



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Stanovení trombogenicity antifosfolipidových protilátek
modifikovaným trombin generačním testem**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Pokludová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Pokludová
Název práce	Stanovení trombogenicity antifosfolipidových protilátek modifikovaným trombin generačním testem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc
Vedoucí práce	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Antifosfolipidový syndrom je hyperkoagulační stav, který je doprovázený výskytem antifosfolipidových protilátek. Antifosfolipidové protilátky nespecificky ovlivňují procesy hemostázy. Pro diagnózu antifosfolipidového syndromu musí být splněno nejméně jedno klinické a nejméně jedno laboratorní kritérium. Klinicky se antifosfolipidový syndrom projevuje arteriálními nebo žilními trombózami a reprodukčními ztrátami. K laboratorním kritériím patří průkaz protilátek lupus antikoagulans, kardiolipinových protilátek nebo protilátek proti β2-glykoproteinu I.</p> <p>V této bakalářské práci byla teoretická část zaměřena především na popis hemostázy, antifosfolipidových protilátek a trombin generačního testu. Experimentální část bakalářské práce byla věnována validaci trombin generačního testu modifikovaného zvýšením specifiity vůči aktivovanému proteinu C jakožto potenciálnímu cíli antifosfolipidových protilátek a dále stanovení trombogenicity různých typů antifosfolipidových protilátek.</p>
Klíčová slova	Hemostáza, trombin, aktivovaný protein C, antifosfolipidové protilátky, trombin generační test
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Pokludová
Title of thesis	Determination of antiphospholipid antibodies thrombogenicity with a modified thrombin generation assay
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Hemato-Oncology, University Hospital Olomouc
Supervisor	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>Antiphospholipid syndrome is a hypercoagulant state that is accompanied by the presence of antiphospholipid antibodies. Antiphospholipid antibodies non-specifically affect hemostasis process. At least one clinical and at least one laboratory criterion must be met for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. Clinically, antiphospholipid syndrome is manifested by arterial or venous thrombosis and reproductive loss. The laboratory criteria include the detection of lupus anticoagulant antibodies, cardiolipin antibodies or antibodies against β2-glycoprotein I.</p> <p>In this bachelor thesis, the theoretical part is focused mainly on the description of hemostasis, antiphospholipid antibodies and thrombin generation test. The experimental part is devoted to the validation of the thrombin generation assay of modified increase of specificity to activated protein C as a potential target of antiphospholipid antibodies and to determination the thrombogenicity of various types of antiphospholipid antibodies.</p>
Keywords	Hemostasis, thrombin, activated protein C, antiphospholipid antibodies, thrombin generation assay
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 16. 5. 2022

.....

Ráda bych poděkovala panu doc. Mgr. Ludku Slavíkovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, odborné vedení, trpělivost a vstřícnost, kterou mi v průběhu zpracování této bakalářské práce věnoval. Poděkování patří také paní Daniele Neplechové za pomoc při provádění experimentů a kolektivu koagulační laboratoře Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr bych chtěla zmínit svou rodinu a nejbližší přátele, kterým děkuji za podporu.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	9
SEZNAM TABULEK.....	10
1 ÚVOD A CÍLE	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 HEMOSTÁZA	13
2.1.1 Primární hemostáza	14
2.1.1.1 Cévy, cévní stěna a cévní systém	14
2.1.1.2 Krevní destičky	15
2.2 HEMOKOAGULACE.....	15
2.2.1 Koagulační faktory.....	16
2.2.2 Vnější koagulační kaskáda.....	19
2.2.3 Vnitřní koagulační kaskáda	19
2.2.4 Společná koagulační kaskáda.....	20
2.2.5 Systém přirozených inhibitorů	21
2.2.5.1 Serpiny	22
2.2.5.2 Systém proteinu C	22
2.3 PATOFYZIOLOGIE HEMOSTÁZY	24
2.3.1 Nеспецифické inhibitory.....	24
2.3.1.1 Charakteristika antifosfolipidových protilátek	24
2.3.1.2 Mechanismy působení antifosfolipidových protilátek	26
2.3.1.3 Laboratorní diagnostika antifosfolipidových protilátek.....	27
2.3.1.3.1 Laboratorní diagnostika LA.....	27
2.3.1.3.2 Laboratorní diagnostika ACLA, anti-β ₂ -GP I a anti-PS/PT.....	28
2.3.1.4 Globální testy.....	28
2.3.1.4.1 Trombin generační test.....	29
2.3.1.4.2 Modifikace trombin generačního testu.....	31
2.3.1.5 Antifosfolipidový syndrom	32
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1 MATERIÁL A METODY	34
3.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky.....	34
3.1.2 Biologický materiál	34
3.1.3 Reagencie	34
3.1.4 Preanalytická fáze.....	35
3.1.4.1 Odběr vzorku	35

3.1.4.2	Zpracování vzorku	35
3.1.4.3	Uchování vzorku	35
3.1.5	Laboratorní postup	36
3.1.6	Soubor pacientů	36
3.1.7	Metody	37
3.1.7.1	Stanovení protilátek	37
3.1.7.2	Modifikovaný trombin generační test	37
3.1.7.2.1	Kalibrace	38
3.1.7.2.2	Validace modifikovaného trombin generačního testu	38
3.2	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	40
4	ZÁVĚR.....	49
	POUŽITÁ LITERATURA	50

SEZNAM ZKRATEK

ACLA	kardiolipinové protilátky
aCL/Vim	anti-kardiolipin/vimentin
anti- β_2 -GP I	protilátky proti β_2 -glykoproteinu I
anti-PT	antiprotrombin
anti-PS/PC	anti-protein S/protein C
anti-PS/PT	anti-fosfatidylserin/protrombin
APA	antifosfolipidové protilátky
APC	aktivovaný protein C
APS	antifosfolipidový syndrom
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
AT	antitrombin
AUC	celkové množství vytvořeného trombinu
C _{max}	maximální koncentrace trombinu
dRVVT	test s jedem Russelovy zmije
F	faktor
Fib	fibrinogen
HMWK	vysokomolekulární kininogen
IU	mezinárodní jednotky
LA	lupus antikoagulans
PC	protein C
PCI	inhibitor aktivovaného proteinu C
PK	prekalikrein
PL	fosfolipidy
PS	protein S
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TGT	trombin generační test
t _{lag}	čas do vzniku první generace trombinu
t _{max}	čas maximální tvorby trombinu
vWF	von Willebrandův faktor
WHO	světová zdravotnická organizace

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vznik trombinu.....	21
Obrázek 2: Kompletní aktivační cesta v koagulační kaskádě.	21
Obrázek 3: Princip působení aktivovaného proteinu C v inhibici koagulační kaskády.....	23
Obrázek 4: Spektrum potenciálních antifosfolipidových protilátek v diagnostice antifosfolipidového syndromu.....	26
Obrázek 5: Typický trombinogram s relevantními parametry.	30
Obrázek 6: Plně automatický koagulační analyzátor Ceveron alpha.	31
Obrázek 7: Trombinogram modifikovaného trombin generačního testu.....	32
Obrázek 8: Kalibrační křivka.	38
Obrázek 9: Trombinogram u pacienta s heterozygotní Leidenskou mutací.	40
Obrázek 10: Trombinogram u pacienta s homozygotní Leidenskou mutací.	41
Obrázek 11: Graf popisující čas do vzniku první generace trombinu.	45
<i>Obrázek 12: Graf popisující čas maximální tvorby trombinu.</i>	<i>45</i>
Obrázek 13: Graf maximální koncentrace trombinu.....	46
Obrázek 14: Graf celkového množství vytvořeného trombinu.....	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příprava reagensí.	36
Tabulka 2: Průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient pro vzorek normální plazmy bez přidání APC.	39
Tabulka 3: Průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient pro vzorek normální plazmy po přidání APC.	39
Tabulka 4: Hodnoty poměrů t_{lag} , t_{max} , C_{max} a AUC u vyšetřovaných pacientů. ...	41
Tabulka 5: Průměrné hodnoty poměrů t_{lag} , t_{max} , C_{max} a AUC.	44
Tabulka 6: Procentuální zastoupení pacientů pod hodnotou cut off.	47

1 ÚVOD A CÍLE

Hemostáza je děj nezbytný pro život. Jde o komplikovaný, přesně regulovaný proces, který dokáže v místě poranění zastavit krvácení, a také udržuje tekutost krve při neporušeném cévním řečišti. Za fyziologického stavu jsou všechny procesy hemostázy v rovnováze. Dojde-li však k jakémukoliv vychýlení, mohou se vyskytovat krvácivé nebo naopak trombotické komplikace. S krvácením se můžete setkat při jakémkoliv říznutí např. do prstu. S trombotickými komplikacemi se můžete setkat u vrozených geneticky podmíněných poruch nebo získaných stavech např. při imobilizaci končetiny v sádře, při dlouhých letech, cestách autobusem nebo autem, kdy dlouhé sezení na těsných sedačkách znemožňuje správnému proudění krve. Krev se může v krevním řečišti zadržovat, dochází k ucpání cévy a tvorbě trombů.

Trombin je klíčovým enzymem hemokoagulace. Systém jeho produkce je složitý. Vnější a vnitřní cestou koagulace vzniká aktivovaný F X, který aktivuje protrombin na trombin. Trombin je jediný koagulační enzym schopný štěpit fibrinogen na fibrin. Trombin aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrinové monomery a vzniká nerozpustné fibrinové koagulum. Specifickou a účinnou kontrolu srážení krve poskytuje systém proteinu C. Systém proteinu C je přirozená antikoagulační cesta. Při jakémkoliv poruše systému proteinu C dochází k nadměrné tvorbě trombinu, což může být např. v přítomnosti vrozené trombofilie nebo přítomnosti antifosfolipidových protilátek.

Jedna z aktivačních reakcí pro vznik trombinu je závislá na fosfolipidech. U některých patologických stavů mohou být přítomny antifosfolipidové protilátky. Jedním z těchto stavů je antifosfolipidový syndrom. Jedná se o systémové autoimunitní onemocnění charakteristické hyperkoagulačním stavem. Pro diagnózu antifosfolipidového syndromu je nutné splnit nejméně jedno klinické a jedno laboratorní kritérium. Ke klinickým kritériím patří komplikace gravidity a vznik trombózy. K laboratorním kritériím patří průkaz protilátek lupus antikoagulans, kardiolipinových protilátek nebo protilátek proti β 2-glykoproteinu I. K antifosfolipidovým protilátkám patří kromě kritériálních protilátek také např. protilátky proti fosfatidylserin/protrombinu, proti protrombinu, proti proteinu C/proteinu S a mnoho dalších. Antifosfolipidové protilátky vytvářejí komplexní sloučeniny s nabitými fosfolipidy. Vazbou antifosfolipidových protilátek

na fosfolipidové struktury se znemožňuje nebo omezuje tvorba koagulačně aktivních komplexů.

V teoretické části se bakalářská práce věnuje popisu hemostázy, hemokoagulace a patofyziologii hemostázy. Tato část je zaměřená na popis antifosfolipidových protilátek a na popis trombin generačního testu. Experimentální část obsahuje použité materiály, postupy a principy metod, tabulky a grafy výsledků. Tato část byla věnována validaci trombin generačního testu modifikovaného zvýšením specifity vůči aktivovanému proteinu C jakožto potenciálnímu cíli antifosfolipidových protilátek a dále stanovení trombogenicity různých typů antifosfolipidových protilátek.

Cíle mé bakalářské práce byly:

1. zpracování literární rešerše zaměřené na popis antifosfolipidových protilátek a na popis trombin generačního testu
2. stanovení antifosfolipidových protilátek
3. validace trombin generačního testu modifikovaného zvýšením specifity vůči aktivovanému proteinu C
4. stanovení trombogenicity antifosfolipidových protilátek

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HEMOSTÁZA

Hemostáza je děj nezbytný pro život. Jde o komplikovaný a přesně regulovaný proces, který dokáže v místě poranění zastavit krvácení a udržuje cirkulaci krve v neporušeném cévním řečišti. Na hemostáze se podílí cévy, krevní destičky a plazmatické faktory (koagulační faktory, faktory fibrinolýzy, přirozené inhibitory). Ve skutečnosti se v těchto systémech účastní všechny látky přítomné na vnitřní straně cévy a v krvi (červené krvinky, leukocyty, lipidy, minerály, bílkoviny atd.). (Penka a kol., 2011)

Proces zástavy krvácení lze rozdělit do čtyř fází, a to na vazokonstrikci, reakci destiček, hemokoagulaci a fibrinolýzu. K vazokonstrikci může docházet mechanicky, kdy poškozenou cévu utlačuje krev opouštějící krevní řečiště a vylévající se do okolních tkání, nebo kontrakcí svalové vrstvy cévní stěny, ke které dochází uvolněním chemických látek z poškozené tkáně. Na kontrakci svalové vrstvy cév se podílí také nervové reflexy. Ty jsou spouštěny hlavně bolestivými podněty, které přicházejí při úrazovém ději, nebo jsou vyvolané krvácením. Rozhodujícím činitelem druhé fáze hemostázy jsou krevní destičky, které mění svůj tvar a charakteristiku, dostanou-li se do blízkosti poškozeného místa cévy. Krevní destičky zvětšují svůj objem a vytvářejí na svém povrchu výchlípký cytoplazmy (pseudopodia). Kontraktilní proteiny umožní přesun destičkových granul k cytoplazmatické membráně a také jejich uvolnění do okolí. Takto se do místa poranění uvolní řada faktorů, díky kterým se spouští další fáze procesu hemostázy. (Kittnar a kol., 2020)

Hemokoagulace je velmi složitý proces, který představuje soubor postupně za sebou následujících dějů, který je nazýván hemokoagulační kaskáda. Obecně se může hemokoagulace rozdělit na tři hlavní kroky. Jedná se o formaci aktivátoru protrombinu (protrombinázový komplex), přeměnu protrombinu na trombin a přeměnu fibrinogenu na fibrin. Po hemokoagulaci následuje odstranění krevního trombu, který už splnil svou úlohu a jehož přítomnost není již žádoucí. Dochází k retrakci trombu a fibrinolýze. Při retrakci krevní destičky aktivně zmenšují plochu trombu díky svých aktinových a myozinových filament a usnadňují fibroblastům, myocytům a endocytům zahájit

regeneraci poškozené tkáně. Fibrinolýza se realizuje pomocí enzymu plazminogenu, serinové proteázy, která je schopná rozpouštět fibrinová vlákna. (Kittnar a kol., 2020)

