

ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ СИСТЕМЫ У БЕРЕМЕННЫХ

Васильева А.А., Золотавина М.Л., Комаренко А.А.

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: Cat-Pug@yandex.ru

Поступила в редакцию: 10.07.2021

Аннотация. В работе рассматриваются методы определения компонентов антикоагулянтной системы плазмы крови, такие как иммунохимические методы (иммуноферментный анализ, иммунохеомлюминесценция, иммунодиффузия, радиоиммунный анализ), антикоагуляционный метод, хромогенный и клоттинговый. Благодаря применению клоттингового и хромогенного методов, показано изменение таких веществ как АТ III, протеин С и протеин S, у женщин в возрасте от 35 до 44 лет при нормально протекающей беременности и при наличии генетических тромботических предрасположенностей в анамнезе на разных сроках беременности. Была выявлена общая тенденция к снижению содержания в плазме крови АТ III и протеина S, и повышению протеина С. Также, было отмечено, что показатели антикоагулянтной системы в плазме крови у беременных с генетической тромботической предрасположенностью изменялись более значительно, чем у женщин с нормально протекающей беременностью.

Ключевые слова: ИХА, антикоагуляционный метод, хромогенный метод, клоттинговый метод, АТ III, протеин С, протеин S, плазма крови, беременность, генетические тромботические предрасположенности.

В современном мире, при общем росте благосостояния населения, все чаще проявляется риск невынашивания беременности, связанный с нарушением содержания в крови компонентов антикоагулянтной системы, таких как АТ III, протеин С и протеин S, являющихся наиболее значимыми в диагностическом отношении, что отмечает в своей работе И. А. Михайлиди [1]. Автор, говорит о том, что нарушения в системе гемостаза – это одна из основных причин не вынашивания беременности, но многие вопросы из этой области до сих пор остаются открытыми и нет окончательных данных по поводу влияния тех или иных факторов на беременность, задержку роста, её прерывание.

Для определения содержания антикоагулянтов в плазме крови можно применять различные методы. Например, методы иммунохимического анализа позволяют узнать содержание АТ III, при помощи простой радиальной иммунодиффузии, когда образуются преципитационные кольца при прохождении реакции антиген-антитело с соответствующими моноспецифическими и стандартными сыворотками антикоагулянта [2]. При определении антигена протеина С в плазме крови, используют твердофазный иммуноферментный анализ [3], а также иммунохеомлюминесценцию, которая сочетает в себе непосредственно хеомлюминесценцию и образование иммунного комплекса, сопровождающееся образованием светового излучения [4]. Также методами радиоиммунного и иммуноферментного анализа можно измерять количественное содержание протеина S. Для определения общего протеина применяют поликлональные, а свободного – моноклональные антитела. Данная группа методов обладает своими преимуществами, такими как высокая стандартизация, чувствительность, воспроизводимость, специфичность, возможность автоматизации, и простота в исполнении [3]. Однако, при большом количестве достоинств у иммунохимического анализа есть и свои недостатки, такие как отсутствие возможности оценить антикоагуляционную активность компонента, а также сложность в синтезе готовых конъюгатов.

Для определения содержания АТ III обычно применяют аутокоагуляционный тест, суть которого заключается в исследовании динамики образования и инактивации вещества тромбина в разведенной и гемолизированной крови пациента в которую добавляется раствор кальция хлорида. При использовании метода, осуществляется оценка свертывающая активность полученной смеси при помощи гемоккоагулографа [5]. Достоинство данного метода заключается в том, что он оказывается чувствителен к нарушениям внутреннего механизма свертывания крови, а недостаток – в его низкой стандартизации и большой затрате времени на выполнение [3].

Помимо данных методов, для исследования концентрации компонентов антикоагулянтной системы, возможно применение хромогенного метода, основанного на образовании цветного окрашивания в ходе прохождения реакции, после образования комплекса субстрат-вещество и высвобождения окрашенного продукта. Содержание АТ III, обратно пропорционально количеству красителя, а количество высвобождаемого красителя при определении содержания протеина С, находится в прямой зависимости [6]. Данный метод обладает большим количеством преимуществ, заключающихся в высокой воспроизводимости, стабильности реагентов, легкости автоматизации процесса, чувствительности к мутациям вне активного центра, но отличается высокой стоимостью реагентов [3].

