tan (Sodium Heparin (glass tubes) EDTA (plastic))	
Gray (Patassium Oxalater sodium Fluoride or sodium Fluoride		Royal Blue (Sodium Heparin EDTA None)	

Medicalestudy.com

- LIGHT BLUE TOP
- SODIUM CITRATE 1:9 (anticoagulant)
- Plasma
- Uses :

1- PT
2- PTT
3- INR
4- D-dimer
5- FDP



THE PURPLE ONE (aka "Lavender")

These bottles are generally used for **haematology** tests where **whole blood** is required for analysis.

This tube contains **EDTA** (ethylenediaminetetraacetic acid), which acts as a potent **anticoagulant** by binding to calcium in the blood.

COMMON TESTS:

- **full blood count (FBC)**
- **erythrocyte sedimentation rate (ESR)**
- **blood film** (for abnormal cells or malaria parasites)
- **reticulocytes**
- **red cell folate**
- **Monospot test** for EBV
- **HbA1C** for diabetic control
- **parathyroid hormone** (PTH)

چ) شمارش اتوماتیک یا دستگاهی پلاکت‌ها در تست CBC[1] یا FBC[2]:

در برخی کشورها به تست‌های پیشرفته CBC که علاوه بر اندکس‌های سه‌گانه ویتروب (MCHC, MCH, MCV)، دارای اندکس‌های متعدد و تکمیلی MCD, MPV, PDW, RDW و ... هستند، تست FBC گفته می‌شود. تعداد این اندکس‌ها می‌تواند تا ۳۵ پارامتر باشد که نسل جدید سل‌کانترهای اتوماتیک مثل Advia-2120، Sysmex-XE-2100i، Abbot Cell Dyne-4000، ABX-Pentra120i و کولترهای سری LH مثل LH-750 از این دسته هستند. این دستگاه‌ها به دلیل شمارش پلاکت‌ها هم با روش امپدانس و هم با روش اوپتیکال (MAPPS)، قادر هستند قطعات ۲۰-۴ فمتولیتری که در روش امپدانس به‌عنوان پلاکت شمرده می‌شوند را بار دیگر مورد ارزیابی قرار داده و پلاکت‌های واقعی را از موارد کاذب مثل شیستوسیت‌ها، بقایایی سیتوپلاسمی، انگل‌های کوچک خونی، مخمر کاندیدیا، دبری‌های بزرگ و دیگر موارد مشابه افتراق دهند.

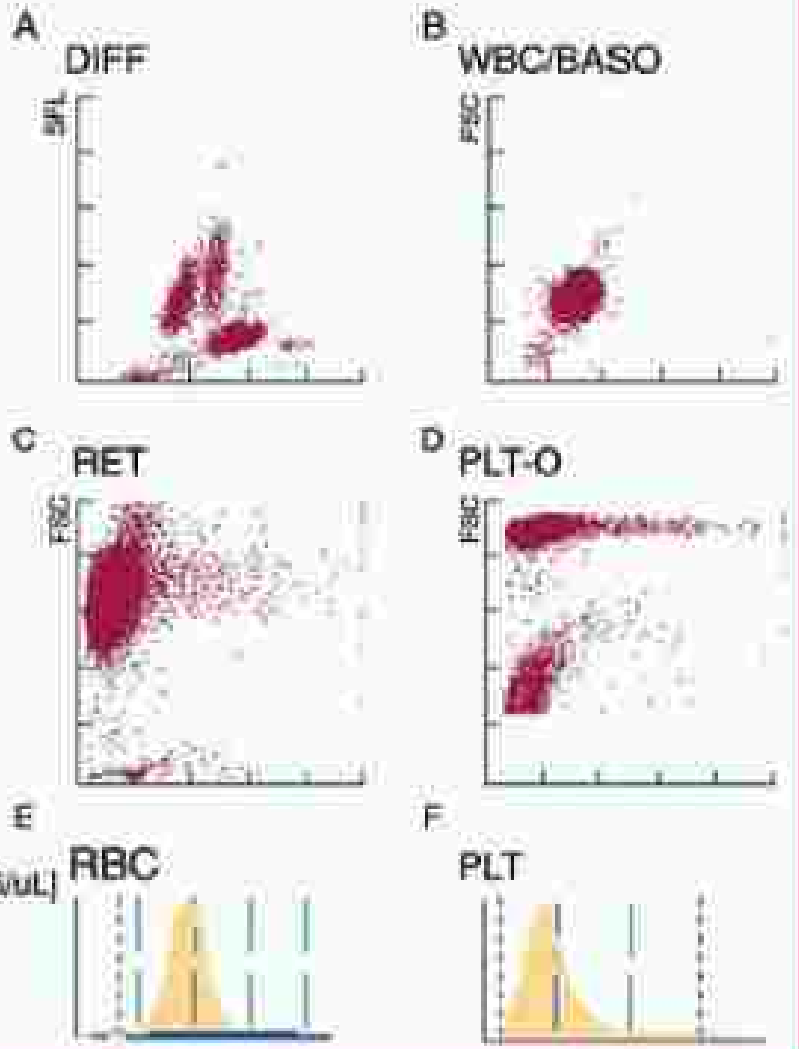
شکل ۴-۵: از راست به چپ: Pentra-120i، Advia-2120 و سیسمکس SE-2100i [۳]

SYSMEX XE – 2100

Sample No.: ERR000000000005 Rack: 9 Tube: 4 05/29/2005 15:41:55
Patient ID: 4004 Ward: Dr.:
Name: Birth: Sex:
Comments: Inst.ID:FLO

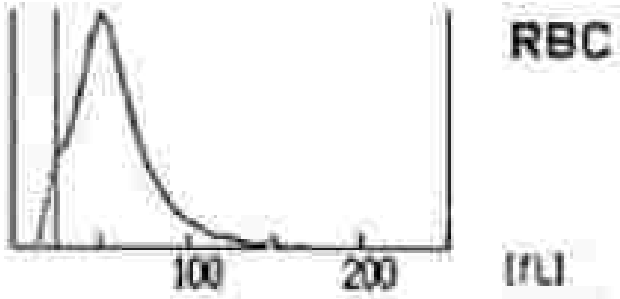
Negative

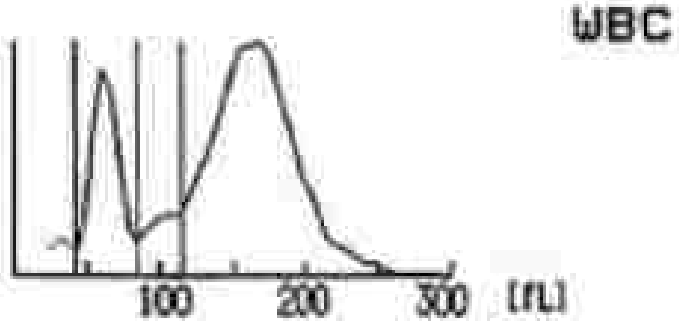
WBC	8.73		[10^3/µL]		
RBC	4.14	-	[10^6/µL]		
HGB	12.2		[g/dL]		
HCT	37.9		[%]		
MCV	91.5		[fL]		
MCH	29.5		[pg]		
MCHC	32.2		[g/dL]		
PLT	321		[10^3/µL]		
RDW-SD	48.0		[fL]		
RDW-CV	14.7		[%]		
MPV	8.7	-	[fL]		
NEUT	5.55		[10^3/µL]	63.6	[%]
LYMPH	2.00		[10^3/µL]	22.9	[%]
MONO	1.12	+	[10^3/µL]	12.8	[%]
EO	0.04		[10^3/µL]	0.5	[%]
BASO	0.02		[10^3/µL]	0.2	[%]
RET	1.27		[%]	0.0526	[10^6/uL]
IRF	11.4		[%]		



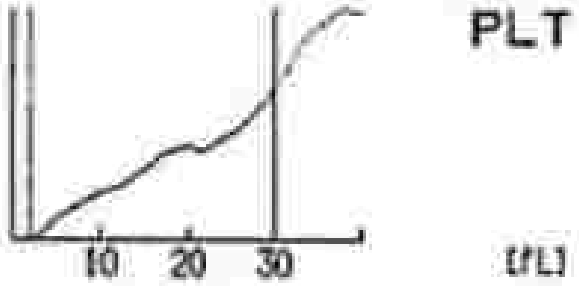
Diamond-Series and Sysmex-series ©2001-2003 by Sysmex, an imprint of Diamond Inc.

WBC		5.8×10³/μL		
RBC	RL*	5.65×10⁶/μL		
HGB	-	8.4g/dL	LYM%	21.0%
HCT	RL*	32.5%	MXD%	7.2%
MCV	RL*	57.5fL	NEUT%	71.8%
MCH	RL*	14.9pg	LYM#	1.2×10³/μL
MCHC	RL*	25.8g/dL	MXD#	0.4×10³/μL
PLT	PU!	1884×10³/μL	NEUT#	4.2×10³/μL

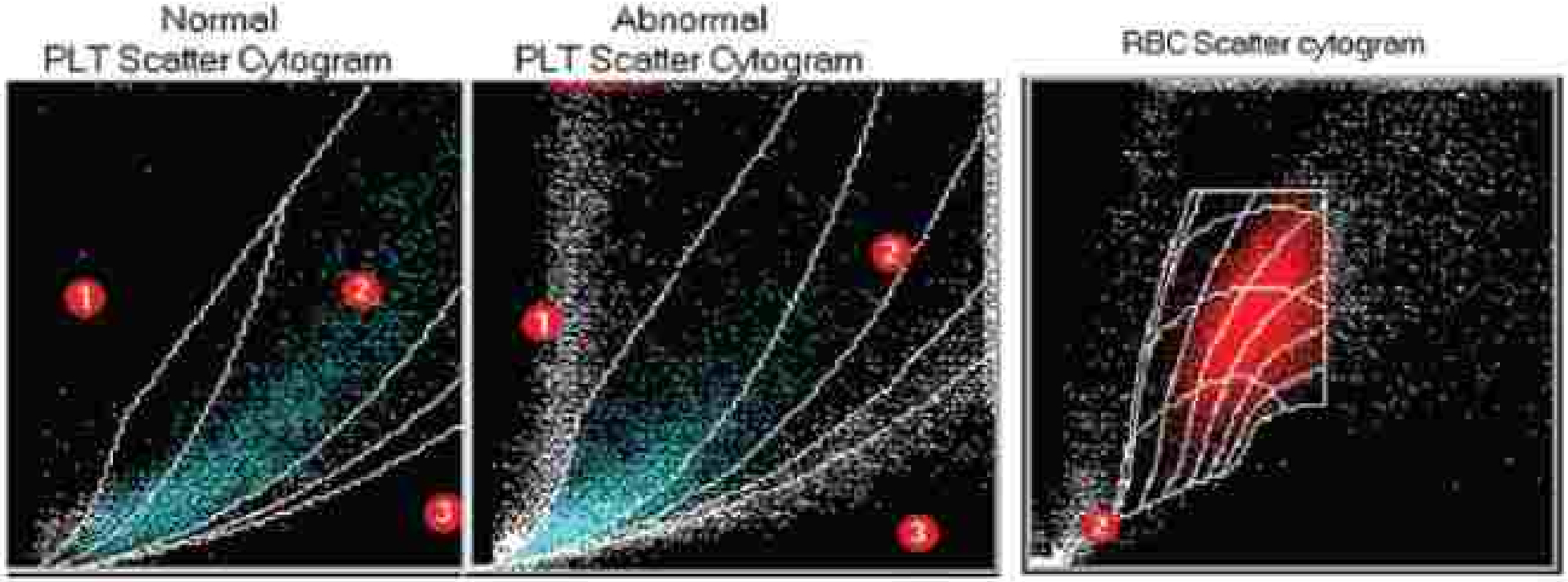




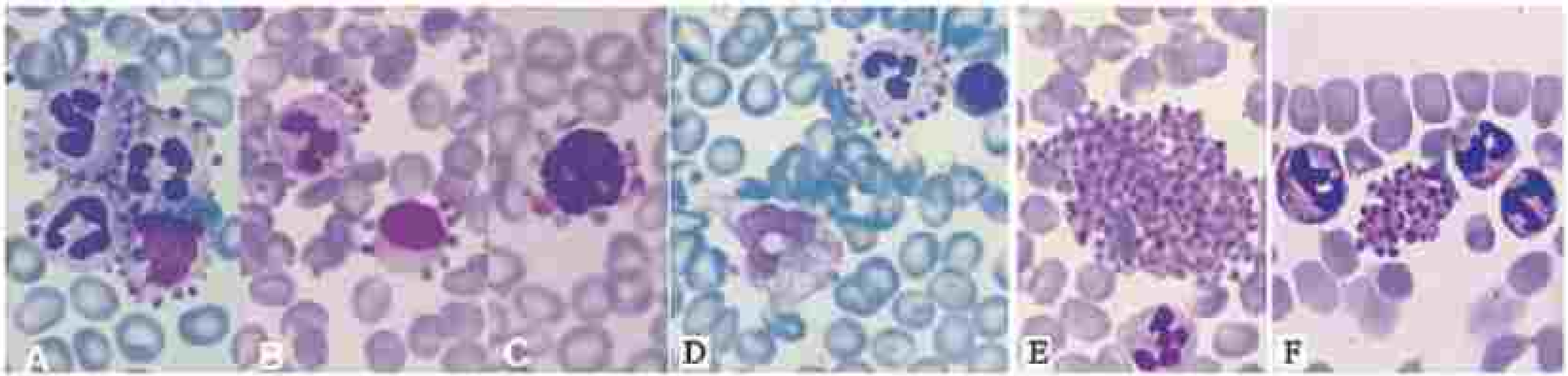
RDW RL* 32.3%



PDW	DW	---.-fL
MPV	PU	---.-fL
P-LCR	PU	---.-%



شکل ۶-۴: سه جایگاه مختلف شمارش پلاکتی که دستگاه Advia از جایگاه ۲ برای شمارش پلاکت‌های حقیقی استفاده می‌کند [۳]



شکل ۸-۵۴: اگرگاسیون پلاکتی (تصاویر E و F) و پدیده پلاکت الماری یا ستلایتیسم در اطراف نوتروفیل و مونوسیت (A). لنفوسیت (B) و بازوفیل (C). تصویر D یک نوتروفیل با پلاکت‌های الماری و یک مونوسیت که پلاکت‌های الماری دور خود را فاگوسیت نموده است را نشان می‌دهد. به دلایل نامعلوم، در افراد دارای پدیده ستلایتیسم احتمال بروز APS (سندرم آنتی‌فسفولیپید) بالاتر است.

تست تورنیکت یا گارو:

تست تورنیکت تستی معادل BT است که اختلالات عروقی را از اختلالات پلاکتی تفکیک می‌کند. در این تست فشارسنج به مدت ۵ دقیقه و تا ۸۰mmHg روی بازو بسته می‌ماند و بعد از آن ظهور پتشی و پورپورا در ۱/۵ اینچ مربع از سطح ساعد مورد بررسی و معاینه قرار می‌گیرد. برای این کار از کاغذهای استاندارد با برش دایره‌ای متناسب با مساحت فوق استفاده می‌شود. قبل از تست باید معاینه اولیه برای رد هرنوع پورپورای قبلی انجام شود. این تست عموماً در کنار تست BT انجام می‌شود و اگر تست مختل بود، شاهد ظهور پورپورا در ساعد دست خواهیم بود ولی در افراد نرمال تا ۵ دقیقه یا پورپورایی در سطح ساعد دست دیده نمی‌شود یا این‌که تعداد آن زیر ۵ عدد می‌باشد. اگر تست BT نرمال ولی تست گارو مختل بود و بیش از ۷ لکه پورپورا در سطح پوست ایجاد شد، اختلال عروقی و نه پلاکتی مورد شک قرار می‌گیرد.

شکل ۳۱-۵۴: تست تورنیکت مثبت در یک بیمار مبتلا به اختلالات عروقی

تست زمان خونروی یا BT[1]:

تست زمان خونروی یا BT، به فاصله زمانی بین برش استاندارد پوست تا بند آمدن خون قرمز (نه پلاسما یا اگزودا) گفته می‌شود. البته در این تست، به‌جز زمان خونریزی، مقدار خون و الگوی خونریزی هم مهم هستند. زمان طبیعی تست BT زیر ۸ دقیقه می‌باشد. از علل افزایش زمان آن می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱- اختلال عملکرد پلاکتی با علل مختلف ذاتی یا اکتسابی (مثل اورمی، سندرم‌های مختلف و مصرف آسپرین یا دیگر داروهای ضد پلاکتی).

۲- اختلالات عروقی و جدار مویرگی با علل ارثی و اکتسابی.

۳- ترومبوسیتوپنی شدید زیر ۱۰۰۰۰۰ /μl با علل مختلف.

۴- انواع بیماری VWD (به‌جز تیپ IIN)، کمبود شدید فیبرینوژن و بیماری‌های دیس‌فیبرینوژنمی.

۵- آنمی شدید با هماتوکریت زیر ۳۰٪.

در شرایط ترومبوسیتوپنی، به شرطی که اختلال انعقاد اولیه به دلایل عملکردی و کیفی نبوده و ناشی از تعداد پلاکت و اختلال کمی باشد، نتیجه تست BT تا حدودی قابل پیش بینی خواهد بود:

BT قابل انتظار = ۳۰۰ − (ضریب شمارش پلاکتی × $۱۰^{۳}$=۴)

مثال پلاکت ۲۰×۱۰^{۳}: BT قابل انتظار = ۳۰۰−(۲۰×۴) = ۲۵min

مثال پلاکت ۱۰۰×۱۰^{۳}: BT قابل انتظار = ۳۰۰−(۱۰۰×۴) = ۵min

برش را بند می‌آورد. تست BT با چهار روش انجام می‌شود:

۱- DUKE (ساده ترین)

۲- IVY

۳- Templat- BT (TBT) = Mielk یا روش توصیه شده WHO

۴- تست دستگاهی PFA-100

جدول ۲- خلاصه ویژگی‌های داروهای ضد انسداد دهنده (DSAIDs) موثر بر عملکرد پلاکت

دارو	مکانیزم آثار	نوع مصرف	نیمه عمر پلاسمایی	متابولیسم	طول مدت متابولیسم	افزایش PT/PTT	ARTIDOTE (پادزهر)
[illegible]	[illegible]	oral	50 hrs	کبدی	10 days	No/No	ندارد
[illegible]	[illegible]	oral/ supp	7 hrs	کبدی	48 hrs	No/No	ندارد
[illegible]	[illegible]	oral/ IV	5-7 hrs	کبدی	48 hrs	No/No	ندارد
[illegible]	[illegible]	oral	2 hrs	کبدی	24 hrs	No/No	ندارد
[illegible]	[illegible]	oral	13 hrs	کبدی	48 hrs	No/No	ندارد
[illegible]	[illegible]	oral	2 hrs	کبدی	24 hrs	No/No	ندارد
Celecoxib	[illegible]	oral	10-17 h	کبدی	none	No/No	ندارد
Aspirin	[illegible]	oral	20 min	کبدی	7 days	No/No	ندارد
Dipyridamole	nitroglycerine	oral	40 min	کبدی	24 hrs	No/No	ندارد
Clopidogrel (Plavix)	ADP-R (P2Y12)	oral	7 hrs	کبدی	5 days	No/No	ندارد
Ticlodipine (Ticlid)	ADP-R (P2Y12)	oral	4 days	کبدی	10 days	No/No	ندارد
Abciximab (ReoPro)	GPIIb-IIIa (RGD)	IV	30 min	کلیوی	72 hrs	No/No	ندارد
Eptifibatide	GPIIb-IIIa	IV	2.5 hrs	کلیوی	24 hrs	No/No	ندارد
Tirofiban	GPIIb-IIIa	IV	2 hrs	کلیوی	24 hrs	No/No	سرپرایا

الف) روش دوک:

در این روش از نرمه لاله گوش به‌عنوان محل برش پوست استفاده می‌شود. برای برش، لانست معمولی با عمق برش ۳mm و عرض ۲mm-۱ به‌کار رفته و از فشار سنج استفاده نمی‌شود. در نوزادان از عمق برش ۰/۵ mm استفاده می‌شود. بعد از لانست زدن به گوش، هر ۳۰ ثانیه یک‌بار خون خارج شده از زخم را با کاغذ صافی جذب و درنهایت مجموع زمان آنها را به ازاء هرکدام ۳۰ ثانیه محاسبه می‌کنیم. ملاک از توقف خونریزی این است که کاغذ صافی به خون آلوده نشود نه به سرم یا اگزودای ناشی از زخم. دوم این‌که نباید کاغذ صافی را با زخم تماس داد. بلکه با تماس کاغذ به گوشه قطره خون و جذب آن، خونریزی را بررسی نمود. حد نرمال آن ۱۵-۳ دقیقه بوده ولی مقادیر بالای ۱۵دقیقه به‌عنوان BT مختل گزارش می‌شود. به‌عبارتی، تا زمان ۸ دقیقه را به‌عنوان نرمال ثبت کرده و موارد ۱۵< دقیقه را به صورت Over 15' گزارش می‌کنند. موارد ۱۵-۸ دقیقه نیز می‌بایست مجدداً تکرار شوند. در تست BT بالای ۳۰ دقیقه احتمال پلاکت زیر ۱۰۰۰۰/μl بسیار افزایش می‌یابد. برای انجام تست BT به تجربه بالایی نیاز است و فرد مجرب به فردی گفته می‌شود که تجربه ۶۰ تست موفق و تکرار پذیر را داشته باشد.

شکل ۱۵-۵۴: انواع مختلف گوش‌های نرمه‌دار، بدون نرمه، غضروفی و غیره که روی نتایج تست BT تأثیرگذار هستند.

این تست به دلیل خطاهای زیادی که دارد قابلیت تکرارپذیری کمی داشته و امکان انجام داپلیکیت آن چندان مقدور نیست. از منابع اصلی خطای روش دوک می‌توان به گوش سرد، گوش غضروفی، گوش بدون نرمه، ترس و رنگ‌پریدگی، گوش‌هایی با سوراخ گوشواره بزرگ در خانم‌ها، سوراخ کوچک و کم عمق لانست و محل نامناسب لانست اشاره نمود. سرما، استرس و ترس با کاهش خون مویرگ‌ها و خالی شدن سریع آنها باعث کاهش کاذب BT می‌شوند. لذا بهتر است ابتدا با مالش گوش و گرم کردن آن، جریان بهتری از خون در لاله گوش فراهم شود. گوش‌های غضروفی یا بدون نرمه نیز به دلیل عروق اندک یا کم-خون می‌توانند باعث خطا شوند. اسید فنولیک و اسید گوانیدوسوکسینیک ناشی از اورمی، دیابت، چربی خون، سختی عروق و فشار خون بالا نیز باعث کاهش کاذب تست می‌شوند. لازم به ذکر است، تست BT نرمال یا طولانی رد کننده یا تأیید کننده یک وضعیت بالینی خونریزی دهنده نبوده و زمان طولانی شده آن نیز نمی‌تواند گویای شدت خونریزی حین جراحی یا بعد آن باشد.

۲- روش آی- وی- وای (IVY):

در این روش از روی ساعد دست برای برش پوست استفاده می‌شود. برای برش از لانست معمولی با عرض 1 mm و عمق ۳mm و به تعداد ۳-۲ سوراخ استفاده می‌شود تا تست به صورت دایلیکیت (دوتایی) یا تریپلیکیت (سه‌تایی) انجام شود. فاصله برش‌ها 5 cm -۳ بوده و در نهایت معدل سه برش محاسبه می‌شود. برای استاندارد سازی تست، از فشار ۴۰mmHg و لانست استاندارد استفاده می‌شود. در این روش، ابتدا فشار سنج را بالای بازو بسته و فشار آن را در ۴۰ تنظیم و سپس با لانست برش زده می‌شود. فشار مانع انقباض عروق شده و چون رگ پُرخون می‌شود، لذا احتمال خالی شدن مویرگ و خطای ناشی از آن وجود ندارد. مقدار نرمال روش IVY حدود 7 mm -۳ است. در این روش نیز خطای لانست وجود داشته و برش‌های لانست عمقی و کم عرض هستند.

شکل ۱۶-۵۴: تست BT به روش IVY

۳- روش مایلک یا TBT (BT الگو)

روش TBT (Template BT) مثل IVY بوده ولی به‌جای لانست از تیغ فنری استاندارد و خاصی با عمق ۱mm و طول ۹mm- ۵ استفاده می‌شود (hoyer ۱۹۸۲). زخم عمقی نبوده، بلکه طولی است، چراکه افزایش طول برش باعث افزایش حساسیت تست می‌شود. دامنه نرمال آن نیز ۹ min- ۳ است. در این روش هم ابتدا فشار را به ۴۰mmHg رسانده و سپس برش زده می‌شود. دمای سطح پوست باید °C ۳۳- ۲۵ باشد و دمای °C ۱۶ باعث کاهش کاذب و تب °C ۴۲ باعث افزایش کاذب آن می شود.

مقدار فشار در روش‌های TBT و IVY، برای بالغین ۴۰ میلی متر جیوه و برای نوزادان به وزن آن بستگی دارد، به‌طوری‌که:

- برای نوزاد زیر kg ۱، از فشار mmHg ۲۰
- برای نوزاد kg ۲-۱، از فشار mmHg ۲۵
- برای نوزاد بالای kg ۲، از فشار mmHg ۳۰ استفاده می‌شود.

برای بررسی فعالیت افزایش یافته انعقادی و شرایط هیپرکواگولانت، مثلاً در سکته قلبی، دیابتی‌های خاص، هیپرلیپیدوزها و هیپرلیپوپروتئینمی‌ها از فشار mmHg ۸۰ استفاده می‌شود. در افراد معمولی فشار ۸۰mmHg باعث افزایش کاذب تست BT می‌شود ولی در افراد فوق به دلیل شرایط هیپرکواگولانتی، تست BT افزایش چندانی پیدا نمی‌کند.

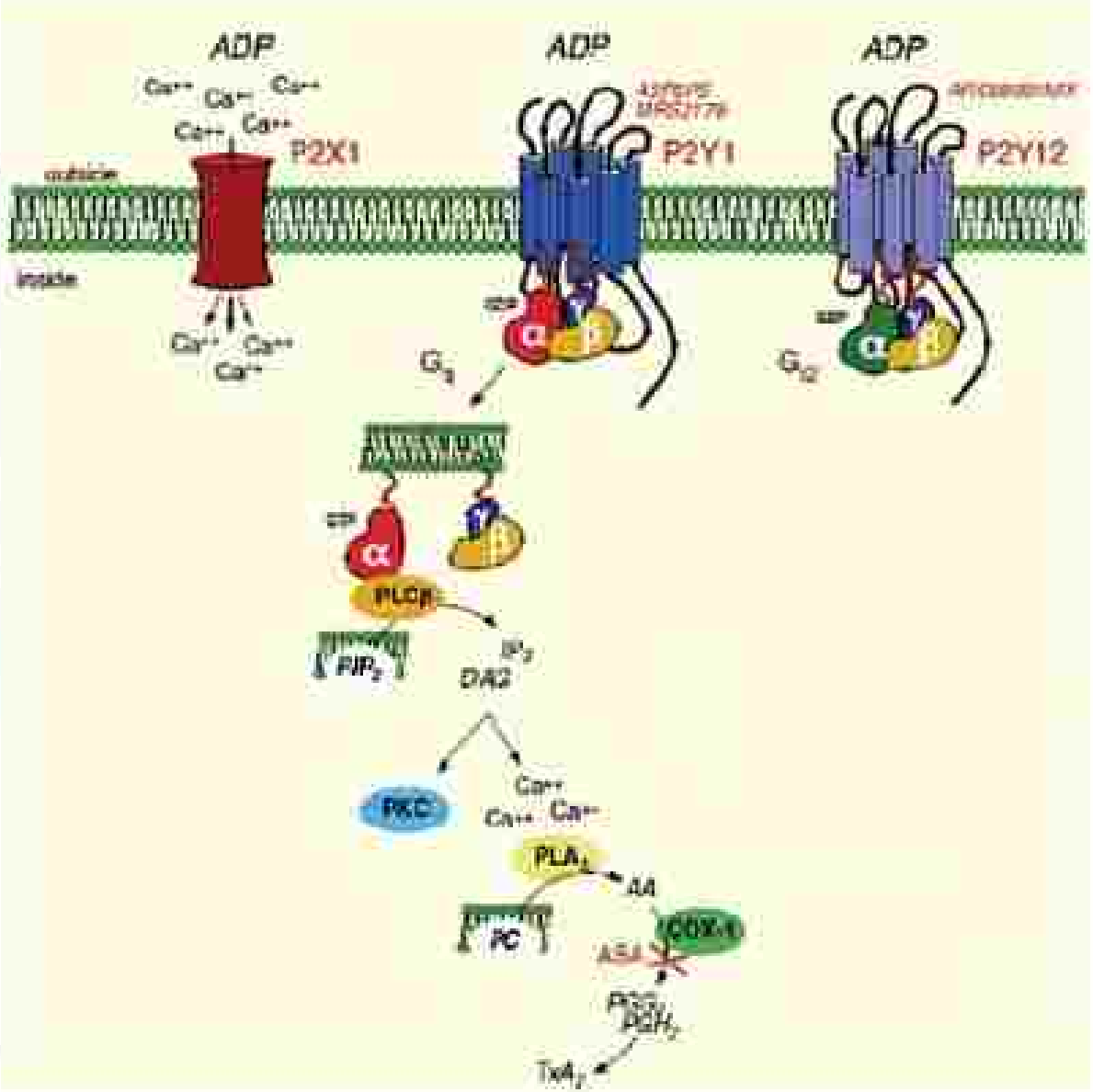
شکل ۱۷-۵۴ روش TBT برای انجام تست BT

تست PFA-100 یا تست ارزیابی عملکرد پلاکتی در In Vitro:

PFA-100 تستی است که در سال ۱۹۹۶ توسط شرکت بهرینگ سوئیس به‌جای تست BT ابداع شده و برای غربالگری اختلالات انعقاد اولیه ناشی از نقص داخلی و یا خارجی پلاکتی و حتی بیماری VWD به‌کار می‌رود. فرم اولیه PFA-100 در سال ۱۹۸۵ توسط کراتزر و بورن طراحی و ساخته شده بود. این تست می‌تواند در اتاق عمل نیز به عنوان یک ابزار سنجش هموستاز اولیه ست‌آپ و نصب شود. PFA-100 تستی است ساده، سریع، غیرتهاجمی، تکرار پذیر و استاندارد سازی شده که در غیرحضور بیمار و در شرایط کاملاً آزمایشگاهی انجام می‌شود. برای تقلید شرایط InVivo در دستگاه از سیستم جریان پرفشار و غشاء شبه عروق آغشته به کلاژن استفاده شده است. برای تقلید شرایط زخم نیز سوراخ میکرونی در وسط غشاء تعبیه شده است.

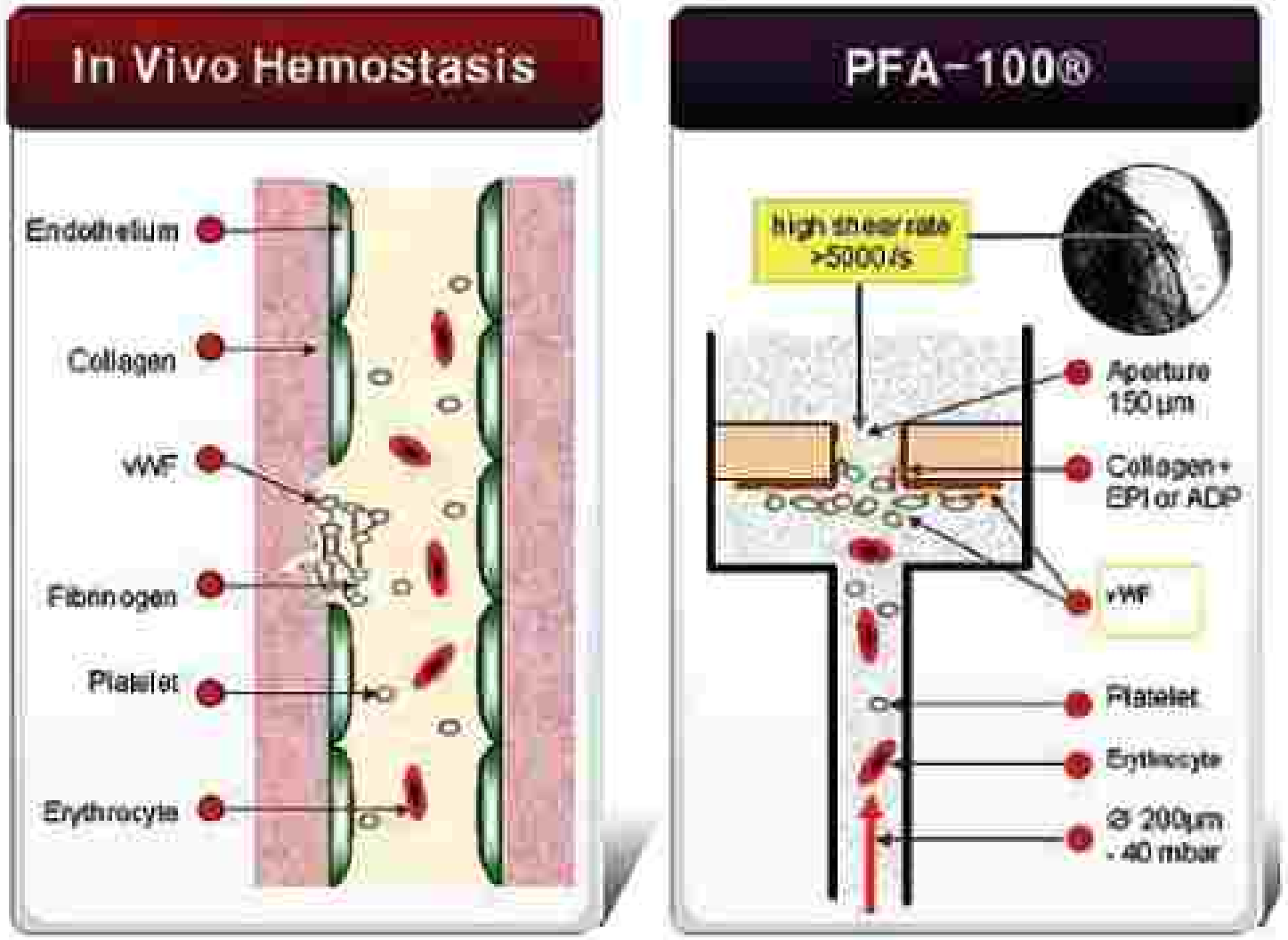
زمان آماده به کار شدن مجدد PFA-100 بعد از هر تست بسیار سریع بوده و برای کودکان، نوزادان، شرایط پرتراکم آزمایشگاهی و آزمایشگاه‌های شلوغ مناسب است. نمونه آن همانند نمونه تست PT/PTT، خون تام بوده و با نسبت ۹ به ۱ با سیترات سدیم ۳/۲٪ و در لوله درب آبی یا بنفش پررنگ تهیه می‌شود ولی هرگز نباید سانتریفوژ شود چرا که باعث فعال شدن و اگرگاسیون پلاکتی شده و تست را مختل می‌کند. نمونه‌گیری باید سریع و در عرض ۴ ساعت انجام شود. هرگز نباید نمونه همولیز باشد یا اینکه در یخچال (حتی معمولی) یا فریزر نگهداری شود چرا که سرما پلاکت‌ها را غیرفعال می‌سازد. لازم به ذکر است که سیترات متناسب روی عملکرد پلاکتی تأثیر زیان‌باری ندارد. همان‌طوری‌که در جلد ۱، فصل ۳ اشاره شد، امروزه برای بررسی عملکرد پلاکت اغلب از ضدانعقاد ترکیبی CTAD (حاوی سیترات، تئوفیلین، آدنوزین و دی‌پیرادیمول) استفاده می‌شود.

در این تست و دستگاه از دو کارتریج استفاده می‌شود که هرکدام از یک مخزن، یک کاپیلاری و یک غشاء آغشته به مواد ساب اندوتلیوم تهیه شده است. یکی از کارتریج‌ها با ۲mg کلاژن نوع I و ۱۰mg اپی‌نفرین (کارتریج Col/Epi) و دیگری با ۲mg کلاژن و ۵۰ mg از ADP (کارتریج Col/ADP)کوت شده است. تفاوت این دو کارتریج بر این اساس است که ADP/ATP می‌تواند بدون این‌که تحت تأثیر مسیر سیکلواکسیژناز، پروتئین G و ترومبوکسان A_2 قرار بگیرد، از طریق رسپتور P_2X_1 خود که نوعی کانال کلسیم است، مستقیماً باعث فعال سازی و اگرگاسیون پلاکت‌ها شود، لذا در صورت استفاده از این کارتریج، حتی اگر بیمار آسپرین مصرف کرده باشد، زمان توقف خونریزی نرمال خواهد بود ولی اگر اختلال غیر از این مورد باشد (مثل VWD و اختلالات پلاکتی)، شاهد افزایش زمان انعقاد خواهیم بود. ADP علاوه بر P_2X_1 دارای دو گیرنده وابسته به پروتئین G (و در نتیجه وابسته به مسیر سیکلواکسیژناز) به‌نام‌های P_2Y_1 و P_2Y_{12} نیز است که مصرف آسپرین و دیگر داروهای NSAID با تداخل در سیگنالینگ آنها باعث اختلال در فعال‌سازی و اگرگاسیون پلاکتها شده و درنتیجه باعث افزایش زمان BT می‌شوند.

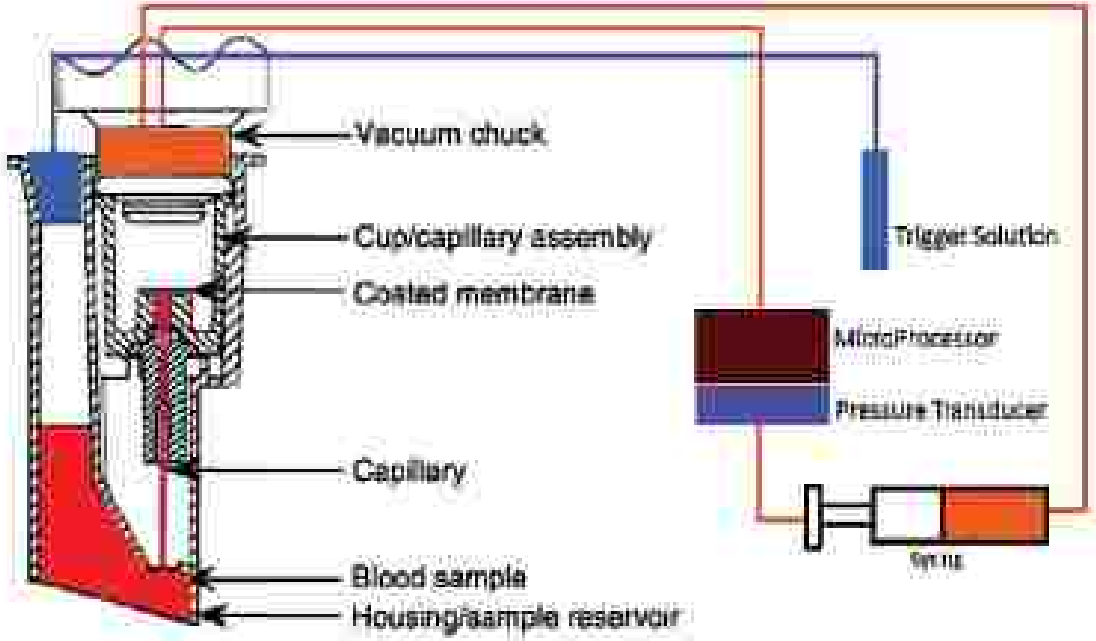


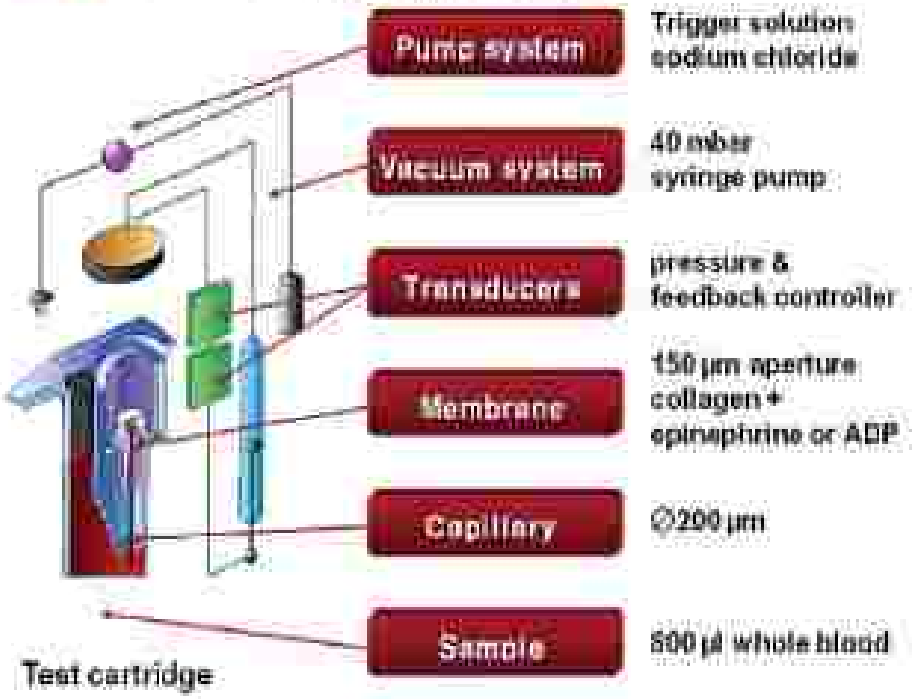
شکل ۱۸-۴: سه نوع مختلف از رسپتورهای ADP که رسپتور P2X1 نوعی کانال کلسیم بوده و باعث افزایش کلسیم داخل سلولی و فعال شدن پلاکت می‌شود. این رسپتور نسبت به ATP نیز حساس بوده و برخلاف دو رسپتور دیگر، وابسته به پروتئین G، مسیر سیکلواکسیژناز، آسپیرین (ASA) و دیگر NSAIDها نیست. از این خاصیت در کارتریج مورد دستگاه PFA-100 برای تشخیص اختلالات داخلی (اینترنسیک) پلاکت از موارد وابسته به داروهای NSAID استفاده می‌شود. داروهای دیگری مثل کلوپیدوگرل و تیکلوپیدین که وابسته به مسیر سیکلواکسیژناز نیستند، باعث افزایش زمان انعقاد در ضرب و کارتریج می‌شوند [۱۷].

شکل ۲۰-۳۴: مراحل انجام یک تست PFA-100 که ابتدا با کلاژن و اپی‌نفرین شروع می‌شود.



شکل ۱۹-۵۴: مقایسه فعال شدن و اگرگاسیون پلاکتی در دو شرایط In-Vivo و In-Vitro

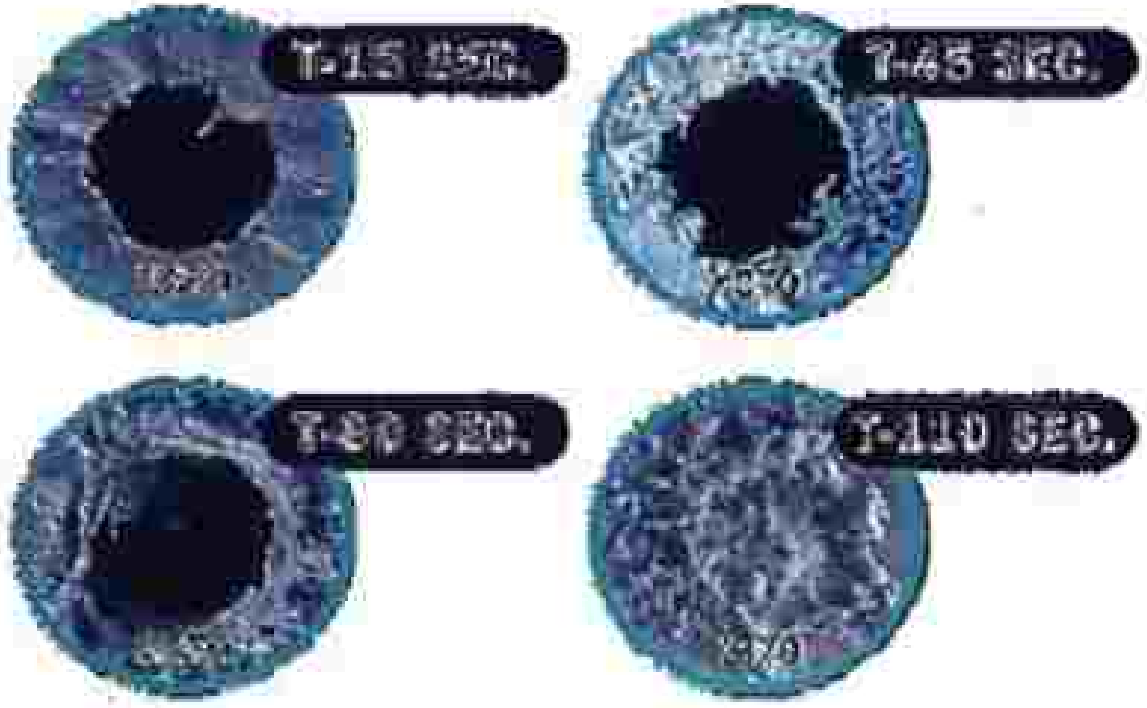




شکل ۱-۲- [illegible] Col/Epi و Col/ADP و ساختار داخلی آنها

برخلاف کارتریج دوم، کارتریج اول حالت پایه داشته و لذا همه اختلالات خارجی و داخلی پلاکتی به دلیل نقص در اتصال و فعال سازی پلاکتی، باعث مختل شدن و طولانی شدن زمان آن می‌شوند. از این رو کارتریج Col/Epi به صورت اولیه و غربالگری برای همه افراد انجام می‌شود و درصورت مختل بودن آن، تست با کارتریج Col/ADP نیز تکرار و بررسی می‌شود. در هردو کارتریج علاوه بر کلاژن (عامل اتصال)، از فعال کننده پلاکتی (آگونیست) نیز استفاده می‌شود که در اولی، اپی‌نفرین و در دومی، ADP مورد استفاده قرار می‌گیرد. همان‌طوری که اشاره شد، چون ADP می‌تواند مستقل از آسپرین، اختلالات شبه آسپرینی و بیماری‌های مسیر سیکلواکسیژناز نیز عمل کند، لذا نتیجه تست در این سه شرایط طبیعی بوده و باعث تمایز آنها از دیگر اختلالات پلاکتی یا VWD می‌شود. عامل اتصال اولیه پلاکت در هردو کارتریج، کلاژن غشاء و VWF موجود در خون تام است، از این رو بیماری‌های VWD، ترومباستنی گلانزمن و سندرم برنارد سولیه (BSS) نیز می‌توانند در هردو کارتریج، با حساسیت بالایی مورد شناسایی قرار بگیرند.

هر کارتریج از ۸۰۰µl خون تام استفاده می‌کند که ابتدا مخزن کارتریج را با ۸۰۰µl خون پر کرده، در دستگاه قرار داده و دکمه استارت را می‌زنیم. خون با پمپاژی برابر با Sec^{-1} ۶۰۰۰-۵۰۰۰ از کاپیلاری عبور کرده و به غشاء کوت شده با Col/Epi یا Col/ADP که سوراخی ۱۵۰ میکرونی دارد، برخورد می‌کند. در این فشار VWF فعال شده و با اتصال به کلاژن و سپس اتصال متقاطع به GP-Ib پلاکت‌ها و در حضور آگونیست Epi یا ADP باعث فعال شدن پلاکت‌ها، افزایش GP-IIb/IIIa سطحی آنها (تغییر تطبیقی) و اگرگاسیون پلاکتی می‌شود. اگرگاسیون پلاکت‌ها در محل سوراخ باعث بستن سوراخ و قطع جریان خون می‌شود که به این محدوده زمانی از اول استارت تا قطع جریان خون، Closure Time یا زمان بند آمدن خون می‌گویند. کلوزر تایم را می‌توان با CLT نشان داد.



PFA-100
REV. 2.20 S/N: 00370

22/02/01 14:01

ID#: 23456.17
Test Type: Collagen/EPI
SAMPLE A: 110 SEC

شکل ۲۲-۵۴: انسداد سوراخ کلاژنی در زمان‌های ۱۵، ۴۵، ۸۰ و ۱۲۰ ثانیه با مقیاس x۳۷۰.

زمان طبیعی انسداد سوراخ یا کلوژر تایم بسته به نوع کارتریج، شمارش پلاکتی و هماتوکریت بیمار متفاوت بوده و به صورت زیر است:

Reference Range:	Reference Interval
COL/EPI	≤ 185 seconds
COL/ADP	≤ 122 seconds

	Normal	Aspirin-like Effect	*vWD or intrinsic platelet defect
COL/EPI	normal	prolonged	prolonged
COL/ADP	normal	normal	prolonged

Interpretation with report. Platelet count and Hematocrit reported with results.

این تست برای اختلالات خفیف پلاکتی مثل بیماری‌های ذخیره‌ای پلاکت و اختلالات ترشحی از حساسیت متوسطی برخوردار بوده و اغلب موارد زمان قطع خونروی (CLT) در کارتریج اول افزایش نشان می‌دهد. اختلال در اتصال اولیه، فعال‌سازی و سیگنالینگ داخل پلاکتی، دگرانولاسیون، اگرگاسیون و اختلالات آسپرینی، همگی می‌توانند باعث اختلال در کارتریج اول شوند. اختلالات عروقی برخلاف BT در این تست تأثیر گذار نیستند. همانند VWF فیبرینوژن نیز در اگرگاسیون پلاکتی دخالت دارد، لذا کاهش یا نقص کیفی آن می‌تواند باعث افزایش CLT شود، بااین حال PFA-100 حساسیت مطلوبی برای ارزیابی نقص یا کمبود فیبرینوژن و سایر فاکتورهای انعقادی ندارد و از این رو برای اسکرین هموفیلی کاربرد ندارد. PFA-100 در VWDهای نوع II و III در هردو کارتریج و در نوع VWD-I بیشتر در کارتریج اول اختلال نشان می‌دهد. از این دستگاه می‌توان برای کنترل و پایش دوز درمانی آسپرین در بیماران قلبی-عروقی نیز استفاده نمود که در این نوع بیماران، دوز دارویی آسپرین در CLT بالاتری تنظیم می‌شود. PFA-100 در کنترل دارویی DDAVP در بیماران VWD نیز می‌تواند موثر باشد. در زنان حامله که جهت زایمان نیاز به بیهوشی اپیدورال یا اسپاینال نخاعی دارند نیز بهتر است ابتدا تست PFA-100 انجام شود تا احتمال هماتوم نخاعی ناشی از بیهوشی در آنها ارزیابی شود. از آنجایی که کارتریج‌های PFA-100 همه عوامل موجود در شرایط Invivo را نداشته و عمدتاً از سه ماده Col/Epi/ADP تشکیل شده است، لذا برای بیماری‌ها و اختلالات ناشناخته هموستاتیک نیز چندان حساس نبوده و باتوجه به عدم تقلید کامل شرایط Invivo، حساسیت کمتری نسبت به تست BT دارد.

موارد موثر در افزایش CLT در PFA-100:

- ترومبوسیتوپنی زیر ۵۰۰۰۰/µl به جهت کمبود سوبسترای انعقاد اولیه
- VWD به جهت نبود اتصال اولیه
- کاهش هماتوکریت به زیر ۳۰٪ به جهت اختلال در فشار شار و پراکنش شعاعی
- اورمی به جهت اختلال عملکرد پلاکتی
- داروهای ضد پلاکتی مثل آسپرین، NSAIDها، داروهای ضد GP-IIb/IIIa (آبسیکسی‌ماب) و داروهای ضد ADP-R (کلوپیدوگرل)
- بیماری‌های ارثی پلاکتی مثل ترومباستنی گلانزمن و سندرم برنارد سولیر.
- افت شدید فیبرینوژن پلاسمایی

این تست برای کنترل داروهای ضد ADP-R مثل کلوپیدوگرل (پلاویکس)، پراسوگرل، الینوگرل، تیکاگرلور، کان‌گرلور و تیکلوپیدین(تیکلید) حساس نبوده و می‌بایست برای این منظور از تست اگرگومتری استفاده نمود. پاسخ تست باید با علایم بالینی بیمار و گاهی دیگر تست‌ها مثل تست اگرگاسیون پلاکتی و VWF assay چک شود. بهتر است هنگام گزارش نتایج برای بیماران آنمیک و ترومبوسیتوپنیک، توضیح و کامنتی نوشته شود تا تفسیر تست بر پایه آنها انجام شود. به دلایل نامعلوم نتایج تست در هنگام عصر ۲۰-۱۰ ثانیه بیشتر از نمونه صبح می‌باشد. کاهش مقدار سیترات باعث کاهش کاذب CLT می‌شود.

جدول ۳-۵۴: نتایج تست PFA-100 در بیماری‌های مختلف ارثی و اکتسابی پلاکتی

Col/Epi	Col/ADP	نوع نقص
نرمال	نرمال	ترومبوسیتوپنی با توارث اتوزومال غالب، نقص پروکوآگولانتی پلاکتی (مثل سندرم اسکات)، اختلالات عروقی
طولانی	نرمال	مصرف آسپرین و داروهای NSAID
طولانی	طولانی	GT، BSS، VWD پلاکتی، VWD، کمبود فیبرینوژن، GPS و داروهای ضد GP-IIb/IIIa
نرمال یا طولانی	نرمال یا طولانی	اختلال P2Y12 (کلوپیدوگرل)، نقص گرانول دلتا، هرماسکی پودلاک، چدیاک هیگاشی، گریسلی، بیماری‌های مرتبط با ADYH-9، نقص اولیه در ترشح، ویسکات آلدریچ، ماکروترومبوسیتوپنی‌های با علل نامشخص، اختلالات MDS و MPN

جدول ۴-۵۴ نتایج CLT در بیماری‌های مختلف ارثی، اکتسابی و دارویی پلاکت [۷].

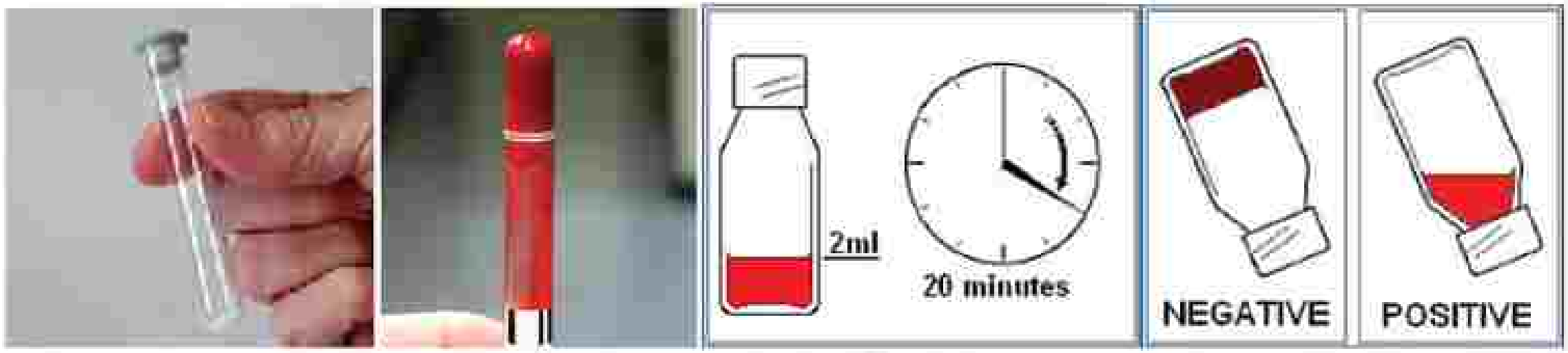
	Total number of subjects reported	CADP CT	CEPI CT
Disorders With Normal Platelet Counts			
Glanzmann thrombasthenia	23	P	P
Aspirin-like defect	6	N	P
$P2Y_{12}$ deficiency	4	N or P	N or P
Dense granule deficiency	30	N or P	N or P
Hermansky-Pudlak syndrome	44	N or P	N or P
Primary secretion defects	30	N	N or P
Platelet procoagulant defect	1	N	N
Disorders With Reduced or Normal Platelet Counts			
Bernard-Soulier syndrome	8	P	P
Platelet-type von Willebrand disease	3	P	P
Gray platelet syndrome	3	P	P
Wiskott-Aldrich syndrome	5	N or P	N or P
Hereditary macrothrombocytopenia associated with nonmuscle myosin heavy chain IIa syndromes	5	N	N or P
Macrothrombocytopenia of undefined cause	11	N or P	N or P
Undefined autosomal dominant thrombocytopenia	1	N	N
Primary Bone Marrow Disorders			
Myelodysplastic or myeloproliferative syndromes, with or without thrombocytosis	69	N or P	N or P

تست زمان انعقاد یا CT:

مدت زمان لازم برای انعقاد خون تام از زمان ورود خون به سرنگ نمونه‌گیری تا زمان ظهور علایم اولیه انعقاد مثل چسبیدن ذراتی از خون به شیشه یا دیده شدن رشته‌های ظریف فیبرین در خون را CT می‌گویند. به CT، تست WBCT یا CT خون تام[1] هم گفته می‌شود. زمان نرمال CT حدود ۶- ۲ دقیقه است. این تست هم برای ارزیابی مسیرهای انعقاد و هم برای ارزیابی عملکرد پلاکت‌ها انجام می‌گیرد، چرا که پلاکت علاوه بر انعقاد اولیه، ۱) با تولید PF2 و فعال کردن فاکتور XI و ۲) با تأمین PL پلاکتی یا PF3 برای اتصال و فعال شدن فاکتورهای انعقادی، در انعقاد ثانویه نیز دخالت دارد. شیشه موجود در ساختار لوله آزمایش نیز ۱) با اثر روی GP-Ib و فعال کردن پلاکت، ۲) با اتصال به PF2 و GP-Ib روی پلاکت و فعال کردن فاکتور XI و در نهایت، ۳) با فعال کردن فاکتور XII (یا فاکتور شیشه) می‌تواند باعث شروع انعقاد اولیه و ثانویه شود که از این خاصیت برای اندازه‌گیری زمان انعقاد CT استفاده می‌شود. پس نتیجه CT طولانی می‌تواند دلیل بر اختلال مسیر داخلی، مشترک و حتی اختلال عملکرد پلاکت باشد ولی از تست CT بیشتر برای بررسی مسیر داخلی استفاده می‌شود (معادل تست PTT)، انجام تست CT سه روش دارد:

i) روش Lee White:

در این روش از سه لوله همولیز هم اندازه استفاده می‌شود که به هرکدام بلافاصله بعد خونگیری، 1ml از خونی که تازه گرفته شده را ریخته و تا ۳ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه قرار می‌دهند. بعد از طی زمان مذکور، ایجاد لخته اولیه و چسبیدن خون به جداره لوله را در هر ۳۰ ثانیه بررسی می‌کنیم. در این تست ملاک از لخته شدن و توقف زمان، ایجاد ذرات لیز لخته بر روی لوله است نه لخته کامل خون. شروع زمان نیز از لحظه اولی که خون وارد سرنگ خونگیری می‌شود، لحاظ می‌شود. بعد از لخته زدن لوله اول و دوم، در نهایت زمان لخته شدن لوله سوم را به‌عنوان نتیجه نهایی CT گزارش می‌کنند چرا که در دو لوله اول و دوم، کج و راست کردن مکرر لوله باعث تسریع انعقاد و کاهش کاذب CT می‌شود و لذا جواب واقعی نخواهد بود. در این تست استفاده از لوله‌های متوسط و بزرگ به دلیل سطح بیشتری از شیشه که با خون برخورد کرده و باعث فعال شدن سریع‌تر مسیر انعقاد اولیه و به‌ویژه ثانویه می‌شود، می‌تواند باعث خطا در نتیجه آزمایش شود. از طرفی دیگر، در لوله های با قطر بالا، خون موجود در وسط لوله با شیشه برخورد نکرده و خیلی دیرتر از خون‌های جداری لخته می‌زنند، از این رو ملاک اصلی از انعقاد، چسبیدن لخته‌های ریز به جدار لوله همولیز خواهد بود. دما نیز پارامتر مهمی در تست CT محسوب می‌شود. عدم استفاده از بن‌ماری به دلیل کاهش دمای ایده‌آل برای واکنش‌های سرین پروتئازی، باعث طولانی شدن کاذب نتیجه تست می‌شود. این تست اغلب در کنار بیمار انجام شده و لوله‌ها بلافاصله به بن ماری داخل آزمایشگاه منتقل می‌شوند. تست اولیه ابداعی توسط آقای لی وایت در ویال‌های پتی‌سیلین انجام می‌شد، از طرفی دیگر به دلیل این‌که ایشان منتظر لخته کامل خون می‌شدند، لذا تست در عرض ۲۰ دقیقه بررسی می‌شد و حد نرمال آن نیز زیر ۲۰ دقیقه بود.



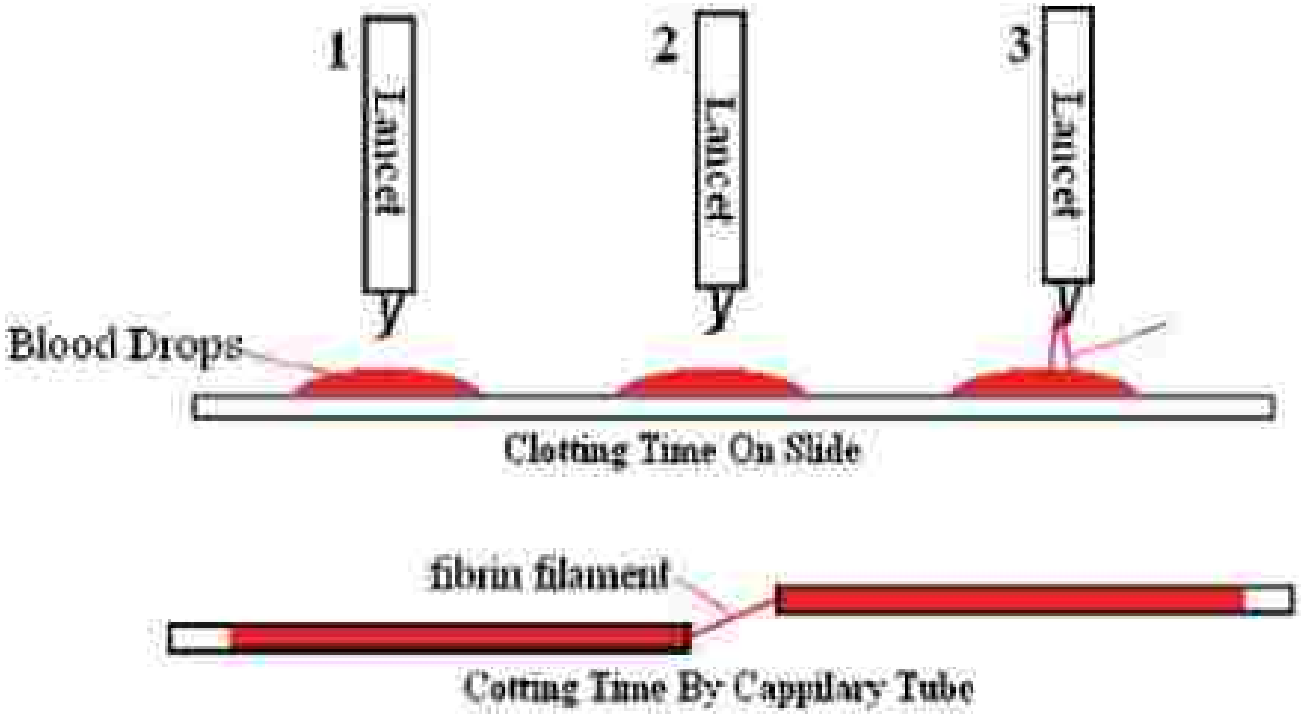
شکل ۳۲-۵۴: تصویر ۱و۲: نمونه‌ای از روش ابداعی لی-وایت برای بررسی انعقاد که در آن لخته کامل خون مورد بررسی قرار می‌گرفت و از این جهت زمان نرمال آن ۲۰ دقیقه بود. تصویر ۳و۴: روش CT امروزی که اتصال خون به شیشه به‌عنوان ملاک انعقاد پذیرفته می‌شود. از این رو مقادیر طبیعی آن ۶-۳ دقیقه می‌باشد.

ii) روش قطره سه تایی روی لام:

این روش روی لام و با ۳ قطره خون انجام می‌شود. در این روش نوک لانست را تا ۹۰ درجه خم کرده و به کمک آن، تشکیل رشته‌های فیبرینی را در هر سه قطره مورد بررسی قرار می‌دهند که باز جواب قطره سوم به دلیل حداقل دستکاری، به‌عنوان جواب CT گزارش می‌شود. در اینجا نیز از خون تازه گرفته شده استفاده می‌شود. برای ایجاد دمای ۳۷ درجه نیز بهتر است تست بر روی Rh-Box بانک خون انجام شود.

iii) روش لوله موئینه:

در این روش خون تازه گرفته شده را در ۳-۲ لوله موئینه سر آبی یا بی‌رنگ (غیرهپارینه) پر کرده و بعد از ۳ دقیقه، هر ۳۰ ثانیه قسمتی از لوله را شکسته و با دور کردن آرام دو تکه شکسته، تشکیل رشته فیبرینی که از دو سر لوله کِش می‌آیند را بررسی می‌کنیم. اولین شکستگی که در آن شاهد رشته فیبرینی هستیم را به‌عنوان زمان CT ثبت می‌کنیم. در این تست، هر کدام از شکستگی‌ها تسریعی در نتیجه CT شکستگی بعدی ندارد و لذا اولین مشاهده فیبرین به‌عنوان جواب نهایی گزارش می‌شود. برخلاف لوله‌های موئینه آبی یا بی‌رنگ، لوله‌های موئینه قرمز یا سبز رنگ هپارینه بوده و باعث اثرات ضدانعقادی می‌شوند، لذا خون در این لوله‌ها تا ۸-۶ ساعت هم لخته نمی‌زند، پس باید در رنگ لوله موئینه دقت کامل را اعمال نمود. امروزه دستگاه‌های اتوماتیک تجاری و POC نیز برای ارزیابی مقدار CT یا ACT وارد بازار شده‌اند.

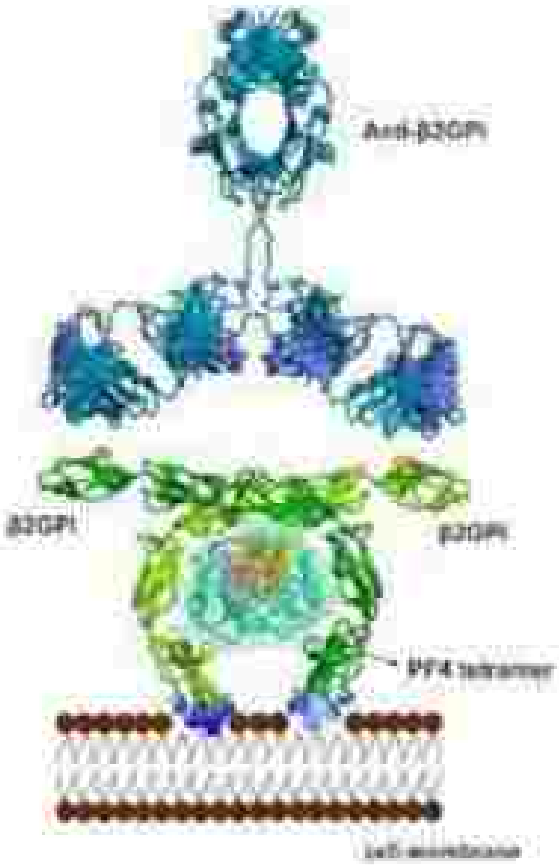


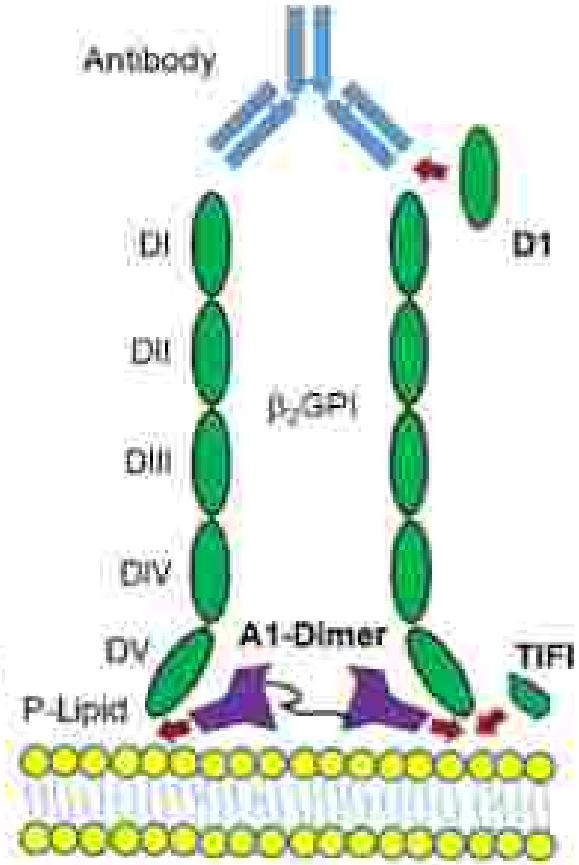
شکل ۳۳-۵۴ تست CT با سه قطره خون فاقد ضد انعقاد در روی لام و با روش لوله موئینه (آبی یا بی‌رنگ) که در هر دو مشاهده رشته‌های فیبرین مورد بررسی قرار می‌گیرد.

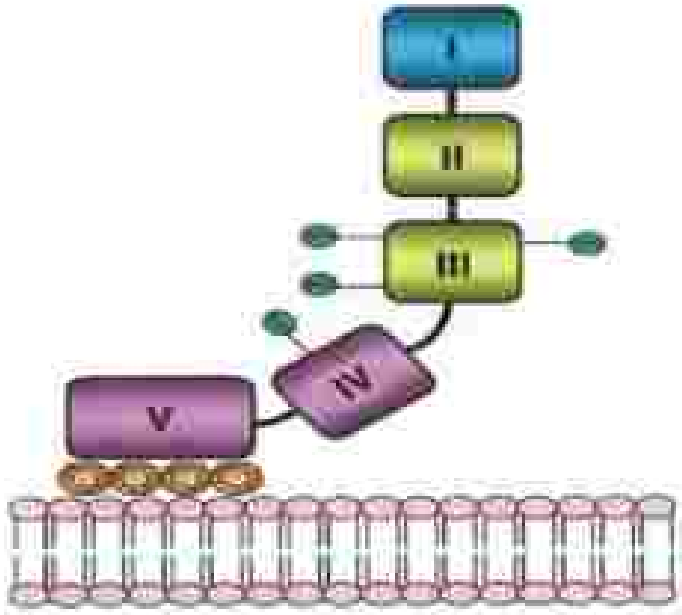
ب) سندرم آنتی فسفولیپید (APS)، سندرم Hüghes یا سندرم خون چسبنده (SBS)[1]:

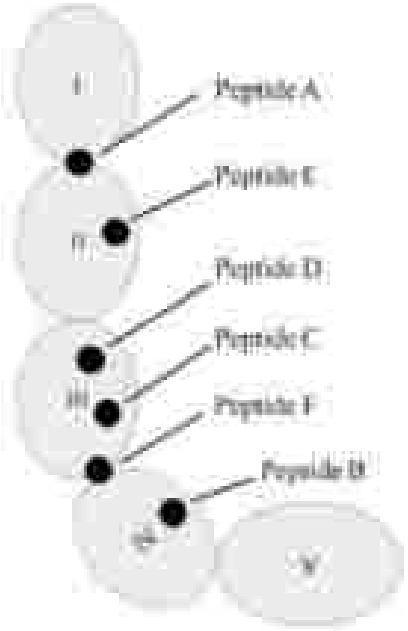
APS نوعی بیماری پیچیده است که متخصصین عروق، خون، روماتولوژی، زنان–زایمان، مغز اعصاب، روان‌شناسی و پوست را درگیر می‌سازد. در این بیماری اتوآنتی‌بادی ضد فسفولیپید یا پروتئین‌های وابسته به فسفولیپید، از کلاس IgG، IgA و IgM ایجاد می‌شود. این بیماری اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط روماتولوزیست انگلیسی، دکتر گراهام آروی هوگز[2] توصیف شد. آنتی‌بادی مذکور ضد فسفولیپید (P-Serin> P-Ethanolamin و P-Inosithol) یا پروتئین متصل به فسفولیپید می‌باشد که این پروتئین می‌تواند در ۹۲٪ موارد علیه β2GPI[3]، پروترومبین و آنکسین A5 و در ۱۰٪ موارد علیه ترومبین، AT-III، t-PA، فاکتورهای X، XI و XII، پروتئین C4 کمپلمان، Pro-S و Pro-C متصل به TM/CD141، فاکتور VII متصل به TF3، GP-IIb/IIIa، PAR2/4 و PF4 سطح پلاکت باشد. β2GPI یا آپولیپوپروتئین H (ALP-H) گلیکوپروتئینی با 50KD و غلظت ۲۰۰-۳۰ µg/ml و محصول کروموزوم 17 است که سرشار از Lys+ بوده (Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys یا دومن Sushi-2) و قابلیت اتصال به دومن‌های با بار منفی مثل فسفولیپید (به خصوص P-Serin)، GP-Ib، آنکسین A2 و A5، هپاران سولفات، CD14، کاردیولیپین، TLR4/MD2 و رسپتور ۲ آپولیپوپروتئین E (ApoER2) (نوعی LDL-R) را دارد. β2GPI همانند آنکسین با اتصال به P.serin سطح سلول‌های فعال شده یا پره‌آپوپتوتیک و همچنین با اتصال به OX-LDL (بخصوص در سطح پلاک آترواسکلروز)، باعث تسهیل شناسایی، فاگوسیتوز و پاکسازی آنها می‌شود.

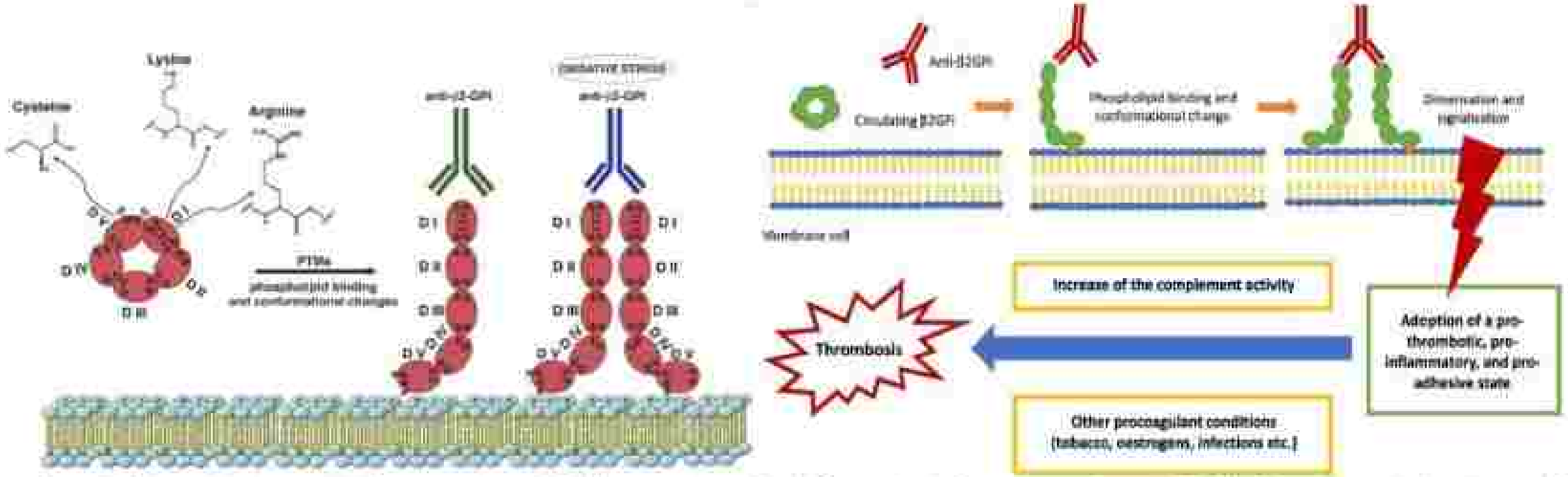
شکل ۱۰۵-۵۲: دکتر گراهام آروی هوگز


Anti-β2GPI
β2GPI
β2GPI
PF4 tetramer

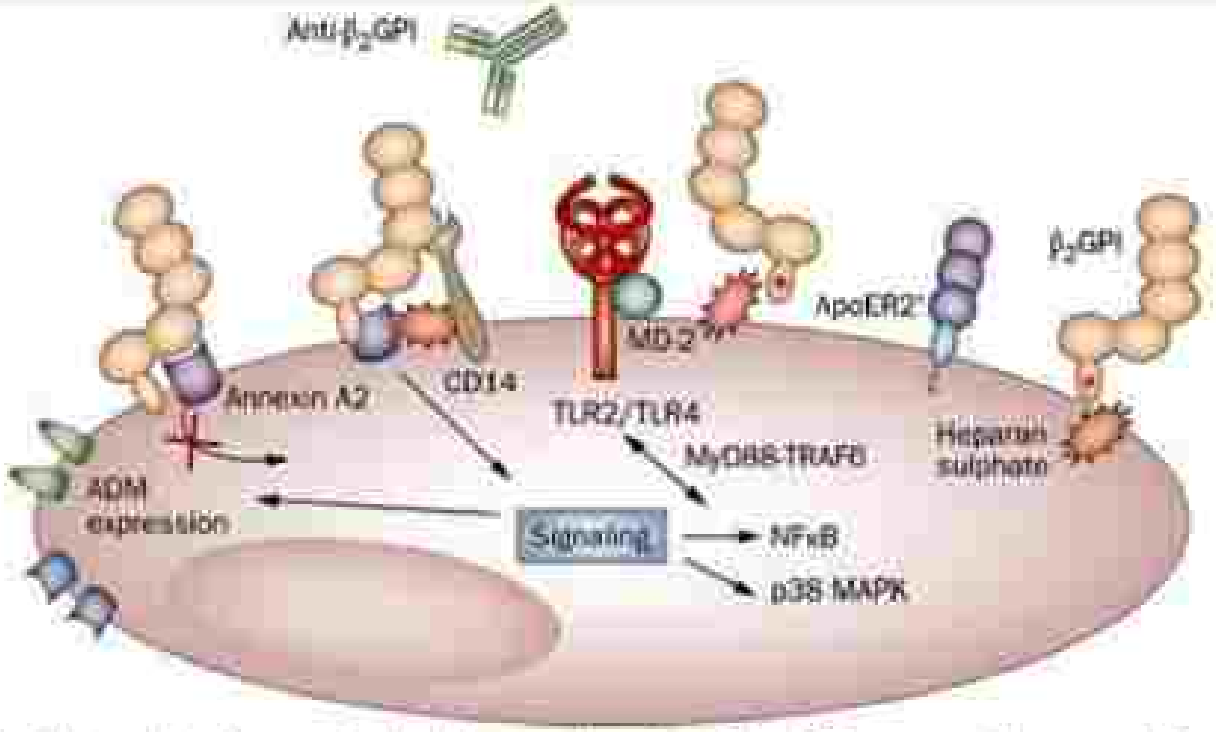

Antibody
DI
DII
DIII
DIV
DV
D1
β2GPI
A1-Dimer
TIFI
P-Lipid


I
II
III
IV
V


Peptide A
Peptide E
Peptide D
Peptide C
Peptide F
Peptide B



شکل ۱۰۶-۵۲: ساختار دومن‌های ۵ گانه β_2GPI که در حالت معمول به دلیل اتصال دومن 5 (با شارژ مثبت) به دومن 1 (با شارژ منفی)، به صورت گلبولار بوده ولی با ظهور P-Serin شدیداً منفی در سطح سلول، دومن D5 آن که غنی از Lys هست به P-serin متصل شده و β_2GPI ساختار خطی پیدا می‌کند. در شرایط التهابی و اکسیداتیو که مقدار P-serin سطح سلولی افزایش می‌یابد، β_2GPI به دلیل اتصال نزدیک بهم، حالت دایمر پیدا می‌کند که در این حالت خاصیت ایمونوژنی پیدا کرده و باعث تولید اتوآنتی بادی ضد β_2GPI با نام APA یا aPL می‌شود. فرم دایمر دارای قدرت سیگنالینگ داخل سلولی و فعال کردن مسیر MAPK و NF-KB نیز بوده و سلول‌ها را از نظر فعالیت التهابی، چسبندگی و انعقادی فعال می‌کند.



