



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vliv kardiologických výkonů na funkci  
krevních destiček**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Pavla Chaloupková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2018

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

V Olomouci dne

.....

Chtěla bych poděkovat panu doc. Mgr. Ludřku Slavíkovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat kolektivu koagulační laboratoře Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Pavla Chaloupková
Název práce	Vliv kardiochirurgických výkonů na funkci krevních destiček
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Koagulační laboratoř: Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci
Vedoucí práce	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Tato bakalářská práce se zabývá základní složkou hemostázy, kde krevní destičky, zajišťují tvorbu trombu pomocí adheze a následné agregace. Je zde porovnán vliv podání trombocytárního koncentrátu na hodnotu agregace, který je odebrán před započítím kardiochirurgického výkonu s použitím přístroje pro mimotělní oběh.

Teoretická část pojednává o hemostáze jako celku a mechanismech hemostatických procesů, kterých se účastní trombocyty. Zvláštní důraz je kladen na schopnost agregace krevních destiček při poškození cévní stěny. Dále je pojednáváno o patofyziologii oběhového ústrojí a kardiochirurgických operací s použitím přístroje pro mimotělní oběh.

### Abstrakt

Experimentální část se věnuje měření agregace krevních destiček optickou metodou za použití přístroje Apact 4004 a následného porovnání mezi jednotlivými soubory. Měření bylo provedeno: 1. Na počátku kardiochirurgického výkonu, 2. Po ukončení mimotělního oběhu a 3. Po navrácení trombocytárního koncentrátu zpět pacientovi. Za kontrolní skupinu byl považován soubor pacientů, kterým po ukončení mimotělního oběhu nebyl navrácen trombocytární koncentrát. Porovnávání bylo provedeno oproti skupině pacientů, kterým bylo navráceno odebrané množství krve. Při měření byly použity inductory aktivace trombocytů (kolagen, adenosindifosfát, epinefrin a ristocetin) používající se při zjišťování patologických stavů v procesu aktivace krevních destiček.

Klíčová slova	krevní destička, agregace, optická agregometrie, mimotělní oběh, Cell saver
Počet stran	71
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Pavla Chaloupková
Title of thesis	The influence of cardiosurgery on platelet function test
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>This bachelor thesis deals with the basic component of hemostasis, where blood platelet ensure thrombus formation by adhesion and subsequent aggregation. This compares the effect of returning platelet concentrate that is collected prior to initiating cardiac surgery using an extracorporeal device, to the value of aggregation.</p> <p>The theoretical part deals with hemostatis and mechanisms of hemostatic processes where platelet are involved. Particular emphasis is on the ability of platelet aggregation to damaged vessel wall. It also deals with the pathophysiology of circulatory system and cardio surgical operations using an extracorporeal circulation.</p> <p>The experimental part deals with the measurement of platelet aggregation using the Apact 4004 and subsequent comparison between the individual sets. Measurement was performed: 1. At the beginning of cardiac surgery, 2. After the end of extracorporeal circulation and 3. After returning the platelet concentrate back to the patient. The control group was considered a set of patients, which did not return a platelet concentrate after the extracorporeal circulation. Comparison was performed against the group of patient, which was returned withdrawn blood. Platelet activators (collagen, adenosine diphosphate, epinephrine and ristocetin) were used in the measurement to detect pathological conditions in the platelet activation process.</p>
Keywords	platelet, aggregation, optical agregometry, extracorporeal circulation, Cell saver
Number of pages	71
Number of appendices	3
Language	Czech

# OBSAH

ÚVOD.....	8
CÍLE PRÁCE.....	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 HEMOSTÁZA.....	10
1.1 Cévní stěna.....	10
1.1.1 Endotel.....	11
1.2 Tkáňová složka.....	12
1.3 Krevní destičky.....	12
1.3.1 Struktura.....	13
1.3.2 Receptory.....	15
1.3.3 Adheze.....	16
1.3.4 Agregace.....	16
1.4 Systém plazmatických faktorů.....	18
2 MECHANISMY HEMOSTATICKÝCH PROCESŮ.....	19
2.1 Primární hemostáza.....	19
2.1.1 Proces tvorby primárního destičkového trombu.....	20
2.1.2 Patofyziologie primární hemostázy.....	21
2.2 Plazmatický koagulační systém.....	21
2.2.1 Koagulační faktory.....	22
2.3 Fibrinolytický systém.....	24
2.3.1 Plazminogen.....	25
2.4 Inhibitory krevního srážení.....	25
2.4.1 Serpiny.....	26
2.4.2 Systém proteinu C.....	27
2.4.3 Kuniny.....	28
2.4.4 Nescifické inhibitory.....	28
3 PATOFYZIOLOGIE OBĚHOVÉHO ÚSTROJÍ.....	29
3.1 Konzervativní léčba.....	30
3.1.1 Antiagregační léčba.....	30
3.2 Invazivní léčba.....	31
3.2.1 Kardiochirurgické řešení.....	31
3.2.2 Mimosřelňný obĚh.....	31
3.2.3 Cell Saver.....	33
4 STATISTICKÉ HODNOCENÍ.....	34