Všechny procesy hemostázy jsou za fyziologického stavu v rovnováze. Dojde-li však k jakémukoliv vychýlení, objeví se krvácivé nebo trombotické komplikace. (Racek a kol., 2021)

2.1.1 Primární hemostáza

Primární hemostáza je děj, který vede k tvorbě primární cévní zátky neboli agregátu krevních destiček. Jde o zacelení porušené integrity cévy. K zástavě krvácení dochází díky destičkovému agregátu. Primární hemostázy se účastní trombocyty a cévní stěna. (Penka a kol., 2011; Šlechtová, 2007)

Když dojde k poranění cévní stěny a obnažení subendoteriálních struktur (kolagenu), přichytí se krevní destičky (trombocyty) ke kolagenním vláknům pomocí receptorů glykoproteinové povahy. Adheze se účastní adhezivní proteiny. Adheze dochází ke změně tvaru trombocytu. Adhezí a aktivací receptorů glykoproteinové povahy se spouští kaskáda biochemických pochodů, kdy dochází také k aktivaci trombocytů. Při změně tvaru krevních destiček dochází k přesunu fosfolipidů z vnitřní membránové dvojvrstvy do vnějších membránových struktur, což je spojeno se změnou náboje povrchových vrstev a jde o tzv. flip-flop fenomén. Dále se obnažují další glykoproteinové receptory a dochází k tzv. agregaci, což je vzájemné spojení trombocytů, a vzniká primární destičková zátka. (Penka a kol., 2011; Šlechtová, 2007)

2.1.1.1 Cévy, cévní stěna a cévní systém

Cévy tvoří systém pro distribuci okysličené krve a její návrat po předání kyslíku tkáním. Mohou se dělit na tepny (artérie), tepénky (arterioly), vlásečnice (kapiláry), které vedou okysličenou krev do cílových orgánů a žilky (venuly), žíly (vény), které vrací neokysličenou krev do plic. (Pecka, 2004)

Cévy, až na kapiláry, mají třívrstvou strukturu, která je tvořena intimou, médií a adventicií. Intima se skládá z jedné vrstvy endoteliálních buněk uložených na bazální membráně. Média je tvořena hladkým svalstvem, které je

obklopeno pojivovou tkání. V adventicii se nachází fibroblasty, adipocyty a také žírné buňky. Za subendotel se považuje cévní stěna mimo vrstvu endotelových buněk. Mezi nejvýznamnější hemostatické složky subendotelu patří kolageny a tkáňový faktor. Subendotel se při poranění dostává do kontaktu s krví, je velmi trombogenní a aktivuje všechny systémy hemostázy. (Pecka, 2004; Penka a kol., 2011)

Uzavřený krevní oběh u lidí objevil v roce 1628 William Harvey. Krev, která je pumpována z levé srdeční komory, se přes arterie a arterioly dostává ke kapilárám, kdy se do tkání předá kyslík. Z kapilár krev protéká žilkami a většími cévami, které se stékají do horní a dolní duté žíly a do pravé síně a následně komory, ze které je krev odváděná plicní žilou do plic. V plicních kapilárách je krev okysličována a pomocí plicních žil je transportována do levé síně a následně komory, čímž se cyklus uzavírá. Cévní systém má kromě cirkulační funkce obrovský význam pro hemostázu. (Penka a kol., 2011)

2.1.1.2 Krevní destičky

Krevní destičky (trombocyty) jsou bezjaderná tělíška, která vznikají v kostní dřeni odštěpením cytoplazmy megakaryocytů. Megakaryocyty naléhají na kapiláry a skrz jejich membránu se do krevního oběhu dostávají krevní destičky. Trombocyty nemají jádro, a proto se nemůžou dělit. Žijí 7-10 dní a jsou degradovány a odstraňovány ve slezině. (Penka a kol., 2011)

Trombocyty zprostředkovávají mnoho interakcí mezi krví a cévní stěnou, uplatňují se v procesu primární hemostázy a také poskytují fosfolipidový povrch k navázání koagulačních faktorů, které jsou závislé na vitamínu K přes vápenaté můstky. (Pecka, 2004)

2.2 HEMOKOAGULACE

Cílem koagulace je zástava krvácení a vytvoření pevných fibrinových vláken. Hemokoagulace představuje postupnou a přesně regulovanou kaskádovou enzymatickou reakci, při které jsou faktory z neaktivní formy štěpeny na formu aktivní. Neaktivní koagulační faktory jsou značeny velkým písmenem F a římskou

číslicí, jejich aktivní forma je značena navíc malým písmenem a. (Penka a kol., 2011)

Podle způsobu aktivace se koagulační kaskáda dělí na vnitřní a vnější systém. Oba systémy se spojují při aktivaci F X na F Xa a společně generují trombin. Trombin hraje v koagulačním systému důležitou roli. Sledování koagulačního systému prostřednictvím tvorby trombinu je důležité u patologií jako je krvácení a trombóza. Krystalové struktury trombinu odhalily, že je vysoce homologní s jinými serinovými proteinázami, jako je chymotrypsin. Primární funkcí trombinu je katalyzovat přeměnu fibrinogenu na fibrin. Velikost tvorby trombinu je určena koncentracemi všech známých i neznámých koagulačních faktorů a inhibitorů spolu s některými plazmatickými proteiny. (Al Dieri a kol., 2012; Crawley a kol., 2007; Penka a kol., 2011)

2.2.1 Koagulační faktory

Koagulační faktory jsou proteiny, které cirkulují v krevní plazmě. Většina z nich je produkována v játrech. Některé koagulační faktory potřebují k jejich syntéze vitamín K. Kromě Fib a F II se většina faktorů v plazmě nachází v nízkých koncentracích. Převážná část faktorů, až na tkáňový faktor, je v plazmě přítomna v podobě proenzymu, kdy se pro správnou funkci vyžaduje proteolytické štěpení, během kterého z proenzymu vznikne koagulačně aktivní enzym. Výjimkou je F VIIa, který koluje v cirkulaci v aktivní formě, avšak většina F VII se nachází ve formě neaktivní. S výjimkou F XIII a kofaktorů V a VIII, jsou koagulační faktory serinové proteázy, mají v aktivním místě enzymu tzv. katalytickou triádu (serin, histidin, aspartamová kyselina). (Pecka, 2004; Penka a kol., 2011)

Základní koagulační faktory a jejich charakteristiky podle (Kittnar a kol., 2020; Pecka, 2004; Penka a kol., 2011; Racek a kol., 2021) jsou:

- Fibrinogen (Fib) je nejlépe charakterizovaný glykoprotein. Je přítomný v plazmě i v granulích krevních destiček. Syntetizován je v játrech. Molekula fibrinogenu tvoří dimer a je složen ze 3 rozdílných párů polypeptidových řetězců alfa, beta, gama, které jsou vázány mezi sebou α sulfidickými můstky. Na udržení struktury se podílejí vápenaté ionty. Fib je substrátem pro trombin, ale také pro plazmin. Je hlavní krevní

bílkovinou, která podporuje agregaci trombocytů prostřednictvím interakce s destičkovými receptory na sousedících destičkách.

- Protrombin (faktor II) je složený z 532 aminokyselin a vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K. Protrombin se pomocí vápenatých iontů váže na negativně nabitě PL, kde je štěpen na aktivní formu a trombin enzymem protrombinázou. Kromě štěpení fibrinogenu slouží trombin ke katalýze reakcí, které vedou k posílení tvorby a regulace koagula. Reakce zahrnují aktivaci buněk, které poskytují povrch pro koagulační reakce, posílení probíhající koagulace a zpevňování koagula, a také zabraňují nadměrnému srážení.
- Tkáňový faktor (faktor III, TF, tkáňový tromboplastin) je integrální transmembránový glykoprotein složený z 236 aminokyselin a řadí se mezi cytokininové receptory. Pro jeho prokoagulační aktivitu je nutná vazba bílkovinné složky tkáňového faktoru s PL. TF je buněčný receptor pro F VII. Tvorba komplexu, za přítomnosti vápenatých iontů, s F VII nebo F VIIa zahájí koagulaci.
- Kalcium (faktor IV, vápenaté ionty) je nezbytné pro velké množství reakcí ve všech systémech hemostázy. Jeho nejnižší koncentrace, která je nutná pro hemokoagulaci, je 0,5 mmol/l.
- Faktor V (proakcelerin, labilní faktor) je jednořetězcový glykoprotein. Snadno se váže na povrch buněčné membrány. Vzniká v játrech a megakaryocytech. Nachází se v plazmě a α granulách krevních destiček. V komplexu protrombinázy společně s vápenatými ionty a PL F Va významně zvyšuje rychlost proteolytického štěpení protrombinu F Xa. Aktivita F Va je regulována aktivovaným proteinem C. Důležitost tohoto regulačního systému je demonstrována vznikem APC rezistence, která je doprovázená mutací genu pro F V, označovanou jako Leidenská mutace.
- Faktor VI se v dnešní době nepoužívá. Tvrdilo se, že F VI u člověka vůbec neexistuje, a že se nalézá pouze u hovězího dobytka. V minulosti se označoval jako destičkový faktor 3 a byl ztotožněn s fosfolipidy, převážně membránovými fosfolipidy vnitřní dvojvrstvy membrány trombocytu (fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin).

- Faktor VII (prokonvertin, stabilní faktor) je jednořetězcový glykoprotein obsahující 406 aminokyselin. Syntetizuje se v játrech a lokálně jsou jeho důležitým zdrojem i aktivované monocyty/makrofágy. F VII díky své proteolytické aktivitě může štěpit F X.
- Faktor VIII (antihemofilický faktor A) je plazmatický glykoprotein o 2332 aminokyselinách. Je navázán na vWF a z této vazby se může uvolnit kontaktem trombinem nebo PL. Právě působením trombinu dochází ke štěpení F VIII. Působení většího množství trombinu naopak F VIII inaktivuje stejně jako APC za přítomnosti PL, vápenatých iontů, F V a proteinu S. Vrozený nedostatek F VIII je nazýván hemofilie A.
- Faktor IX (antihemofilický faktor B, Christmas faktor) je jednořetězcový glykoprotein vznikající za účasti vitamínu K v játrech. F IXa tvoří koagulačně aktivní komplex tzv. vnitřní tenázu, která aktivuje F X na F Xa. Nedostatek F IX způsobuje hemofilii B, což je závažné vrozené krvácivé onemocnění.
- Faktor X (Stuartův-Prowerův faktor) je dvouřetězcový glykoprotein vznikající za účasti vitamínu K v játrech. F Xa je součástí enzymatického koagulačně aktivního komplexu protrombokinázy. Protrombokináza katalyzuje přeměnu protrombinu na trombin.
- Faktor XI (antihemofilický faktor A, plasma tromboplastin antecedent) je glykoprotein aktivovaný při tzv. kontaktní fázi plazmatického koagulačního procesu. V krvi koluje v neaktivní formě v podobě zymogenu serinové proteázy. Aktivovaný může být proteolýzou zprostředkovanou F XIIa za přítomnosti HMWK a negativně nabitých povrchů, trombinem, trypsinem, nebo F VIIa.
- Faktor XII (Hagemanův faktor) je také glykoprotein vznikající v játrech, který patří mezi serinové proteázy. K aktivaci tohoto faktoru dojde při kontaktu se subendoteliálními strukturami při poškození povrchu cévní stěny. Kromě koagulace zasahuje Hagemanův faktor také do imunologických systémů.
- Faktor XIII (fibrin-stabilizující faktor, transglutamináza) se nachází v plazmě, nebo v buňkách. F XIII, nacházející se v plazmě, vzniká v játrech a cirkuluje jako tetramer. F XIII, přítomný v buňkách, je v nich

syntetizován jako dimer. V koagulační kaskádě F XIIIa stabilizuje fibrinovou sraženinu.

- Prekalikrein (Fletcherův faktor) je proteinkináza vznikající v játrech a ve slinivce břišní. V plazmě je ve formě zymogenu, který je navázán na HMWK. Kalikrein aktivuje F XII a zvyšuje uvolňování kininů z kininogenů.
- Vysokomolekulární kininogen (Fitzgeraldův faktor, HMWK) je plazmatický protein vznikající v játrech a endotelu pupečnickových žil. Z kininogenů vznikají za účasti kininogenáz peptidy kininy. Vysokomolekulární kininogen se váže na povrch aktivovaných krevních destiček, buňky endotelu, neutrofilů.