شکل ۱۱-۱۱: β2GPI در دومین ۵ خود دارای دومین کاتیونی متصل شونده به PL است که از طریق آن به ساختارهای آنیونی مثل هیاران سولفات، آنکسین A2، CD14، TLR4/MD2 و رسپتور 2' آپولیپوپروتئین E (ApoER2') سطح اندوتلیوم متصل شده و باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ NF-KB و P38-MAPK، بیان سیتوکاین‌های التهابی، مولکول‌های چسبندگی و TF-3 می‌شود.

به aPL موجود در APS بر اساس نوع تست ارزیابی کننده آن، ۱) LAC (تست‌های انعقادی وابسته به PL) یا ۲) ACA (تست‌های ایمونولوژیکی ELISA) گفته می‌شود. از تست‌های LAC می‌توان به dRVVT، PTT-LA، dPT، TT-LA، K-CT و S-CT (CT فعال شده با کائولین و سیلیکا)، نسبت ECT/TCT و .... و از تست‌های ACA می‌توان به تست الایزای سنجش ACA (آنتی کاردیولیپین)، ACA+β2GPI (آنتی β2GPI متصل به کاردیولیپین)، nPT (آنتی پروترومبین)، aPs و aPE (آنتی فسفاتیدیل سرین و آنتی فسفاتیدیل اینوزیتول) و AnnA5 (آنتی آنکسین a5) اشاره نمود که PTT-LA و KCT/SCT بالاترین حساسیت را نسبت به Anti-β2GPI و تست dRVVT بالاترین حساسیت را نسبت به Anti-Thrombin دارند (توصیه Pengo). البته d-TT هم به دلیل بررسی فقط ترومبین و فسفولیپید رقیق، از حساسیت بالایی برخوردار هست. همزمان با aPL، آنتی‌بادی ضد کاردیولیپین نیز می‌تواند در APS حضور داشته باشد که نوعی فسفولیپید قلبی محسوب می‌شود. در کل اتوآنتی‌بادی‌های مذکور دو نوع هستند که شامل i) آنتی کواگولان لوپوسی (LAC) یا آنتی فسفولیپید آنتی‌بادی (APA/aPL)[1] و ii) آنتی کاردیولیپین آنتی‌بادی (ACA)[2] می‌باشند. اولی (IgG و IgM) اغلب علیه فاکتورهای گروه پروترومبیناز و باعث طولانی شدن PTT شده و دومی (IgG، IgM و IgA) اغلب علیه β_2GPI، ACA، aPT و aAnA5 بوده و برعکس، باعث ترومبوز می‌شود (پارادکس APS). این دو آنتی بادی در ۹۰٪ موارد با هم همپوشانی داشته و به عبارتی ۹۰٪ کسانی که APA دارند، ACA را هم دارند. از طرفی دیگر، ۵۰٪ بیماران لوپوسی نیز هر دو آنتی‌بادی را دارند (ACA علاوه‌بر SLE و APS در عفونت سیفلیس و بیماری اسکلروزیس نیز تولید می‌شود). این آنتی‌بادی‌ها هم در تشخیص و هم در پایش درمان و هم پیش‌آگهی حائز اهمیت هستند ولی با این وجود گایدلاین بین المللی قوی ندارند.

Lupus anticoagulants V/s Anti cardiolipin antibodies

PARAMETERS	LUPUS ANTICOAGULANTS	ANTI CARDIOLIPIN ANTIBODIES
Family	Anti - phospholipid	Anti - phospholipid
Auto Antibody class	IgG or IgM	IgG or IgM or IgA
Auto Antibody directed against	Anionic Phospholipids	Anionic Phospholipids
Phospholipid Binding Characteristics	Bind with Anionic phospholipids in the prothrombinase complex	Binds to complex of Anionic phospholipid, cardiolipin & β-2 GPI
Method of Detection	Phospholipid dependent coagulation assays	ELISA / Immunoassays
Diagnostic Relevance	Thrombosis, Recurrent fetal loss, Thrombocytopenia	Thrombosis, Recurrent fetal loss, Thrombocytopenia

aPL	General term	General term for antiphospholipid antibodies (aCL, anti-β2GPI, aPT, LAC, etc.)
LAC	by clotting assays	Lupus anticoagulants antibodies detected by clotting assays with specificity to β2GPI and/or PT
aCL	by ELISA	Antibodies against cardiolipin detected by ELISA
anti-β 2GPI	by ELISA	Antibodies against β2GPI detected by ELISA
aPT	by ELISA	Antibodies against prothrombin (PT) detected by ELISA
aPS, aPE	by ELISA	Antibodies against phospholipids other than cardiolipin (phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine) detected by ELISA
aAnA5	by ELISA	Antibodies against annexin A5 detected by ELISA

همزمان با aPL، آنتی‌بادی ضد کاردیولیپین نیز می‌تواند در APS حضور داشته باشد که نوعی فسفولیپید قلبی محسوب می‌شود. در کل اتوآنتی‌بادی‌های مذکور دو نوع هستند که شامل i) آنتی کواگولان لوپوسی (LA) یا آنتی فسفولیپید آنتی‌بادی (APA/aPL)[1] و ii) آنتی کاردیولیپین آنتی‌بادی (ACA)[2] می‌باشد. این دو آنتی بادی در ۹۰٪ موارد با هم همپوشانی داشته و به عبارتی ۹۰٪ کسانی که APA دارند، ACA را هم دارند. از طرفی دیگر، ۵۰٪ بیماران لوپوسی نیز هر دو آنتی‌بادی را دارند (ACA علاوه‌بر SLE و APS در عفونت سیفلیس و بیماری اسکلروزیس نیز تولید می‌شود). عیار هر دو آنتی‌بادی در حال نوسان بوده و لذا نباید به یک جواب منفی بسنده کرد و هر هفته یک‌بار و تا ۱۲-۶ هفته (۳- ۲ ماه) می‌بایست تیتر آنها توسط تست ELISA[3] کنترل و چک شوند. در واقع برای تشخیص قطعی APS، یکی از این دو آنتی‌بادی باید طی چند هفته مثبت شود. برای تشخیص بیماری علاوه‌بر معیارهای آزمایشگاهی، وجود دو معیار بالینی ۱) ترومبوز عروقی و ۲) سقط مکرر بدون توجیه طی هفته ۱۰ حاملگی الزامی بوده (معیارهای Sapporo) و در عین حال وجود سایر علل ترومبوز (مثل فاکتور V لیدن، پروترومبین G20210A، جهش MTHFR، افزایش سطح فاکتور VIII و PAI-1، کاهش سطح AT-III، Pro-S، Pro-C، t-PA) نیز می‌بایست رد شوند (حساسیت این معیارها ۷۱٪ و اختصاصیت آنها ۹۸٪ تعیین شده است). شیوع APS همانند دیگر بیماری‌های اتوایمیون در زنان ۵ برابر مردان است. این آنتی‌بادی‌ها ضد دو جزء متفاوت ولی مرتبط به‌هم ۱) فسفولیپید: مثل کاردیولیپین، TF3 و فسفاتیدیل سرین و ۲) پروتئین: مثل β_2GPI، فاکتور پروترومبین، Pro-C/S، GP-IIb/IIIa، آنکسین A5 و فاکتور VII می‌باشند که در دو دمای ۳۷ درجه و RT عمل می‌کنند.

جدول ۴۲-۵۲: معیارهای تشخیصی سابورو برای تأیید APS (۱۹۹۹-۱۹۹۸)

معیارهای بالینی:
❖یک یا چند مورد از بروز ترومبوز شریانی، وریدی یا ترومبوز عروق کوچک در هر بافت یا اندامی
❖سقط جنین در یکی از شرایط زیر:
۱- یک یا چند مورد مرگ غیرقابل توجیه قبل از هفته ۱۰ حاملگی و در شرایطی که جنین از نظر مورفولوژی نرمال باشد.
۲- یک یا چند مورد زایمان زودهنگام قبل از هفته ۳۴ حاملگی به دلیل اکلامپسی، پره‌اکلامپسی شدید یا مشاهده خصوصیات شناخته شده نارسایی جفت در شرایطی که جنین از نظر مورفولوژی نرمال باشد.
۳- سه یا چند مورد سقط خودبه‌خود، پشت‌سرهم و غیرقابل توجیه قبل از هفته ۱۰ حاملگی و به شرطی که ناهنجاری‌های آناتومیک و هورمونی مادر و ناهنجاری‌های کروموزومی پدر یا مادر رد شده باشند.
معیارهای آزمایشگاهی:
❖ حضور آنتی کوآگولانت لوپوسی در پلاسما به شرطی که طی حداقل ۶ هفته، ۲ یا چند بار تکرار و تایید شده باشد (معیار انجمن بین المللی ترومبوز و هموستاز).
❖ آنتی کاردیولیپین (ACA یا aCL) نوع IgG یا IgM با تیتر متوسط یا بالا، به روش ELISA، در ۲ یا چند نوبت، با فاصله حداقل ۶ هفته، در سرم یا پلاسما مثبت باشد.
❖ آنتی β2-GPI نوع IgG یا IgM با تیتر متوسط یا بالا، به روش ELISA در ۲ نوبت، با فاصله حداقل ۶ هفته، در سرم یا پلاسما مثبت شده باشد.
طبق معیارهای مقدماتی سابورو، (مالی تشخیص APS بدون مورد شک قرار می‌گیرد که فقط یکی از معیارهای بالینی به همراه یکی از معیارهای آزمایشگاهی وجود داشته باشند.

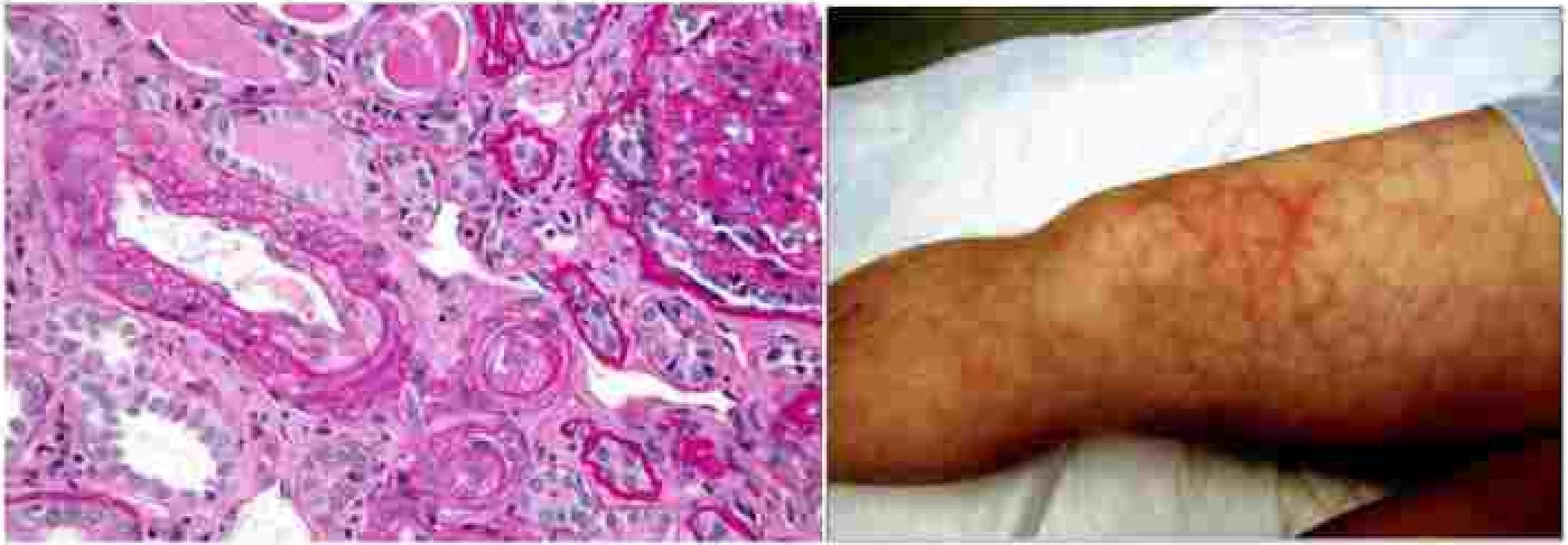
Table 1 Comparison of the Sapporo (10) and the revised laboratory criteria (1) for the antiphospholipid syndrome

	Sapporo criteria	Sydney criteria
LAC	Screening-, mixing and confirmation tests (ISTH guidelines)	Screening-, mixing and confirmation tests (ISTH guidelines)
	Two or more occasions, at least 6 wk apart	Two or more occasions, at least 12 wk apart
aCL antibodies	Detected by standardised β2GPI dependent ELISA	Detected by standardised ELISA
	IgG and/or IgM	IgG and/or IgM
	Medium or high titre	Medium or high titre >40GPL or MPL*, or > 99th percentile
	Two or more occasions, at least 6 wk apart	Two or more occasions, at least 12 wk apart
Anti-β2GPI antibodies		IgG and/or IgM titre > 99th percentile
		Two or more occasions, at least 12 wk apart

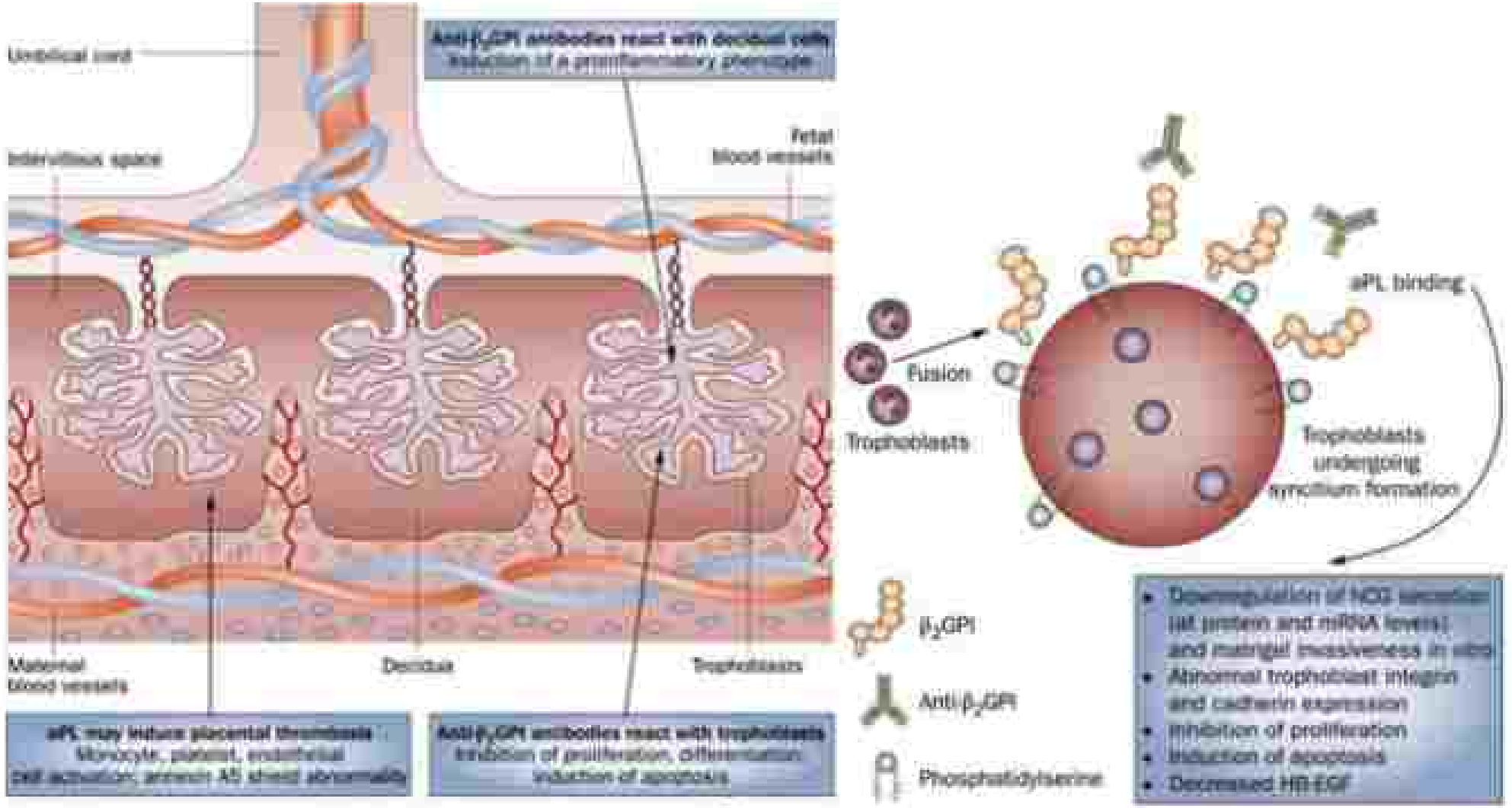
*GPL, units IgG phospholipid antibody titre; MPL, units IgM phospholipid antibody titre.

Table 1. Major clinical manifestations of APS.

Venous thrombosis
Arterial occlusion
Recurrent fetal loss
Thrombocytopenia with or without hemolytic anemia
Livido reticularis
Transient cerebral ischemia
Migraine
Chorea
Transverse myelitis



شکل ۱۰۸-۵۲: راست) Livedo reticularis در پای خانم مبتلا به APS و چپ) عوارض ترومبوتیک در کلیه بیمار APS که میکروآنژیوپاتی ترومبوتیکی را در بیوپسی کلیه نشان می‌دهد (رنگ PAS)

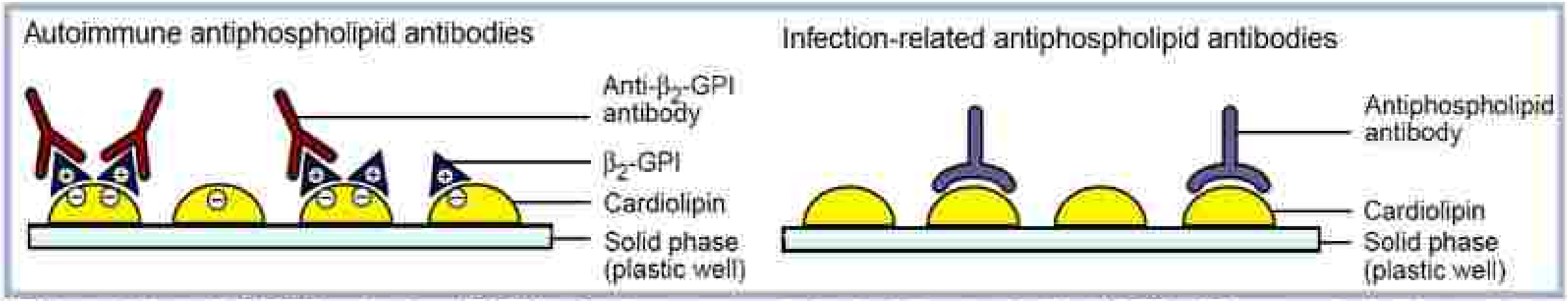


شکل ۷-۱-۵۳: در مرحله تشکیل سینسیتیوم بین ترفوبلاست جنین با اندومتر مادر، فسفاتیدیل سرین آنیونی در سطح ترفوبلاست‌ها دچار فلیپ-فلپ شده و در سطح سلول بیان می‌شود. در این مرحله β2GPI به P-Serine و آنکسین V سطح ترفوبلاست جفت متصل شده و باعث اتصال APA:Anti- β2GPI به آن می‌شود. اتصال آنتی‌بادی باعث تثبیت کمپلمان، تخریب سلولی و با ایجاد سیگنال‌های داخل سلولی (مهار STAT5) می‌شود که نهایتاً باعث کاهش تولید هورمون‌های β-hCG، استریول (E3)، پروژسترون، کاهش بیان EGF متصل به هپارین (HB-EGF)، اینتگرین و کادهرین اتصالی و افزایش آپوپتوز سلولی می‌شود. به‌طور کلی، APA متصل به جفت، موتوسیت، پلاکت، اندوتلیوم و پروتئین‌های انعقادی و ضدانعقادی پلاسما با ایجاد ترومبوز، تخریب و آپوپتوز ترفوبلاستی، کاهش رشد جفت و آسیب پلاستایی باعث التهاب جفت و اندومتر مادر شده و بدین ترتیب به دلیل عدم فعالیت نرمال پلاسنتا و کاهش تولید هورمون‌های حاملگی (استریول، گنادوتروپین و پروژسترون) و تشکیل ترومبوز، سقط جنین ایجاد می‌شود. اغلب اختلالات حاملگی و مامایی از هفته دهم شروع می‌شوند.

شناسایی و تشخیص سندرم APS :

الف) روش سرولوژیکی ELISA:

به‌وسیله کوت کردن کف پلیت ELISA با فسفولیپید کاردیولیپین با یا بدون β_2GPI (به‌عنوان Agهای بار منفی) بستر آزمایش مهیا می‌شود، سپس با افزودن پلاسمای بیمار به پلیت و انکوباسیون ۲۰ دقیقه‌ای شرایط اتصال آنتی‌بادی‌های احتمالی فراهم شده و در نهایت با شستشو و افزودن AHG نوع IgG یا IgM به آن، تیتر آنتی‌بادی به‌دست می‌آید که واحد آن به دو صورت MPL (1μg IgM آنتی‌فسفولیپید) یا GPL (1μg IgG آنتی‌فسفولیپید) است. در این تست استفاده از پروتئین‌های متصل شونده به PL مثل β_2GPI (به عنوان کوفاکتور) باعث افزایش حساسیت و اختصاصیت تست می‌شود. B2-GPI از اتصال VWF به پلاکت و لکوسیت و از اتصال فاکتورهای انعقاد به دیواره جنین جلوگیری می‌کند. از آنجایی که ACA می‌تواند در بیماران سیفلیسی هم مثبت شوند، لذا برای رد موارد عفونی و واکسیناسیون می‌بایست که تست ۲ بار با فاصله ۱۲-۶ هفته از همدیگر مثبت شود (مقادیر بالای ۴۰MPLU/GMPLU) تا وجود آنتی‌بادی‌های ACA و LA (نوع IgG، IgA یا IgM) و بیماری APS تأیید شود. مثبت شدن موقت این تست در SLE، RA، شوگران و مصرف برخی داروها نیز دیده می‌شود. در APS آنتی‌بادی ضد P-serin، کاردیولیپین، β_2GPI و ترومبین نیز مثبت می‌شود که ریسک بروز ترومبوز در LA بیش از ACA می‌باشد (به ترتیب ۱۱ برابر به ۳/۲ برابر). توصیه می‌شود اگر تیتر ACA (IgG، IgM و IgA) مثبت و بالای ۴۰ بود، مستقیماً تکرار مثبت آن طی ۱۲ هفته آتی بررسی شود و اگر تیتر مثبت و زیر 40 بود، بهتر است آنتی بادی ضد B2-GPI نیز چک شود ولی اگر علی‌رغم وجود علایم بالینی سایپورو، نتیجه تست ACA منفی بود، بهتر است آنتی بادی ضد LA (ALA)، P-serin (APSA)[1] و ترومبین هم چک شده و حداقل دو جواب مثبت طی ۱۲ هفته اخذ شود. ACA به مراتب بیش از LA با آنتی بادی ضد B2-GPI همراهی دارد.



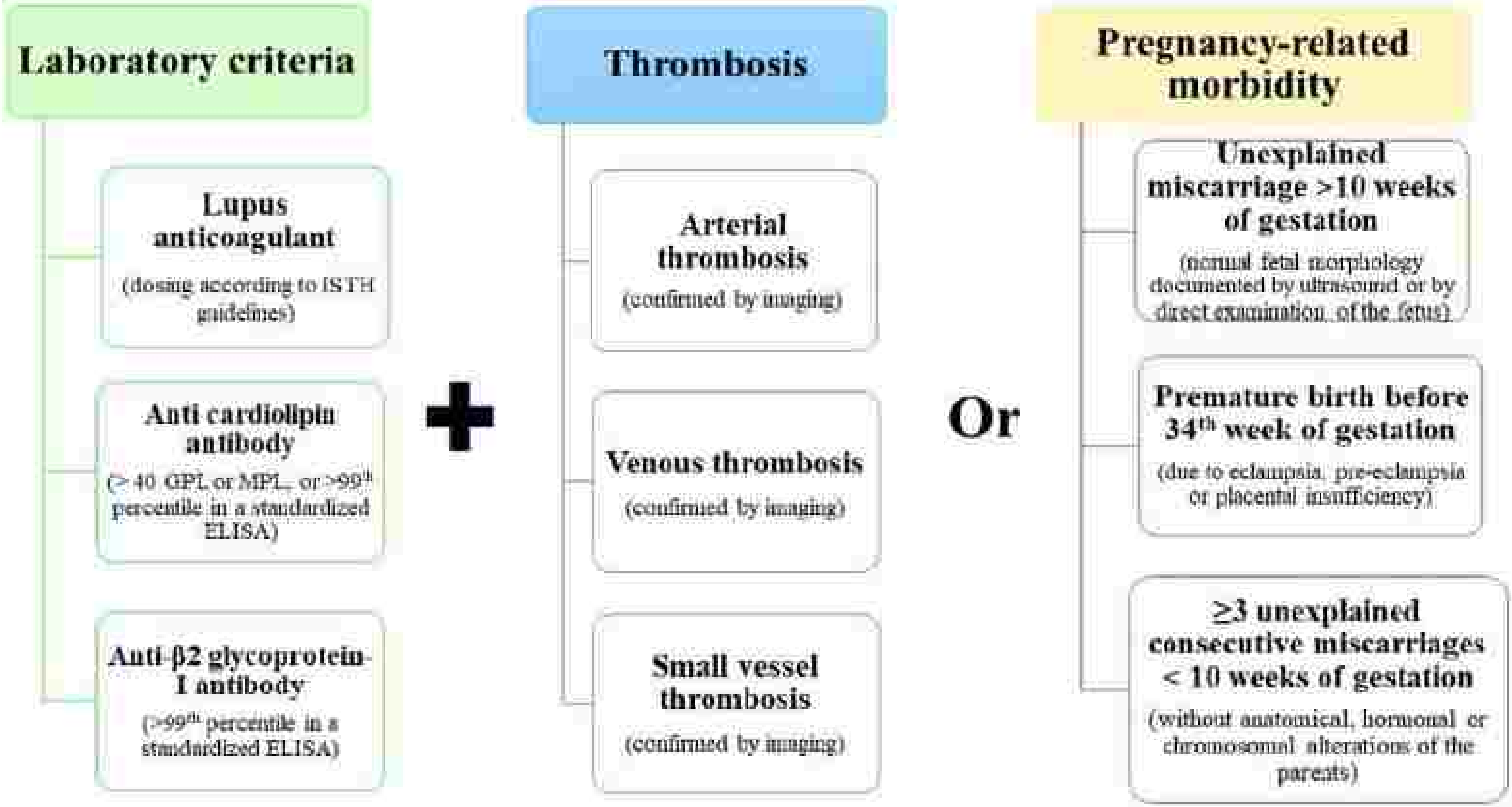
شکل ۵۴-۱۱۱: تست الایزا برای تشخیص ACA و Anti-β2GPI که البته در ۵-۱٪ افراد نرمال جامعه نیز مثبت می‌باشد. آنتی B2-GPI در حالت دایمر با B2-GPI باعث مهار آنکسین V(A5) در جلوگیری از تشکیل انعقاد در سطح کیسه جنینی و مهار جلوگیری از اتصال VWF به سطح پلاکت و چندین عملکرد مختلف می‌شود که نتیجه آنها فعال شدن انعقاد در سطح جنین و افزایش اتصال VWF به پلاکت‌ها، مونوسیت و لنکوسیت‌ها و فعال شدن آنها خواهد بود.

Lupus anticoagulants V/s Anti cardiolipin antibodies

PARAMETERS	LUPUS ANTICOAGULANTS	ANTI CARDIOLIPIN ANTIBODIES
Family	Anti - phospholipid	Anti - phospholipid
Auto Antibody class	IgG or IgM	IgG or IgM or IgA
Auto Antibody directed against	Anionic Phospholipids	Anionic Phospholipids
Phospholipid Binding Characteristics	Bind with Anionic phospholipids in the prothrombinase complex	Binds to complex of Anionic phospholipid, cardiolipin & β-2 GPI
Method of Detection	Phospholipid dependent coagulation assays	ELISA / Immunoassays
Diagnostic Relevance	Thrombosis, Recurrent fetal loss, Thrombocytopenia	Thrombosis, Recurrent fetal loss, Thrombocytopenia

ب) روش‌های هماتولوژیکی انعقادی:

در بیماری APS برخلاف تست نرمال AXA، نتایج پایه تست PTT، aPTT، PT، ST/RVVT و TT افزایش دارند، ولی انجام تست dRVVT و dTT با فسفولیپید رقیق شده از اهمیت تشخیصی بیشتری برخوردار هستند (البته به شرط R/O بیماری انعقادی و مصرف ضدانعقاد). از تست‌های ۶ گانه انعقادی[1] جهت تشخیص APS می‌توان به ۱) dRVVT[2]، ۲) dTT، ۳) نسبت TE-CT، ۴) mPTT ۱به۱ و ۴ به ۱، ۵) PTT با فسفولیپید حساس به لوپوس (PTT-LA) و ۶) تست PT و PTT با PL اکسترنال اضافی اشاره نمود. تست‌های dRVVT و PTT-LA به صورت رقیق شده هستند تا APS در حضور کمترین مقادیر فسفولیپید بتواند اثرات مهاری خود را به خوبی اعمال کند (به ترتیب با حساسیت ۸۷ و ۹۰ درصد). اگر بیماری تحت درمان با VKAها (آنتاگونیست‌های Vit-K) یا LMWH قرار داشته باشد، این اجازه وجود دارد که برای کاهش تداخل آنها، وارفارین را به مدت ۲-۱ هفته قطع نمود تا INR به زیر ۱/۵ کاهش یابد یا در مورد LMWH، تزریق آن را تا ۱۲ساعت به تعویق انداخته و بعد از نمونه‌گیری اقدام به تزریق آن نمود. اگر هم INR بین ۳-۱/۵ بود، می‌توان با رقت 1:1 پلاسمای بیمار با PNP (پوولد پلاسمای نرمال) تست را انجام داده و بر اساس آن تست‌ها را تفسیر نمود. البته در شرایطی مثل ترومبوز حاد که بیمار لاجرم هردوی وارفارین و هپارین را دریافت کرده و مقدار فاکتورهای فاز حاد (مثل I و VIII) به دلیل ترومبوز افزایش می‌یابند، انجام تست و تفسیر آنها بسیار دشوار خواهند بود.

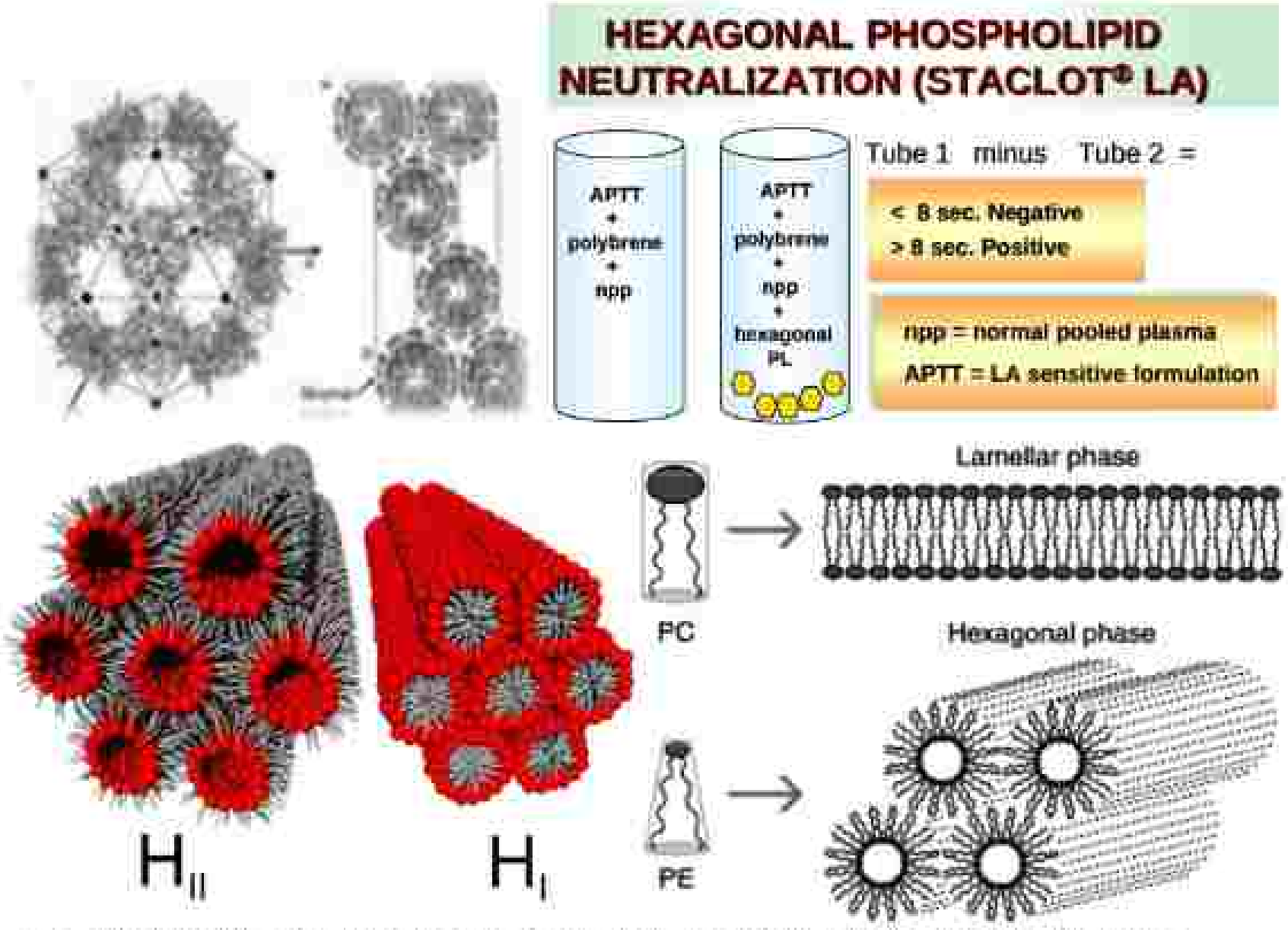


ISTH: International Society on Thrombosis and Haemostasis

شکل ۱۱۱-۵۲: معیارهای تشخیصی APS بر اساس معیارهای ISTH و سیدنی (در بیانیه ۲۰۰۸ میلان توصیه شده است که بیماری APS رسماً بعنوان یک بیماری ترومبوز درمان شود).

i) بررسی PT و PTT با فسفولیپید اکسترنال اضافی:

هر دو تست در حالت اولیه و معمولی خود طولانی بوده ولی هر چه مقدار فسفولیپید به‌کار رفته کمتر باشد، اثر مهاری آنتی‌بادی بهتر شده و زمان تست‌ها بیشتر می‌شود. افزودن فسفولیپید پلاکتی بیشتر (پلاکت‌های شستهٔ منجمد و ذوب شده) در مرحله دوم باعث کاهش اثر مهاری فسفولیپید، تأثیر کافی فسفولیپیدها و طبیعی شدن تست‌ها می‌شود که این فرایند اصلاحی باعث تشخیص بیماری می‌شود. فسفولیپید مازاد می‌تواند PL معمولی (فسفاتیدیل سرین)، PL هگزاگونال سنتتیک (تست StaClot-LA)، پلاکت، PMP (میکروپارتیکل پلاکتی) یا لیزانت پلاکتی باشد که به این نوع تست‌ها، پروسه خنثی سازی پلاکت (PNP)[۳] گفته می‌شود و همگی قادر به اصلاح تست‌های انعقادی در بیماران APS می‌باشند. در تست خنثی سازی با PLهای سنتتیک هگزاگونال، اختلاف تست قبل و بعد افزودن HG-PL (با افینیتی پایین به آنتی‌بادی) اگر بیش از ۱۱ ثانیه (در برخی منابع بیش از ۸ ثانیه) باشد، می‌تواند تاییدی بر APS باشد. حساسیت PLهای شش وجهی (به خصوص نوع اینورت H-2) نسبت به نوع مسطح برای تشخیص APS بیشتر می‌باشد. لازم به ذکر است اگر PPP به خوبی تشکیل نشود و این پلاسما فریز و ذوب شود، این عمل باعث آزاد شدن فسفولیپید و خنثی سازی سهوی نمونه و نتایج منفی کاذب می‌شود. لذا برای کاهش تاثیر فسفولیپیدهای پلاکتی، پلاسمای PPP (با پلاکت کمتر ۱۰۰۰۰/ul و فاقد PF4) با یک دور 2500g/10min یا دو دور 1500g/15min×2 انجام شده یا اینکه قبل مصرف از اولتراسانتریفوژ یا فیلتر 0.22μ استفاده می‌شود (البته فیلتر قسمتی از VWF و VIII را نیز کاهش می‌دهد). اگر قرار بر فریزر پلاسما به مدت ۲ هفته باشیم، می‌بایست در دمای ۸۰- ذخیره شود.



شکل ۱۱-۱۱: تفاوت ساختاری فسفولیپیدهای خطی و هگزاگونال تیپ I (میسلار) و II (اینورتد) که در تست غربالی استاکلات (شرکت استاگو) از نوع II آن استفاده می‌شود

1 Inverted hexagonal (H_{II}) and micellar hexagonal (H_I) phases. the hydrophilic headgroup in red and the hydrocarbon chains in grey.

2 Tissue Thromboplastin inhibition (TTI)

تست d-PT یا TTI[2] نوعی تست PT با ترومبوپلاستین (مخلوط فاکتور بافتی با فسفولیپید پلاکتی[3] یا سفالتین) رقیق شده یا d-TP است که در آن ترومبوپلاستین را در دو رقت 1:50 و 1:500 آماده (با DW) و سپس یک حجم از آن را یکبار با پلاسمای بیمار و یکبار با PNP به صورت 1:1 مخلوط و سپس برای هرکدام تست PT انجام می‌شود. سپس PT(1:500) بیمار را بر PT(1:50) پلاسمای PNP تقسیم می‌کنیم که نسبت بالای ۱/۳ احتمال APS را تایید و مقدار زیر ۱/۱ باعث رد آن می‌شود. البته به دلیل نوع و سورس فاکتور بافتی، مقدار ISI و تفاوت حساسیت و همچنین با توجه به نوع پلاسما (تازه، فریز شده یا لیوفلیزه) و با توجه به اینکه برخی از ACA یا LAهای IgM قادر به طولانی کردن تست TTI نیستند، لذا تفسیر آن اغلب دشوار و وابسته به متغیرهای گوناگون است.

Table 2. Diagnostic algorithm for the detection of LA.

Step 1.	Prolongation of phospholipid-dependant clotting time
	PTT
	PT
	DRVVT
	Other snake venom assays
	KCT
	TTI
Step 2.	Mixing assays
Step 3.	Confirmation of phospholipid dependence
	PNP
	Platelet-derived vesicles
	Hexagonal-phase phospholipids
	High-phospholipid confirmatory reagent
Step 4.	Exclusion of specific inhibition of any one coagulation factor

ii) تست زمان انعقاد (CT):

مدت زمان لازم برای انعقاد خون تام از زمان ورود خون به سرنگ نمونه‌گیری تا زمان ظهور علایم اولیه انعقاد مثل چسبیدن ذراتی از خون به شیشه یا دیده شدن رشته‌های ظریف فیبرین در خون را CT می‌گویند. به CT، تست WBCT یا CT خون تام[۲] هم گفته می‌شود. زمان نرمال CT حدود ۶-۲ دقیقه است. این تست هم برای ارزیابی مسیرهای انعقاد و هم برای ارزیابی عملکرد پلاکت‌ها انجام می‌گیرد، چرا که پلاکت علاوه بر انعقاد اولیه، ۱) با تولید PF2 و فعال کردن فاکتور XI و ۲) با تأمین PL پلاکتی یا PF3 برای اتصال و فعال شدن فاکتورهای انعقادی، در انعقاد ثانویه نیز دخالت دارد. شیشه موجود در ساختار لوله آزمایش نیز ۱) با اثر روی GP-Ib و فعال کردن پلاکت، ۲) با اتصال به PF2 روی پلاکت و فعال کردن فاکتور XI و در نهایت، ۳) با فعال کردن فاکتور XII (یا فاکتور شیشه) می‌تواند باعث شروع انعقاد اولیه و ثانویه شود که از این خاصیت برای اندازه‌گیری زمان انعقاد CT استفاده می‌شود. پس نتیجه CT طولانی می‌تواند دلیل بر اختلال مسیر داخلی، مشترک و حتی اختلال عملکرد پلاکت باشد، ولی از تست CT بیشتر برای بررسی مسیر داخلی استفاده می‌شود (معادل تست PTT). تست CT معمولی بدون ماده فعال کننده انعقاد بوده و استاندارد سازی و تکرارپذیری کمی دارد. دمای کم یا زیاد بن ماری، حرکت‌دادن زیاد لوله، قطر زیاد لوله (به دلیل عدم تماس وسط خون با شیشه)، نوع شیشه، میزان مهارت پرسنل و موارد مشابه قادر به تداخل در نتایج CT هستند. فقر فاکتورهای VIII و XII و شمارش پلاکت‌های خون نیز در نتیجه تست دخیل هستند. برای استاندارد سازی تست CT و افزایش تکرارپذیری آن از نوع فعال شده آن یعنی تست ACT استفاده می‌شود که در آن، لوله‌های آزمایش یا موئینه توسط دوز ثابت و مشخصی از اکتیواتور کوت می‌شوند تا مسیر انعقاد داخلی را فعال کنند. تست ACT اغلب در اتاق عمل، جهت تنظیم دوز درمانی هپارین و در کنار PTT به‌کار می‌رود. به‌عبارتی ACT نوعی تست غربالگری برای هردوی پایش مسیر داخلی و کنترل درمانی هپارین می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۶۶ توسط هاترسلی ابداع شد. از اکتیواتورهای مهم در این زمینه می‌توان به کائولین (آلومنیوم سیلیکات هیدراته)، سیلیت، اسید الاژیک، اکارین، سیلیکا، تیله‌های شیشه‌ای ریز، ترومبوپلاستین و تکستارین اشاره نمود. در حقیقت این

نوع CTهای فعال شده ۴ نوع اند:

۱- KCT یا Kaolin-CT که بدون نیاز به فسفولیپید خارجی عمل می‌کند.

۲- TCT یا Textarin-CT که برای عملکرد خود نیاز به فسفولیپید خارجی دارد (حساس به APS).

۳- ECT یا Ecarin-CT که بدون نیاز به فسفولیپید عمل می‌کند (غیرحساس به APS).

۴- TECT یا Textarin-Ecarin-CT

در KCT خون، کلسیم و کائولین را با هم مخلوط کرده و بدون افزودن فسفولیپید اکسترنال، زمان انعقاد را ثبت می‌کنند که فسفولیپید مصرفی در این نوع تست، همان فسفولیپید داخلی (غشاء پلاکتی) است. تکستارین نوعی سم است که در حضور فسفولیپید خارجی، پروترومبین را فعال می‌کند. اکارین نیز مشابه تکستارین بوده ولی با این تفاوت که بدون نیاز به فسفولیپید قادر است پروترومبین را فعال کند. از ترکیب این دو ماده، تست TECT ابداع شده است که مقدار آن برابر نسبت TCT به ECT می‌باشد. اکارین سم مار Echis carinatus است که قادر است بدون نیاز به PL، پروترومبین را دچار برش آنزیمی نموده و بدون کاستن از وزن مولکولی آن، به ماده حد واسط پروترومبین-ترومبین بنام میزوترومبین تبدیل کند که دارای سطح پایینی از فعالیت پروکوآگولانتی بوده و می‌تواند باعث تبدیل فیبرینوژن به فیبرین مونومر شود. این سطح از فعالیت میزوترومبین قابل مهار شدن توسط هیرودین و سایرمهارکننده‌های مستقیم ترومبین بوده ولی توسط هپارین که به‌طور غیرمستقیم و به کمک آنتی‌ترومبین III باعث مهار ترومبین می‌شود، مهار نمی‌شود. از این رو از تست ECT برای کنترل و پایش درمان با هیرودین نیز استفاده می‌شود. از ECT گاهی به‌جای تست رپتیلاز تایم (RT) نیز استفاده می‌شود.

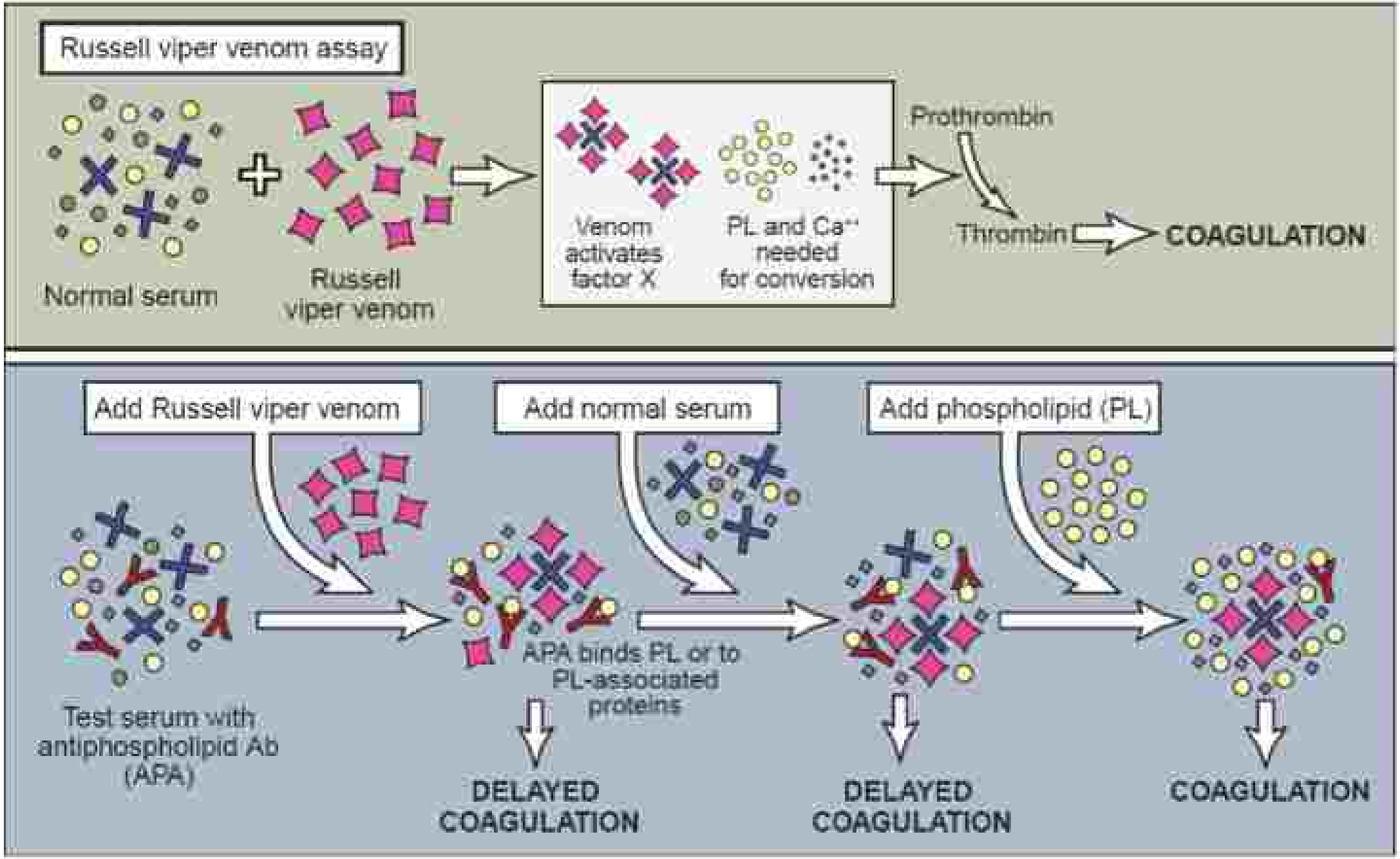
شکل ۱۱۲-۵۲: سم مار اکیس کارینانوس که حاوی فعال کننده اکارین می‌باشد.

تست TECT، آزمایش اختصاصی برای سندرم آنتی فسفولیپید (APS) هم است که در آن آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپید با اتصال به سطح پلاکت‌ها یا فسفولیپید اکسترنال مانع از اتصال فاکتورها به PF3 یا فسفولیپید پلاکتی شده و لذا انعقاد تاحدودی مختل می‌شود (افزایش توام PT وPTT). البته افزودن دوز بالای فسفولیپید اکسترنال به تست می‌تواند تاحدودی با حذف اثر رقابتی باعث اصلاح تست‌ها شود. در تست KCT و ECT چون تنها منبع فسفولیپید تست، خون بیمار است، لذا حضور APA می‌تواند با خنثی کردن آن باعث افزایش نتیجه تست شود. در افراد نرمال به دلیل نبود آنتی‌بادی ضد فسفولیپید پلاکتی، هر دو تست TCT و ECT طبیعی و یکسان بوده و لذا نتیجه تست TECT حدود یک می‌شود ولی درافراد مبتلا به سندرم آنتی فسفولیپید، به دلیل پوشیده شدن غشاء پلاکت با آنتی‌بادی‌ها و عدم تأثیر آنها بر تکستارین، صورت کسر افزایش داشته و مخرج کسر به دلیل عدم نیاز اکارین به فسفولیپید، طبیعی باقی می‌ماند و درنتیجه TECT افزایش نشان می‌دهد. البته هپارین و آنتی‌بادی ضد V نیز می‌توانند این نسبت را افزایش دهند. تست ECT یا CT فعال شده با اکارین به دلیل داشتن فعال کننده Ecarin برای پایش هپارین و هیرودین نیز به‌کار می‌رود.

iii) تست استیپون تایم (S.T[1]) یا تست سم مار راسل (RVVT):

در تست ST که همانند تست PTT انجام می‌شود، به‌جای محلول سفالتین ساده از محلول راسل حاوی سفالتین و رقت 10^{-5} سم مار راسل استفاده می‌شود. این سم درمجاورت Ca یونیزه، فاکتور X را مستقیماً فعال نموده و مسیر مشترک را راه می‌اندازد. برخلاف تست TT که فقط فاکتور I را بررسی می‌کند، تست S.T فاکتورهای X، V و II را نیز مورد سنجش قرار می‌دهد. همانند تست‌های دیگر انعقادی، هپارین و داروهای مشابه آن، FDPsها، اختلالات فیبرینوژن، اورمی و APS در نتیجه آن دخالت دارند. فرم رقیق شده این تست که d-RVVT نام داشته و فسفولیپید (سفالتین) رقیق و کمتری دارد، حساسیت بالایی به سندرم آنتی‌فسفولیپید/آنتی کوآگولان لوپوسی (APS/ LA) داشته و برای شناسایی آن به‌کار می‌رود. البته برای تأیید تست، در نهایت اگر بعد از طولانی شدن تست dRVVT، نتیجه تست با افزودن PL اضافی اصلاح شود، تشخیص APS محرز می‌شود.

شکل ۱۱۳-۵۲: مار Vipera russeli

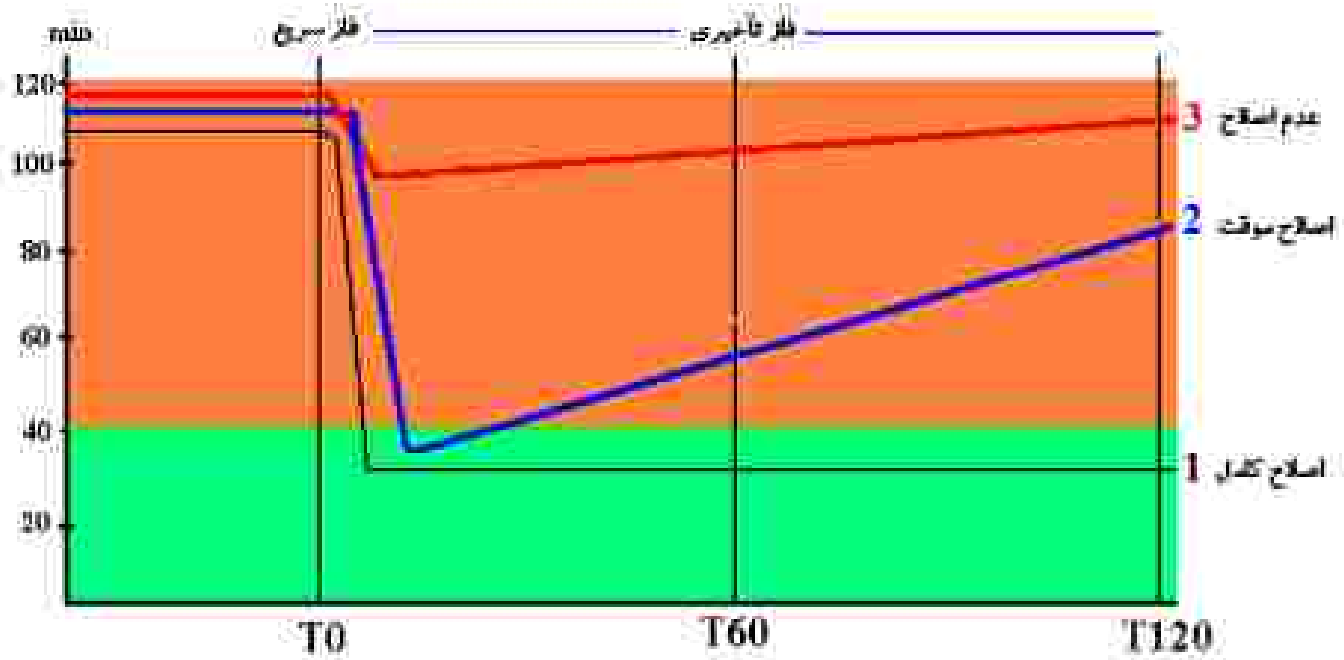


شکل ۱۱۴-۵۲: اساس تست RVVT (Russell viper venom test) که اگر نتیجه تست dRVVT+PL حدود ۸ ثانیه کمتر از dRVVT باشد، تشخیص APS تایید می‌شود.

iv) Mixed–PTT یا m-PTT:

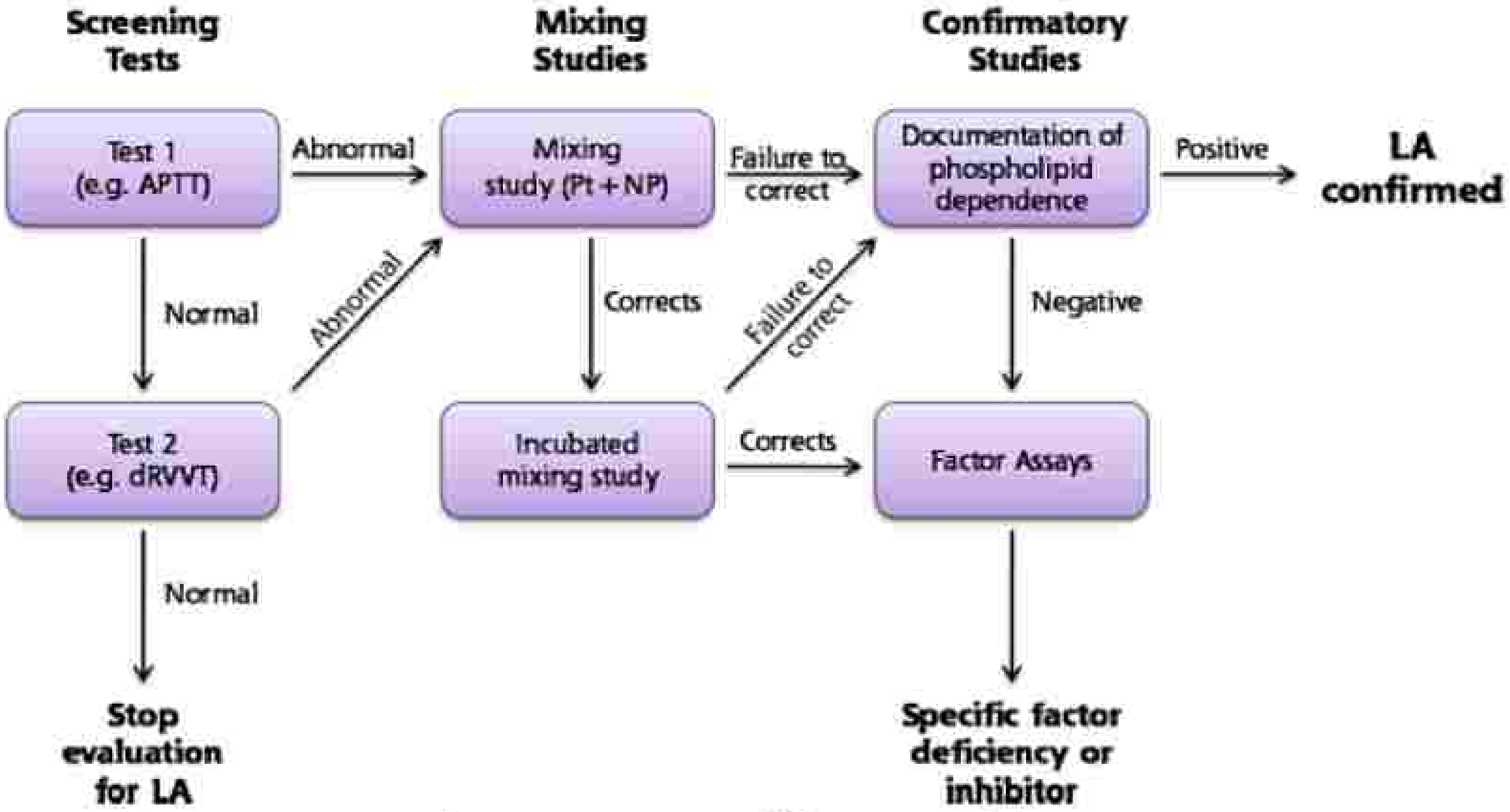
mPTT به دو فرم mPTT1-1 (50:50) و mPTT1-4 (20:80) انجام می‌شود. روش انجام تست mPTT مثل PTT است ولی نمونه مورد استفاده در آن نسبت ۱ به ۱ یا ۱ به ۴ پلاسمای بیمار با پلاسمای نرمال پوول است. پلاسمای نرمال پوول (PNP)[۲] از ترکیب پلاسمای حداقل ۲۰ فرد سالم، غیرحامله، فاقد نقص یا فقر فاکتور انعقادی، بدون عفونت، التهاب، بدخیمی، بیماری‌های اتوایمیون، بدون ابتلاء به بیماری‌های ویروسی هپاتیت B و C و HIV، فاقد ضدانعقاد لوپوسی و APS، عدم مصرف قرص‌های ضد حاملگی و هپارین تهیه می‌شود، تعداد پلاکت‌های PNP زیر ۱۰۰۰۰ در میکرولیتر می‌باشد. بعد از مخلوط نمودن پلاسمای بیمار با PNP، سه نوع زمان انکوباسیون T0، T60 و T120 (بلافاصله، بعد از ۱ ساعت و بعد از ۲ ساعت) وجود خواهد داشت که بعد از طی هرکدام، یک تست PTT مجدد از مخلوط آنها به‌عمل می‌آید. به T0، میکس سریع و به T60 و T120، میکس‌های تأخیری گفته می‌شود. امروزه PNPهای تجاری و پایدار مثل Cryocheck و George King نیز در بازار وجود دارند که مقادیر پلاسمایی تک تک فاکتورهای آن مشخص هستند[۳]. انجام انجام Mixed PTT در هموفیلی های مقاوم به درمان ضروری است.

همان‌طوری‌که عنوان شد، حساسیت کیت‌های PTT طوری طراحی شده است که قادر به شناسایی مقادیر فاکتورهای زیر ۴۰-۳۰٪ بوده و سطح پلاسمایی ۲۰٪ فاکتورها (مثل فاکتور VIII) باعث طولانی شدن تست PTT می‌شود. از این رو اگر یک PNP با سطح فاکتور ۱۰۰٪ را به نسبت ۱به۱ با پلاسمای بیماری که مثلاً دارای ۲۰٪ فاکتور VIII است، مخلوط کنیم از مخلوط آنها یک پلاسما با مقدار فاکتور ۶۰٪ حاصل می‌شود که قاعدتاً قادر خواهد بود نتیجه PTT را تا مقادیر نرمال ±۱۰٪ اصلاح نماید. در تست mPTT1-4 از مخلوط یک حجم ازPNP با فاکتور ۱۰۰٪ و چهار حجم از پلاسمای بیمار با فاکتور ۲۰٪، یک پلاسمای ۳۶٪ حاصل می‌شود [(100+4(20))/5=36] که به سختی قادر به اصلاح mPTT خواهد بود و از این رو از حساسیت بیشتری نسبت به mPTT1-1 برخوردار بوده و کمتر باعث نتایج مثبت کاذب می‌شود. تست mPTT1-4 بیشتر برای بررسی حضور Anti-VIII و APA در سندرم APS به‌کار می‌رود چرا که رقت ۱ به ۴ (یک پنجم) که در این حالت ایجاد می‌شود، مقادیر آنتی‌بادی، APA یا مهارکننده موجود در پلاسمای بیمار را به میزان زیادی رقیق نموده و لذا تأثیر مهاری آنها را به حداقل می‌رساند. نکته مهم در رابطه با PTT میکس این است که برای mPTT نباید فقط از پلاسمای یک فرد نرمال استفاده کرد چراکه پلاسمای مذکور ممکن است به‌جای فاکتور ۱۰۰٪، مقادیر پایین‌تر مثل ۶۰-۵۰٪ آن را داشته باشد ولی به علت حساسیت پایین تست PTT، به‌عنوان فرد سالم و نرمال ارزیابی شده باشد. استفاده از پلاسمای پوول ۲۰ تایی این خطا را به میزان زیادی کاهش می‌دهد چراکه افراد طبیعی با فاکتور بالای ۱۰۰٪ نیز وجود دارند که خطای ناشی از افراد نرمال با فاکتور زیر ۱۰۰٪ را خنثی می‌کنند. تست‌های سنجش مقدار فاکتورها نیز عمدتاً نوعی Mixed-PTT هستند که به نسبت ۱ به ۱ با پلاسمای معرف فاقد یکی از فاکتورها انجام می‌شوند. از طرفی دیگر، اگر تیتر آنتی-بادی‌ها بالا باشد، انجام تست mPTT1-4 ضرورت پیدا می‌کند.



شکل ۱۱۶-۵۲: سه الگوی مختلف اصلاح در Mixed-PTT. آنتی‌بادی ضد فاکتور VIII برای اثر خود نیازمند زمان ۲ ساعته بوده و لذا T0 آن اصلاح می‌شود ولی با گذر زمان، نتایج T60 و T120 آن مجدداً طولانی می‌شود. ولی آنتی‌بادی ضد فسفولیپید بسیار سریع الاثر بوده و حتی اجازه اصلاح زمان T0 را هم نمی‌دهد ولی در مقابل رقت‌های بالای آن باعث خنثی شدن اثر آنتی‌بادی می‌شود.

منظور از اصلاح mPTT کاهش جواب PTT به مقدار normal+10% بوده و مقادیر بالای ۱۳٪ به‌عنوان عدم اصلاح در نظر گرفته می‌شوند. مقادیر بین ۱۳-۱۰٪ به‌عنوان بوردرلاین و موارد مشکوک بوده و می‌بایست بار دیگر تکرار شوند. به این دامنه، منطقه خاکستری یا rosner نیز گفته می‌شود. از mPTT1-1 ساده با انکوباسیون کوتاه مدت نیز برای شناسایی آنتی فسفولیپید آنتی‌بادی یا آنتی کوآگولان لوپوسی استفاده می‌شود که در صورت اصلاح نشدن آن (مثل "mPTT>42) و به شرط تأیید دیگر نتایج آزمایشگاهی مثل تست‌های LE، ANA و dRVVT، تشخیص APS مسجل می‌شود. APA چون باعث مهار همه فاکتورهای وابسته به PL می‌شود، لذا برخلاف آنتی‌بادی ضد فاکتور VIII، هر دوی PT و PTT را طولانی می‌کند. از سویی دیگر، APS طی تست فاکتور اسی به ندرت پاسخ کمتر از ۳۵IU/dl (۳۵٪) ایجاد می‌کند، درحالی که آنتی‌بادی ضد فاکتور به ندرت باعث پاسخ بالای ۱۰IU/dl (۱۰٪) می‌شود. در این بیماران انجام تست PTT با فسفولیپید کمتر (PTT-LA or Low PL PTT) باعث افزایش حساسیت و اختصاصیت تست نسبت به APS می‌شود که محدوده نرمال آن ۴۶-۳۲ ثانیه می‌باشد.



شکل ۱۱۷-۵۲: الگوریتم تشخیصی APS در صورت مشاهده یک Aptt غیرطبیعی

برای تشخیص APS می‌بایست از تست‌های شش‌گانه هگزاگونال، حداقل دو مورد آن مثبت باشد و این نتیجه مثبت می‌بایست در یک بازه زمانی ۱۲ ماهه دوبار مجزا مثبت باشد و طبق معیارهای ساپورو با علایم بالینی مثل سقط جنین و ترومبوآمبولی همراه باشد. در واقع بعد از آنکه نتیجه تست aPTT طولانی شد (مقدار نرمال aPTT برای نوزادان زیر ۵ روز، ۶۰-۲۵ ثانیه، برای نوزادان ۵ روزه تا سه ماهه، ۵۰-۲۴ ثانیه، برای نوزادان بالای ۳ ماه و بالغین ۳۶-۲۴ ثانیه و به طور کلی ۴۶-۲۵ ثانیه بوده و در نوزادان فول ترم و پره‌ترم به ترتیب ۳۵٪ و دو برابر بیش از بالغین می‌باشد)، دو تست PTT-LA و dRVVT روی نمونه انجام می‌شود که در تستdRVVT به دلیل اینکه برخلاف PTT-LA فاکتورهای VII، VIII، IX، XI و XII تداخلی ندارند، حساسیت و اختصاصیت بالاتری وجود دارد. تست PTT-LA دو نوع Screen و Confirm (PTT-LAs و PTT-LAc) دارد که اولی که حالت غربالگری دارد، در حضور مقادیر پایین فسفولیپید (LA) و دومی که حالت تاییدی دارد، در حضور مقادر مازاد فسفولیپید (HP) انجام می‌شود. لذا به دلیل وجود آنتی بادی ضد PL در این بیماری، تست PTT-LAs طولانی و تست PTT-LAc کوتاه خواهند بود. مقدار نرمال PTT-Las بسته به مقدار PL کاهش یافته در برخی شرکت‌ها ۷۰-۴۶ ثانیه و در برخی ۴۶-۳۲ ثانیه می‌باشد. لذا اگر نتیجه تست زیر ۷۰ یا ۴۶ ثانیه (بسته به شرکت)، باشد که احتمال APS رد می‌شود ولی اگر مقادیر بالا بودند، در مرحله دوم PL مازاد همان شرکت (HP) به لوله آزمایش افزوده شده و تست PTT تکرار و نتیجه آن ثبت می‌شود (PTT-HP یا PTT-LAc)، اگر HP قادر به کاهش نتیجه PTT باشد، حداقل می‌بایست میزان ۱۰/۹ ثانیه مقدار تست را کاهش دهد که در این حالت بیماری APS تایید می‌شود. در افراد نرمال وجود و عدم وجود HP چندان باعث اختلاف نتایج نشده و مقدار PTT_{LA}-PTT_{HP} حدود ۱۰/۹-۲/۸ ثانیه حاصل می‌شود که مقادیر بالای ۱۰/۹ ثانیه احتمال APS را تایید و مقادیر پایین‌تر احتمال آن را رد می‌کنند. در اقدام بعد نسبت PTT-LA:PTT-HP (نسبت Screen:Confirm) محاسبه می‌شود که مقادیر بالای ۱/۲ باعث تایید و مقادیر زیر ۱/۲ باعث رد احتمال APS می‌شود. به عنوان مثال در یک بیمار APS نتیجه تست اول ۸۳ و نتیجه تست دوم ۵۷ ثانیه می‌شود که اختلاف دو تست ۲۶ ثانیه و نسبت آنها ۱/۴۵ حاصل می‌شود.

همزمان با تست فوق، تست d-RVVT در سه فرمت Screen (اولیه)، Mix1:1 (میکس 1:1 با PNP) و Confirm (با PL مازاد) و همزمان روی نمونه بیمار و PNP انجام می‌شود. محلول d-RVVP حاوی رقت 10^{-5} از سم مار راسل، PL رقیق، کلسیم، بافر، ماده ضد هپارین پلی‌برن و مقداری ماده پایدار کننده هست که نتیجه نهایی آن به صورت تشکیل لخته یا بررسی اوپتیکال در طول موج 671nm ثبت می‌شود. d-RVVT اسکرین روی بیمار و PNP انجام می‌شود که مقدار نرمال آن بسته به شرکت ۲۷-۲۳ ثانیه یا ۴۶-۳۱ ثانیه می‌باشد. در نتیجه در افراد نرمال نتایج دو تست مشابه خواهند بود و از این رو DRVVT screen Ratio (نسبت اسکرین بیمار به PNP) یا Rs<1.2 حاصل شده ولی در بیماران APS به دلیل بالا بودن محسوس تست اسکرین، نسبت Rs>1.2 خواهد بود. به عنوان مثال اگر نتیجه تست اسکرین بیمار و PNP به ترتیب ۴۶/۵ و ۳۸ ثانیه باشد، DRVVT screen Ratio=1.22 حاصل خواهد شد که احتمال APS را بالا می‌برد. البته Rs>1.2 می‌تواند به دلیل APS، آنتی‌بادی ضد فاکتور V، کمبود یکی از فاکتورهای I، II، V و X یا مصرف داروهای ضد انعقادی مثل وارفارین، هپارین، مهارگرهای مستقیم II (دابیگاتران، آرگاتروبان، بیوالیرودین) و مهارگرهای مستقیم X (آپیگزابان، ادوگزابان، ریواروگزابان) نیز باشد. لذا در مرحله بعد تست میکس آن انجام می‌شود تا کمبود فاکتور از حضور مهارکننده افتراق داده شود. لذا هر دوی پلاسمای بیمار و PNP را به نسبت 1:1 با PNP مخلوط کرده و بلافاصله تست DRVVTmix روی بیمار و PNP تکرار و نتیجه آنها ثبت و مقدار DRVVT mix1:1 Ratio محاسبه می‌شود که نسبت Rc<1.2 احتمال APS را تا حدودی رد و احتمال کمبود فاکتور را تایید می‌کند و در مقابل Rc>1.2 احتمال APS با مهارگر ضد فاکتور را تایید می‌کند که در این حالت مرحله سوم تست انجام شده و این بار همزمان به پلاسمای بیمار و PNP مقدار مشخصی PL مازاد افزوده شده و نتایج بررسی و ثبت و مقدار DRVVT confirm Ratio محاسبه می‌شوند. در واقع فسفولیپید مازاد می‌تواند آنتی بادی ضد PL را خنثی کند ولی روی آنتی بادی ضد فاکتور مثلاً V بی‌اثر خواهد بود. در نتیجه نسبت Rc<1.2 باعث رد احتمال APS و نسبت Rc>1.2 باعث تایید احتمال APS می‌شود. در مرحله آخر از خود Rs و Rc نیز نسبت Normalized Ratio یا R-screen:R-confirm محاسبه می‌شود که مجدداً مقادیر Rn<1.2 باعث رد APS و مقدار Rn>1.2 تایید کننده احتمال APS خواهند بود. مقدار نرمال نسبت dRVVT برای فرمت‌های Screen، Confirm و Mixing به ترتیب ۱/۱۷-۰/۸۵، ۱/۱-۰/۹ و ۱/۱-۰/۹۸ می‌باشد که در کل مقدار زیر ۱/۲ برای آنها در نظر گرفته می‌شود. به عنوان مثال اگر در مثال فوق، DRVVTc بیمار و PNP به ترتیب ۳۷/۸ و ۳۶/۵ ثانیه باشد، مقدار Rc برابر ۱/۰۳ و مقدار Rn یا نسبت ۱/۲۲ به ۱/۰۳ نیز ۱/۱۸ حاصل می‌شود که در کل احتمال APS رد می‌شود.

جدول ۴۴-۵۲: نتایج تست بررسی APS در بیمار مشکوک که نهایتاً احتمال APS در وی رد می‌شود.

Tests	Result	unit	Method	Ref range
PTT	31.9	Sec	Clotting	25-42
PTT-LA	43.4	Sec	Clotting	32-46
DRVVTs-pt	46.5	Sec	Clotting	33-43
DRVVTs-Normal	38.0	Sec	Clotting	31-46
DRVVTs-Ratio	1.22	Ratio	Clotting	<1.2
DRVVTc-pt	37.8	Sec	Clotting	32-41
DRVVTc-Normal	36.5	Sec	Clotting	31-38
DRVVTc-Ratio	1.03	Ratio	Clotting	<1.2
Normalized Ratio	1.18	Ratio	Clotting	<1.2

فرمولاسیون مربوط به انواع Rc، Rn و گاهاً Rm:

$$\text{dRVVT mix ratio} = \frac{\text{dRVVT screen (50:50 mix patient:NPP)}}{\text{dRVVT screen (NPP)}}$$

$$\text{dRVVT confirm ratio} = \frac{\text{dRVVT confirm (patient plasma)}}{\text{dRVVT confirm (NPP)}}$$

$$\text{Normalized ratio} = \frac{\text{dRVVT screen ratio}}{\text{dRVVT confirm ratio}}$$

جدول ۴۵-۵۲: تفسیر نتایج تست D-RVVT

R screen	R mixing	R confirm	تفسیر
<1.2	–	–	رد APS
>1.2	≤1.2	<1.2	رد APS
>1.2	>1.2	<1.2	احتمال حضور مهارکننده ضد V، لنفوپرولیفراتیوهای اتوایمیون و درمان با ضدانعقاد تایید و احتمال APS بسیار کم یا رد می‌شود.
>1.2	<1.2	>1.2	وجود APS تایید و احتمال کمبود فاکتور، مهارگر فاکتور و مصرف داروی ضد انعقاد کاهش می‌یابد.
>1.2	>1.2	>1.2	تایید قطعی APS

جدول ۴۶-۵۴: نتایج تأیید کننده بیماری APS در یک مرد ۳۹ ساله مبتلا به لوپوس

Test	Result	Comment
Low PL PTT	62 s	RI: 34-50s
DRVVT	59 s	RI: 30.9-41.5 s
PTT Mix	42 s	No correction
DRVVT Mix	45 s	No correction
DRVVT Neutral.	Ratio 1.32	Ratio ≥1.19 = LA
PTT Neutralization	Change13 s	Shortened by ≥8 s
	= LA	

این مرد ۳۹ ساله در سن ۳۱ سالگی سابقه MI داشته و اخیراً نیز با یک سکته مغزی، از دست رفتن حافظه و فلج اندام مراجعه نموده است. تست‌های قلبی-عروقی قادر به تشخیص علت MI نبوده ولی چند ماه بعد از نتایج فوق، تستهای مشابه و جدیدی نیز انجام داده که در آن مقدار PTT ۵۴" (نرمال ۳۶"-۲۵")، PT ۱۲/۵" (نرمال ۱۳/۳"-۱۰/۲)، d-RVVT ۹۳" (نرمال ۴۲"-۳۱")، مقدار ACA نوع IgG و IgM بالای ۸۰U/L (GPL و MPL) حاصل شد که در ادامه تست StaClot-LA نیز در دو لوله انجام و اختلاف دو لوله ۴۸/۸ ثانیه (نرمال زیر ۱۰") و مقدار Rn نیز ۱/۸ حاصل شد. بدین ترتیب بیماری APS آن قطعی گردید.

vi) PTT یا TT با پلاسمای رقیق شده:

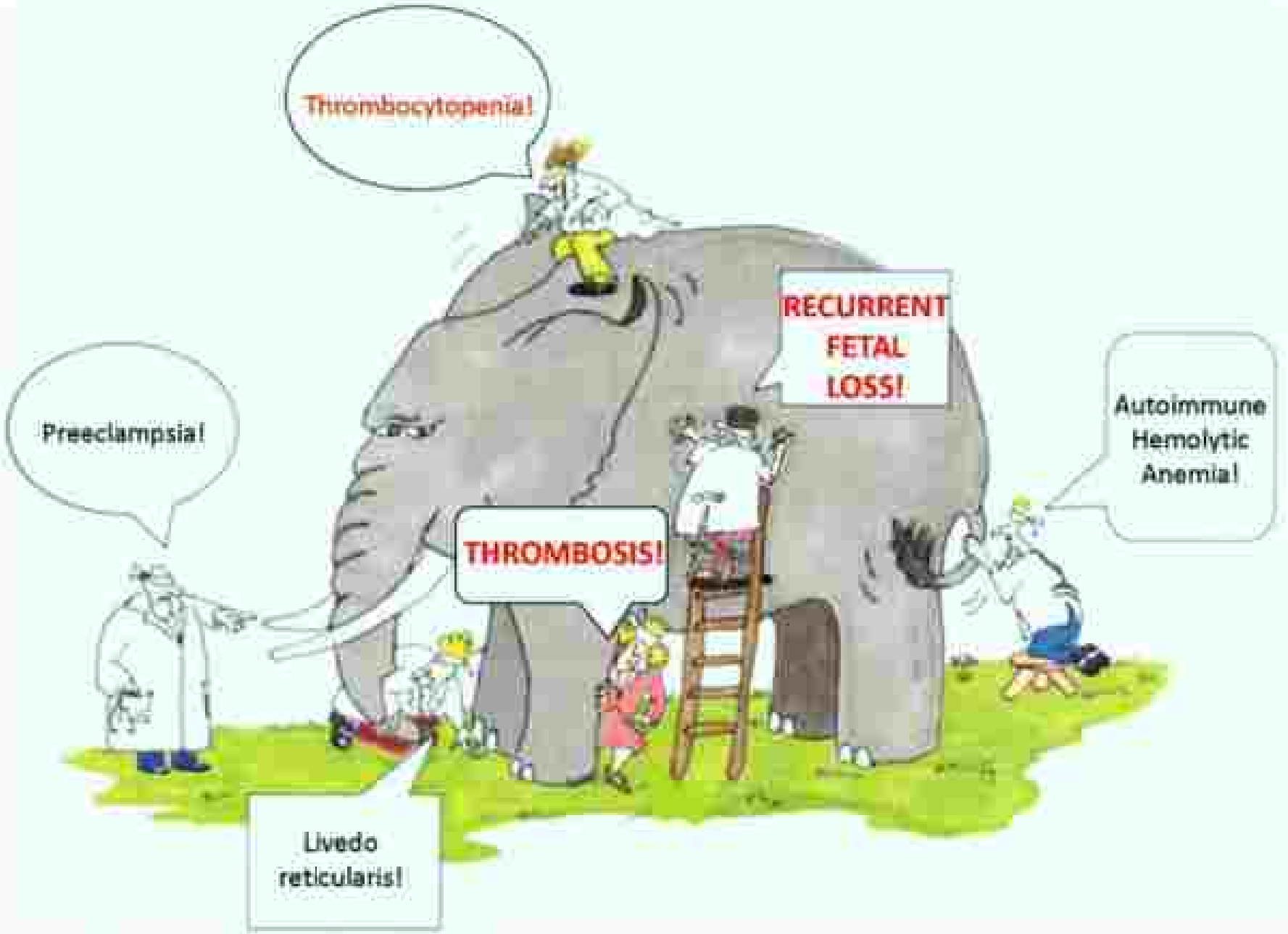
پلاسمای ۱به۱ رقیق شده با حلال باعث کاهش تیتر مهارگر می‌شود ولی در عین حال تیتر فاکتورها به ٪ ۵۰ افت می‌کند که این امر باعث کاهش اثر مهارگر می‌شود ولی از آنجایی که ۵۰٪ از فاکتورها برای انعقاد طبیعی کافی می‌باشد، لذا PTT یا TT نرمال خواهد شد. درواقع فاکتورهای انعقادی با رقت ۵۰٪ هنوز عملکرد خود را داشته و PTT یا TT طبیعی دارند ولی آنتی‌بادی APA به دلیل رقت مذکور قادر به اثر مهاری قوی نبوده و تست اصلاح می‌شود. PTT به کاهش فاکتورهای مسیر داخلی به زیر ۴۰-۳۵٪ و PT به کاهش فاکتورهای خارجی به زیر ۵۰٪ حساس بوده و کمتر از این مقادیر باعث افزایش PTT و PT می‌شود.