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
5 MATERIÁL A METODY.....	35
5.1 Chemikálie .....	35
5.2 Materiál a přístrojová technika.....	35
5.3 Použité metody .....	36
5.3.1 Odběr krve .....	36
5.3.2 Laboratorní stanovení .....	37
5.3.3 Agregometrie .....	37
5.3.4 Testy agregometrie .....	39
VÝSLEDKY .....	41
6 SOUBOR PACIENTŮ.....	42
6.1 Průběh operace.....	42
6.2 Vyšetřovaná skupina pacientů postupujících zákrok s použitím Cell Saveru .....	43
6.2.1 Údaje o předoperační medikaci.....	47
6.2.2 Parametry mimotělního oběhu .....	47
6.2.3 Transfuzní terapie .....	52
6.2.4 Charakteristika pacientů.....	53
6.3 Kontrolní skupina pacientů bez navracení krve z Cell Saveru .....	57
6.4 Skupina operovaných pacientů s navracením krve z <i>Cell Saveru</i> .....	58
6.5 Statistické hodnocení kontroly a pacienta .....	60
DISKUZE .....	63
ZÁVĚR.....	64
PŘÍLOHY .....	65
Seznam použitých zkratk .....	65
Seznam obrázků.....	67
Seznam tabulek.....	68
SEZNAM LITERATURY .....	69

# ÚVOD

Krev je kapalná cirkulující tkáň složená z plazmy a krevních buněk (erytrocyty, leukocyty a trombocyty). Její ztráta může být život ohrožující, a proto existuje systém navazujících reakcí – kaskád, který slouží jako ochranný mechanismus zástavy krvácení, tzv. hemostáza. Mezi hlavní složky hemostázy patří cévní stěna, tkáňová složka, činitelé plazmatického koagulačního systému a krevní destičky. Během tohoto procesu dochází ke tvorbě krevní zátky (trombu) aktivací trombocytů a jejich následnému přilnutí na poraněné místo cévní stěny, čímž dostávají signál vedoucí ke změně jejich tvaru a vzájemné agregaci (ta může být vyvolána i působením řady induktorů). Současně s tímto procesem probíhá v krvi řada enzymatických reakcí, spouštějících se na základě kontaktu koagulačních faktorů s obnaženým endotelem cévní stěny. Výsledkem těchto reakcí je přeměna rozpustného fibrinogenu (plazmatický protein) na nerozpustný vláknitý fibrin, zpevňující vzniklý trombus.

Pro porozumění patofyziologickým procesům kardiovaskulární soustavy je důležitá nejen znalost příčin nemocí srdce a cév, ale i podíl účasti krevních elementů na těchto procesech. V České republice je úmrtnost na kardiovaskulární choroby jednou z nejvyšších na světě (cca 53 %). Při jejím řešení se jako první volí konzervativní (neoperativní) léčba. V případě jejího selhání se poté volí invazivní řešení a v nejzávažnějších případech pak kardiochirurgické operace, během kterých bývá použit mimotělní oběh obsahující rekuperační přístroj Cell saver.

V této bakalářské práci se zabýváme rozdíly v agregaci krevních destiček vyvolaných induktory (kolagen, adenosindifosfát, epinefrin, ristocetin) při kardiochirurgických výkonech, kdy porovnáváme kontrolní skupinu pacientů, kterým nebyla vrácena krev z přístroje Cell saver, oproti skupině pacientů operovaných stejně ale s navrácením krve z tohoto přístroje. Pro měření agregace byl v našem případě použit optický agregometr Apact 4004, sledující změnu průchodu světla míchanou plazmou bohatou na krevní destičky. Během tohoto měření byl pozorován výrazný a příznivý vzestup agregace vyvolané danými induktory po navrácení trombocytárního koncentráту z přístroje Cell saver oproti kontrolní skupině.