Для определения концентрации антикоагулянтов применим и клоттинговый метод, заключающийся в регистрации временного промежутка между добавлением реактива, вызывающего свертывание плазмы, до

Таблица 1. Контингент обследуемых

Триместр	Экспериментальные группы, n	
	N, n	П, n
I	42 Э(I)	11 Э(Ип)
II	54 Э(II)	16 Э(IIп)
III	36 Э(III)	10 Э(IIIп)
Контрольная группа, n		
Небеременные женщины	25 К	
Примечания N – нормально протекающая беременность; П – с генетической тромбоцитической предрасположенностью; К – контрольная группа.		

образования сгустка фибрина, которое в свою очередь приводит к повышению мутности раствора [6]. В зависимости от присутствия веществ, которые добавляют при исследовании, можно оценить функционирование отдельных звеньев гемостаза. Так определение протеина S происходит в присутствии рекомбинантного тканевого фактора, фосфолипидов, ионов кальция, а также активированного протеина C. Данный метод исследования обладает своими преимуществами – простотой, легкостью, чувствительностью к патологиям определяемого вещества, доступностью и быстротой выполнения, благодаря которым получил широкое распространение при диагностике гемостазной системы [7]. Однако, использование клоттингового метода для определения АТ III дает не стабильные результаты и его, при возможности, для данного компонента его лучше не использовать, а также метод может давать заниженные результаты при высоком FVIIa и резистентности к АПС.

На сегодняшний день, определение содержания АТ III и протеина C преимущественно осуществляется с помощью *хромогенного метода*, а для определения содержания в плазме крови протеина S, чаще всего применяют *клоттинговый метод* [6].

Материалом исследования служила плазма крови женщин в возрасте от 35 до 44 лет, которые находились на поздней фазе репродуктивного периода согласно, классификации И. В. Станоевича [8]. Также внутри возрастной группы плазма крови женщин была разделена на триместры: I триместр (до 12 недель), II триместр (с 13 по 27 неделю) и III триместр (с 28 недели до момента родов) [9], что отмечается в данных таблицы 1. В исследовании были использованы данные гемостазного исследования плазмы крови у женщин в состоянии нормальной физиологической беременности, при наличии генетической тромбоцитической предрасположенности, а также для контроля были использованы данные практически здоровых женщин, находящихся вне состояния беременности.

Таблица 2. Показатели антикоагулянтной системы плазмы крови при беременности

Показатель / Референтные значения, %	Группа исследования						
	Э(I)	Э(II)	Э(III)	Э(Ип)	Э(IIп)	Э(IIIп)	К
АТ III 83,0-128,0	95,8* # ±11,4	90,1*# ±8,95	88,4* ±10,4	95,6' ±11,4	92,6' ±11,0	83,3* ±12,2	104,0 ±12,1
Протеин С 70,0-140,0	105,5 ±15,3	109,8' ±23,3	110,5 ±15,9	99,0 ±11,4	115,0 ±5,4	109,8 ±12,2	105,0 ±20,2
Протеин S 60,0-135,8	55,8* ±22,8	47,2*± 15,2	40,6* ±8,6	40,8 ±4,0	48,7 ±13,9	42,0 ±9,2	92,8 ±16,1
Примечания * – p<0,01 – значимость различий показателя плазмы крови с показателями соответствующей контрольной группы; ! – p<0,05 – значимость различий показателя плазмы крови с показателями соответствующей контрольной группы; # – p<0,01 – значимость различий показателя плазмы крови между группами сравнения.							