2.2.2 Vnější koagulační kaskáda

Vnější koagulační kaskáda neboli vnější cesta koagulace je zahájena poškozením tkáně. Porušením integrity cévní stěny dochází k uvolnění tkáňového faktoru a různých látek jako jsou lipoproteiny a fosfolipidy. Na F VII se naváže komplex lipoproteinů tkáňového faktoru a následuje aktivace F X za přítomnosti vápenatých iontů. Komplex obsahující F VIIa, TF, PI a vápenaté ionty je nazýván jako vnější tenáza. F Xa s F Va, destičkovými fosfolipidy a vápenatými ionty tvoří komplex protrombinázy, který přeměňuje malé množství protrombinu na trombin. Takto vzniklý trombin zpětně aktivuje koagulační faktory XI, XI, VIII, V a trombocyty, ale není schopen rozštěpit dostatečné množství fibrinu. Tato fáze koagulace je iniciační. (Kittnar a kol., 2020; Šlechtová, 2007)

Se vznikem komplexu vnější tenázy a protrombinázy je aktivován TFPI. Po navázání TPFI na TF je cesta aktivace zablokována, protože působení komplexu vnější tenázy je vázáno pouze na povrch buněk, které exprimují tkáňový faktor. Koagulace poté probíhá pouze vnitřní cestou koagulace ve fázi amplifikace a propagace. (Šlechtová, 2007)

2.2.3 Vnitřní koagulační kaskáda

Vnitřní koagulační kaskáda neboli vnitřní cesta koagulace je spouštěna zpětnými mechanismy. Malým množstvím trombinu, který vznikl cestou vnější tenázy

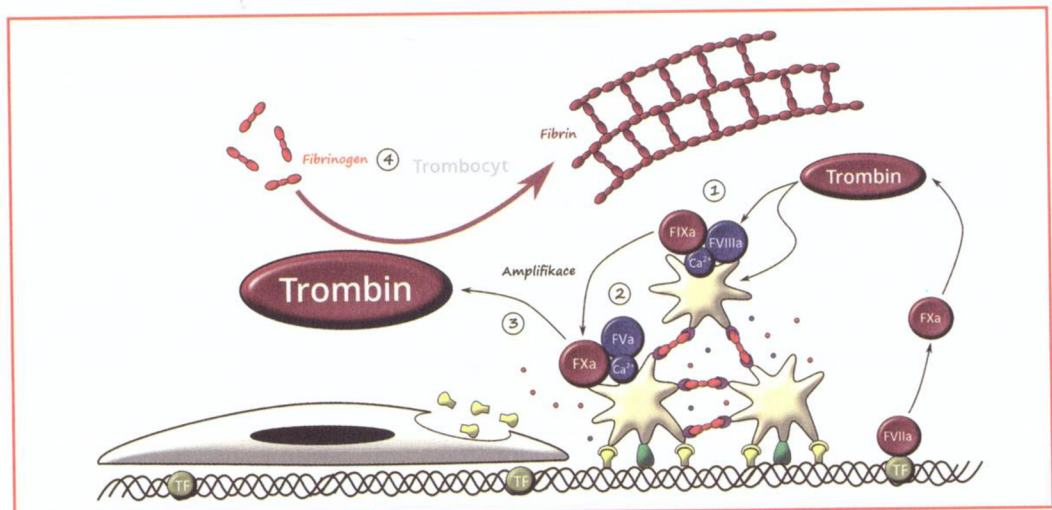
a protrombinázy, se aktivují koagulační faktory XI, IX, VIII, V. Touto cestou je celý proces koagulace urychlen a amplifikován. F IXa, F VIIIa, PI a vápenaté ionty tvoří tzv. vnitřní tenázu, která již generuje dostatečné množství F Xa. F Xa, FVa, PI a vápenaté ionty v komplexu protrombinázy přeměňují dostatečné množství protrombinu na trombin. (Šlechtová, 2007)

Dřívější představa o tom, že je vnitřní cesta koagulace spouštěna ve fázi kontaktu aktivací F XII s následnou aktivací F XI, který tvoří komplex s HMWK, byla v současné době opuštěna. Touto cestou se spouští proces koagulace především na arteficiálních površích in vitro. (Šlechtová, 2007)

2.2.4 Společná koagulační kaskáda

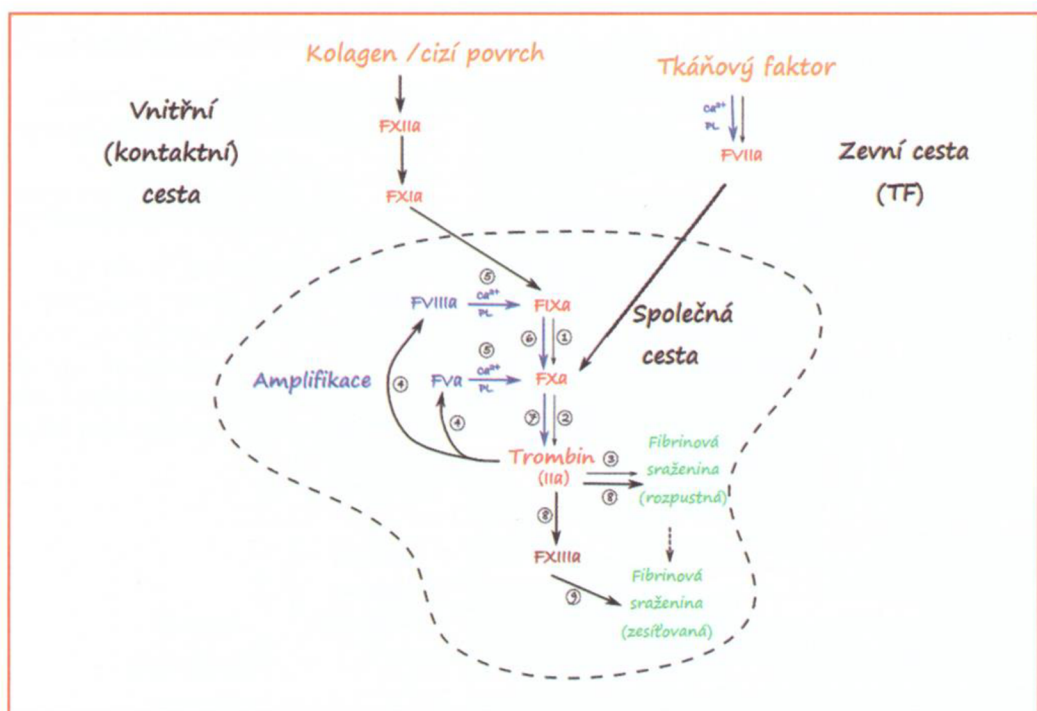
Vnější i vnitřní cesta hemokoagulace působí v organismu společně. Pro iniciaci koagulace je nezbytný systém vnější tenázy. Systém vnitřní tenázy je pak nezbytný pro amplifikaci procesu. F Xa vytvořený vnější nebo vnitřní koagulační cestou aktivuje protrombin na trombin. Trombin je jediný koagulační enzym schopný štěpit fibrinogen na fibrin. Trombin aktivuje přeměnu glykoproteinu fibrinogenu na fibrinové monomery, které jsou stabilizovány trombinem aktivovaným F XIIIa a vzniká nerozpustné fibrinové koagulum. (Penka a kol., 2011; Šlechtová, 2007)

Celý hemokoagulační proces probíhá na povrchu krevních buněk, kdy iniciace probíhá na povrchu monocytů, amplifikace a propagace pak na povrchu trombocytů. Průběh koagulačních reakcí není přísně kaskádovitý, jelikož dochází k celé řadě zpětných vazeb. (Šlechtová, 2007)



Obrázek 1: Vznik trombinu.

Převzato od: (Škorňová a kol., 2020)



Obrázek 2: Kompletní aktivační cesta v koagulační kaskádě.

Převzato od: (Škorňová a kol., 2020)

2.2.5 Systém přirozených inhibitorů

Fyziologicky je v krvi v klidovém stavu přítomno malé množství aktivních koagulačních faktorů včetně trombinu. K udržení rovnovážného stavu je nutná regulace. V procesech krevního srážení hrají přirozené inhibitory (regulační

proteiny) důležitou roli. Slouží jako jeden ze zpětnovazebných mechanismů k zabránění nekontrolovatelného srážení krve a udržují koagulační rovnováhu. Do systému přirozených inhibitorů se řadí např. serpiny, systém proteinu C, kuniny, metaloproteinázy, nespecifické inhibitory. (Penka a kol., 2011)

2.2.5.1 Serpiny

Inhibitory serinových proteáz serpiny jsou většinou nespecifické inhibitory. Jsou důležitým regulačním faktorem nejen v procesu hemostázy. Komplex serpin-serinová proteáza je po uvolnění do cirkulace vychytáván serpinovými receptory v játrech. Mezi serpiny patří antitrombin, heparin kofaktor II, C1 inhibitor, inhibitor aktivovaného PC, proteinázový inhibitor závislý na proteinu Z, protein Z. (Penka a kol., 2011)

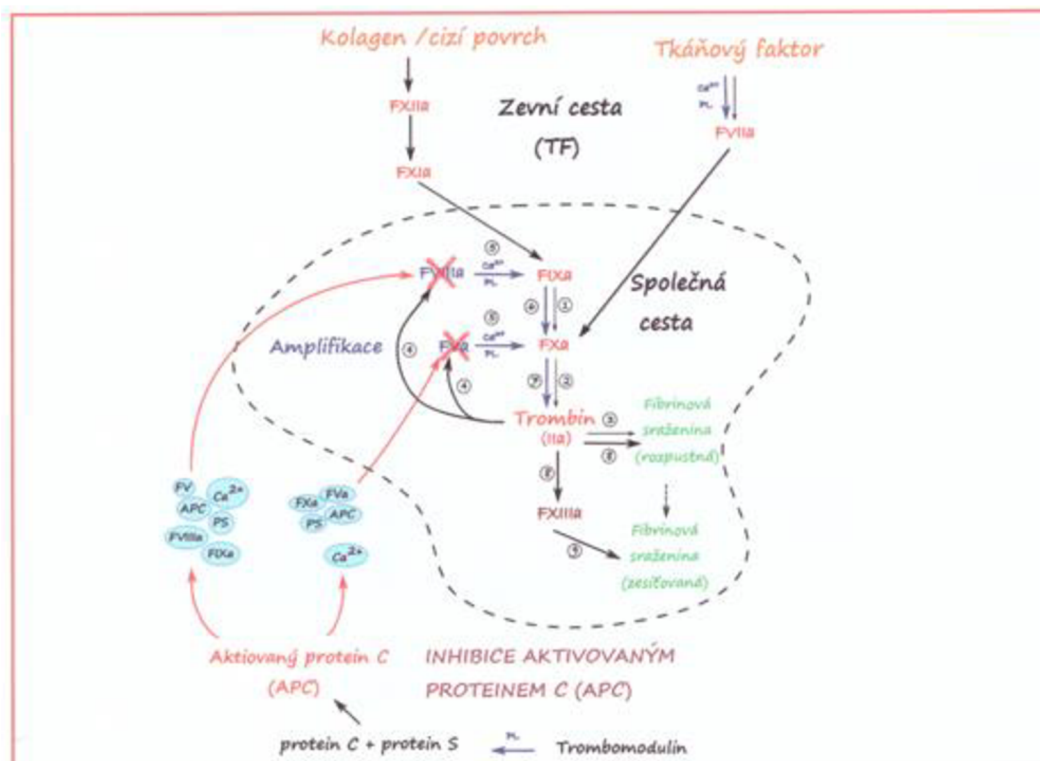
2.2.5.2 Systém proteinu C

Systém proteinu C je přirozená antikoagulační cesta, jejíž cílem je štěpení F Va a F VIIIa, čímž je regulována tvorba sraženiny. Systém proteinu C poskytuje specifickou a účinnou kontrolu srážení krve. Dráha proteinu C je zahájena aktivací proteinu C trombinem navázaným na trombomodulin na povrchu endoteliálních buněk. Vzhledem k antikoagulačním a protizánětlivým schopnostem systém proteinu C moduluje obranu organismu na cizí stimulus. (Dahlback, 2004; Penka a kol., 2011).

Podle (Dahlback, 2004; Penka a kol., 2011; Racek a kol., 2021) tvoří systém proteinu C:

- Protein C je prekurzor aktivovaného proteinu C, který patří mezi vitamín K-dependentní proteiny. Je tvořen v hepatocytech a nejspíš i v endotelu. Komplex trombin-trombomodulin je nejdůležitějším aktivátorem proteinu C. PC je aktivován také komplexem F X-trombomodulin. Nejdůležitější funkcí je inaktivace kofaktorů koagulace F Va a F VIIIa. Mezi inhibitory PC patří např. PCI nebo α_2 -antitrypsin. Těžký deficit proteinu C je s trombofilií a může vést až ke smrtelným novorozeneckým trombofilním příhodám. Na funkci PC má také vliv mutace genu pro F V Leiden. Mutovaný F V blokuje štěpení APC, které je pro funkci tohoto inhibitoru klíčové.

- Protein S je vitamín K-dependentní protein, který je uložen v endotelu a alfa granulách krevních destiček. Asi 40 % PS cirkuluje v plazmě ve volné formě, zbylých 60 % je v komplexu s C4b vázajícím proteinem. Protein S slouží jako kofaktor APC při inaktivaci F Va a F VIIIa. Blokuje přeměnu protrombinu na trombin. Protein S interaguje s regulátorem komplementu C4b vázajícího proteinu.
- C4b vázající protein je regulační multimerní protein cesty komplementu složený z alfa řetězců a část také s beta řetězcem. Pouze forma s beta řetězcem váže reverzibilně PS. Jedním z účinků PS je zprostředkování vazby C4b vázajícího proteinu na povrch buněk.
- Trombomodulin je integrální transmembránový glykoprotein stále přítomný na cévním endotelu. Působí jako kofaktor trombinu při aktivaci proteinu C a TAFI.
- EPCR neboli endoteliální receptor pro protein C je transmembránový glykoprotein, který zvyšuje aktivaci PC na endotelu a snižuje antikoagulační působení APC.



Obrázek 3: Princip působení aktivovaného proteinu C v inhibici koagulační kaskády.