# CÍLE PRÁCE

1. Literární rešerše problematiky hemostázy a účasti trombocytů v patofyziologii oběhové soustavy.
2. Osvojení si metodik a postupů vyšetřování agregace krevních destiček.
3. Zjištění funkce trombocytů, zpětně podaných pacientovi po ukončení mimotělního oběhu.
4. Porovnání klinického významu podání trombocytů z Cell saveru oproti skupině pacientů operovaných stejným způsobem, kterým destičky nebyly podány.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 HEMOSTÁZA

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení. Jedná se o komplexní proces, na kterém se podílí řada složek a mechanismů s rozdílnými vstupy a účinky s celou řadou pozitivních a negativních zpětných vazeb. Požadavky na hemostatické mechanismy se liší dle toho, zda probíhají v arteriální nebo venózní části krevního řečiště:

- V cévách je vyžádána pohotová interakce koagulačních faktorů s destičkami
- V žilách je naopak důležitá účast inhibitorů plazmatických koagulačních faktorů bránících růstu krevní sraženiny a její propagaci do krevního řečiště.

Hemostáza je řízena optimální souhrou endoteliální bariéry, trombocytů, aktivačních a inhibičních faktorů koagulační kaskády a fibrinolytického systému.

Hlavními složkami hemostázy jsou dle Pecky (2004):

- *Cévní stěna* (endotel a subendotelové struktury)
- *Tkáňová složka* (uvolněná z porušené tkáně)
- *Krevní destičky* (trombocyty)
- *Činitelé plazmatického koagulačního systému* (aktivátory, inhibitory a složky fibrinolýzy).

### 1.1 Cévní stěna

Cévy, kromě kapilár, mají třívrstvou strukturu v podobě intimy, medie a adventicie. Intima je tvořena jednovrstevnou výstelkou endoteliálních buněk, které jsou spojené polysacharidovou intracelulární matrix a obklopené bazální membránou syntetizovanou fibroblasty a samotnými endoteliemi. Pod bazální membránou se nachází extracelulární matrix (ECM) jehož hlavními buňkami jsou fibroblasty a hladké svalové buňky.

Subendotel se fyziologicky dostává do kontaktu s krví pouze při poranění. Je velmi trombogenní a okamžitě aktivuje všechny systémy hemostázy. Jeho nejvýznamnější hemostatické složky jsou kolageny a tkáňový faktor (TF) (Penka & Slavičková, 2011).

### 1.1.1 Endotel

Endotel neboli cévní výstelka, tvoří funkční a dynamický netrombogenní povrch lumina cév a jeho poškození může být příčinou zánětu, trombózy a aterosklerózy. U dospělého člověka představuje přibližně 1 % tělesné hmotnosti těla. Mimo jiné reguluje cévní tonus, průtok krve, permeabilitu kapilár, proliferaci buněk hladké svaloviny a hemostázu. Aktivní složku tvoří systém endotelií, které na svém povrchu nesou řadu receptorů (např. trombomodulin, fibronectin) včetně adhezivních receptorů (integrinů). Endotelové buňky se podílí na metabolismu lipoproteinů, syntéze tkáňového aktivátoru plazminogenu, umožňují výměnu kyslíku, tekutin a makromolekul mezi krví a tkáněmi. Dále se podílejí na udržení rovnováhy mezi stimulací a inhibicí růstu cév a rozhodují o adhezi krevních elementů.

Endotelové buňky mají i významné výkonné a regulační funkce, které vyplývají z jejich sekrečních aktivit a schopnosti měnit tyto aktivity v závislosti na signálech přicházejících z kardiovaskulárního, imunitního a nervového systému (Davies, 1993; Schnitzer, 1997; Cines et al., 1998; Poredoš 2001; Penka & Slavíčková, 2011).

Endoteliální faktory stimulující hemostázu:

- Tkáňový faktor (TF)
- Von Willebrandův faktor (VWF)
- Faktor aktivující destičky (PAF)
- Trombinový receptor (PAR)
- Heparinázy
- cytokiny aj.

Endoteliální faktory způsobující inhibici hemostázy:

- TFPI (tissue factor pathway inhibitor)
- VWF - proteáza metabolizující Von Willebrandův faktor
- EDRF (endothelium dependent relaxing factor)
- Trombomodulin (TM)
- Glykosaminoglykany – heparansulfát, dermatansulfát
- Antagonisté, inhibiční cytokiny aj.

Endotelie mohou být aktivovány do protrombotického stavu nejen přímým traumatem ale i řadou cytokinů (např. Interleukin- 1, tumor nekrotizující faktor – TNF), vysokou hladinou homocysteinu, oxidovanou formou LDL (low density lipoproteins) a vysokým krevním tlakem. Rozsáhlá aktivace endotelu cytokiny u sepse nebo polytraumatu může vést k rozvoji syndromu diseminované intravaskulární koagulace (Penka & Slavíčková, 2011).