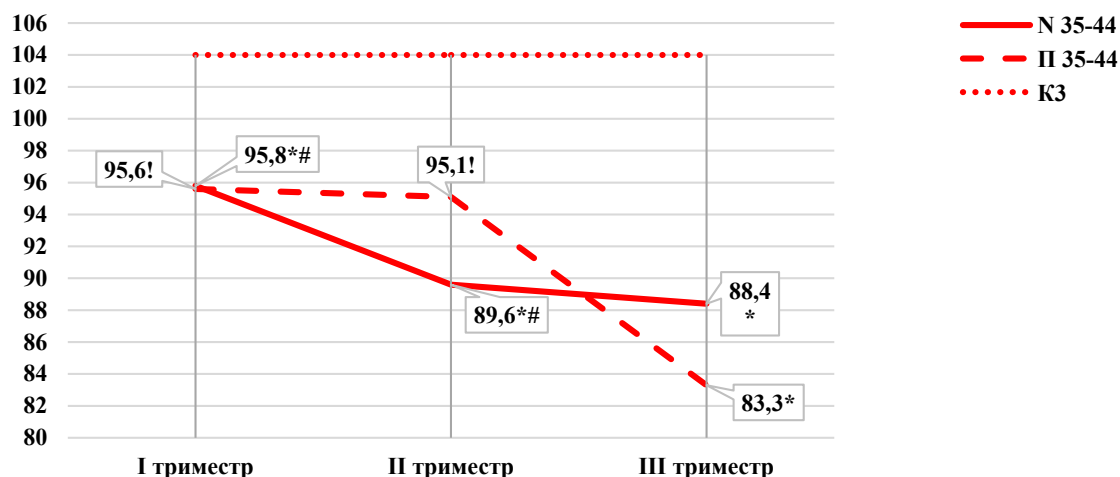


Рисунок 1. Изменение концентрации АТ III в плазме крови беременных

Согласно данным работы В. Е. Радзинского [10], на группу от 30 до 40 лет приходится до 40 процентов риска спонтанного прерывания беременности, одной из причин которого, могут быть нарушения в системе гемостаза [10]. Поэтому, для исследования были взяты данные гемостазного исследования плазмы крови беременных женщин старшего возраста.

При *нормально протекающей беременности* в первом триместре согласно данным таблицы 2, у группы Э(I) содержание АТ III в плазме крови снижалось относительно данных о концентрации антикоагулянта в плазме у контрольной группы в 1,08 раза. Во втором триместре беременности содержание АТ III в плазме крови в группе Э(II) относительно контрольной группы К снижалось в 1,16 раза. В третьем триместре в группе Э(III) отмечалось уменьшение концентрации АТ III в плазме крови относительно контрольной группы К в 1,18 раза. Данные о содержании АТ III в плазме крови во всех трёх триместрах попадали в зону значимости $p < 0,01$ и являлись достоверными. Таким образом, у женщин с нормально протекающей беременностью на всём ее протяжении концентрация АТ III в плазме крови оказывалась сниженной относительно группы контроля, и по мере увеличения срока, возрастало и уменьшение антикоагулянта.

Снижение содержания АТ III в плазме крови беременных женщин может быть связано с естественным процессом гиперкоагуляции, который развивается при данном состоянии и способствует подготовке и защите организма будущей матери от чрезмерной кровопотери во время родов [11]. В результате нарушения нормальной деятельности свертывающей системы происходит большой расход компонентов антикоагулянтной системы, в частности АТ III, и как следствие снижение его концентрации в плазме крови. В результате этого увеличивается риск развития во время беременности тромбоза сосудов, характеризующийся уменьшением концентрации АТ III в плазме крови [12].

Содержание АТ III в плазме крови беременных женщин с наличием генетических тромбофобических предрасположенностей в первом триместре беременности в группе Э(Iп) концентрация исследуемого антикоагулянта в плазме крови меньше в 1,12 раза по сравнению с контрольной группой, согласно данным таблицы 3, что находилось в зоне значимости $p < 0,05$. Содержание АТ III в плазме крови во втором триместре, у группы Э(IIп) оказывалось ниже в 1,09 раза, чем в плазме у группы контроля, при этом данные находились в зоне значимости $p < 0,05$. В третьем триместре у группы Э(IIIп) содержание АТ III в плазме крови снижалось в 1,25 раза, по сравнению с контролем, что попадало в зону значимости $p < 0,01$, и данные являлись достоверными.

К понижению концентрации АТ III на первых сроках беременности могут привести: гетерозиготный фактор Лейден, протромбиновая мутация, дефицит протеина S [13].

Таким образом, концентрация АТ III в плазме крови у беременных с наличием генетической тромбофобической предрасположенности была сниженной относительно показателей контрольной группы и к концу беременности оказывалась сниженной более значительно, чем у женщин с нормально протекающей беременностью, что и отмечается из рисунка 1.

Концентрация протеина С в плазме крови у женщин с нормально протекающей беременностью при прогрессировании данного состояния, оказывается повышенной относительно группы контроля. Однако в первом триместре беременности у группы Э(I) содержания протеина С в плазме крови практически равно таковым показателям у группы контроля. Во втором триместре у группы Э(II) в плазме крови, наблюдался рост концентрации антикоагулянта в 1,08 раза, по сравнению с группой контроля. В третьем триместре у беременных группы Э(III) содержание протеина С в плазме крови возрастало в 1,05 раза относительно содержания у контрольной группы.