در سال ۱۹۰۶ واسرمن[1] سرمی را از بیماران سیفلیسی جدا کرد (راژین واسرمن) که می‌توانست با بافت آلوده به تریپونما پالیدوم، بافت قلبی حاوی کاردیولیپین و خود کاردیولیپین واکنش بدهد، امروزه ترکیب کاردیولیپین، لستین و کلسترول برای ساخت محلول VDRL[2] و انجام تست فلوکولاسیون[3] مورد استفاده قرار می‌گیرد. در APS تست VDRL (سیفیلس) مثبت می‌شود که کاذب است. APS فجیع نیز در برخی موارد علایم TTP را بروز می‌کند ولی در TTP وجود علایمی مثل تب، شیستوسیت بالا، سابقه عفونت ویروسی، اختلالات کلیوی، پورپورای مشخص، احتمال عود مکرر (۶۴٪ موارد) و عدم نیاز به درمان آنتی کوآگولانت باعث افتراق آن از APS می‌شوند. احتمال DIC در هر دو بیماری ۲۵٪ می‌باشد.

Table 3. Estimates of sensitivity and specificity of laboratory tests for APS.

Test	Reference	Sensitivity (%)	Specificity (%)
LA			
*sa ISTH guidelines	[101]	86	79
*sa ISTH guidelines	[102]	100	73
aCL and anti-β2GPI			
aCL/ anti-β2GPI	[101]	56	86
anti-β2GPI	[103]	89	56
anti-β2GPI	[5]	na	98
anti-β2GPI	[102]	86	67
aCL	[5]	na	78
aCL	[102]	71	53
Anti-PRO			
aPRO/PS	[101]	57	92
aPRO	[5]	na	98
aPRO	[102]	71	51

*sa: *secundum artis*, ie. following the method in ISTH guidelines, ref. [81].



شکل ۱۱-۱۱: APS به فیلی بزرگی در تاریکی شبیه است که پزشکان هرکدام به قسمتی از آن دست زده و استنباط مختصری از آن دارند (اشاره به شعر حافظ که هرکسی از ظن خود شد یار من)، در برخی از کشورها این داستان حافظ به یک فیل و پنج مرد کور که اولین بار فیل را لمس میکردند، تغییر یافته است.

بررسی اگرگاسیون پلاکتی (تست اگریگومتری):

اگر تست BT بیماری بالا ولی شمارش پلاکتی و تست تورنیکت وی نرمال بود، این تست انجام می‌شود. به‌عبارتی دیگر، هدف تست بررسی اختلال عملکرد پلاکت است. در این تست عملکرد پلاکت در invitro از نظر تجمع و اگرگاسیون پلاکتی و همچنین ترشح گرانول دلتا که به موازات اگرگاسیون صورت می‌گیرد، مورد بررسی واقع می‌شود. برای فعال کردن پلاکت‌ها جهت اگرگاسیون و ریلیز، ازآگونیست‌های پلاکتی استفاده می‌شود. آگونیست‌ها انواع مختلف قوی، ضعیف، معمولی و یا غیرمعمول دارند. آگونیست‌های معمول شامل ADP، ریستوسیتین (نوعی آنتی بیوتیک)، بوتروسیتین، کلاژن (معادل ریستوسیتین در invivo)، اپی‌نفرین/آدرنالین، اسید آراشیدونیک و آگونیست‌های غیرمعمول شامل U46619 (آنالوگ $TX-A_2$)، یونوفر کلسیم A23187، گاما ترومبین تریپسینه و TRAP (توالی پپتیدی فعال کننده ترومبین) هستند. ADP برای عملکرد خود به فیبرینوژن و کلاژن برای عملکرد خود به ریستوسیتین نیاز کوفاکتوری داشته و به تنهایی تأثیر کمی دارند. خود ترومبین قابلیت ایجاد فیبرین را داشته و مشکل ساز است از این رو به عنوان آگونیست کاربرد ندارد. لذا دو راه حل وجود دارد:

- استفاده از گاما ترومبین تریپسینه (روش فورمن، ۱۹۹۸) که دارای قدرت فعال سازی و تحریک پلاکت بوده ولی فاقد قدرت لخته سازی و تحریک انعقاد می‌باشد. γ ترومبین می‌تواند با اثر بر گیرنده‌های PAR باعث برش قطعه SFLLRN از PAR1 و قطعه GYPGQV از PAR4 شود که این قطعات با تحریک رسپتور و Pro-G باعث فعال شدن پلاکت، ترشح گرانول‌ها و اگرگاسیون آن می‌شوند.
- استفاده از TRAP (توالی پپتید فعال کننده ترومبین) که مشتق ناحیه خاصی از رسپتور ترومبین و درواقع همان قطعات SFLLRN و GYPGQV هستند.

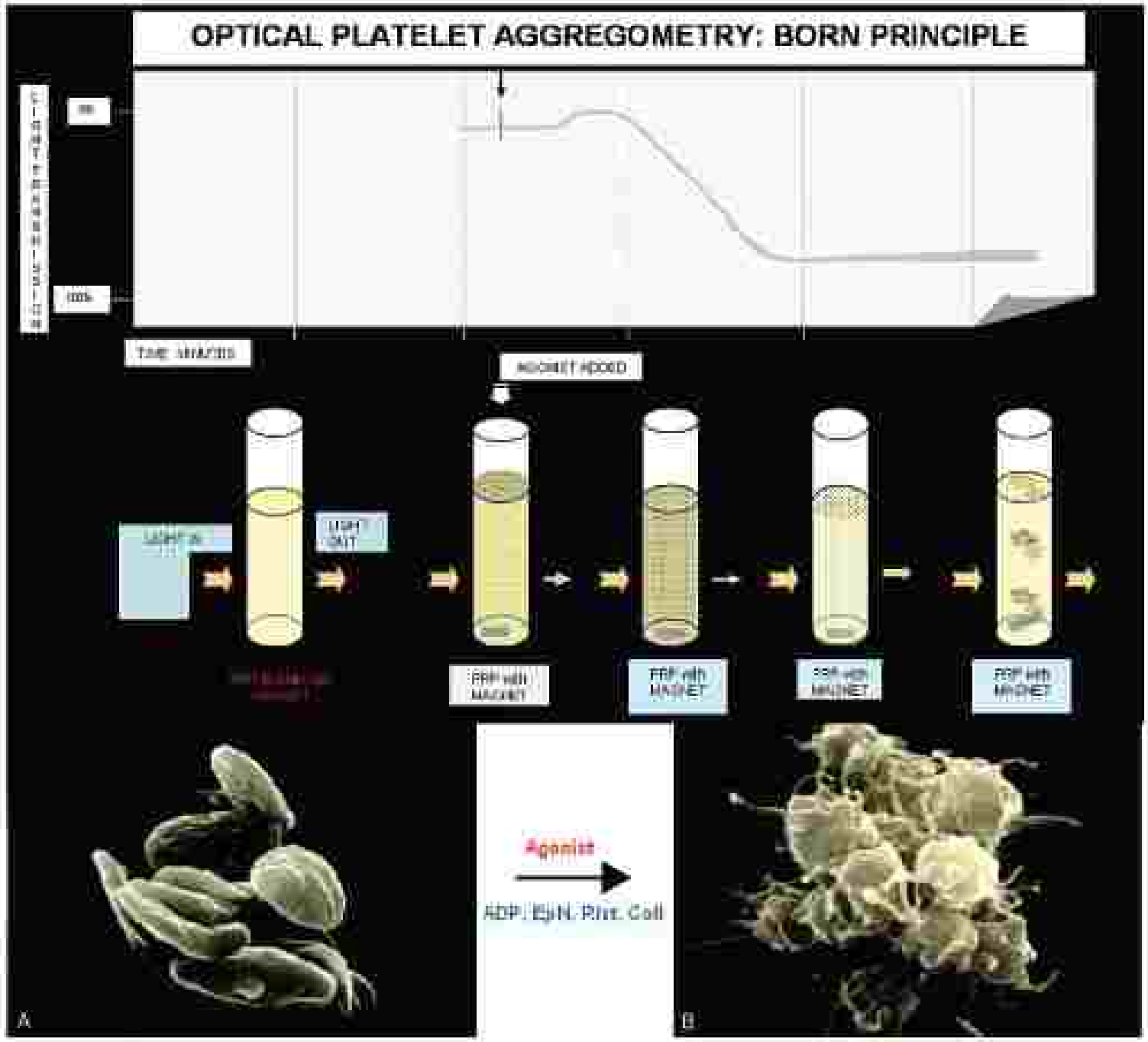
تست اگرگاسیون پلاکتی توسط دستگاه اگریگومتر و در طول مدت ۸ دقیقه و با ۲ پارامتر بررسی می‌شود:

۱- log OD، به‌عنوان ملاکی از اگرگاسیون.

۲- میزان ترشح ATP به‌عنوان ملاکی از ریلیز پلاکتی (گرانول δ).

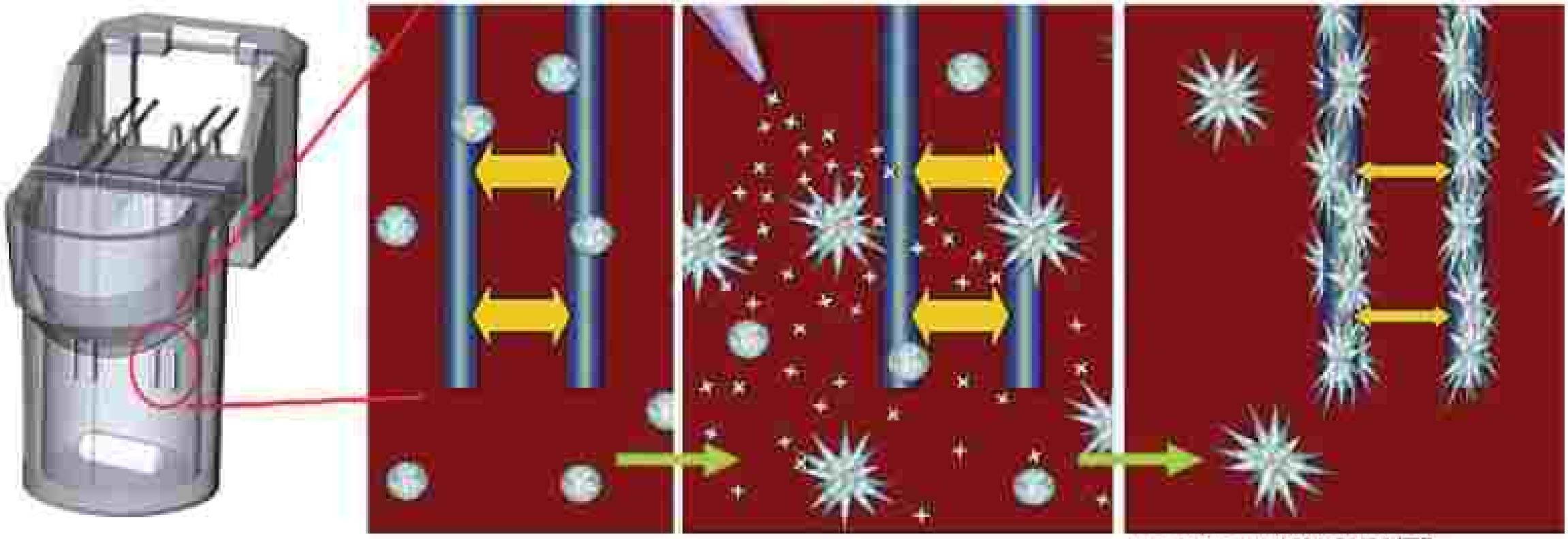
شکل ۲۶-۵۴: نمونه‌ای از دستگاه‌های اگزوسمتر جذب نوری و امپدانس [۱۷].

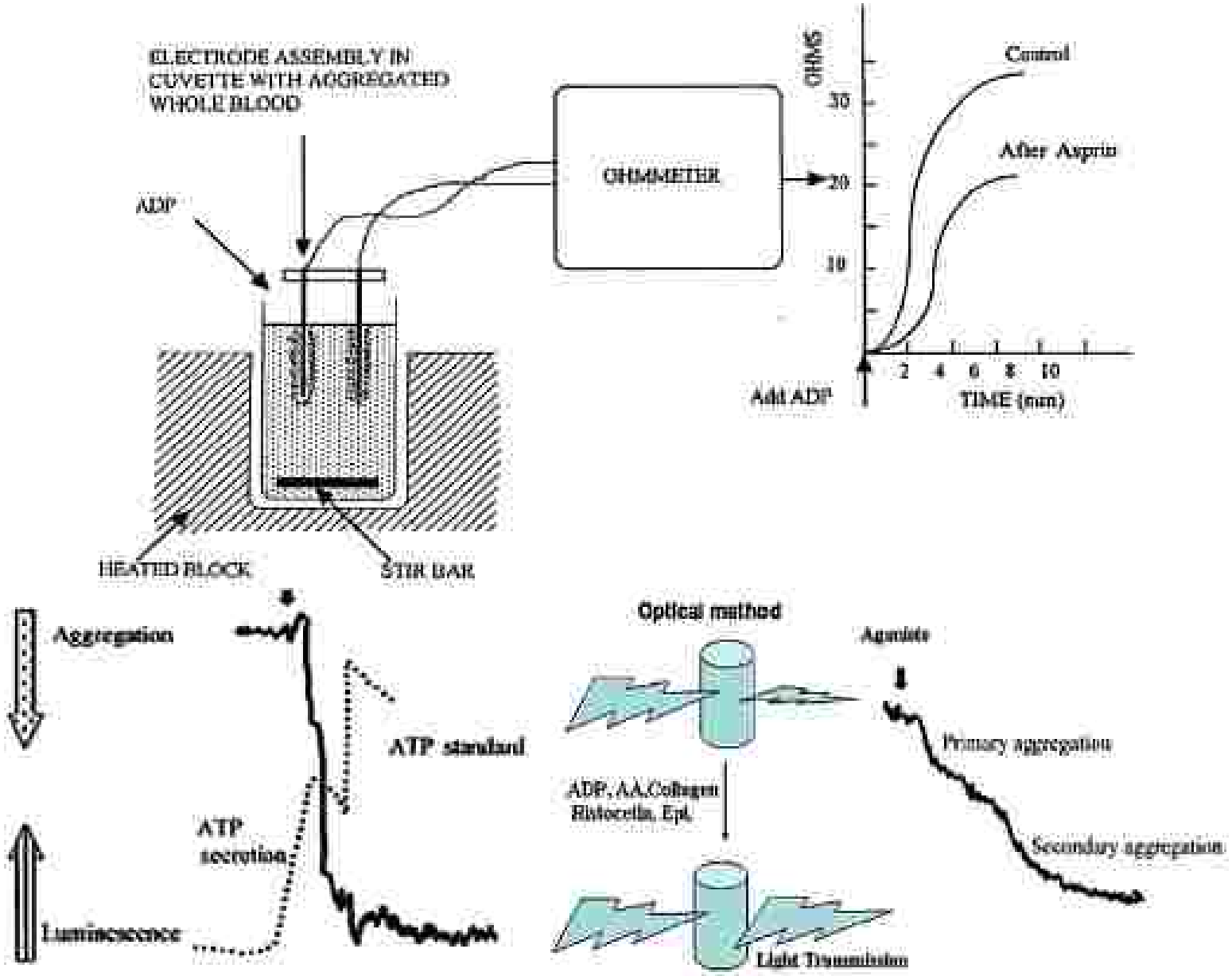
در این تست از نمونه خون سیتراته استفاده می شود که پس از سانتریفوژ. پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) کدر رنگی از آن تهیه می‌شود. PRP از سانتریفوژ با دور کم خون تام (g۲۰۰-۱۵۰ برای ۳۰ دقیقه) به‌دست می‌آید و بهتر است برای حذف ترومبین احتمالی داخل آن، ۲-۱ بار نیز با نرمال سالین شسته شود. در صورت مشاهده تعداد زیادی RBC بهتر است سانتریفوژ برای مدت ۵ دقیقه دیگر تکرار شود. برای تهیه پلاسمای عاری از پلاکت (PPP) جهت تنظیم تعداد پلاکت PRP می‌توان مقداری از خون تام را در دور g۱۵۰۰ تا ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و پلاسمای فوقانی آن را جمع آوری نمود. تعداد پلاکت‌های ایده‌آل PRP حدود $۲۰۰-۳۰۰\times۱۰^{۹}/L$ می‌باشد که در صورت تعداد بالا، مقداری PPP به آن افزوده می‌شود و در صورت تعداد کمتر پلاکت، PRP را مجدداً سانتریفوژ نموده و مقداری از پلاسمای رویی آن را بر می‌دارند. دور بالای سانتریفوژ با اگرگاسیون، کاهش تعداد پلاکت و فعال‌سازی نسبی آنها باعث اختلال کاذب در تست می‌شود. در مرحله بعد، در کوت‌های پلاستیکی مختلف، ۵۰۰µl از PRP را با انواع مختلف آگونیست و به همراه گوی فلزی در حال چرخش در میدان مغناطیسی مجاورت داده تا پلاکت‌ها اگریگه شوند. حرکت دائم PRP باعث حرکت پلاکت‌ها و مخلوط شدن آن با آگونیست‌ها می‌شود. PRP محلول و کدر (به دلیل فیبرینوژن و انبوه پلاکت‌های معلق) طی اگرگاسیون و تجمع پلاکت‌ها، به پلاسمایی شفاف و حاوی لخته پلاکتی تبدیل می‌شود. لذا OD نور عبوری در مقایسه با حالت اولیه افزایش یافته و به عبارتی جذب نوری کاهش می‌یابد. از طرفی ATP آزاد شده از گرانول‌های متراکم δ نیز به‌عنوان الگویی از دگرانولاسیون و ریلیز پلاکتی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. دستگاه های اگرگومتر یا i) کاهش جذب و یا ii) افزایش OD نور عبوری را بررسی می کنند که روش دوم کاربرد بیشتری دارد. مدت انجام تست حدود ۷ دقیقه است. در این مدت کینتیک تغییر جذب نور یا تغییر نور عبوری ثبت شده و نتیجه آن به صورت یک نمودار نزولی یا صعودی (به ترتیب بسته به میزان جذب یا میزان OD) ترسیم می‌شود. شیب نمودار اهمیت تشخیصی داشته و تغییر آن اوپراتور را به بررسی بیشتر نتایج راهنمایی می‌کند. علاوه بر شیب نمودار، الگوی موج‌های آن نیز بسیار مهم بوده و باعث کمک به تفسیر نتایج می‌شود. در



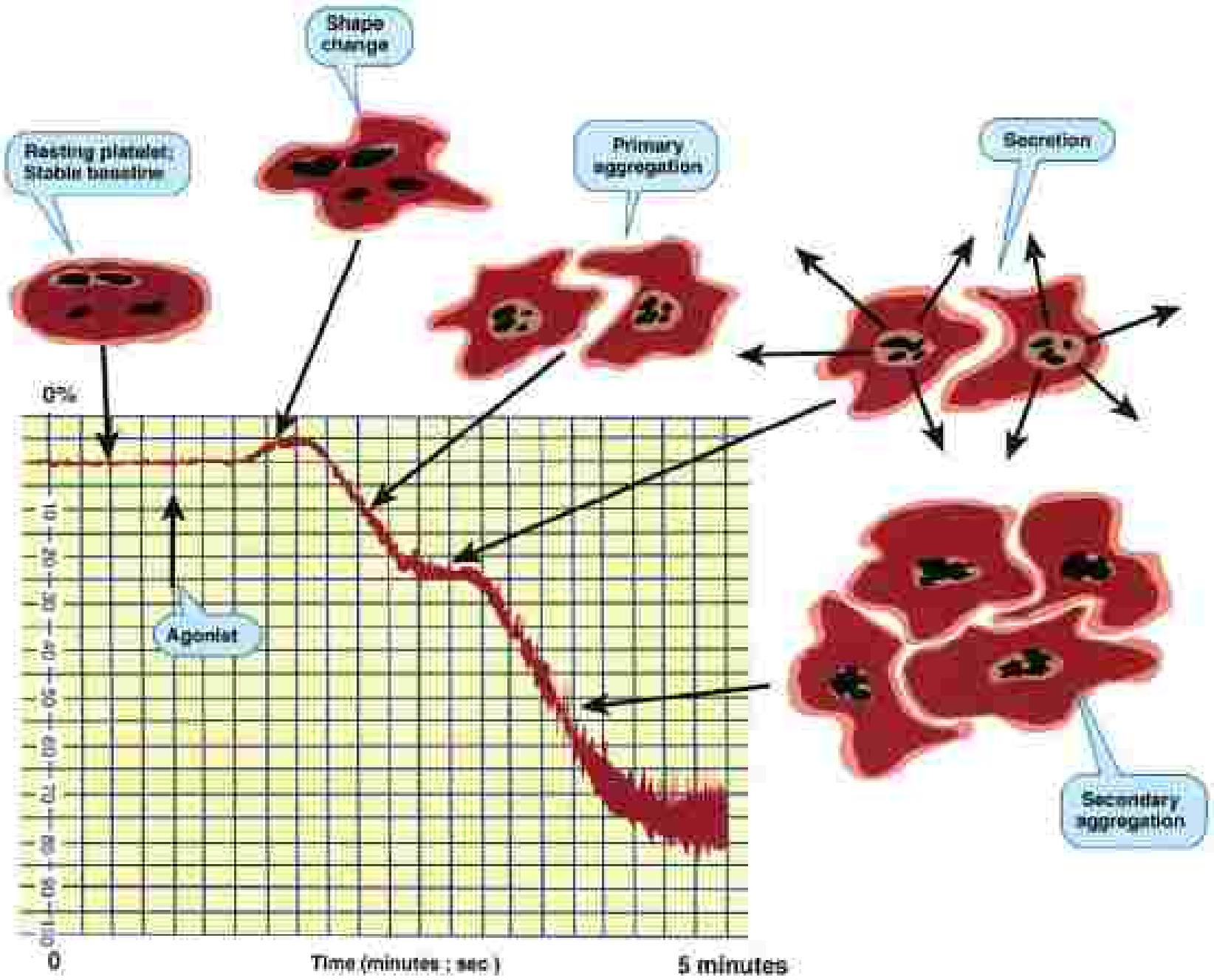
شکل ۲۴. اصل تیپی سنجش آگریگومتری به روش جذب نوری

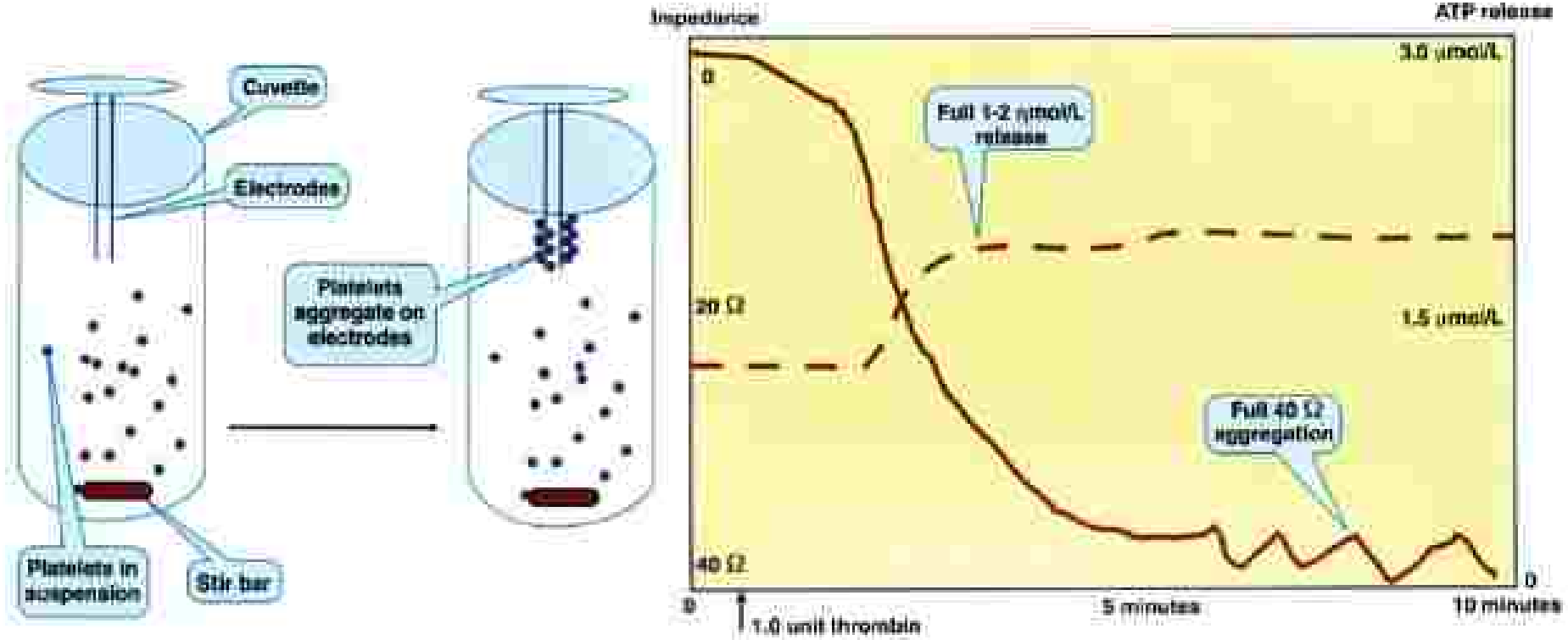
برای بررسی اگریگاسیون پلاکتی علاوه‌بر روش جذب نوری، از روش امپدانس[1] و میکروبید نیز استفاده می‌شود. در روش امپدانس، دو الکترود مثبت و منفی وارد سوسپانسیون RPR می‌شود که افزودن آگونیست و درنتیجه اگریگاسیون و تجمع پلاکت‌ها بر سطح الکترودها باعث افزایش امپدانس و مقاومت الکتریکی آن شده و بدین ترتیب منحنی امپدانس در برابر زمان ترسیم می‌شود. مزیت روش امپدانس در این است که علاوه‌بر RPR می‌توان با خون تام نیز تست را انجام داد. این تست را نیز می‌توان با ترشح ATP و بررسی لومینومتری آن نیز تلفیق نمود (لومینوامپدانس). در روشی دیگر، به‌جای الکترود از تیله یا بیدهای کوچک آغشته به به فیبرینوژن و رنگ جاذب طول موج الکترومغناطیسی مادون قرمز استفاده می‌شود که اتصال و اگریگاسیون پلاکت‌ها به سطح بیدها باعث عدم جذب نور مادون قرمز می‌شود.





شکل ۳۸-۵۴: (B) بررسی اگریگاسیون به روش امپدانس که در آن تجمع پلاکت‌ها بر روی الکترود دستگاه Multiplate (ایجاد Cardinal Wojcicki) باعث ایجاد مقاومت الکتریکی و تشخیص اگریگاسیون می‌شود. پایین: بررسی اگریگاسیون به روش امپدانس که طی اگریگاسیون از شدت نور جلوی کاسه بر شدت نور عبوری یا (D) عبوری و مقدار ATP ترشح شده از گرانول‌های دانسه افزایش می‌یابد.


Shape change
Resting platelet: Stable baseline
Primary aggregation
Secretion
0%
Agonist
Secondary aggregation
0
Time (minutes : sec)
5 minutes

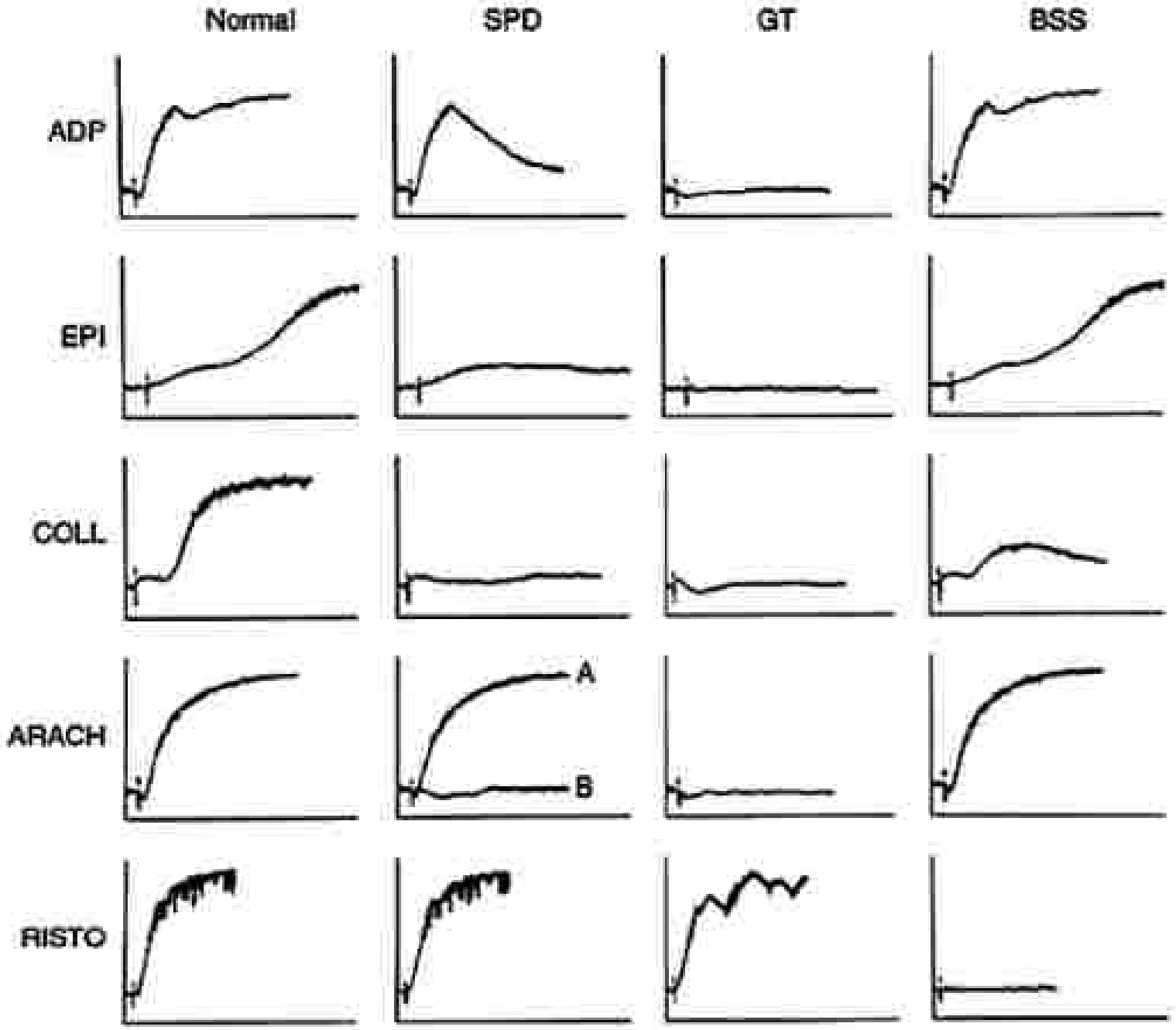


Agonist	Typical Concentration	Receptors
Thrombin	1 U/mL	Protease activatable receptor 1 (PAR-1) and PAR-4; GP Ibα and GP V
ADP	1-10 μmol/L	$P2Y_1$, $P2Y_{12}$
Epinephrine	2-10 μmol/L	α_2-adrenergic receptor
Collagen	1-5 μg/mL	GP Ia/IIa, GP VI
Arachidonic acid	500 μmol/L	TPα, TPβ
Ristocetin	1 mg/mL	GP Ib/V/IX in association with VWF

Agonist	Concentration	Aggregation Impedance	ATP Secretion
Thrombin	1 U	Not recorded	1-2 ηmol/L
Collagen	1 μg/mL	15-27 Ω	0.5-1.7 ηmol/L
	5 μg/mL	15-31 Ω	0.9-1.7 ηmol/L
ADP	5 μmol/L	1-17 Ω	0.0-0.7 ηmol/L
	10 μmol/L	6-24 Ω	0.4-1.7 ηmol/L
Arachidonic acid	500 μmol/L	5-17 Ω	0.6-1.4 ηmol/L
Ristocetin	1 mg/mL	>10 Ω	Not recorded

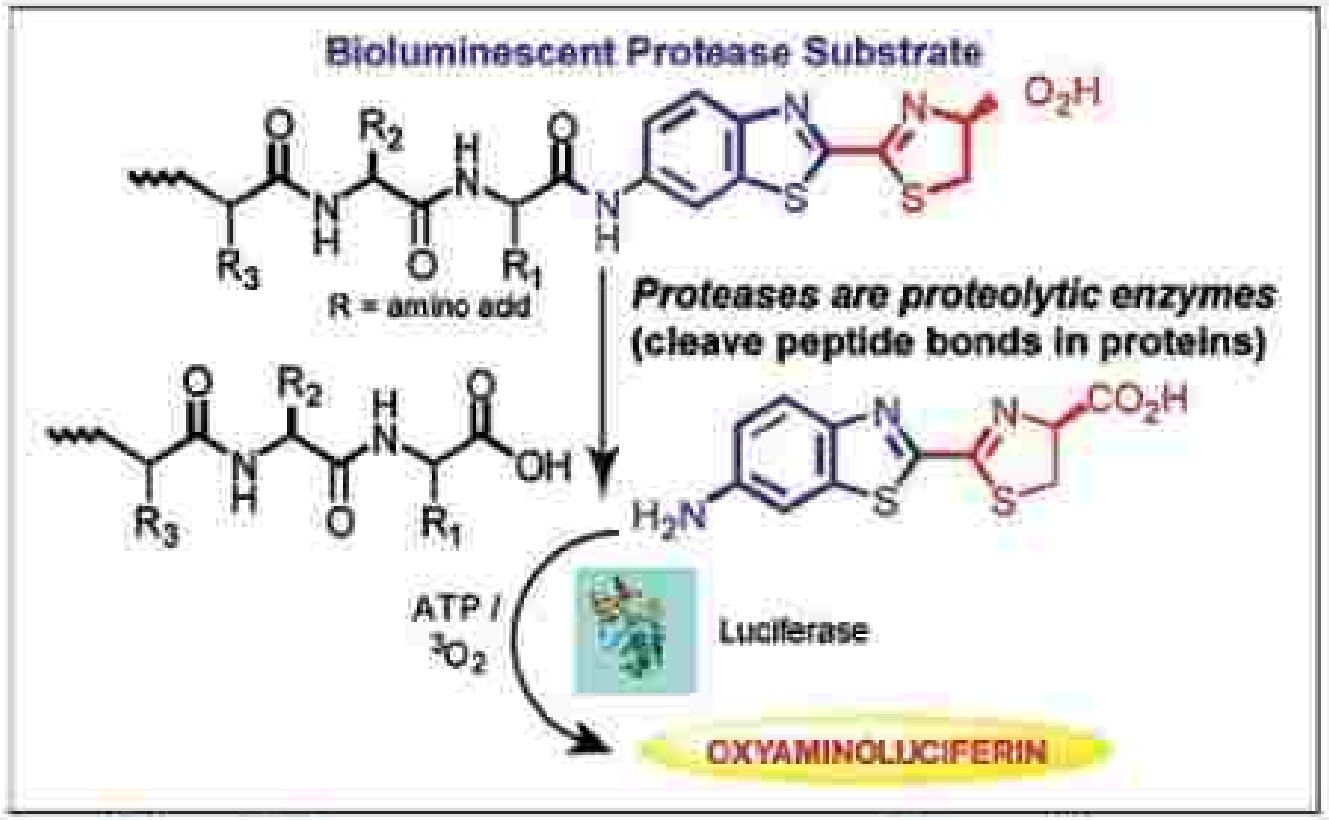
شکل ۱-۴: الگوی دو مرحله‌ای اگرگاسیون پلاکت‌ها در یک فرد سالم که طی آن با تجمیع پلاکت‌ها به دور الکترود و افزایش امپدانس آن، دستگاه مقدار مقاومت (Ω) افزوده شده را در طول زمان مورد سنجش قرار می‌دهد. در جدول پایین، مقدار ATP ترشح شده توسط هر آگونیست به همراه میزان امپدانس اگرگاسیون نشان داده شده است.

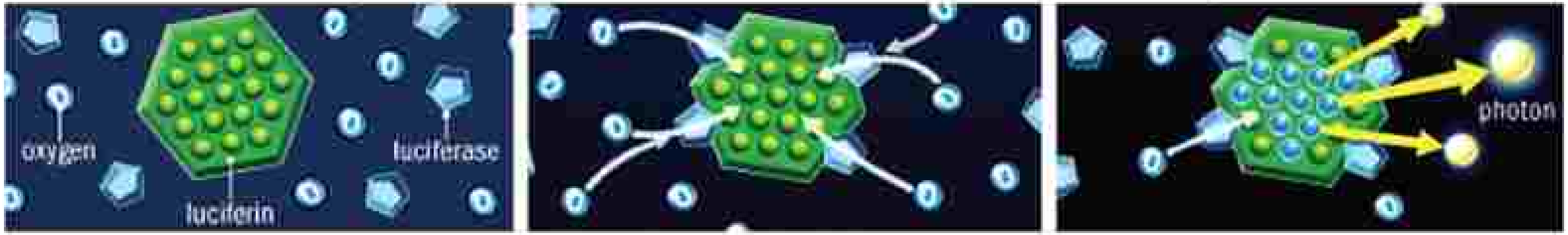
Disorder	*ADP*	*Adrenaline*	*Collagen*	*Arachidonic acid*	*Ristocetin*
Bernard–Soulier	Normal	Normal	Normal	Normal	Absent
Pseudo-vWD	Normal	Normal	Normal	Normal	Increased at low doses
ADP receptor defect	Impaired	Impaired	Impaired	Impaired	Present
Epinephrine receptor defect	Normal	Impaired	Normal	Normal	Present
Collagen receptor defect	Normal	Normal	Impaired	Normal	Present
Defect of signal transduction	Variable impairment	Variable impairment	Variable impairment	Variable impairment	Present
Glanzmann's thrombasthenia	Absent	Absent	Absent	Absent	Present
δ-SPD	Impaired	Impaired	Impaired	Variable	Present
Thromboxane receptor defect	Impaired	Impaired	Impaired	Impaired	Present



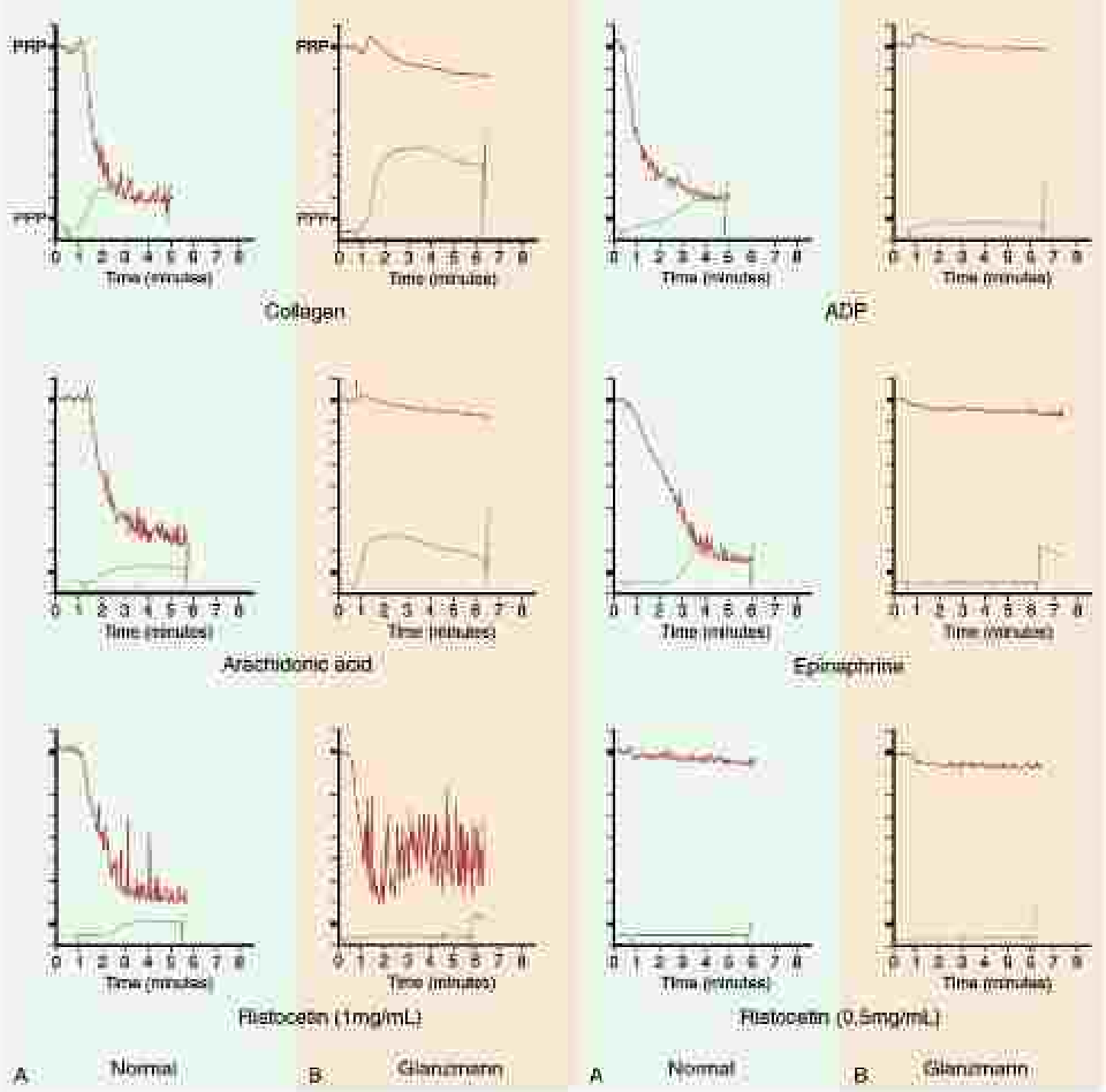
شکل ۴۲-۵۴: پاسخ پلاکت‌ها به آگرگاسیون آگونیست‌ها در بیماری‌های مختلف ترومبوسیتوپاتی که به سه دسته نرمال (present)، غیرطبیعی (impaired) و مختل (Absent) تقسیم می‌شوند.

شکل ۴۶-۵۴: خانواده بیولومینسانس و فرمول شیمیایی Firefly Luciferin

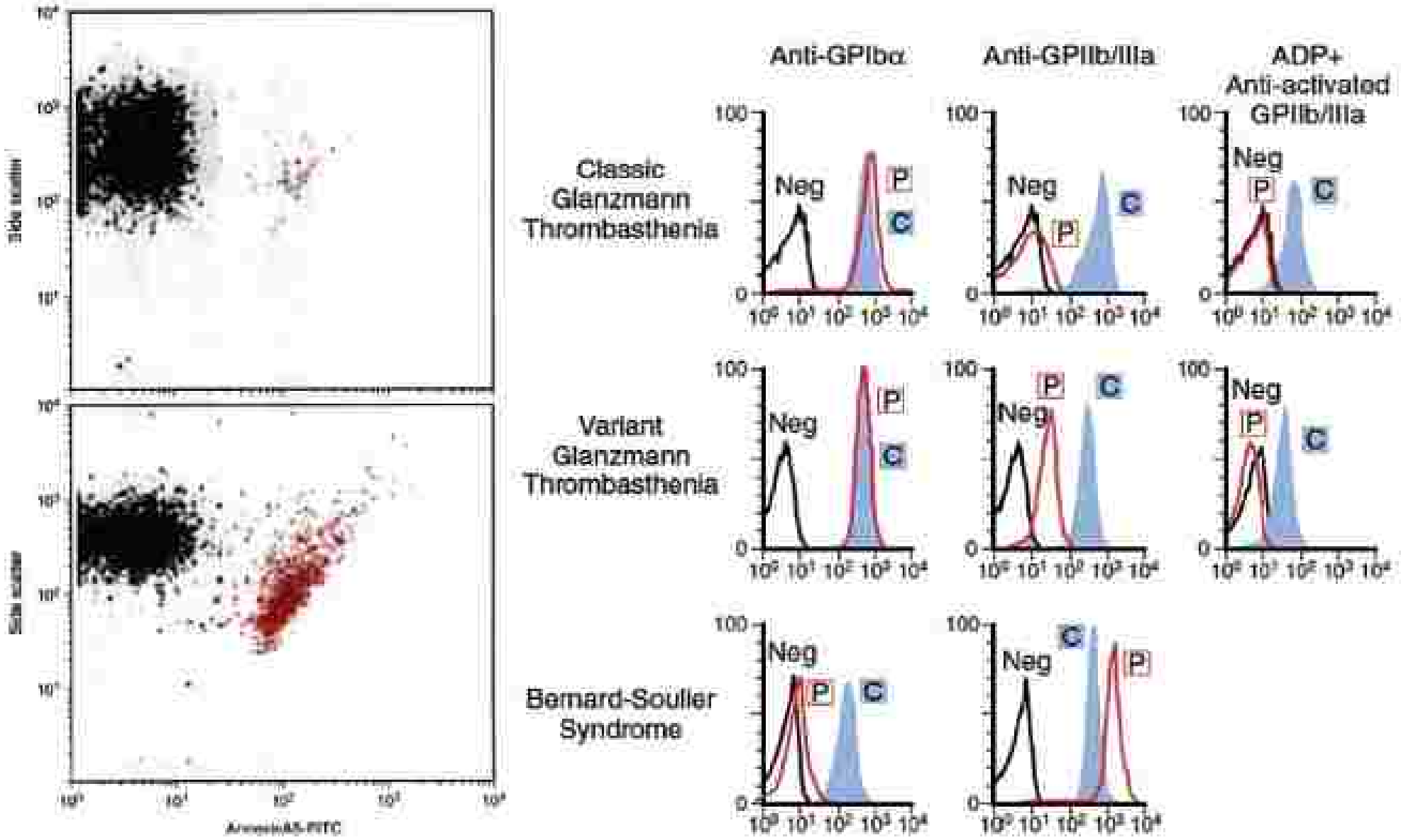




شکل ۴۷-۵۴: روش تولید فوتون نوری در لوسیفرین در حضور اکسیژن، ATP، کلسیم و آنزیم لوسیفریناز که نوعی فوتوپروتئین محسوب می‌شود.


PRP
PPP
Time (minutes)
Collagen
ADP
Arachidonic acid
Epinephrine
Ristocetin (1mg/mL)
Ristocetin (0.5mg/mL)
A Normal
B Glanzmann
A Normal
B Glanzmann

شکل ۴۸-۵۴: مطالعات تشخیصی لومینو اگریگاسیون پلاکت‌ها در ترومباستنی گلانزمن که در آن اگریگاسیون پلاکت‌ها و ترشح ATP به طور همزمان اندازه گیری شده است (لومی اگریگاسیون). در هر پانل، گراف بالا یا قرمز رنگ بیانگر اگریگاسیون پلاکت‌ها می‌باشد که افزایش اگریگاسیون به دلیل کاهش کدورت و نور جذب شده به‌صورت منحنی نزولی نمایش داده شده است. برای انجام این تست، نخست می‌بایست با استفاده از پلاسمای غنی از پلاکت نرمال (PRP) که به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شده و در سطح ۹۰ درصدی مقیاس عمودی تنظیم می‌شود، حد بالای اگرگاسیون را تعیین نمود. سپس با استفاده از پلاسمای عاری از پلاکت (PPP) که به‌عنوان کنترل منفی استفاده شده و در سطح ۱۰ درصدی مقیاس عمودی تنظیم می‌شود، حد پایین اگرگاسیون را مشخص نمود. در نهایت نیز حداکثر و حداقل انحنای گراف بیمار (گراف قرمز) از روی این دو کنترل تعیین شده و حداکثر انحنای روبه پایین نمودار در سطح نمودار PPP قرار می‌گیرد تا در صورت قرائت موارد خاص، نمودار در خارج از مختصات ست‌آپ اولیه قرار نگیرد. در هر پانل، نمودار پایینی (گراف سبز) نیز ترشح ATP توسط پلاکت‌ها را به صورت منحنی صعودی نشان می‌دهد. با ترشح ATP، محلول لوسیفرین-لوسیفریناز موجود در محیط واکنش خاصیت لومینانسی پیدا کرده و قابل ردیابی توسط دستگاه لومینومتر می‌شود. انحنای ناگهانی در انتهای هر نمودار سبز رنگ، بیانگر پاسخ به ATPی اضافه شده به عنوان یک استاندارد کالیبراسیون داخلی می‌باشد. اندازه‌گیری همزمان اگرگاسیون و ATP حاصل از ترشح گرانول‌های متراکم (دلتا)، امکان شناسایی و تشخیص ۱) اختلالاتی مثل ترومباستنی گلانزمن که مراحل پایانی اگریگاسیون پلاکت را تحت تأثیر قرار می‌دهد، یا ۲) ناهنجاری‌هایی که رسپتورهای اختصاصی آگونیست‌های پلاکت را درگیر می‌کنند و یا ۳) ناهنجاری مسیر انتقال سیگنال داخلی که ممکن است پاسخ ترشحی و یا حتی پاسخ اگریگاسیون به آگونیست‌های ضعیف‌تر پلاکت (مثل ADP یا اپی‌نفرین) را تحت تأثیر قرار بدهد ولی پاسخ به محرک‌های قوی‌تر (مثل آراشیدونیک اسید یا کلاژن) را چندان تحت تأثیر قرار ندهد را فراهم می‌آورد. لازم به ذکر است که ترومباستنی گلانزمن فقط به دوزهای متوسط و بالای ریستوسیتین پاسخ داده و در برابر دوزهای پایین، اگرگاسیونی نشان نمی‌دهد.



شکل ۴۹-۴: بررسی فلوسایتومتریک پلاکت‌ها در شرایط نرمال (C)، بیماری GT و BSS که به صورت P نشان داده شده است (شکل سمت راست). نمودارهای آبی رنگ پس‌زمینه جایگاه پالس‌های نرمال قرمز را نشان می‌دهند. در شکل سمت چپ نیز پلاکت‌های فعال (تصویر پایین با نقاط قرمز) و غیرفعال (تصویر بالا با نقاط سیاه) باهم مقایسه شده‌اند. در این تصویر برای نشان دادن پلاکت‌های فعال از آنکسین نشاندار استفاده شده است[۷].

تست بررسی اتصال پلاکتی[1] (PAT) یا تست شیشه:

در این تست با یک سرنگ حدود ۶-۴ سی‌سی خون از بیمار گرفته و نصف آن را در یک ویال استاندارد CBC (با درپ بنفش) حاوی EDTA و نصف دیگر خون را در ویال‌های مشابهی که تا نصف توسط گوی‌های شیشه‌ای پر شده‌اند، می‌ریزند. بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه شمارش پلاکت هر دو ویال را به‌دست می‌آورند که در افراد نرمال، شمارش پلاکت ویال دوم می‌بایست ۷۵-۴۰٪ کمتر از شمارش پلاکت‌های ویال اول باشد. پلاکت‌های نرمال به دلیل داشتن PF2 و GP-Ib میل بالایی برای اتصال به شیشه دارند که این خاصیت باعث اتصال آنها به گوی‌های شیشه‌ای و کاهش شمارش آنها در ویال دوم می‌شود. گزارش تست به صورت تقسیم اختلاف پلاکت دو ویال ضرب در ۱۰۰ به شمارش ویال اول می‌باشد.

$$PAT\% = (Plt1 - Plt2) \times 100 \div Plt1$$

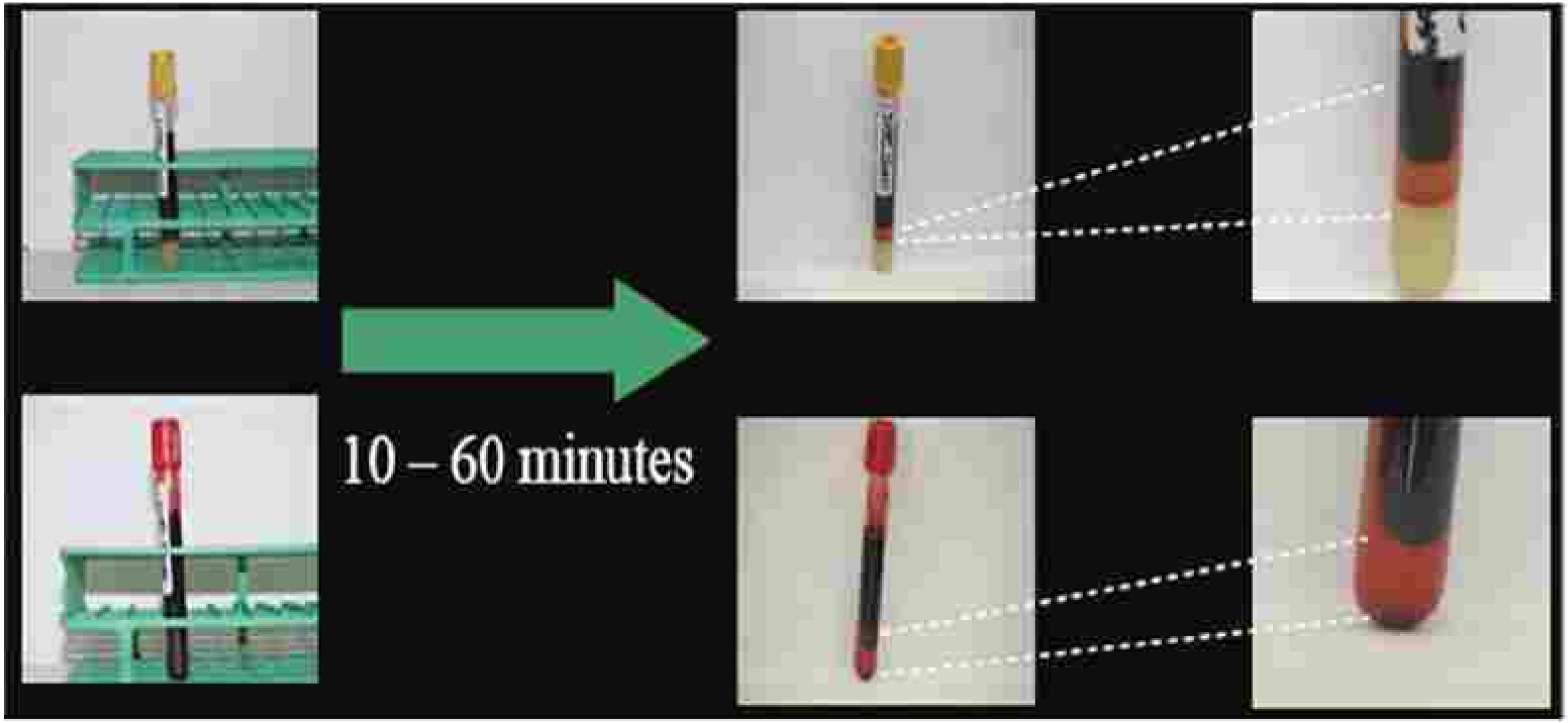
مثال، پلاکت ویال اول بیماری ۴۴۰۰۰۰/µl و شمارش ویال دوم وی ۳۳۰۰۰۰/µl می‌باشد، آیا وی دچار مشکلات اتصالی و اگرگاسیون می‌باشد یا خیر؟

$$PAT\% = (440000 - 330000) \times 100 \div 440000 = 25\%$$

نتیجه ۲۵٪ مقادیر خوبی برای اتصال پلاکتی مطلوب نبوده و بیمار احتمالاً مشکلات انعقادی مثل ترومباستنی گلانزمن، سندرم چدیاک هیگاشی، بیماری‌های میلوپروليفراتیو (مثل ET, PV, CML و MMM)، اورمی یا مصرف آسپرین یا داروهای مشابه و یا اختلالات مسیر سکلواکسیژناز می‌تواند داشته باشد.

تست رتراکسیون، انقباض یا توکشیدگی لخته (CRT):

پلاکت‌ها بعد از فعال‌سازی، اتصال به عوامل ساب‌اندوتلیوم و اگرگاسیون، دچار چروکیدگی و انقباض شده و به این ترتیب باعث انقباض کل لخته می‌شوند تا سایز لخته محدود شده و باعث انسداد عروقی یا کاهش اکسیژن‌رسانی به ناحیه مورد نظر نشوند. از سویی دیگر، انقباض لخته در دراز مدت باعث تسهیل جدا شدن آن از محل زخم ترمیم یافته نیز می‌شود. این فرآیند وابسته به اکتین و میوزین‌های پلاکتی است که در اثر فعال‌سازی و افزایش کلسیم داخل سلولی ایجاد می‌شود. طبق گزارشات دکتر شونوالدر، تیروزین کیناز‌های خانواده Src و پروتئاز Caplain نقش مهمی در فعال سازی رشته‌های اکتین و میوزین و انقباض لخته دارند. در این حالت، پلاکت مجدداً از حالت کروی فعال خود درآمده و به فرم شدیداً چروکیده تبدیل شده و انقباض خود را به خارج از سلول و به کل لخته منتقل می‌کند. علاوه بر رشته‌های انقباضی، اتصال قوی مولکول‌های اینتگرینی مثل GP-IIb/IIIa به VWF، عوامل ساب اندوتلیوم و دیگر پلاکت‌ها نیز نقش مهمی در انقباض لخته بازی می‌کنند. این نوع اینتگرین‌ها تحت تنظیم پروتئین‌های G فامیل Ras (مثل Rap-1 و RhoA) در سطح پلاکت‌های فعال بیان شده و نقطه ثقل محکمی را برای انقباض و توکشیدگی لخته فراهم می‌آورند. طی این روند پلاسما از لابه‌لای سلول‌ها خارج و لخته به مرور جمع می‌شود. حجم پلاسمای به‌دام افتاده بستگی به قدرت انقباض لخته دارد و افزایش رتراکسیون باعث کاهش پلاسمای به دام افتاده و افزایش پلاسمای آزاد شده می‌شود که قابل سنجش است. این فرآیند به تعداد کافی از پلاکت‌های فانکشنال طبیعی، ATP، کلسیم و حداقل ۲۰۰mg/dl فیبرینوژن نیاز دارد. شروع انقباض حداقل ۳۰ دقیقه بعد از لخته کامل شروع شده و طی ۶۰ دقیقه به ۳۰٪ و طی ۴ ساعت به حداکثر خود می‌رسد ولی با این وجود، اغلب تا ۲۴ ساعت دیگر نیز نگهداری می‌شود که در این زمان انقباض لخته کاملاً تکمیل شده و به پایداری می‌رسد. در این مدت، لخته به ۵۰-۴۵٪ از حجم خون اولیه کاهش می‌یابد. در اختلال اگرگاسیون، مصرف داروهای ضد پلاکتی، ترومبوسیتوپنی، کمبود GP-IIb/IIIa و فیبرینوژن شاهد اختلال انقباض و درنتیجه بزرگی لخته، افزایش سرم به‌دام افتاده در لخته، کاهش حجم سرم آزاد و افزایش رهایی RBCها به داخل سرم آزاد خواهیم بود. در این حالت اندازه لخته بیشتر از ۵۰٪ حجم خون اولیه بوده و سرم آزاد به‌جای محلول صاف و زرد، به صورت خون آبه‌ی قرمز دیده می‌شود. این تست را به‌جای خون تام با پلاسمای غنی از پلاکت یا PRP نیز می‌توان انجام داد.



شکل ۵۰-۵۴: انقباض لخته طبیعی طی یک ساعت که خروج نسبت زیادی از پلاسما را در تصویر بالا نشان می‌دهد. در تصویر پایین، نقص در انقباض لخته با افزایش حجم لخته، سرم خونی و افزایش پلاسمای به دام افتاده تشخیص داده می‌شود.

روش آزمایش :

نمونه مورد استفاده، خون کامل یا PRP غنی از پلاکت می‌باشد، با این تفاوت که زمان انجام تست برای RPR یک ساعت و برای خون کامل، ۲۴ ساعت است. برای انجام تست، به یک لوله مدرج (درجه بندی ۱۰ - ۱ از بالا به پایین) ml ۱۰ خون یا PRP ریخته. سپس یک سیم فنری یا میخ در داخل آن قرار داده و به آن ترومبین یا Ca اضافه می‌شود تا خون یا پلاسمای PRP در اطراف فنر لخته بزند. لوله را تا ۲۴ ساعت در ^{oC} ۳۷ نگهداری نموده و بعد از آن، سیم متصل به لخته منقبض شده را درآورده و حجم سرم باقی مانده اندازه‌گیری می‌شود. در حالت نرمال کمتر از ۴۵٪ از حجم اولیه خون تام یا PRP به صورت سرم در لابه‌لای لخته باقی مانده و مابقی (اغلب ۵۵٪ خون یا PRP) به صورت سرم شفاف و آزاد از لخته خارج می‌شود. لازم به ذکر است که علاوه بر ساعت ۲۴، لخته را در ساعات ۱، ۲ و ۴ نیز به صورت چشمی و بدون درآوردن فنر بررسی می‌کنند تا زمان شروع اولین علایم انقباض مشخص شود. در حالت نرمال کمتر از ۵٪ سرم خارج شده را RBCها تشکیل می‌دهند که به آنها Red cell fall-out گفته می‌شود. لازم به ذکر است که هنگام بیرون کشیدن لخته، به دلیل جمع شدن فیزیکی لخته، ۲ قطره سرم به همراه مقداری RBC ممکن است از لخته به درون سرم بچکد. در گذشته این تست بیشتر برای شناسایی ترومباستنی گلانزمن به‌کار می‌رفت.

شکل ۵۱-۵۴: انجام تست CRT در دو حالت نرمال (تصویر بالا) و مختل (تصویر پایین) با استفاده از نمونه RPR. هنگام تهیه PRP، در پایان کار، برای بهتر دیده شدن لخته مقداری RBC به آن اضافه می‌شود.

علل کاهش CRT:

۱- اختلال کمی و کیفی فیبرینوژن و VWF

۲- ترومبوسیتوپنی زیر ۵۰۰۰۰ و اختلال عملکرد پلاکت مثل سندرم برنارد سولیر (BSS) و ترومباستنی گلانزمن (GT)

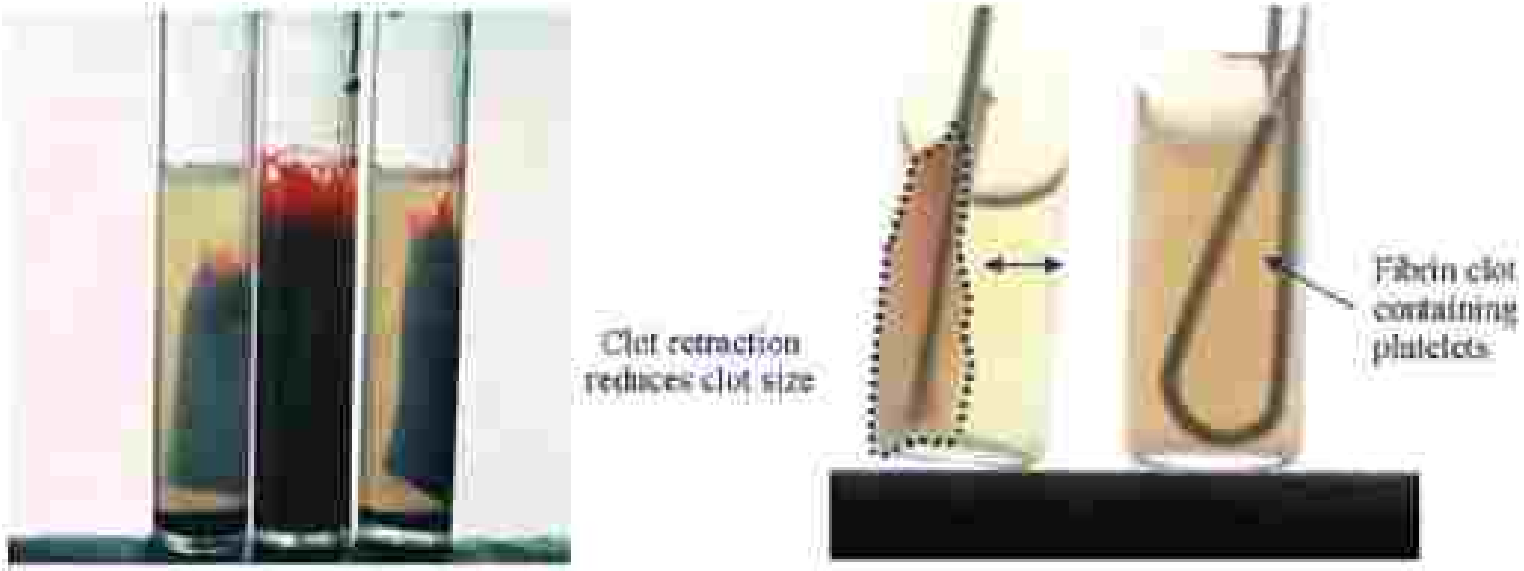
۳- پلی‌سایتمی و افزایش HCT باعث افزایش کلاب و غیر اختصاصی اندازه لخته و در نتیجه کاهش CRT می‌شود. آنمی، برعکس باعث کوچکی کاذب لخته و افزایش CRT می‌شود.

۴- هموفیلی و لخته ضعیف و عدم انقباض آن که باعث کاهش حجم مانده می‌شود.

۵- DIC و فیبرینولیز

۶- داروهای ضد انعقاد مختلف (هپارین، وارفارین، آسپرین، کلوپیدوگرل و غیره)

۷- پاراپروتئینمی و شرایط هیپرویسکوزیته مثل مالتیپل میلوما (MM) و ماکروگلبولینمی والدنشتروم (WM)



شکل ۵۴-۵۴: مثال‌هایی از انقباض لخته در خون تام و PRP

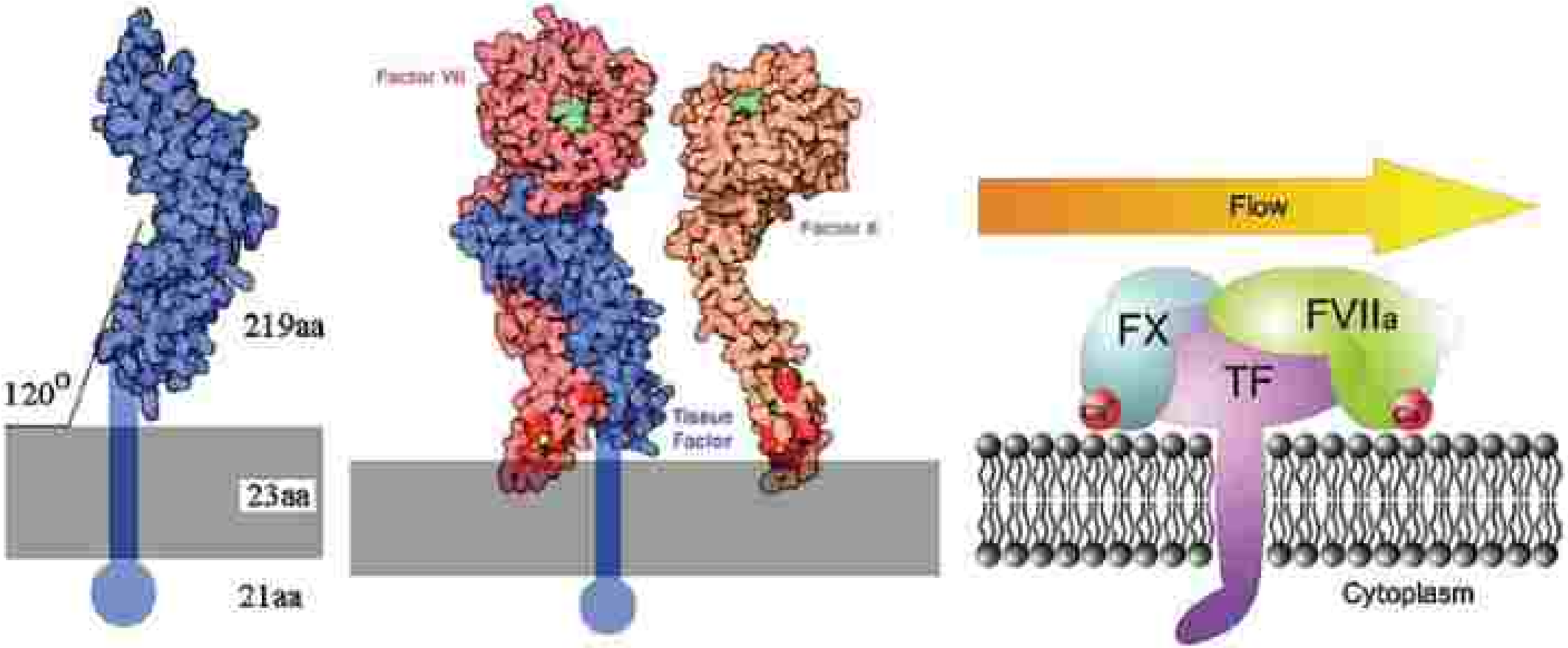
همانند همه تست‌های انعقادی همولیز نیز می‌تواند باعث اختلال در تست شود. پلاکت‌های فعال و دگرانوله که در اثر اشکال در خون‌گیری ایجاد می‌شوند نیز شباهت بالایی به اختلالات ساختاری و عملکردی پلاکت داشته و به‌طور کاذب باعث نتایج کاذب در تست CRT می‌شوند. از علل مصنوعی و آرتیفکت که باعث ایجاد همولیز می‌شوند می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- خون‌گیری با استفاده از سرسوزن باریک
- کشیدن پرقدرت خون در سرنگ طی خون‌گیری
- به هم زدن شدید خون در سرنگ یا لوله
- خالی نمودن سریع و تند خون سرنگ از مسیر سرسوزن
- سانتریفیوژ خون در سرعت بالا قبل از لخته شدن خون کامل
- انجماد و ذوب خون
- لوله های غیرتمیز یا وجود بقایای شوینده‌ها
- وجود آب (یامحلول‌های هیپوتونیک) در سرنگ یا لوله

فاکتور III یا فاکتور بافتی (TF) (فسفولیپید بافتی یا ترومبوپلاستین یا CD142)

علاوه بر فاکتور بافتی-۳ اسامی مختلفی مثل ترومبوپلاستین بافتی، فسفولیپید بافتی، CD142، ترومبوکیناز، سینوزیم و فاکتور موراویتز[1] نیز برای فاکتور III به‌کار می‌رود. البته ترومبوپلاستین اسم تجاری موارد سنتتیک فاکتور بافتی محسوب می‌شود که به دو فرم ترمبوپلاستین کامل (حاوی TF و PF3) و ترومبوپلاستین نسبی یا پارشیال (فقط PL یا PF3) سنتز می‌شوند. محلول اول در تست PT و محلول دوم در تست PTT کاربرد دارد. ژن سازنده آن (ژن F3) با ۱۲/۶Kb اندازه و ۶ اگزون روی کروموزوم 1p13 قرار دارد که پروتئین حاصل از آن به صورت غشایی می‌باشد ولی یک فرم محلول از TF نیز وجود دارد که ایزوفرم آلترناتیو اسپلایسینگ بوده و در آن اگزون ۵ حین بلوغ mRNA حذف شده و درنتیجه اگزون ۴ به ۶ وصل می‌شود. نیمه‌عمر TF مشخص نبوده ولی از ۲۶۳ اسیدآمینه و ۴۴KD وزن تشکیل شده است. این فاکتور برخلاف دیگر فاکتورها، سرین پروتئاز نبوده، خاصیت آنزیمی نداشته، جزء هیچ‌کدام از سه گروه اصلی فاکتورهای انعقادی نبوده و نه جذب و نه مصرف می‌شود. این فاکتور فرم ذخیره نیز ندارد ولی در میکروپارتیکل‌های لکوسیتی (LMP) و اندوتلیومی (EMP) به وفور دیده می‌شود. مقدار TF3 مورد نیاز برای یک هموستاز فیزیولوژیک سریع با CT نرمال ۵ دقیقه‌ای، ۱-۵ pM است که باعث افزایش ۲۰۰۰-۱۰۰۰ برابری فعالیت فاکتور VII شده و با تولید II، غلظت موضعی TF3 را به ۲۰-۱۰ nM افزایش می‌دهد.

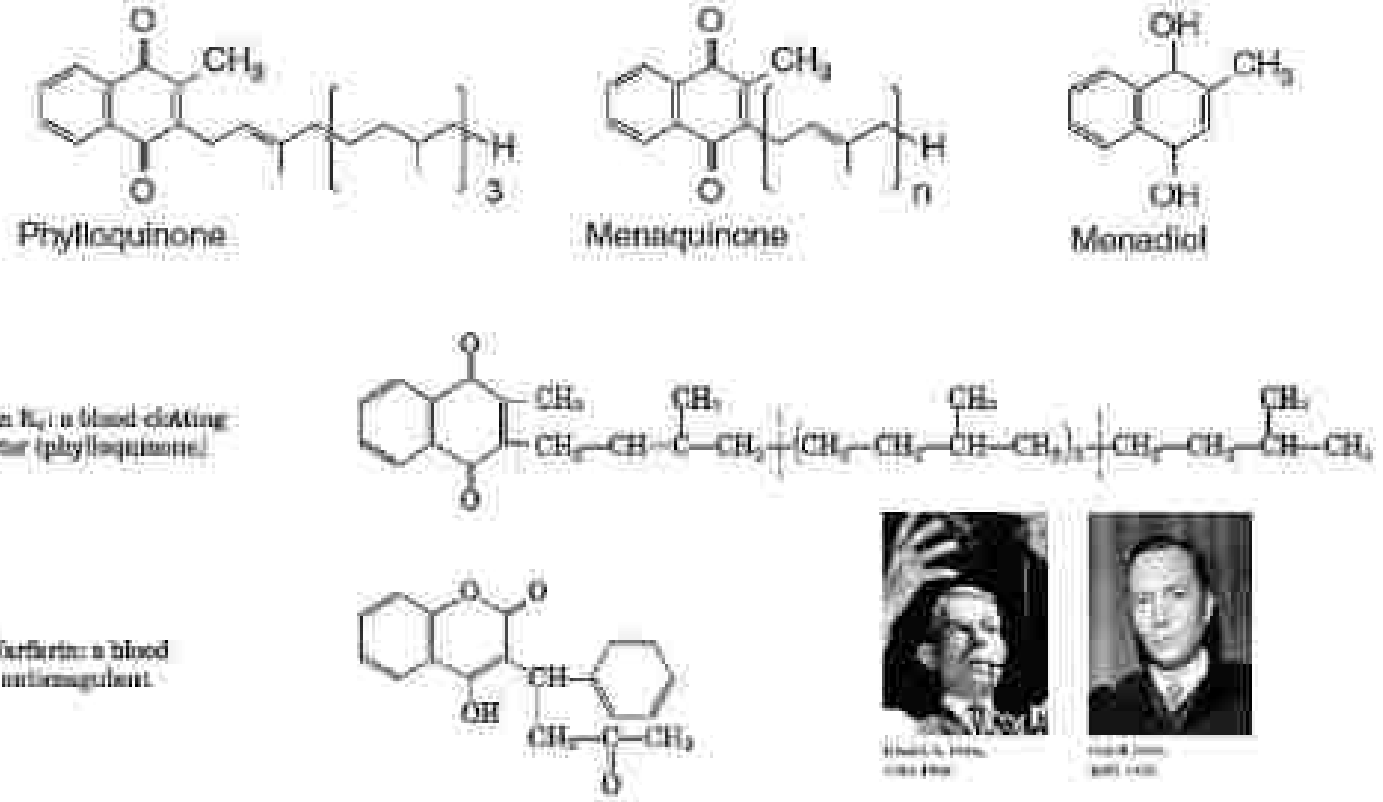
جنس فاکتور III از لیپوپروتئین بوده و به‌عنوان فسفولیپید بافتی در تست انعقادی PT مورد استفاده قرار می‌گیرد، دربرابر فاکتور III یا TF، به غشای فعال شده پلاکت‌ها، فسفولیپید پلاکتی یا PF3 گفته می‌شود که در تست PTT از آن تحت عنوان سفالین استفاده می‌شود. حالت سنتتیک TF نیز در انجام تست PT به‌عنوان منبع فسفولیپید بافتی مورد استفاده قرار می‌گیرد که به آن ترومبوپلاستین گفته می‌شود. فاکتور III بعد از سنتز در سیتوزول به غشاء منتقل شده و با فسفولیپیدهای غشایی ترکیب می‌شود. این فاکتور در اندوتلیوم عروق (مهم‌ترین سلول)، سلول‌های ساب اندوتلیوم، پلاکت فعال، مونوسیت/ ماکروفاژ فعال، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپی‌درم، سلول‌های عصبی نوروگلیا، سلول‌های عضله صاف، کراتینوسیت، آستروسیت، میوکاردیوم، در بافت‌هایی مثل مغز، مایع آمینون، جفت، ریه، طحال، کلیه و در اطراف عروق، کپسول‌های احاطه کننده ارگان‌ها و سطوح اپیتلیالی و به‌طور کلی در اکثر سلول‌ها به جز سلول‌های اریتروسیتی حضور دارد. بافت مغز انسان بیشترین و بهترین مقدار TF را داشته و از این رو بهترین ISI را برای تست PT/INR دارد (حدود ۱).