Intaktní endoteliální buňky také hrají podstatnou úlohu v primární hemostáze, protože udržují trombocyt v intaktním stavu a brání jeho adhezi na cévní stěnu. Aktivaci destiček kontrolují dle Pecky (2004) různými mechanismy:

- Vytváří bariéru mezi krví a tkáněmi – oddělují od cirkulace vysoce trombogenní subendotelové vrstvy obsahující struktury na bázi kolagenu (kolagen typu III)
- Syntetizují prostacyklin ( $\text{PGI}_2$ ), který stabilizuje destičku stimulací cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP)
- Trvale uvolňují oxid dusnatý (NO), který tlumí aktivaci krevních destiček pomocí cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP)
- Produkují endonukleázy přeměňující adenosindifosfát (ADP) na neaktivní adenosinmonofosfát (AMP)
- Vytváří negativní elektrostatický náboj, který nedovolí negativně nabitým trombocytům přilnout k endotelu

## 1.2 Tkáňová složka

Z poraněné tkáně a okolních buněk dochází k uvolňování ADP, vyvolávající primární shlukování (agregaci) krevních destiček, a tkáňového faktoru, který způsobuje přeměnu protrombinu na aktivní trombin (Pecka, 2004).

## 1.3 Krevní destičky

Krevní destička je nejmenší částice v krvi, představující heterogenní populaci složenou z trombocytů o různé velikosti, tvaru a hustoty. Mladší destičky jsou oproti starším větší. Mají hutnější cytoplazmu a na membráně mají větší počet vazebných míst. Stárnutím destiček se snižuje jejich denzita a klesá aktivita nitrobuněčných procesů. Mladé trombocyty jsou vyplavovány z kostní dřeně a zadržovány ve slezině. Po uvolnění z megakaryocytů podléhají procesu stárnutí a v krevním oběhu přežívají 9 – 12 dní. Zestárlé a nefunkční trombocyty jsou poté odbourávány mononukleárním fagocytárním systémem.

Trombocyty jsou bezjaderné buňky, vznikající odštěpováním cytoplazmy megakaryocytů v kostní dřeni. Tyto fragmenty jsou uvolňované z kostní dřeně a vyplavované do krevního oběhu, kde působí jako neoddělitelná složka první fáze hemostázy. V inaktivním stádiu mají krevní destičky diskoidní tvar s průměrem 2 – 4  $\mu\text{m}$ . Trombocyty jsou za normálních okolností obklopeny mimobuněčnou tekutinou, se kterou interagují. Dochází tím k jejich aktivaci, při které se mění jejich tvar na nepravidelný s výběžky cytoplazmy – filopodia.

V cytoplazmě trombocytů se nalézají tři typy granulí:

- $\alpha$  – *granula* obsahující faktor IX, VWF, faktor V a fibrinogen.
- $\delta$  – *granula (denzní)* s ADP, adenosintrifosfát (ATP) vápníkem a serotoninem.
- $\gamma$  – *granula (lyzozomy)* jejichž funkce je totožná s lyzozomy.

Trombocyty se v organismu podílí jak na fyziologických, tak i patologických procesech krevního srážení, které při dysfunkci krevních destiček mohou vést ke krvácení nebo při nadměrné aktivaci k trombóze. Trombocyty také podporují proliferaci a diferenciaci dalších buněk, aktivně skladují růstové faktory a biologicky aktivní látky či podléhají interakcím s okolními buňkami (leukocyty, endotelové buňky). V patologických procesech se krevní destičky nachází v aktivním stavu, kde k jejich aktivaci může dojít stykem se subendoteliálními strukturami (například při poškození cévní stěny), nebo specifickými látkami (aktivátory) vyplavenými do krevního oběhu – kolagen a trombin. Při tomto procesu dochází uvnitř buňky k transportům nitrobenčného vápenatého kationtu, způsobujících zvýšení koncentrace volných  $\text{Ca}^{2+}$ , či změnám membránové struktury – flip-flop, microvehicle (Schroit & Zwaal, 1991; Kroll & Schafer, 1995; Pecka, 2006, Kořínková, 2017).

### 1.3.1 Struktura

Trombocyty jsou nejmenší buňky fyziologicky přítomné v lidské krvi. Společně s erytrocyty se jedná o bezjaderné krevní elementy, a proto je řadíme mezi tzv. neúplné buňky. Jejich membrána je citlivá k řadě podmětů, které ovlivňují metabolické procesy a aktivační děje v buňce. Tvar krevní destičky se mění dle stupně aktivace (Kroll et al., 1996; Kořínková, 2017).

Dle Pecky (2006) lze v trombocytech vyčlenit 4 oblasti na základně anatomických znaků:

- *Periferní oblast*: zahrnující „plazmatický obal“, glykokalyx, membránové a submembránové struktury. Probíhají zde pochody na molekulární úrovni při interakci trombocytu s extracelulárním prostředím.
- *Oblast solubilního gelu*: obsahující viskózní matrix tvořený z převážné části fibrilárními proteiny. Sestává se z obvodového pásu mikrotubulů, submembránových filamentů, mikrofilamentů a proteinové podjednotky v rovnováze s polymerizovanými vlákny.
- *Oblast organel*: zahrnuje denzní tělíska,  $\alpha$  – granula, lyzozomy, peroxizómy a mitochondrie.
- *Membránový systém*: otevřený kanálkový systém a denzní tubulární systém.