В ходе определения содержания протеина С у экспериментальных групп во время беременности показатели превышали значения контрольной группы сравнения. Возможность увеличения концентрации данного показателя отмечал в своей работе В.В. Долгов [4]. Эти изменения концентрации протеина во время протекания

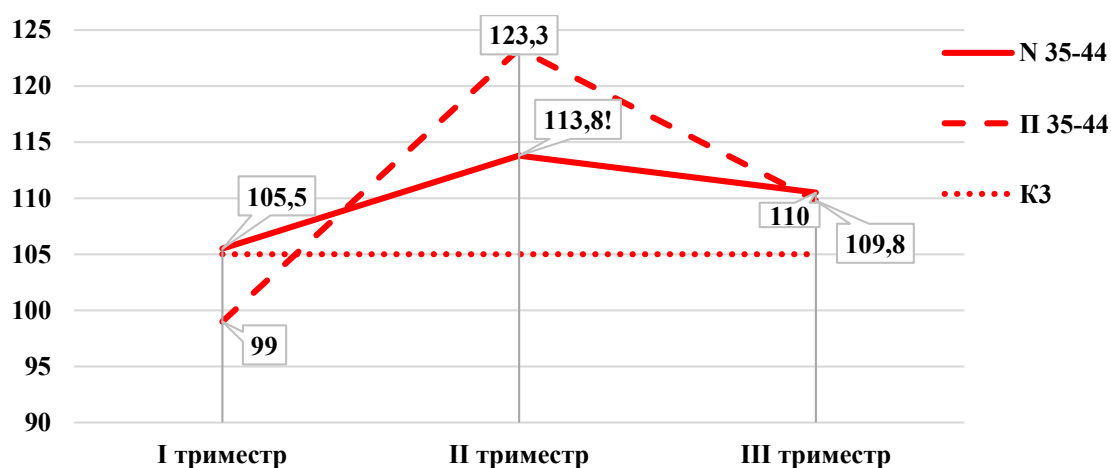


Рисунок 2. Изменение концентрации протеина С в плазме крови беременных

беременности, по мнению автора, могут происходить в связи с увеличением концентрации PAI-1 и угнетением фибринолитической активности крови [14], а также за счёт увеличения концентрации в организме женщины гормонов – эстрогенов, синтезирующихся в плаценте, по мере протекания беременности. Эстрогены стимулируют развитие тканей, участвующих в размножении, увеличивают чувствительность миомерия во время родовой деятельности к действию окситоцина. Они оказывают влияние на компоненты свертывающей системы крови, а также на протеин С [15].

У женщин с генетической тромбоцитической предрасположенностью в первом триместре в плазме крови в экспериментальной группе Э(Іп), концентрация протеина С снижалась в 1,06 раза по сравнению с его содержанием у группы контроля, в то время как у женщин с нормально протекающей беременностью такого изменения не наблюдалось. Во втором триместре у группы Э(ІІп) содержание протеина С в плазме крови возрастало в 1,17 раза по сравнению с контрольной группой. В третьем триместре у Э(ІІІп) концентрация данного антикоагулянта в плазме крови возрастала по сравнению с группой контроля в 1,05 раза. Таким образом у женщин с наличием генетической тромбоцитической предрасположенностью на этапе первого триместра беременности происходило снижение содержания протеина С в плазме крови, а далее, по мере протекания беременности происходит его волнообразное увеличение, что отмечается из рисунка 2. При этом во втором триместре, увеличение более значимое, чем у женщин с нормально протекающей беременностью.

Такие изменения показателей антикоагулянтной системы, возможны при наличии в генах мутаций, затрагивающих программирование MTHFR, что влечет за собой развитие в организме беременной состояния гипергомо-цистеинемии. Данное состояние будет оказывать большое влияние как отдельно на антикоагулянтную систему, так и на весь гемостаз в целом. Гипергомоцистеинемия осуществляет возрастание коагуляционного процесса за счёт активации протеина С и ингибирования и блокировки АТ III. Помимо этих нарушений возникает торможение фибринолиза, что в совокупности ведет к риску нарушения процесса протекания беременности [16].