Převzato od: (Škorňová a kol., 2020)

2.3 PATOFYZIOLOGIE HEMOSTÁZY

Hemostáza představuje jeden z mechanismů, které udržují integritu vnitřního prostředí. Zajišťuje fluiditu krve v intaktním cévním řečišti a při porušení kontinuity cévní stěna dochází krevním srážením k zástavě krvácení. Hemostatická rovnováha je výsledkem normální funkce cévní stěny, trombocytů a plazmatických činitelů, které zahrnují koagulační a fibrinolytický systém a také jejich aktivátory a inhibitory. Narušení rovnováhy se může projevovat krvácivými nebo trombofilními stavy. (Pecka, 2004)

2.3.1 Nespecifické inhibitory

Nespecifické inhibitory jsou schopny inhibovat jakoukoliv proteázu. K této skupině se řadí např. alfa₂-mikroglobulin, alfa₁-antitrypsin, C1-inhibitor a také antifosfolipidové protilátky. (Pecka, 2004; Penka a kol., 2011)

- Alfa₂-mikroglobulin je tvořen řadou buněk včetně makrofágů a hepatocytů. Nachází se v plazmě i extravaskulárně. Je schopný inhibovat proteinázy všech tříd. Inhibuje F Xa a je schopen vytvářet komplexy s proteolytickými enzymy plazmy, leukocytů, bakterií. Účinek alfa₂-mikroglobulinu je důležitý v situacích, kdy dochází k vyčerpání kapacity jiných inhibitorů.
- Alfa₁-antitrypsin je glykoprotein syntetizovaný v játrech, který inhibuje především F Xa a je také silným inhibitorem aktivovaného PC. Hlavním významem je inhibice bílých krvinek a slinivky břišní.
- C1-inhibitor je glykoprotein syntetizovaný v játrech a uvolňovaný v průběhu aktivace destiček. Inhibuje F XIIa, F XIa a kalikrein. Jeho účinek je zesílen v přítomnosti heparinu.
- Antifosfolipidové protilátky

2.3.1.1 Charakteristika antifosfolipidových protilátek

Antifosfolipidové protilátky (APA) jsou heterogenní skupinou autoprotiátek (imunoglobulinů – především IgG a IgM). APA jsou charakterizovány náchylností k reprodukčním ztrátám, nebo k trombózám v žilním, tepenném či mikrocirkulárním řečišti. APA slouží k diagnostice antifosfolipidového syndromu. (Pecka, 2004; Penka a kol., 2011)

Z pohledu diagnózy APS se vyčleňují tři skupiny APA. Tyto protilátky jsou označovány jako APS kriteriální. První dvě skupiny jsou diagnostikovány pomocí ELISA metod. Jedná se o protilátky proti kardiolipinům (ACLA) a protilátky proti β_2 -glykoproteinu (anti- β_2 -GP I). Třetí skupinou APA jsou tzv. lupus antikoagulans (LA), které jsou zjišťovány na základě jejich schopnosti na fosfolipidech závislé reakce krevního srážení. (Penka a kol., 2009)

LA jsou heterogenní skupinou imunoglobulinů, které se specificky zaměřují na epitopy negativně nabitých proteinů vázajících fosfolipidy buněčné membrány, protrombin, β_2 -glykoprotein I, které in vitro prodlužují koagulační testy závislé na fosfolipidech. Pozitivita LA je mnohem rizikovějším faktorem pro rozvoj tromboembolie, recidivujících reprodukčních ztrát, mozkové ischemie ve srovnání s ACLA, anti- β_2 -GP I i jinými nekriteriálními protilátkami. (Bradacova a kol., 2021)

Anti- β_2 -GP I je aniontový glykoprotein s pěti doménami vázajícími se na fosfolipidy. Čtyři domény mají pravidelné, konzervované sekvence, pátá doména je aberantní. Přítomnost anti- β_2 -GP I IgM nebo IgG protilátky je spojena s tromboemblickými komplikacemi. (Bradacova a kol., 2021)

ACLA zahrnují skupinu protilátek proti kardiolipinové části antigenu VDRL (venereal disease research laboratory), což jsou protilátky, které reagují s fosfolipidy komplexu protrombinového aktivátoru a protilátky, které mohou reagovat s kardiolipinem ve fixní fázi. Zpočátku byly ACLA rozpoznány jako látky interferující při testu na syfilis pomocí extraktu z hovězího srdce, následně bylo zjištěno, že jsou namířeny proti kardiolipinu ve směsi. (Bradacova a kol., 2021; Škorňová a kol., 2020)

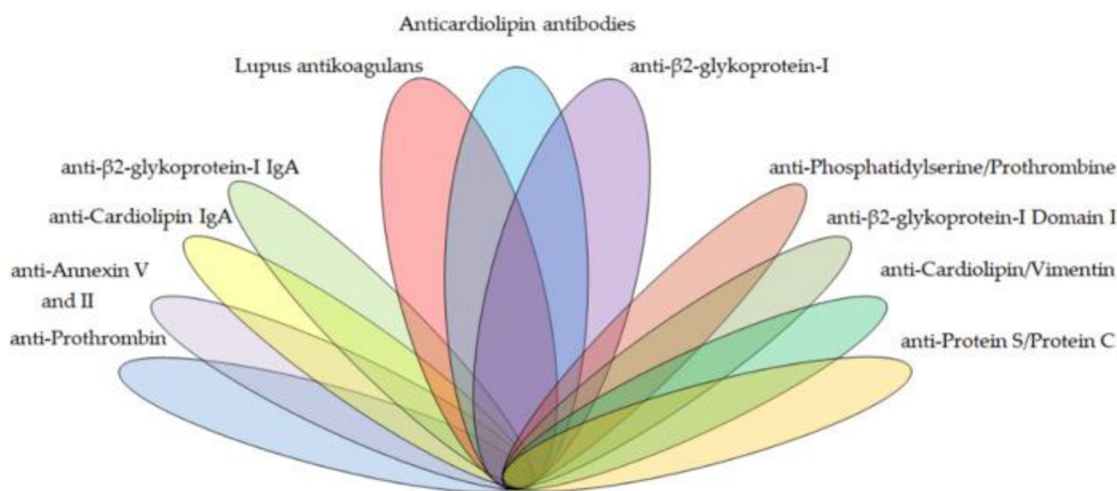
Kromě APS kriteriálních protilátek existuje široká škála APS nekriteriálních protilátek, které zahrnují např. anti-protrombin (anti-PT), anti- β_2 -GP I doména I, anti-annexin II, anti-annexin V, anti-fosfatidylserin/protrombin (antiPS/PT), anti-kardiolipin/vimentin (aCL/Vim), anti-proteinS/protein C (anti-PS/PC) apod. Nekriteriální protilátky by mohly pomoci diagnostikovat pacienty s klinickými projevy APS, kteří mají negativní kriteriální protilátky a mohou proto představovat tzv. séronegativní APS. (Bradacova a kol., 2021; Funke a kol., 2020)

Protilátky anti-fosfatidylserin/protrombin jsou nyní uznávány jako vysoce účinný potenciální marker pro APS, silně jsou spojeny s protilátkami LA. Pozitivita anti PS/PT IgG, IgM s pozitivitou LA velmi významně souvisí s arteriálními

i venózními trombozami a s těhotenskými potížemi. Anti-PT a anti-PS/PT nejspíš patří k různým populacím autoprotilátek, i když mohou být obě přítomny u stejného pacienta. Anti-PS/PT lze detekovat pomocí ELISA metody. Detekují se přímým potažením protrombinu na ozářené destičky ELISA nebo použitím komplexu fosfatidylserin/protrombin jako antigenu. (Bradacova a kol., 2021; Devreese, 2020; Funke a kol., 2020; Liu a kol., 2020; Sciascia a kol., 2014).

Přítomnost aCL/Vim je silně spojena s recidivující trombózou a těhotenskou morbiditou. Vimentin je součástí endoteliálních buněk a může být přítomen i na povrchu apoptotických neutrofilů, T-lymfocytů, aktivovaných makrofágů a krevních destiček. Vimentin a kardiolipin působí na povrchu apoptotických buněk jako imunogeny a mohou indukovat tvorbu protilátek. (Bradacova a kol., 2021)

Anti-PS/PC jsou obvykle častou příčinou těhotenských komplikací a preeklampsie. Vazba anti-PS/PC na komplexy fosfolipidů s inhibitory koagulace proteinem S a proteinem C zapříčiní zablokování jejich činnosti a následně rozvoj trombózy. (Bradacova a kol., 2021)



Obrázek 4: Spektrum potenciálních antifosfolipidových protilátek v diagnostice antifosfolipidového syndromu.

Převzato od: (Bradacova a kol., 2021)

2.3.1.2 Mechanismy působení antifosfolipidových protilátek

Antifosfolipidové protilátky vytvářejí komplexní sloučeniny s nabitými fosfolipidy (kardiolipin, fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin) nebo s jejich komplexy

s makromolekulární látkou (kofaktorem). Proteinové kofaktory pro vazbu APA na negativně nabitě fosfolipidy jsou např. alfa₂-glykoprotein I, protein C, protein S, HMVK, F X, annexin V, protrombin. Vazbou APA na fosfolipidové struktury se znemožňuje nebo omezuje tvorba koagulačně aktivních komplexů. Působení APA v organismu je velmi heterogenní a podle cílového antigenu mohou zřejmě působit na různých úrovních. Změny, které v organismu při působení APA mají pak za následek např. aktivaci či jinou funkční změnu buňky. (Pecka, 2004; Penka a kol., 2009)

β₂-glykoprotein I inhibuje aktivaci PC, inaktivaci F Va a F VIIIa cestou APC/PS, aktivaci fibrinolýzy komplexem F XII/PK, aktivaci AT mediované heparansulfátem. Mezi další mechanismy působení patří potenciace aktivace trombocytů, tvorby F Xa na trombocytech, snížení volného PS cestou inhibice interakce β₂-glykoproteinu I a C4-vázacího proteinu. Anti-protrombin/anti-trombin se váže na trombinem aktivované destičky, inhibuje uvolnění prostacyklinu pod vlivem trombinu, inhibuje aktivaci PC. Anti-protein C inhibuje aktivaci proteinu C, inaktivaci F Va a F VIIIa cestou APC/PS. Anti-protein S inhibuje aktivaci F Va a F VIIIa cestou APC/PS. Anti-fosfolipáza A₂ inhibuje produkci prostacyklinu z endotelových buněk. Anti-heparansulfát cévní stěny inhibuje aktivaci AT mediované heparansulfátem. Anti-trombomodulin inhibuje aktivaci PC. Anti-annexin V ovlivňuje funkci placentárního antikoagulačního proteinu I (annexinu V) tvorbou komplexů, bloádou nebo odstraněním annexinu V z jeho přirozených míst v placentě. (Pecka, 2004; Penka a kol., 2011)

2.3.1.3 Laboratorní diagnostika antifosfolipidových protilátek

2.3.1.3.1 Laboratorní diagnostika LA

Koagulační vyšetření protilátek lupus antikoagulans vyžaduje rychlé zpracování plazmy na plazmu bezdestičkovou speciálními centrifugačními metodami a filtry. Jinak by mohly fosfolipidové membrány krevních destiček poskytovat falešně negativní výsledky fosfolipid dependentních testů na LA. Před testováním LA jsou zásadní screeningové rutinní koagulační testy, včetně protrombinového času, aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT) a trombinového času pro vyloučení jiných forem konzumpční koagulopatie nebo vlivu antikoagulační

terapie. Diagnostika LA se opírá o provedení minimálně jednoho testu závislého na fosfolipidech, což je lupus senzitivní aPTT nebo test s jedem Russelovy zmi je (dRVVT). (Penka a kol., 2009; Škorňová a kol., 2020)

Dle (Penka a kol., 2009) identifikace lupus antikoagulans probíhá nejprve skrínigovými testy, kde se používají právě fosfolipid-závislé testy citlivé na LA. K těmto testům patří především aPTT, test s jedem Russelovy zmi je, kaolinový čas. V případě positivity ve skrínigových testech je nutné prokázat přítomnost inhibitoru pomocí tzv. korekčních testů, kde se sleduje korekce prodloužených časů normální plazmou. Pokud ve směsných testech (směs pacientovy a normální plazmy) nedojde ke korekci času, přistupuje se k průkazu charakteru inhibitoru, kde se používají tzv. konfirmační testy.

2.3.1.3.2 Laboratorní diagnostika ACLA, anti- β_2 -GP I a anti-PS/PT

Laboratorní diagnostika ACLA, anti- β_2 -GP I a anti-PS/PT se provádí metodami ELISA nebo chemiluminiscenčními metodami. Metoda ELISA (enzym linked immunosorbent assay) je stanovení antigenu pomocí protilátky značené enzymem. Po reakci antigenu se značenou protilátkou se stanovuje enzymatická aktivita vzniklého komplexu pomocí specifického chromogenního substrátu za vzniku zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci vyšetřovaného antigenu. Výsledky koncentrace antigenu jsou vydávány kvantitativně na základě odečtení z kalibrační křivky. (Penka a kol., 2011; Škorňová a kol. 2020)

Metoda ELISA však bývá čím dál více nahrazena novějšími automatizovanými systémy s různými variacemi pevné fáze (např. mikročástice) a různými detekčními systémy (např. chemiluminiscence, průtoková cytometrie, multiplexní systémy). Automatizace může zlepšit reprodukovatelnost a snížit mezilaboratorní variace v rámci jedné metody. Automatizované systémy se snadněji provádějí, používají přísné protokoly a harmonizované pracovní podmínky ve srovnání s tradičně prováděnou manuální ELISA metodou. (Devreese, 2014; Devreese 2020)

2.3.1.4 Globální testy

Globální testy popisují celý srážecí proces neboli zachycují účast celého systému, nebo více systému na hemostáze. Mezi tyto testy patří např. doba

krvácení, test konzumpce protrombinu, tromboelastografie (TEG), trombin generační test (TGT). (Pecka, 2004; Penka a kol., 2009)

Doba krvácení je málo citlivý globální test primární hemostázy. Principem je určení času, při kterém dojde k zástavě krvácení při standardním vpichu. Prodloužená doba krvácení ukazuje na poruchy cévní stěny, snížený počet trombocytů nebo funkční poruchu (trombocytopenii, trombocytopatii, von Willebrandovu chorobu). (Pecka, 2004; Penka a kol., 2009)

Test konzumpce protrombinu stanovuje množství zbylého protrombinu v séru po vysrážení krve za standardních podmínek. Při normálním průběhu srážení se většina protrombinu přemění na trombin a v séru tak zůstane malé množství protrombinu. Při poruchách koagulace pak zůstává velká část nespotřebovaného protrombinu v séru. (Faber a kol., 2015)

Tromboelastografie je metoda, která využívá přístroje tromboelastografu, ve kterém dochází ke srážení krve nebo plazmy vyvolané přidáním vápenatých iontů. Pomocí mechanického detekčního systému je umožněno sledování kinetiky tvorby koagula, jeho růstu a pevnosti. Výsledkem je křivka ukazující startovací čas, kinetiku formace trombu a maximální amplitudu. Ze křivky lze rozeznat např. hypokoagulaci, trombocytopenii, hyperkoagulaci. (Faber a kol., 2015; Pecka, 2004)