Plazmatický obal krevní destičky je tvořen albuminem, fibrinogenem, koagulačními plazmatickými činiteli (globuliny, glykoproteiny) a vápenatými ionty. Tento obal příznivě ovlivňuje přilnavost trombocytů a hraje důležitou roli při interakcích krevní destičky.

Membrána má tloušťku 6–10 nm a podobné složení jako membrány ostatních krvinek. Vytváří však hluboké vychlípeniny do nitra destičky tzv. otevřený kanálkový systém. Mezi její hlavní složky patří z 57 % bílkoviny (kontraktilní, enzymy a buněčné receptory), z 35 % lipidy (lipoproteiny, cholesterol a glykolipidy) a z 8 % sacharidy (glykoproteiny, glukosaminy, mukopolysacharidy aj.). Membrána je tvořena dvouvrstvou lipidů s asymetrickým uložením fosfolipidů. Podstatnou složkou je však cholesterol, který je nerovnoměrně rozdělen mezi membránovými listy a ovlivňuje její fluiditu, permeabilitu a transport látek přes membránu.

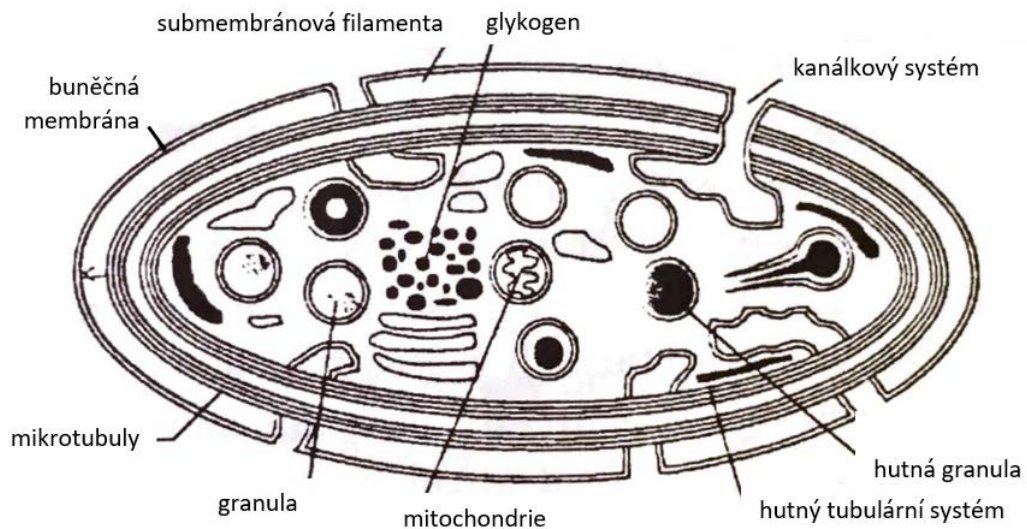
Otevřený kanálkový systém krevních destiček se skládá z početných zvlněných vychlípenin membrány, které zasahují do nitra buňky. Systém tvoří síť kanálků o průměru 200–300 nm procházejících cytoplazmou. Kanálky jsou navzájem propojeny a zároveň jsou spojeny s denzním tubulárním systémem.

Kontraktilní systém trombocytů je složen z cytoskeletu, který udržuje diskoidní tvar a podílí se při její aktivaci na změně tvaru, tvorbě pseudopodií, vnitřní kontrakci a sekreci. Cytoskeletární soustava sestává z fibrilárních elementů, které jsou uloženy v základní cytoplazmě mezi ostatními buněčnými organelami.

Mezi základní komponenty této složky patří:

- *Mikrotubuly*: tvořené proteinem tubulinem, který je polymerizovaný do tvaru trubiček. V neaktivované destičce jsou uloženy na obvodu, těsně pod plazmatickou membránou, kde jsou fixovány aktinovými vlákny.
- *Mikrofilamenta*: tvořené aktinem, který je v klidovém stavu v monomerní struktuře a po aktivaci polymeruje, a profilinem vážícím monomery aktinu a tím zabraňuje jeho polymeraci.

Mitochondrie představuje asi 3 % z celkového objemu krevní destičky a jsou jejím zdrojem energie, kterou získávají oxidativní fosforylací. Denzní tubulární systém je zde analogem hladkého endoplazmatického retikula, avšak neobsahuje ribozomy. Jsou zde uloženy enzymy cyklu kyseliny arachidonové nezbytné k syntéze prostaglandinů a slouží jako zásobník  $\text{Ca}^{2+}$  (Chap et al., 1987; Pecka, 2006).