Концентрация протеина S у обследуемых с нормально протекающей беременностью, в плазме крови в первом и втором триместре у групп Э(І) и Э(ІІ) оказывалась сниженной в 1,7 раза относительно группы контроля, данные являлись достоверными, так как находились в зоне значимости $p < 0,01$. В третьем триместре у группы Э(ІІІ) отмечалось, снижение содержания протеина S относительно группы контроля и достигало 2,28 раза, что являлось наиболее значительным отклонением среди всех групп, данные относительно контроля были достоверны, так как попадали в зону значимости $p < 0,01$.

При определении концентрации протеина S в крови беременных, мы можем отметить общую тенденцию к снижению концентрации данного показателя. Что объясняется тем, что количество протеина S во время беременности может снижаться более чем в половину, за счёт возрастания в крови количества такого компонента системы комплемента, как – С4b-связывающего белка. Происходит перераспределение в плазме крови в соотношении свободной и связанной формы протеина S. В следствии этого осуществляется уменьшение доли его свободной части, которая и обладает антикоагулянтной активностью [14].

У женщин с наличием генетической тромбоцитической предрасположенности содержание протеина S в плазме крови в первом триместре беременности у группы Э(Іп) снижалось в 2,27 раза относительно контрольной группы К. Во втором триместре беременности концентрация протеина S, у группы Э(ІІп) понижалась в 1,9 раза. В третьем триместре содержание протеина S у группы Э(ІІІп) уменьшалось в 2,21 раза. Также, стоит отметить, что все значения концентрации протеина S на всех этапах беременности значительно выходили за пределы референтных значений, характерных для данного компонента антикоагулянтной системы. Из рисунка 3, отмечается, что снижение протеина S у группы с генетическими отклонениями более значительное, чем у женщин с нормально протекающей беременностью.

При наличии у беременных женщин мутации протромбиновой мутазы развивается дефицит протеина S, который в свою очередь может привести и к снижению концентрации в плазме крови такого антикоагулянта как АТ III.