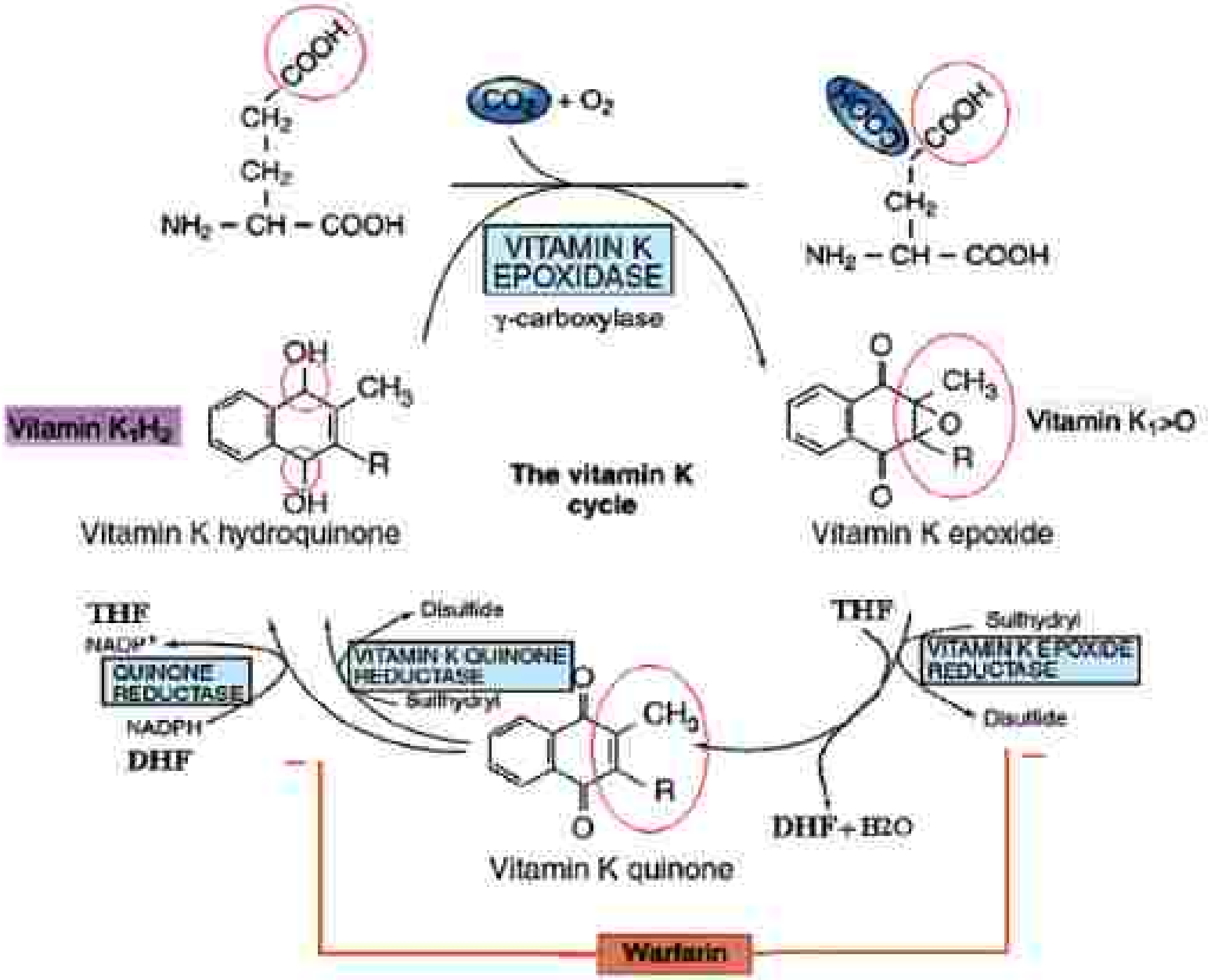
شکل ۴۶-۵۳: ساختار فاکتور III و اتصال آن به فاکتورهای VIIa و Xa

ویتامین K

نقش ویتامین K در انعقاد اولین بار توسط دو دانشمند به‌نام‌های ادوارد دوبزی و هنریک دام و به صورت مستقل از یکدیگر مطرح گردید. Vit-K جزء ویتامین‌های محلول در چربی است که برای جذب خود از روده به وجود صفرا و نمک‌های صفراوی نیاز دارد. نیاز روزانه بدن به Vit-K حدود 0/1-0/5μg/Kg می‌باشد. Vit-K به سه صورت یافت می‌شود: Vit-K1 (فیلوکینون phyllloquinone) که در مواد غذایی مثل روغن نباتی و سبزیجات یافت شده و فرم اصلی ویتامین در رژیم γ-کربوکسیلاسیون محسوب می‌شود. Vit-K2 (مناکینون menaquinone) که توسط باکتری‌های فلور نرمال روده مثل E-Coli سنتز می‌شود و Vit-K3 (منادیول Menadiol) که به صورت سنتیک و مصنوعی و برای مصارف دارویی تهیه می‌شود. Vit-K2 برخلاف K1 ضمناً در گوشت و جگر حیوانات یافت می‌شود ولی در بدن قابل تبدیل به فرم K1 می‌باشد. لازم به ذکر است، مصرف غذاهای غنی از Vit-K مثل سبزیجات نیز می‌تواند تا حدودی باعث مقاومت به مصرف دارویی وارفارین شود.



شکل (۴۰-۵۲) بالا: سه فرم اصلی ویتامین K و پایین: ساختار شیمیایی ویتامین K1 و وارفارین [۲۴]



شکل ۱۱-۵۳. گاماکربوکسیلاسیون اسید گلوتامیک‌های دومین Gla در فاکتورهای گروه پروترومبین. در این چرخه داروی وارفارین با مهار دو آنزیم VKOR و VKQR و احتمالی Vit-K1 در فرم اپوکسایدی، چرخه ویتامین K را مهار نموده و اجازه تبدیل مجدد اپوکسایدی به فرم فعال هیدروکینون را نمی‌دهد. لذا تنها پادزهر وارفارین، تزریق دوز دارویی Vit-K می‌باشد.

کمبود یا اختلال در چرخه ویتامین K در موارد زیر مشاهده می‌شود:

۱-در نوزادان (به‌ویژه نوزادان نارس) : زیرا ویتامین K مادری از جفت عبور نکرده و روده نوزاد نیز فاقد باکتری‌های سازنده Vit-K است، از طرفی دیگر، در شیر مادر نیز مقدار کمی ویتامین K وجود دارد. تغذیه با شیر بز نیز در مقایسه با شیر گاو و شیر مادر ویتامین K کمتری دارد.

۲-در اختلالات کبدی به دلیل کاهش متابولیسم آن (تبدیل K2 و K3 به K1)

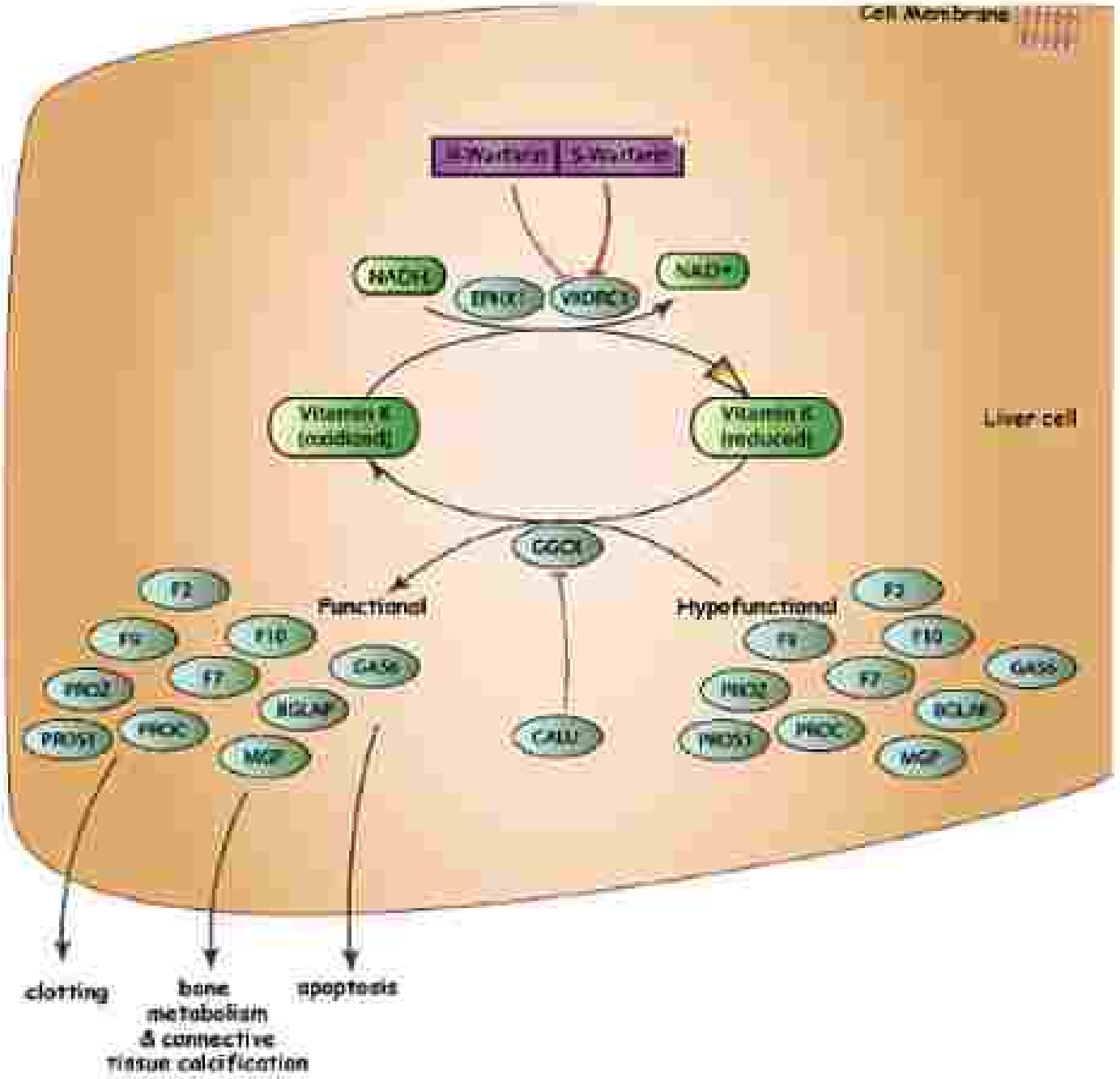
۳-در عارضه استئاتوره (سوءجذب چربی‌ها)، در انسداد صفراوی، کاهش تولید صفرا و دیگر اختلالات روده ای که جذب ویتامین‌های محلول در چربی کاهش دارند.

۴- مصرف داروهای وارفارینی و کومادینی یا مسمومیت با آنها

۵- مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف که باعث نابودی فلور نرمال سازنده ویتامین K در روده می‌شود.

۶- فقر غذایی و سوءجذب‌های عمومی (مثل سلیاک)

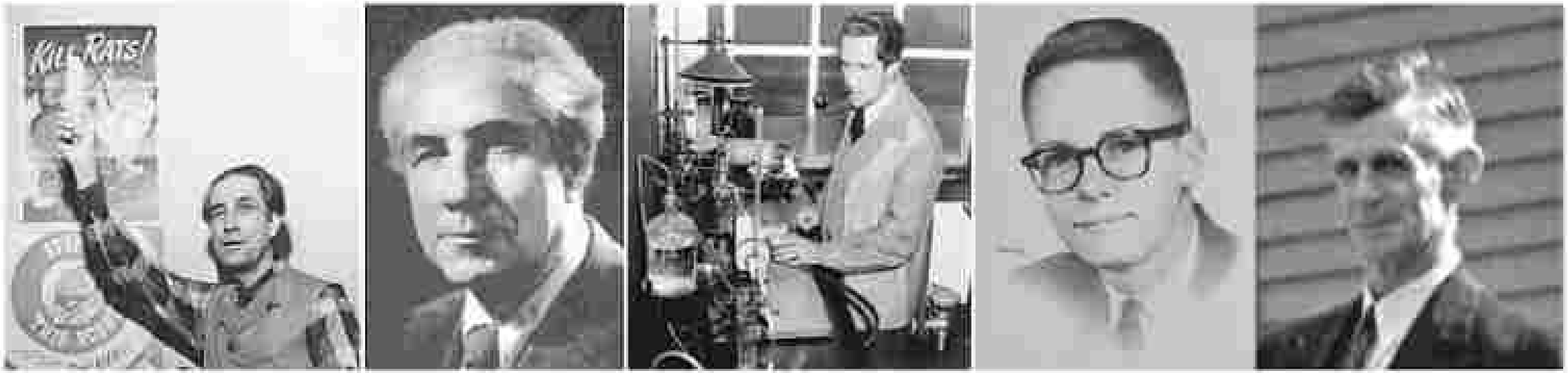
شکل ۲۲-۵۳: مواد غذایی غنی از Vit-K



شکل ۱۲-۵۳ پروتئین‌هایی که تحت گاما کربوکسیلاسیون کبدی به فرم بالغ خود تکامل یافته و در مسیرهای مختلف انعقاد، آپوپتوز و متابولیسم کلسیم مورد استفاده قرار می‌گیرند.

شکل ۱۵-۵۳: وارفارین مشتق دارویی از گیاه White street Clover است که علاوه‌بر آن در دانه گیاه کومارو (دیپتریکس اودوراتا) و گالیوم اوردوراتوم نیز وجود دارد. از تخمیر ساقه و برگ‌های یونجه، ذرت و سویا توسط لاکتوباسیل‌ها، سیلاژ تهیه می‌شود که فاسد شدن آن و رشد قارچ در سیلاژهای فرسوده باعث تولید دی‌کومارول در آن می‌شود که گله گاو با خوردن آن دچار خونریزی از مناطق جراحت دیده شده و حتی تلف می‌شدند[۶]

در دهه ۱۹۲۰ مشخص شد که برخی از گاوهایی که بعد از اخته شدن یا درآوردن شاخشان[5] توسط دامداران و با سیلاژ یونجه Sweet Clover[6] تغذیه می‌شدند، در اثر خونریزی شدید از محل‌های جراحت، تلف می‌شدند. در سال ۱۹۲۱ دامپزشکی به نام فرانک شوفیلد ارتباط خونریزی با مصرف یونجه مذکور را شناسایی و گزارش نمود که فقط تغذیه از یونجه‌های فاسد یا پوسیده باعث عوارض خونریزی دهنده فوق می‌شدند. در سال ۱۹۳۳ محققی به نام کارل پُل لینک در دانشگاه ویسکانزین، اثر ضد انعقادی یونجه فاسد را شناسایی نمود و سپس دو نفر از دانشجویان وی به نام‌های هارولد کمپبل و مارک استامن توانستند طی ۵ سال یک عصاره سفید رنگ و کریستاله با خاصیت ضدانعقادی را از یونجه‌های تخمیر شده تخلیص کنند. در ادامه استامن و همکار وی، کارلز هوبتر[7] ماهیت ماده مورد نظر را ۴-هیدروکسی کومارین تعیین نموده و آن را دی‌کومارول نام‌گذاری کردند. دی‌کومارول یک مایکوتوکسین مشتق از ۴ هیدروکسی کومارین بود که قبل از یونجه‌های فرسوده، در گیاهی به نام Cumeru (نوعی Tanka bean)[8] شناسایی شده بود. از این رو محققین دانشگاه ویسکانزین به آن نام دی‌کومارول نهاده بودند که بعدها به آن و گیاهان حاوی آن، کومارین گفته شد. سپس داروی مشتق از آن را کومادین و در



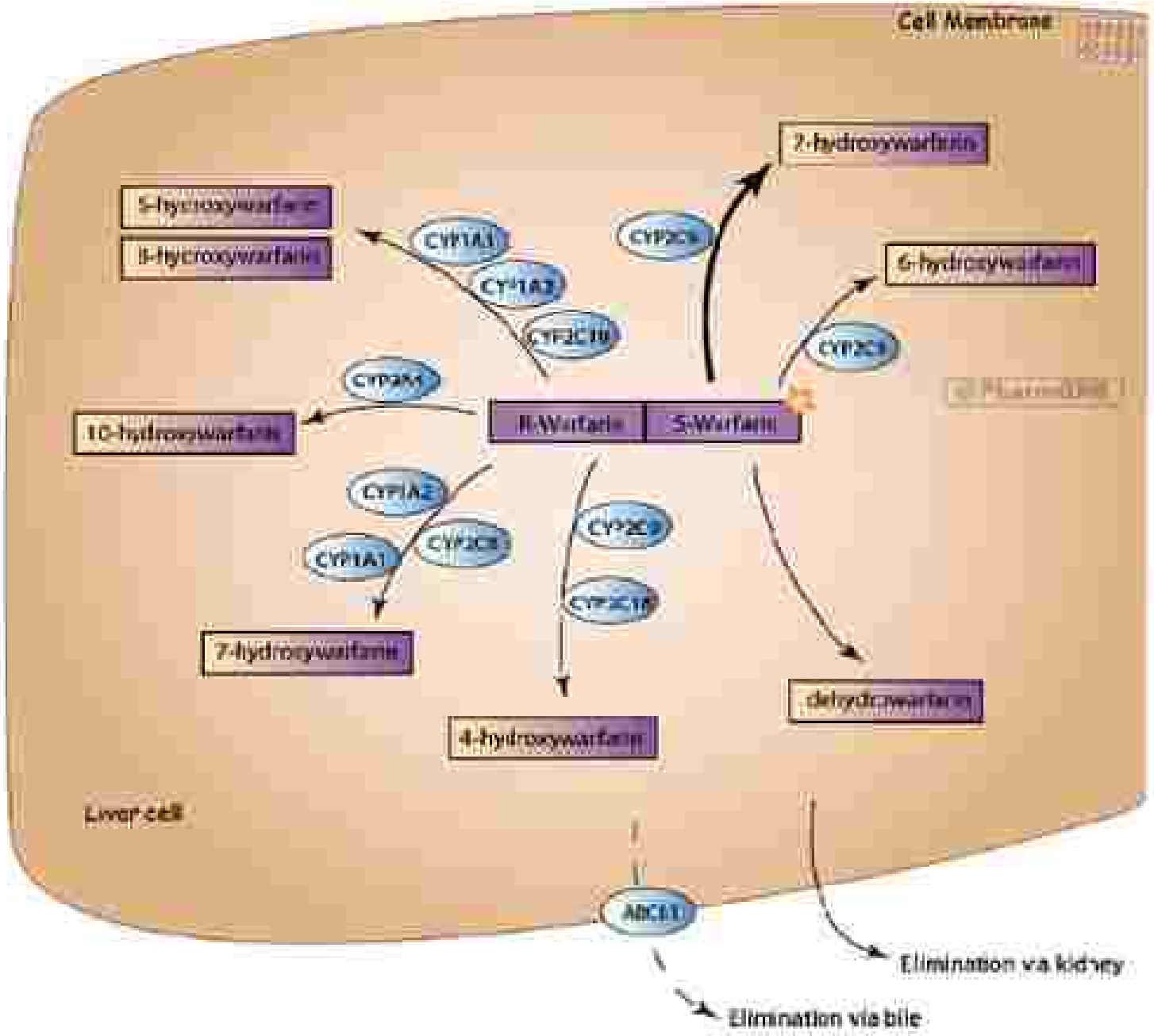
شکل ۱۶-۵۳ از راست به چپ: چارلز هوبتر، مارک استامن و کارل پل لینک (کاشف اصلی مرگ موش و داروی وارفارین) [۶].

وارفارین:

کلمه وارفارین از مخفف موسسه تحقیقاتی فارغ التحصیلان دانشگاه ویسکانسین که بر روی کومارین کار می‌کردند گرفته شده است ولی به نام‌های کومارین، ژانتوفن، ماروان، لاوارین، وارفانت و کومادین[1] نیز شناخته می‌شود (Wisconsin Alumni Research Foundation on coumarin). این دارو از ساقه‌های فاسد و فرسوده نوعی یونجه شیرین[2] مشتق می‌شود که در مراتع و کوهستان‌ها رشد می‌کند. گاهی نیز گله‌های گاو و گوسفند از این نوع یونجه خورده و دچار عوارض خونریزی دهنده و سقط می‌شدند. این گیاه دارای یک ماده سمی به‌نام بیس هیدروکسی کومارین[3] هم است که در سال‌های گذشته از دوزهای بالای آن به عنوان مرگ موش و رودنتی‌ساید[4] استفاده می‌شد. دارو به صورت ۱۰۰٪ در روده جذب شده و ۹۹٪ آن بعد از جذب به آلبومین وصل شده و ۱٪ مابقی با جلوگیری از احیاء ویتامین K، باعث احتباس آن در فرم اکسید و غیرفعال می‌شود. نیمه عمر پلاسمایی دارو حدود ۳۶ ساعت است که از این جهت اثرات آن تا ۳-۴ روز در خون باقی می‌ماند. دوز اولیه و فارماکولوژیک آن 0.75mg/kg است که بعد از آن توسط تست PT/INR کنترل و پایش می‌شود. از معایب این دارو توانایی عبور آن از جفت و تراتوژن بودن آن است که از این جهت در مادران حامله منع تجویز دارد.

شکل ۱۴-۵۳: قرص‌های خوراکی وارفارین (کومادین) که بسته به دوز، در رنگ‌های مختلف ساخته می‌شوند.

و درمان بیماری‌های ترومبوتیک در DVT، ترومبوآمبولی، دریچه مصنوعی قلب، سندرم APS، فیبریلاسیون شریان‌ها و ندرتاً MI استفاده می‌شود. البته داروهای سریع‌الاثر (مثل acenocoumarol)[5] و طویل‌الاثر (مثل phenprocoumo)[6] نیز مشتقات دارویی کومارین هستند که امروزه در اندیکاسیون‌های های مشابه مورد استفاده قرار می‌گیرند. از داروهای مهارکننده مستقیم فاکتور X که در کنار وارفارین استفاده شده و نیازی به مونیتورینگ ندارند، می‌توان به dabigatran[7]، rivaroxaban، Apixaban، Betrixaban، Derexaban و Edoxaban اشاره نمود. در درمان بیماران با وارفارین، ابتدا دارو با دوز ۱۰mg شروع و بعد از رسیدن INR به مقادیر ۳/۵-۲/۵ و پایدار ماندن آن، دوز نگهدارنده آن بسته به INR هدف تجویز می‌شود.



شکل ۴۸-۵۳ مسیر کاتابولیسم کبدی ایزومرهای R و S وارفارین

جدول ۱۴-۵۴: مشخصات فنوتیپی و میزان حساسیت ژنوتیپ‌های مختلف آنزیم‌های دخیل در متابولیسم وارفارین (N=896 نفر) [۷].

Warfarin sensitivity	GENOTYPE COMBINATION VKORC1	CYP2C9	Prevalence	Clinical considerations
Very high	A/A G/A	*1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3 *3/*3	23 (2.6%)	Dose decrease and frequent INR monitoring
High	A/A G/A G/G	*1/*2 *2/*3 *3/*3	36 (4.0%)	Dose decrease and frequent INR monitoring
Moderate	A/A G/A G/G	*1/*1 *1/*2, *1/*3, *2/*2 *2/*3	238 (26.6%)	Dose decrease and frequent INR monitoring
Mild	G/G	*1/*2, *1/*3, *2/*2	109 (12.2%)	Frequent INR monitoring
Normal	G/A	*1/*1	262 (29.2%)	Likely to experience normal response to warfarin
Less than normal	G/G	*1/*1	228 (25.4%)	Dose increase may be required to maintain optimal INR
Total			896 (100%)	

جدول ۱۵-۵۴: فراوانی آلل‌های مختلف آنزیم‌های دخیل در متابولیسم وارفارین در نژادهای مختلف انسانی و ارتباط آنها با دوز درمانی وارفارین (N=1013 نفر) [۷].

SNP alleles	Gene location	White (N = 838), %	African American (N = 153), %	Other or mixed race (N = 24), %	Univariate association with dose in total population, per allele (95% CI), %
CYP2C9*2 (C>T)	3608C>T	13.1	5.2	10.4	−17 (−22 to −12)
CYP2C9*3 (A>C)	42814A>C	6.0	1.0	4.2	−30 (−36 to −24)
CYP2C9*5 (C>G)	42619C>G	0	1.3	2.1	NS
VKORC1 861 C>A	−4451C>A	36.0	8.8	26.1	14 (9 to 18)
VKORC1 3673 G>A	−1639G>A	36.6	9.5	41.7	−29 (−31 to 26)
VKORC1 5808 T>G	IVS1+3247T>G	25.1	4.6	8.3	25 (29 to 22)
VKORC1 6853 G>C	IVS2+124G>C	37.2	24.3	41.7	−37 (−42 to −32)
VKORC1 9041 G>A	626G>A	39.4	51.3	41.7	18 (14 to 23)
F2 Thr165Met	494C>T	13.3	1.3	30.0	−5.8 (−11.4 to 0.0)

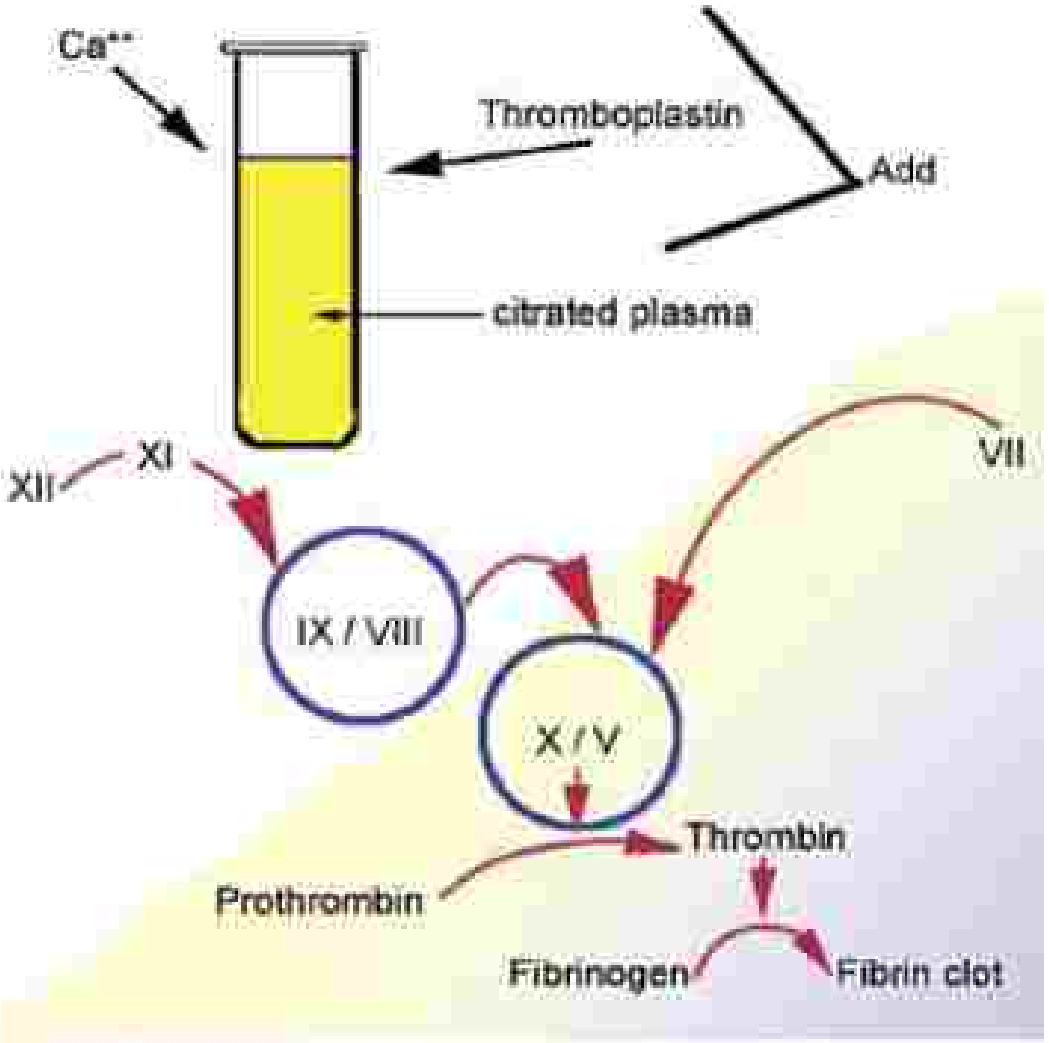
CI، محدوده اطمینان، NS، غیرمعنی‌دار، SNP، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی

آزمایشات مربوط به سیستم انعقاد ثانویه شامل تست‌های زیر می‌باشد:

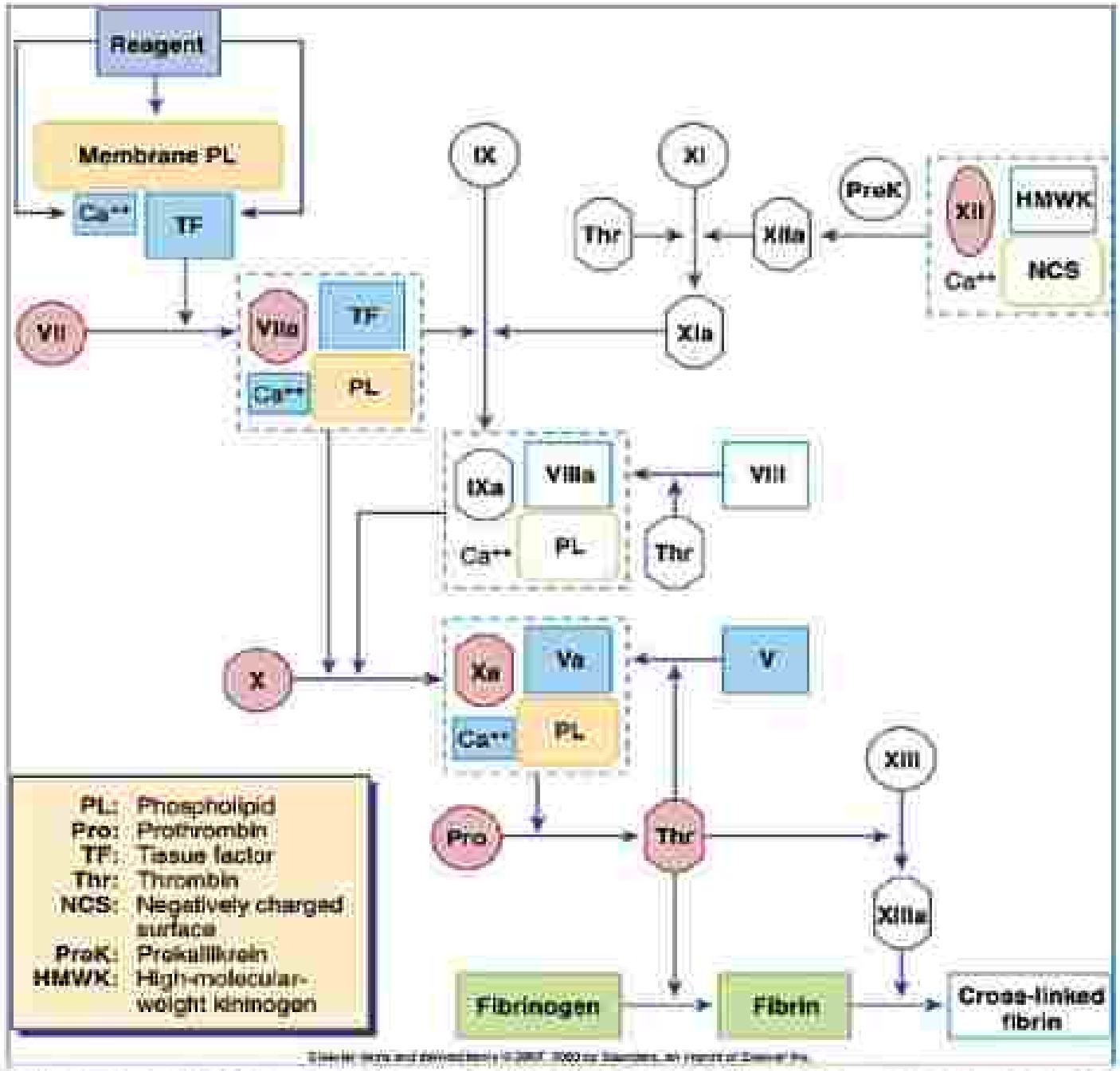
- تست PT و انواع آن (PT و mixed+PT)
- تست PTT و انواع آن
- تست CT و انواع آن
- تست‌های فاکتور اسی
- تست TT و انواع آن مثل تست ST، RVVT و RT
- تست سنجش تیتر آنتی‌بادی‌های مهارگر ضد فاکتورهای انعقادی (بتسدا)

۱) تست زمان پروترومبین (PT):

این تست برای ارزیابی مسیر خارجی و مشترک انعقاد ثانویه و بر روی پلاسمای بیمار انجام می‌گیرد که پلاسمای بیمار از رقت ۹ به ۱ خون تام با سیترات سدیم ۳/۲٪ تهیه می‌شود. پلاسمای مورد آزمایش می‌بایست عاری از پلاکت باشد، ازاین رو در دور بالای rpm ۱۵۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. هنگام تهیه پلاسما با سیترات، کلسیم یا فاکتور IV انعقادی آن حذف می‌شود، از طرفی دیگر فاکتور III انعقادی نیز در پلاسما حضور ندارد و فاکتورهای گروه پروترومبین مثل VII، X، II و IX هم که برای عملکرد خود نیاز به حضور فسفولیپید پلاکتی دارند، به دلیل سانتریفوژ دور بالا و جدا کردن پلاکت‌ها از پلاسما، امکان فعال شدن آنها سلب می‌شود، لذا برای ارزیابی مسیر انعقاد خارجی می‌بایست به آن فاکتور III، کلسیم و فسفولیپید پلاکتی افزوده شود که کلسیم آن به صورت کلرور کلسیم، فاکتور III آن به صورت عصاره بافت مغز و فسفولیپید پلاکتی آن (PF3) به صورت محلول سفالین تأمین می‌شود. سفالین در واقع نوعی محلول PRP فعال شده توسط آگونیست‌های پلاکتی است که پلاکت‌های آن بلافاصله بعد از فعال شدن، توسط فرمالین تثبیت شده و سپس توسط روش‌های فیزیکوشیمیایی تکه‌تکه شده و به صورت لیوفیلیزه در می‌آید. به مخلوط کلرور کلسیم + سفالین + عصاره بافت مغز که دارای هر دو نوع فسفولیپید بافتی و پلاکتی است، محلول PT یا ترومبوپلاستین کامل گفته می‌شود. در مقابل به سفالین (فسفولیپید پلاکتی) بدون عصاره مغز که فاقد فسفولیپید بافتی است، محلول PTT یا ترومبوپلاستین پارشیال (ناقص) گفته می‌شود که اگر به آن فعال‌کننده‌های انعقادی مثل کائولین، سیلیت و اسید الاژیک اضافه شود، به آن محلول aPTT و اگر سم مار راسل اضافه شود، به آن محلول ST یا RVVT گفته می‌شود. در این تست‌ها به دلیل تأمین فسفولیپید پلاکتی از منبع سفالین، دیگر نیازی به فسفولیپید پلاکت‌های خود بیمار نبوده و لذا برای حذف آنها از سانتریفوژ High Spm استفاده می‌شود تا شمارش بالا یا پایین پلاکت افراد مختلف باعث اختلاف یا تداخل در نتیجه تست‌ها نشود.



شکل ۶۵-۵۴: محلول لیوفیلیزه شده ترمبوپلاستین برای انجام تست PT

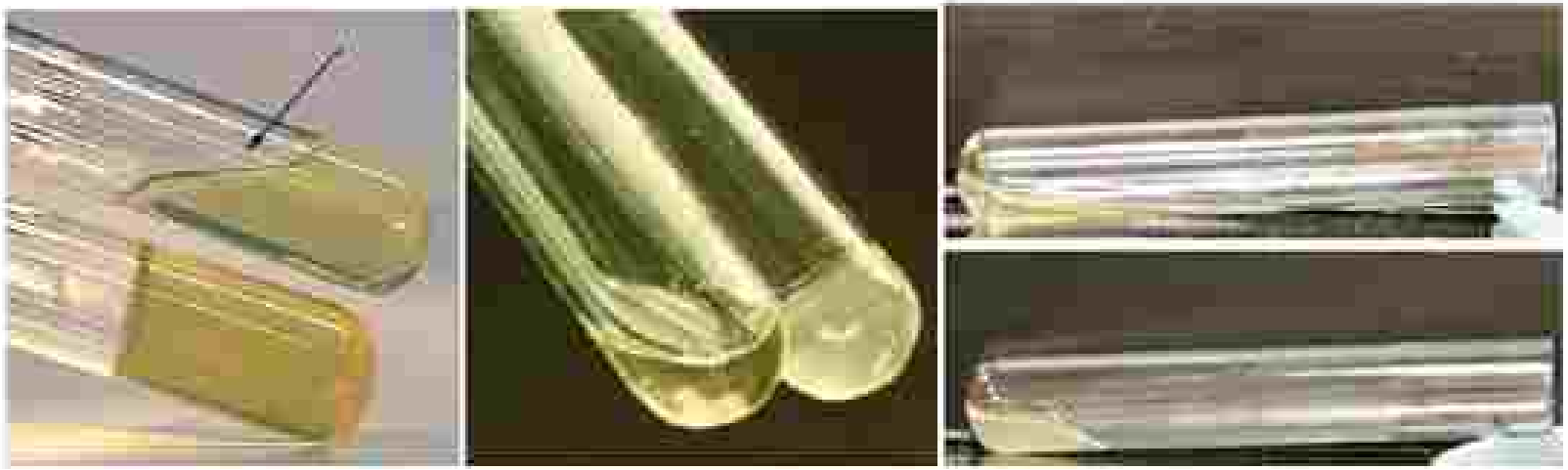


شکل ۶۶-۴: فلوچارت انجام تست PT. نوع معلول‌ها و جایگاه اثر هر کدام از آنها در مسیر انعقاد خارجی و مشترک نشان داده شده است.[۱۱]

روش‌های بررسی لخته:

۱- روش چشمی (یا دستی)

در این روش، شخص انجام دهنده آزمایش شخصاً و به صورت دستی تست را در بن ماری ۳۷ درجه انجام داده و تشکیل اولین لخته فیبرینی را به‌عنوان اتمام زمان PT یا PTT گزارش می‌کند. لازم به ذکر است که در برخی از بیماران کبدی، در موارد هیپوفیبرینوژنمی و بیمارانی که دوز بالایی از سرم یا محلول‌های کلوئیدی دریافت می‌کنند، تشکیل لخته فیبرینی کامل نبوده و لخته به صورت سفیده تخم مرغ خام، فقط غلیظ شده و تا تشکیل لخته سفت مدت زمان بیشتری را سپری می‌کند که البته زمان اتمام PT تشکیل حالت سفیده مانند خواهد بود.



شکل ۶۷-۵۴: تشکیل لخته فیبرینی قابل مشاهده در تست PT یا PTT که نسبت به پلاسمای غیرمنعقد دارای قوام و کدورت قابل توجهی می‌باشد.

۲- روش نیمه اتوماتیک (فیبرومتر)

در این روش، دو الکترود مثبت و منفی وجود دارند که یکی متحرک و دیگری ثابت می‌باشد. الکترود متحرک هر ثانیه یک‌بار وارد محلول شده و از آن خارج می‌شود و بدین ترتیب باعث ایجاد یک جریان الکتریکی متناوب در دو سر الکترودها می‌شود. تشکیل لخته یا رسوب فیبرین روی الکترود و کاهش جریان الکتریکی همراه خواهد بود که در این لحظه جریان الکتریکی قطع و زمان PT ثبت می‌شود. این روش به دلیل رسوب تدریجی فیبرین بر روی الکترود و کاهش تدریجی جریان الکتریکی می‌تواند کینتیک واکنش را نیز بررسی کند.

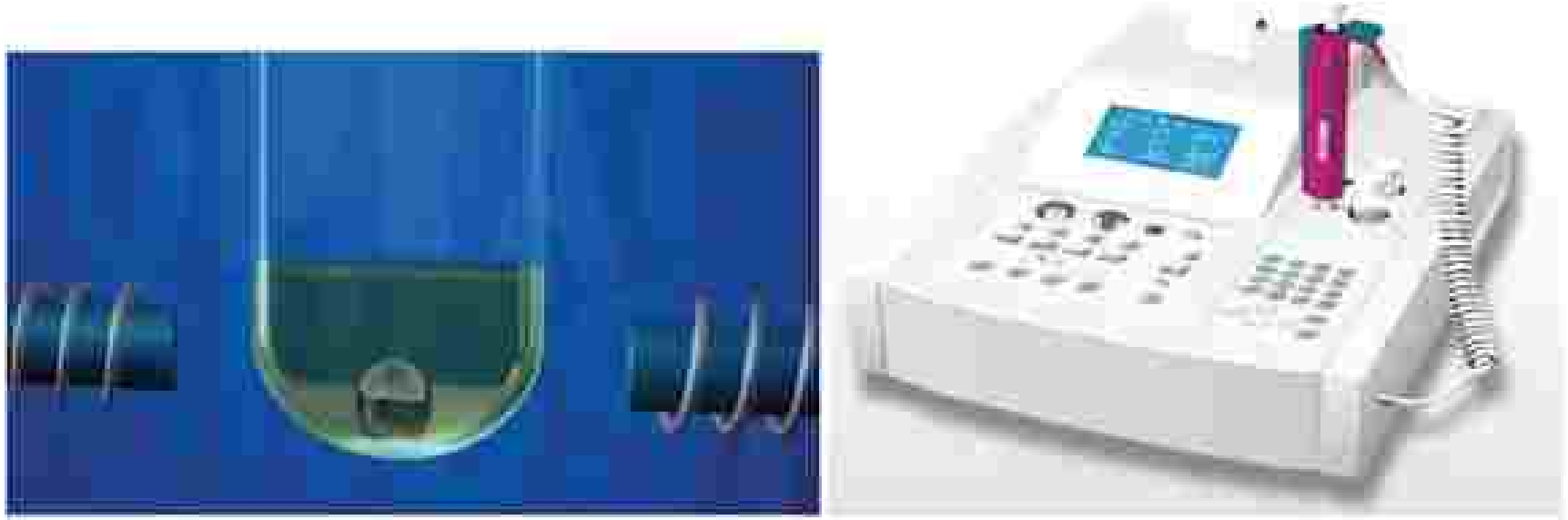
۳- روش اتوماتیک یا کوآگولومتر

الف) روش اوپتیک: در این روش تشکیل لخته در داخل کوت پلاستیکی و همانند فوتومتر یا اسپکتروفوتومتر در مقابل نور مرئی تنگستن انجام می‌گیرد. در این روش با ایجاد لخته و کدر شدن PPP میزان نور خروجی از کوت کاهش یافته و با تغییر OD نور خروجی، زمان تست قطع و کینتیک واکنش بررسی می‌شود. البته مقادیر بالای CRP و VLDL قادرند در حضور کلسیم ایجاد ذرات رسوبی کدر نموده و باعث نمودار دی‌فازیک تست اوپتیک شوند.

ب) روش ساچمه فلزی: در این روش، ساچمه فلزی در داخل یک کوت پلاستیکی مستقر در میدان مغناطیسی، مدام در حال حرکت متناوب به چپ و راست است که تشکیل لخته باعث توقف ساچمه و قطع زمان تست توسط سنسورهای مخصوص می‌شود.

امروزه دستگاه‌های کوآگولومتر به صورت تک کاناله، ۴ کاناله، ۱۶ کاناله و یا اتوآنالایز طراحی، ساخته و به بازار وارد شده‌اند که شرکت‌هایی مثل Stago و Sysmex مدل‌های جدید و خوبی از آنها را وارد ایران نموده‌اند. در دستگاه‌های نیمه اتوماتیک استاگو، ابتدا ۵۰µl از ۴ پلاسمای مجهول بیماران را در کوت‌های پلاستیکی حاوی ساچمه ریخته و بعد از ۱۱۰ ثانیه به کمک یک پیپت الکترونیکی، به هر کوت ۱۰۰µl از محلول PT (ترومبوپلاستین) 37^{oC} اضافه می‌شود. پیپت توسط یک کابل الکترونیکی به تایمرهای دستگاه وصل بوده و با هر بار ریختن محلول به کوت، زمان کوت مربوطه استارت می‌خورد.

پیپت الکترونیکی به صورت مخزن ترومبوپلاستین هم بوده و مقدار محلول مورد نیاز حداقل ۳۲ تست را در خود ذخیره می‌کند. با لخته شدن پلاسما و توقف ساچمه، زمان تست متوقف می‌شود. ترتیب ریختن محلول را خود دستگاه در LCD مربوطه نشان داده و اتمام زمان ۱۱۰ ثانیه‌ای انکوباسیون را نیز دستگاه توسط بوق صوتی مشخص می‌سازد. قبل از آماده شدن دستگاه، تمامی محلول‌های PT و PTT و کانال‌هایی که کوت‌ها در آن قرار می‌گیرند، توسط المنت‌های برقی به دمای ۳۷^{oC} می‌رسند و تا قبل از آن، دستگاه به فرم Ready در نمی‌آید.



شکل ۶۸-۴ث: دستگاه‌های کوآگولومتر ساچمه‌ای که از توقف حرکت ساچمه در درون لخته فیبرینی پی به لخته شدن پلاسما می‌برند.

به‌جز دستگاه‌های نیمه اتوماتیک، اتوآنالایزرهای مختلف و چند پارامتری نیز وارد بازار شده اند که قادر به انجام تست‌های مختلف انعقادی، فاکتور اسی، تست‌های Mixed، تست‌های پروتئین C/S و غیره هستند. این دستگاه‌ها توانایی رقیق کردن و چک کردن مجدد نمونه را نیز داشته و به صورت اتوماتیک و طبق برنامه از قبل طراحی شده، نمونه‌های غیرطبیعی را با شرایط مختلف بررسی مجدد می‌کنند. همچنین دستگاه‌های Point Of Care مخصوص بیماران یا مطب پزشکان نیز طراحی و ساخته شده است که همانند دستگاه‌های گلوکومتر از خون تام تهیه شده یا لانست، برای انجام تست استفاده می‌کند.

شکل ۶۹-۵۴: کوآگولومترهای ۱۶ کاناله استاگو با پی‌پت برقی و تایمرهای جداگانه که علاوه‌بر ۴ کانال تست، ۱۶ کانال اسکوپاسیون نیز دارد.

شکل ۷۰-۵۴: کوآگولومترهای نیمه اتوماتیک از مدل‌های مختلف که به دو روش ساچمه‌ای و اوپتیکال تشکیل لخته فیبرینی را بررسی و اندازه‌گیری می‌کنند.

شکل ۷۱-۵۴: از راست به چپ: کوآگولومترهای اتوماتیک سیسمکس CA500، CA600 و CA1500

شکل ۷۳-۵۴: از راست به چپ، کوآگولومترهای اتوماتیک ac17000، استاگو STA-Compact و Grifols

شکل ۷۳-۵۴: دو نمونه از دستگاههای POC برای اندازه‌گیری PT و INR در بیماران تحت درمان با وارفارین که از تجزیه سوپسترا توسط ترومبین برای سنجش PT استفاده می‌کنند.

نتایج PT را به ۴ فرم گزارش می‌کنند:

۱- ثانیه (از زمان افزودن پلاسما تا زمان انعقاد آن)

۲- درصد فعالیت یا ACT

۳- R یا نسبت زمان پروترومبین بیمار به کنترل

۴- $INR=R^{ISI}$ که نوعی اصلاح محاسباتی و ریاضی PT می‌باشد.

فرم R: کاهش چند برابری فاکتورهای دخیل در مسیر انعقاد خارجی را به صورت نسبت پاسخ بیمار به پاسخ شاهد بیان می‌کند. به‌عنوان مثال، PT ۱۸ ثانیه بیمار در برابر کنترل ۱۱/۵ ثانیه شاهد، یعنی اینکه به عنوان مثال، مقدار فاکتور VII پلاسمای بیمار تا ۱/۵ برابر نسبت به پلاسمای شاهد کمتر یا رقیق‌تر شده است. منظور از INR همان مقدار R است ولی به شرطی که با ترومبوپلاستین مرجع با ISI=1 انجام می‌شد، به‌عبارتی دیگر، INR حالت شرطی R بوده ($INR=R^{ISI}$) و بسته به حساسیت یا ISI کیت می‌تواند متفاوت باشد. تست PT قادر است فاکتور VII زیر ۳۵٪، فاکتور II زیر ۱۰٪ و فاکتور I زیر mg/dl ۱۰۰ را به خوبی شناسایی کند که حساسیت تست PT در کیتی با ISI بالای ۱/۷ به کاهش فاکتورهای X و VII خوب ولی به کاهش فاکتورهای II و I خیلی محدود است. در موارد هتروزیگوت کمبود فاکتورها که مقدار پلاسمایی فاکتورها به ۶۵-۳۰٪ کاهش می یابند، مقدار PT ۳ تا ۱ ثانیه افزایش دارد ولی در موارد هموزیگوت این مقدار به میزان زیادی افزایش نشان می‌دهد.

شکل ۹-۴: محدوده نرمال نتایج تست‌های انعقادی در نوزادان پارس، رسیده و بالغین سالم

	Premature infant	*Term infant*	*Normal adult*
PT (s)	16–20	14–17	12–14
TT (s)	15–24	14–18	12–14
APTT (s)	50–65	40–50	30–40
Factor IX (%)	15–20	20–40	50–200
Factor VII (%)	20–60	35–70	50–200
Antithrombin (%)	25–35	45–75	80–120

همان‌طوری‌که اشاره شد، هر کدام از کارخانه‌های سازنده کیت‌های PT منابع گوناگون و نسبت‌های متفاوتی از ترکیبات جفت، مغز و ریه حیوانات مختلف را به‌کار می‌برند. لذا اختلاف نتیجه ۲ تست PT می‌تواند ناشی از ۱) مقادیر مختلف فاکتورهای پلاسما، ۲) دوز وارفارین مصرف شده، ۳) خطای آزمایشگاهی و یا ۳) نوع ترومبوپلاستین، نوع کارخانه و مقدار ISI آن محلول باشد. ISI ضریبی است که موئسسات معتبر بین‌المللی، تحت قوانین WHO به کیت‌های هر کارخانه و بعد از انجام آزمایشات مقایسه‌ای با محلول‌های استاندارد (عصاره مغز انسان) اعطاء می‌کنند تا بدین وسیله اختلاف بین کیت کارخانه و کیت استاندارد (ترومبوپلاستین مغز انسان) تعدیل شود. ISI هر کیت در هر Lot Number یا سری ساخت با سری ساخت قبلی متفاوت بوده و برای هر سری ساخت، یک ISI خاص ارزیابی و اعطاء می‌شود. امروزه بیشترین عصاره ترومبوپلاستین کیت‌های آزمایشگاهی از عصاره مغز خرگوش لیوفیلیزه شده با استون تهیه می‌شود. سازمان WHO برای هماهنگی و همسوسازی انواع مختلف جواب‌ها با محلول‌های مختلف، واحدی به‌نام INR را تعریف نمود تا نتیجه PT یک بیمار در آزمایشگاه‌های مختلف فقط به اختلالات پاتولوژیک بیمار بستگی داشته باشد و به منبع و نوع فاکتور بافتی وابسته نباشد. INR یا نسبت همسو شده بین المللی[1] برابر است با نسبت PT بیمار به PTکنترل به توان ISI (R^{ISI}).

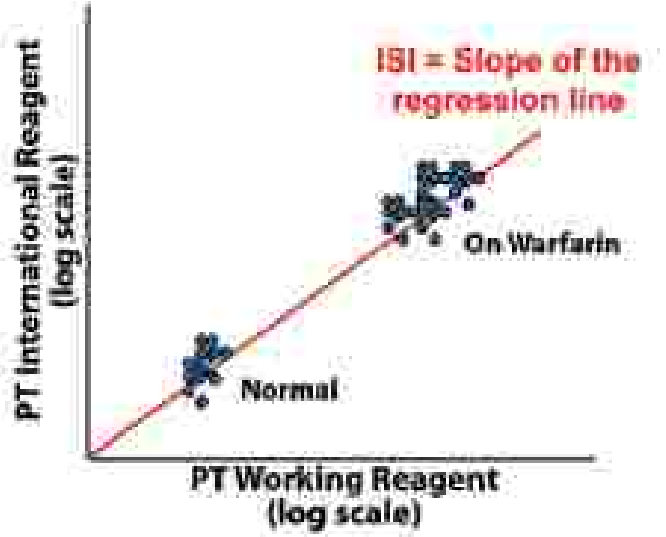
$$INR = \left(\frac{sample\ PT}{control\ PT}\right)^{ISI}$$

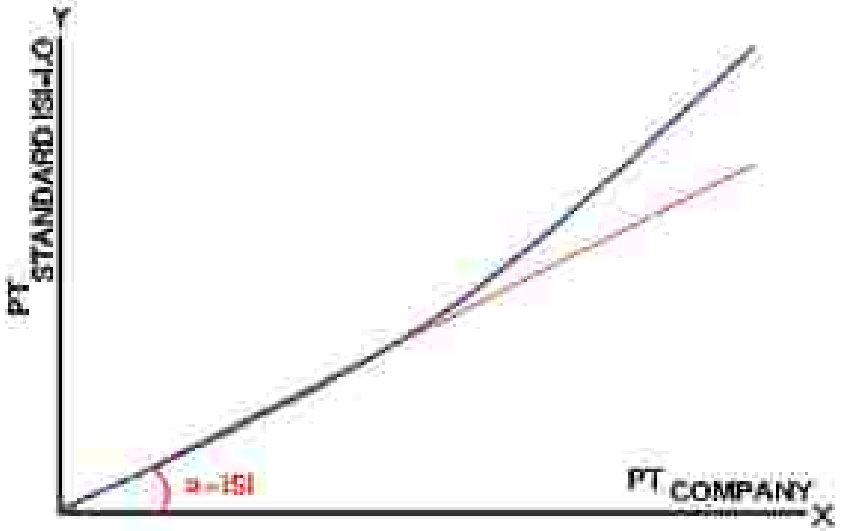
PTp از PT بیمار، PTst (MNPT)[2] از میانگین ژئومتریک PTهای ۲۰ پلاسمای کنترل و استاندارد هر آزمایشگاه و ISI از روی کیت کارخانه سازنده محلول PT حاصل می‌شود. در میانگین ژئومتریک به‌جای محاسبه مستقیم میانگین، ابتدا لگاریتم داده‌ها را محاسبه کرده و میانگین آنها را بدست می‌آورند و در نهایت Anti-log آن را به‌عنوان میانگین کل در نظر می‌گیرند که در این روش تداخلات خارجی به حداقل می‌رسد.

مثال: در آزمایشگاهی با PT استاندارد "۱۱ ثانیه و کیت ISI=1.2، PT بیماری "۱۴ ثانیه گزارش شده است. INR بیمار چقدر است؟

$$INR=(14/11)^{1.2}= 1.27^{1.2}= 1.33$$

در استاندارد جهانی، بهترین ISI برابر 1.1-0.9 و مربوط به عصاره مغز انسان است (مرجع) و هرچه ISI یک کیت به عدد 1 نزدیکتر باشد نشانگر (1) همبستگی نتایج کیت مذکور با کیت استاندارد (WHO و ۲) حساسیت بالای تست PT به حداقل تغییرات غلظت فاکتور VII، X و II خواهد بود و لذا نتایج کیت‌های با ISI پایین، همواره بالاتر از کیت‌های با ISI بالا می‌باشند. شرکت‌های مختلف، معرف خود را با این استاندارد مرجع کالیبره کرده و ISI مرجع استاندارد خود را از مراجع معتبر دریافت می‌کنند. در روش اعطاء ISI، از پلاسمای افراد مختلف تحت درمان با دوزهای متفاوت وارفارین که هرکدام مقادیر متفاوت PT ولی INR ثابت دارند، استفاده می‌شود (۶۰ نمونه وارفارینه و ۲۰ نمونه نرمال). لذا جواب INR معمولاً مخصوص افراد تحت درمان با وارفارین بوده و برای افراد معمولی که وارفارین دریافت نکرده و یک تست غربالگری انعقادی انجام می‌دهند، گزارش ثانیه و درصد فعالیت ACT/کفایت می‌کند. پس بسته به دوز وارفارین مصرفی، نتایج مختلف PT حاصل می‌شود. تست PT هرکدام از پلاسماهای فوق را یک بار با معرف استاندارد (ISI=1) و یک بار هم با معرف شرکت (ISI=?) انجام می‌دهند. در نهایت برای هر پلاسما (حدود ۸ نمونه)، ۲ مختصات با پاسخ بر اساس محلول استاندارد و محلول شرکت (X=SI و Y=company) حاصل می‌شود که لگاریتم آنها را در محور مختصات رسم نموده و شیب خط مماس بر آن را بدست می‌آورند که حاصل‌ضرب ISI مرجع در شیب حاصل از نمودار، برابر با ISI آن شرکت یا کیت خواهد بود. هدف از محاسبه شیب (Slope)، تبدیل نمودار منحنی به خطی است. در تست PT ارتباط بین کمبود یک فاکتور انعقادی و افزایش زمان PT خطی نبوده و در کمبود شدید فاکتورهای مسیر خارجی، نتایج PT به صورت تصاعدی افزایش می‌یابد. این امر باعث تشکیل نمودارهای غیرخطی و منحنی شکلی می‌شود که برخلاف نمودارهای خطی قابلیت نرمال‌سازی را ندارند. بدین جهت از شیب خط مماس بر آنها به‌عنوان ضریب تعدیل ISI استفاده می‌شود. البته هرچه مقدار دوز وارفارین، مقدار INR و مقدار ISI بالاتر باشد، CV٪ حاصل از تکرار آزمایشات نیز بیشتر می‌شود. به‌عنوان مثال، CV در INR=2.8 حدود ۸٪ و در INR=4.3 حدود ۱۲٪ می‌باشد.





شکل ۲۲-۵۴: محور X لگاریتم نتایج مربوط به کیت شرکت و محور Y لگاریتم نتایج مربوط به استاندارد (ISI=1) است که همواره به دلیل حساسیت PT، نتایج مختصر بیشتری را نشان می‌دهد. درنتیجه منحنی حاصل صعودی بوده و حاصل‌ضرب شیب آن در ISI مرجع، برابر مقدار ISI کیت خواهد بود.

جدول ۱۰-۵۴ مقایسه حساسیت ISIهای مختلف

sensitivity	ISI of
Low	1.8 to 2.4
Intermedite	1.4 to 1.8
High	1.0 to 1.4

همان‌طوری‌که اشاره شد، از آنجایی که در بررسی INR، عدد ISI از پلاسمای افراد تحت درمان با «وارفارین» محاسبه می‌شود، لذا بهتر است INR در کنترل مصرف داروی وارفارین و موارد مشابه استفاده شود نه در افراد سالمی که دارو مصرف نمی‌کنند. با توجه به موارد مذکور، INR تست غربالگری انعقادی محسوب نشده و فقط برای کنترل وارفارین کاربرد دارد. در ISI بالا حساسیت تست کم بوده و درنتیجه طی کمبود مختصر یا متوسط یک یا چند فاکتور انعقادی، مقدار PT چندان طولانی نمی‌شود (مگر کاهش فاحش و محسوس فاکتور). در این شرایط عدم افزایش کافی PT یا به توان رسیدن آن به ISI بالا جبران شده و INR افزایش می‌یابد. در نتیجه، پاسخ نهایی و INR آن با محلول ترومبوپلاستین استاندارد همخوانی پیدا کرده و یک نتیجه واحد گزارش می‌شود. برعکس، در ISI پایین حساسیت تست بالا بوده و حداقل کمبود فاکتورها باعث افزایش محسوس نتیجه PT می‌شود. لذا نیاز تست به ضریب کمکی ISI کمتر خواهد بود. بدین ترتیب با اعمال ISI در نتیجه PT یک بیمار، INR تست‌های مختلف PT از یک نمونه، یکسان و همسو می‌شوند و در نتیجه تغییرات PT یک بیمار وابسته به خود پلاسما می‌شود نه فاکتورهای بافتی موجود درمعرف.

به مثال زیر توجه فرمایید. دو آزمایشگاه با دو کیت مختلف وجود دارند که یکی از ISI خوب ۱/۵ و دیگری از ISI نامطلوب و غیرحساس ۲/۵ استفاده می‌کند، در نتیجه برای یک نمونه مشترک، آزمایشگاه اول به دلیل حساسیت بالا در شناسایی حداقل اختلال انعقادی، نتیجه ۲۲ ثانیه را گزارش می‌کند ولی آزمایشگاه دوم به دلیل حساسیت پایین، نتیجه ۱۷ ثانیه را به‌دست می‌آورد. این نتایج پزشک معالج را برای اقدامات درمانی دچار سردرگمی و اشتباه می‌کند. از این رو INR برای یکسان‌سازی نتایج مورد استفاده قرار گرفت. با اعمال فرمول INR نتایج هردو آزمایشگاه به صورت INR=2.4 خواهد بود و درنتیجه حساسیت پایین آزمایشگاه دوم با توان بالای ISI جبران می‌شود.

آزمایشگاه ۲	آزمایشگاه ۱
ISI=2.5	ISI=1.5
PTp=17"	PTp=22"
PTst=12"	PTst=12"
R=1.42	R=1.80
INR=2.4	INR=2.4

نمونه خون PT (خون سیتراته) را می‌توان تا ۶- ۲ ساعت در یخچال نگهداری نمود ولی برای نگهداری بیشتر خون می‌بایست خون را سانتریفوژ نموده از آن PPP (پلاسمای عاری از پلاکت) تهیه نمود. PPP را می‌توان تا ۸-۶ ساعت در یخچال و تا ماه‌ها در فریزر $-۲۰^{\circ C}$ نگهداری نمود. نمونه حتماً باید در ظرف پلاستیکی گرفته و نگهداری شود تا شیشه‌ای برای فعال کردن فاکتور XII وجود نداشته باشد. در تهیه PPP باید سعی شود تا پلاسما حداقل پلاکت را داشته باشد، از این رو می‌بایست خون را در دور بالا و تا ۱۵-۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمود (نقش حضور پلاکت در پلاسمای کهنه به مراتب بیشتر از پلاسمای تازه می‌باشد). نمونه هرگز نباید همولیز بالای ۲+ یا لخته داشته باشد، چراکه همولیز باعث افزایش کلسیم، TF3 و تاحدودی فسفولیپید شده و لخته نیز باعث مصرف فاکتورهای انعقادی می‌شود. حالت کدورت، زردی، همولیز، لیپمیک، آنمیک و پلی‌سایتمیک می‌بایست به‌عنوان توضیح یا کامنت، گزارش شوند چرا که هرکدام از آنها امکان تداخل در نتایج تست را دارند. زردی به‌خاطر دلالت بر بیماری کبدی با افزایش تست PT، آنمی باعث کاهش کاذب و پلی‌سایتمی باعث افزایش کاذب تست PT می‌شوند. سرما باعث فعال شدن نسبی فاکتورهای PK و VII شده و نتیجه PT را ۲-۱ ثانیه کاهش می‌دهد. در تستهای انعقادی، استفاده از اگزالات سدیم باعث ناپایداری شدید فاکتور V شده و همچنین اگزالات با کلسیم خون رسوب داده و باعث کدورت کاذب پلاسما در روش‌های دستگاهی اوپتیک می‌شود، از این رو می‌تواند باعث افزایش کاذب نتایج PT و PTT شود، لذا در تهیه نمونه خون برای تست‌های PT یا PTT از اگزالات استفاده نمی‌شود. ضدانعقاد EDTA نیز باعث غیرفعال کردن شدید فاکتورهای V و VIII شده و از طرف دیگر به‌دلیل قدرت بالای شیلاتاسیون کلسیم و طیف وسیع عملکرد آن قادر است در پلاسمای بیمار به صورت فعال باقی مانده و Ca اضافه شده حین انجام تست را نیز خنثی کرده و باعث افزایش کاذب PT یا PTT شود، لذا هرگز در تست‌های انعقادی EDTA مصرف نمی‌شود. در نمونه‌های بالاتر و پایین‌تر از ۲ml (بیش از ۳۰۰µl)، به دلیل بهم خوردن نسبت سیترات به خون، نتایج تست مختل می‌شوند. به‌طوری‌که در نمونه‌های بالاتر، افزایش کاذب و در نمونه‌های کمتر، کاهش کاذب

تست PT و PTT دیده می‌شود، از این‌رو بالاتر یا پایین‌تر بودن نمونه از خط استاندارد می‌بایست به صورت کامنت گزارش شوند.

هر چه نمونه خون یا پلاسما مدت زمان بیشتری را در شرایط غیراستاندارد مثل دمای بالا بماند، شرایط موجود۲ ظرفه عمل نموده و از یک ظرف طی آن، به دلیل ناپایداری، مقدار پلاسمایی فاکتورهای VIII و V افت کرده و باعث افزایش کاذب PT و PTT می‌شوند و از طرف دیگر، باعث فعال شدن تدریجی فاکتور XII و کاهش کاذب تست PTT و تخفیف مورد قبل می‌شود که امروزه استفاده از لوله‌های پلاستیکی باعث کاهش فرآیند دوم شده است، از این رو نگهداری طولانی مدت نمونه در شرایط غیر ایده‌آل باعث افزایش کاذب تست PTT و تا حدودی PT می‌شود.

شکل ۷۵-۵۴: نمونه‌ای از خون‌های مختلف اخذ شده برای تست PT/PTT. خون برخی از نمونه‌ها بالاتر یا پایین‌تر از خط استاندارد می‌باشد که در موارد ۴-۵mm بالا یا پایین خط استاندارد، درخواست نمونه‌گیری مجدد می‌شود. نمونه برخی بیماران نیز ضمولیز خفیف تا شدید دارند که موارد شدید رد شده و درخواست نمونه گیری مجدد می‌شود. کف آلود بودن نمونه دلالت بر به هم زدن بسیار شدید نمونه داشته و اغلب با ضمولیز همراه هستند. برخی نمونه‌ها نیز آلبیک یا پلی‌سایتمیک شدید بوده و با اختلالات اساسی همراه هستند. نمونه‌های لخته نیز به دلیل عدم به هم زدن نمونه خون، نمونه‌گیری طولانی مدت و یا فاقد سیترات بودن لوله دیده می‌شوند که رد شده و پذیرش نمی‌شوند.

عوامل موثر در افزایش نتیجه تست PT:

افزایش PT در:

- مصرف وارفارین، آسنوکومارول، فنپروکومون و دیگر کومارین‌های خوراکی که باعث کاهش سطح پلاسمایی فاکتورهای وابسته به Vit-K می‌شوند.
- تجویز دوز متوسط و بالای هپارین داخل عروقی (HMWH، LMWH و فونداپارینوکس) که با تحریک AT-III باعث تجزیه فاکتورهای II ، X و IX می‌شود.
- مصرف داروهای لیپرودین یا هیرودین، آرگاتروبان، بی‌والیرودین (آنژیوماکس) و اگزانتا (ریمالگاتران) و دیگر مهارگرهای مستقیم ترومبین
- مصرف داروی ریواروگزابان، دابیگاتران، آپیگزابان، بتریگزابان، ادوگزابان، درگزابان و دیگر مهارگرهای مستقیم فاکتور X
- کمبود غذایی Vit-K، بیماری‌های کبدی (با کاهش ?کربوکسیلاسیون فاکتورها و تولید PIVKA) و مصرف آنتی بیوتیک‌ها (با از بین بردن فلور نرمال گوارشی تولید کننده Vit-K) همگی باعث کمبود Vit-K می‌شوند که این امر با مکانیسم مشابه، باعث اختلال عملکرد فاکتورها، عدم توانایی آنها در اتصال به فسفولیپید پلاکتی و افزایش هردوی PT و PTT، به‌ویژه تست PT می‌شوند.
- سندرم آنتی فسفولیپید (APS) یا سندرم هوگز
- کمبود ارثی یا اکتسابی فاکتورهای مسیر خارجی و مشترک (VII، V، X، II و I) یا تشکیل اتوآنتی‌بادی ضد آنها

* کمبود فاکتورهای هموفیلی (مثل VIII و IX) و فاکتورهای تماسی (مثل XII و XI) باعث افزایش PT نمی‌شوند. در واقع، کمبود فاکتور XII و فاکتورهای سه‌گانه هموفیلی (XI،IX،VIII) باعث افزایش تست PTT شده و حساس‌ترین فاکتورهای مورد ارزیابی در تست PTT محسوب می‌شوند.

* کمبود فاکتور III به دلیل افزوده شدن دستی مقادیر بالایی از ترومبوپلاستین بافتی قابل ارزیابی در تست PT نبوده و مورد سنجش قرار نمی‌گیرد.

* به علت کاهش فاکتورهای XI، X، IX، II و VII در مصرف وارفارین، در دوز بالا و طولانی مدت وارفارین PTT نیز علاوه بر PT افزایش می‌یابد. البته PT به دلیل کوتاه بودن مسیر خارجی، درگیر بودن بیشتر فاکتورهای مسیرهای خارجی و مشترک و همچنین به دلیل کوتاه بودن نیمه عمر پلاسمایی فاکتور VII، از حساسیت بیشتری نسبت به وارفارین برخوردار می‌باشد ولی PTT به دلیل عدم درگیری فاکتورهای هموفیلی و تماسی، حساسیت کمتری نسبت به وارفارین دارد. در مقابل، هپارین عملکرد AT-III را تا ۲۰۰۰ برابر افزایش داده و باعث برش آنزیمی فاکتورهای XI<IX<X<II می‌شود (به ترتیب). لذا ترکیب هپارین و AT-III با برش و حذف ترومبین و فاکتور X شدیداً نتیجه تست PTT و تا حد متوسطی PT را افزایش می‌دهند. ترومبین جزء فاکتورهای مسیر مشترک بوده و نقص یا فقدان آن باعث افزایش زمان هر پنج تست PT، PTT، TT، RT و ST می‌شود.

- هپارین در دوز کم، فقط PPT را افزایش داده و PT نرمال بوده یا افزایش مختصری را نشان می‌دهد. (مثل PTT > 60"، PT=13-15")
- هپارین در دوز متوسط، PPT را شدیداً افزایش داده و PT را نیز تا ۲-۱/۵ برابر افزایش می‌دهد. (مثل PTT > 90"، PT>21")
- هپارین در دوز بالا، هردوی PPT و PT را کاملاً مختل کرده و زمان آنها را افزایش می‌دهد. (PTT > 120"، PT>120")

بسته به اسامی تجاری و ژنریک، به وارفارین، کومارین سدیم، پان‌وارفین، دی‌کومارول، وارفیلون، کوفارین، وارترین، ژانتوفن، ماروان، لاوارین، وارفانت، کومادین و ضد انعقاد خوراکی(OAT)[1] نیز گفته می‌شود. اثرات مصرف وارفارین بسته به نیمه عمر پلاسمایی فاکتورها در عرض ۵ – ۴ روز بعد از تجویز آن مشخص می‌شود. به‌طوری‌که فاکتور Pro-C در عرض ۳-۲ ساعت، فاکتور VII در عرض ۶-۳ ساعت، فاکتورهای VIII و HMWK در عرض ۱۲-۱۰ ساعت، فاکتورهای X و IX در عرض ۲۴ ساعت و فاکتور II (مهم‌ترین) در عرض ۹۶-۷۲ ساعت (۴-۳ روز) شروع به افت می‌کنند. لذا در بیمارانی که دوز بالا و ناگهانی وارفارین دریافت می‌کنند، دارو باعث افت سریع Pro-C و کاهش قدرت ضد انعقادی آن شده و در نتیجه باعث ترومبوز و نکروز پوستی (سندرم نکروز وارفارینی و سندرم انگشتان بنفش پا)، به‌ویژه در ۷- ۳ روز اول می‌شود.

جدول ۱۱-۵۴: نیمه عمر پلاسمایی فاکتورهای انعقادی و میزان حساسیت آنها به مصرف وارفارین

FACTORS	PLASMA t ½ (hrs)
Fibrinogen (I)	72-120
Prothrombin (II)	60-70
V	12-16
VII	3-6
VIII	8-12
IX	18-24
X	30-40

FACTORS	PLASMA t ½ (hrs)
XI	52
XII	60
Protein C	2-3
Protein S (total)	42
Tissue factor	--
Thrombomodulin	--
antithrombin	72

EPCR ،Pro-S و ترومبومودولین عوامل کوفاکتوری برای Pro-C فعال (APC) بوده و APC نیز باعث غیرفعال سازی و برش فاکتورهای V و VIII می‌شود. لذا فقر آن (ارثی یا اکتسابی به مصرف وارفارین) باعث کاهش اثرات ضدانعقادی و افزایش اثرات انعقادی یا ترومبوز می‌شود. در مصرف وارفارین نیز چون پروتئین C قبل از فاکتور VII کاهش می یابد لذا در دور بالا و ساعات اولیه درمان یا وجود بیماری زمینه فقر Pro-C، وارفارین به‌جای کاهش انعقاد، باعث کاهش اثرات ضدانعقادی و افزایش اثرات ترومبوز شده و نکروز پوستی ایجاد می‌کند. از این رو ابتدا (قبل وارفارین) درمان ضدانعقادی را با هپارین تزریقی آغاز نموده و بعد از افزایش زمان PTT به ۲/۵ برابر مقدار نرمال، درمان همزمان با وارفارین خوراکی را نیز آغاز می‌کنند. در ادامه و طی ۵-۳ روز متعاقب استفاده همزمان از هپارین و وارفارین، تزریق هپارین را متوقف و درمان با وارفارین را ادامه می‌دهند. برای این منظور و قبل از قطع تجویز هپارین، ابتدا INR بیمار را به ۳-۲ پایدار افزایش داده و سپس مصرف داخل وریدی هپارین به مصرف خوراکی وارفارین تبدیل شده و بیمار در صورت عدم نیاز به بستری شدن، از بیمارستان ترخیص شده و ادامه درمان خود را در منزل سپری می‌کند. طی این زمان، مقدار پلاسمایی بقیه فاکتورهای انعقادی مثل VII، X، IX و به‌خصوص II نیز کاهش یافته و عوارض نکروتیک و ریسک ترومبوز ناشی از کاهش Pro-C از بین می‌روند و اثرات ضد انعقادی وارفارین بر اثرات نکروتیک و ترومبوتیک آن حاکم می‌شود. نکروز پوستی ناشی از حالت هیپرکوآگولان وارفارین (کاهش سریع و شدید Pro-C)، باعث ایجاد ایسکمی، کبودی و زخم در ناحیه سینه، پستان، ران، و مناطق پر چربی می‌شود. نکروز پوستی به صورت هموراژیک و خونریزی دهنده بوده و درمان یا بهبودی آهسته‌ای دارد که به این روند نکروز پوستی ناشی از وارفارین (WISN)[7] گفته می‌شود. همان‌طوری‌که اشاره شد، این نوع نکروز عمدتاً در کسانی که کمبود نهفته و زمینه پروتئین‌های C و S دارند، بیشتر دیده می‌شود چرا که وارفارین باعث آشکارسازی و تشدید آن می‌شود. در تمامی مراحل فوق، می‌توان به‌جای هپارین از مهارگرهای مستقیم ترومبین (مثل آرگاتروبان و لپیرودین) یا E-X (مثل ریواروکزابان و دابیگاتران) استفاده نمود.

شکل ۷۶-۵۴: نکروز پوستی ناشی از دور بالا و بیشاره وارفارین (WISN) که با کاهش سریع‌تر پروتئین C (ضد انعقادی) نسبت به فاکتورهای انعقادی دیگر ایجاد نکروز پوستی می‌شود. این عارضه با تجویز همزمان یا پیش از وارفارین، هپارین قابل پیش‌گیری می‌باشد.

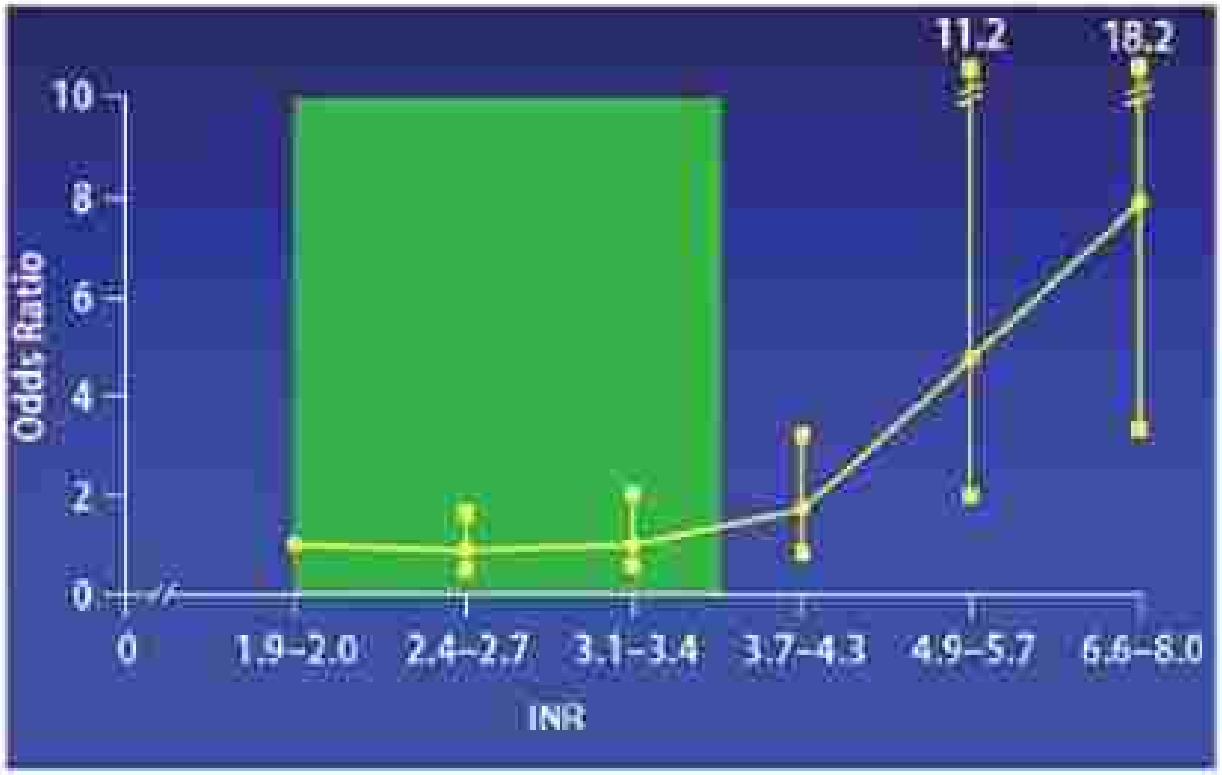
نکته مهم این‌که، هرچند طی مصرف وارفارین فاکتور VII سریع و در عرض چندین ساعت افت می‌کند ولی اوج اثر ضد ترومبوزی وارفارین حین کاهش فاکتور II ایجاد می‌شود که حدود ۹۶ ساعت طول کشیده و مستقل از INR می‌باشد. در این مدت مقدار Pro-C و فاکتور VII افت بیشتری نشان می‌دهد ولی به دلیل کاهش مخصوص فاکتورهای وابسته به Vit-K، اثرات ضد انعقادی وارفارین غالب می‌شود. بهتر است همواره قبل از تجویز وارفارین، با انجام تست‌های LFT از صحت و سلامت کبد اطمینان حاصل شود تا وجود بیماری‌های زمینه‌ای کبد باعث تداخل در تنظیم، پایش و کنترل دوز درمانی وارفارین نشود. همواره قبل از تجویز وارفارین یا هر ضدانعقاد دیگر، بهتر است با انجام تست‌های PT، aPTT، CT، BT و شمارش پلاکت، از وضعیت انعقادی پایه بیمار اطلاع حاصل شود تا تجویز داروها با احتساب آنها صورت بگیرد. همچنین بیمار باید موارد منع مصرف داروهای ضد انعقاد داشته باشد. بهترین زمان مصرف وارفارین، عصر هنگام ساعت ۶pm و بهترین زمان پایش INR صبح‌ها بساعت ۹am می‌باشد. پایش INR اغلب ۵-۳ روز بعد از تجویز وارفارین به محدوده هدف خود می‌رسد که در این زمان تجویز هپارین متوقف شده و پایش INR بسته به دور آن هر ۴-۲ هفته یکبار (اغلب یک بار در هر ماه) انجام می‌شود. کنترل دوز دارویی وارفارین همواره به کمک INR صورت می‌گیرد که مقدار INR بسته به مصرف درمانی یا پروفیلاکسی آن فرق داشته و در موارد مختلف از INRهای متفاوتی استفاده می‌شود. INR های درمانی یا پروفیلاکسی استاندارد برای برخی از بیماری‌ها به صورت زیر است:

INR بین ۲/۵-۲ : در پیش‌گیری از ترومبوز ورید عمقی (DVT) و در طول جراحی‌های پرخطر

INR بین ۳ - ۲: در شکستگی استخوان، جراحی عمیق و در درمان DVT و آمبولی‌های ریوی (PE)

INR بین ۳/۵-۲: در موارد DVT و PE شدید و عود شونده در پیوند شریان و عمل قلب باز، در پیوند دریچه مصنوعی قلب و در فقر مادرزادی فاکتورهای Pro-S/C و AT-III. به عبارتی دیگر، در پیش‌گیری از DVT از INR بین ۳/۵ - ۲، در درمان ساده DVT از INR بین ۳- ۲ و درمان موارد عود شونده از INR بین ۳/۵-۳ استفاده می‌شود. در استفاده پیش‌گیرانه با پروفیلاکسی وارفارین، جهت جلوگیری از ترومبوز یا انفارکتوس و در عین حال برای جلوگیری از خونریزی داخل مغزی از محدوده INR بین ۳/۵-۲ استفاده می‌شود.