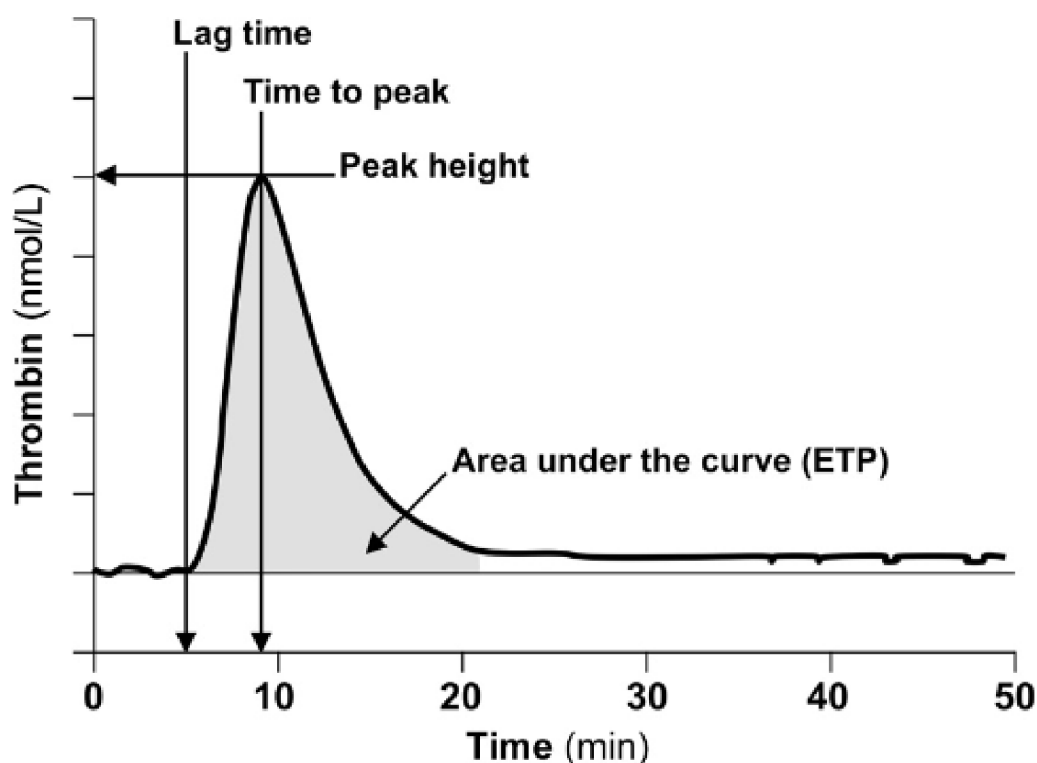
2.3.1.4.1 Trombin generační test

Trombin generační test je funkční test, který je používán pro analýzu a monitorování hemostatického systému. Principem je in vitro monitorování vzniku trombinu v plazmě po aktivaci koagulační kaskády TF. Reakce probíhá za účasti negativně nabitých fosfolipidů a vápenatých iontů. Měření probíhá ve speciálním přístroji – fluorometru. Pro vyšetření se používá citrátová plazma, chudá či bohatá na trombocyty. Generovaný trombin vznikající v průběhu srážení přeměňuje fluorogenní substrát na fluorofor a signál, který vzniká touto přeměnou, je zaznamenáván kontinuálně fluorometrem. Fluorometr je vybaven počítačovým softwarem pro záznam a výpočet parametrů, vycházejících z trombinogramu. (Hemker a kol., 2000; Hluší a kol., 2010a; Penka a kol., 2011; Tripodi, 2016)

Výsledkem je tzv. trombinogram, který charakterizuje množství vznikajícího trombinu v plazmě pacienta v čase. Křivka je charakterizována fází iniciační, propagační a terminální. Zpožděná generace upozorňuje na riziko krvácení, nedostatečně kontrolovaná generace trombinu naopak na zvýšené riziko trombózy. (Penka a kol., 2009)

Z trombinogramu lze dle (Penka a kol., 2011; Tripodi, 2016) zjistit:

- Lag time (min) – čas od iniciace k první detekované generaci trombinu (t_{lag})
- Peak Height (nM) – největší vytvořená generace trombinu (C_{max})
- ETP neboli AUC (area under the curve) (nM /min) – endogenní trombinový potenciál je celkové množství vytvořeného trombinu neboli plocha pod křivkou (AUC)
- Time to Peak (min) – čas do vytvoření největší koncentrace trombinu (t_{max})



Obrázek 5: Typický trombinogram s relevantními parametry.

Převzato od: (Tripodi, 2016)

TGT měří krvácivou i trombofilní tendenci. Může být používán k získání kompletního obrazu hemostatického systému, k monitorování trombofilních

onemocnění i krvácivých stavů a také k monitorování léčby antikoagulační (hepariny, kumariny) i substituční u hemofiliků či von Willebrandovy choroby. (Hemker a kol., 2006; Penka a kol., 2009)

Komerčně dostupné jsou 2 druhy TGT, které vykazují dostatečnou reprodukovatelnost a jejich provedení je poměrně snadné. Obě varianty jsou založené na principu štěpení fluorogenního substrátu vznikajícím trombinem. První metodou je kalibrovaný automatizovaný trombin generační test (Thrombinoscope B. V., Maastricht, Nizozemsko), vyvíjený v kolektivu prof. Hemkera. Druhou možností je Technotrombin® TGA assay (Technoclone, Vídeň, Rakousko). (Hluší a kol., 2010a; Hluší a kol., 2010b)



Obrázek 6: Plně automatický koagulační analyzátor Ceveron alpha.

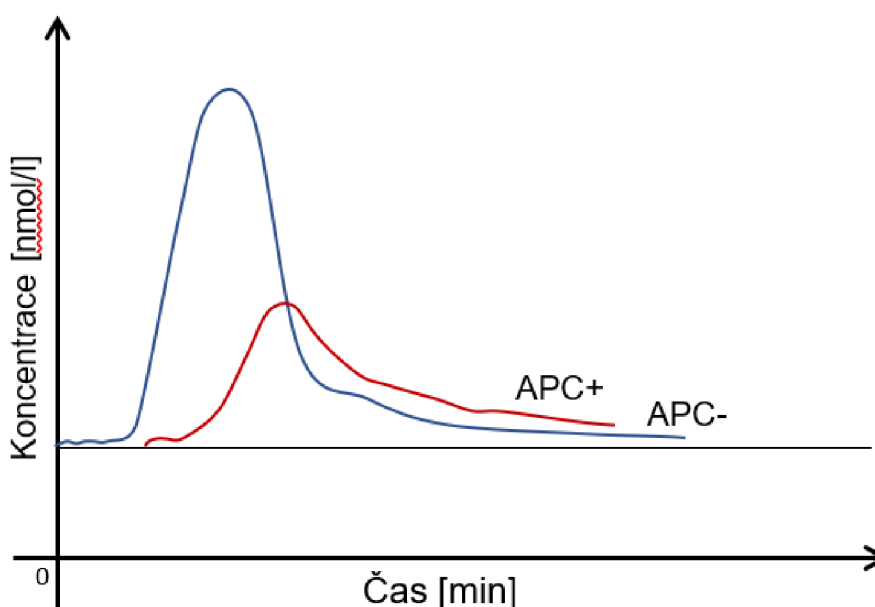
Převzato z: <https://www.nordicdiagnostica.com/en/category/instruments-2>

2.3.1.4.2 Modifikace trombin generačního testu

Trombin generační test může být různě modifikován. Test lze modifikovat např. rozdílnými koncentracemi TF jako koagulačního iniciátoru testu např. dle (Lewis a kol., 2007), rozdílnými koncentracemi fosfolipidů např. dle (Hemker a kol., 2003), přidáním inhibitoru kontaktní fáze při měření u stavů s nízkou generací trombinu (hemofilie) např. dle (van Veen a kol., 2006), přidáním trombomodulinu nebo aktivovaného proteinu C např. dle (Regnault a kol., 2003). Aktivovaný

protein C zvyšuje senzitivitu testu při deficitu proteinů C, S nebo APC rezistenci. (Hluší a kol., 2010a)

Jednou z možných modifikací TGT pro zvýšením specifity je přidání aktivovaného proteinu C, což má za následek rozlišení pacientů s poruchou v systému proteinu C a proteinu S od normálních kontrol. Ukazuje se, že tato modifikace může být vhodnou i pro stanovení vlivu antifosfolipidových protilátek na tento systém. Přidáním APC se trombinogram změní. t_{lag} a t_{max} se v přítomnosti antifosfolipidových protilátek oproti geneticky podmíněné trombofilii (F V Leiden heterozygot a F V Leiden homozygot) prodlouží, c_{max} a AUC se sníží. (Billoir a kol., 2021)



Obrázek 7: Trombinogram modifikovaného trombin generačního testu.

2.3.1.5 Antifosfolipidový syndrom

APS je systémové autoimunitní onemocnění, které se projevuje zejména výskytem arteriálních, žilních či mikrovaskulárních trombóz a také reprodukčními ztrátami. Jde o hyperkoagulační stav, který je spojený s přítomností APA. (Bradacova a kol., 2021; Indrák, 2014; Vydra a kol., 2019)

Pro diagnózu APS je nutné splnit nejméně jedno klinické a jedno laboratorní kritérium. Ke klinickým kritériím patří právě poruchy těhotenství a vznik trombózy. U trombózy se jedná o jednu či více klinických manifestací

arteriální nebo venózní trombózy, případně trombózy malé cévy v kterékoli tkáni či orgánu a je prokázána objektivními validovanými kritérii a v případě histopatologického průkazu je bez známek zánětu v cévní stěně. Při poruše těhotenství jde o jedno či více nevysvětlitelných úmrtí morfologicky normálního plodu v nebo po 10. týdnu těhotenství s potvrzením normální morfologie plodu ultrasonograficky či přímým vyšetřením, o jednu či více předčasných narození morfologicky normálního novorozence před 34. týdnem těhotenství z důvodu eklampsie či těžké preeklampsie podle standardní definice nebo při prokázaných známkách placentární insuficience, nebo tři a více nevysvětlitelných následných spontánních potratů před 10. týdnem těhotenství po vyloučení anatomických či hormonálních abnormit matky a po vyloučení chromozomálních abnormit rodičů. Původní klinická a laboratorní kritéria, která definovala pacienty s APS, byla stanovena v roce 1998 a nazývají se jako tzv. sapporská kritéria. V roce 2006 byla publikována revize těchto kritérií tzv. kritéria ze Sydney. K laboratorním kritériím patří průkaz LA, ACLA nebo anti- β_2 -GP I. LA je prokázán v plazmě dvakrát anebo vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů a je detekován podle doporučení Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu. ACLA je prokázán v séru či plazmě, IgG či IgM izotopu, ve středním a vysokém titru (tj. 40 IU, nebo > 99. percentil), je prokázán dvakrát a nebo vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů, je měřen standardizovaným typem ELISA metody. Anti- β_2 -GP I je prokázán v séru či plazmě, IgG či IgM izotopu (titr > 99. percentil), je prokázán dvakrát a nebo vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů, je měřen standardizovaným typem ELISA podle doporučeného postupu. (Devreese a kol., 2009; Houghton a kol., 2017; Indrák, 2014)

APS se rozděluje na primární a sekundární. Primární APS je stav kdy pacient nemá žádné jiné autoimunitní onemocnění. Sekundární APS se vyskytuje v souvislosti s jiným autoimunitním onemocněním – lupus erythematoses. (Bradacova a kol., 2021; Vydra a kol., 2019)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL A METODY

3.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Analyzátor Ceveron® Alpha (Technoclone, Rakousko)
- Ledničky (4-8 °C)
- Mrazicí boxy (-20 °C, -80 °C)
- Biologický termostat BT 120 (LAB systém)
- Stolní centrifuga 5424 (Eppendorf, Německo)
- ACL TOP 750 CTS 2020 (Werfen, Itálie)
- BioFlash (Werfen, Itálie)
- Multiscan RC (Biotech a. s., USA)
- Automatické pipety (100, 200, 1000 µl) s příslušenstvím (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní plast
- Plastové stojánky

3.1.2 Biologický materiál

- Nesrážlivá krev s přidavkem citrátu sodného v poměru 9:1 (0,109 mol/l tj. 3,2%)

3.1.3 Reagencie

- Ceveron® TGA RC Low Kit (Technoclone, Rakousko)
 - Ceveron® TGA RC Low – spouštěcí činidlo s nízkou koncentrací fosfolipidových micel obsahujících rekombinantní lidský tkáňový faktor v Tris-Hepes-NaCl pufru, lyofilizované
 - Ceveron® TGA SUB – fluorogenní substrát 1mM Z-G-G-R-AMC, lyofilizovaný
 - Roztok chloridu vápenatého 25 mM

- APC Resistance Kit (Technoclone, Rakousko)
 - R1 APC (+APC) – aktivovaný protein C, Polybren, Hepes, BSA, lyofilizováno
 - R2 (-APC) – Polybren, Hepes, BSA, lyofilizováno
- Destilovaná voda

3.1.4 Preanalytická fáze

3.1.4.1 Odběr vzorku

Při odběru vzorku je nutné pracovat co nejšetrněji, aby se zabránilo uvolnění aktivačních látek. Materiál se odebírá do odběrové zkumavky VACUETTE®, ve kterých se nachází nesráživé činidlo čili citrát sodný (3,2%). Vzhledem k tomu, že výsledky koagulačních testů jsou závislé na poměru vápenatých iontů a vápenatého chelatačního roztoku, musí se optimalizovat množství citrátu v odběrové zkumavce u pacientů s nízkým hematokritem (< 0,25). Optimalizace se provádí podle následujícího vzorce.

$$ml\ citrátu\ sodného = \frac{100 - Hct}{595 - Hct} \cdot ml\ odebrané\ krve$$

Odebraný vzorek musí být označen štítkem s identifikací pacienta (což zahrnuje příjmení, jméno, rodné číslo) a identifikací oddělení.

3.1.4.2 Zpracování vzorku

Jednotlivé vzorky jsou centrifugovány z důvodu odstranění krevních buněk od plazmy. Optimální centrifugace probíhá při 2500 G po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Pro dosažení co nejmenšího množství trombocytů v plazmě (< 10G/l) se centrifugace jedenkrát opakuje. Zamezí se tak výskytu falešně negativních výsledků.