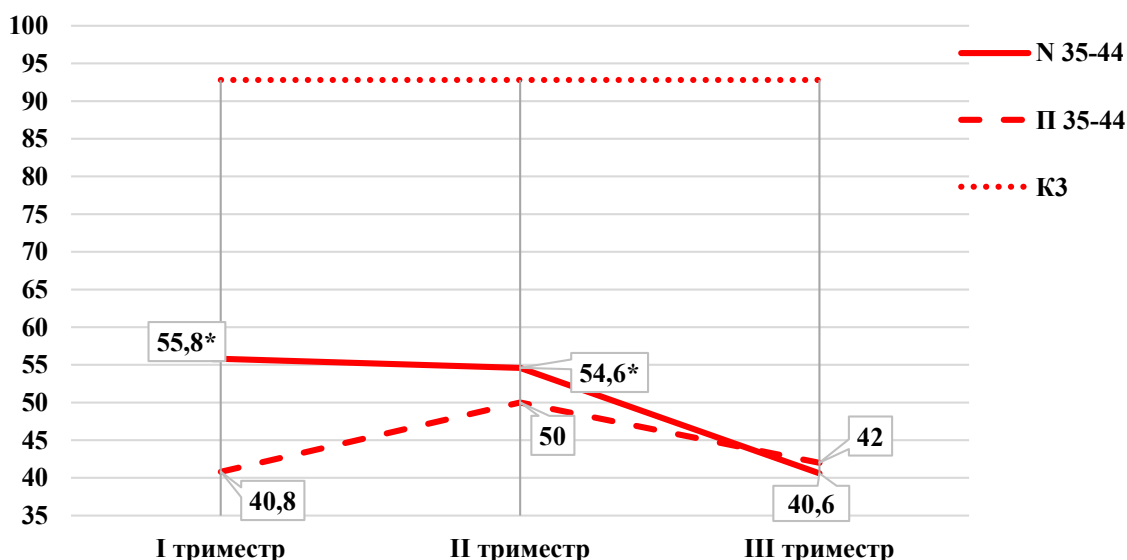


Рисунок 3. Изменение концентрации протеина S в плазме крови беременных

Таким образом, исходя из анализа информации, можно отметить, что благодаря применению хромогенного метода удалось определить, что во время беременности содержание АТ III в плазме крови имеет тенденцию к снижению, причем у группы с генетическими тромботическими предрасположенностями уменьшение концентрации более существенное к концу беременности; при помощи хромогенного метода удалось определить, что при беременности происходит возрастание содержания протеина С, однако отмечалось, что в первом триместре беременности у группы с генетическими тромботическими предрасположенностями, концентрация антикоагулянта уменьшалась, но далее, по мере прогрессирования беременности, она повышалась. Применение клоттингового метода позволило оценить изменение концентрации протеина S в плазме крови, которая к концу беременности снижается более чем в половину. Таким образом, новые методы исследования компонентов антикоагулянтной системы, дают возможность оценить в полной мере их изменение, что в последствии дает возможность своевременной оценки формирования и развития риска прерывания беременности. Однако следует оценивать не отдельные компоненты данной системы, а спектр показателей: АТ III, протеин С, протеин S.

Список литературы / References:

1. Михайлиди И.А. К вопросу о нарушениях в системе протеина С с разнообразной акушерской патологией в анамнезе у беременных. *Акушерство, гинекология и репродукция*, 2014, № 3, с. 59-64. [Mikhaylidi I.A. On the issue of protein c system disorders in pregnant women with various obstetric pathology in past history. *Akusherstvo, ginekologa i reprodukcijaz*, 2014, no. 3, pp. 59-64 (In Russ.)]
2. Волков С.Л. Разработка способа выделения антитромбина-III, получение антисыворотки и некоторые аспекты ее применения: автореферат дис. кандидата медицинских наук: 14.00.17, 14.00.16. Чита, 1999, 19 с. [Volkov S.L. Development of a method for isolating antithrombin-III, obtaining antiserum and some aspects of its application: abstract of the dissertation of the candidate of medical Sciences: 14.00.17, 14.00.16. Chita, 1999, 19 p. (In Russ.)]
3. Ярец Ю.И., Новикова И.А. *Лабораторные методы оценки системы гемостаза: учебно-методическое пособие для студентов 4 курса медико-диагностического факультета медицинских вузов*. Г.: ГомГМУ, 2014, 72 с. [Yarets Yu. I., Novikova I.A. *Laboratory methods for assessing the hemostasis system: an educational and methodological guide for 4th-year students of the medical and diagnostic Faculty of medical universities*. G.: GomGMU, 2014, 72 p. (In Russ.)]
4. *Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство*: в 2 т. – Т. 1. / под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012, 928 с. [Clinical laboratory diagnostics: national guidelines: in 2 vol. - Vol. 1. / ed. V.V. Dolgov, V.V. Menshikov. M.: GEOTAR-Media, 2012, 928 p. (In Russ.)]
5. Родионова В.В., Хмель О.С. Нарушение коагуляционного звена гемостаза у больных артериальной гипертензией в сочетании с остеоартрозом. *Запорожский медицинский журнал*, 2016, № 3, с. 20-23. [Rodionova V.V., Khmel' O.S. Violations of coagulation hemostasis in patients with arterial hypertension in combination with osteoarthritis. *Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal*, 2016, no. 3, pp. 20-23. (In Russ.)]
6. *Дифференциальная диагностика нарушений системы гемостаза с использованием инструментов и реагентных систем* / под ред. С.А. Васильева, В.В. Самойленко. М.: Instrumentation Laboratory, 2014, 73 с. [Differential diagnosis of hemostatic system disorders using instruments and reagent systems / ed. S.A. Vasilyev, V.V. Samoylenko. M.: Instrumentation Laboratory, 2014, 73 p. (In Russ.)]
7. Безруков А.В. Новые программируемые анализаторы показателей гемостаза. *Клинико-лабораторный консилиум*, 2007, № 16, с. 94-96. [Bezrukov A.V. New programmable analyzers of hemostasis indicators. *Kliniko-laboratorniy konsilium*, 2007, no. 16, pp. 94-96. (In Russ.)]