INR بالای ۵ در مسمومیت با دوز بالای وارفارین دیده شده و کاربرد درمانی ندارد. در این حالت می‌بایست برای جلوگیری از خونریزی، اقدام به قطع دارو و درمان مسمومیت نمود. در این بیماران مقدار aPTT نیز افزایش داشته و INR>۵ ممکن است پایش هپارین را نیز مختل کند. وارفارین در دوز بالا باعث خونریزی داخلی و خارجی (نه‌ویژه خونریزی مغزی)، خونریزی از زخم‌های کهنه، بینی، لثه و تومورها، نکروز پوستی انگشتان پا، نوک بینی، باسن، ران، پستان و نواحی پر چرب شده و به دلیل خونریزی گوارشی، تست گایاک یا خون مخفی مدفوع را مثبت می‌کند. لازم به ذکر است، داروهای تداخل کننده در عملکرد پلاکت قادرند ریسک خونریزی ناشی از وارفارین را افزایش دهند. از طرفی دیگر میزان پاسخ بدن به وارفارین با افزایش سن و کاهش سطح آنزیم‌های P450 کبدی بیشتر می‌شود که می‌بایست در تنظیم دوز دارویی وارفارین مد نظر قرار بگیرد. به‌عنوان مثال دوز آیده‌آل وارفارین برای INR=1.5 در یک فرد زیر ۵۰ سال، حدود 6/1mg/day، در یک فرد ۶۰-۵۰ ساله حدود 5/3mg/day، در یک فرد ۷۰-۶۰ ساله حدود 4/3mg/day، در یک فرد ۸۰-۷۰ ساله حدود 3/9mg/day و در یک فرد بالای ۸۰ ساله حدود 3/5mg/day می‌باشد. بر این اساس دو جدول برای تعیین دوز وارفارین در بیماران سالخورده و غیرسالخورده طراحی شده است که اغلب پزشکان به کمک آن دوز مورد مصرف وارفارین را بسته به میزان INR هدف تعیین می‌کنند.



شکل ۷۷-۴ محدوده ایده‌آل یا اوپتیمال INR پروفیلاکسی که در این محدوده ریسک خونریزی‌های داخل مغزی به حداقل مقدار خود می‌رسد. افزایش INR به بالای ۶/۵ ریسک خونریزی را تا ۱۸ برابر افزایش می‌دهد.

جدول ۱۲-۵۴: دوز وارفارین تدریجی در افراد معمولی (جدول سمت راست) و افراد سالخورده (جدول سمت چپ)

Day	INR	Dose for Age (mg) <50yrs	51-65yrs	66-80yrs	>80yrs
1	<1.4	10	9	7.5	6
2	<1.5	10	9	7.5	6
	≥1.5	0.5	0.5	0.5	0.5
3	<1.8	10	9	7.5	6
	1.8-2.5	4.0-5.0	3.5-4.5	3.0-4.0	2.5-3.0
	2.6-3.0	2.5-3.5	2.5-3.5	2.0-2.5	1.5-2.0
	3.1-3.5	1.0-2.0	1.0-2.0	0.5-1.5	0.5-1.5
	3.6-4.0	0.5	0.5	0.5	0.5
	>4.0	0	0	0	0
4	<1.5	10.0-15.0	9.0-13.0	7.5-11.0	6.0-9.0
	1.6-1.3	6.0-8.0	5.5-7.0	4.5-6.0	3.5-5.0
	2.0-2.6	4.5-5.5	4.0-5.0	3.5-4.5	2.5-3.5
	2.7-3.5	3.5-4.0	3.0-3.5	2.5-3.0	2.0-2.5
	3.6-4.0	3	2.5	2	1.5
	4.1-4.5	Omit next days dose then			
		1.0-2.0	0.5-1.5	0.5-1.5	0.5-1.0
	>4.5	None (hold dose)			

Decrease dose by one third if patient has one or more of the following:

- Severe congestive cardiac failure (EF<30% and/or biventricular failure)
- Severe COPD (O_2 or steroid dependent or dyspnoea at rest)
- Concurrent amiodarone use

Day	INR @ 9AM	Warfarin Dose (mg) @ 6PM
1	<1.4	10
2	<1.8	10
	1.8	1
	>1.8	0.5
3	<2.0	10
	2.0-2.1	5
	2.2-2.3	4.5
	2.4-2.5	4
	2.6-2.7	3.5
	2.8-2.9	3
	3.0-3.1	2.5
	3.2-3.3	2
	3.4	1.5
	3.5	1
	3.6-4.0	0.5
	>4.0	0
4 (predicted maintenance dose)	<1.4	>9
	1.4	8
	1.5	7.5
	1.6-1.7	7
	1.8	6.5
	1.9	6
	2.0-2.1	5.5
	2.2-2.3	5
	2.4-2.6	4.5
	2.7-3.0	4
	3.1-3.5	3.5
	3.6-4.0	3
	4.1-4.5	Omit next dose then 2mg
	>4.5	Omit next two doses then 1mg

جدول ۱۳-۵۴: درمان خونریزی در صورت مصرف دوز بالای وارفارین در بیماران تحت درمان با داروهای ضدانعقاد خوراکی

Clinical situation		*Action*
3 < INR < 6 (target 2.5) 4 < INR < 6 (target 3.5)	No bleeding	Reduce warfarin dose or stop Restart when INR < 5
6 < INR < 8		Stop warfarin
	No bleeding or minor bleeding	Restart when INR < 5
INR > 8		Stop warfarin
	No bleeding or minor bleeding	Restart warfarin when INR < 5 If other risk factors for bleeding, give 0.5–2.5 mg of vitamin K orally
	Major bleeding	Stop warfarin Give prothrombin complex concentrate* 50 units/kg or fresh-frozen plasma (FFP) 15 mL/kg Give 5 mg of vitamin K i.v.

*Factors II, VII, IX and X or factors II, IX and X with factor VII concentrate.

جدول ۱۶-۵۴: داروهای مختلف موثر در دوز دارویی وارفارین

Mechanism	*Drugs*
Reduced coumarin binding to albumin	Phenylbutazone Sulphonamides
Reduced coumarin metabolism	Cimetidine Allopurinol Tricyclic antidepressants Metronidazole Sulphonamides
Alteration of hepatic receptor for drug	Thyroxine Quinidine
Induction of hepatic microsomal metabolism of coumarin	Barbiturates Rifampicin
Enhanced synthesis of clotting factors	Oral contraceptives Stanazol

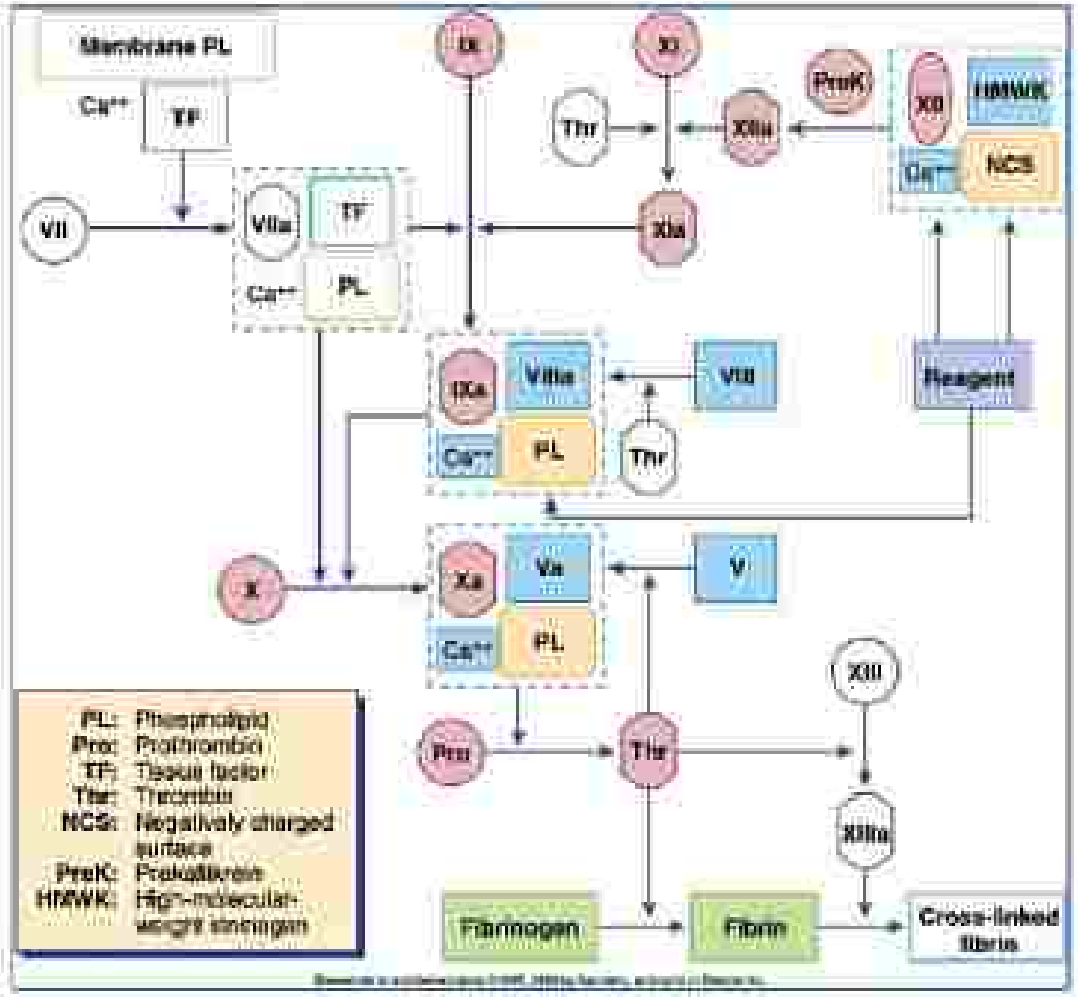
Note: Drugs which interfere with platelet function may increase the bleeding risk with warfarin.

۴) تست زمان ترومبوپلاستین پارشیال (PTT):

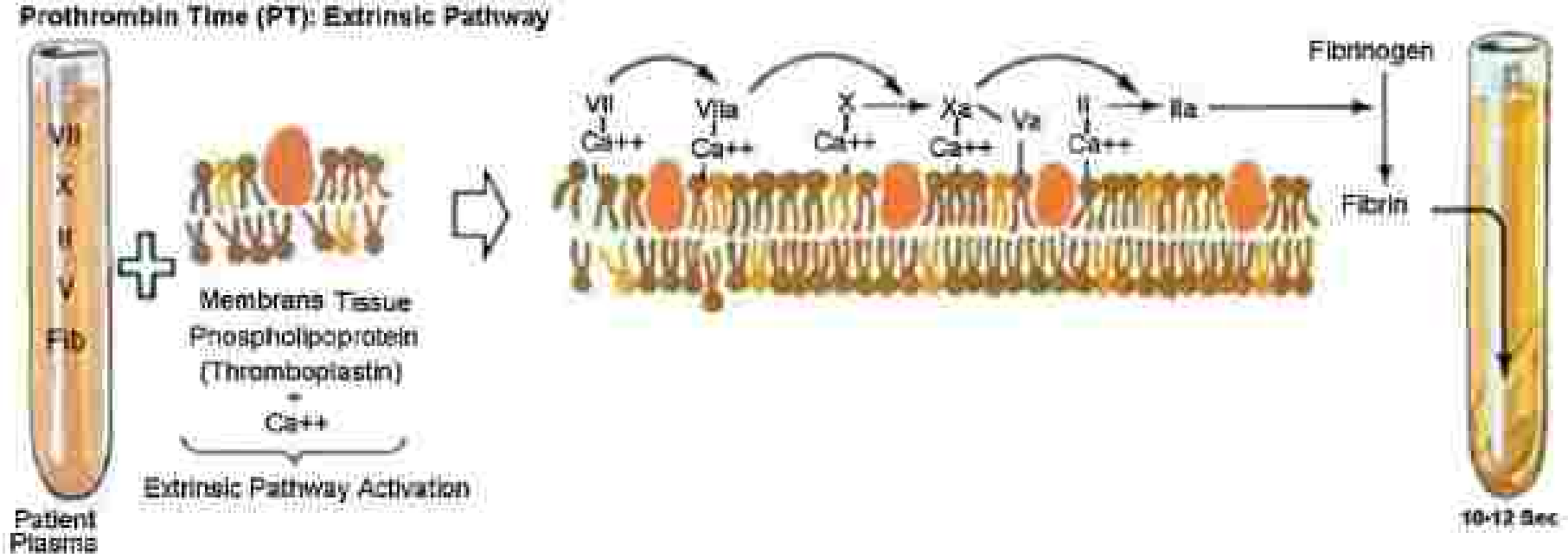
تست PTT مسیر داخلی انعقاد را بررسی نموده و در کمبود فاکتورهای تماسی (مثل فاکتورهای XII و PK)، فاکتورهای آنتی هموفیلیک (مثل فاکتورهای VIII, IX, XI) و کمبود فاکتورهای مشترک (مثل II, V, X و I) طولانی می‌شود. این تست به دو صورت معمولی (PTT) و فعال شده (aPTT) انجام می‌شود. برخلاف تست PT که از ترکیب فسفولیپید بافتی و فسفولیپید پلاکتی (ترومبوپلاستین کامل) استفاده می‌کند، در تست PTT از فسفولیپید پلاکتی فاقد فسفولیپید بافتی (ترومبوپلاستین پارشیال یا نسبی) استفاده می‌شود که سفالین نام دارد. در PTT معمولی، فعال کننده مسیر انعقاد داخلی، خود شیشه بوده ولی در تست aPTT برای فعال کردن فاکتور XII و دیگر فاکتورهای تماسی به فعال کننده‌ها یا اکتیواتورهای خاصی نیاز دارد که برای این منظور می‌توان از ۳ نوع فعال‌کننده کائولین، سیلیت (برای XII) و اسید الاژیک (برای PK) استفاده نمود که هر سه پلی‌آنیون هستند. در این فرم از تست، چون هم از فسفولیپید اکسترنال و هم از فعال کننده استفاده می‌شود لذا به آن PTT فعال شده یا aPTT گفته می‌شود. قبلاً به aPTT تست KCCT[1] هم گفته می‌شد. فاکتورهای تماسی HMWK, XII و پره‌کالیکرئین (PK) چون پلی‌کاتیون هستند، لذا با اتصال به فعال‌کننده‌های پلی‌آنیونی فعال شده و مسیر انعقاد داخلی را راه می‌اندازند. از بین ۳ فاکتور تماسی XII، HMWK و PK، پره‌کالیکرئین میل کمتری به فعال کننده‌های قدیمی مثل کائولین و سیلیت داشته و برای فعال شدن به زمان انکوباسیون بیشتری (حدود ۱۰ دقیقه) نیاز دارد، از این رو، امروزه از فعال کننده اختصاصی PK یعنی اسید الاژیک برای فعال نمودن سریع آن (در عرض ۳ دقیقه) استفاده می‌شود و محلول aPTT امروزی اسید الاژیک نیز دارد. به محلول فسفولیپید پلاکتی که حاوی فعال کننده کائولین، سیلیت و اسید الاژیک باشد، سفالین فعال‌شده یا محلول APTT گفته می‌شود.

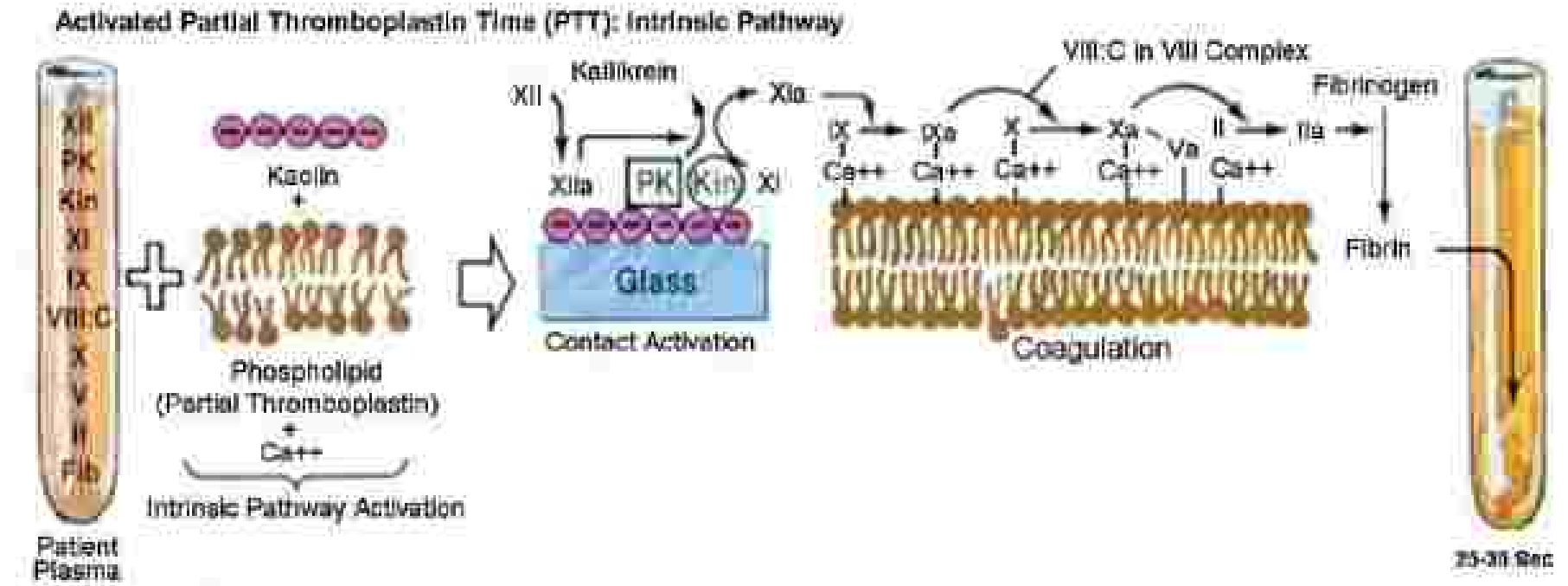
روش انجام تست PTT یا aPTT

در این تست ۱۰۰µl محلول aPTT را با ۱۰۰µl پلاسمای PPP مخلوط و بعد از ۳-۵ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه به آن ۱۰۰µl کلرور کلسیم ۰/۰۲۵ مولار افزوده و زمان انعقاد را تا زمان تشکیل لخته فیبرینی ثبت می‌کنند. لازم به ذکر است که در صورت استفاده از محلول فسفولیپید پلاکتی ماده یا انجام تست PTT (و نه aPTT) که فاقد اسید لاتریک هستند زمان انکوباسیون را به ۱۰ دقیقه افزایش می‌دهیم تا فاکتور PK نیز فعال شود. تست PTT را نیز می‌توان همانند تست PT با انواع مختلف روش‌های دستگاهی انجام داد ولی در نمونه‌های کدر و شدیداً لیپمیک، بهتر است از روش‌های اپتیک استفاده نشود. نمونه‌های همولیز نیز می‌بایست رد شوند.



شکل ۸/۵-۴: فلوچارت انجام تست PTT. نوع محصولات و جایگاه اثر هر کدام از آنها در مسیر انعقاد داخلی و مشترک [۱۱].





شكل ٤٤-٤٥ يوضح الجلطة في PT (يمين) وفي aPTT (يسار)

عوامل موثر در افزایش زمان PTT:

۱- مصرف هپارین و دیگر مهارکننده‌های ترومبین (مثل زی‌ملاگاتران، بی‌والیرودین، آرگاتروبان و ...) در هر سه دوز کم، متوسط و بالا.

۲- مصرف داروهای مهارکننده فاکتور X (مثل دابیگاتران، ریواروکزابان و ...)

۳- کمبود فاکتورهای تماسی (HMWK, PK, XII)، آنتی هموفیلی (VIII, IX, XI) و فاکتورهای مسیر مشترک (X,V,II, I).

۴- وجود آنتی‌بادی ضد فاکتورهای مسیر داخلی و مشترک.

۵- سندرم APS و مهارکننده انعقادی.

۶- کمبود فیبرینوژن به حد پایین‌تر از ۱۰۰mg/dl یا اختلال عملکرد آن (دیس فیبرینوژنمی).

۷- وارفارین با دوز بالا و طولانی مدت.

۸- پلی‌سایتمی شدید و کاهش مقدار پلاسما نسبت به سیترات که با شیلانه کردن کلروکلسیم افزوده شده در تست PTT به‌طور کاذب باعث افزایش زمان PTT می‌شود.

۹- نمونه کهنه، لخته ریز یا درشت، وجود بقایای شوینده در کوت یا لوله و دیگر موارد کاذب.

۱۰- عدم استفاده از اسید آزیک یا کاهش زمان انکوباسیون تست

۱۱- نارسایی کبدی مثل هپاتیت، سیروز، کبد چرب، کارسینومای کبدی و ...

اگر PTT بیماری علی‌رغم تکرار تست طولانی بود، برای تأیید و تفسیر آن ابتدا خونریزی یا عدم خونریزی بالینی بیمار بررسی می‌شود که درصورت عدم خونریزی شک به کمبود فاکتورهای تماسی مطرح می‌شود. در این حالت، ابتدا تست را با دوره انکوباسیون ۱۰ دقیقه‌ای تکرار می‌کنند که اگر اصلاح شد، کمبود P.K مطرح می‌شود، به‌جای این عمل، تست را می‌توان با فعال کننده اسید آزیک یا با تست aPTT نیز تکرار نمود که اگر اصلاح شد، کمبود PK مطرح می‌شود و اگر اصلاح نشد:

۱- تکرار تست با هپاریناز، سولفات پروتامین یا heparsorb برای حذف اثر هپارین

۲- تکرار تست با Mixed- PTT برای شناسایی کمبود فاکتورهای انعقادی از سندرم APS و حضور مهارگر ضد فاکتورهای انعقادی

۳- تکرار تست با فسفولیپید بیشتر برای بررسی احتمال ضد انعقاد لوپوسی

۴- تکرار تست با فیبرینوژن اکسترنال برای رد احتمال کمبود یا اختلال فیبرینوژن

۵- تکرار تست با اصلاح نسبت سیترات.

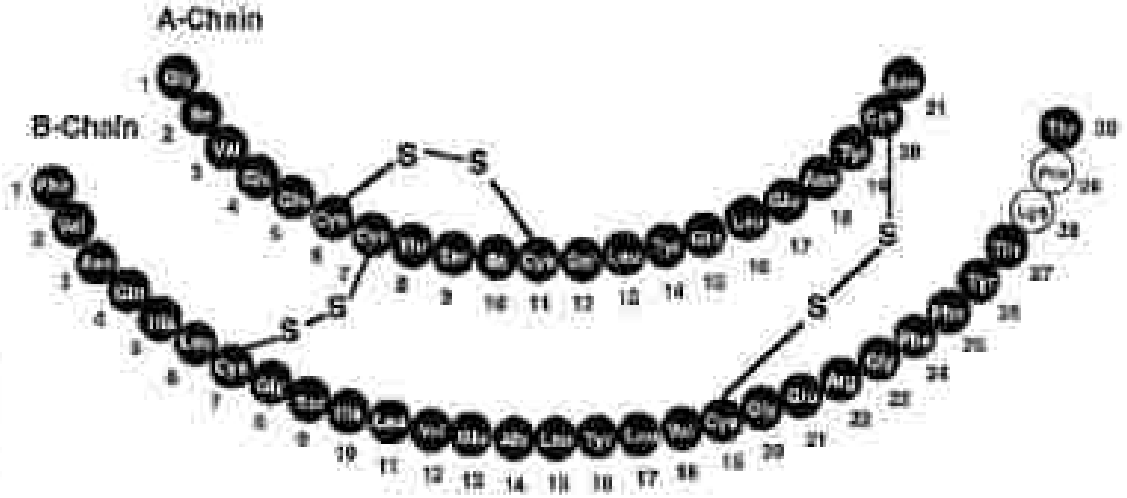
آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپید در سندرم APS و بیماری لوپوس (SLE) با اتصال به فسفولیپیدهای موجود در محلول سفالتین و سطح پلاکت مانع از تأثیر فسفولیپید و اتصال فاکتورهای انعقادی به آنها شده و درنتیجه با جلوگیری از فعال شدن فاکتورهای انعقادی باعث افزایش همه تست‌های انعقادی مثل PTT، PT و TT می‌شوند. برای حل این موضوع یا تأیید وجود مهارگر، یا مقدار فسفولیپید اکسترنال اضافه شده در تست را زیاد می‌کنند و یا اینکه از تست PTT-Mixed استفاده می‌کنند که در ادامه توضیح داده می‌شود. تست PTT به پلاسمای کهنه و شرایط نامطلوب نگهداری نیز حساس است چرا که عوامل مذکور باعث افت شدید فاکتورهای VIII، V و VII شده و در نتیجه نتایج تست PTT (و حتی PT) افزایش کاذب نشان می‌دهد. لذا تست انعقادی PTT حاوی هپارین را می‌بایست در عرض ۱ ساعت و نمونه‌های بدون هپارین را می‌بایست در عرض ۴ ساعت از نمونه‌گیری انجام داد. در غیر این‌صورت، می‌بایست پلاسمای PPP را جدا نموده و در یخچال ^{oC}۶-۴ فقط تا ۴ ساعت، برای انجام تست PTT نگهداری نمود. پلاسمای PPP فریز شده در دمای ^{oC}۲۰- را تا یک ماه نیز می‌توان نگهداری نمود.

آنزیم هپارینار و فیلتر هپارورب:

هپارینار آنزیم طبیعی تجزیه کننده هپارین است که در صورت نیاز به حذف تداخلات هپارین در تست‌های انعقادی از آن استفاده می‌شود. هپارروب نیز رزین‌های تعویض یونی جاذب هپارین هستند که باعث حذف آن از پلاسما می‌گردند. در PTT طولانی، یا پلاسما را تا ۱۰ دقیقه با هپارینار انکوبه نموده و یا از یک ستون هپارورب عبور می‌دهند که اگر PTT مجدد اصلاح شد، تزریق هپارین تأیید می‌شود و اگر اصلاح نشد، می‌بایست Mixed-PTT انجام داد.

سولفات پروتامین:

سولفات پروتامین معکوس کننده، پادزهر یا آنتی‌دوت هپارین بوده و از اسپرم ماهی آزاد یا کوسه تهیه می‌شود. البته امروزه نوع نوترکیب آن نیز تولید و در شرایط بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده که در اسپرم ماهی‌های نر وجود دارد، باعث جدا شدن تخم‌های بارور شده از توده تخم‌های ناباروری می‌شود که تازه تخم‌گذاری شده و به صورت تجمعات بزرگ متصل به هم هستند. این پروتئین در یکی از مراحل اسپرماتوژنز نیز جایگزین پروتئین هیستون در DNA می‌شود و برای باروری و عملکرد اسپرم بسیار ضروری است. پروتامین همانند PF4/CXCL4 و برخلاف هپارین، یک پروتئین غنی از آرژنین پلی‌کاتیون بوده و با اتصال شدید به هپارین پلی‌آنیون اثر آن را خنثی می‌کند. سولفات پروتامین در دوز متوسط و کم استفاده می‌شود، چرا که در دوز بالا عملکرد معکوس داشته و به صورت ضد انعقاد و ضد پلاکت عمل می‌کند. به عبارتی سولفات پروتامین در دوز بالا (مسمومیت با پروتامین) با اتصال به کلسیم و پلاکت‌های فعال و با کاهش مقدار کلسیم و مهار پلاکت‌ها، اثرات ضد انعقادی و ضد پلاکتی هم داشته و باعث اختلالات و آریتمی قلبی نیز می‌شود که در چنین مواردی به بیمار، کلرید کلسیم تزریق می‌شود. به دلیل قدرت آنتی‌ژنیسیتی که پروتامین دارد، برخی بیماران نسبت به آن حساسیت داشته و واکنش آنافیلاکسی نشان می‌دهند. دوز ایده‌آل آن ۰/۷ mg/kg/min و حداکثر ۵۰ mg/min است که باعث بازگشت نتایج تست‌های PTT و TT به حالت اولیه می‌شود. ۱/۳mg سولفات پروتامین قدرت خنثی سازی ۱۰۰IU هپارین را دارد. به عبارتی، هر واحد IU از هپارین با ۰/۰۱ mg از آن خنثی می‌شود. پروتامین به جز در جراحی، در کشت سلولی، انتقال ژن و تخلیص پروتئین نیز کاربرد دارد.



شکل ۸۷-۵۴: ساختار اولیه پروتامین

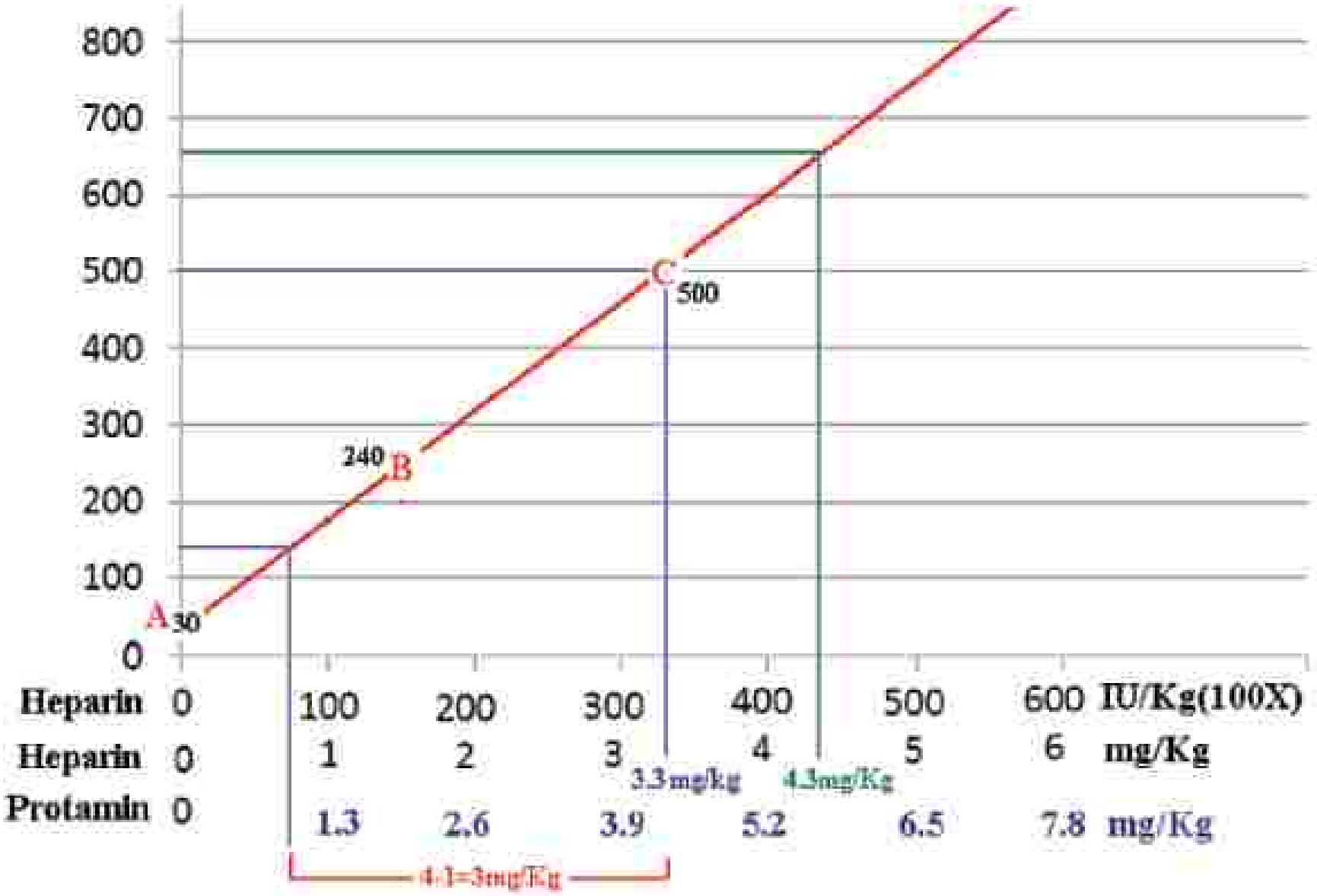
۵) روش پایش یا خنثی سازی هپارین با استفاده از پروتامین و تست ACT:

۱- ابتدا قبل از تجویز هپارین، از بیمار خون گرفته شده و ACT شاهد انجام می‌شود (اغلب نرمال است). سپس با عدد حاصله نقطه A را درنمودار رسم می کنند. محور مختصات شامل زمان ACT و دوز هپارین خواهد بود (مثلاً A=30sec).

۲- هپارین اولیه تخمینی را با هدف ۲ برابر کردن ACT شاهد تزریق می‌کنند، مثلاً مقدار ۱/۵ mg/kg هپارین را که معادل ۵۰ IU/kg است را تزریق و سپس ACT جدید را انجام داده و بعد از رسم نقطه B در نمودار، دو نقطه را به صورت خطی به هم وصل می‌کنند (معمولاً ۲ برابر شده و به ۲۴۰ – ۸۰ ثانیه می‌رسد).

۳- زمان ACT متناسب با نوع جراحی یا درمان پزشکی را انتخاب کرده (مثلاً در عمل بای پس، ACT حدود ۵۰۰sec – ۴۵۰ مد نظر می‌باشد) و از روی نمودار خطی AB نقطه C را محاسبه می‌کنیم. مثلاً مشاهده می‌شود که برای رسیدن به ACT=500sec به ۳/۳mg/kg هپارین نیاز است که چون ۱/۵mg آن قبلاً تزریق شده، مقدار ۱/۸mg/kg هپارین دیگر هم تزریق می‌شود.

۴- انجام ACT تأییدی بعد از تجویز کامل هپارین و ترسیم نقطه C



شکل ۸۹-۵۴: نمودار فرضی از یک بیمار قلبی تحت بستری در اتاق عمل که هپارین آن توسط پروتامین کنترل می‌شود.

۵- کم و زیاد کردن ACT :

الف) زیاد کردن ACT (مثلاً از ۵۰۰ ثانیه به ۶۵۰sec):

مشاهده می‌شود که در نمودار برای رسیدن به ACT حدود ۶۵۰ ثانیه، به ۴/۳ mg/kg هپارین نیاز است که قبلاً ۳/۳mg تزریق شده و هم اکنون نیز ۱mg/kg هپارین مجدد تزریق می‌شود.

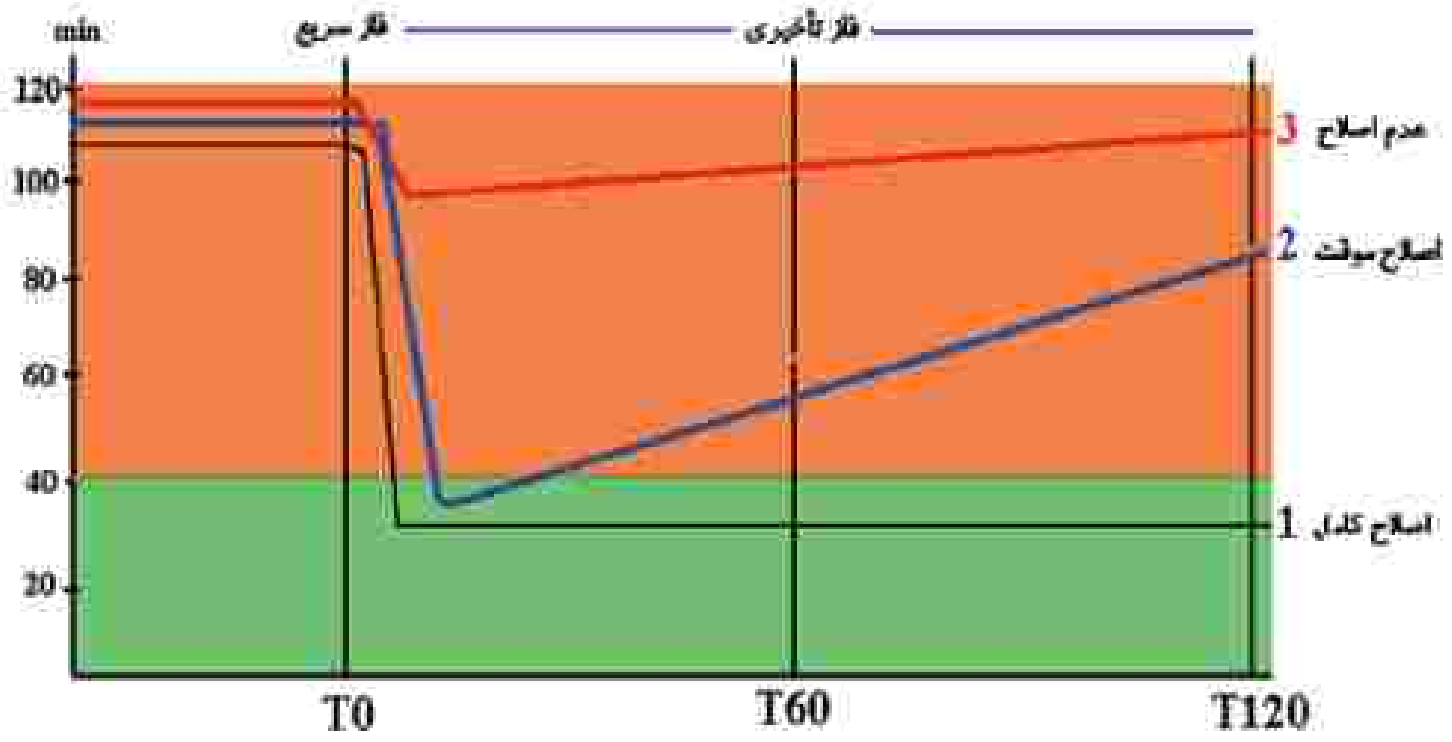
ب) برای کم کردن ACT یا معکوس کردن اثر هپارین (مثلاً از ۵۰۰ ثانیه به ۱۵۰ ثانیه):

در این حالت از خط سوم یعنی خط پروتامین استفاده می‌شود که ۵۰۰ ثانیه معادل ۴mg پروتامین و ۱۵۰ ثانیه معادل ۱mg پروتامین است، لذا بعد از محاسبه ۳=۱-۴، مقدار ۳ mg/kg پروتامین به بیمار تزریق می‌شود تا ACT در ۱۵۰ ثانیه قرار بگیرد.

۶) Mixed–PTT یا m-PTT:

mPTT به دو فرم mPTT1-1 و mPTT1-4 انجام می‌شود. روش انجام تست mPTT مثل PTT است ولی نمونه مورد استفاده در آن نسبت ۱ به ۱ یا ۱ به ۴ پلاسمای بیمار با پلاسمای نرمال پوولد است. پلاسمای نرمال پوولد (PNP)[1] از ترکیب پلاسمای حداقل ۲۰ فرد سالم، غیرحامله، فاقد نقص یا فقر فاکتور انعقادی، بدون عفونت، التهاب، بدخیمی، بیماری‌های اتوایمیون، بدون ابتلاء به بیماری‌های ویروسی هپاتیت B و C و HIV، فاقد ضدانعقاد لوپوسی و APS، عدم مصرف قرص‌های ضد حاملگی و هپارین تهیه می‌شود. تعداد پلاکت‌های PNP زیر ۱۰۰۰۰ در میکرولیتر می‌باشد. بعد از مخلوط نمودن پلاسمای بیمار با PNP، سه نوع زمان انکوباسیون T0، T60 و T120 (بلافاصله، بعد از ۱ ساعت و بعد از ۲ ساعت) وجود خواهد داشت که بعد از طی هرکدام، یک تست PTT مجدد از مخلوط آنها به‌عمل می‌آید. به T0، میکس سریع و به T60 و T120، میکس‌های تأخیری گفته می‌شود. امروزه PNPهای تجاری و پایدار مثل Cryocheck و George King نیز در بازار وجود دارند که مقادیر پلاسمایی تک تک فاکتورهای آن مشخص هستند[2]. انجام Mixed PTT در هموفیلی های مقاوم به درمان ضروری است.

شکل ۹۰-۵۴: شمایی از mPTT در یک بیمار مبتلا به آنتی‌بادی ضد فاکتور VIII که در آن از PNPهای تجاری استفاده شده است. PNPها به صورت فریز آماده و تجاری در بازار وجود دارند ولی هر آزمایشگاهی خود نیز می‌تواند آن را تهیه و مورد استفاده قرار بدهد. ویال‌های قرمز بعنوان کنترل مثبت برای APS و ویالهای بنفش به عنوان PNP مصرف می‌شوند.



شکل ۹۱-۵۴: سه الگوی مختلف اصلاح در Mixed-PTT

تفسیر توأم نتایج PT و PTT:

اگر زمانی:

A) PT نرمال و PTT بالا بود:

۱- کمبود، نقص یا مهارگر ضد فاکتورهای مشترک (I, II,V,X) رد می‌شود.

۲- کمبود، نقص یا مهارگر ضد فاکتور VII و مصرف وارفارین رد می‌شود.

۳- دیس‌فیبرینوژنمی و هیپوفیبرینوژنمی رد می‌شود.

۴ -کمبود، نقص یا مهارکننده ضد فاکتورهای XII, XI, IX, VIII مورد شک قرار می‌گیرد. در ضد انعقاد لوپوسی یا سندرم APS نیز اغلب مقادیر PT در حد نرمال بوده ولی PTT افزایش بیشتری را نشان می‌دهد.

۵- در این حالت بیماری VWD نوع IIN یا III را نیز می‌توان مورد شک قرار داد.

۶ – علاوه بر موارد فوق، پروتئینوری و دفع فاکتورهای XI و XII نیز می‌تواند مطرح باشد. در پروتئینوری چون اکثراً فاکتورهای XI, XII و Pro-S دفع می‌شوند. لذا PT نرمال باقی می‌ماند.

B) اگر PTT و PT هر دو بالا بود:

این حالت ۲ فرم دارد:

الف) اگر PT > PTT بود:

احتمال ۱- مصرف وارفارین، ۲- کمبود Vit-k، ۳- بیماری شدید کبدی، ۴- DIC و ۵-آمیلوئیدوزیس، پاراپروتئینمی و گاماپاتی مونوکلونال مطرح می‌شود. در بیماری‌های کبدی همه فاکتورها به‌جز VIII کاهش دارند، چرا که فاکتور VIII در RES هم ساخته می‌شود.

ب) اگر PTT> PT بود:

احتمال ۱- مصرف هپارین ۲- ضد انعقاد لوپوسی یا APS ۳- پروتئینوری مطرح می‌شود.

افزایش توأم PT و PTT می‌تواند در اصل نقص مسیر مشترک باشد که هردو تست را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در چنین مواردی برای تأیید نقص مشترک از تست‌های ترومبین تایم (TT)، رپتیلاز تایم (RT) و یا استیپون تایم (ST) استفاده می‌شود که اگر TT غیر طبیعی بود:

۱- احتمال مصرف هپارین، هیرودین یا دیگر مهارکننده‌های ترومبین

۲- احتمال حضور FDP شدید در خون

۳- احتمال اختلال کیفی یا کمی فیبرینوژن

۴- احتمال کمبود Vit-k یا مصرف وارفارین که در دوز بالا و طولانی باعث کاهش II نیز می‌شود، مطرح خواهد بود.

در کمبود فاکتورهای مشترک، اگر کاهش فاکتورها خفیف باشد، PT و TT افزایش و PTT به دلیل دامنه بزرگ‌تری که دارد، در محدوده نرمال باقی می‌ماند ولی اگر کمبود شدید باشد، هر سه افزایش خواهند داشت. در چنین مواردی، انجام تست لاتکس FDPs و D-دایمر نیز می‌تواند در تشخیص افتراقی بیماری‌ها کمک کننده باشد.

C) PT افزایش و PTT نرمال:

۱- کمبود فاکتور VII و دوزهای متوسط وارفارین مطرح است.

۲- کمبود خفیف فاکتورهای مسیر مشترک (I, X, V, II) نیز می‌تواند مطرح باشد.

۳- مصرف هپارین رد می‌شود چراکه:

هپارین با افزایش قدرت AT-III تا ۱۰۰۰ برابر باعث تجزیه همه سرین‌پروتئازها مثل XII, XI < IX<X< II و تاحدودی VII شده و لذا PTT افزایش به مراتب بیشتری در مقایسه با PT خواهد داشت. هپارین و APS هردو روی دو تست PT و PTT اثر دارند ولی تأثیر آنها روی PTT به مراتب بیشتر از PT می‌باشد.

در همه موارد فوق، برای شناسایی عامل اصلی می‌بایست PT یا PTT میکس و سنجش فاکتور اسی انجام شود. PT میکس عمدتاً برای فاکتورهای VII و X و PTT میکس عمدتاً برای فاکتورهای VIII و IX و XI به کار می‌رود.

۹) تست TT یا ترومبین تایم:

تست TT سرعت تبدیل فیبرینوژن به فیبرین و سرعت پلی‌مریزاسیون فیبرین مونومر را مورد بررسی قرار می‌دهد. در این تست، ترومبین فعال (IIa) به‌عنوان فعال کننده و آغاز کننده واکنش، به صورت دستی و به همراه کلرور کلسیم به پلاسما اضافه می‌شود و لذا خود فاکتور II در تست TT سنجش نمی‌شود. از طرفی دیگر، فاکتورهای X و کوفاکتور آن، یعنی فاکتور V هم که در بالادست ترومبین قرار دارند، در این تست بررسی نمی‌شود و مسیر مشترک بعد از II بررسی می‌شود، لذا وارفارین در این تست بی‌تأثیر می‌باشد. گاهی از این تست برای سنجش کمی مقدار فیبرینوژن خون نیز استفاده می‌شود.

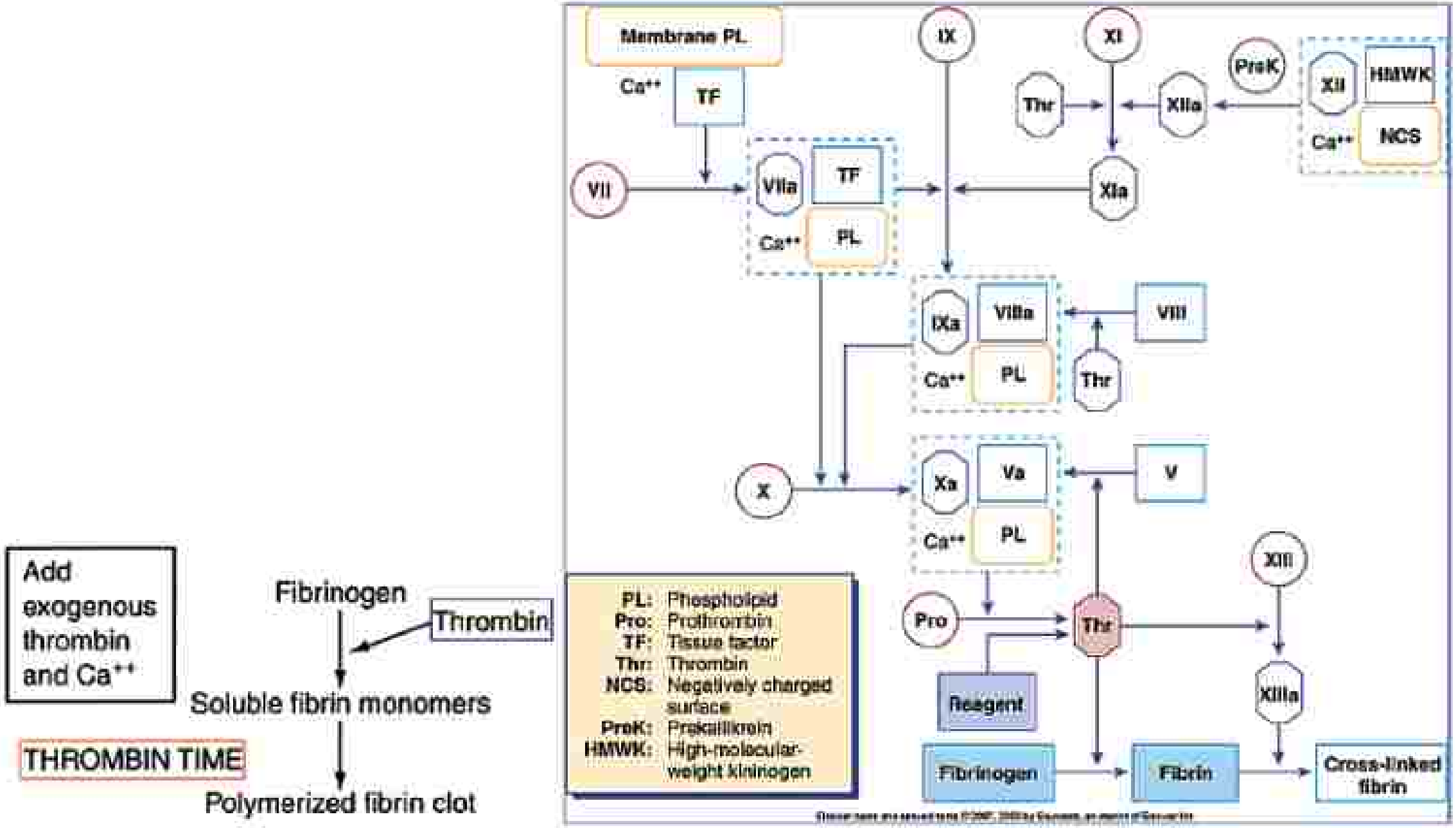
روش انجام تست TT:

۱۰۰μl پلاسمای سیترانه را با ۱۰۰μl ترومبین حاوی کلرور کلسیم (محلول TT) مخلوط کرده و زمان تبدیل فیبرینوژن به فیبرین پلی‌مر یا زمان انعقاد TT را بررسی می‌کنند. مقادیر نرمال تست برای افراد بالغ حدود ۱۴-۱۲ ثانیه می‌باشد. هپارین با تحریک AT-III و Hep-Cof-II باعث تخریب و تجزیه فاکتورهای IIa اضافه شده به روش دستی گشته و در نتیجه باعث طولانی شدن تست TT می‌شود. در این تست، ترومبین قادر به فعال کردن فاکتورهای V و VIII نیز می‌باشد.

افزایش TT در موارد زیر دیده می‌شود:

- اختلالات کمّی و کیفی فیبرینوژن
- وجود آنتی‌بادی ضد ترومبین
- هپارین تراپی و دیگر داروهای مهارگر ترومبین [هیرودین، لیرودین، آرگاترومبان یا رقلوران، بی والیدرین، ...]
- افزایش فیبرینولیز اولیه یا ثانویه که FDPs ها افزایش دارند
- اختلالات پلی‌مریزاسیون مثل اورمی، گاماپاتی مونوکلونال و ...

از مختل‌کننده‌های فیبرینوژن می‌توان به خود دیس فیبرینوژنمی، دیس پروتئینمی، FDPها، Dدایمرها، مصرف داروهای فیبرینولیتیک (مثل استرپتوکینیاز و اوروکینیاز که باعث افزایش ثانویه FDPها می‌شوند)، گاماپاتی و پاراگلبولینمی (مثل مالتیپل میلوما و ماکروگلبولینمی والدنشتروم) اشاره نمود. می‌توان اثر هپارین را با آنزیم هپاریناز، سولفات پروتامین یا ستون هپارورپ از بین برد ولی راه حل دوم، انجام تست رپتیلاز تایم (RT) مقاوم به هپارین است. برای حذف اثر FDPsها، پاراپروتئین‌ها و شرایط اورمی نیز می‌توان قبل از انجام تست، برای بیمار درخواست همودیالیز نمود.



شکل ۹۸-۵۴: فلوچارت انجام تست TT، نوع محلول‌ها و جایگاه اثر هرکدام از آنها در مسیر انعقاد مشترک [۱۱]

۱۰) تست رپتیلاز تایم (R.T):

تست RT معادل تست TT بوده ولی هپارین در آن بی‌اثر است. در این تست به‌جای ترومبین، ترکیبی از سموم مارها بنام محلول RT یا آتروکسین استفاده می‌شود. این سم که به آنکرود یا آنزیم رپتیلاز نیز معروف است. فیبرینوژن را مستقیماً با شکستن زنجیره FPA به فیبرین تبدیل می‌کند و چون متفاوت از ترومبین است، لذا ترکیب AT-III با هپارین قادر به برش و تجزیه آن نخواهد بود. حال آنکه در تست TT، ترکیب هپارین + AT-III قادر است ترومبین افزوده را تجزیه و تست را مختل کند. تست RT هنوز به اختلالات کمی و کیفی فیبرینوژن و حضور FDPsها، پاراپروتئین‌ها و اورمی حساس بوده و مقدار آن در این موارد طولانی می‌شود. رپتیلاز نام کلی بوده و اغلب از سموم مارهای مختلف مثل آنزیم رپتیلاز مار Bothrops atrox، سم آتروکسین مار Bothrops Jacarta، سم آروین یا آنکرود مار Agkistrodon Rhodostoma و آنزیم باکتریایی Congulase، Thrombin استفاده می‌شود.

شکل ۹۹-۵۴: مار Bothrops atrox

۱۱) تست استیپون تایم (S.T) یا تست سم مار راسل (RVVT):

در این تست از رقت 10^{-5} سم مار راسل در محلول سفالتین استفاده می‌شود. این سم در مجاورت Ca یونیزه، فاکتور X را مستقیماً فعال نموده و مسیر مشترک را راه می‌اندازد. این تست برخلاف TT و RT به منبع فسفولیپیدی نیز نیاز دارد و برخلاف تست TT و RT، تست S.T فاکتورهای X، V و II را هم بررسی می‌کند. همانند تست‌های دیگر انعقادی، هپارین و داروهای مشابه آن، FDPsها، اختلالات فیبرینوژن و اورمی در نتیجه آن دخالت دارند.

شکل ۱۰۰-۵۴ مار Vipera monelli

روش انجام تست:

۲۰۰µl محلول RVVT که حاوی رقت 10^{-5} سم مار راسل و فسفولیپید سفالتین است را با ۲۰۰µl از پلاسمای بیمار مخلوط و بعد از ۳ دقیقه انکوباسیون در بن‌ماری ۳۷ درجه، ۲۰۰µl کلرور کلسیم به آن افزوده و زمان ST را ثبت می‌کنیم. فرم رقیق شده این تست که d-RVVT نام داشته و فسفولیپید کمتری دارد. حساسیت بالایی به سندرم آنتی‌فسفولیپید/آنتی کوآگولان لوپوسی (APS/ LA) دارد و برای شناسایی آن به‌کار می‌رود.

۱۴) تست D-dimer و FDPs[۶] به روش لاتکس، الایزا و چیپ:

در تست D-دایمر از آنتی‌بادی‌های ضد نواحی D-D پلی‌مر فیبرین (مثل آنتی‌بادی 3B6) و در FDPs لاتکس، از آنتی‌بادی‌های ضد قطعات X، Y، D و E استفاده می‌شود. این آنتی‌بادی‌ها روی ذرات لاتکس کوت می‌شوند که وجود هر کدام از آنتی‌ژن‌ها در پلاسما، باعث اتصال آنها به‌یکدیگر و درنتیجه تشکیل آگلوتیناسیون می‌شود. از این آنتی‌بادی‌ها برای کوت کردن چاهک‌های ELISA نیز می‌توان استفاده نمود. کیت‌های لاتکس (LAT)[۷] توانایی شناسایی ۲μg/ml-۱۱ از FDPs یا D-dimerها را دارند. تست D-دایمر برخلاف FDPsها در بیماری‌های فیبرینولیز اولیه که لخته باعث فعال شدن مسیر فیبرینولیز نشده و مسیر به صورت خود به خود یا در اثر بدخیمی یا تزریق استرپتوکیناز یا اوروکیناز فعال می‌شود، منفی می‌باشد، در حالی که تست FDPs لاتکس در هردوی فیبرینولیز اولیه و ثانویه (مثل DIC، PE، DVT، PNH، موارد از آنمی داسی، AML-M3، سپتی‌سمی باکتری‌های G(-) و ...)[۱] مثبت می‌شود. به جز تست لاتکس، تست‌های نواری، چیپ و دستگاه‌های POC نیز برای این تست‌ها طراحی و وارد بازار شده‌اند که اغلب در مراکز اورژانس برای غربال‌گری بیماری‌های ترومبوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مقایسه بین دو تست، D-دایمر دارای اختصاصیت بالا و FDPs دارای حساسیت بالا می‌باشد، لذا همواره بهتر است این دو تست توأم با یکدیگر انجام شود.

حساسیت تست LAT برای FDPها حدود ۲μg/ml بوده و هر تیتر یک بار مثبت آن معادل ۲μg/ml از FDPs است (فاکتور کمیت). در این تست می‌توان رقت سرمالی از پلاسما هم ایجاد کرده و مقدار FDPها را به صورت نیمه‌کمی اندازه‌گیری نمود. رقتی از پلاسما که واکنش LAT آن مثبت است را در ۲ ضرب کرده (فاکتور کمیت) و مقدار را گزارش می‌کنیم. مثلاً اگر رقت ۱۰/۱[۱] مثبت شود، تیتر FDP حدود ۲۰×۲ = ۴۰μg/ml خواهد بود. محدوده نرمال نیز برای FDPs ۲-۸μg/ml و برای D-dimer حدود ۲۵۰ng/ml می‌باشد که در هر دو نمونه خون مثل PT/PTT اخذ می‌شود. لازم به ذکر است که FDP در خون برای بررسی فیبرینولیز و در ادرار برای بررسی رد پیوند و گلومرولونفریت سنجش می‌شود. در این تست، مقدار فیبرینوژن نمونه می‌بایست طبیعی باشد و اگر کم بود، دستی اضافه می‌شود. افزایش FDPs در فیبرینولیز اولیه، فیبرینولیز ثانویه (ولی در کنار D-دایمر)، بیماری کبدی و کاهش کلیرانس آن، بیماری گلومرولونفریت و رد پیوند کلیه مثبت می‌شود. لوله‌های اخذ نمونه نیز مخصوص بوده و حاوی ترومبین و رپتیلاز هستند تا خون سریع لخته بزند. همچنین لوله‌ها حاوی آپروتینین، Soybean trypsin یا ترانگزامیک اسید (مهار کننده پلاسمین و تریپسین) هستند تا سیستم فیبرینولیز فعال نشده و FDPهای تازه تولید ناشی از نمونه‌گیری سنجیده نشوند و در نتیجه FDPهای از قبل موجود درخون پایش شوند. در این تست اگر گاسیون مثبت ذرات لاتکس به این معنی است که پلاسما دارای قطعات E و D تکی و یا DD/E و بقیه D-دایمرها می‌باشد. سرمالی بودن رقت پلاسما نیز به آن فرم نیمه کمی- کیفی می‌دهد (نه کمی کامل). این تست قدرت افتراق فیبرینولیز اولیه از ثانویه را ندارد.

شکل ۷-۱-۵۴: دو نوع تست لاتکس در زمینه روشن و زمینه سیاه که برای سنجش کیفی و تقریباً نیمه کمی D-dimer به‌کار می‌رود. با رقت دادن اولیه به پلاسما (مثل 1/2 و 1/8) می‌توان تاحدودی تیتر D-دایمر را نیز به دست آورد. موارد منفی به صورت <5μg/ml و موارد مثبت بسته به تیتر آن به صورت 5-20μg/ml برای رقت 1/2 و >20μg/ml برای رقت 1/8 گزارش می‌شوند.

شکل ۸-۱-۵۴: چیپ‌های سنجش D-دایمر: این تست با ۳۵ لاندا خون تام یا ۲۰۰ لاندا پلاسما انجام می‌گیرد. بعد از ریختن خون یا پلاسما، ۳ قطره نیز بافر به آن افزوده و بعد از طی ۱۰ دقیقه، نتیجه را قرائت می‌کنند که وجود دو خط دلیل بر مثبت بودن تست می‌باشد. نمونه خون مورد استفاده برای این نوع از تست‌ها در لوله‌های خاصی که حاوی مواد ضد فیبرینولیز هستند، جمع‌آوری می‌شود تا پلاسمین در آنها فعال نشده و باعث تجزیه فیبرین یا فیبرینوژن و ایجاد نتیجه مثبت کاذب نشود.

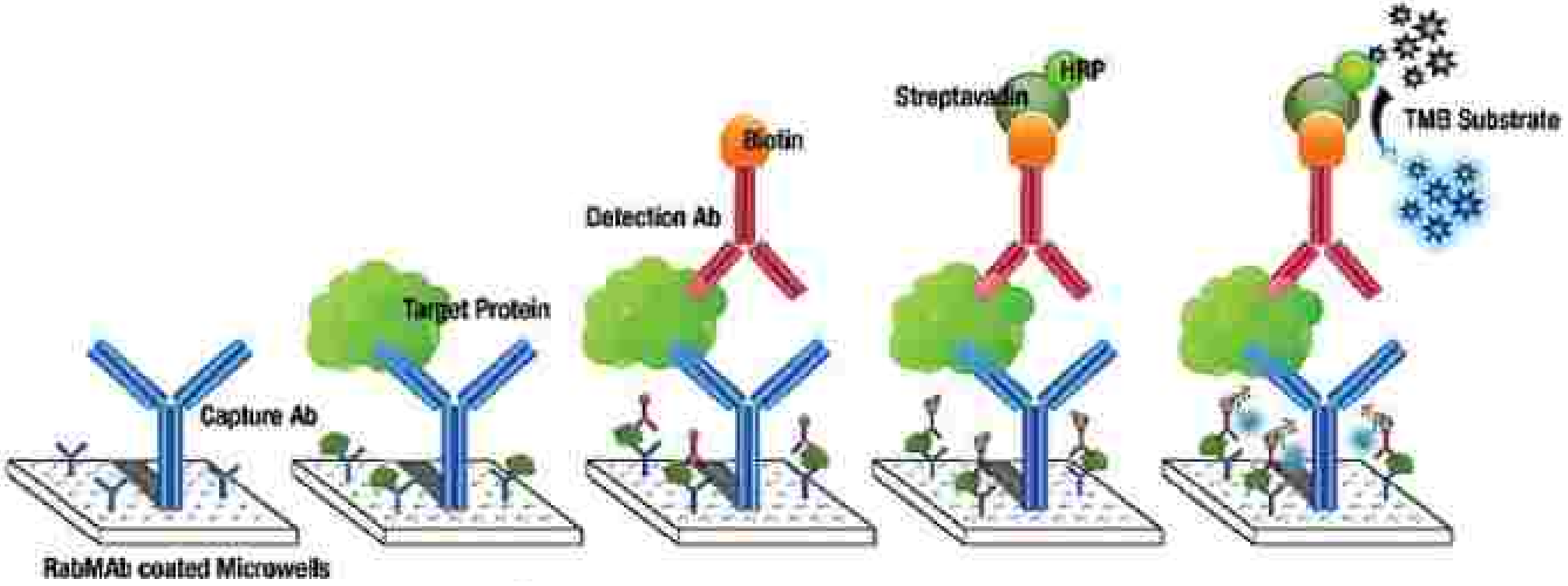
شکل ۹ : ۱-۵۴ دستگاههای POC مخصوص مطب یا اورژانس که از خون سرانگشت برای سنجش D-دایمر استفاده می‌شود. این دستگاه در عرض ۱۵ دقیقه نتیجه تست را قرائت می‌کند.

در نوع دیگری از دستگاه‌های سنجش D-dimer نیمه کمی، از کاپ‌های مخصوصی استفاده می‌شود که در نهایت توسط دستگاه ریدر خاصی مورد قرائت قرار می‌گیرد. در این تست ابتدا با ۵۰μl از محلول شستشو کاپ را خیس نموده و سپس ۵۰μl پلاسمای بدون پلاکت (PPP) و ۵۰μl محلول کونژوکه و مجدداً ۵۰μl دیگر محلول شستشو به کاپ اضافه نموده و در نهایت غلظت نیمه کمی D-دایمر را توسط دستگاه ریدر قرائت می‌کنند.

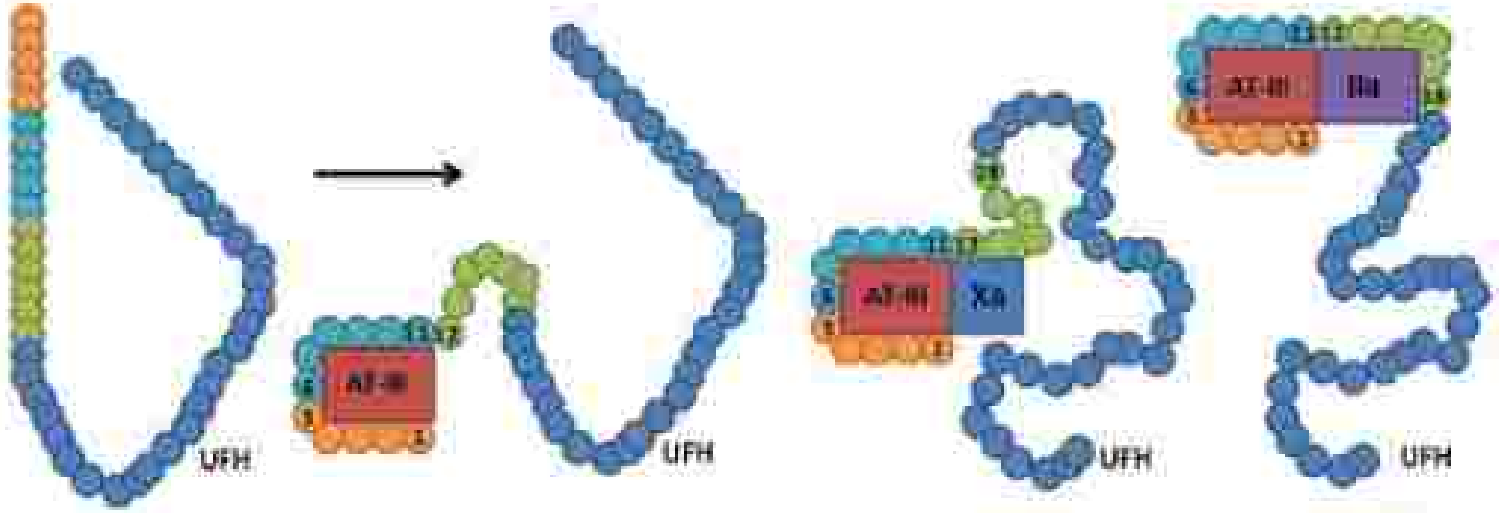
شکل - ۱۱-۵۴: کیت‌های شرکت نایوکارد برای اندازه‌گیری D-دایمر

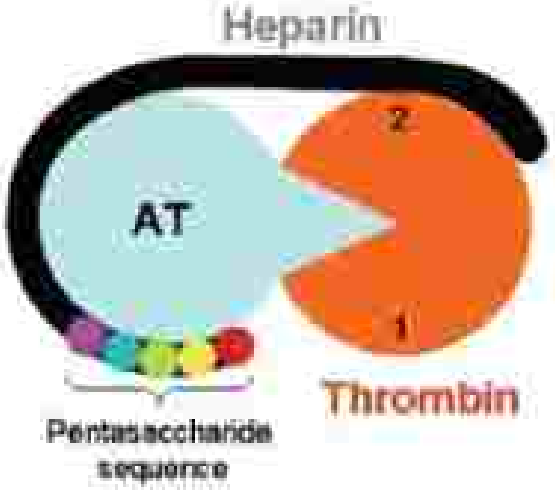
روش dELISA

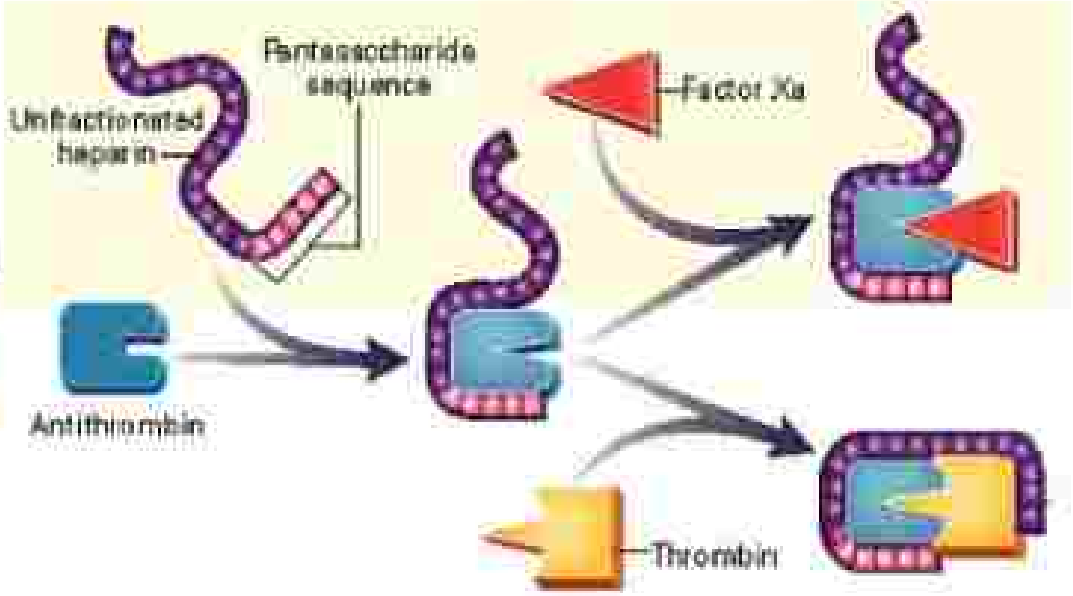
در روش الایزا به دلیل استفاده از mc-Ab حساسیت تست تا حد ng/ml افزایش می‌یابد. در این روش که نوعی الایزای ساندویچ می‌باشد، Ab1 به کف پلیت کوت می‌شود تا اتصال آن به D-دایمر یا FDPs موجود در پلاسمای بیمار، مانع از شسته شدن آنها شود. در مرحله بعد Ab ثانویه ضد D-Ab1دایمر که خود از طریق واسطه بیوتین-استرپتاویدین به آنزیمی مثل پراکسیداز متصل است، به پلیت اضافه شده و در مرحله آخر و بعد از شستشوی نهایی، آنزیم متصل به Ab-2 در حضور سوبسترا ایجاد رنگ می‌کند که شدت رنگ متناسب با غلظت D دایمر موجود در پلاسمای بیمار خواهد بود. گاهی نیز Ab2 متصل به مواد فلورسانست می‌باشد. همان‌طوری‌که اشاره شد، برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی D-دایمرها به کف پلیت، از آلبومین گاوی برای پوشاندن سطوح آزاد کف پلیت استفاده می‌شود. برای قرائت OD نیز از ELISA Reader استفاده می‌شود. گاهی افزایش بسیار شدید D دایمر با افزایش اتصال غیراختصاصی به کف پلیت باعث افزایش کاذب OD می‌شود که در چنین مواقعی به پلاسمای بیمار رقت داده می شود.



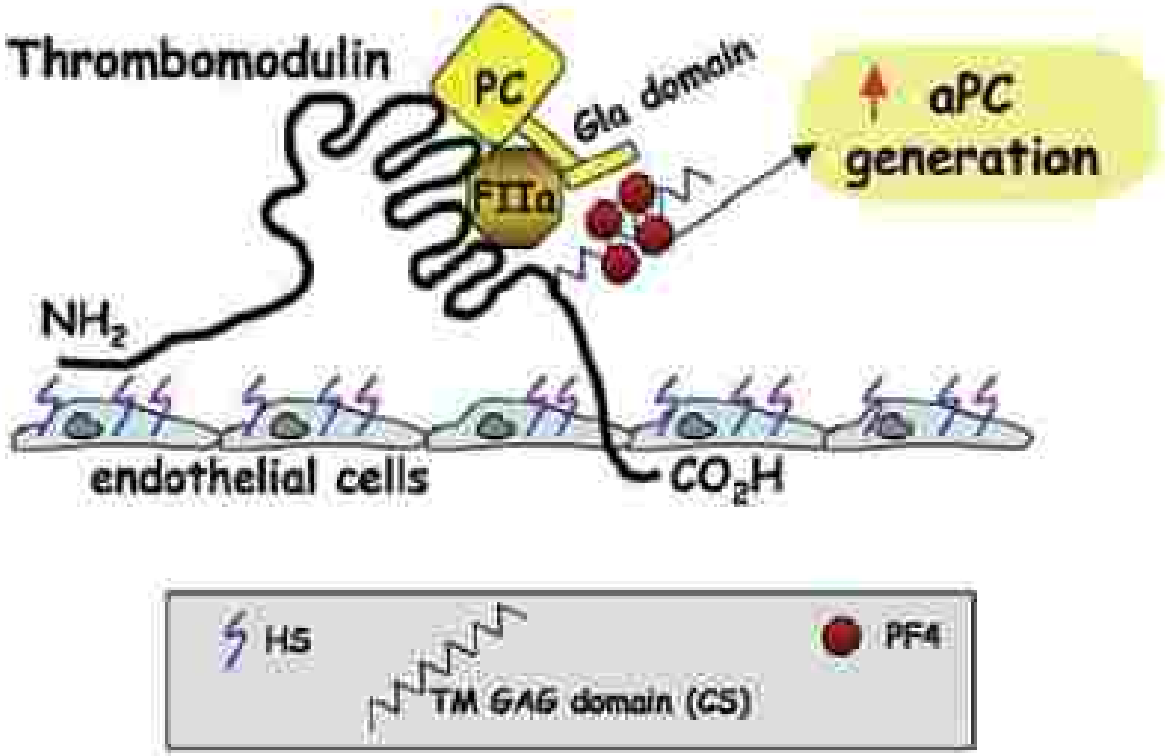
شکل ۱۱۲: تکنیک الایزای ساندویچ برای سنجش مقدار D-dimer

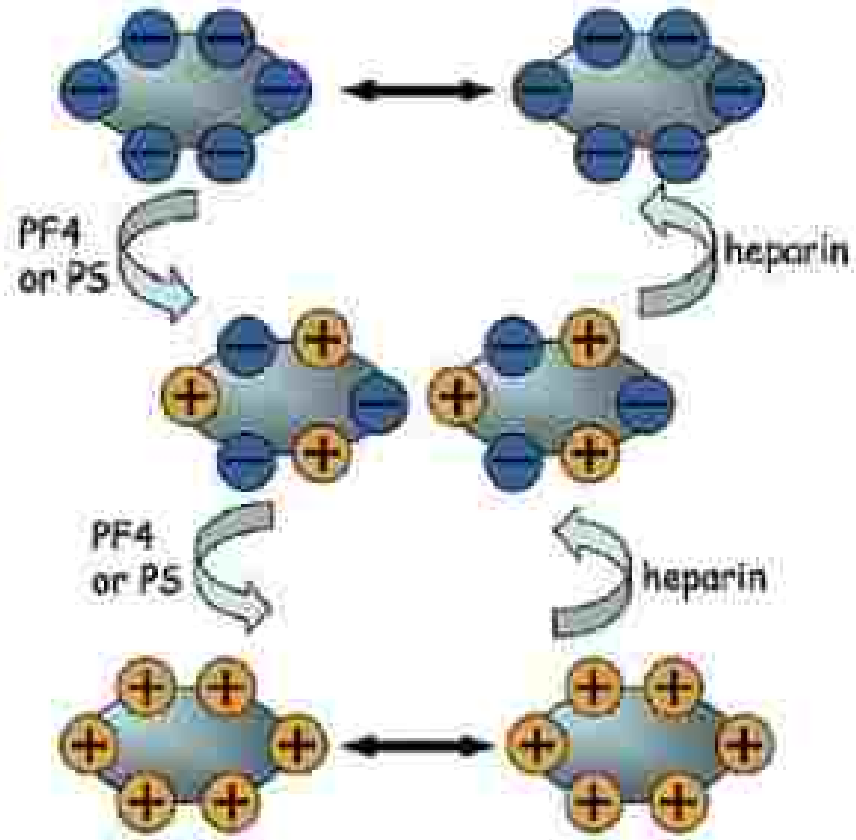




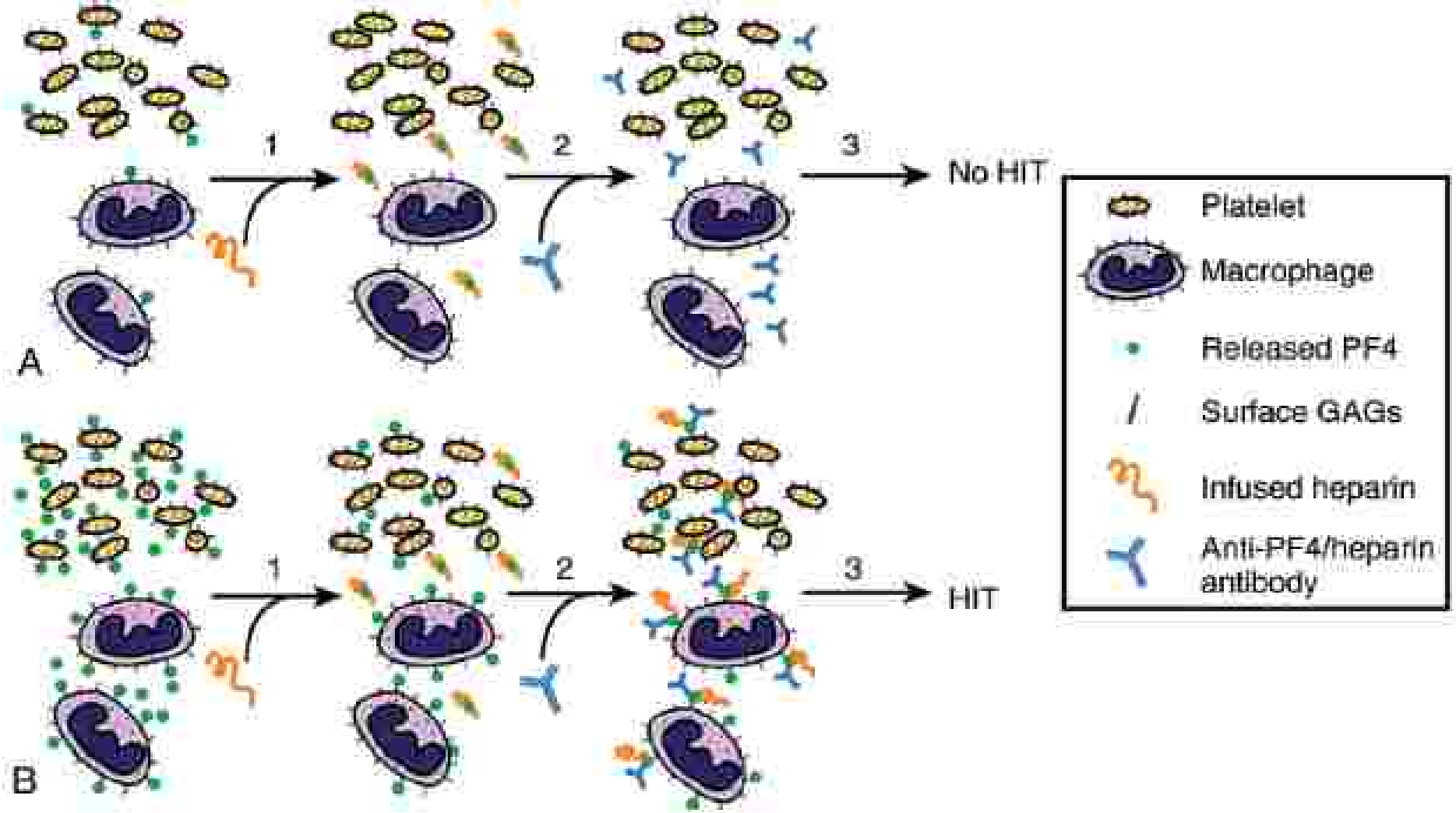


شکل ۱۸- (a) شکل (b) ساختار شیمیایی یک قسمت از هپارین UFH و شکل پایین اتصال هپارین UFH به AT-III و سوبستراهای IIa و Xa را نشان می‌دهد. همانطور که مشهود است قندهای ۱ تا ۱۸ در اتصال به سوبستراها نیز نقش دارند و فقدان آنها در LMWH باعث می‌شود تا نقش ضد Xa آن بیشتر از نقش ضد IIa آن باشد. فوندابارینوکس به دلیل عدم اتصال به پروتئین‌ها و سلول‌های مختلف، غلظت پلاسمایی آن بعد ۲ ساعت از تزریق دارو، به حداکثر خود می‌رسد. نیمه‌عمر پلاسمایی آن ۱۷ ساعت بوده و دارای کلیرانس کلیوی می‌باشد. لذا در بیماران مبتلا به نارسایی کلیوی، به دلیل افزایش شدید غلظت پلاسمایی آن، تجویز فوندابارینوکس منع مصرف دارد.