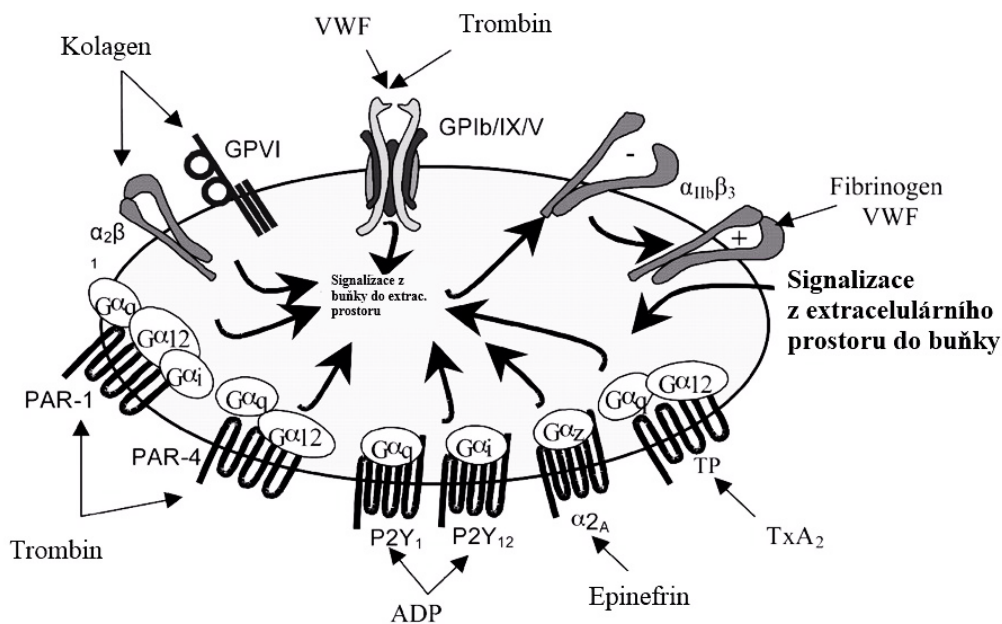
**Obrázek 1.** Morfologie krevní destičky – upraveno dle Matýšková & Hrachovinová (1999).

### 1.3.2 Receptory

Zachycení signálu je zprostředkováno pomocí receptorů na povrchu membrány krevní destičky. Řada biologických procesů, které jsou regulovány destičkami, je zprostředkováno membránovými glykoproteiny. Mimo tyto vazebné receptory má trombocyt na své membráně řadu dalších receptorů, které slouží k navázání některých aktivačních a stimulačních látek (Evans & Graham, 1988).

Dle Pecky (2006) se na povrchu krevní destičky nachází tyto skupiny receptorů:

- *Integriny*: převážně glykoprotein IIb/IIIa a glykoprotein Ia/IIa.
- *Glykoproteiny bohaté na leucin (LRG)*: komplex glykoproteinu (GP) Ib/IX, zprostředkující adhezi krevních destiček na VWF endotelu.
- *Selektiny*: zprostředkovávají interakce trombocytů a endotelu s leukocyty. Uvolňují se z krevních destiček po jejich aktivaci.
- *Imunoglobuliny*: PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) přítomný i na monocytech.
- *Quadraspaniny*: proteiny neznámé funkce.



Obrázek 2. Vybrané receptory na membráně krevní destičky – převzato a upraveno dle Rivery et al. (2009)

### 1.3.3 Adheze

Adheze neboli přilnavost, je proces, při kterém dochází k přilnavosti krevních destiček na jiné než trombocytární povrchy. Adheze trombocytů na subendotel poraněné cévy je komplexní proces vyžadující přítomnost několika adhezivních proteinů. Přilnavost je lineárně závislá na počtu trombocytů a uplatňuje se zde především VWF, fibronectin, fibrinogen a vápenaté ionty. Krevní destička po styku s kolagenními nebo subendotelovými strukturami změní během několika sekund svůj tvar (někdy i desetinásobně velikost) a pomocí pseudopodií přilne k povrchu. Přítomnost  $Mg^{2+}$  zvyšuje adhezi na kolagen až 5krát (Roth, 1991; Pecka, 2006).

### 1.3.4 Agregace

Agregace je vzájemné shlukování krevních destiček. Dochází k němu vlivem změny konformace glykoproteinové struktury GP IIb/IIIa po obsazení receptorových míst na membráně krevní destičky agonisty. Konformační změna poté umožní vyvázání molekuly fibrinogenu nebo VWF mezi dvěma receptory. Při agregaci dochází nejprve k primární fázi, v průběhu které dochází jen k částečnému spojování trombocytů menším počtem glykoproteinových struktur. Sekundární fáze je navozena silnějším aktivačním impulsem, kdy dochází k obnažení většího počtu glykoproteinových receptorů, dochází k řadě nevratných změn a destičky k sobě přilnou těsněji (Pecka, 2006).