8. Станоевич И.В. Дискуссионные аспекты физиологии женской репродуктивной системы: медицинская и демографическая проблемы. *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2012, № 12, с. 73-77. [Stanoevich I.V. Debatable aspects of the physiology of the female reproductive system: a medical and demographic problem. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa*, 2012, no. 12, pp. 73-77. (In Russ.)]
9. Сидорова И.С., Макаров И.О. *Течение и ведение беременности по триместрам*. М.: Медицинское информационное агентство, 2009, 298 с. [Sidorova I.S., Makarov I.O. *The course and management of pregnancy by trimester*. М.: Medicinskoe informacionnoe agenstvo, 2009, 298 p. (In Russ.)]
10. Радзинский В.Е. *Неразвивающаяся беременность*. Методические рекомендации МАРС. М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2015, 48 с. [Radzinskiy V.E. *Undeveloped pregnancy*. Methodical recommendations of MARS. М.: redakciya jurnala StatusPraesens, 2015, 48 p. (In Russ.)]
11. Мельников А.П., Петрухин В.А., Половинкина И.А. Рациональная антикоагулянтная терапия при беременности. *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2010, № 1, с. 23-28. [Mel'nikov A.P., Petrukhin V.A., Polovinkina I.A. Rational anticoagulant therapy during pregnancy. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa*, 2010, no. 1, pp. 23-28. (In Russ.)]
12. Будыкина Т.С., Верхоломова Ф.Ю., Гурьева В.М. Эффективный инструмент оценки состояния гемостаза во время беременности: тромбофотометрия динамическая (тромбодинамика). *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2015, № 15, том 4, с. 95-100. [Budykina T.S., Verkhologomova F.Yu. Guryeva V.M. An effective tool to evaluate the homeostasis during pregnancy: dynamic thrombophotometry (thrombodynamics). *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa*, 2015, no. 15, vol. 4, pp. 95-100. (In Russ.)]
13. Рудзевич А.Ю. Изменения гемостаза у беременных с тромбофилией, возможность профилактики осложнений беременности при приобретенной тромбофилии и антифосфолипидном. *Научное обозрение. Медицинские науки*, 2019, № 1, с. 48-54. [Rudzevich A.Yu. Changes in hemostasis in pregnant women with thrombophilia, possibility of prevention of complications of pregnancy in thrombophilia and antifosfolipid syndrome. *Nauchnoe obozrenie. Medicinskie nauki*, 2019, no. 1, pp. 48-54. (In Russ.)]
14. Мурашко А.В. Антикоагулянтная терапия при беременности. *Трудный пациент*, 2009, том 7, № 1-2, с. 5-10. [Murashko A.V. Anticoagulation therapy at pregnancy. *Trudniiy pacient*, 2009, vol. 7, no. 1-2, pp. 5-10. (In Russ.)]
15. *Биохимия*, под ред. Е.С. Северина. 5-е изд., исп. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019, 768 с. [Biohimiya, ed. by E.S. Severin. 5th ed., isp. and add. М.: GEOTAR-Media, 2019, 768 p. (In Russ.)]
16. Пестрикова Т.Ю., Юрасов И.В., Юрасова Е.А., Ковалева Т.Д. Коррекция гемостазиологических нарушений у пациенток с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза. *Гинекология*. 2013, № 5, с. 25-28. [Pestrikova T.Y., Yurasov I.V., Yurasova E.A., Kovaleva T.D. Correction of homeostasis abnormalities in pregnant women with inflammatory diseases pelvic organs. *Gynecology*, 2013, vol. 15, no. 5, pp. 25-28. (In Russ.)]

APPLICATION OF MODERN METHODS FOR EVALUATION OF INDICATORS OF ANTI-COAGULANT SYSTEM IN PREGNANT WOMEN

Vasilyeva A.A., Zolotavina M.L.

Kuban State University

st. Stavropolskaya, 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: Cat-Pug@yandex.ru

Abstract. This scientific paper considers methods for determining the components of the anticoagulant system of blood plasma, such as immunochemical methods (enzyme immunoassay, immunochemoluminescence, immunodiffusion, radioimmunoassay), anticoagulation method, chromogenic and clotting. With the help of clotting and chromogenic methods, revealed changes in such substances as AT III, protein C and protein S among women aged 35 to 44 years with a normal pregnancy and in the presence of genetic thrombotic predispositions in the anamnesis at different stages of pregnancy. There was a general tendency towards a decrease in the content of AT III and protein S in the blood plasma, and an increase in protein C. It was also noted that the indicators of the anticoagulant system in the blood plasma in pregnant women with a genetic thrombotic predisposition changed more significantly than in women with a normal pregnancy.

Key words: ICA, anticoagulation method, chromogenic method, clotting method, AT III, protein C, protein S, blood plasma, pregnancy, genetic thrombotic predispositions.