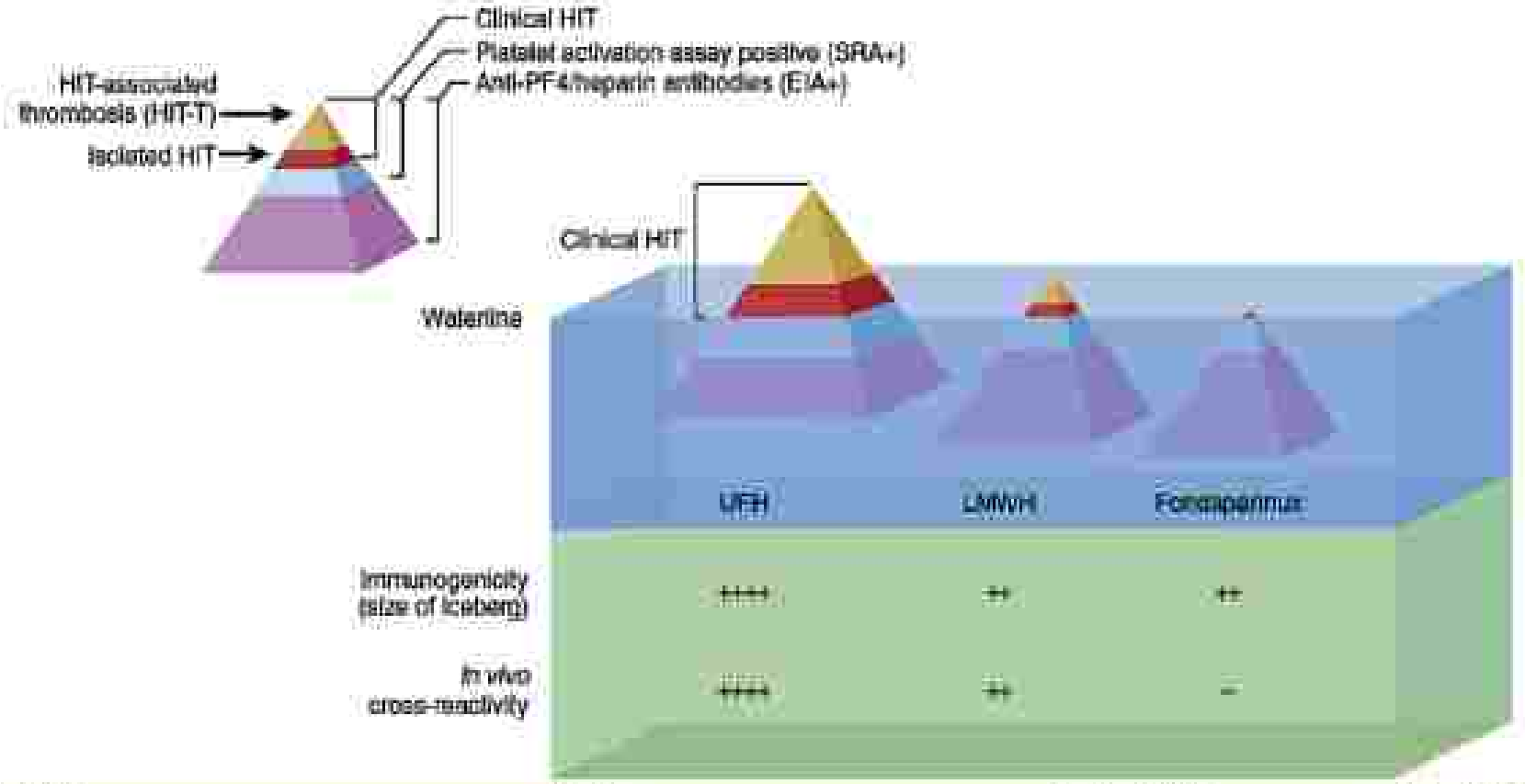


شکل ۴۵-۵۱: تصویر راست) تأثیر PF4 و سولفات پروتامین (PS) در کاهش شارژ منفی سطح پلاکت‌ها، کاهش دافعه بین آنها و تسهیل اگرگاسیون پلاکتی در دوزهای متوسط که با افزایش مقادیر PF4 و PS و الفا، بار مثبت بیش از حد به سطح پلاکت‌ها، مجدداً دافعه بین سلولی شکل می‌گیرد که این بار تزریق هپارین (با شارژ منفی) در دوز کم باعث افزایش مجدد اگرگاسیون و تزریق هپارین با دوز بالا باعث بازگشت کامل اثر PF4 و دافعه بین سلولی می‌شود. تصویر چپ واسطه قرار گرفتن PF4 مثبت بین دومن Glaی منفی Pro-C و دومن GAG منفی ترومبومودولین (TM) را نشان می‌دهد که این رخداد باعث افزایش ۴۵ برابری فعالیت TM و APC می‌شود ولی تزریق همزمان هپارین با کاهش این عملکرد می‌تواند باعث بروز HITT شود[۷].



شکل ۴۴-۱: مکانیسم پایه HIT. شکل A: مونوسیت‌ها و پلاکت‌های بیماری را نشان می‌دهد که مقادیر اندکی از PF4 ترشح نموده است. حال بعد از شروع درمان با UFH (۱)، PF4 سطح گلیکوکالیکس با وزن بالایی به هپارین متصل شده و با تشکیل نئوآنتی‌ژن باعث تحریک تولید آنتی‌بادی ضد PF4-UFH می‌شود (۲)، ولی از آنجایی که مقادیر زیادی از PF4/GAG سطحی برای اتصال به آنتی‌بادی وجود ندارد، لذا اکثر پلاکت‌ها دست نخورده باقی مانده و باعث فعال‌سازی مونوسیت‌ها و پلاکت‌ها نمی‌شود (۳) و بدین ترتیب عوارض HIT نیز ایجاد نمی‌شود. با این وجود حضور مقادیر بالای GAG-PF4 در سطح مونوسیت‌ها و پلاکت‌ها (شکل B) باعث می‌شود تا بعد از هپارین درمانی، مقادیری از آنها در پلاسما آزاد شود که با اتصال به هپارین و تشکیل دایمر PF4-UFH باعث اتصال آنتی‌بادی به آن و تشکیل کمپلکس PF4-UFH-Ab هم در پلاسما و هم در سطح مونوسیت و پلاکت شود. دم FC آنتی‌بادی در کمپلکس مذکور با اتصال به گیرنده FcγR در سطح مونوسیت و پلاکت باعث فعال‌سازی آنها و رهاشدن TF2 از مونوسیت و ریلیز گرانول‌های δ و α از پلاکت می‌شود که به نوبه خود باعث ترومبوسیتوپنی (HIT) و عوارض ترومبوتیک ناشی از آن (HITT) می‌شود [۷].

شکل ۳۸-۵۵: HITT یا تروموبور ناشی از HIT در مصرف داروی UFH



Feature	LMWH	Fondaparinux	Idraparinux
Mode of administration	Subcutaneous	Subcutaneous	Subcutaneous
Bioavailability, %	85-90	100	100
Half-life, hours	4	17	80
Target	Factor Xa > thrombin (2-4 fold)	Factor Xa	Factor Xa
Renal clearance	Yes	Yes	Yes
Neutralized by protamine sulfate	Partial	No	No

شکل ۴۴-۵۱: مقایسه میزان عوارض بالینی (HIT+HITT)، شدت ایمونوژنیکی و واکنش‌های متقاطع بین انواع مختلف هپارین. همان‌طوری که مشهود است، در این تصویر عوارض هپارین به یک کوه یخی شناور تشبیه شده است که کل توده یخی، میزان آنتی‌بادی شکل گرفته بر علیه PF4-LTH را نشان داده (EIA+) و قسمت خارج از آب نیز مجموع عوارض بالینی ترومبوسیتوپنیک و ترومبوتیک بروز کرده در بیماران را نشان می‌دهد (HIT و HITT) و هرچه این قسمت بیشتر در سطح آب باشد، عوارض بالینی ترومبوسیتوپنیک و ترومبوتیک دارو نیز بیشتر خواهد بود. لازم به ذکر است اندازه توده یخی با نوع هپارین مورد استفاده تعیین می‌کند برخی از آنتی‌بادی‌های مذکور فعال کننده پلاکت (SRA+) و برخی فاقد این فعالیت هستند. همان‌طوری که مشهود است قدرت آنتی‌ژنیک کمپلکس LLC ناشی از UFH/HMWH که توسط اندازه توده یخی مشخص می‌شود، بیشتر از LMWH و فوندا‌پاریوکس بوده و لذا عوارض آن نیز بیشتر می‌باشد [۷].

جدول ۲: [illegible]

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
CC chemokines			
CCL1	I-309	CCR8	Monocyte recruitment and endothelial cell migration
CCL2	MCP-1	CCR2	Mixed leukocyte recruitment
CCL3	MIP-1α	CCR1, CCR5	Mixed leukocyte recruitment
CCL4	MIP-1β	CCR5	T cell, dendritic cell, monocyte, and NK recruitment; HIV co-receptor
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	Mixed leukocyte recruitment
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	Mixed leukocyte recruitment
CCL8	MCP-2	CCR3, CCR5	Mixed leukocyte recruitment
CCL9	CCL-MP	CCR1	?
CCL11	Eotaxin-1	CCR3	Eosinophil, basophil, and Th2 recruitment
CCL12	Eotaxin-2	CCR2	Mixed leukocyte recruitment
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3	Mixed leukocyte recruitment
CCL14	HCC-1	CCR1, CCR5	?
CCL15	MIP-5	CCR1, CCR3	Mixed leukocyte recruitment
CCL16	HCC-4	CCR1, CCR5	?
CCL17	TARC	CCR4	T cell and basophil recruitment
CCL18	PARC, DC-CK1		Lymphocyte and dendritic cell homing
CCL19	MIP-3β/ELC	CCR7	T cell and dendritic cell migration into paracortical areas of lymph nodes
CCL20	MIP-3α	CCR6	?
CCL21	SLC	CCR7	T cell and dendritic cell migration into paracortical areas of lymph nodes
CCL22	MDC	CCR4	T cell and basophil recruitment
CCL23	MPIF-1	CCR1	?
CCL24	Eotaxin-2	CCR3	Eosinophil, basophil, and Th2 recruitment
CCL25	TECK	CCR9	Intestinal migration
CCL26	Eotaxin-3	CCR3	Eosinophil, basophil, and Th2 recruitment
CCL27	CTACK	CCR10	Dermal cell migration
CCL28	MEC	CCR10	Mucosal cell migration
CXC chemokines			
CXCL1	GROα	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL2	GROβ	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL3	GROγ	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL4	PF-4	CXCR3b	Tumor suppression
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Neutrophil recruitment
CXCL9	Mig	CXCR3	Effector T cell recruitment
CXCL10	IP-10	CXCR3, CXCR3B	Effector T cell recruitment
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Effector T cell recruitment
CXCL12	SDF-1α/β	CXCR4	Mixed leukocyte recruitment; HIV co-receptor
CXCL13	BCA-1	CXCR5	B cell migration into follicles
CXCL14	BRAK		?
CXCL16	-	CXCR6	?
C chemokines			
XCL1	Lymphotactin	XCR1	T cell and NK cell recruitment
XCL2	SCM-1β	XCR1	?
CX3C chemokines			
CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1	T cell, NK cell, and monocyte recruitment; CTL and NK cell activation

برای تشخیص زودهنگام یا دقیق HIT و افتراق آن از دیگر ترومبوسیتوپنی‌ها از i) تست‌های Pre Test، ii) یافته‌های بالینی و iii) سیستم امتیازدهی 4T استفاده می‌شود. در روش امتیازدهی، یکی از دو سیستم گریفسوالد آلمان (GW) یا همیلتون کانادا استفاده می‌شود که در آن، شدت ترومبوسیتوپنی، زمان افت پلاکت، احتمال بروز ترومبوز و دیگر عوارض HIT مورد بررسی و امتیازدهی قرار می‌گیرد (در سیستم GW، افت ۵۰ درصدی شمارش پلاکت یا افت آن به میزان ۱۰۰۰۰۰-۳۰۰۰۰۰/μl دارای امتیاز ۲ بوده، در حالی که در سیستم همیلتون ۱ امتیاز محسوب می‌شود). در روش‌های آزمایشگاهی ابتدا تست‌های ایمونولوژیکی بررسی آنتی‌بادی ضد PF4-Heparin بررسی می‌شوند (با روش ELISA) که ممکن است به دلیل نقش ضد میکروبی و طبیعی آن، در درصد بالایی از بیماران مثبت باشد، بدون آنکه فرد علایم HIT و HITT را نظاهر کند (این نوع آنتی‌بادی‌ها می‌توانند زمان شروع علایم HIT را تسریع کنند). این تست که به PaGIA[1] نیز معروف است، دارای حساسیت بالا ولی اختصاصیت پایین بوده و لذا روش مناسبی برای غربالگری اولیه بیماری HIT محسوب می‌شود و جالب اینکه، هرچه نتیجه یا OD تست ELISA در مورد anti-PF4/Heparin از ۰/۵ بالاتر باشد، ریسک نسبی ایجاد ترومبوز و احتمال فعال‌سازی پلاکت‌ها نیز بالاتر خواهد بود. بدین ترتیب برای تشخیص HIT ترکیبی از علایم بالینی و آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته و الگوریتم (یا فلوچارتی) برای آن رسم می‌شود، که اگر کسی امتیاز بالای ۴ را در سیستم 4T کسب کرده و مقدار OD تست PaGIA آن بالای ۰/۵ باشد، به احتمال زیاد مبتلا به HIT خواهد شد. با توجه با اختصاصیت پایین تست بررسی آنتی‌بادی و وجود موارد بالایی از مثبت کاذب، همواره بهتر است در کنار تست‌های ایمونولوژیک از تست‌های بررسی عملکرد پلاکتی (PAA)[1] مثل SRA[2] نیز استفاده شود. همچنین به دلیل نتایج مثبت کاذب بالا در تست‌های سرولوژیکی بهتر است به‌جای استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال IgG/A/M، فقط از IgG استفاده نمود که باعث افزایش اختصاصیت تست شده، میزان موارد مثبت کاذب را کاهش می‌دهد ولی تا حدودی حساسیت تست را نیز کاهش می‌دهد. در مورد تست‌های SRA، سه نوع عملکرد وجود دارد: در واقع این تست رهاسازی گرانول δ (حاوی سروتونین، ADP و ATP) را مورد بررسی قرار می‌دهد. در یک روش، ATP آزاد شده باعث فعال شدن آنزیم لوسیفراز و تولید نور مرئی می‌شود که سنجش مقدار آن برآیندی از میزان دگرانولاسیون پلاکتی خواهد بود (روش lumaggregometery)، در روش بعدی مقادیر ADP، ATP و سروتونین آزاد شده مستقیماً مورد سنجش قرار می‌گیرند و در روش سوم، ابتدا پلاکت‌ها را با سروتونین رادیواکتیو نشاندار کرده و سپس میزان رهاسازی مواد رادیواکتیو از پلاکت‌های فعال شده را مورد سنجش قرار می‌دهند. رهاسازی طبیعی گرانول δ می‌تواند نشانه‌ای از رهاسازی گرانول α هم باشد. نکته دیگر این‌که، از آنجایی که واکنش بین هپارین و کمپلکس GAG-PF4 به تناسب وزنی ایده‌آل بین اجزاء آن بستگی

جدول ۱۰-۵۱: سیستم امتیاز دهی Pre Test برای تشخیص اولیه HIT [۷].

4Ts	کسب ۲ امتیاز	کسب ۱ امتیاز	بدون کسب امتیاز
ترومبوسیتوپنی Thrombocytopenia	افت بالای ۵۰ درصدی پلاکت یا افت شمارش پلاکتی به میزان ۱۰۰۰۰۰-۴۰۰۰۰۰/µl*	افت ۳۰-۵۰ درصدی پلاکت یا افت شمارش پلاکتی به میزان ۱۰۰۰۰-۱۹۰۰۰/µl	افت کمتر از ۳۰ درصدی پلاکت افت شمارش پلاکتی به میزان کمتر از ۱۰۰۰۰/µl
مدت زمانی که در آن پلاکت افت می‌کند Timing of platelet count fall	شروع واضح طی ۱۰-۵ روز از آغاز درمان یا افت پلاکت در کمتر از ۱ روز (قبل از مواجهه با هپارین طی ۳۰ روز اخیر)†	شروع بیماری طی ۱۰-۵ روز بوده ولی شروع دقیق آن مشخص و واضح نبوده و در این مدت شمارش پلاکت بسیار کنترل نشده است، یا شروع آن بعد از روز ۱۰‡ یا افت پلاکت در کمتر از ۱ روز (قبل از مواجهه با هپارین طی ۱۰۰-۳۰ روز اخیر)	افت شمارش پلاکت در کمتر از ۴ روز بدون مواجهه اخیر با هپارین
ترومبوز یا دیگر عوارض آن Thrombosis or other sequelae	ترومبوز جدید تأیید شده، نکروز پوستی در محل تزریق§، واکنش حاد سیستمیک بعد از تزریق بولوس UFH	ترومبوزهای پیشرونده یا عود شونده¶، ضایعات پوستی غیر نکروتیک (اریتما)، ترومبوزهای مشکوک غیر ثابت شده#	ندارد
دیگر علل ترومبوسیتوپنی oTher causes for thrombocytopenia	غیر آشکار	مشکوک**	قطعی و آشکار**

*Greifswald, Germany (GW): platelet count fall >50% or nadir 20–100 k/µL; Hamilton, Canada (but not GW): Platelet count fall >50% directly resulting from surgery counts as 1 point, rather than 2 points.
†GW: onset from days 5–14 (rather than days 5–10); platelet fall within 1 day (heparin exposure within 100 days).
‡GW: onset after day 14.
§Skin lesions at heparin injection sites.
¶Progression refers to objectively documented increase in thrombus size (usually, extension of deep vein thrombosis by ultrasonography); recurrence refers to newly formed thromboembolus in previously affected region (usually, new perfusion defects in a patient with previous pulmonary embolism).
#In GW, "suspected thrombosis (not proven)" was not included as a criterion.
**Determination of whether the presence of another apparent cause of thrombocytopenia was "possible" or "definite" was at the discretion of the investigator.

Property	Unfractionated heparin	LMWH	Fondaparinux
Source	Animal origin	Animal origin	Synthetic
Biologic effect	Multitargeted inhibitory activity, primarily factors IIa and Xa, but also IXa, XIa, and XIIa	Untargeted inhibitory activity, primarily factor Xa, but also IIa (and to a lesser extent IXa)	Selective and specific inhibition of factor Xa
Half-life (s.c. route)	~3 hrs	~4 hrs; requires twice-daily injections for some indications; once-daily injections appropriate for others	17-21 hrs; allows for once-daily injection for all indications
Binding to proteins other than target	+++	++	None detected at therapeutic range
Bioavailability (s.c. route)	~20%	> 90%	~100%
Route of elimination	Reticuloendothelial and endothelial, also renal (minor)	Renal (predominantly)	Renal
Platelets	Inhibition of platelet function and aggregation contributes to heparin-associated hemorrhagic complications	Some effect on function and aggregation	No effect on function or aggregation
Induced thrombocytopenia (HIT response)	2-5%	1-2%, cross-reactivity when heparin is positive for PF4	Not observed; resistant to PF4
Dosing in DVT prophylaxis	2-3 times/day	1-2 times/day	Once/day
Inter- or intrapatient variability	+++	++	+
Monitoring	aPTT, platelet count	Platelet count	None required

شکل ۳۰-۵.۵- تفاوت ساختمان و عملکرد UFH و LMWH (انوکساپارین) و فوندا‌پاریوکس (آریکسترا). AT-III روی فاکتورهای ریموزی و فاکتورهای متصل به سطح پلاکت می‌اثر است. دایمر AT-III و هپارین با ترومبین کمپلکس سه تایی با نسبت ۱:۱:۱ ایجاد نموده و بدین ترتیب ترومبین (و دیگر فاکتورهای مذکور) را از نظر آنزیمی غیرفعال می‌سازند. در حضور هپارین، سرعت واکنش بین ترومبین و آنتی ترومبین III حدود ۲۰۰۰ برابر افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است که AT-III برای مهار ترومبین به هپارین‌های بلند HMWH نیاز نداشته ولی برای مهار فاکتور X حضور هپارین‌های کوتاه و حتی پنتاساکارید نیز کفایت می‌کند. این در حالی است که قدرت مهار ترومبین در این دو هپارین بسیار پایین است. از این رو برای کنترل و پایش درمانی HMWH از تست aPTT و برای پایش درمانی هپارین‌های LMWH و فوندا‌پاریوکس از تست Anti-Xa assay یا ACT استفاده می‌شود [۶].

جدول ۴: برخی خصوصیات ساختاری و فارماکوکینتیک انواع مختلف داروهای LMWH [۸]

Name	Trade name	Manufacturer	Synonyms	Defractionation method	Halflife (h)	Factor Xa:IIa ratio (daltons)	Average molecular weight (U)
Marketed in U.S.							
Enoxaparin	Lovenox®	Rhone-Poulenc Rorer	PK 10169 Enoxaparine Pharmuka 10169	Benzylation and alkaline depolymerization	4.5	2.7:1	4,500
Dalteparin	Fragmin®	Pharmacia and Upjohn	FR 860 Kabi 2165 Tedelparin	Nitrous acid depolymerization	2-4	2.0:1	4,000-6,000
Ardeparin	Normiflo®	Wyeth-Ayerst	RD 11885	Peroxidative depolymerization	1.2-3.3	2.0:1	5,600-6,500
Used worldwide							
Nadroparin		Sanofi	CY 216D Fraxiparin Seleparina	Nitrous acid depolymerization	3.5	2-4.1	4,500
Pamaparin		Opocrin	OP 2123 Alpha LMWH Fluxum Moridalton	Cupric acid and hydrogen peroxide degradation	4	3:1	4,500-5,000
Reviparin		Knoll	LU 473111 Clivarin	Nitrous acid depolymerization	NA	3-5:1	4,300
Tinzaparin		Novo	Logiparin Novo LHN 1 Innohep	Enzymatic degradation	1.3	2:1	4,900
Bioparin		Biobetica	–	NA	NA	NA	NA
Miniparin		Syntax	–	NA	NA	NA	NA
Sandoparin		Sandoz	Monoembolex	NA	NA	NA	NA

تست Anti Xa assay/Activity یا تست AXA :

در موارد چاقی، دوران طفولیت یا پیری، نارسایی یا اختلالات کلیوی، دوز بالای فاکتور VIII، ابتلاء به سندرم آنتی‌فسفولیپید (APS)، افزایش aPTT، خونریزی، عوارض ترومبوتیک، حاملگی و مقاومت به هپارین، به‌ویژه در هپارین LMWH که پایش آن با تست aPTT قابل پیش‌بینی نیست، از تست AXA استفاده می‌شود. البته در افراد غیرموارد فوق، به دلیل پایین بودن ریسک HIT و کم بودن اتصال به پروتئین‌های پلاسمایی نیازی به پایش روتین و روزانه LMWH نیست*. در این تست، غلظت هپارین موجود در خون از طریق قدرت hep+AT-III در خنثی کردن فاکتور Xa مورد بررسی و سنجش قرار می‌گیرد. نوع هپارین تجویز شده می‌بایست قبل از انجام تست مشخص باشد و پیش از ۴ ساعت از تزریق هپارین یا زمان نمونه‌گیری سپری نشده باشد. پلاسمای عاری از پلاکت (PPP) نیز می‌بایست رأس ۱ ساعت از سلول‌ها جدا شده باشد و در صورتی که طی ۲ ساعت مورد آزمایش قرار نگیرد، در فریزر ۲۰- نگهداری شود.

روش:

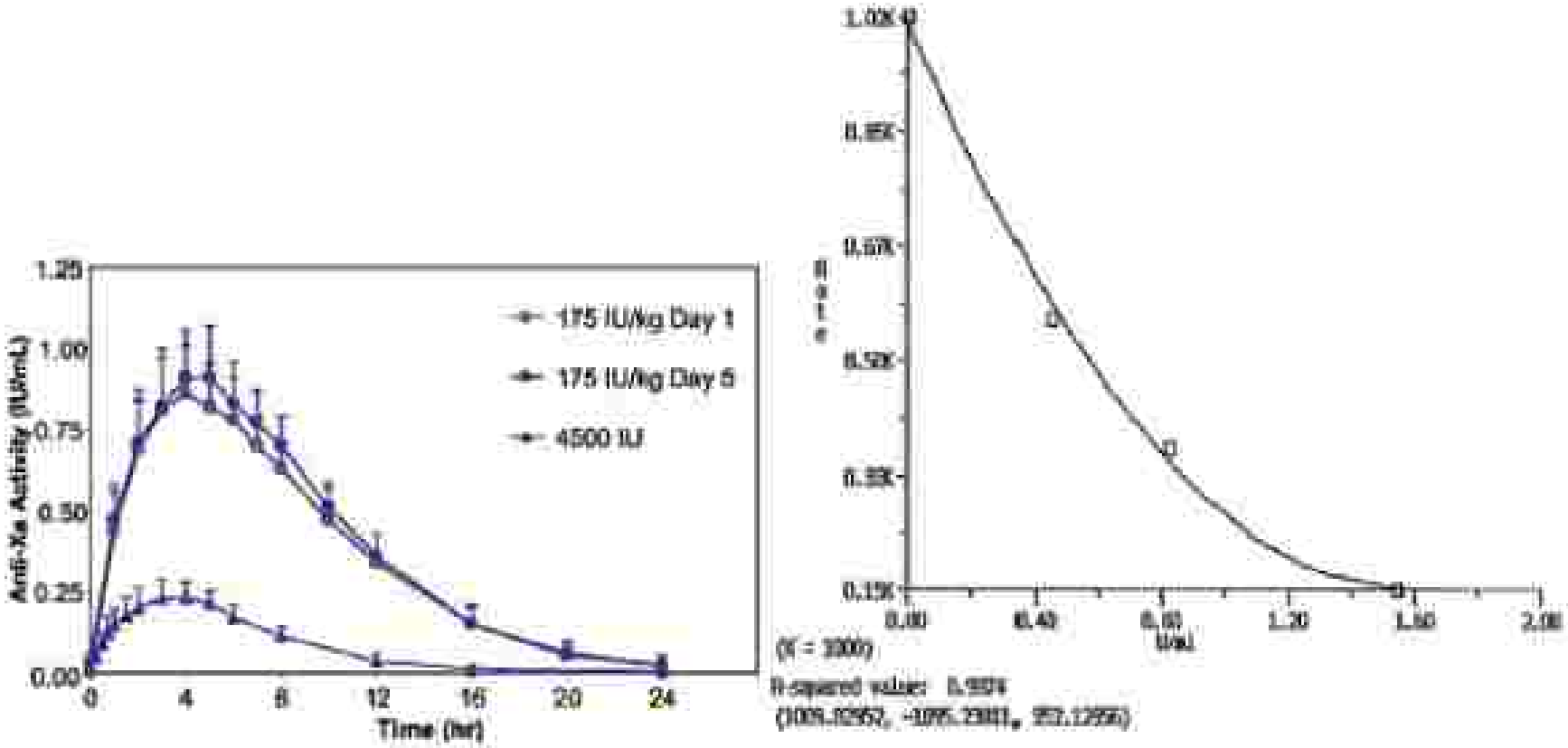
در این تست، مقدار مشخصی از پلاسما با مقدار مشخصی AT-III (چون به دلیل تجویز هپارین در بدن، AT-III مصرف می‌شود) و مقدار مشخص و ثابتی

Xa کاوی (برای استاندارد‌سازی Xa فعال به زیموژن) مخلوط و تا ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه می‌شود. طی این مدت بسته به مقدار هپارین موجود در پلاسمای بیمار و با توجه به تشکیل ترمبر Xa-ATIII-Hep مقداری از فاکتور Xa فعال کاوی مصرف و خنثی شده و مابقی آن سنجش می‌شود. برای این منظور، به مخلوط فوق RPNA (آرژنین-پارانیترو آنیلین) اضافه می‌شود که در اثر عملکرد فاکتور Xa باقی مانده، ریشه R-COOH از آن جدا شده و رنگ زردی متناسب با معکوس مقدار هپارین ایجاد می‌شود که جذب آن در طول موج ۴۰۵nm قرائت می‌شود. هر چه رنگ زرد و یا نور جذبی کمتر باشد، یعنی فاکتور Xa کمتری باقی مانده و لذا هپارین پلاسمایی زیادی برای خنثی کردن آن تجویز شده است. از این رو نمودار نزولی بوده و با افزایش غلظت هپارین، نمودار کاهش می‌یابد. قبل از انجام تست بیمار، ترسیم یک منحنی استاندارد الزامی است که برای این کار از غلظت‌های سرمیالی هپارین استفاده می‌شود. برای این منظور پلاسماهای تجاری با غلظت‌های مشخص و سرمیالی هپارین LMWH نیز وجود دارند که در جدول زیر به یک نمونه از آن اشاره شده است.

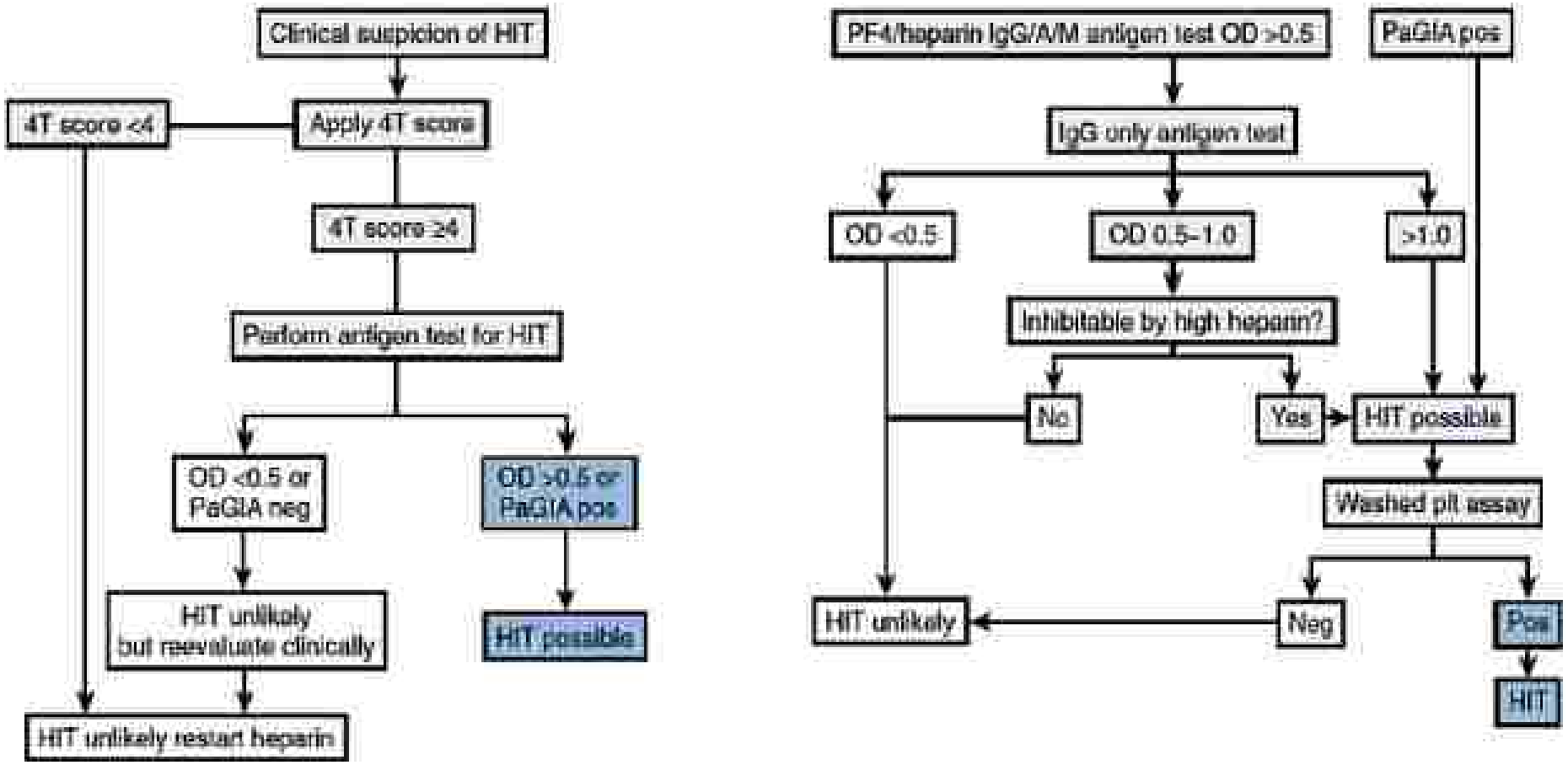
↑ هپارین ← ↑ فعالیت ضد Xa ← ↓ مقدار فاکتور Xa باقی مانده کاوی ← ↓ ریشه آزاد R-COOH ← ↓ نور زرد ← ↓ جذب نوری

Reference LMWH concentrations	0.00 U/mL	0.45 U/mL	0.82 U/mL	1.54 U/mL
Absorbance at 405nm	1017	564	368	154

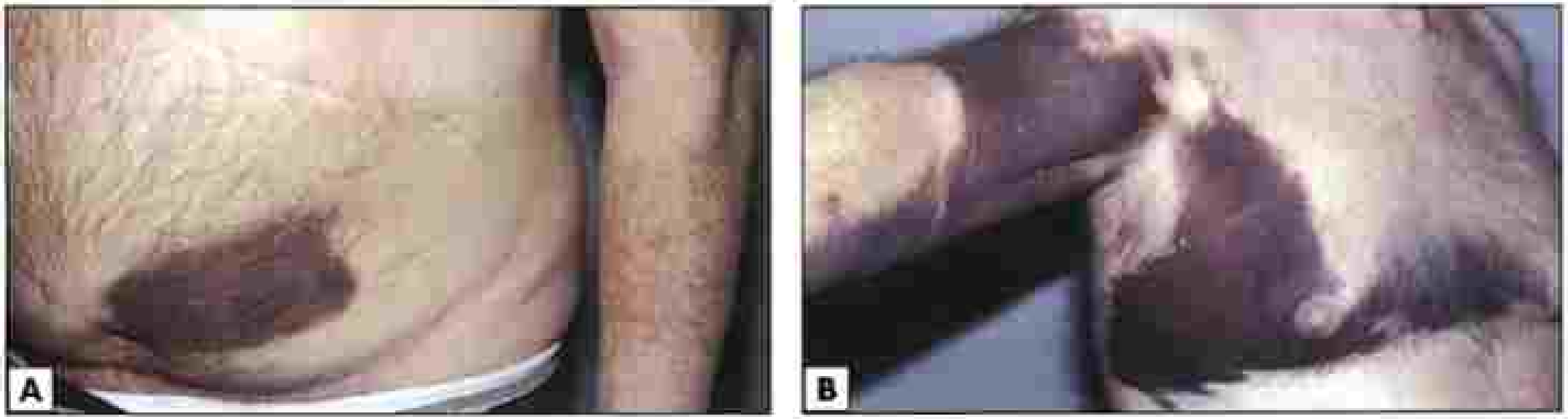
دوز پروفیلاکسی Anti-Xa-Activity برای UFH (Anti-Factor Xa UFH) می‌بایست ۰/۱-۰/۴U/ml و دوز درمانی آن ۰/۳-۰/۷U/ml باشد. حال آنکه دوز درمانی برای LMWH حدود ۰/۵-۱/۱U/ml می‌باشد. مقدار مرجع سطح آنتی Xa به نوع و دوز هپارین، برنامه زمانی و اندیکاسیون یا علت تزریق هپارین بستگی دارد. در مواردی که فردی هپارین دریافت نکرده باشد، مقدار تست می‌بایست صفر یا غیرقابل سنجش باشد. مقدار هپارین UFH، علاوه بر تست‌های aPTT و AXA، به وسیله روش تیتراسیون پروتامین[1] نیز پایش می‌شود که دوز درمانی هپارین با این روش ۰/۲-۰/۴IU/ml با مقدار هپارین درمانی ۰/۳-۰/۷IU/ml به روش AXA برابری می‌کند.



شکل ۳۳-۵: نمودار سمت راست) نمودار استاندارد تست Anti-Xa activity در ترسیم نمودار غلظت هپارین در محور X و جذب نوری در محور Y وارد می‌شود. از برآیند مختصات فوق یک نمودار خطی یا منحنی «ومجهولی حاصل می‌شود که بیشترین تاثیر خطی آن در غلظت هپارینی IU/ml (۰/۱-۰/۰۱) حاصل می‌شود. در این ناحیه خطی پیش‌بینی دور دومالی هپارین به راحتی صورت می‌گیرد. نمودار سمت چپ) ارتباط زمانی بین حداکثر فعالیت Anti-Xa با زمان نمونه‌گیری بعد از تزریق هپارین. همان‌طوری‌که مشهود است ماکزیمم فعالیت ضد Xa حدود از ۴-۳ ساعت بعد از تجویز آن ایجاد می‌شود و این حالت برای غلظت‌های مختلف نیز صادق است.



شکل ۴۷-۵۱: الگوریتم یا فلوچارت تشخیص زودهنگام HIT بر اساس امتیاز 4T و تست PaGIA. در فلوچارت سمت چپ: ۱- اگر بیمار امتیاز بالای ۴ را در سیستم 4T کسب نکند، نیازی به تست جای بیشتر نداشته و می‌تواند تزریق هپارین خود را ادامه دهد. ۲- اگر امتیاز سیستم 4T زیر ۴ و OD تست EIA یا PaGIA صفر یا زیر ۰/۵ باشد، احتمال HIT پایین بوده و می‌توان تزریق هپارین را ادامه داد. ۳- اگر امتیاز سیستم 4T بالای ۴ و OD تست PaGIA نیز بالای ۰/۵ باشد، احتمال HIT محرز بوده و تزریق هپارین می‌بایست قطع گردد. ۴- اگر تست PaGIA مثبت و یا نتیجه IgG ضد PF4-Heparin بالای ۱ بود، احتمال HIT بالا بوده و می‌بایست بر روی آن تست SRA یا FRP شسته انجام داد (سرم بیمار + RFR قرمز سالم) که در صورت مثبت بودن، بروز HIT محرز شده و به احتمال قوی آنتی‌بادی از نوع فعال کننده پلاکت خواهد بود که در این هنگام تجویز هپارین می‌بایست متوقف شود. ولی اگر تست صلکتری SRA منفی شد، حتی‌رغم بالا بودن IgG احتمال بروز HIT رد شده و می‌توان تزریق هپارین را ادامه داد. ۵- ولی اگر نتیجه تست IgG ضعیف و OD آن بین ۱-۰/۵ باشد، احتمالاً این آنتی‌بادی از نوع فعال‌کننده پلاکت نخواهد بود که برای اطمینان کامل و تأیید نهایی، تست یک بار دیگر با مقادیر بالاتر هپارین تکرار می‌شود. اگر واکنش پذیری مهار نشود، احتمال HIT رد شده و می‌توان تزریق هپارین را ادامه داد. ۶- در نهایت می‌توان وضعیت بالینی بیمار را با نتایج آزمایشگاهی وی مقایسه و بازبینی نمود تا نتیجه نهایی را تأیید یا رد نمود. لازم به ذکر است، تکرار مجدد تست EIA برای افرادی که تست EIA اولیه منفی دارند، کاربرد موردی خواهد بود، چرا که این تست حتی در مراحل اولیه HIT نیز مثبت می‌شود و احتمال مثبت شدن آن با تکرار مجدد، تست وجود ندارد [۲].



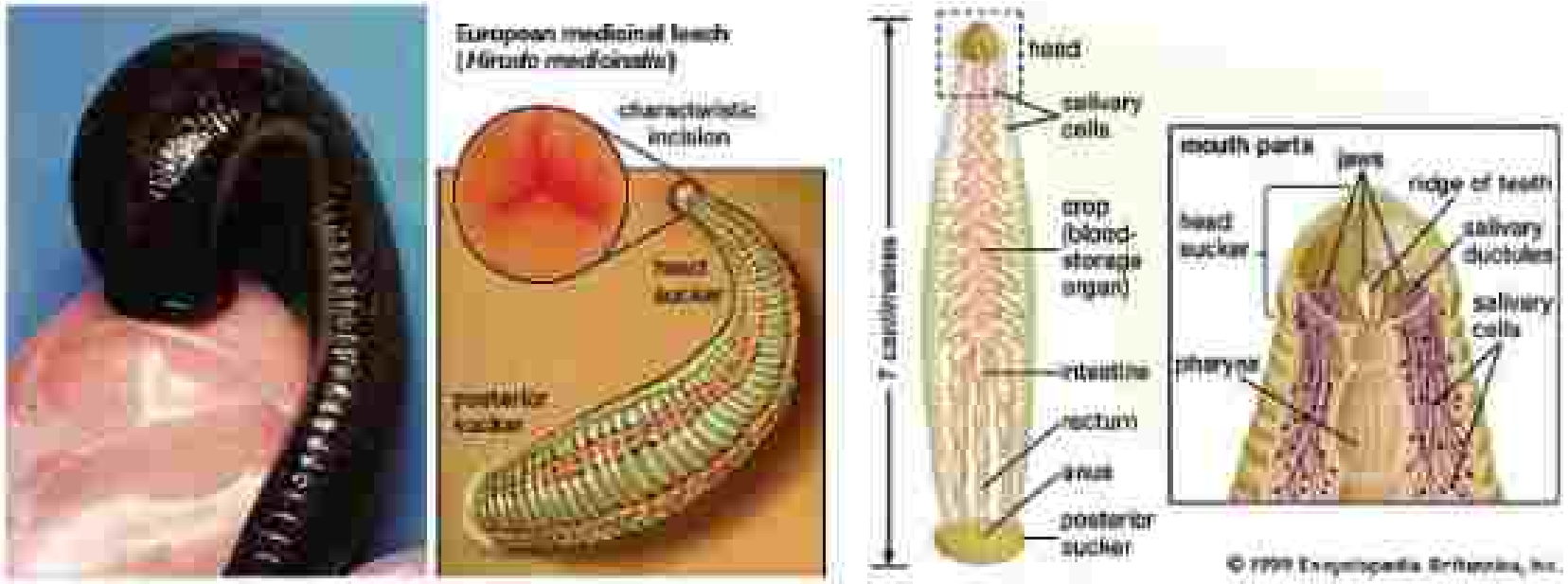
شکل ۹۰-۵۸: عوارض خونریزی‌دهنده ناشی از تزریق هپارین که در تصویر A: هماتوم در محل تزریق را نشان داده ولی در شکل B عوارض خونریزی دهنده سیستمیک در نواحی دور از محل تزریق را نشان می‌دهد.

شکل ۹۱-۵۸: خونریزی و هماتوم در محل تزریق هپارین به اطراف ناف

داروهای مهارکننده مستقیم ترومبین (DTI):

از این مجموعه می‌توان به لپیرودین یا هیرودین (رفلودان)، آرگاتروبان، بی‌والیرودین (آنژیوماکس) و اکزانتا (زیملاگاتران)[1] اشاره نمود که به‌جز مورد آخر، مابقی دارای تأییدیه FDA هستند. این داروها بدون نیاز به AT-III یا HCF-II و با اتصال به یک یا چند جایگاه خاص از ترومبین، یعنی جایگاه فعال، جایگاه شناسایی سوبسترا (اگزوسایت ۱) یا جایگاه اتصال به فیبرین (اگزوسایت ۲) قادر به مهار مستقیم ترومبین هستند که برای این منظور مهار یک یا هر دو جایگاه فعال یا اگزوسایت ۱ الزامی است. آرگاتروبان و اکزانتا با اتصال به جایگاه فعال، بی‌والیرودین با اتصال به اگزوسایت ۱ و هیرودین با اتصال به هر دو جایگاه باعث مهار ترومبین و مسیر مشترک انعقادی می‌شوند. از داروهای مهارکننده مستقیم فاکتور X (نه ترومبین) هم که نیازی به مونیتورینگ ندارند، می‌توان به dabigatran، rivaroxaban، Apixaban، Betrixaban، Darexaban و Edoxaban اشاره نمود.

شکل ۳۴-۵: نحوه عملکرد ضدانعقادهای مستقیم ترومبین (DTI) اتصال هیرودین غیرقابل برگشت و اتصال آرگاتروبان برگشت‌پذیر است.

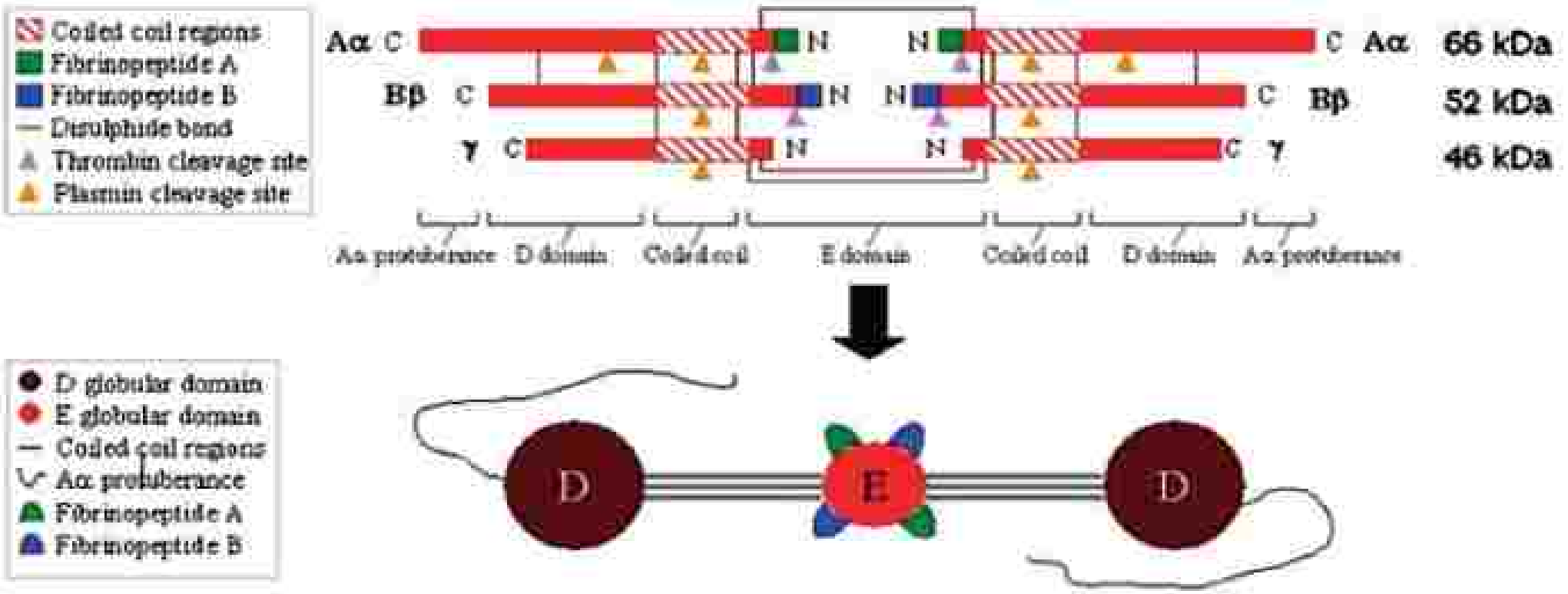


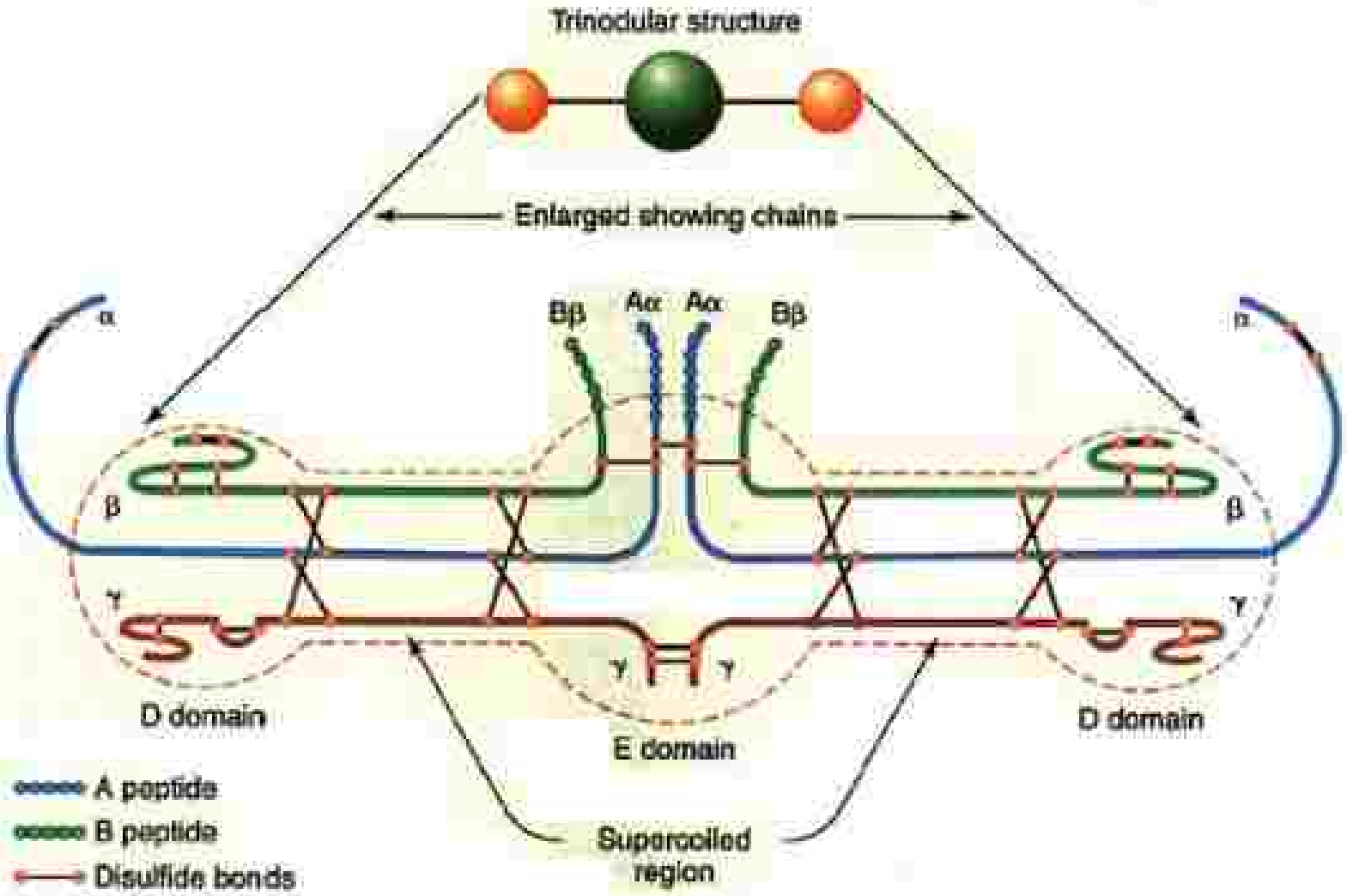
شکل ۳۶-۵۵. زالوی *Hirudo medicinalis* و غدد بزاقی آن که فرآورده ضد انعقادی آن برای کاربردهای درمانی استفاده می‌شود.

شکل ۳۶-۵۵. فرمول ساختاری و انواع مختلف فرآورده هیرودین تجاری: پودری شکل، کپسول و آمپول تزریقی (رفلودان و لیرودین)

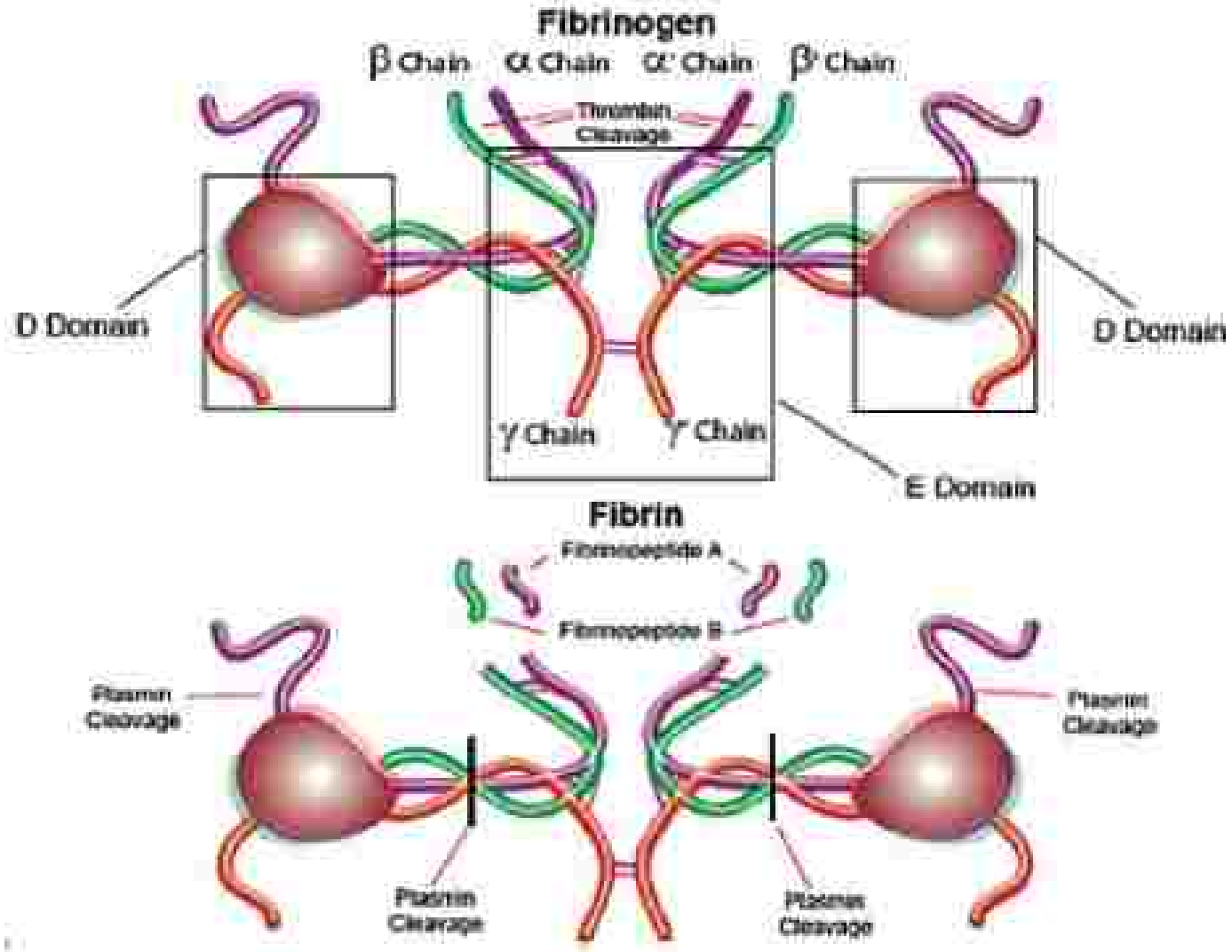
جدول ۲. خلاصه خصوصیات داروهای مختلف ضد انعقادی

خصوصیات	لپیرودین (لپتادین یا میوپرین)	آرگاتروبان (آرگاترا)	دیمارپاسین (آنژیومکس)	هپارین (پاکارین)	هپتاپنتاسودیم (پنتاساکارید)
جذب مواد غذایی (F)	۶۰٪	۵۴٪	۲۱٪	۵۰٪	۱۲٪
نیمه‌عمر فرم داخلی (بازسازی کلیوی) (بازسازی کبدی)	۱/۳ ساعت ۰/۷-۲ ساعت ۱/۳ ساعت	(۳۹-۵۱) دقیقه ۳۰ دقیقه ۵۰ دقیقه	۲۳-۲۱ ساعت	۲۳ ساعت طولانی ۲۴ ساعت	(۱۹-۲۱) ساعت طولانی ۲۰ ساعت
محل کلیرانس و متابولیسم	کبدی	کبدی	آنزیماتیک (توسط ترومبین)	کبدی	کلیه
اندیکاسیون مصرف مورد تأیید FDA	داروهای HIT	داروهای HIT در بیماران مبتلا به HIT که تحت PCI قرار می‌گیرند	در بیماران مبتلا یا در معرض خطر HIT و HITT که تحت PCI قرار می‌گیرند	-	-
غلظت‌هایی که دارو بدون تغییر توسط کلیه دفع می‌شود	۲۵٪	۱/۵	۲۰٪	۱۰۰-۱۴۰٪	۱۰۰٪
تست پایش دارو	aPTT, ECT	aPTT, ACT	aPTT, ECT, ACT	ACT	نمی‌باشد
مقدار هدف	aPTT حدود ۱/۵-۲/۵ برابر نرمال	aPTT حدود ۱/۵-۳ برابر نرمال	aPTT حدود ۱/۵-۲/۵ برابر نرمال	۱۴۰-۱۶۰ ثانیه	-
اثر دارو بر HITT	متوسط تا شدید	متوسط تا شدید	کمتر تا متوسط	بدون	بدون
آنتی‌دوت	ندارد	ندارد	ندارد	دارد	دارد
دوز اولیه	HIT: 0.1mg/Kg/hr HITT 0.4mg/kg/hr Bolus, Then 0.15 mg/Kg/hr (up to 10.5mg/h) (اگر کلیرانس سرم به ۱/۵-۲mg/dl برسد دوز نصف می‌شود)	0.2-10mg/Kg/min این که aPTT به ۱/۵-۳ برابر مقدار نرمال برسد و aPTT به بالای ۱۰۰ ثانیه برسد دو بیماران کسانی دارد ۲-۳ برابر کاهش می‌یابد	0.15mg/Kg/hr	HIT: 750-1250U/SC مقدار U and X فرزین بیهوشی SC دو بار در روز (1.4) HITT: Bolus 1250U for <55Kg 2500U for 55-90Kg 3750U for >90Kg Then 150-500U/hr	2.5-10mg/day
هزینه هر mg هزینه هر دوز	[illegible] [illegible]	[illegible] [illegible]	- -	[illegible] [illegible] [illegible]	- -

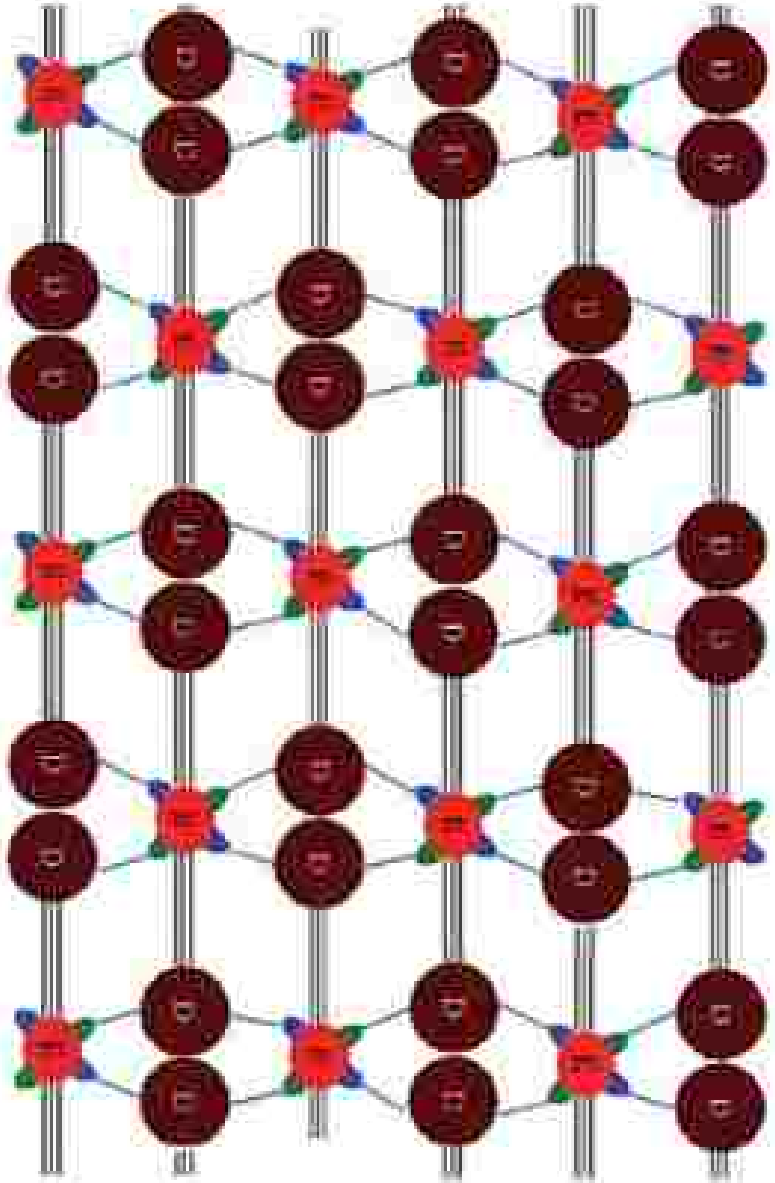

Coiled coil regions
Fibrinopeptide A
Fibrinopeptide B
Disulphide bond
Thrombin cleavage site
Plasmin cleavage site
Aα
Bβ
γ
C
N
66 kDa
52 kDa
46 kDa
Aα protuberance
D domain
Coiled coil
E domain
D globular domain
E globular domain
Coiled coil regions
Aα protuberance
Fibrinopeptide A
Fibrinopeptide B
D
E

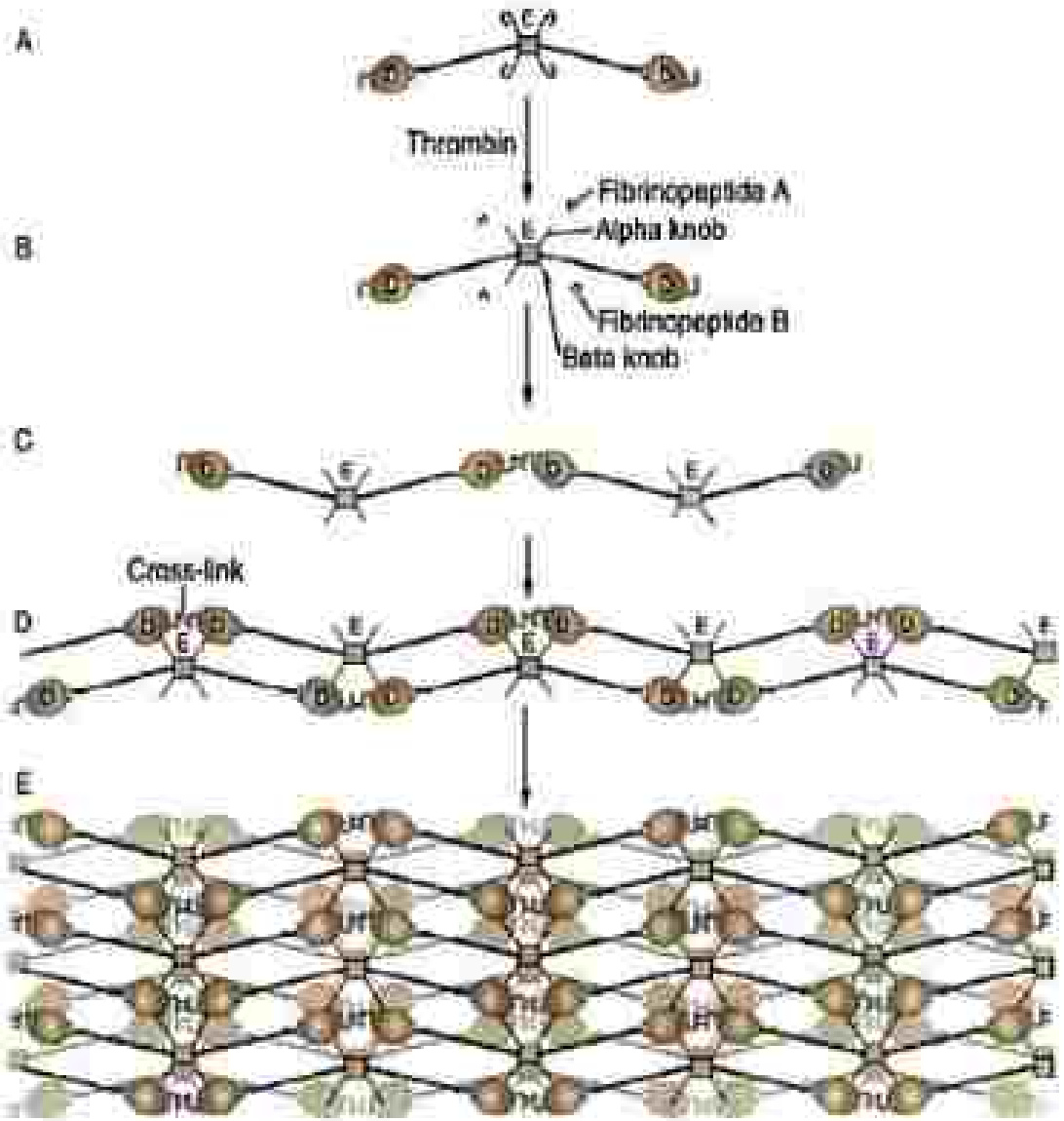


شکل ۳۰-۵۳: سایز فیبرینوژن: ۴۷ nm - ۴۵ ، سایز D: 5nm ، سایز E: ۷ nm ، قطر مارپیچ سه‌تایی: ۱ nm ، طول هر مارپیچ: ۱۶ nm که با حساب تقارن دوطرفه آن ۳۲nm خواهد بود.



شکل ۳۱-۵۳: ساختار ۶ زنجیره‌ای فیبرینوژن که از ۲ دومن D و یک دومن E تشکیل می‌شود. دومن‌های E و D حاصل به هم پیچ خوردگی زنجیره‌های α و β و γ در مرکز و کناره‌های فیبرینوژن می‌باشند که البته زنجیره α از دومن D بیرون زده و دنباله α را می‌سازد. ترومبین با جدا کردن ۴ قطعه FPA1, FPA2, FPB1, FPB2 فیبرینوژن را به فیبرین مونومر تبدیل می‌کند. علاوه‌بر ترومبین، سموم ماری آتروکسین، آنکروود و آروین (حاوی آنزیم رپتیلاز) نیز قادر هستند با جداکردن فقط دوقطعه FPA1 و FPA2 از فیبرینوژن، باعث فعال شدن آن شوند. در دومن E حدود ۶ عدد NT وجود دارد ولی در هر دومن D فقط ۲ عدد CT وجود دارد که CT رشته α از آن خارج می‌شود. انتهای NT زنجیره γ در سمت داخل دومن E قرار داشته و توسط ترومبین بریده نمی‌شود.





شکل ۳۵-۵۳: مراحل تشکیل فیبرین پلی‌مر: A) فیبرینوژن غیرفعال، B) فیبرین مونومر تحت برش آنزیمی ترومبین، C) اتصال طولی فیبرین‌های مونومر، D) اتصالات عرضی بین E با D-D، و E) تشکیل شبکه وسیع از پلی‌مر فیبرینی که قرار گیری ارتروسیت‌ها و پلاکت‌ها در لابه‌لای آن باعث انسداد کامل ناحیه آسیب دیده می‌شود. لازم به ذکر است که ترومبین کل FPA و FPB را برش نزده، بلکه جزئی از آن را در سایت A و B قطع می‌کند [۷]

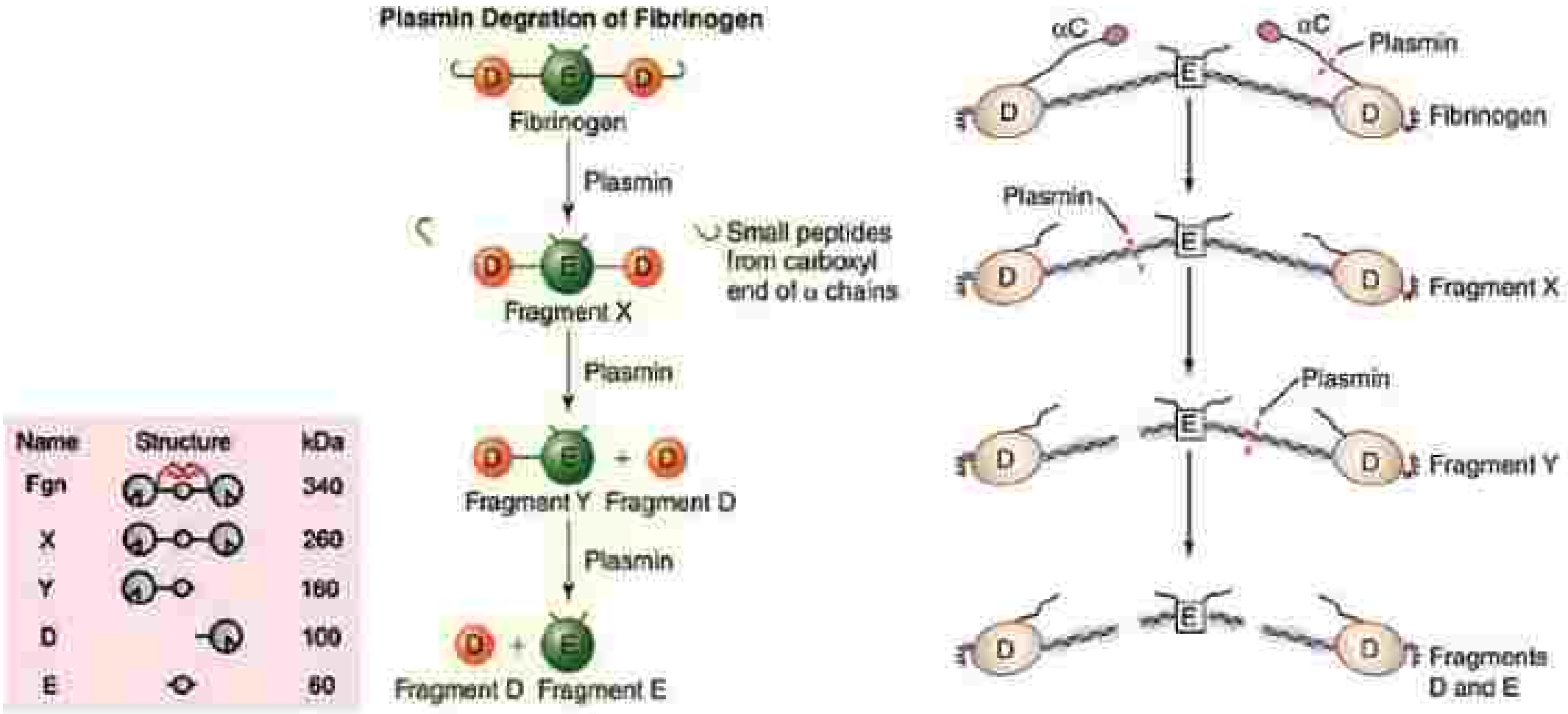
پلاسمینوژن در حضور ترومبین، استرپتوکیناز، اوروکیناز، فاکتور XII، u-PA و یا t-PA به پلاسمین تبدیل می‌شود که پروتئازی عمومی بوده و فیبرینوژن، فیبرین مونومر و فیبرین‌پلی‌مر را به قطعات ریز برش می‌زند. پلاسمین برخلاف ترومبین که فقط قادر به برش در سایت‌های A و B در فیبرینوژن هستند، هم روی فاصله بین E-D (ناحیه Coiled Coil)، هم روی GP-R و GP-H، هم روی ناحیه αC، هم روی زنجیره گاما و هم به سایت‌های A ,B اثر نموده و قادر است علاوه بر فیبرینوژن، روی فیبرین‌پلی‌مر نیز اثر کرده و آن را تجزیه کند. می‌توان فیبرینوژن و فیبرین مونومر را بر اساس نقاط مختلف برش پلاسمینی و در نتیجه وجود یا عدم وجود سه دومن D-E-D به چند جزء تقسیم نمود:

مجموع قطعات 2D+E+FPα+FPβ که هنوز قطعات FPA و FPB را داشته باشد، معادل فیبرینوژن محسوب می‌شوند.

مجموع قطعات 2D+E که فاقد قطعات FPA و FPB باشد، معادل فیبرین مونومر، فیبرین X یا قطعه X محسوب می‌شوند.

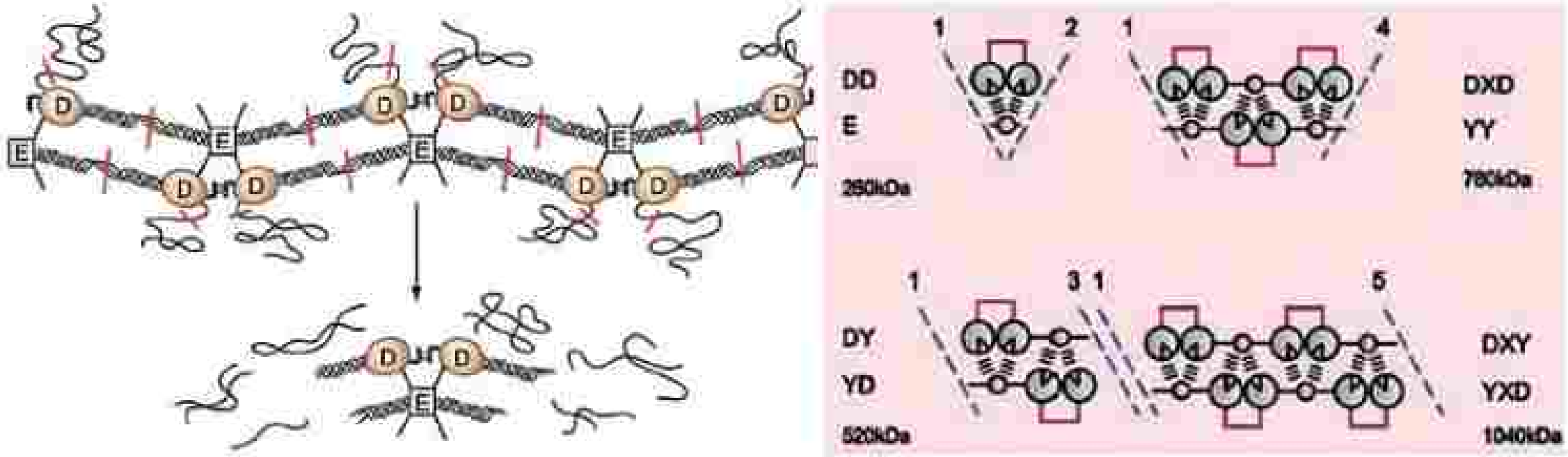
مجموع قطعات D+E که یکی از قطعات D را ندارد، معادل قطعه Y محسوب می‌شوند (Y+D=X).

قطعات مختلف E,D,Y,X را FDPs[1] یا محصولات تجزیه فیبرینوژن می‌گویند. از بین قطعات FDPs، فقط قطعه X است که به دلیل داشتن یک دومن E و دو دومن D قدرت پلی‌مریزاسیون داشته و قطعات D,E,Y چون ۲ سره نیستند، قدرت پلی‌مریزاسیون و برهمکنش دوطرفه را ندارند.

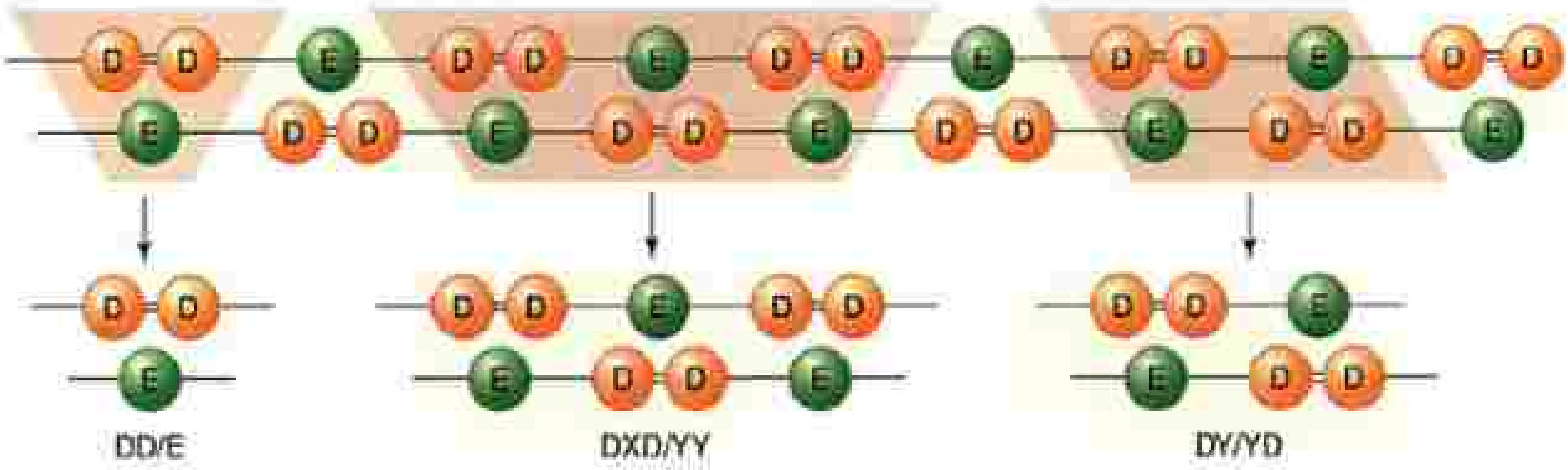


شکل ۳۶-۳۳: قطعات مختلف FDPs ناشی از تجزیه فیبرین مونومر و فیبرینوژن

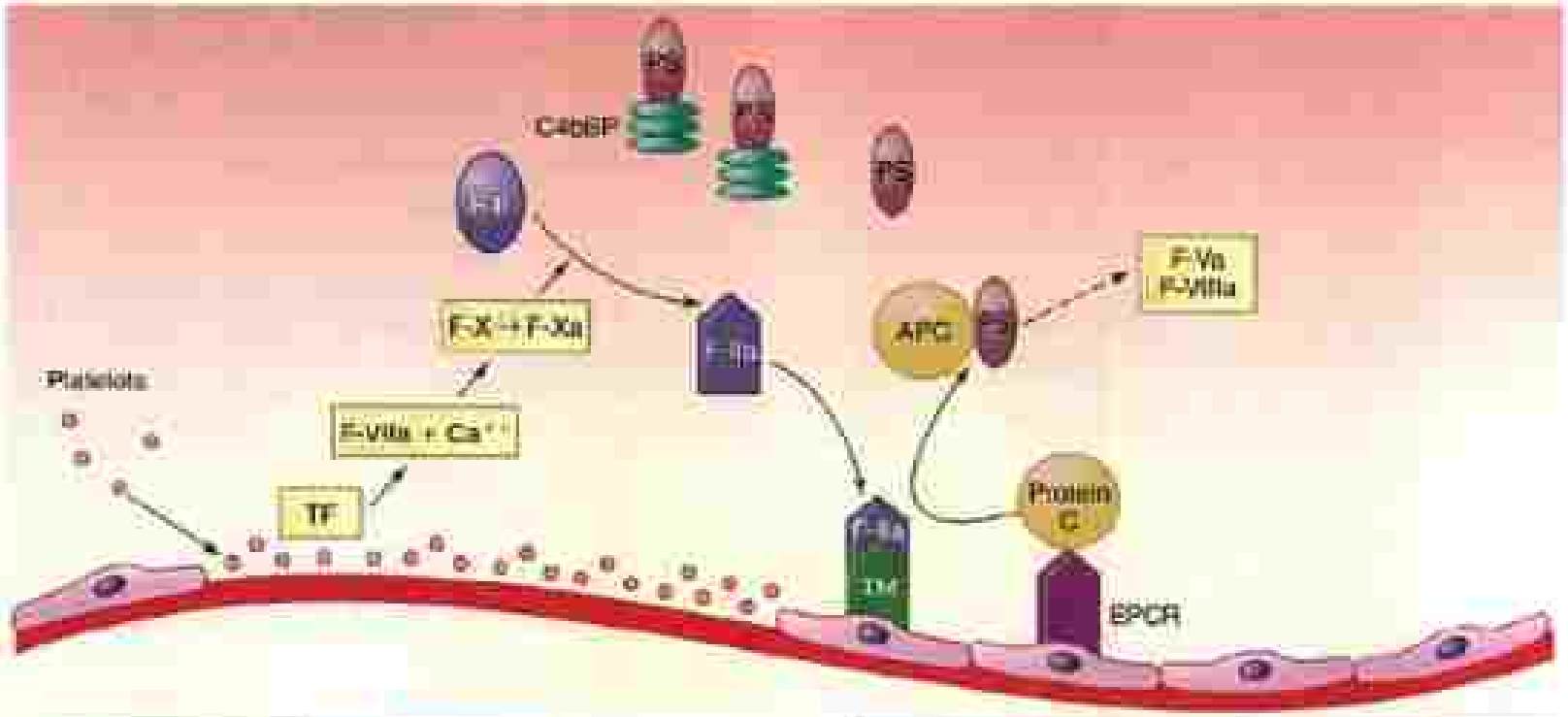
همان‌طوری‌که اشاره شد، تجزیه فیبرینوژن و فیبرین‌مونومر با پلاسمین باعث تشکیل قطعات مختلف FDPs می‌شود ولی تجزیه فیبرین پلی‌مر به دلیل وجود اتصالات عرضی کوالان بین دومن E با دو دومن D از فیبرین‌های دیگر، فراتر از FDPsها خواهد بود. در فرم پلی‌مر، اغلب برش‌ها در فواصل بین دومن‌های D و E ایجاد می‌شود. از این رو قطعات مختلف E, D,Y, X تشکیل می‌شوند ولی به‌جز آنها، ترکیبی از دومن E با دو دومن D (D2E) نیز ایجاد می‌شود که به دلیل حضور همواره دو دومن D متصل به E، به آنها قطعات D-دایمر (D-dimer) گفته می‌شود. از D-دایمرها می‌توان به قطعات DD/E, DD/DE, DDE/DE, DXD, YY(ED/DE), DD, YXD, YD و... اشاره نمود. تجزیه فیبرینوژن و فیبرین مونومر منجر به تشکیل D-دایمر نمی‌شود.