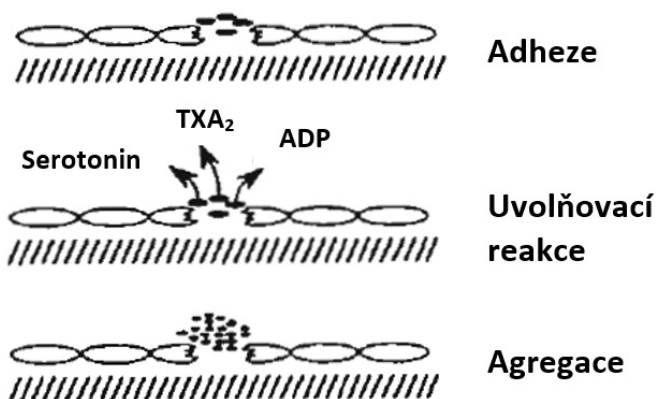


Mezi induktory agregace dle Pecky (2006) a Trojana (2003) patří:

- *Adenosindifosfát*: patří mezi hlavní ukazatele, kteří rozhodují, zda bude agregace probíhat reverzibilně nebo ireverzibilně. Při nízké koncentraci dochází ke změně tvaru destiček, zatímco při koncentracích vyšší dochází k uvolňovací reakci. ADP se získává především z porušených buněk a tkání. Největší množství se však čerpá z denzních granul.
- *TXA<sub>2</sub>*: může působit přes dva různé receptory.
- *Faktor aktivující destičky a destičkové lipidy*: jedná se o látky, pocházejících z endotelu nebo vznikajících při infekčních a zánětlivých procesech z aktivovaných neutrofilních granulocytů, bazofilů a makrofágů. Aktivace trombocytů probíhá inhibicí adenylcyklázy, snížením hladiny cAMP v destičkách či iniciací fosfoinositolového cyklu prostřednictvím spojení PAF s membránovým receptorem. Síla agregace je závislá na množství tohoto faktoru.
- *Trombin*: vznikající na povrchu trombocytů účinkem protrombinázy na protrombin. Aktivuje krevní destičky prostřednictvím proteázou aktivovaného receptoru PAR-1 a působí i na GPIb.
- *Kyselina arachidonová (AA)*: vzniká odštěpováním z membrány fosfolipidů za účasti fosfolipázy A<sub>2</sub>. Uvolněná AA zodpovídá za tvorbu endoperoxidů (PGH<sub>2</sub>) a tromboxanů (TXA<sub>2</sub>)
- *Adrenalin*: sám vyvolává agregaci, pokud je v dávkách výrazně překračujících jeho fyziologickou koncentraci. Působí přes  $\alpha_2$  – adrenergní receptor prostřednictvím G proteinu. Výsledkem je zesílení účinku jiných destičkových aktivátorů.

Stimulací výše uvedených látek na krevní destičky dochází k jejich aktivaci. Dochází tak ke vzniku příznivých podmínek pro přesun vápníku, změnu tvaru krevních destiček a uvolňovacích reakcí. V cytoplazmatické membráně se volně nacházejí glykoproteinové receptory GPIIb a GPIIIa, které se po uvolnění vápenatých iontů aktivují a nastává jejich vzájemné spojení za tvorby GPIIb/GPIIIa. Vzniklý komplex receptorů je již schopen navázat fibrinogen. Poté následuje ireverzibilní (sekundární) agregace, jejímž úkolem je vytvoření stabilizujících můstků mezi destičkami pomocí trombospondinu, který je syntetizován a vylučován buňkami endotelu, fibroblasty a hladkého svalstva. Shlukování trombocytů je zakončeno smrštěním vytvořené krevní zátky napomáhající uzavření rány (Matýšková & Hrachovinová, 1999; Nosál & Jancinová, 1990).

### Funkce krevní destičky



Obrázek 3. Schéma adheze a agregace – upraveno dle Pecky (2006).