3.1.4.3 Uchování vzorku

Vzorek se má zpracovat do 2 hodin od odběru. Oddělenou plazmu lze rozpipetovat po alikvotech a zamrazit při -20 °C. Opětné rozmražování

a zamrazování není doporučeno. Před vyšetřením se musí vzorek rozpustit v termostatu (vodní lázni) při 37 °C po dobu 10 minut.

3.1.5 Laboratorní postup

Nejprve proběhla analýza základní koagulace v podobě aPTT, následovalo stanovení LA v podobě dRVVT testu, eventuálně confirmace. U vzorků byly detekovány dále ACLA, anti- β_2 -GP I a anti-PS/PT. Vzorky plazmy, u kterých byly již stanoveny protilátky, byly po vyjmutí z mrazícího boxu vloženy do termostatu, kde byly rozmrazeny. Lyofilizované reagensie byly temperovány při laboratorní teplotě a následně rozpuštěny v požadovaném množství destilované vody (viz. Tabulka 1). Byla provedena analýza TGT na analyzátoru Ceveron® Alpha (Technoclone, Rakousko).

Tabulka 1: Příprava reagensí.

Reagensie	Destilovaná voda [ml]
Ceveron® TGA RC Low	1
Ceveron® TGA SUB	3
R1 APC (+APC)	2
R2 (-APC)	2

3.1.6 Soubor pacientů

Studie byla provedena na 127 pacientech s prokázanými různými typy antifosfolipidových protilátek a na 10 pacientech s prokázanými geneticky podmíněnými trombofiliemi (buď s heterozygotní nebo homozygotní Leidenskou mutací), kteří sloužili k porovnání. U heterozygotní Leidenské mutace je riziko trombofilních komplikací 5–10krát vyšší, u homozygotní Leidenské mutace dokonce vyšší 80–100krát. Soubor pacientů obsahoval 63 žen a 74 mužů. Průměrný věk skupiny nemocných byl 51 let a medián byl 47 let. Věkové rozmezí námi sledovaných pacientů se pohybovalo od 19 let do 75 let.

3.1.7 Metody

3.1.7.1 Stanovení protilátek

Protilátky lupus antikoagulants byly detekovány testy závislémi na fosfolipidech aPTT (Werfen, Itálie) a dRVVT (Werfen, Itálie). ACLA a anti- β_2 -GP I byly detekovány pomocí CLIA souprav (Werfen, Itálie). CLIA metoda byla provedena pomocí analyzátoru BioFlash (Werfen, Itálie) metodikou, která využívá dvoukrokovou imunoanalýzu založenou na principu chemiluminiscence. Anti-PS/PT byly detekovány ELISA metodou (Werfen, Itálie). Protilátky byly koagulační laboratoři již dříve stanoveny.

3.1.7.2 Modifikovaný trombin generační test

Trombin generační test byl proveden pomocí plně automatického analyzátoru Ceveron Alpha (Technoclone, Rakousko) za použití kitu Ceveron® TGA RC Low Kit (Technoclone, Rakousko) a kitu APC Resistance Kit (Technoclone, Rakousko).

Standardní stanovení TGT se provádí následovně. K 40 μ l vzorku bezdestičkové plazmy se přidává 20 μ l TRIS pufru a 15 μ l rekombinantního TF (71,6 pM). Dále se přidává 40 μ l fluorogenního substrátu. Samotná reakce je zahájena přidáním 35 μ l CaCl₂.

Modifikovaný TGT je prováděn přidáním rekčního pufru R1 APC (+APC) Reagent nebo R2 (-APC) Reagent ke vzorku plazmy. Tvorba generace trombinu v měřeném vzorku byla zahájena přidáním spouštěcího činidla, obsahujícího TF s nízkou koncentrací fosfolipidových micel (Ceveron TGA RC Low). Následně byl přidán 1 mM fluorogenní substrát (Ceveron TGA SUB). Vlastní reakce byla zahájena 25 mM roztokem chloridu vápenatého.

Generovaný trombin štěpí fluorogenní substrát, který je detekován. Fluorescence je vyvolána zářením s excitační vlnovou délkou 360 nm, které následně vyvolá emisní vlnovou délku 465 nm.

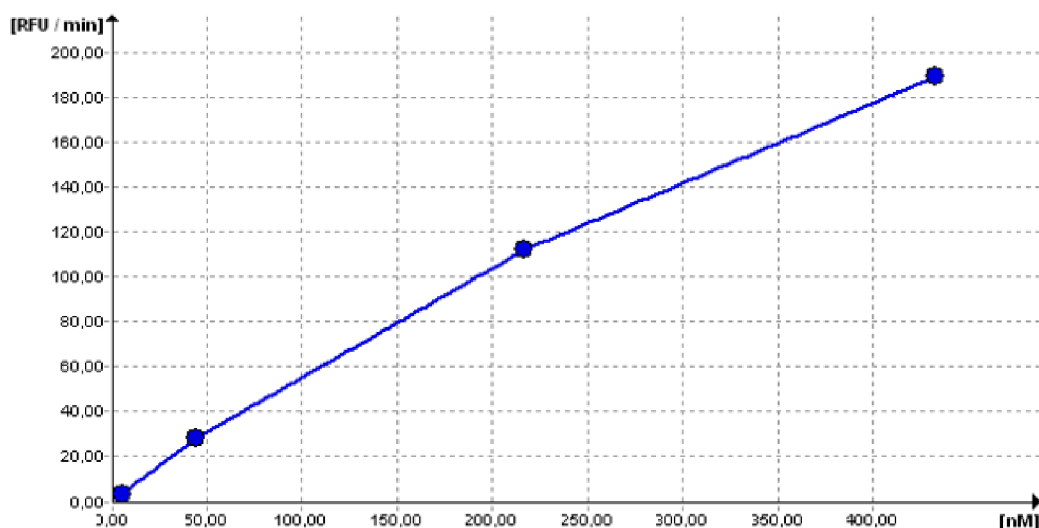
Vyhodnocení výsledků bylo automaticky prováděno pomocí software Ceveron PC-SW verze 2. 0. 2. 0. Výsledky byly následně zpracovány a upraveny v programu Microsoft Excel 2019 verze 2. 2. 0. 3.

3.1.7.2.1 Kalibrace

Kalibrace je prováděna na 3 hladinách trombinového standardu vztaženého na WHO standard, kdy je jednorázově stanovena jeho aktivita vůči fluorogennímu substrátu.

Kalibrace stanovení byla prováděna na standard trombinu 800 nM. Z tohoto standardu byly připraveny kalibrační body s koncentrací 200, 400 a 800 nM. Do reakce bylo pipetováno 90 μ l příslušně naředěného standardu trombinu s přidáním pouze fluorogenního substrátu a CaCl_2 . Námi použitou kalibrační křivku přibližuje obrázek 8.

Kalibrací trombinového standardu se hodnoty signálu fluorescence (RFU/min) převedou na hodnoty koncentrace trombinu v plazmě (nM).



Obrázek 8: Kalibrační křivka.

3.1.7.2.2 Validace modifikovaného trombin generačního testu

Validace TGT byla provedena na normální plazmě, kdy bylo provedeno 10 jednotlivých stanovení. Pro jednotlivá stanovení byla vždy připravena nová diagnostika pomocí naředění příslušných lyofilizovaných reagensů. Průměry, směrodatné odchylky a variační koeficienty naměřených hodnot t_{lag} , t_{max} , C_{max} a AUC pro vzorek normální plazmy bez přidání a po přidání APC jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

Tabulka 2: Průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient pro vzorek normální plazmy bez přidání APC.

	t_{lag} [min]	t_{max} [min]	c_{max} [nM]	AUC [nM/min]
Průměr	1,25	4,30	390,35	3065,85
Směrodatná odchylka	0,07	0,14	14,77	86,60
Variační koeficient [%]	5,60	3,26	3,78	2,82

Tabulka 3: Průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient pro vzorek normální plazmy po přidání APC.

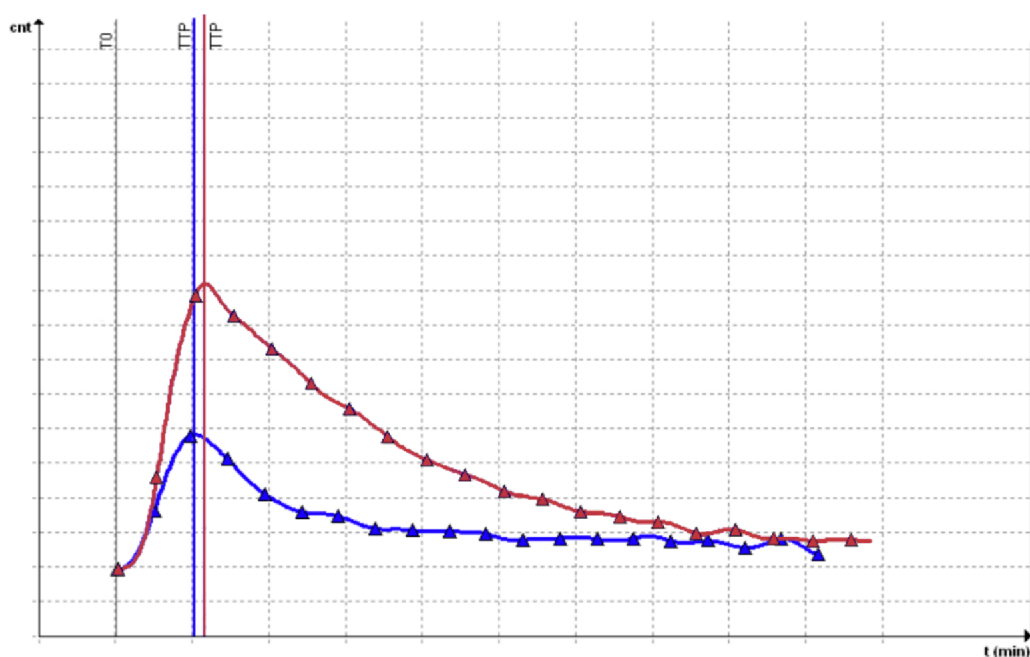
	t_{lag} [min]	t_{max} [min]	c_{max} [nM]	AUC [nM/min]
Průměr	1,25	4,70	171,60	1367,00
Směrodatná odchylka	0,07	0,70	23,61	133,07
Variační koeficient [%]	5,60	14,89	13,76	9,73

3.2 VÝSLEDKY A DISKUSE

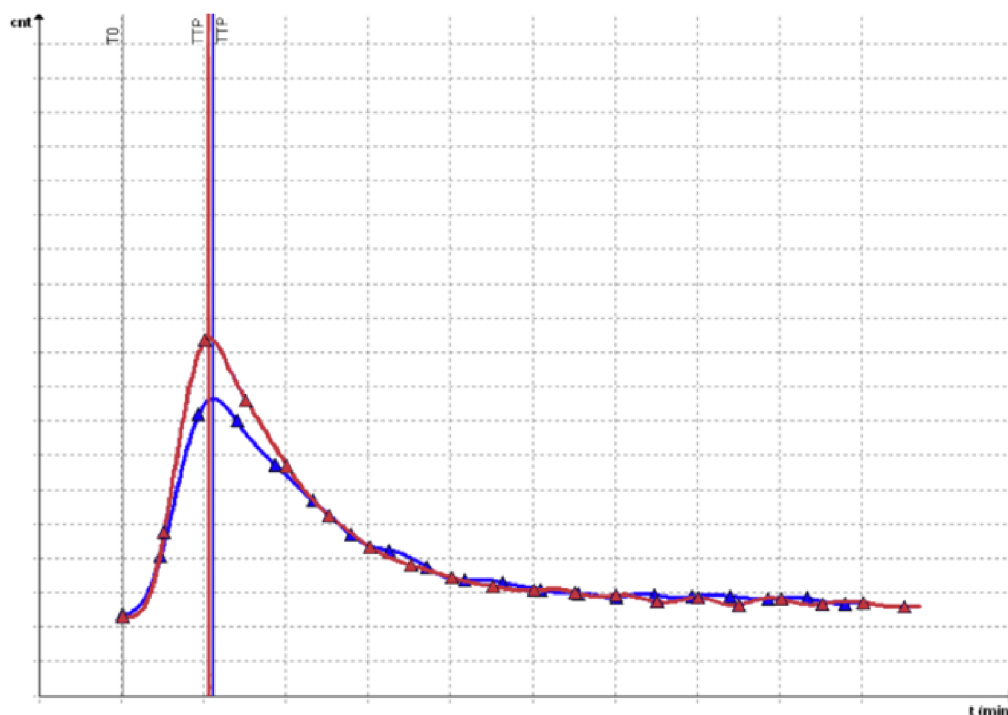
Trombin generační test modifikovaný přidáním přirozeného inhibitoru APC vykazuje vyšší senzitivitu k jednotlivým poruchám koagulace, což bylo prokázáno na souboru 127 pacientů s antifosfolipidovými protilátkami jednotlivých typů. Výsledky byly porovnávány s pacienty, u kterých byla prokázána geneticky podmíněná trombofilie (buď heterozygotní nebo homozygotní Leidenská mutace). U modifikovaného TGT byly hodnoceny parametry t_{lag} , t_{max} , C_{max} a AUC po provedení bez přidání a po přidání APC. Jednotlivé parametry byly hodnoceny v poměru stejně jako při vyšetření APC rezistence u geneticky podmíněné trombofilie způsobené mutací F V Leiden.

Hodnoty poměrů t_{lag} , t_{max} , C_{max} a AUC souboru 137 pacientů jsou shrnuty v tabulce 6. V tabulce 7 jsou shrnuty průměrné hodnoty poměrů t_{lag} , t_{max} , C_{max} a AUC jednotlivých typů protilátek a geneticky podmíněných trombofilí.