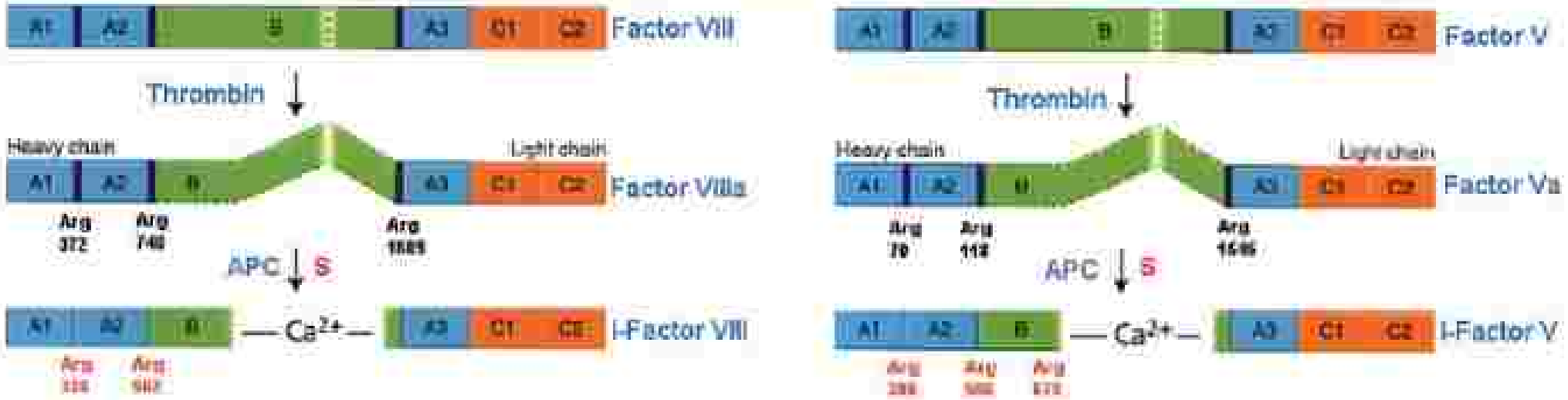


شکل ۳۷-۵: تشکیل D-dimer از پلی‌مر فیبرین توسط فاکتور فیبرینولیتیک پلاسمین



شکل ۳۸-۵۳: مثالی از انواع D-جدایش





شکل ۴۳-۵۳: نحوه فعالیت پروتئین C فعال (APC) در برش آرژنین‌های ۳۴۶ و ۵۶۲ فاکتور VIII و آرژنین‌های ۳۰۶، ۵۰۶ و ۶۷۹ فاکتور V. جهش آرژنین‌های مذکور باعث مقاومت فاکتور V و VIII به APC می‌شود که از آن جمله می‌توان به فاکتور V- لیدن (Arg506—Gln) و فاکتور V- کمبریج (Arg506—Thr) اشاره نمود. قسمت عمده Pro-S در اتصال به C4bp می‌باشد که یک پروتئین فاز حاد محسوب می‌شود. از این رو موارد مختلف التهابی (مثل عفونت، دخانیات، بدخیمی و عفونت) با افزایش C4bp و کاهش Pro-S آزاد، باعث افزایش ریسک ترومبوز می‌شوند.

می‌شود. فعال شدن فاکتور V توسط ترومبین، در سه ناحیه Arg70-Ser71، Arg118-Thr119 و Arg1545-Ser1546 صورت می‌گیرد. فاکتور Va باعث کنار هم قرار دادن X-V-II و تسهیل اثر Xa بر روی پروترومبین می‌شود، ازاین‌رو به آن پرواکسلرین، پروترومبین اکسلراتور، اکسلراتور گلبولین (ACG) یا ترومبوژنوگلوبین نیز گفته می‌شود. علاوه بر ترومبین، پلاسمین، پاپائین، خود فاکتور Xa و سم مار راسل نیز قادر به فعال‌کردن نسبی فاکتور V هستند. پنی‌سیلین و آمینوگلیکوزیدها با تحریک ایجاد نئوآنتی‌ژن در سطح فاکتورهای V و VIII باعث تولید آنتی‌بادی بر ضد آنها شده و نهایتاً باعث کاهش مقدار یا عملکرد آنها می‌شوند. از آنجایی که فاکتور Vعمدتاً در اتصال به پلاکت حمل می‌شود، از این رو در کمبود فاکتور V، علاوه بر تزریق FFP و کرایو، تزریق پلاکت نیز کمک کننده بوده و باعث افزایش سطح پلاسمایی آن می‌شود.

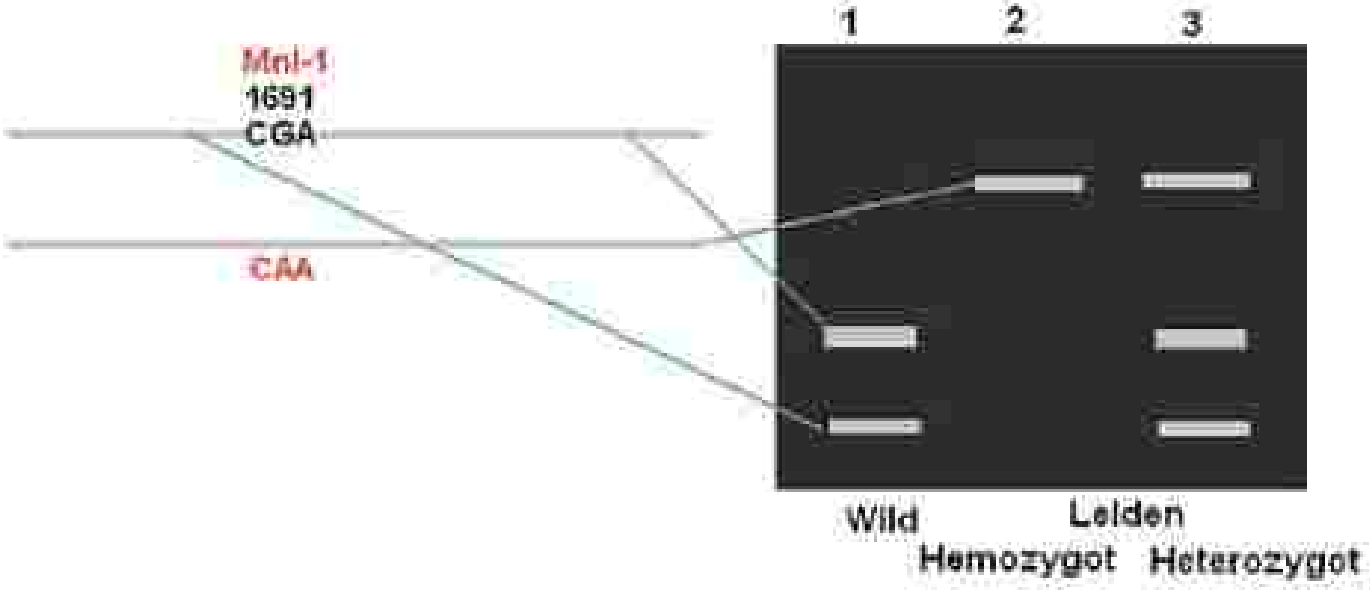
فاکتور Va بعد از فعال شدن مسیر ضد انعقاد مرتبط با پروتئین C فعال (APC) و پروتئین S (کوفاکتور)، در نواحی Arg506، Arg306 و Arg679 دچار برش سرین پروتئازی قرار گرفته و غیر فعال می‌شود. جهش در Arg506 باعث عدم برش و غیرفعال نشدن فاکتور V شده و در نتیجه فاکتور X به طور کنترل نشده‌ای مسیر مشترک انعقادی را فعال نموده و باعث مقاومت F-Va به APC و بروز ترومبوز می‌شود. دو جهش معروف در این مورد وجود دارد که باعث ایجاد ۱) فاکتور V لیدن (۹۵٪ موارد) و ۲) فاکتور V کمبریج (۵٪موارد) می‌شوند. فاکتور V لیدن (FVL) حاصل جهش G1691A یا Arg506Glu در اگزون ۱۰ و فاکتور V کمبریج (FVC) حاصل جهش Arg306Thr در اگزون ۷ فاکتور V می‌باشد. فاکتور V لیدن بسته به هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن برای جهش مذکور، به ترتیب ۹۰ برابر یا ۸ برابر افراد سالم، مستعد ابتلاء به DVT (ترومبوز ورید عمقی) و PE (آمبولی ریوی) می‌باشند. به جهش در آرژنین ۶۷۹ نیز فاکتور V نوع HR2 گفته می‌شود که به دلیل اهمیت پایین Arg679 در غیر فعال کردن V، ترومبوژنیک بودن آن ثابت نشده است.

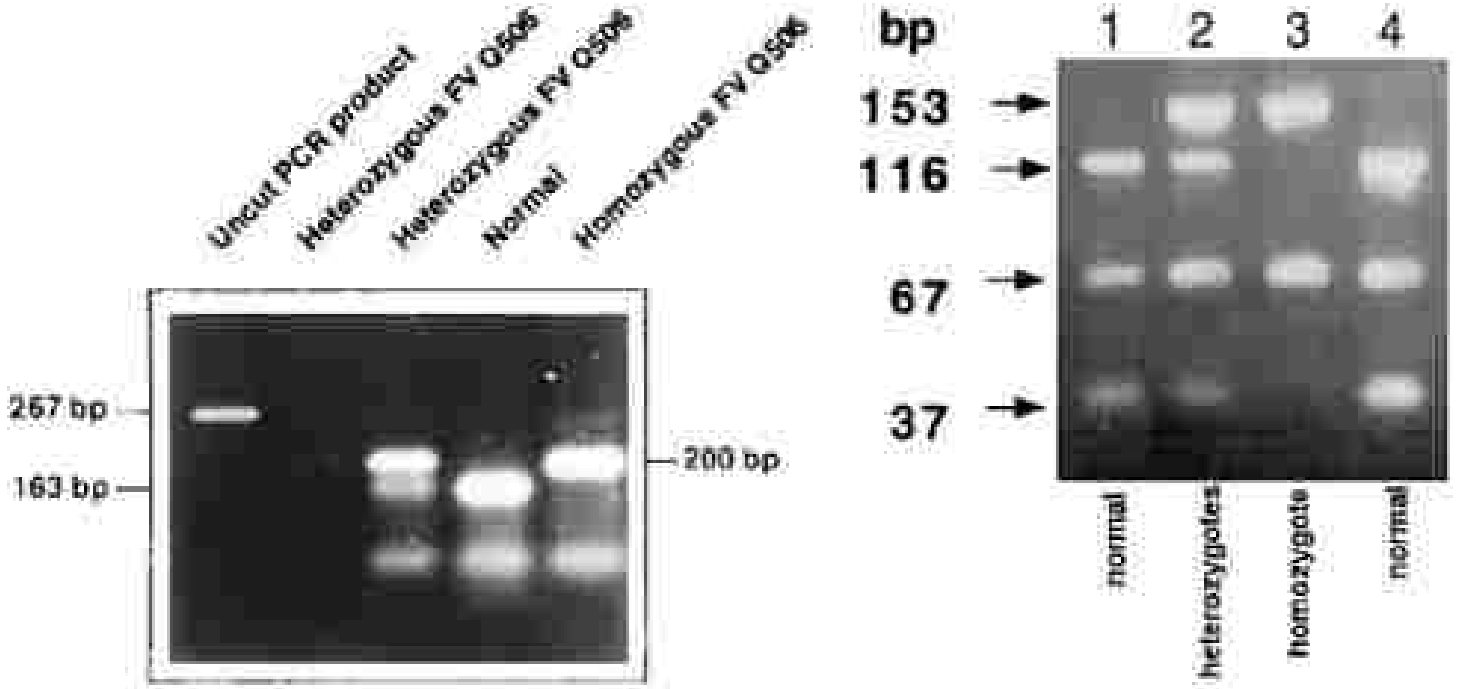
۶) فاکتور V-leiden (FVR506Q)

فاکتور V لیدن، نوعی فاکتور V است که به دلیل جهش در Arg506 نسبت به APC مقاومت پیدا کرده است. در واقع، فاکتور Va بعد از فعال شدن مسیر ضد انعقاد مرتبط با پروتئین C فعال (APC) و پروتئین S (کوفاکتور)، در نواحی Arg506، Arg306 و Arg679 دچار برش سرین پروتئازی قرار گرفته و غیر فعال می‌شود. جهش در Arg506 باعث عدم برش و غیرفعال نشدن فاکتور V شده و در نتیجه فاکتور X به طور کنترل نشده‌ای مسیر مشترک انعقادی را فعال نموده و باعث مقاومت F-Va به APC، تولید مقادیر زیاد ترومبین و بروز ترومبوز می‌شود. دو جهش معروف در این مورد وجود دارد که باعث ایجاد ۱) فاکتورV لیدن (۹۵٪ موارد) و۲) فاکتورV کمبریج (۵٪موارد) می‌شوند. فاکتور V لیدن (FVL) حاصل جهش G1691A یا Arg506Glu در اگزون ۱۰ و فاکتور V کمبریج (FVC) حاصل جهش Arg306The در اگزون ۷ فاکتور V می‌باشد. به جهش در آرژنین ۶۷۹ نیز فاکتور V نوع HR2 گفته می‌شود که به دلیل اهمیت پایین Arg679 در غیر فعال کردن V، ترومبوژنیک بودن آن ثابت نشده است.

در بیماران مبتا
در این تست ا
کند. در این بی
پیدا کند. هر چ
Pro-C فانکشن
HR2) می‌باشد
MnI-1 برای د

نمی‌باشد.
ا غیرفعال
د افزایش
ن غلظت
کمبریج و
محدودتر

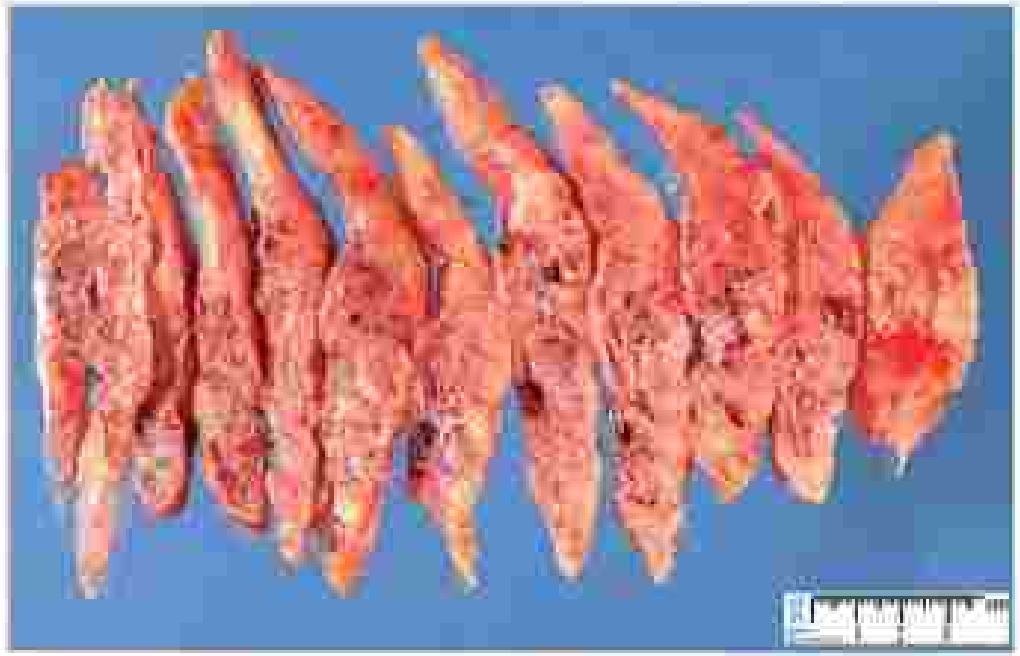




شکل ۴-۴- ۵- تکنیک ARMS جهت تشخیص فاکتور V-لیدن و نحوه توارث آن که در شکل پایین دو مثال متفاوت از آن ارائه شده است (الکتروفورز در ژل ۲٪ بسته به طراحی پرایمرهای PCR اندازه ژنوم و قطعات حاصل از آن می‌تواند متفاوت باشد.

چهره اول

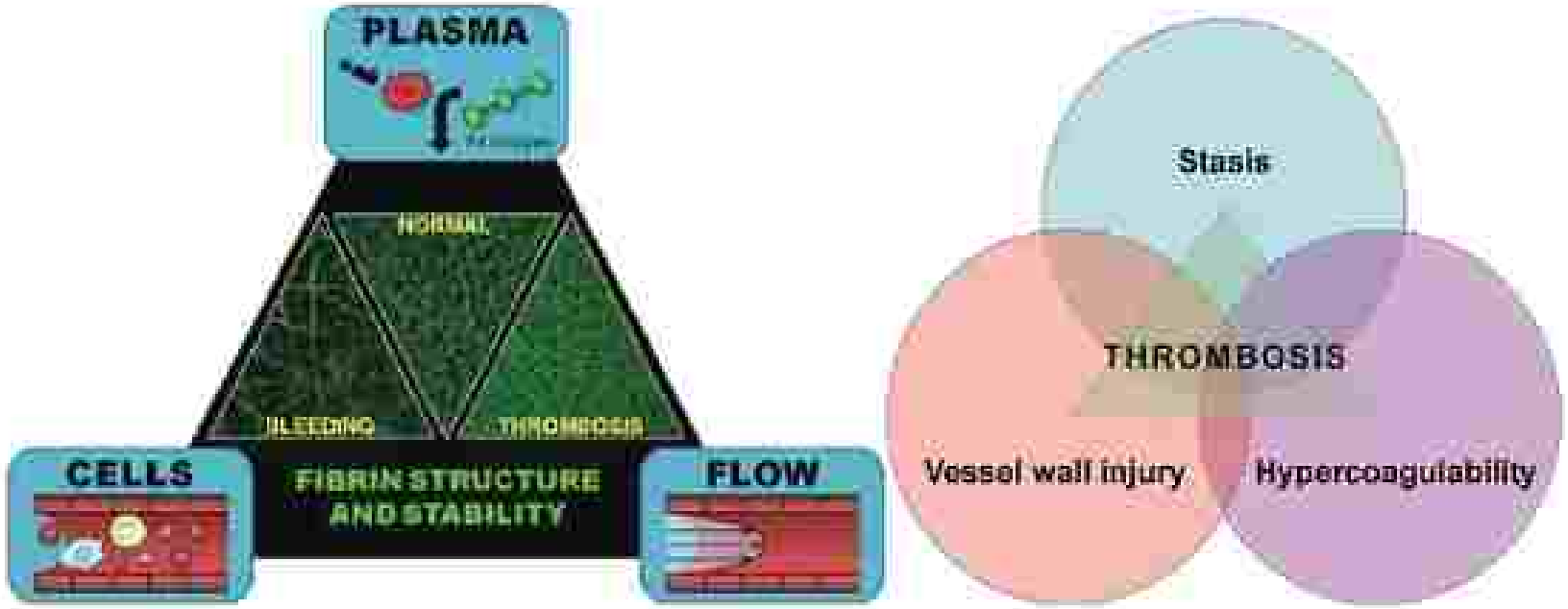
ترومبوز •



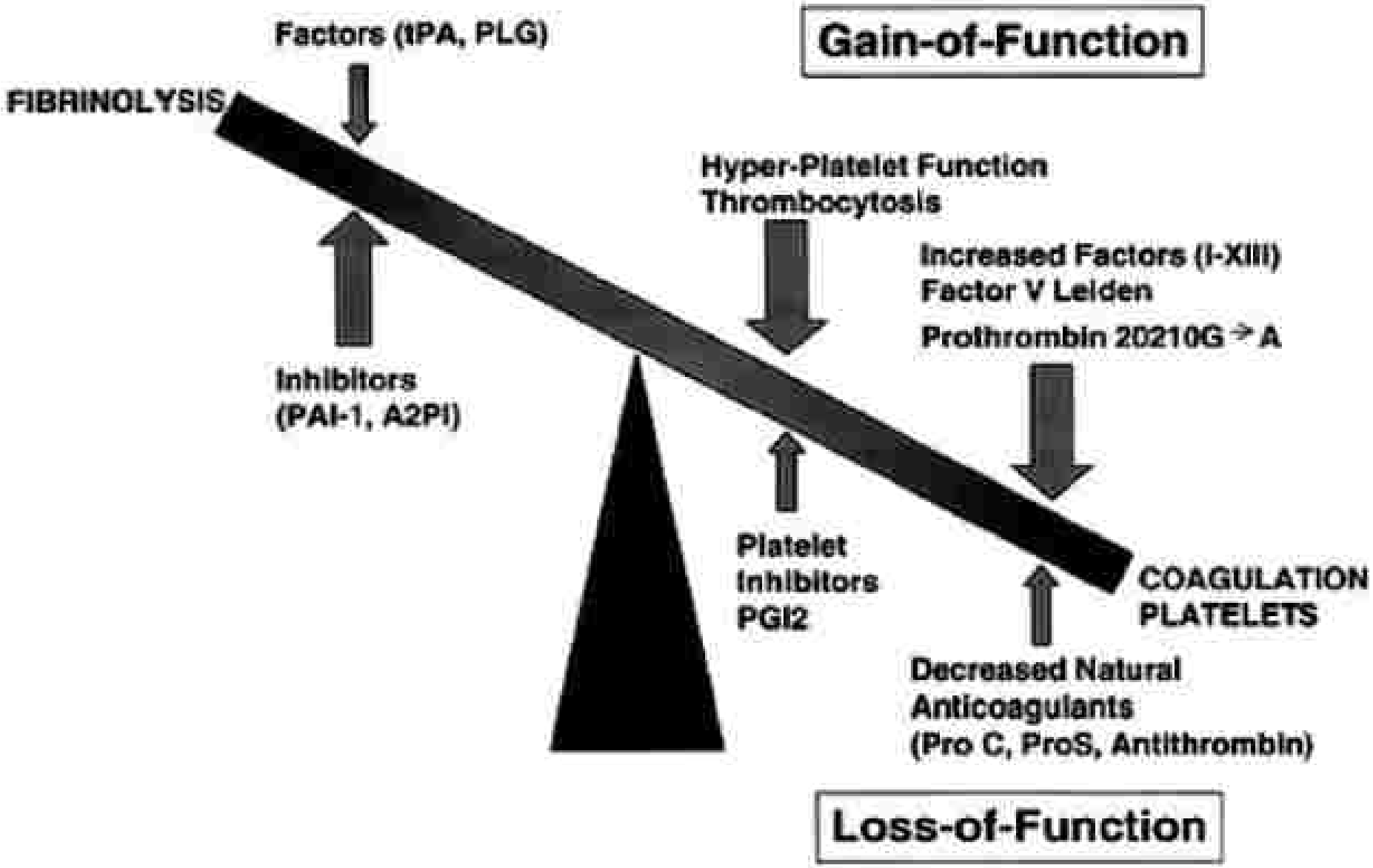
شکل ۶-۱۷ تفاوت تروموبوز قرمز با تروموبوز سفید که هر دو طی عمل جراحی از عروق بیماران خارج شدند.

شکل ۱۸-۱۵: تفاوت یک لخته سفید (پلاک) با یک لخته قرمز (کلات) که هر دو از عروق حولی خارج شده‌اند.

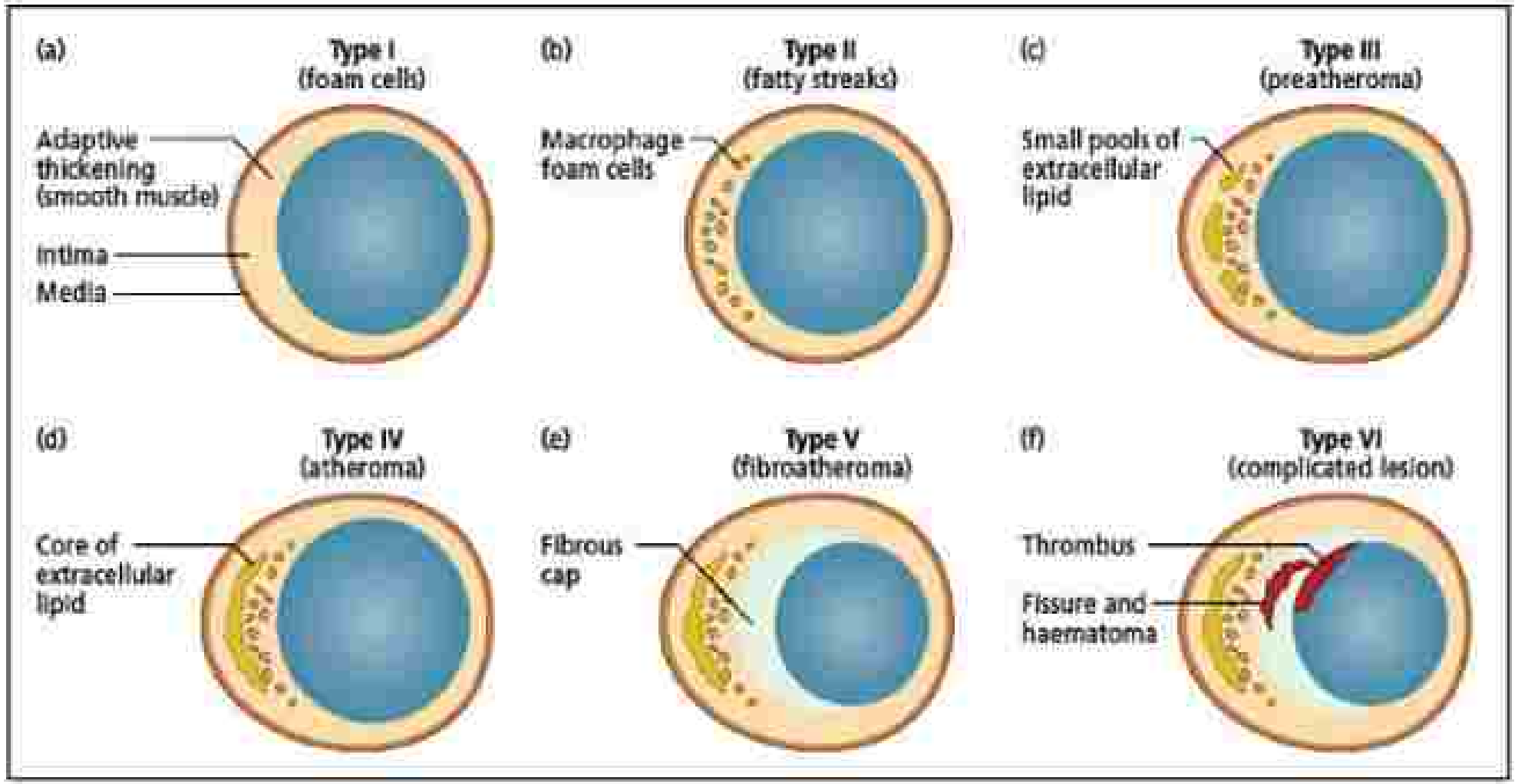
شکل ۱- ف. دکتر رادولف ویرشو (۲-۱۹-۱۸۲۱)، پزشک جراح آلمانی [۴]



شکل ۲- مثلث ویرشو که بر آن سه عامل اصلی، شرایط غیرعادی انعقاد و آسیب عروقی باعث بروز ترومبوز می‌شوند [۴].



شکل ۵-۰۰ ق عوامل موثر در شیفت تعادل هموستاز به سمت تشکیل ترومبوز



شکل ۱۵-۵۱ مراحل ۶ گانه تشکیل پلاک آترواسکلروز در عروق پرفشار

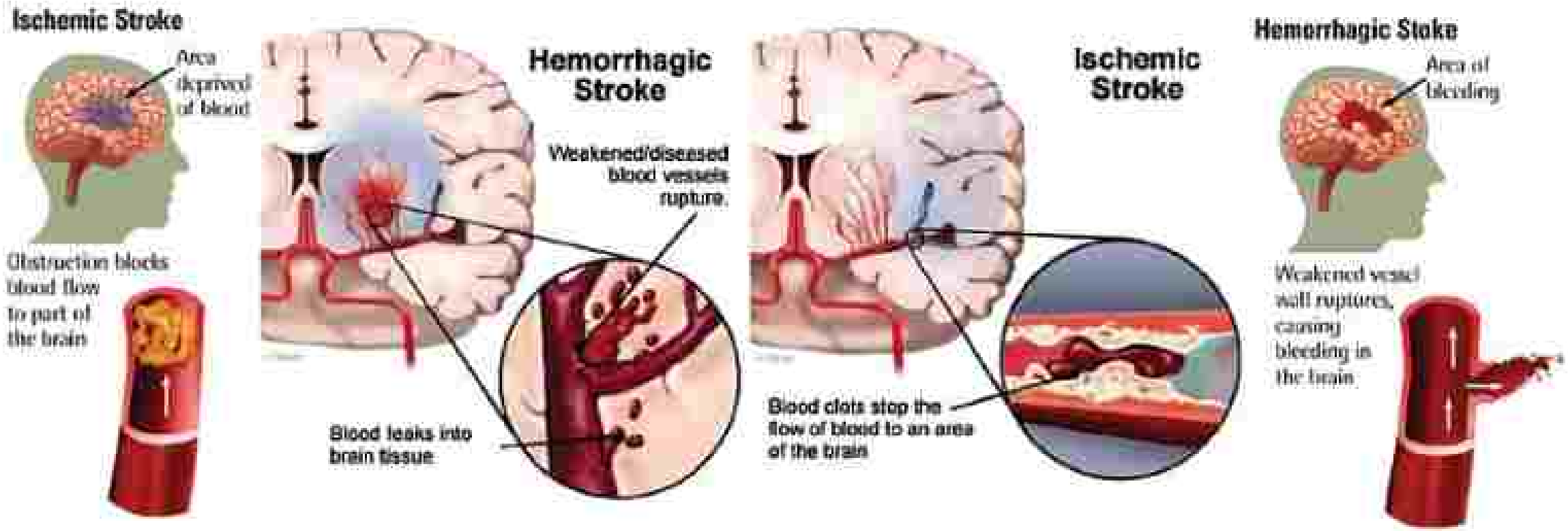
جدول ۱-۱- شیوع و ریسک نسبی هر کدام از ریسک فاکتورهای ترومبوز [۴]

Risk factors for thrombosis	Prevalence in general population, %	Prevalence in thrombophilic population, %	Estimated thrombotic risk, fold
Decreased antithrombin	<0.01	<1	12–20
Decreased protein C	0.3	4–8	8–10
Decreased protein S	0.2	7–12	10–15
Factor V_{Leiden} (heterozygous)	3–4*	10–40	1.8–2.6
Factor V_{Leiden} (homozygous)	<0.01%	2–4	10–15
Prothrombin G20210A	2–3*	10–15	1.5–2.2
Elevated factor VIII	10–15	20–35	2–4.5
Elevated fibrinogen	5–12	20–30	2–3
Dysfibrinogenemia	<0.01	0.3–0.8	1.5–3
Thrombomodulin mutations	<0.01	0.2–0.8	2–4
Elevated homocysteine	3–5	8–15	2–4.5
Lupus anticoagulant	1–5	10–30	2–10
Oral contraceptives	N/A	N/A	2–3
Pregnancy	N/A	N/A	4–8

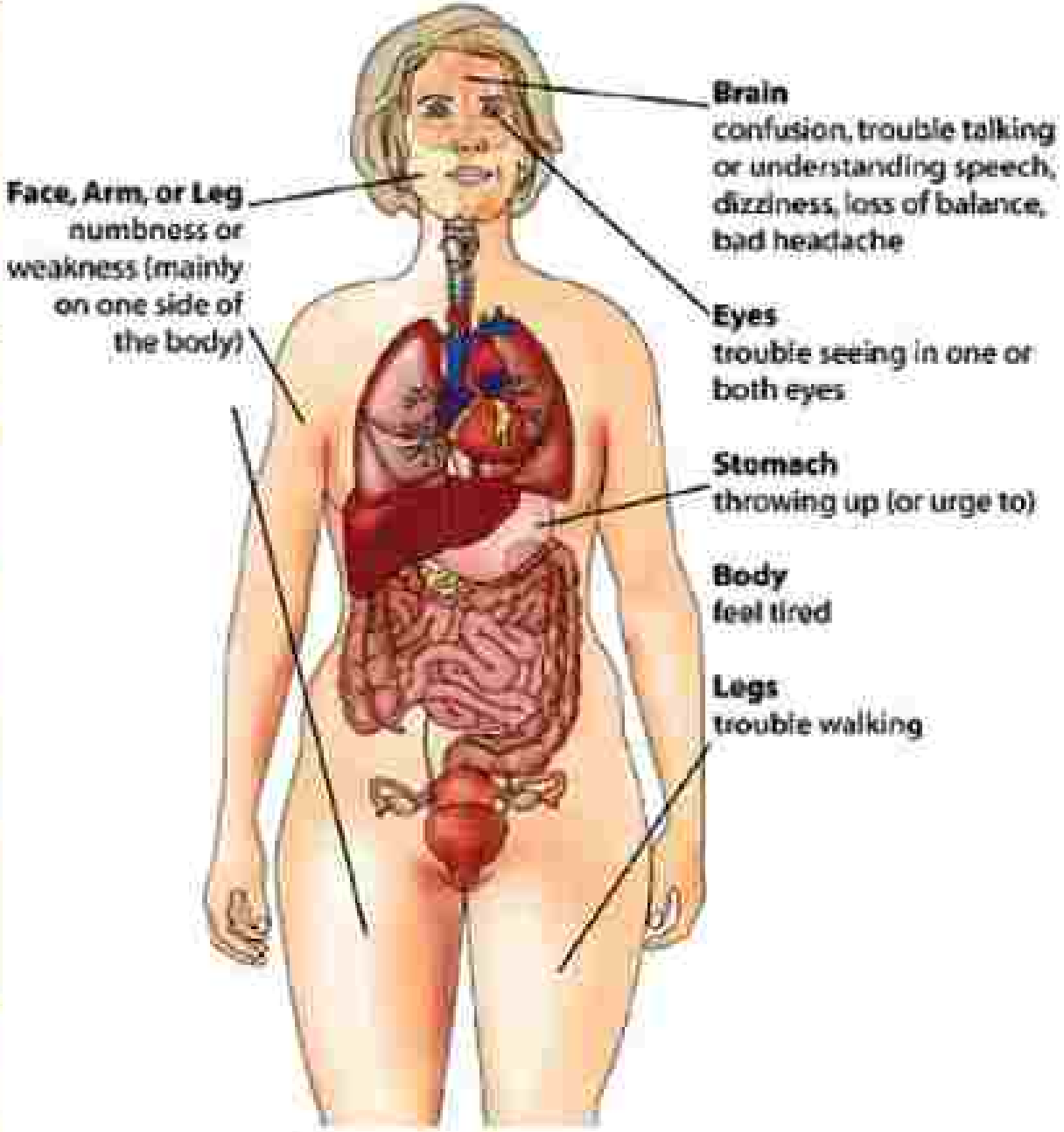
N/A, Not applicable.
*Factor V_{Leiden} and Prothrombin 20210 prevalence for heterozygosity in Caucasian general population; however, both very low (<0.1%) in African and Asian populations.

جدول ۲-۱- اثر هم‌زمان ترومبوز در صورت حضور دو ریسک فاکتور همزمان [۷]

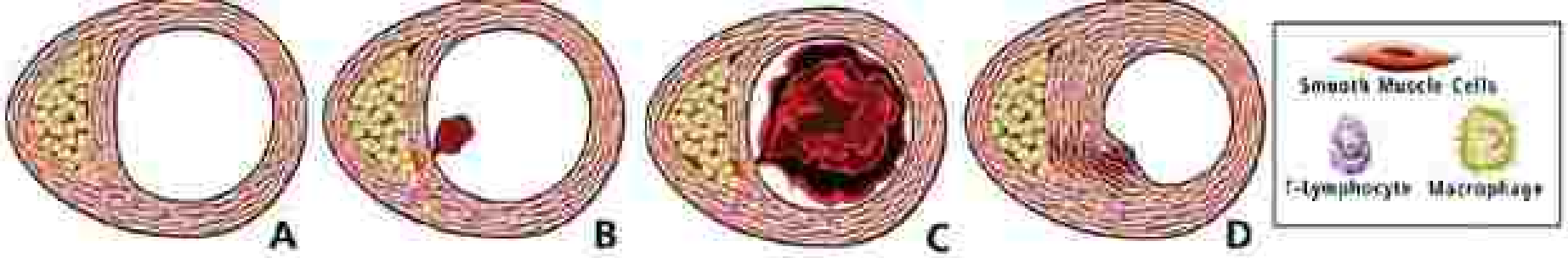
Risk factor 1	Risk factor 2	Combined risk (fold greater)
Protein C	Factor V_{Leiden} (heterozygous)	25–45
Protein S	Factor V_{Leiden} (heterozygous)	25–50
Factor V_{Leiden} (heterozygous)	Elevated factor VIII	12–20
Factor V_{Leiden} (heterozygous)	Oral contraceptives	8–20
Factor V_{Leiden} (heterozygous)	Pregnancy	25–40



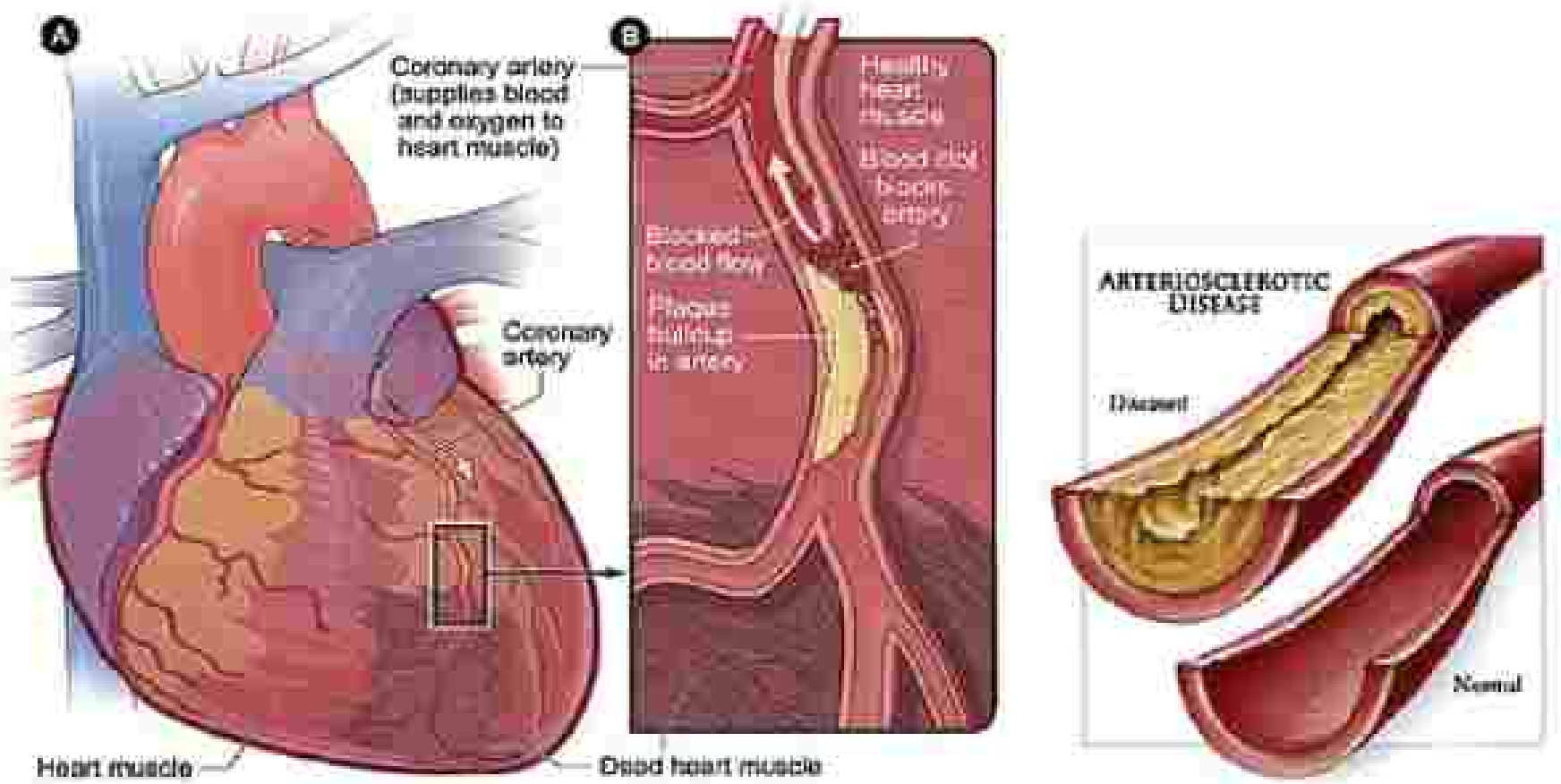
شکل ۳۳-۵۷ استروک ناشی از ترومبوز یا خونریزی داخل مغز که در هر حال با کاهش خون‌رسانی به برخی نواحی مغز باعث بروز آن می‌شود.



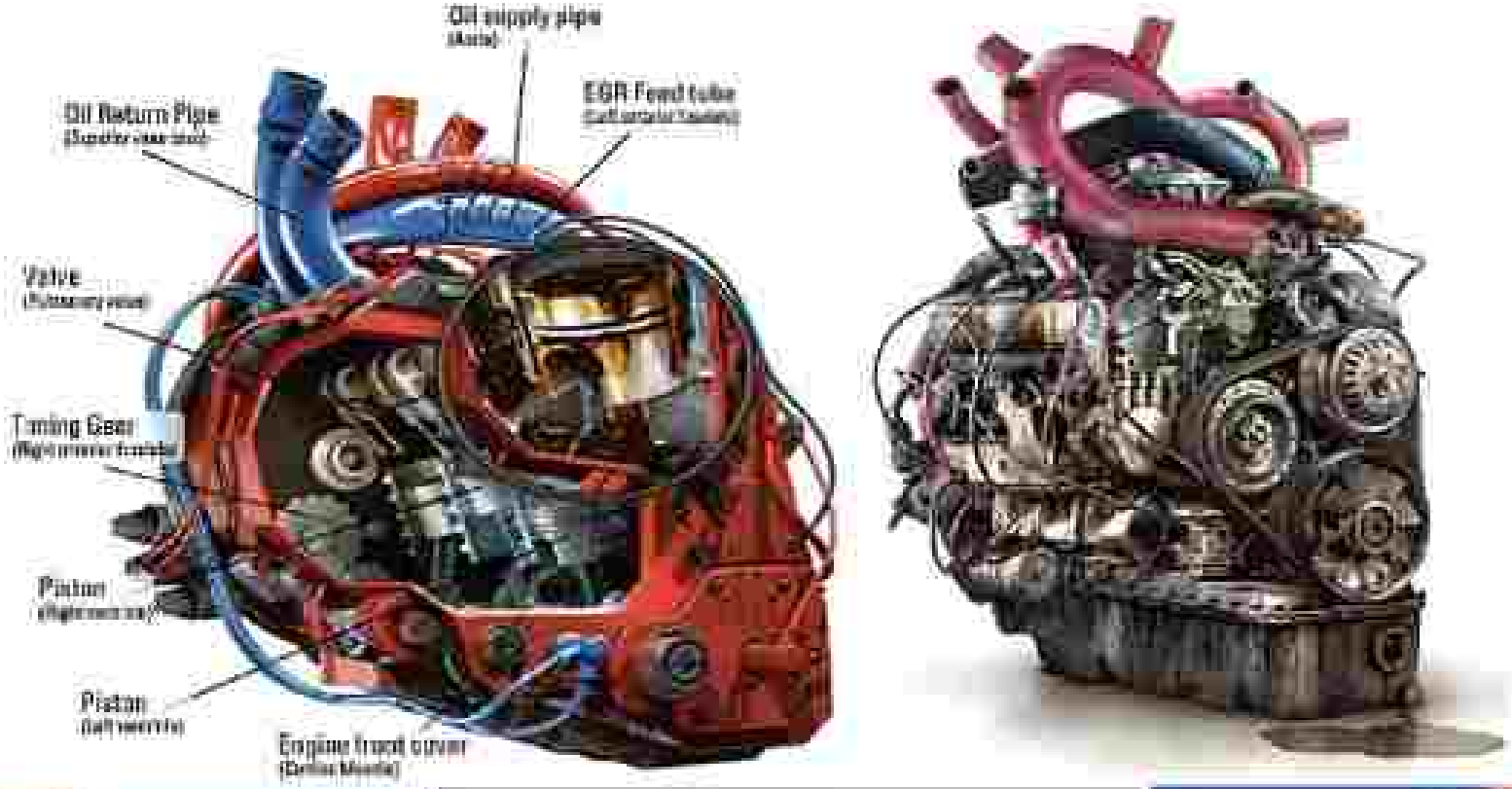
شکل ۳۴-۶: علایم و نشانه‌های استروک که با فلج شدن یک سمت بدن مثل افتادگی چشم، لمس شدن یکی از دست‌ها، عدم توانایی در خندیدن متقارن، تلفظ نادرست کلمات و جملات، احساس خستگی، گیجی و منگی، عدم تعادل، کج شدن دهان و چشم، اختلال در بینایی، سردرد و ... همراه است که گاهی از جمله علایم و تلفن اورژانسی به ۱۱۵ تحت عنوان FAST یاد می‌شود.

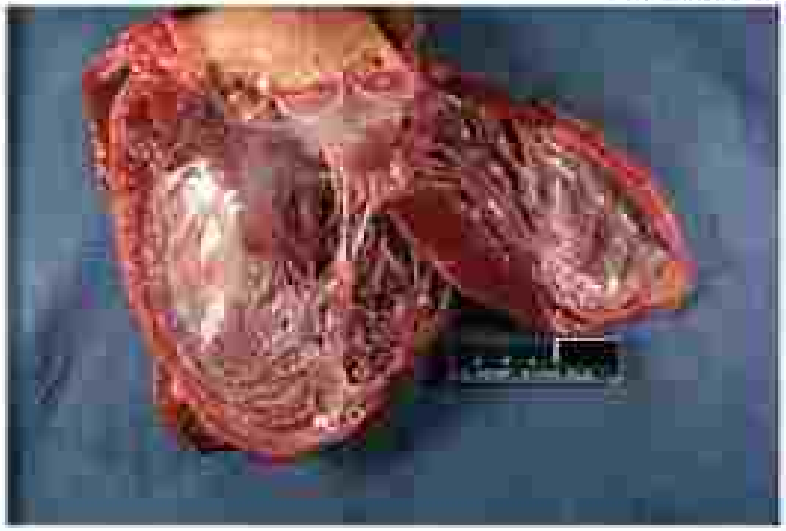


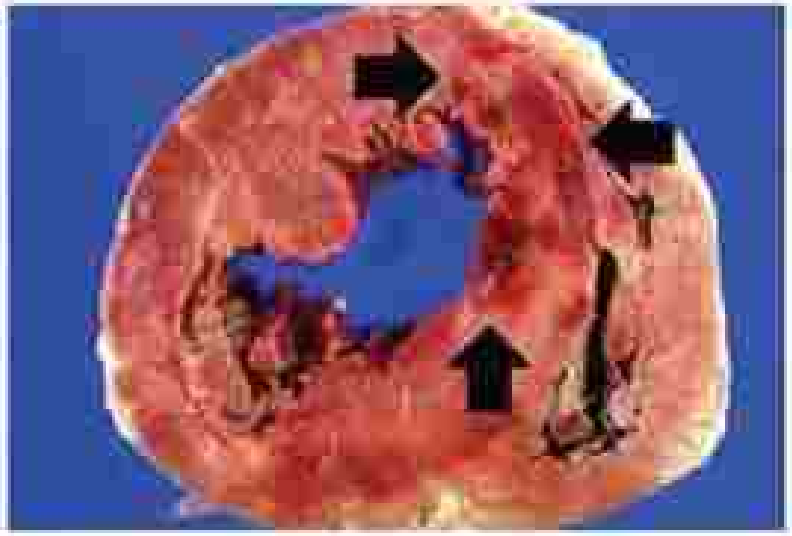
شکل ۹-۱۰: مراحل تشکیل پلاک آترواسکلروز که ماکروفاژها، میوسیت‌ها و اندوتلیوم، سلول‌های اصلی تشکیل دهنده آن هستند.



شکل ۱۰-۱۰: تنگ‌شدگی عروق کرونر توسط فوم‌سل‌های پلاک آترواسکلروز که فرم شدید آن می‌تواند باعث هیپوکسی، نکروز و انفارکتوس میوکارد قلبی شود. در صورت پارگی این فوم‌سل‌ها حجم بالایی از فاکتور بافتی، عوامل سایتاندوتلیوم، LDL و کلسیم نیز در جریان آزاد می‌شوند که می‌توانند با ایجاد ترومبوز باعث انسداد بیشتر رگ، بروز هیپوکسی و نهایتاً MI شوند [۴].







شکل ۱۸-۶: تصاویری از بافت نکروزه قلب در اثر بروز انفارکتوس قلبی

جدول ۱۱-۰۶ فاکتورهای غیر بیماری و یا وابسته به سبک زندگی که باعث افزایش ریسک ترومبوز در افراد می‌شوند [۱۱]

Risk Factor	Comment	Contribution to Thrombosis	Laboratory Diagnosis
Age	Thrombosis after age 50	Risk doubles by decade	—
Immobilization	Distance driving, air travel, wheelchair, bedrest, obesity	Decreased blood flow	—
Diet	Fatty foods, inadequate folate, vitamin B_6, and vitamin B_{12}	Homocysteinemia: relative risk of 2-7× for arterial or venous thrombosis	Plasma homocysteine, vitamin levels, and lipid profile
Lipid metabolism imbalance	Hyperlipidemia, hypercholesterolemia, dyslipidemia, lipoprotein (a) elevation, HDL-C decreased, LDL-C elevated	Varied risk: moderate thrombosis association with hypercholesterolemia alone; may be congenital	Lipid profiles: total cholesterol, HDL-C, LDL-C, triglycerides, and lipoprotein (a)
Oral contraceptives	30 μg, formulation with progesterone	4-6×	—
Pregnancy	—	3-5×	—
Hormone replacement therapy	—	2-4×	—
Femoral and tibial fractures	—	80% incidence of thrombosis if not treated with anticoagulant	—
Hip, knee, gynecologic, prostate surgery	—	50% incidence of thrombosis if not treated with anticoagulant	—
Smoking	—	Depends on degree	hsCRP, fibrinogen
Inflammation	Chronic or acute	Arterial thrombosis	hsCRP, fibrinogen
Central venous catheter	Endothelial injury and activation	33% of children with central venous lines develop venous thrombosis	—

hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein.

جدول ۱۲-۶: بیماری‌های اکتسابی که باعث افزایش ریسک ترومبوز در افراد می‌شوند [11].

Disease	Comment	Contribution to Thrombosis	Laboratory Diagnosis
Antiphospholipid syndrome	Chronic antiphospholipid antibody often secondary to autoimmune disorders	1.6-3.2× risk when chronic: stroke, myocardial infarction, recurrent spontaneous abortion, venous thrombosis	Mixing studies, lupus anticoagulant profile, anticardiolipin antibody and anti-β_2-GPI immunoassay
Myeloproliferative disorders	Essential thrombocythemia, polycythemia vera	Plasma viscosity, platelet activation	Platelet counts and aggregometry
Hepatic and renal disorders	Diminished production or loss of control proteins	Deranged coagulation pathways	Protein C, protein S, and antithrombin assays; factor assays
Cancer	Trousseau syndrome, low-grade chronic DIC	20× risk of thrombosis; 10-20% of people with idiopathic venous thrombosis have cancer	DIC profile including platelet count, D-dimer, fibrinogen assay
Leukemia	Acute promyelocytic leukemia (M3), acute monocytic leukemia (M4-M5)	Chronic DIC	DIC profile including platelet count, D-dimer, fibrinogen assay
Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	Platelet-related thrombosis	DVT, PE, DIC	Flow cytometry phenotyping, DIC profile
Chronic inflammation	Diabetes, infections, autoimmune disorders, smoking	—	Factor VIII assay, fibrinogen, hsCRP

DVT, deep vein thrombosis; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; PE, pulmonary embolism; DIC, disseminated intravascular coagulation.

جدول ۱۳-۶: ریسک‌فاکتورهای ارثی عامل بروز ترومبوز، میزان ریسک نسبی و تست آزمایشگاهی مورد نیاز برای ارزیابی آن [۱۱]

Risk Factor	Comment	Risk of Thrombosis	Laboratory Tests
Antithrombin deficiency	Antithrombin inhibits the serine proteases thrombin and factors IXa, Xa, and XIa. Antithrombin function is enhanced by heparin	Heterozygous: 10-20×	Clot-based and chromogenic antithrombin assays and immunoassay for antithrombin concentration
Protein C deficiency	APC is a serine protease that hydrolyzes factors Va and VIIIa; requires protein S as cofactor	Homozygous: 100%, rarely reported Heterozygous: 2-5×	Clot-based and chromogenic protein C activity assays and immunoassay
Free protein S deficiency	Cofactor for APC; 40% is free, 60% bound to C4bBP	Homozygous: 100%, causing neonatal purpura fulminans Heterozygous: 1.6-11.5×	Clot-based free protein S activity assays, free and total protein S immunoassays
APC resistance	FVL (R506Q) mutation gain of function renders factor V resistant to APC	Homozygous purpura fulminans: 100% but rarely reported Heterozygous: 3×	APTT-based APC resistance test and confirmatory molecular assay
Prothrombin G20210A	Mutation in the gene's untranslated 3′ promoter region creates moderate prothrombin activity elevation	Homozygous: 18× Heterozygous: 1.8-11.5×	Molecular assay only. Phenotypic assay provides no specificity
Dysfibrinogenemia and fibrinogenemia	Association with arterial thrombosis	Under investigation: acute-phase reactant	Fibrinogen clotting assay, thrombin time, reptilase time
Plasminogen mutations	Rare cases described	—	Chromogenic substrate
TPA deficiency, PAI-1 elevation	PAI-1 increase may be common	—	Chromogenic substrate assays

آزمایشات مورد نیاز برای ارزیابی ترومبوز

۱- تعیین سطح پروتئین C، S و Z

۲- بررسی مقاومت فاکتور V به APC

۳- تعیین جهش G1691A در فاکتور V-لیدن و سپس تعیین هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن آن

۴- تعیین جهش G20210A در ژن پروترومبین

۵- تعیین جهش Jak2 و الکتروفورز سرم برای بیماری‌های هیپرویسکوزیته مثل نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو و دیس‌کرازی‌های B سل

۶- تست‌های هگزاگونال تشخیص APS (dRVVT، TECT، PT یا TT با PL اضافی، تست الایزا برای ACA و APA و ...)

۷- سنجش سطح AT-III

۸- سنجش مقدار هموسیستئین خون در ناشتایی و ۴ ساعت بعد غذا یا مصرف متیونین

۹- تست CBC، ESR، CRP، PT، PTT و به خصوص تست TT و RT برای بررسی وضعیت فیبرینوژن

۱۰- فاکتور اسی برای فاکتورهای I، II، VIII

۱۱- بررسی FDPs و D-دایمر، تست‌های MI قلبی

۱۲- تست BT IVY با فشار ۸۰mmHg برای ارزیابی وضعیت هیپرکوآگولانت

۱۳- تعیین سطح t-PA، PAIها، تست لیز یوگلبولین، تست ترومبوالاستوگرام و ...

۱۴- ارزیابی فلوسایتومتری CD59 و CD55 برای تشخیص بیماری PNH

۱۵- سونوگرافی داپلر رنگی از عروق و ونوگرافی با ماده حاجب یُددار (حساس‌ترین روش)

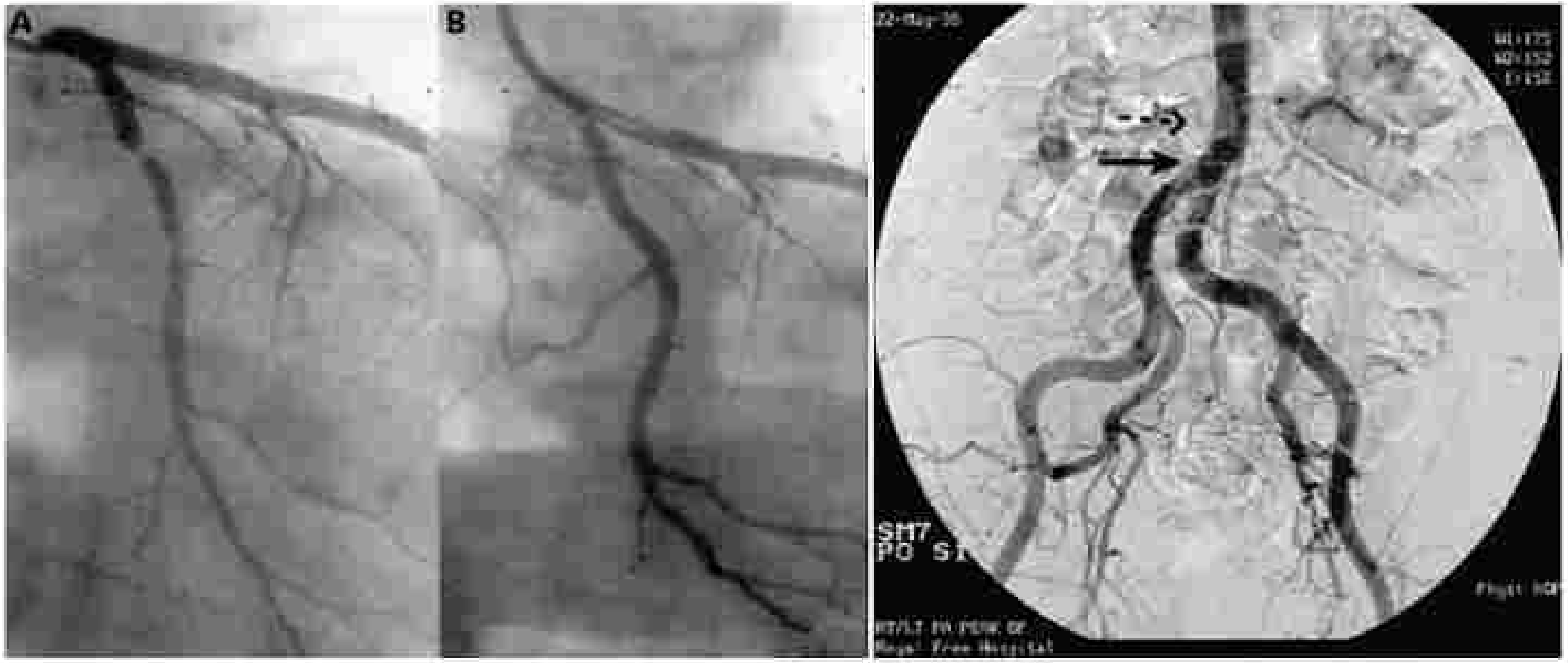
۱۶- آنژیوگرافی ریوی، سینتی‌گرافی نسبت تهویه به جریان خون ریوی (VQ) و اکوکاردیوگرافی (شکل ۴۲-۶۰)

۱۷- اسکن یا MRI قلبی-عروقی یا پلتیسموگرافی امپدانس (Impedance Plethysmography)

جدول ۱۴-۶ پروفایل کامل تست‌های آزمایشگاهی مورد استفاده در تشخیص بیماری‌های ترومبوتیک [۱۱]

Assay	Reference Results	Comment
APC resistance	Ratio ≥1.8	Clot-based screen based on PTT
FVL mutation	Wild-type	Molecular assay performed in follow-up to APC resistance assay <1.8
Prothrombin G20210A	Wild-type	Molecular assay. There is no phenotypic assay for prothrombin G20210A
Lupus anticoagulant profile*	Negative for lupus anticoagulant	Minimum of two clot-based assays, such as PTT, DRVVT, or dilute prothrombin time with phospholipid neutralization test for immunoglobulins of the antiphospholipid antibody family
ACL antibody	IgG: <12 GPL IgM: <10 MPL	Immunoassay for immunoglobulins of the antiphospholipid antibody family
Anti-β_2-GPI antibody	<20 G units	Immunoassay for an immunoglobulin of the antiphospholipid antibody family. β_2-GPI is the key phospholipid-binding protein in the family
Antithrombin activity*	78-126%	Serine protease inhibitor suppresses factors Xa and IIa. When consistently below reference limit, follow up with antithrombin antigen assay
Protein C activity*	70-140%	Digests factors VIIIa and Va. When consistently below reference limit, follow up with protein C antigen assay
Protein S activity*	65-140%	Protein C cofactor. When consistently below reference limit, follow up with total and free protein S antigen assay, C4bBP
Factor VIII activity	50-186%	Confirm elevated factor VIII
Fibrinogen	220-498 mg/dL	Clot-based assay. Elevation may be associated with arterial thrombosis
PAI-1	<30 IU/mL	Elevation may be associated with venous thrombosis

*Inaccurate during active thrombosis or anticoagulant therapy. Perform 14 days after anticoagulant therapy is discontinued.
GPL, IgG anticardiolipin antibody unit; MPL, IgM anticardiolipin antibody unit; GPI, glycoprotein-I; DRVVT, dilute Russell viper venom time; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1.

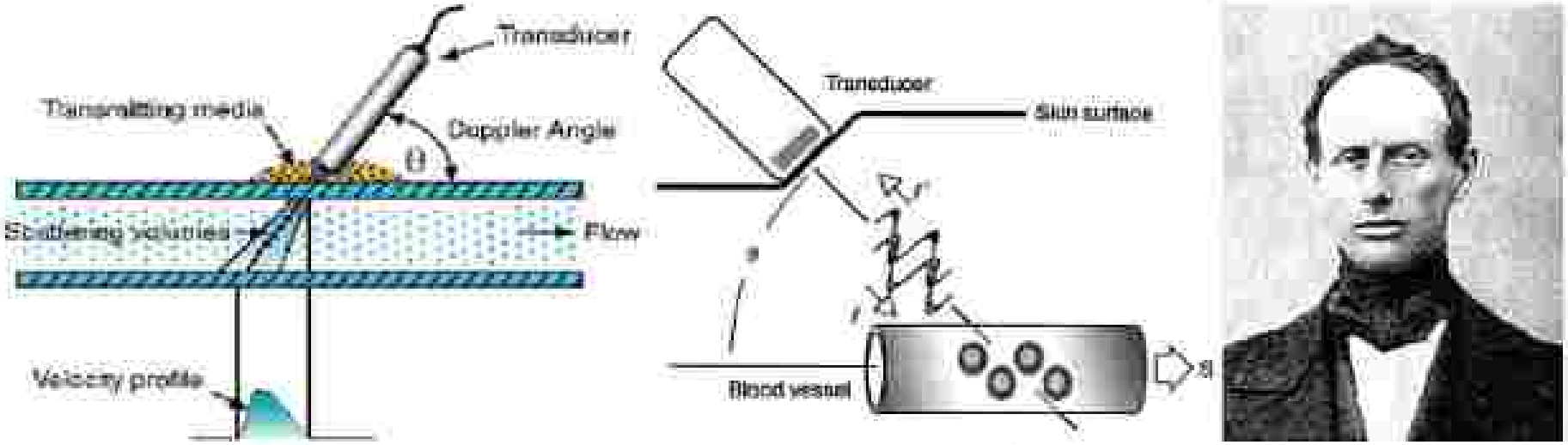


شکل ۴۵-۰ (راست) مشاهده آمبولی در شریان مشترک ایلیاک (فلش نقطه چین) در محل دوشاخه شدن آئورت تحتانی، چپ) انسداد عروق کرونر در آنژیوگرافی از قلب

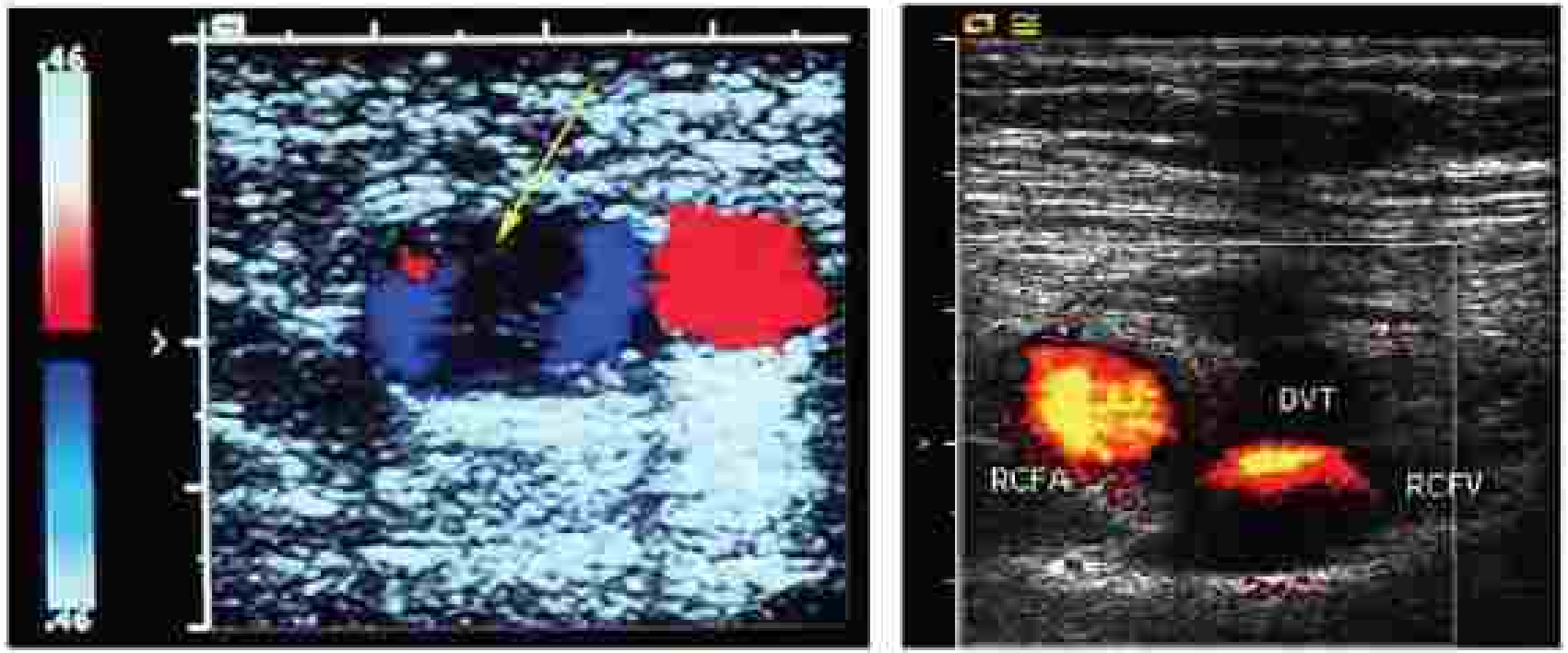
آقای داپلر فیزیکد
نزدیک شدن به فر
نیز می‌توان شناسایی
در بافت گوشتی و
پروب و ΔF اختلاف
داد. در داپلرهای ر
جسم نزدیک شوند
تیره خاکستری دید

دن یا
وند را
صوت
توسط
خیص
دیگر
رنگ

شکل ۴۹-۱۰ فرد دو تصویر از دستگاه سونوگرافی داپلر رنگی مخصوص مطب و قابل حمل



شکل ۴۷-۶: تصویر آلفی دایلر و تصویر شماتیک از زاویه پروب (ترانسدیوسر) با عروق مورد بررسی



شکل ۴۸-۶: راست: تصویر دایلر رنگی از ورید و شریان مشترک سمت راست فمور (RCFA& RCFV) که یک DVT در وسط ورید را نشان می‌دهد.

جدول ۳-۱۰ مارکرهای مرتبط با ریسک ترومبوز شریانی [۱۱]

Marker	Reference Interval	Comments
hsCRP	<0.55 mg/L	Marker of inflammation; report in relative risk ranges; stable, reproducible
Fibrinogen	200-400 mg/dL	>300 mg/dL increases thrombotic risk; high correlation with risk; inadequate reproducibility with numerous test platforms
Homocysteine	4.6-12.1 μmol/L	Normals and predictive values vary with population; may be reduced through vitamin B_6, B_{12}, and folate supplement
Total cholesterol	<200 mg/dL	Reproducible; some relationship with diet; risk prediction is not independent of inflammation
Total cholesterol:HDL-C ratio	<10	Reproducible; elevated ratio has some relationship with diet and exercise; risk prediction is not independent of inflammation
LDL-C	<130 mg/dL	Reproducible; may be significantly lowered with statin therapy
Lipoprotein (a)	2.2-49.4 mg/dL	Varies with race and age; may be lowered with statin therapy; inadequate reproducibility
Plasminogen, TPA, PAI-1, α_2-antiplasmin	—	Available from hemostasis reference laboratories

hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; TPA, tissue plasminogen activator; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol.