Mezi laboratorní kritéria se řadí pozitivita alespoň jedné protilátky typu ACLA, LA nebo anti- β_2 -GP I. Aby bylo splněno laboratorní kritérium, musí být protilátky opakovaně pozitivní v odstupu 12 týdnů. Hodnotí se, zda se jedná o single, double nebo triple pozitivitu. Nejvyšší riziko trombózy a rekurentních abortů mají pacienti s triple pozitivitou.



Obrázek 9: Trombinogram u pacienta s heterozygotní Leidenskou mutací.



Obrázek 10: Trombinogram u pacienta s homozygotní Leidenskou mutací.

Na obrázku 9 a 10 je viditelný rozdíl mezi snížením tvorby trombinu po přidání APC u heterozygotní a homozygotní Leidenské mutace. Červená křivka představuje reakci tvorby trombinu bez přidání APC, modrá křivka představuje reakci tvorby trombinu po přidání APC.

Tabulka 4: Hodnoty poměrů t_{lag} , t_{max} , C_{max} a AUC u vyšetřovaných pacientů.

Pacient	Poměr t_{lag} [min]	Poměr t_{max} [min]	Poměr C_{max} [nM]	Poměr AUC [nM/min]	Jednotlivé laboratorní markery
1	2,50	1,49	45,32	48,69	LA
2	1,36	1,28	5,74	4,56	LA
3	1,50	1,24	5,97	4,26	LA
4	1,59	1,32	5,47	4,87	LA
5	1,50	1,45	7,34	4,90	LA
6	1,55	1,37	6,29	4,58	ACLA
7	1,64	1,35	11,54	10,26	LA
8	2,08	1,44	15,11	13,46	LA
9	1,49	1,32	6,08	5,68	LA
10	1,22	1,32	2,73	1,99	LA
11	1,50	1,41	3,61	2,21	ACLA
12	1,80	1,60	24,58	11,22	ACLA
13	1,82	1,42	6,18	4,56	anti- β_2 -GP I
14	2,00	1,41	10,75	9,26	LA

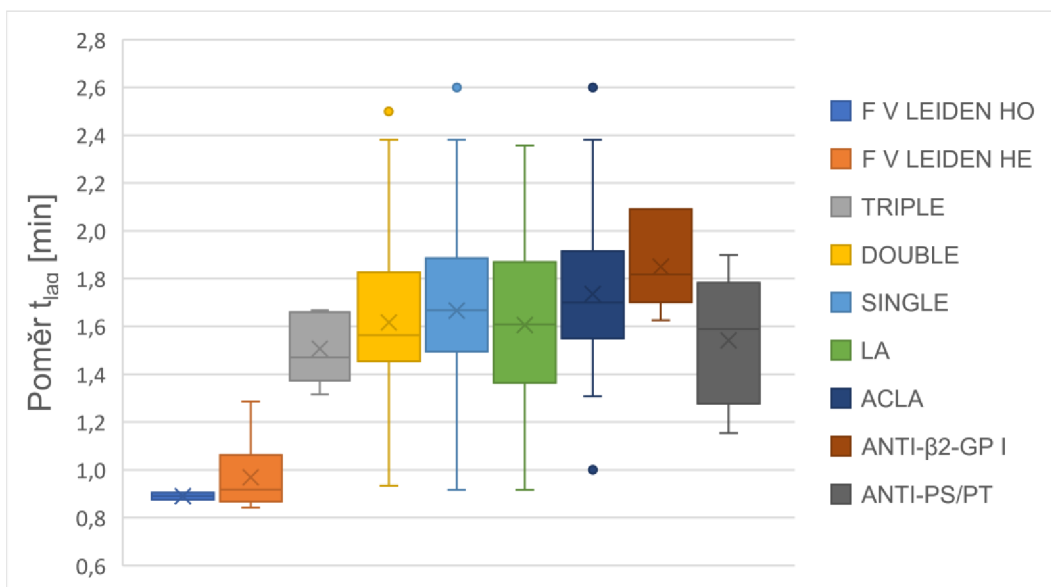
15	1,42	1,34	5,02	3,28	LA
16	1,67	1,58	7,37	4,49	LA
17	2,11	1,53	7,33	4,82	ACLA
18	1,85	1,12	3,99	3,59	ACLA
19	0,58	1,49	34,51	48,54	LA
20	2,00	1,29	23,63	18,21	ACLA
21	1,92	1,33	8,07	7,18	LA
22	1,67	1,34	4,37	2,81	LA
23	1,31	1,47	8,52	4,27	ACLA
24	1,70	1,37	4,02	2,96	LA
25	2,27	1,45	25,44	20,29	LA
26	1,45	1,32	3,44	2,85	LA
27	1,82	1,32	10,69	7,96	LA
28	2,17	1,41	23,50	20,20	LA
29	2,07	1,70	21,07	21,28	LA
30	1,64	1,33	5,96	4,44	ACLA
31	2,00	1,38	3,61	2,02	ACLA
32	1,53	1,34	8,70	7,79	LA
33	1,78	1,34	10,45	9,05	ACLA
34	1,73	1,28	7,45	5,61	LA
35	1,44	1,42	11,15	10,58	ACLA
36	2,16	1,54	24,04	34,33	ACLA
37	1,94	1,59	11,63	10,18	ACLA
38	1,62	1,46	6,37	4,18	LA
39	1,91	1,44	26,87	19,28	anti- β_2 -GP I
40	1,89	1,54	4,96	3,12	LA
41	1,89	1,41	6,95	5,64	LA
42	1,69	1,36	8,71	6,77	ACLA
43	1,60	1,36	11,98	9,50	LA
44	1,89	1,44	6,44	4,48	LA
45	1,59	1,52	11,00	8,44	ACLA
46	1,00	1,45	4,09	2,44	LA
47	1,67	1,46	9,24	6,46	LA
48	2,13	1,39	9,09	7,49	ACLA
49	1,71	1,26	7,67	6,08	anti- β_2 -GP I
50	2,60	1,45	10,37	11,90	ACLA
51	1,36	1,42	4,51	3,00	ACLA
52	2,36	1,70	19,46	19,95	LA
53	1,85	1,58	13,32	8,74	ACLA
54	1,60	1,38	5,80	3,17	ACLA
55	2,09	1,32	11,31	8,81	anti- β_2 -GP I
56	2,09	1,53	9,75	6,50	anti- β_2 -GP I
57	1,70	1,43	5,39	3,53	anti- β_2 -GP I
58	1,56	1,39	2,47	1,67	LA
59	1,27	1,05	3,18	2,41	LA
60	1,56	1,49	5,94	3,59	ACLA
61	2,38	1,43	12,86	12,44	ACLA

62	1,59	2,00	29,56	45,83	LA
63	1,50	1,36	17,80	14,04	ACLA
64	1,14	1,32	2,50	1,71	LA
65	1,22	1,22	4,01	3,07	LA
66	2,08	1,52	24,04	16,83	LA
67	1,75	1,53	20,71	11,36	LA
68	2,17	1,47	18,02	40,23	LA
69	2,57	1,61	21,36	32,26	LA
70	1,62	1,27	8,15	6,95	ACLA
71	1,79	1,37	13,82	8,66	LA
72	1,06	1,16	4,42	3,72	LA
73	1,07	1,10	2,54	1,98	LA
74	0,92	1,15	3,05	2,36	LA
75	1,67	1,29	4,05	3,58	LA
76	1,00	1,39	4,33	2,79	ACLA
77	1,63	1,42	3,59	2,05	anti-β ₂ -GP I
78	1,75	1,50	9,38	5,96	ACLA
79	1,29	1,36	8,52	7,02	LA
80	1,50	1,33	4,65	2,94	LA
81	1,59	1,28	3,54	2,45	ACLA
82	1,71	1,43	15,49	13,94	ACLA
83	1,75	1,45	18,17	14,91	ACLA
84	0,75	1,81	58,46	60,34	LA
85	1,36	0,90	4,65	5,05	LA
86	2,48	1,56	77,51	101,15	LA
87	1,28	1,21	9,81	7,39	LA
88	1,90	1,39	22,91	19,95	anti-PS/PT
89	1,59	1,25	10,73	10,25	anti-PS/PT
90	1,15	1,24	3,85	2,76	anti-PS/PT
91	5,00	2,18	60,26	34,58	anti-PS/PT
92	1,40	1,04	1,86	2,67	anti-PS/PT
93	1,67	1,48	13,09	9,34	anti-PS/PT
94	1,47	1,52	7,40	4,46	double
95	1,54	1,39	3,81	2,32	double
96	2,38	1,69	26,94	20,72	double
97	2,13	1,52	10,29	10,14	double
98	1,75	1,52	17,30	16,42	double
99	2,00	1,72	9,72	5,62	double
100	2,33	1,41	23,18	27,70	double
101	1,54	1,45	7,08	3,60	double
102	1,75	1,52	14,14	10,73	double
103	1,72	1,43	11,70	8,31	double
104	1,32	1,41	4,80	2,61	double
105	1,54	1,39	6,52	4,34	double
106	1,49	1,52	9,61	7,04	double
107	0,93	1,14	3,23	2,36	double
108	0,95	1,16	3,72	3,48	double

109	1,96	1,39	22,14	24,33	double
110	1,00	1,22	2,16	1,71	double
111	1,59	1,75	15,40	10,96	double
112	2,50	1,47	26,04	23,64	double
113	1,85	1,47	12,11	10,12	double
114	1,54	1,49	6,30	4,35	double
115	1,67	1,35	12,43	9,92	double
116	2,00	1,33	10,78	11,34	double
117	1,47	1,45	9,83	7,42	double
118	1,69	1,30	6,59	5,33	double
119	1,72	1,54	16,53	12,91	double
120	0,94	1,15	3,86	2,91	double
121	1,45	1,43	12,78	14,83	double
122	1,35	1,56	13,22	10,64	double
123	1,32	1,32	4,65	3,29	triple
124	1,43	1,35	4,76	3,44	triple
125	1,47	1,30	8,78	10,14	triple
126	1,65	1,48	8,36	7,43	triple
127	1,67	1,32	12,28	11,64	triple
128	0,90	1,06	2,97	2,61	F V Leiden ho
129	0,88	0,98	1,55	1,31	F V Leiden ho
130	1,29	1,24	10,56	7,64	F V Leiden he
131	1,10	1,14	6,70	6,44	F V Leiden he
132	0,84	0,88	4,62	5,92	F V Leiden he
133	0,87	1,03	2,47	1,87	F V Leiden he
134	0,89	1,06	2,82	1,96	F V Leiden he
135	0,87	0,97	1,58	1,36	F V Leiden he
136	0,94	1,07	2,93	2,10	F V Leiden he
137	0,95	1,04	3,12	2,40	F V Leiden he

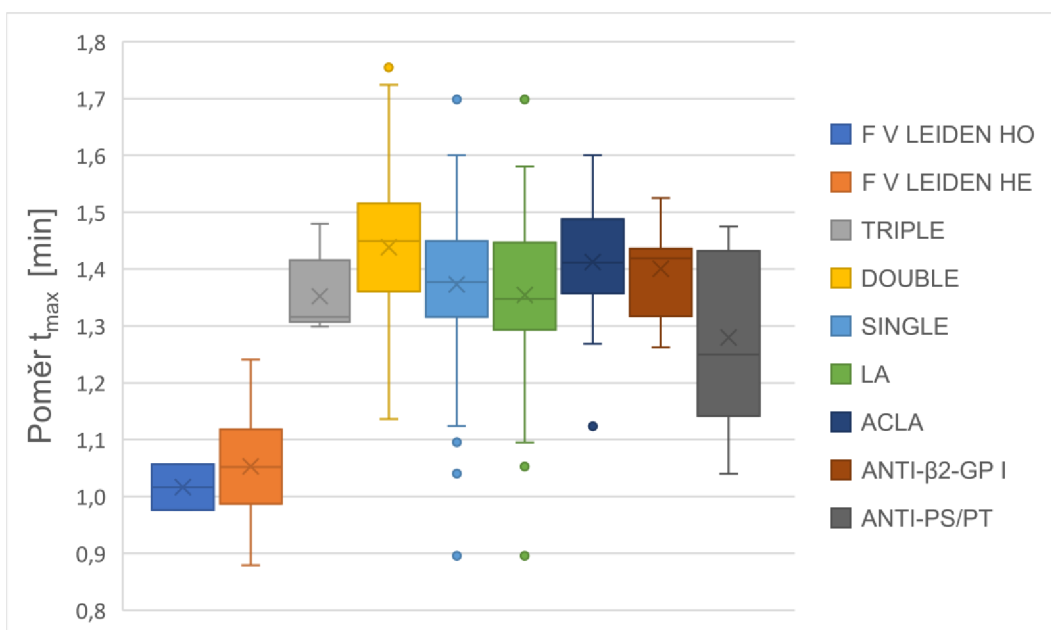
Tabulka 5: Průměrné hodnoty poměrů t_{lag} , t_{max} , C_{max} a AUC.

	Poměr t_{lag} [min]	Poměr t_{max} [min]	Poměr C_{max} [nM]	Poměr AUC [nM/min]
F V Leiden ho	0,89	1,02	2,26	1,96
F V Leiden he	0,97	1,05	4,35	3,71
Triple	1,51	1,35	7,77	7,19
Double	1,62	1,44	10,94	9,02
Single	1,67	1,37	9,34	7,25
LA	1,61	1,35	8,68	6,85
ACLA	1,74	1,41	9,97	7,56
Anti-β_2-GP I	1,85	1,40	10,11	7,26
Anti-PS/PT	1,54	1,28	10,49	8,99



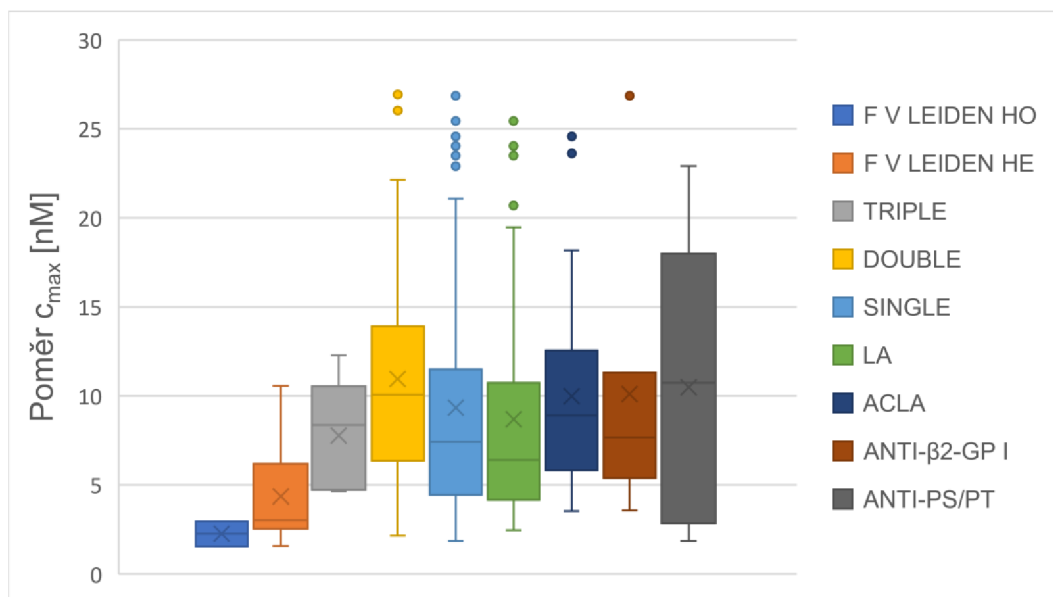
Obrázek 11: Graf popisující čas do vzniku první generace trombinu.