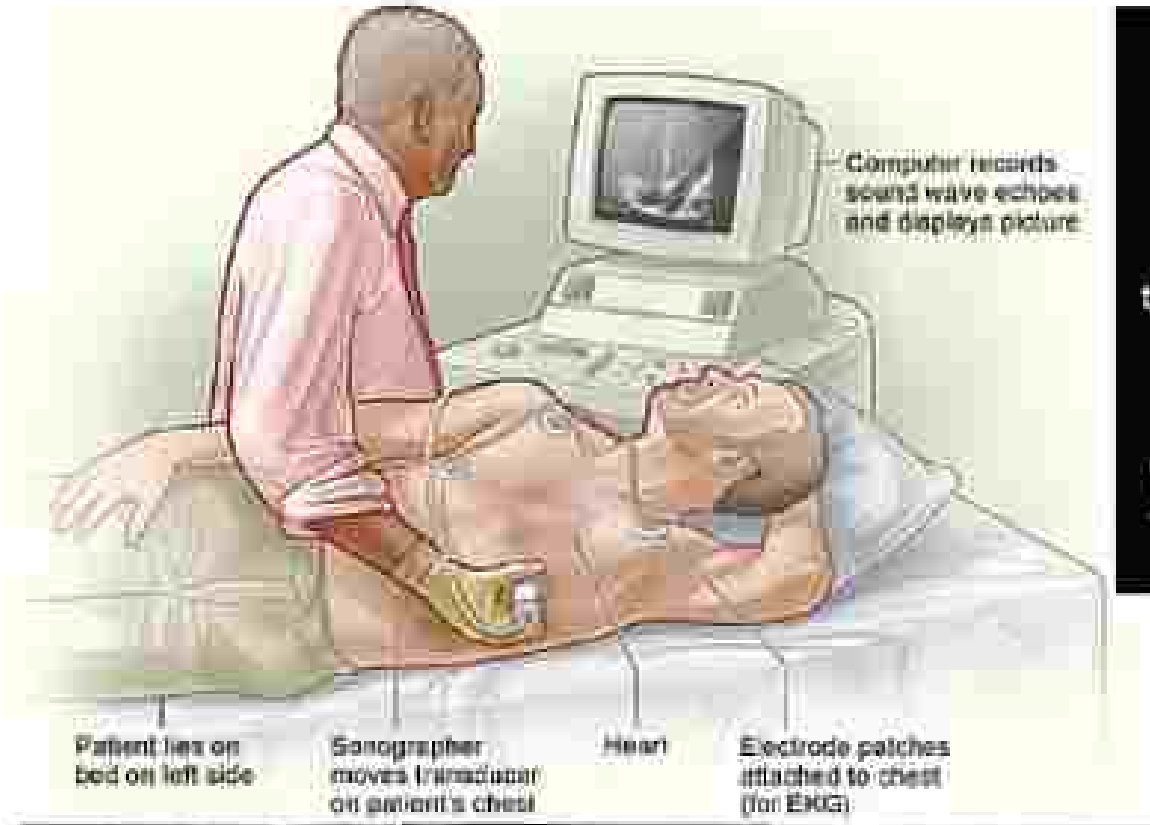
جدول ۴- ۶: ریسک نسبی بروز MI در چهار سطح از hs-CRP و در دو جنس مذکر و مونث

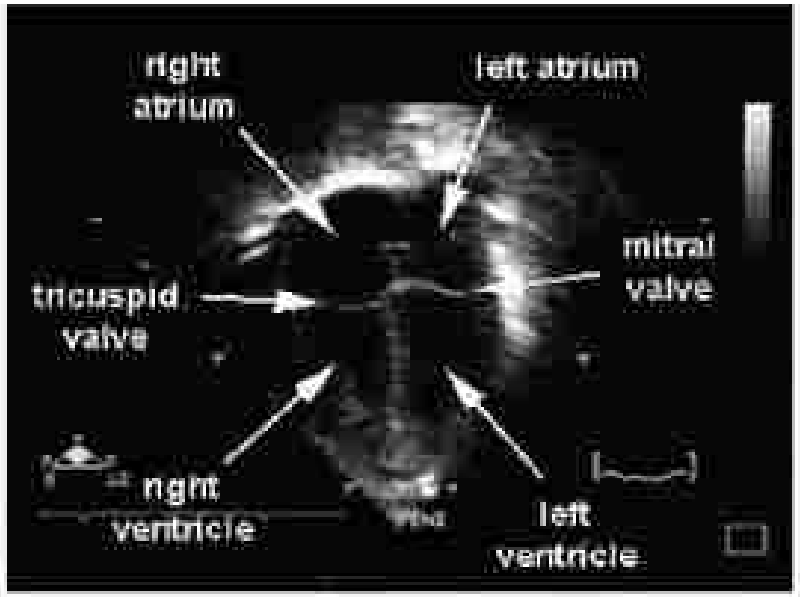
Quartile	CRP (mg/L)	RELATIVE RISK OF MI OR STROKE Males	Females
1	≤0.55	1.0	1.0
2	0.56-1.14	1.8	2.9
3	1.15-2.10	2.5	3.5
4	≥2.11	2.9	5.5

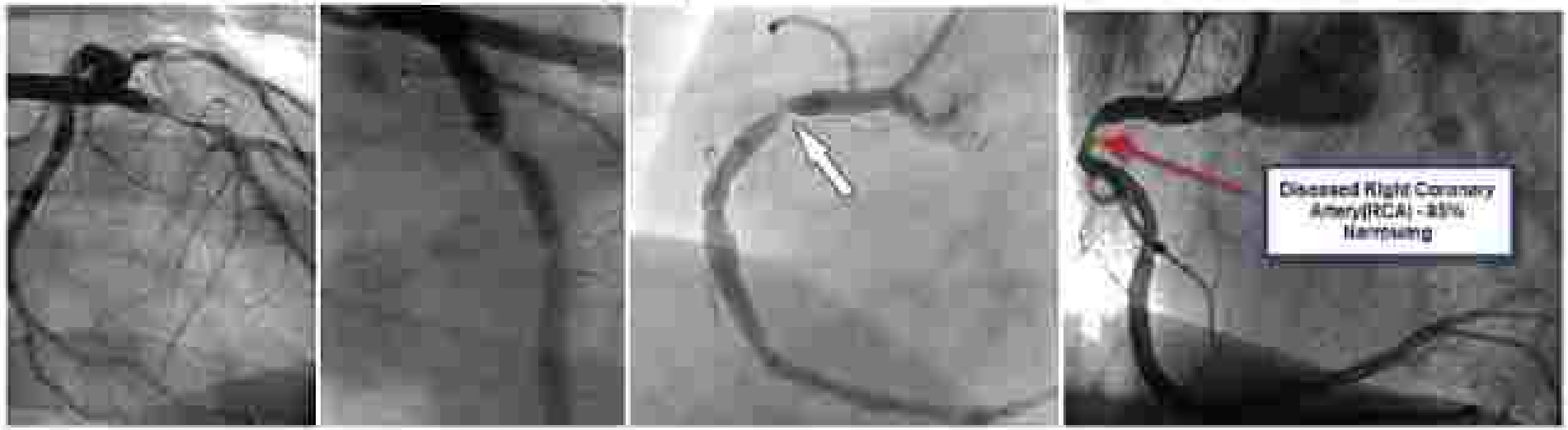
جدول ۵- ۶: ریسک نسبی بروز MI در سه سطح از hs-CRP و سه سطح از کلسترول توتال و TC:HDL-C Ratio

CRP	TOTAL CHOLESTEROL Low (≤191 mg/dL)	Medium (192-223 mg/dL)	High (≥224 mg/dL)
Low (≤0.72 mg/L)	1.0	1.4	2.3
Medium (0.73-1.69 mg/L)	1.2	1.5	4.3
High (≥1.70 mg/L)	1.1	2.3	5.3

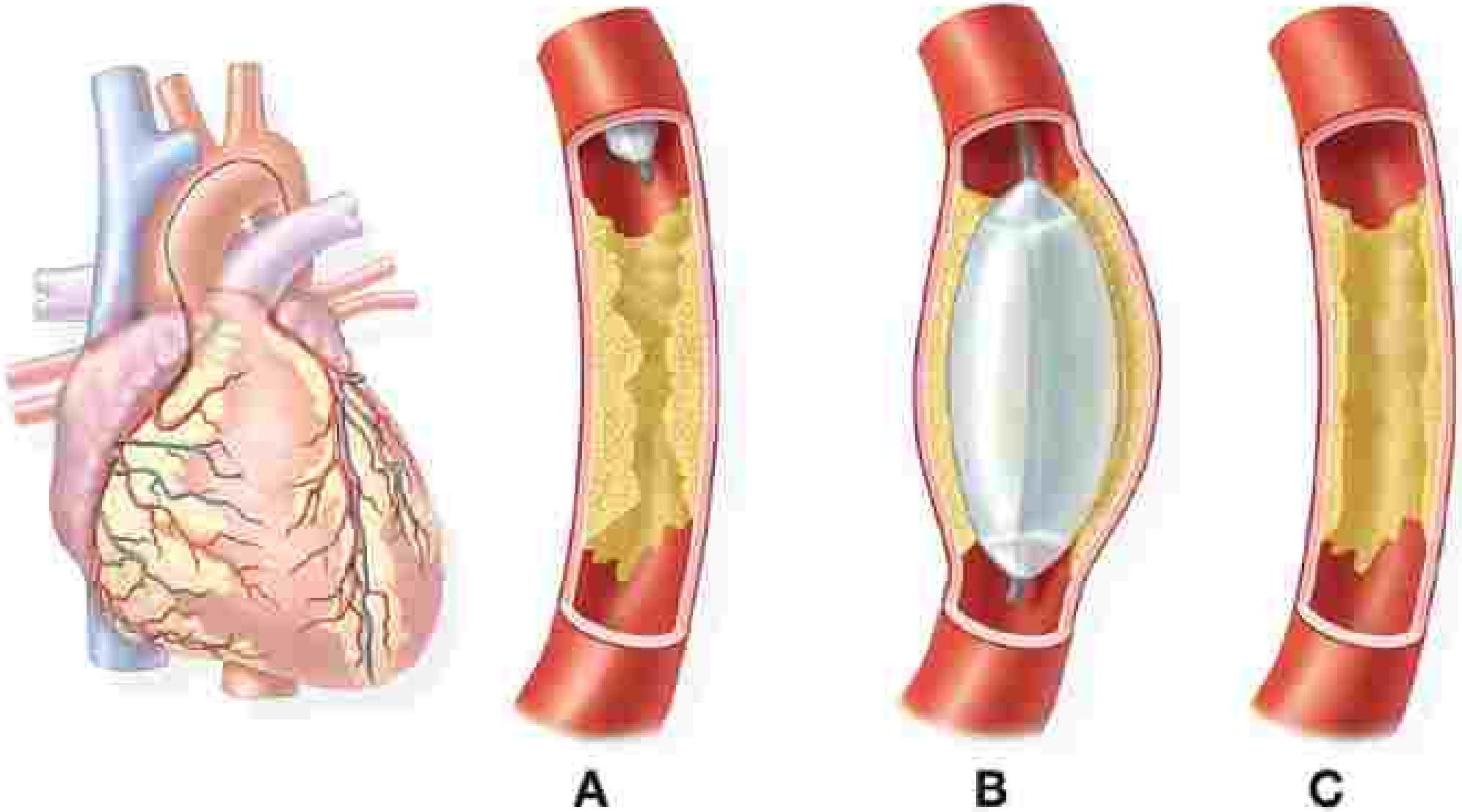
CRP	TC:HDL-C RATIO Low (≤3.78)	Medium (3.79-5.01)	High (≥5.02)
Low (≤0.72 mg/L)	1.0	1.2	2.8
Medium (0.73-1.69 mg/L)	1.1	2.5	3.4
High (≥1.70 mg/L)	1.3	2.8	4.4



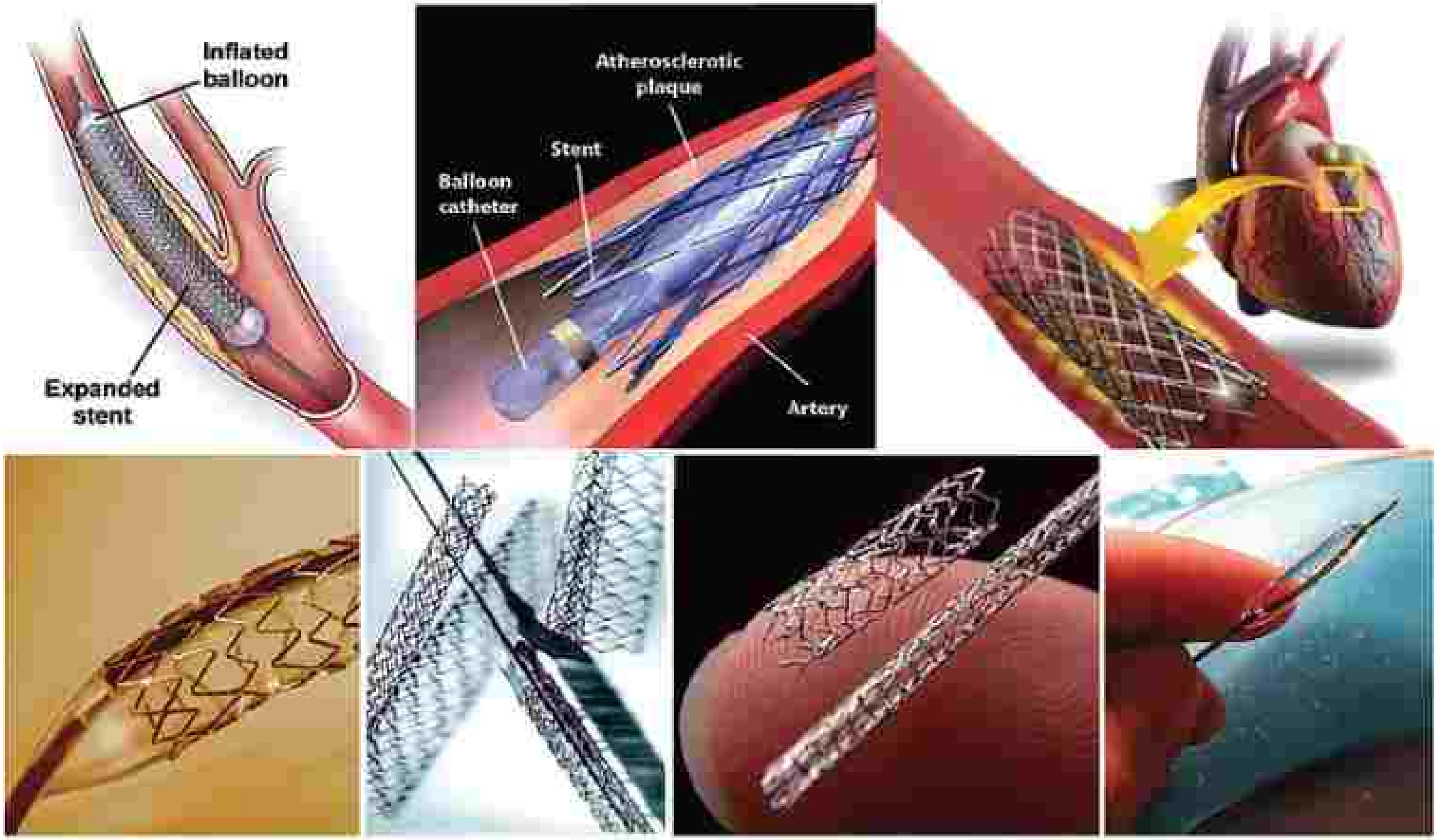




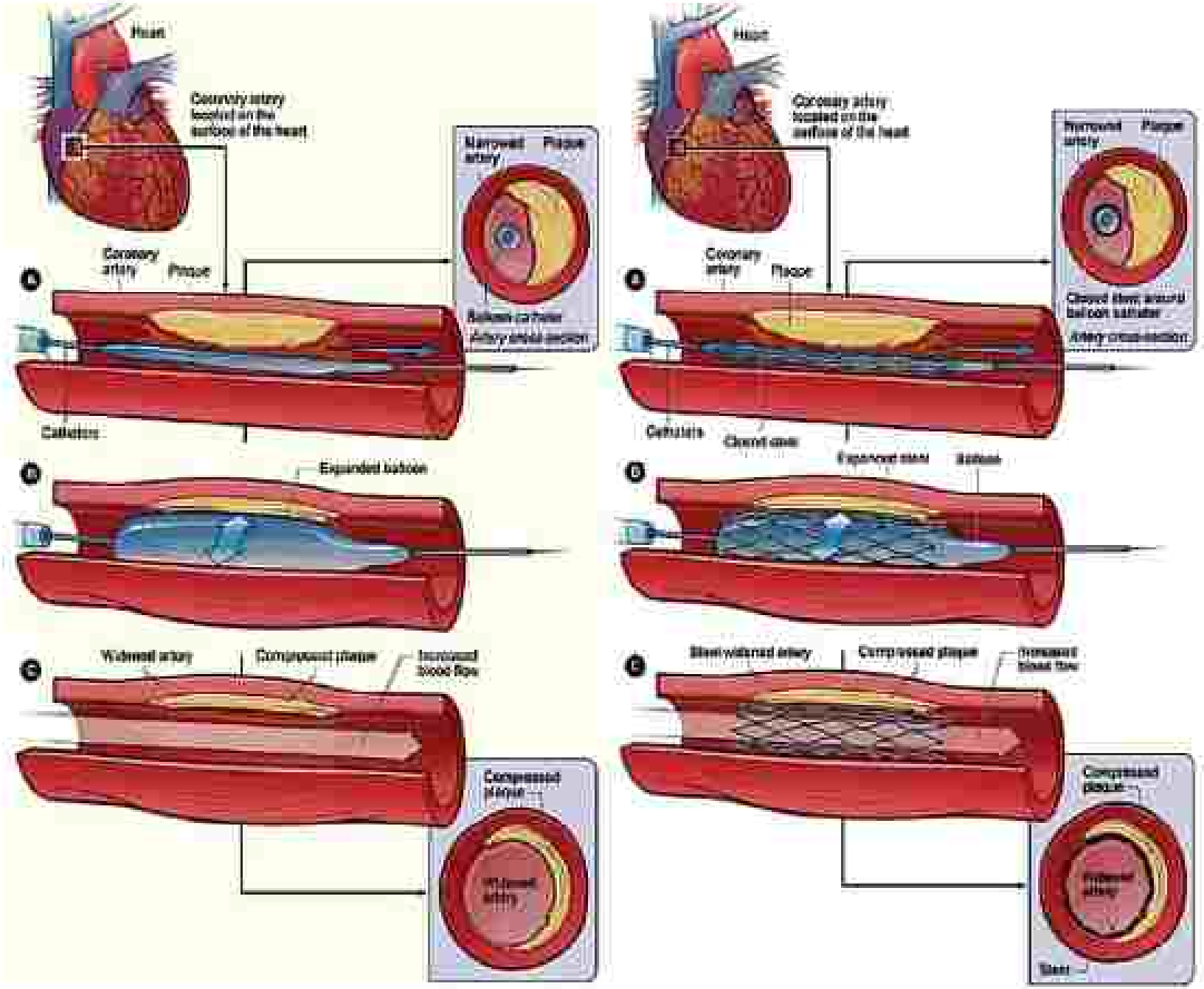
شکل ۱۱-۱۰ تصاویر مختلف از اکوکاردیوگرافی، سونوگرافی قلب، آنژیوگرافی و مشاهده گرافتگی یا انسداد عروق کرونر قلب (به کمک ماده حاجب)



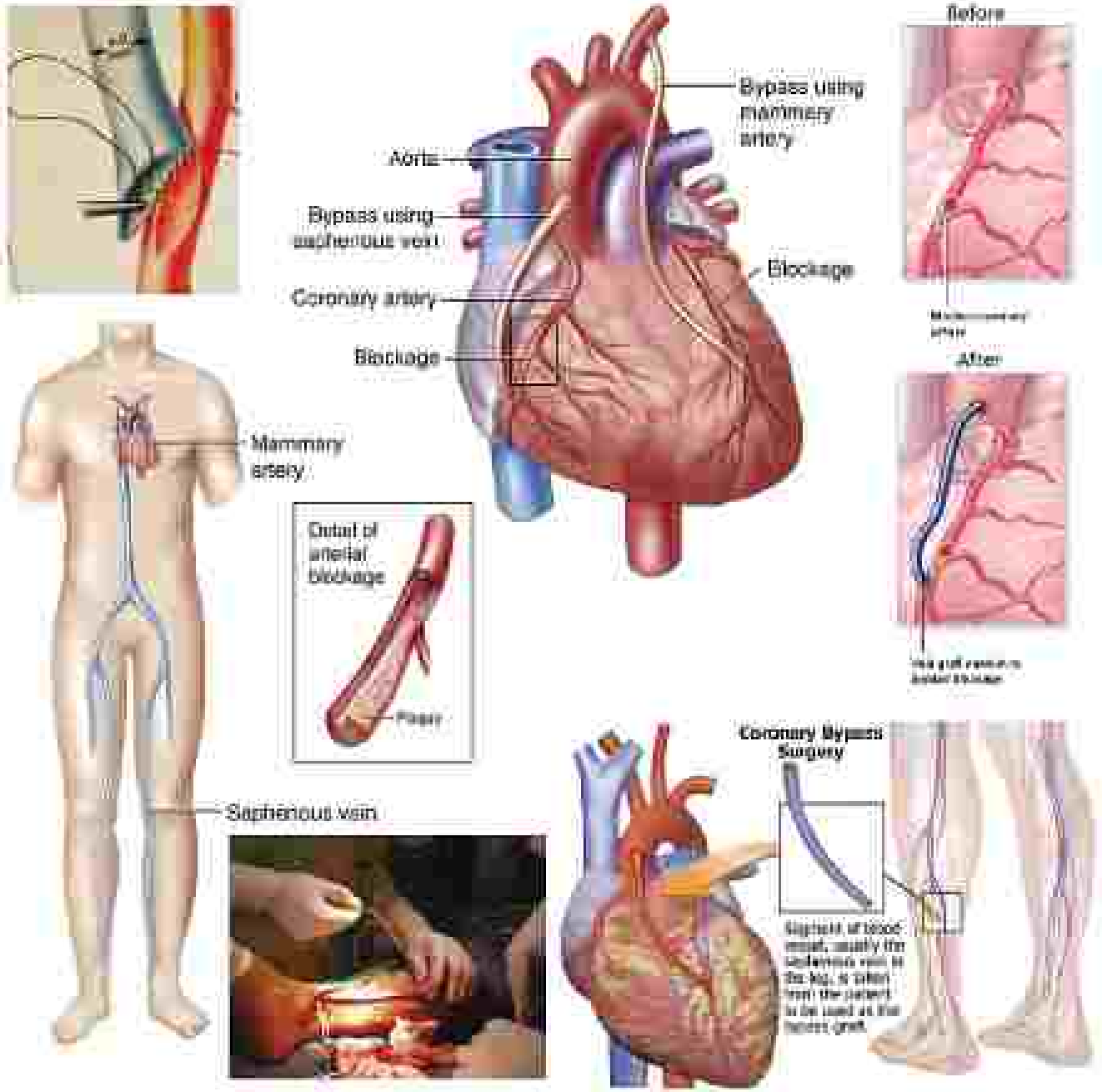
شکل ۴-۱۰: مراحل مختلف بالن زدن در عروق انسدادی کرونر قلب. در واقع، بالن یک وسیله بادکنک مانندی است که در انتهای یک کاتتر قرار داشته و پزشک متخصص قلب اگر هنگام آنژیوگرافی متوجه گرفتگی عروق کرونر باشد می‌تواند با تزریق مایع به داخل کاتتر باعث حجیم و متسع شدن بالن در ناحیه گرفته عروق شود. درنتیجه قسمت گرفته رگ تا مدتی باز شده و ریسک انفارکتوس قلبی به طور موقت از بین می‌رود. این روش درمان موقتی بوده و احتمال بازگشت انسداد وجود دارد. لذا بیمار می‌بایست برای درمان قطعی تحت عمل بای‌پس قرار بگیرد. ولی اگر سن، توانایی جسمانی، سیستم ریوی و مشاوره بیهوشی بیمار، اجازه عمل جراحی سنگین قلب را ندهد، در چنین شرایطی همزمان با بالن زدن می‌توان از سیستم بالن جهت گذاشتن قلب (استنت) استفاده نمود تا قبل اجازه بازگشت انسداد توسط پلاک آترواسکلروز را ندهد. استنت‌ها قفس‌های جمع شده‌ای هستند که بالن باعث بازشدن آنها و فشار به پلاک‌های برجسته عروق می‌شوند.



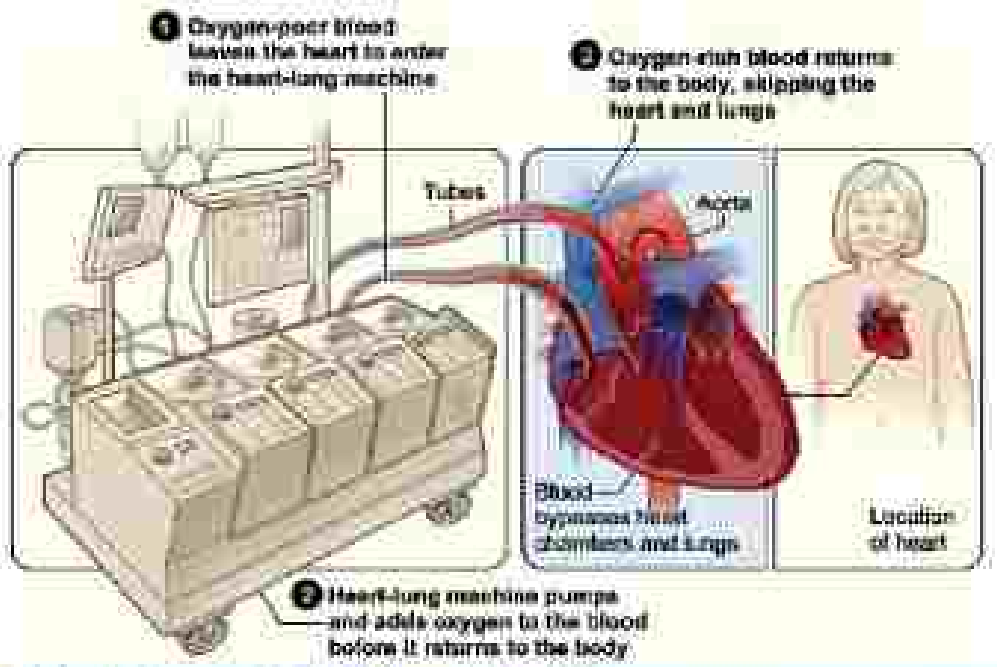
شکل ۱۳-۶ تصاویر مختلف از چندین نوع فنر یا استنت که به کمک کاتتر مخصوص بالن‌دار در ناحیه انسدادی رگ مستقر می‌شود.



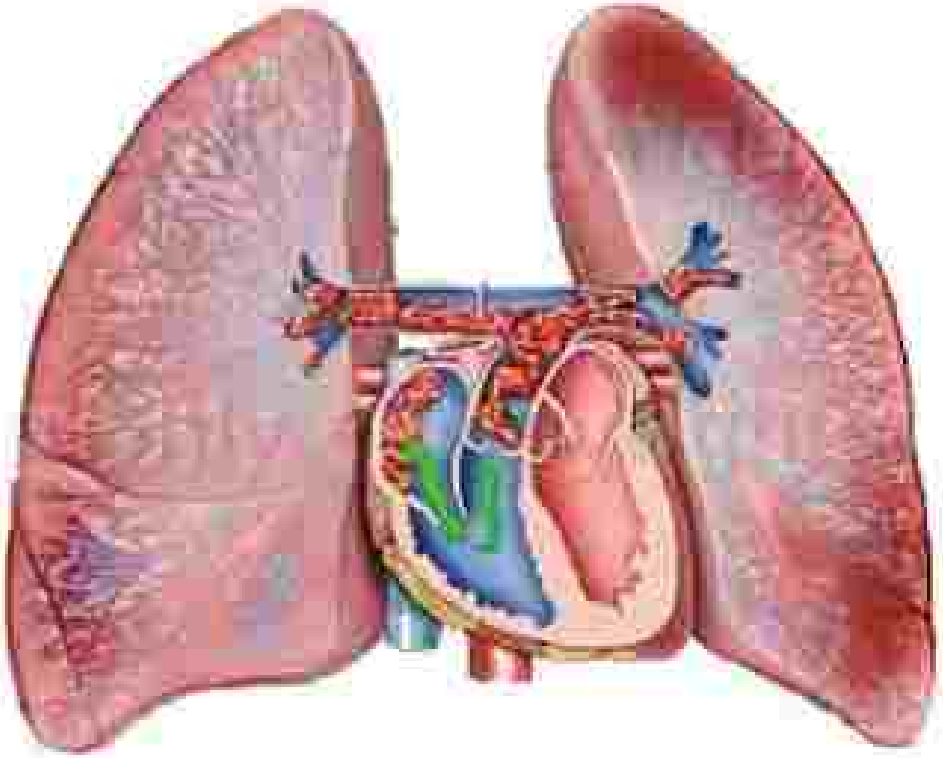
شکل ۱۴-۱۰ مراحل مختلف کارگذاشتن بالن و یا استنت در عروق اصلی کرونر قلب



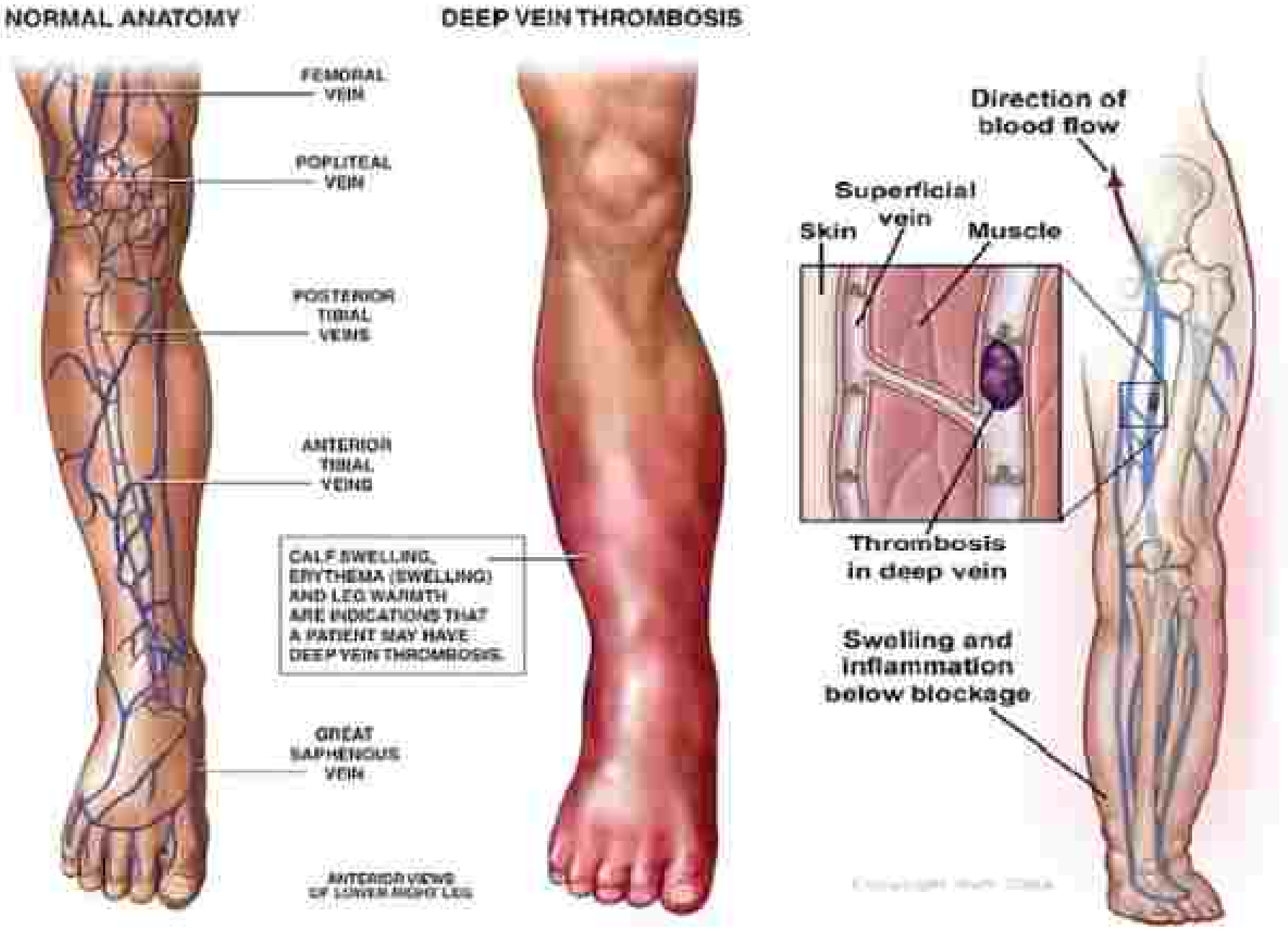
شکل ۱۵-۵ عمل قلب باز در بالا یکی از مهمترین و خطرناک‌ترین اعمال جراحی در جهان است که طی آن قسمتی از رگ سالم یا با ماهیچه سینه را خارج نموده و به قسمت انسداد رگ یا قسمت مجاور ناحیه گسستگی رگ در حال عمل می‌گیرند. بدین ترتیب با اتصال این رگ به شکل ناحیه انسدادی را ایجاد زیاد و تأثیر آن در شکل خون‌رسانی به عضله میوکارد قلب را از این رو به این نوع عمل جراحی عمل بای‌پس اصطلاحاً می‌گفته می‌شود

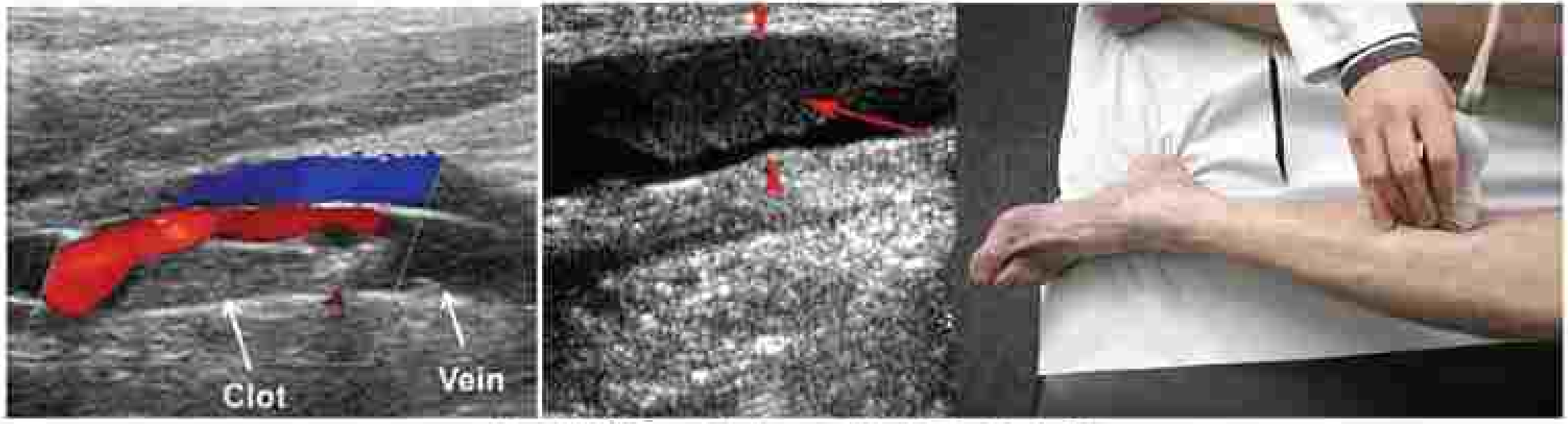


شکل ۱۹-۶ دستگاه قلب-ریه دستگاهی است که عمل پمپاژ یا پاریس به کمک از ایجاد می‌کند. دستگاه عمل قلب، عمل خون و فشار قلب را انجام عمل و درمان قلب را فراهم می‌کند. اما قلب از عمل خون جدا را با جیب بالشی از خون انجام می‌دهد. [illegible] دستگاه قلب-ریه و سپس به کمک دستگاه قلب-ریه [illegible] را به خارج از بدن و به دستگاه منتقل می‌کند تا فشار مقدار خون ناخن آن به عوامل [illegible] دیگر به سایر [illegible] و عضلات فشار قلب [illegible] را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. [illegible] خون [illegible] خارج از بدن و در دستگاهی که اکثر قلب و ریه را [illegible] می‌کند. [illegible] این فاصله [illegible] و [illegible] قلب [illegible] و سپس خون [illegible] با اکسیژن شده و آبیاری قلب و سلولهای [illegible] بدن [illegible] می‌باشد.



شکل ۱۹-۰۶: تشکیل ترومبوز در شریان ریوی باعث انسداد آن و جلوگیری از ورود خون بدون اکسیژن به ریه شده و در نتیجه با کاهش اکسیژناسیون خون باعث بروز سیانوز، هیپوکسی و عوارض خطرناکی در فرد می‌شود که از مهم‌ترین آنها می‌توان به هیپوکسی مغز و کاهش هوشیاری آن اشاره نمود. ترومبوزهای معلق نیز ممکن است در خون حرکت کرده و با ایجاد ترومبوآمبولی باعث گسترش آن در بدن و شاخه‌های عمقی ریه شود که در چنین مواردی می‌تواند باعث نکروز ریه و تشدید عوارض هیپوکسیک شود.


NORMAL ANATOMY
DEEP VEIN THROMBOSIS
FEMORAL VEIN
POPLITEAL VEIN
POSTERIOR TIBIAL VEINS
ANTERIOR TIBIAL VEINS
CALF SWELLING, ERYTHEMA (SWELLING) AND LEG WARMTH ARE INDICATIONS THAT A PATIENT MAY HAVE DEEP VEIN THROMBOSIS.
GREAT SAPHENOUS VEIN
ANTERIOR VIEWS OF LOWER RIGHT LEG
Direction of blood flow
Superficial vein
Skin
Muscle
Thrombosis in deep vein
Swelling and inflammation below blockage



شکل ۵۰-۶: سونوگرافی دایپلر از وریدهای پا که وجود DVT را اثبات می‌کند.

شکل ۲۳-۱۰: ترومبوز وریدهای عمقی پا (DVT) که با قرمزی، ادم و درد پا و افزایش ریسک ترومبو آمبولی همراه می‌باشد. لازم به ذکر است که التهاب عروق وریدی ناشی از ترومبوز، ترومبوفلبیت گفته می‌شود که نوعی واسکولیت وریدی ناشی از هیپرکسی و آتروکسی می‌باشد.

لازم به ذکر است، به فرم پیشرفته نارسایی مزمن عروقی بعد از DVT، سندرم بعد ترومبوز یا سندرم بعد فلبیت (PTS یا PPT)[1] گفته می‌شود که در آن آسیب عروقی باعث ادم، درد، اریتما، هیپرپیگمانتاسیون، زخم پوستی، لیپودرماتواسکلروز، آستئاتوز یا ریزش پوست (ایچتیوز اکتسابی)، آتروفی و تغییرات تروفیک می‌شود. در برخی افراد با کانسر وسیع و ترومبوز عروق متقاران ناشی از آن، زخم‌های پوستی حالت زله‌ای و بلغمی (فلگماریا)[1] پیدا می‌کنند که به آن زخم مارژولین[2] و به فرم خفیف آن آلبادولنز[3] گفته می‌شود. فرم شدید PTS می‌تواند به صورت سیانوز و سیاهی کامل دست یا پا نیز بروز کند [۳۷].

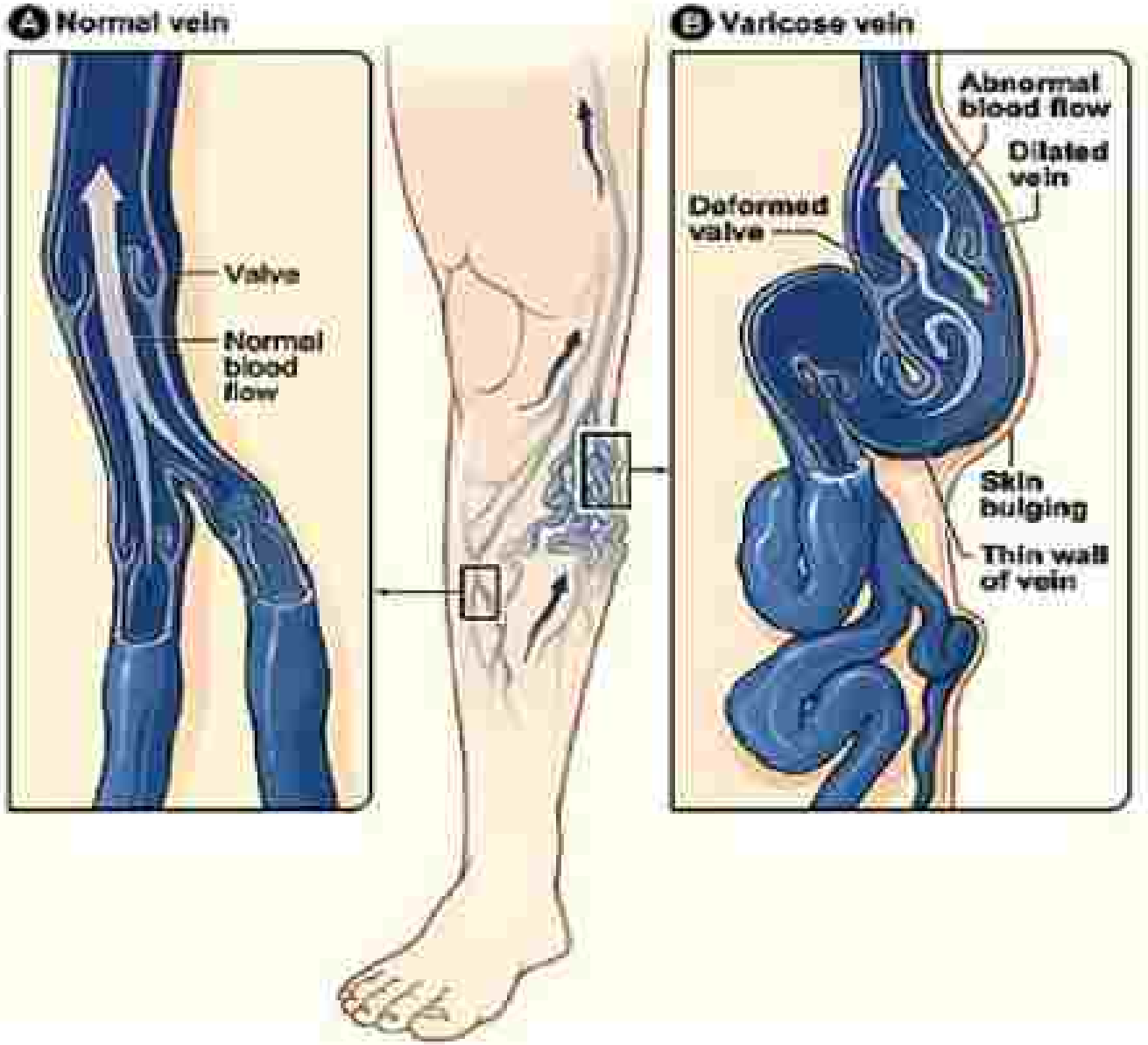
1 Postthrombotic or postphlebitic syndrome

1 Phlegmasia cerulea dolens

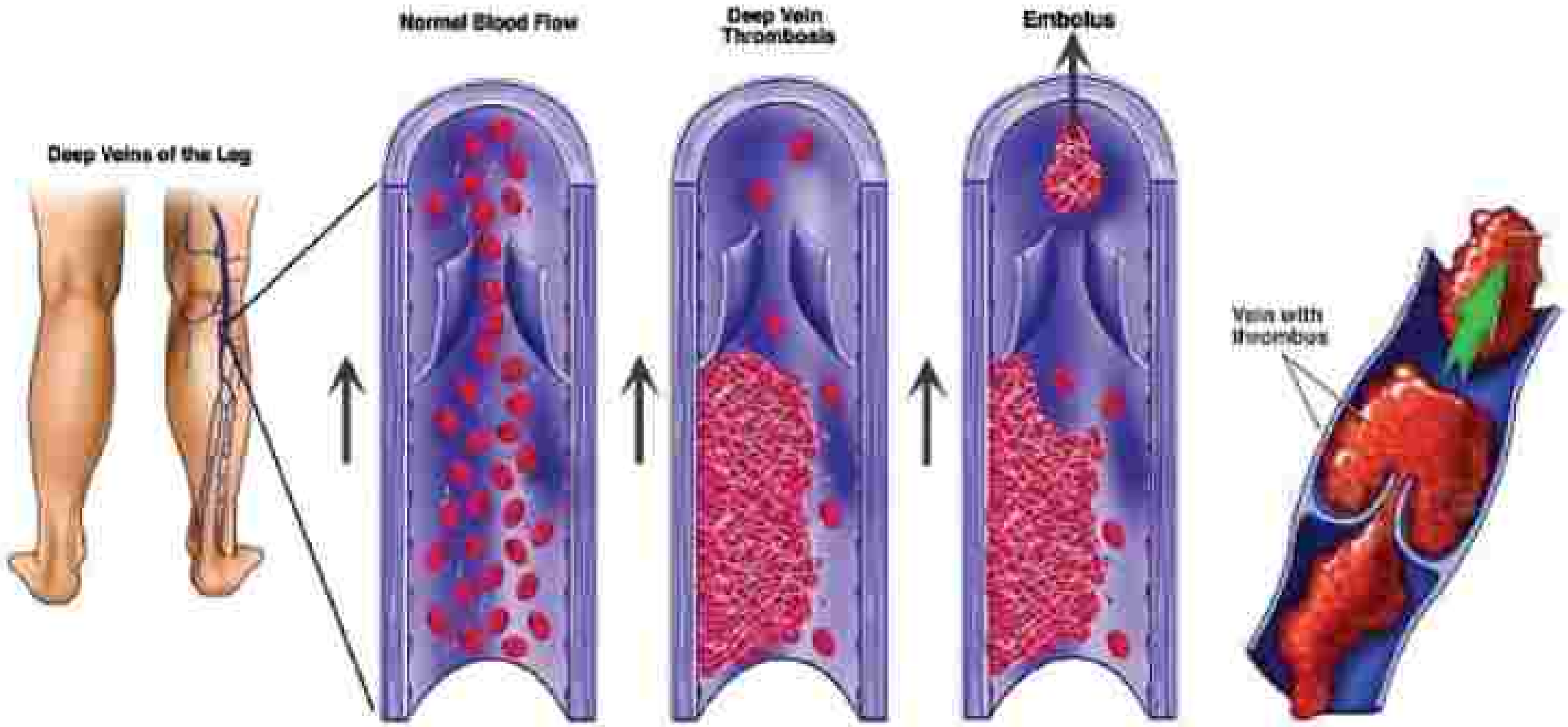
2 Marjolin's ulcer

3 alba dol ens

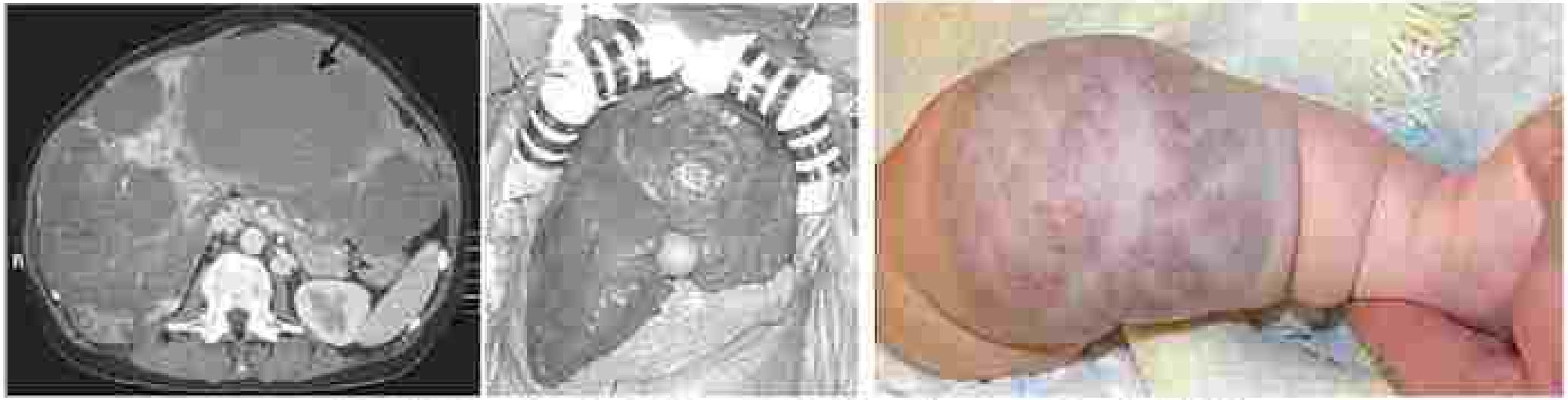
شکل ۴۰-۴۰: سندرم PTS و زخم‌های مارژولین در بیماران مبتلا به DVT



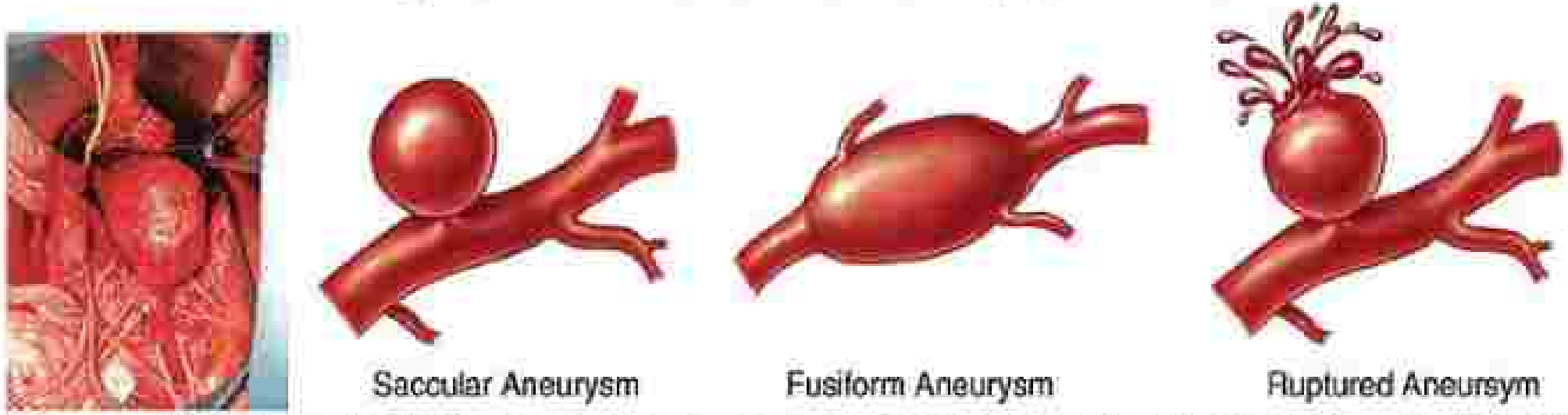
شکل ۲۶-۶۰: پاتوفیزیولوژی بروز واریس در پا که به احتمال عملکرد دریچه‌های لانه کبوتری وریدهای عمقی پا مربوط می‌شود. این افراد مستعد DVT و بروز DIC نیز هستند.



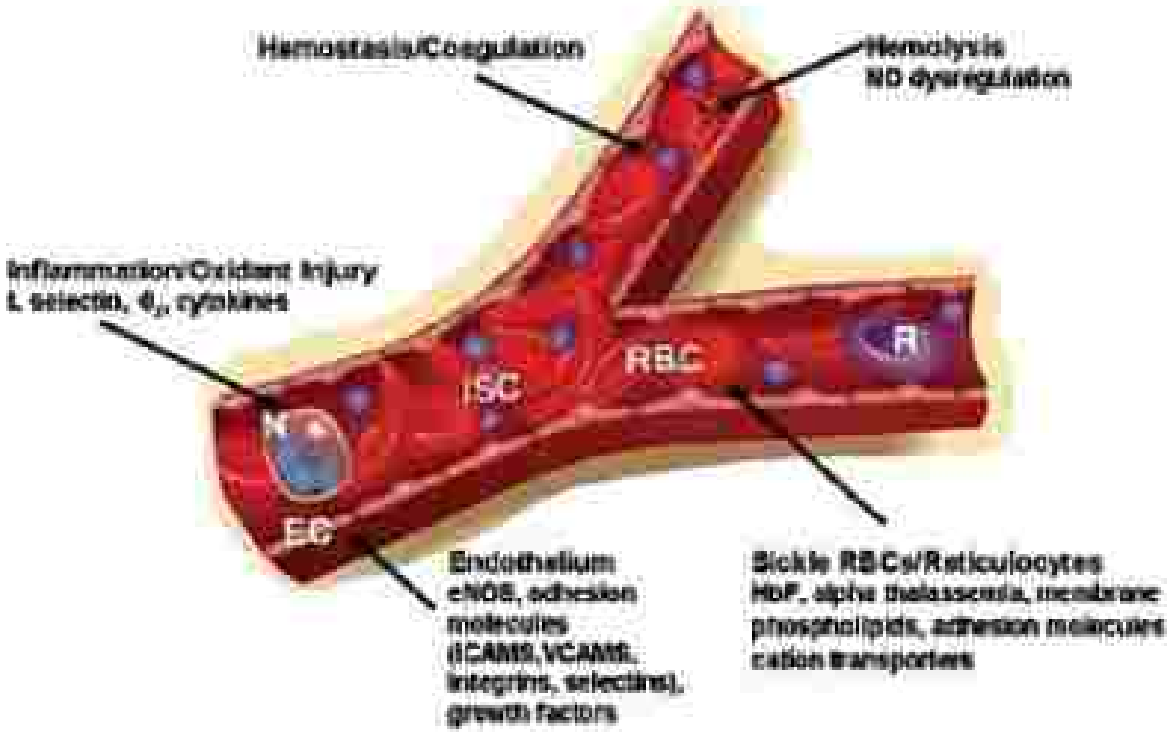
شکل ۲۷-۰۰: اختلالات دریچه لانه‌زنبوری. احتباس و ایستایی خون در فواصل بین دریچه‌ها و القاء ترومبوز در آن می‌تواند باعث افزایش ریسک ترومبوآمبولی و DVT شود.

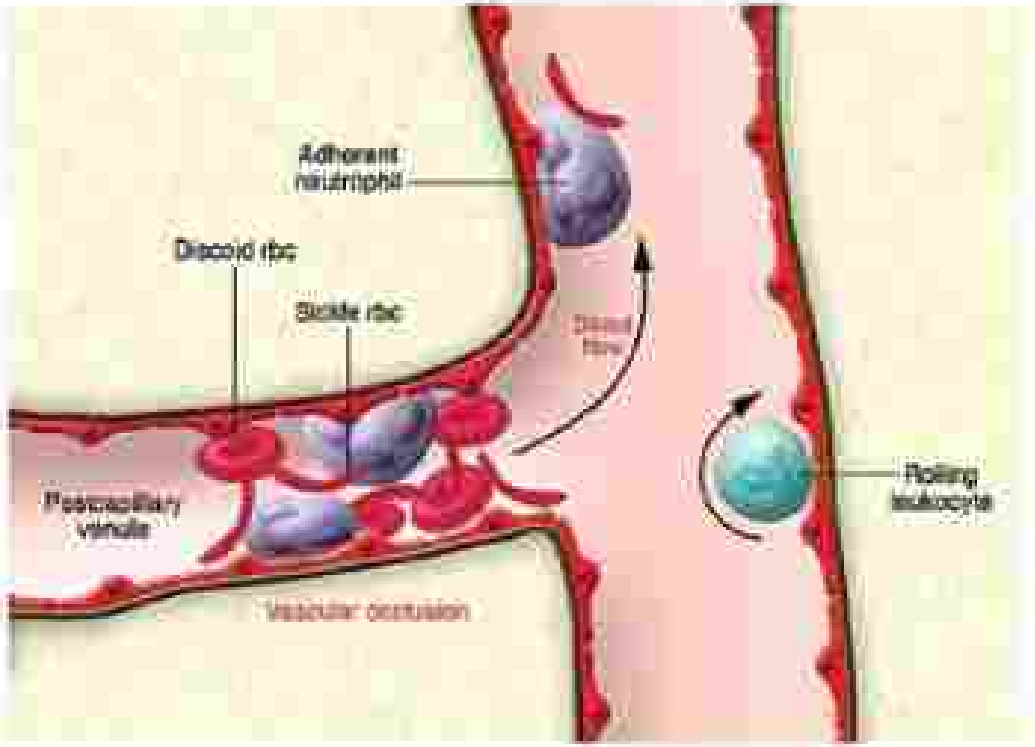


شکل ۲۴-۶: همانژیوم وسیع در بازو و همانژیومای شدید و غول آسای کبدی (سندرم کازاباخ-مریت)

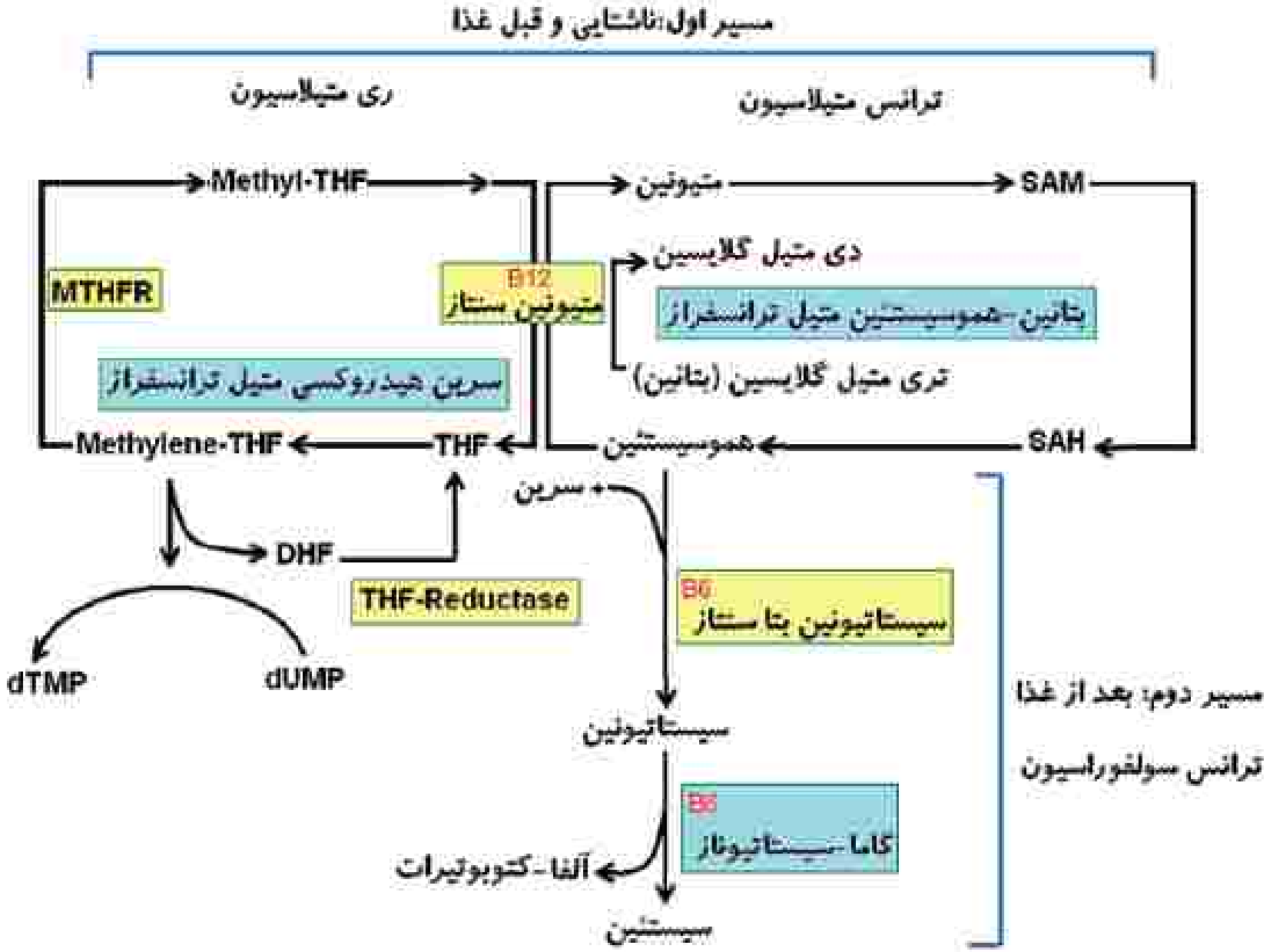


شکل ۲۵-۶: انواع مختلف آنوریسم عروقی که گاهی در ورید اجوف تحتانی ایجاد شده و باعث تورم شدید، نارسایی قلبی و در موارد شدید باعث پارگی، خونریزی داخلی و مرگ می‌شود. آنوریسم‌ها به اشکال دوکی (عمدتاً در ورید اجوف) و حبابی یا کیسه‌ای شکل (عمدتاً در مغز) دیده می‌شوند و اغلب به دلیل تورم مزمن و شدید، دیواره نازک و آسیب پذیری دارند. آنوریسم‌های دوکی یا فوزی‌فرم در بیشتر مواقع حاوی پلاک‌های آترواسکلروز نیز بوده و استعداد بالایی در بروز ترومبوز دارند [۵].





شکل ۳۷-۶: انسداد عروقی ناشی از عدم انعطاف سلول‌های داسی شکل و افزایش چسبندگی سلول‌ها یکدیگر و همچنین به سلول‌های اندوتلیوم و لکوسیت‌های مارژینال [۵].



شکل ۳۰-۶: مسیرهای متابولیسم هموسیستئین در دو شرایط ناشتا (ری‌متیلاسیون و ترانس‌متیلاسیون) و تغذیه با متیونین بالا (ترانس‌سولفوراسیون). در واقع هنگام تغذیه با متیونین، به دلیل افزایش متیونین خون تبدیل هموسیستئین به متیونین متوقف شده و لذا سیستئین تولید می‌کند که اگر مسیر ترانس‌سولفوراسیون دچار نقص آنزیمی باشد، به اجبار هموسیستئین خون افزایش می‌یابد (تست

۴) افزایش هموسیستئین خون:

هیپرهموسیستئینمی یکی از مهم‌ترین علل ایجاد ترومبوز وریدی شریانی و آترواسکلروزیس است. افزایش هموسیستئین باعث اختلال در اتصال I-PA به دامنه دنباله‌دار آنکسین II (رسپتور I-PA) شده و در نتیجه I-PA نمی‌تواند به پلاسمینوژن متصل شود و آن را فعال کند. بدین ترتیب به دلیل کاهش پلاسمین فرد مستعد ترومبوز می‌شود. سطح طبیعی هموسیستئین خون بین ۵-۱۵μmol است که مقادیر ۱۶-۲۴μmol در گروه افزایش خفیف، مقادیر ۲۵-۱۰۰μmol در گروه افزایش متوسط و مقادیر بالاتر از ۱۰۰μmol در گروه افزایش شدید هموسیستئین قرار می‌گیرند. اختلال در مسیر متابولیسم هموسیستئین باعث هموسیستئینمی و مقادیر بیش از ۱۰۰μmol آن باعث دفع ادراری و هموسیستینوری می‌شود. بالا بودن هموسیستئین خون می‌تواند با آسیب به سلول‌های اندوتلیوم و کاهش اثرات ضد انعقادی آن باعث آترواسکلروز شدید و رودربی، آترو ترومبوز و ایجاد ترومبوز وریدی شود، به‌طوری‌که حتی افزایش خفیف و ۵ درصدی آن به افزایش بیماری‌های کرونری و شریان‌های محیطی و مغزی می‌انجامد. شیوع این بیماری در جمعیت عادی حدود ۵-۳٪ در جمعیت افراد ترومبوفیلی ۱۵-۸٪ و ریسک نسبی ترومبوز ناشی از کمبود آن، ۴-۳ برابر می‌باشد. افزایش هموسیستئین می‌تواند به دلیل نقص آنزیمی (مثل سیستاتیونین بتا سنتاز)، فقر تتراهیدروفولات (THF یا Vit-B9) یا فقر کوبالامین (Vit-B12) باشد. در حالت معمول، methyl-THF

مکانیسم‌های اثر هیپرهموسیستئینمی در ایجاد سختی عروق و ترومبوز:

۱- هموسیستئین باعث رشد و تکثیر سلول‌های ماهیچه‌ای صاف دیواره عروق، مهار عمکرد و افزایش تکثیر سلول‌های اندوتلیال می شود. از این رو موجب ضخیم شدن لایه انتیما عروق و بروز پلاک آترواسکلروز می‌شود.

۲- اختلال در عملکرد فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (I-PA) و مهار اتصال آن به آنکسین II

۳- اختلال در پاسخ وازوموتور و کاهش فعالیت ترومبومودولین عروق

۴- جلوگیری از رها شدن NO و پروستاسیکلین ($PG-I_2$) و تجمع نیتریک اکساید به همراه LDL و کلسترول در ماکروفاژها.

۵- جلوگیری از فعال شدن پروتئین C به وسیله کمپلکس ترومبین- ترومبومودولین.

۶- آسیب مستقیم عروقی از راه تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش بیان TF3

جدول ۹-۶ ریسک نسبی بیماری‌های مختلف ترومبوفیلیک [۴]

وضعیت ترومبوفیلیک		ریسک نسبی ترومبوز
نرمال		۱
فقر پروتئین C	هتروزیگوت	۸-۱۰
	هموزیگوت	ترومبوز شدید هنگام تولد
فقر پروتئین S	هتروزیگوت	۱۰-۱۵
	هموزیگوت	ترومبوز شدید هنگام تولد
افزایش هموسیستئین خون		۳-۴
افزایش هموسیستئین توأم با V لیدن هتروزیگوت		۲۰
مصرف OCP[۱] در فرد نرمال		۴
V لیدن	هتروزیگوت	۵-۷
	هتروزیگوت توأم با OCP	۳۰-۳۵
	هموزیگوت	۸۰
	هموزیگوت توأم با OCP	بالای ۱۰۰
پروترومبین G20210A	هتروزیگوت	۳
	هتروزیگوت توأم با OCP	۱۶
	هموزیگوت	۳۵-۵۰ (بیشتر شریانی)
فقر AT-III	نوع I هتروزیگوت	۱۴-۲۰
	نوع I هموزیگوت	مغایر حیات و مرگ جنینی
	نوع II هموزیگوت	بالای ۱۰۰ با ریسک ترومبوز شدید وریدی و شریانی

کمبود هموزیگوت پروتئین C و S باعث DIC و پورپورای فولمینانت در سنین پایین و حتی دوران جنینی می‌شوند ولی کمبود هتروزیگوت آنها در کنار یک عامل مستعد کننده DIC می‌تواند باعث بروز پورپورای فولمینانت در بالغین نیز بشود. LPS با تحریک فاکتور XII، سیتوکاین‌های التهابی مثل IL-1، IL-8 و TNF با تحریک تولید مقادیر بالای TF3، درگیری جفت و آمنیون با تأمین مقادیر بالای فسفولیپید و TF3، مارگزیدگی با فعال‌سازی برخی فاکتورهای انعقادی و تورمورها و سرطان‌ها با تأمین موسین و سرین‌پروتئازهای فعال کننده فاکتور X و تأمین TF3 باعث تحریک DIC در بیماران مبتلا به نقص Pro-C شده و منجر به پورپورای فولمینانت می‌شوند. به همراهی DIC با ترومبوآمبولی و یک نئوپلاسم متاستاتیک مثل سرطان رحم، مغز، تخمدان و پانکراس، سندرم تروسو (trousseau) یا ترومبوآمبولی مهاجر گفته می‌شود[۴۱].

شکل ۲۱-۶۰: نکروز پوستی ناشی از DIC در ناحیه پستان، زیر ناف و اطراف ران پا [۳۷].

چهره دوم

هموفیلی•

۱-کمپلکس فاکتور IX (کنسانتره کمپلکس پروترومبین یا PCC)

۲-کنسانتره فاکتور IX

۳-فاکتور IX نوترکیب (Benefix)

۴-کنسانتره فعال شده کمپلکس پروترومبین (اتوپلکس یا APCC)

جدول ۱۳-۵۷: خواص بیوشیمیایی کنسانتره فاکتور IX

Specific Activity IU IX C/mg Pro	Pro-S	Pro-C	X	VII	II	IX:Ag	IX:C	IX Concentrate (Company)
	IU/ml							
2.1	2.9	2.9	64	0.22	79	111	64	Preconative Kabi)
1.9	7	2.3	44	3.9	86	110	55	Prothromplex-TIM4 (Immuno)
278	0.74	0.17	0.3	<0.01	0.05	162	115	Nonative (Pharmacia)
121	0.13	0.23	16	0.1	6	650	257	Alphanine (Alpha)
195	0.04	0.002	0.21	<0.05	0.98	154	110	Immunine (Immuno)
236	0.06	0.14	0.02	0.03	0.25	260	98	Mononine (Armour)

۴- فراورده‌های فیبا (FEIBA) یا APCC:

این فراورده، نوعی PCC فعال بوده از پلاسمای پوولد تهیه می‌شود و به جهت داشتن مقادیر قابل توجهی از فاکتورهای فعال IIa، VIIa، IXa، Xa و فسفولیپازهای فعال کننده، بهتر و بیشتر از کمپلکس پروترومبین (پروپلکس) و کنسانتره فاکتور IX می‌تواند نیاز به فاکتور VIII را میان‌بُر بزند، لذا به AICC[1]، APCC[2] و Feiba[3] هم معروف بوده و نوع تجاری آن اتوپلکس T[4] نام دارد. فاکتورهای فعال موجود در این فراورده قادرند بدون نیاز به فاکتور VIII و با دور زدن آن، مسیر داخلی و مشترک انعقاد را راه‌اندازی نموده و باعث تشکیل لخته شوند. در مقابل، ریسک ترومبوز و حتی بروز MI در این نوع از فراورده‌ها بیشتر است. فیبا عمدتاً در افراد دارای مهارگر فاکتور VIII (هموفیلی اکتسابی) که در آنها آنتی‌بادی مهارگر، فاکتور VIII تزریق شده را نیز بلوکه و غیرفعال می‌کند، استفاده می‌شود تا بدین وسیله FEIBA با بای‌پس یا میان‌بُر زدن فاکتور VIII بتواند فاکتور X را فعال کند. دور معمولی آن ۳۰-۵۰U/Kg هر ۸ ساعت یک‌بار بوده ولی در موارد خونریزی شدید تا ۷۵-۱۰۰U/Kg هر ۶ ساعت یک‌بار نیز تجویز می‌شود. AICC/FEIBA برای هر دوی هموفیلی A و B اکتسابی و مقاوم به درمان دارای مهار کننده به‌کار می‌رود. این محصول مجوز FDA داشته و توسط حرارت و S/D ویروس‌زدایی شده و بعد از لیوفیلیزاسیون بسته‌بندی می‌شود. همان‌طوری‌که اشاره شد، از عوارض آن می‌توان به ترومبوز، افت فشار خون، MI و DIC اشاره نمود، لذا مصرف آن با بررسی تست D-دایمر پایش می‌شود. علاوه بر FEIBA، داروی نووسون نیز به دلیل داشتن VIIa فعال، توانایی فعال کردن فاکتور X و بای-پس فاکتور VIII را دارد ولی این دارو گران قیمت بوده و عوارض مشابهی با FEIBA دارد.

شکل ۳۶-۵۷: داروی FEIBA یا کمپلکس فعال شده پروترومبین (APCC) که به دلیل داشتن پروتئین‌های فعال پروترومبین باعث بای‌پس فاکتور VIII می‌شود.

جدول ۵-۵۸: تقسیم بندی شدت کمبود فاکتور VIII

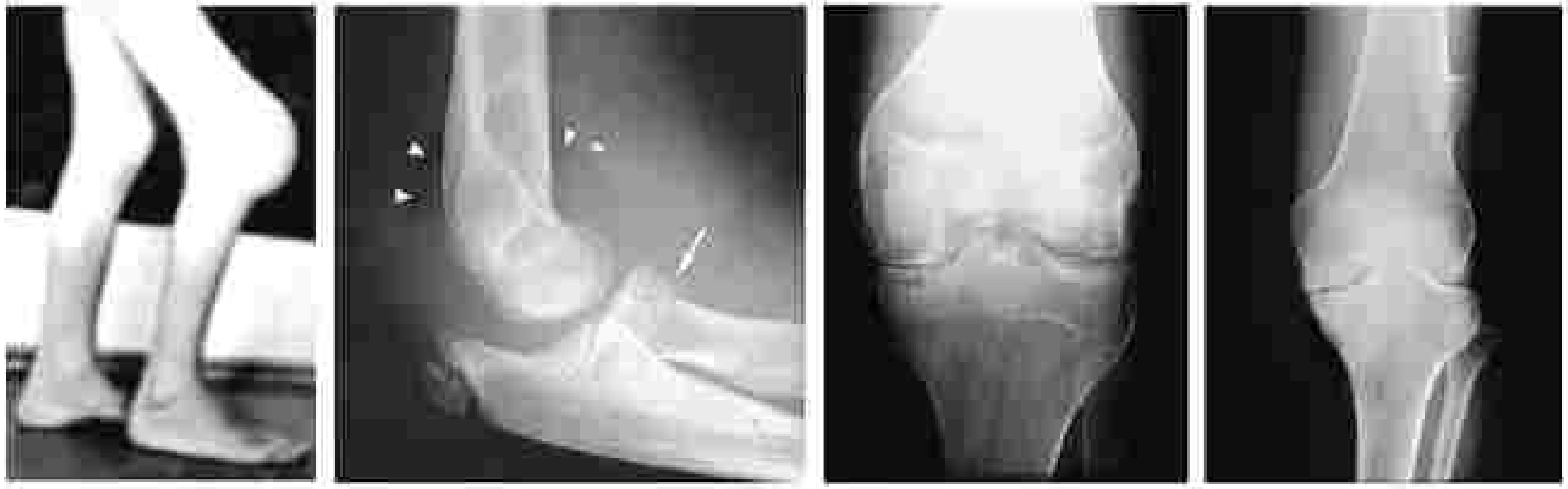
نوع	VIII:C(%)	VIII:C(IU/ml)	IX:C(%)	خمارتروز	شیوع	الگوی خونریزی	علت خونریزی
موارد شدید	<٪۱	<۰/۰۱U/ml	۱۰۰	+۳	٪۵۰-۷۰	۴-۲ بار در ماه	خودبخود
موارد متوسط	٪۱-۵	۰/۰۱-۰/۰۵U/ml	۱۰۰	+	٪۱۰	۶-۴ بار در سال	ترومای مختصر
موارد خفیف	٪۶-۳۰	>۰/۰۵U/ml	۱۰۰	-/+	٪۳۰-۴۰	غیرمعمول	ترومای شدید و جراحی
موارد نرمال	>٪۳۰	>۰/۳U/ml	۱۰۰	-	اکثر مردم	ندارند	-

جدول ۷-۵۸: خصوصیات انواع مختلف هموفیلی B

نوع	IX(%)	IX(IU/ml)	VIII:C(%)	درصد شیوع	خمارتروز
موارد شدید	<٪۱	<۰/۰۱U/ml	۱۰۰	۷۲	+۳
موارد متوسط	٪۱-۵	۰/۰۱-۰/۰۵U/ml	۱۰۰	۱۹	+
موارد خفیف	٪۶-۳۰	>۰/۰۵U/ml	۱۰۰	۹	-/+
موارد نرمال	>٪۳۰	>۰/۳U/ml	۱۰۰	-	-

شکل ۱۵-۵۸: از راست به چپ: ۱) کیست کاذب خونی در ناحیه چپ قفسه سینه بیمار هموفیلی. ۲) کودک مشکوک به تنیسه بدنی که از طریق آن هموفیلی وی تشخیص داده شده است و ۳) گازگرفتگی زبان که باعث تشکیل آبسه بزرگ در سطح آن می‌شود و اغلب با خونریزی شدیدی همراه می‌باشد.

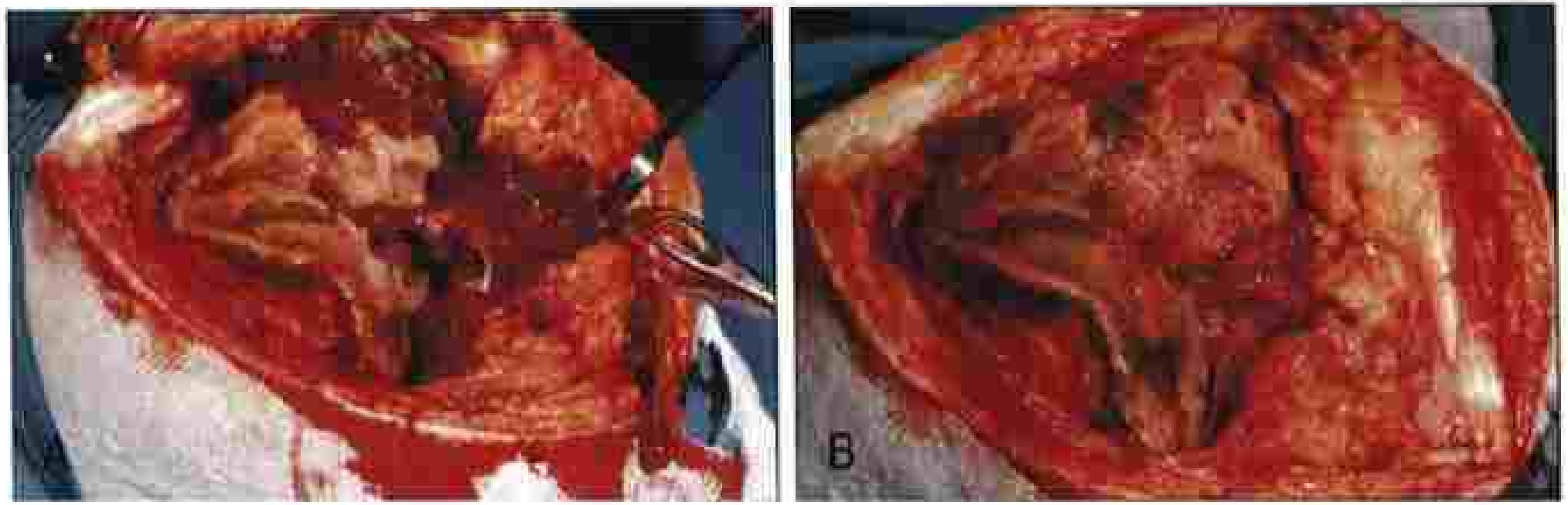
شکل ۱۶-۵۸: اکیموز وسیع و کبودشدگی وسیع در بیمار مبتلا به هموفیلی.



شکل ۱۸-۵۸: انواع مختلف هماتروز که باعث دفرمیتی و تخریب مفاصل و در نهایت آرتروپاتی هموفیلی می‌شوند. این علایم اغلب در مفاصل زانو، آرنج، مچ پا، مچ و شانه دیده شده و کمتر در مفاصل بین مهره‌ها و انگشتان دیده می‌شوند. هماتروز اختصاصی‌ترین نشانه هموفیلی و خونریزی مغزی شایع‌ترین علت مرگ مبتلایان موفیلی می‌باشند.

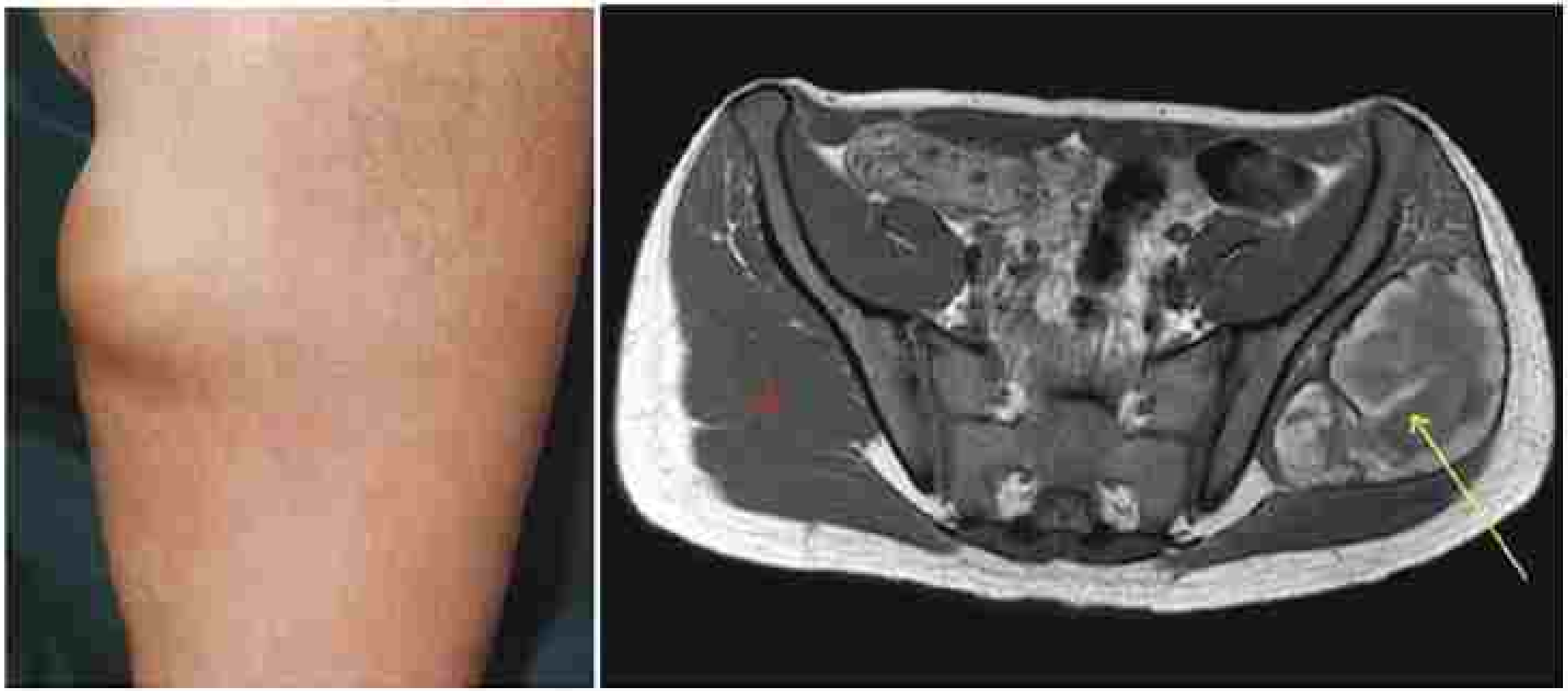
شکل ۱۹-۵۹: دفرمیتی مفاصل در هماتروز ناشی از هموفیلی

شکل ۲۱-۵۱: تخلیه مستقیم خون همارتروز توسط سرنگ‌های مخصوص

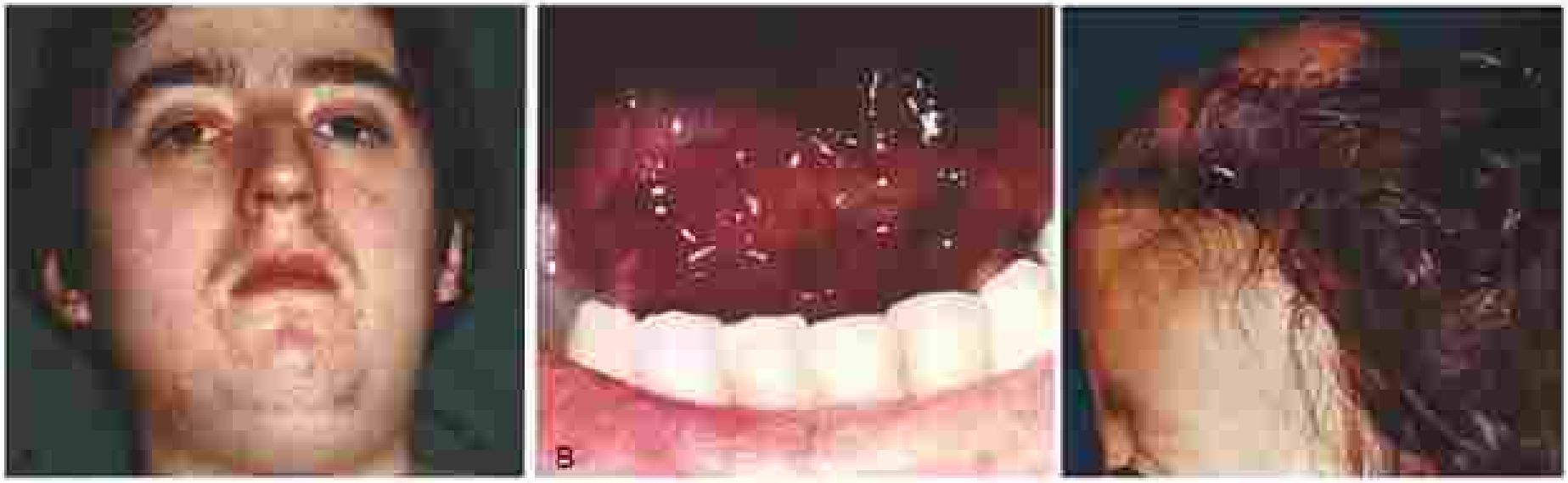


شکل ۲۲-۵۱: هموسیدروز و تغییر رنگ زانو به همراه دفرمیتی شدید در زانوی بیمار مبتلا به هموفیلی A [۳۷]

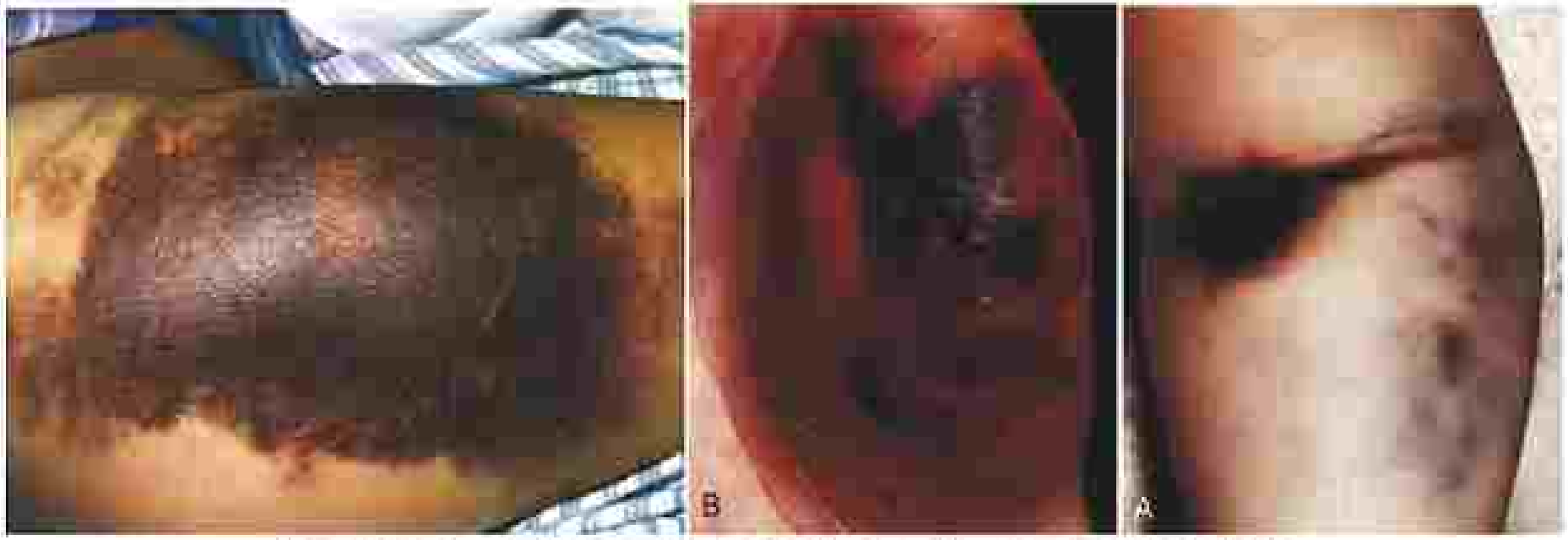
شکل ۲۳-۵۸: تخلیه اجزاء استخوانی و غضروفی زانوی بیمار قبلی که البته تغییر رنگ هموسیدرینی آنها نیز مشهود است. لازم به ذکر است، برخلاف اختلالات پلاکتی که در آنها اکیموز و خونریزی مخاطی شایع‌تر است، در کمبود فاکتورهای انعقادی همارتروز، خونریزی مفاصل و بافت‌های نرم با شیوع بالاتری دیده می‌شود [۳۷].



شکل ۳۴-۵۸ راست) تومور کاذب (فلش زرد) در ناحیه باسن و در عضله کفل سمت چپ بیمار ۱۵ ساله مبتلا به هموفیلی شدید که توسط MRI-T2 تصویربرداری شده است. چپ) تومور کاذب عضله بازو که در اثر خونریزی‌های مکرر، ترمیم ناکامل کپسوله شدن و فیبروزه شده تدریجی آن ایجاد شده است [۱۲].



شکل ۲۵-۵۸: (راست) هماتوم شدید سر در اثر تروما، وسط و چپ) خونریزی لثه زیر زبانی که باعث تورم عنب‌لب و نواحی زیر چانه بیمار مبتلا به هموفیلی A شده است [۳۷].



شکل ۲۶-۵۸: هماتوم و خونریزی زیر جلدی شدید در نواحی آرنج، شست دست و ران پای بیمار مبتلا به هموفیلی A [۳۷].

با تشکر