Obrázek 11 popisuje čas do vzniku první generace trombinu. Poměr t_{lag} byl v průměru u všech typů protilátek ve srovnání s geneticky prokázanými trombofiliemi prodloužen, což znamená, že fosfolipidové povrchy jsou obsazené, reakce probíhá pomaleji, tudíž propagační fáze nastává později. Tento poměr byl nejvíce prodloužen u anti-β₂-GP I pozitivních pacientů, nejméně prodloužen byl u triple pozitivních pacientů.



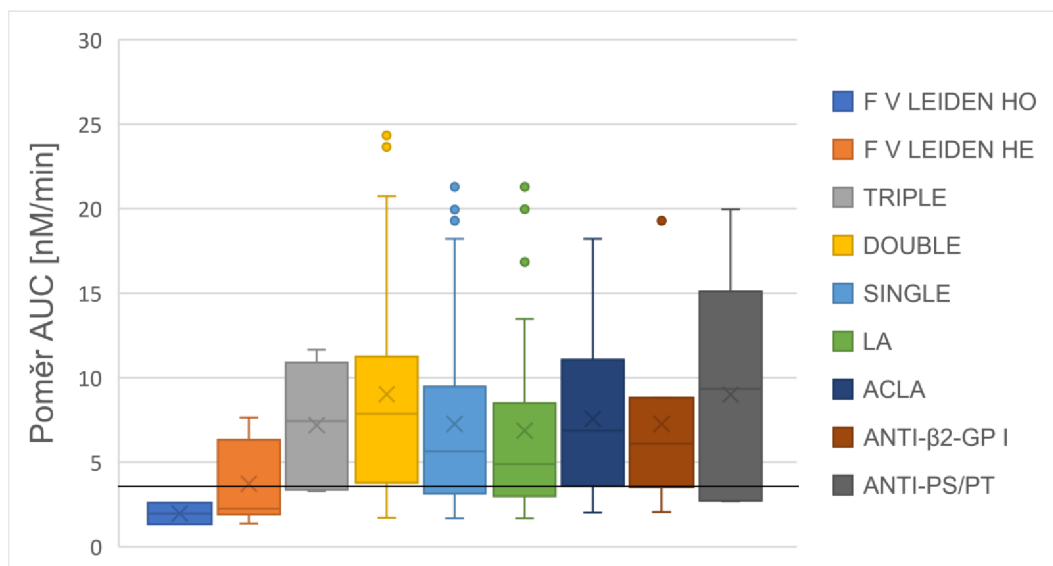
Obrázek 12: Graf popisující čas maximální tvorby trombinu.

Obrázek 12 popisuje čas maximální tvorby trombinu. Poměr t_{max} byl také jako poměr t_{lag} v průměru u všech typů protilátek ve srovnání s geneticky prokázanými trombofiliemi prodloužen. Fosfolipidové povrchy jsou obsazeny a reakce probíhá pomaleji. Poměr t_{max} byl u double pozitivních pacientů prodloužen nejvíce, naopak nejméně byl tento poměr prodloužen u anti-PS/PT.



Obrázek 13: Graf maximální koncentrace trombinu.

Obrázek 13 popisuje maximální koncentraci trombinu. Poměr c_{max} se v průměru u všech typů protilátek ve srovnání s geneticky prokázanými trombofiliemi zvyšoval. Poměr c_{max} se nejvíce zvýšil u double pozitivních pacientů, u triple pacientů byl nárůst nejmenší.



Obrázek 14: Graf celkového množství vytvořeného trombinu.

Obrázek 14 popisuje celkové množství vytvořeného trombinu. Poměr AUC se v průměru u všech typů protilátek ve srovnání s geneticky prokázanými trombofiliemi zvyšoval. Největší nárůst poměru AUC se vyskytoval u double a anti-PS/PT pozitivních pacientů. Nejmenší nárůst tohoto poměru byl u LA pozitivních pacientů. Nicméně v každé skupině existovali pacienti, kteří měli obdobný poměr AUC jako geneticky podmíněné trombofilie.

Tabulka 6: Procentuální zastoupení pacientů pod hodnotou cut off.

	Pacienti celkem	Pacienti pod hodnotou cut off	Pacienti pod hodnotou cut off [%]
Triple	5	2	40,00
Double	29	7	24,14
Single	93	27	29,03
LA	51	15	29,41
ACLA	29	8	27,59
Anti-β₂-GP I	7	2	28,57
Anti-PS/PT	6	2	33,33

Celkově byl analyzován soubor 10 pacientů s prokázanými geneticky podmíněnými trombofiliemi, které sloužily k porovnání a 127 pacientů s prokázanými různými typy antifosfolipidových protilátek, u kterých bylo 73,23 % single, 22,83 % double a 3,94 % triple pozitivních pacientů. Jako nejvhodnější marker TGT se jeví poměr AUC.

Poměr t_{lag} se v průměru prodlužoval v důsledku obsazení fosfolipidových povrchů protilátkami, což by mělo svědčit, že koagulační reakce probíhá pomaleji a pacientovi by mělo spíše hrozit riziko krvácení, což však klinicky u těchto pacientů není pozorováno, tudíž tento jev nejspíš plně nekoresponduje se situací in vivo.

Poměr t_{max} stejně jako poměr t_{lag} se prodlužoval v důsledku obsazení fosfolipidových povrchů protilátkami a tím pomaleji probíhala reakce.

Poměr c_{max} se v průměru zvyšoval u všech skupin protilátek oproti geneticky podmíněným trombofiliím. Nicméně ve všech skupinách se vyskytovali pacienti, kteří se chovali stejně jako geneticky podmíněné trombofilie.

Na rozdíl od c_{max} parametr AUC nevykazuje v průměru takové zvýšení poměru od geneticky podmíněné trombofilie a ukazuje nám spolehlivě pacienty, kteří mají stejné výsledky poměru AUC s a bez přidání APC, tudíž lze předpokládat, že budou mít stejně porušený systém aktivace proteinu C při výskytu protilátek jako má geneticky podmíněná trombofilie. Provizorní hodnota cut off představuje průměrnou hodnotu poměru AUC u heterozygotní Leidenské mutace. Největší zastoupení pacientů pod hodnotou cut off bylo u triple pozitivních pacientů, vysoké zastoupení měli také pacienti s pozitivními protilátkami anti-PS/PT. Nejmenší zastoupení pacientů pod hodnotou cut off bylo u double pozitivních pacientů.

4 ZÁVĚR

Na základě vypracované literární rešerše, která byla zaměřená především na popis antifosfolipidových protilátek a na popis trombin generačního testu, byla modifikována metodika měření generace trombinu za přítomnosti aktivovaného proteinu C. Touto modifikací byla zlepšena senzitivita testu pro hodnocení funkce inhibičního systému aktivovaného proteinu C, jehož porucha představuje jednu ze závažných trombofilií.

Pro hodnocení senzitivity testu byly posuzovány 4 parametry poměrů t_{lag} , t_{max} , c_{max} a AUC, z nichž se nám jeví jako nejpřínosnější celková generace trombinu, kde se po aplikaci hodnoty cut off, odpovídající průměrné hodnotě heterozygotních nosičů Leidenské mutace, podařilo identifikovat pacienty s poruchou aktivace proteinu C v důsledku přítomnosti antifosfolipidových protilátek ve všech vyšetřovaných skupinách, kdy nejvyšší zastoupení bylo u triple pozitivních pacientů, což zcela koresponduje s klinickým pozorováním.

POUŽITÁ LITERATURA

Al Dieri R., de Laat B., Hemker, H. C. (2012) Thrombin generation: What have we learned? *Blood Reviews*, **26**(5), 197-203.

Billoir P., Miranda S., Levesque H., Benhamou Y., Duchez V. L. (2021) Hypercoagulability Evaluation in Antiphospholipid Syndrome without Anticoagulation Treatment with Thrombin Generation Assay: A Preliminary Study. *Journal of Clinical Medicine*, **10**(12), 1-6.

Bradacova P., Slavik L., Ulehlova J., Skoumalova A., Ullrychova J., Prochazkova J., Hlusi A., Manukyan G., Kriegova E. (2021) Current Promising Biomarkers and Methods in the Diagnostics of Antiphospholipid Syndrome: A Review. *Biomedicines*, **9**(2), 1-15.

Crawley J. T. B., Zanardelli S., Chion C., Lane D. A. (2007) The central role of thrombin in hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **5**, 95-101.

Dahlback B. (2004) Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *International Journal of Hematology*, **79**(2), 109-116.

Devreese K., Hoylaerts M. F. (2009) Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome. *European Journal of Haematology*, **83**(1), 1-16.

Devreese K. M. J. (2014) Antiphospholipid antibody testing and standardization. *International Journal of Laboratory Hematology*, **36**(3), 352-363.

Devreese K. M. J. (2020) Testing for antiphospholipid antibodies: Advances and best practices. *International Journal of Laboratory Hematology*, **42**, 49-58.

Faber E. a kolektiv (2015) *Základy hematologické diagnostiky*, 2. vydání, 56-69, Mladá fronta a. s., Olomouc.

Funke A., Staub H. L., Monticielo O. A., Balbi G. G. M., Danowski A., Santiago M. B., de Andrade D. C. O., Rego J. (2020) Non-criteria Antiphospholipid Antibodies: a narrative review. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, **66**(11), 1595-1601.

Hemker H. C., Giesen P. L., Ramjee M., Wagenvoord R., Beguin S. (2000) The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thrombosis and Haemostasis*, **83**(4), 589-591.

Hemker H. C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., de Smedt E., Wagenvoord R., Lecompte T., Beguin S. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, **33**(1), 4-15.

Hemker H. C., Al Dieri R., de Smedt E., Beguin S. (2006) Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thrombosis and Haemostasis*, **96**(5), 553-561.

Hluší A., Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Indrác K. (2010a) Globální hodnocení funkce hemostázy - část I. Trombin generační test. *Transfúze a hematologie dnes*, **16**, 65-70.

Hluší A., Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Zapletalová J., Indrác K. (2010b) Globální hodnocení funkce hemostázy - část II. Vlastní zkušenosti s použitím trombin generačního testu u pacientů s trombofilií. *Transfúze a hematologie dnes*, **16**, 121-125.

Houghton D. E., Moll S. (2017) Antiphospholipid antibodies. *Vascular Medicine*, **22**(6), 545-550.

Indrác K. a kolektiv (2014) Hematologie a transfúzní lékařství, 1. vydání, 483-487, TRITON, Praha.

Kittnar O. a kolektiv (2020) *Lékařská fyziologie*, 2. vydání, 141-150, Grada Publishing, a.s., Praha.

Lewis S. J., Stephens E., Florou G., Macartney N. J., Hathaway L. S., Knipping J., Collins P. W. (2007) Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *British Journal of Haematology*, **138**(6), 775-782.

Liu T. T., Gu J. Y., Wan L. Y., Hu Q. Y., Teng J. L., Liu H. L., Cheng X. B., Ye J. N., Su Y. T., Sun Y., Zhou J. F., Norman G. L., Wang X. F., Yang C. D., Shi, H. (2020) "Non-criteria" antiphospholipid antibodies add value to antiphospholipid syndrome diagnoses in a large Chinese cohort. *Arthritis Research & Therapy*, **22**(1), 1-11.

Pecka M. (2004) *Laboratorní hematologie v přehledu*, 1. vydání, FINIDR, s. r. o., Český Těšín.

Penka M., Buliková A. a kolektiv (2009) *Neonkologická hematologie*, 2. vydání, Grada Publishing, a.s., Praha.

Penka M., Tesařová E. a kolektiv (2011) *Hematologie a transfuzní lékařství I*, 1. vydání, Grada Publishing, a.s., Praha.

Racek J., Rajdl D. a kolektiv (2021) *Klinická biochemie*, 3. vydání, 405-411, Galén, Praha.

Regnault W., Beguin S., Lecompte T. (2003) Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, **33**(1), 23-29.

Sciascia S., Sanna G., Murru V., Roccatello D., Khamashta M. A., Bertolaccini M. L. (2014) Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis and Haemostasis*, **111**(2), 354-364.

Škorňová I., Slavík L. a kolektiv (2020) Hemostáza, 1. vydání, P+M, s.r.o., Turany.

Šlechtová J. (2007) Hemostáza - jak ji možná neznáme. *Klinická biochemie a metabolismus*, **15**, 97-101.

Tripodi A. (2016) Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*, **62**(5), 699-707.

van Veen J. J., Gatt A., Cooper P. C., Kitchen S., Makris M. (2006) Between-batch variation of calibrator activity can significantly influence fluorogenic measurement of thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **4**(11), 2514-2516.

Vydra J., Novák J., Lauermannová M. a kolektiv (2019) Hematologie v kostce, 2. vydání, 176-179 Mladá fronta a. s., Praha.