## 1.4 Systém plazmatických faktorů

Jedná se o proteiny plazmy, které se přímo účastní krevního srážení. Podle místa vzniku je dělíme na faktory koagulační, přirozené inhibitory a faktory fibrinolýzy. Z biochemického hlediska se podle Penky et al. (2011) jedná o:

- *Enzymy* kolující v krvi jako neaktivní proenzymy (prekalikrein, plazminogen, protein C, tkáňový a urokinázový aktivátor plazminogenu, transglutamináza aj.).
- *Kofaktory* urychlující enzymatické reakce (protein S a Z, tkáňový faktor, trombomodulin, endoteliální receptor pro protein C aj.).
- *Fibrinogen* (FBG) působící jako substrát trombinu, jehož účinkem dochází k přeměně na fibrin.
- *Adhezivní plazmatické proteiny*, mezi které patří Von Willebrandův faktor, fibronectin, vitronectin a další.
- *Regulační proteiny* přirozeně inhibující krevní srážení (antitrombin, heparin kofaktor II,  $\alpha_2$ -antiplazmin, inhibitor aktivátoru plazminogenu a aktivovaného proteinu C,  $\alpha_2$ -makroglobulin aj.).
- *Fosfolipidy (PL)*, estery glycerolu a kyseliny fosforečné, které jsou integrální součástí buněčných membrán. Hlavní funkcí je účast na vzniku a přeměně membrán, transport tuku v organismu a poskytování negativně nabitých povrchů pro koagulační reakce.
- *Ionty minerálů* – Vápníkové ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) jsou nezbytné ve všech systémech hemostázy. Jejich vyvážáním dosáhneme nesrážlivé krve.

## 2 MECHANISMY HEMOSTATICKÝCH PROCESŮ

Po jakémkoli poškození endotelu cévního povrchu dochází k zahájení procesu srážení kombinovanou adhezivní reakcí zahrnující jak krevní destičky, tak i ostatní buňky či látky, které se podílejí na hemostáze. K zástavě krvácení dochází bezprostředně po ataku tvorbou primární hemostatické zátky, ze které se po jejím smrštění vytvoří zátka definitivní.

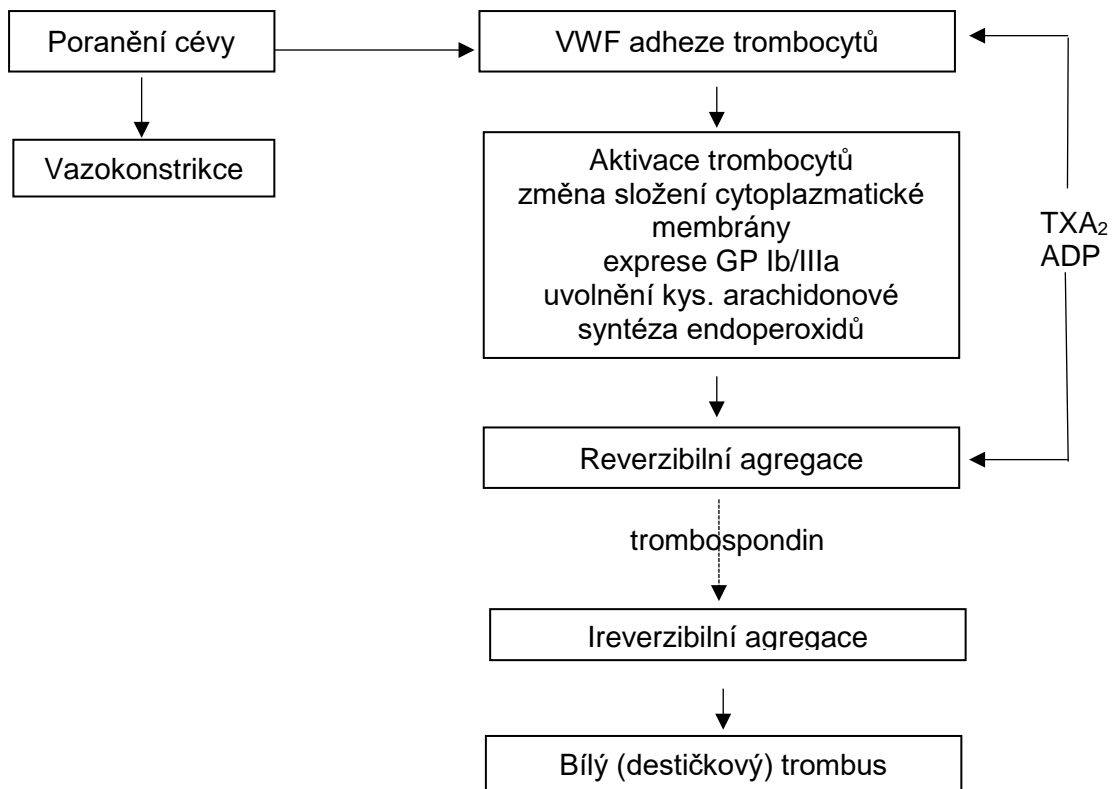
Mezi základní mechanismy hemostázy dle Pecky (2004) patří:

- *Primární hemostáza*
- *Plazmatický koagulační systém*
- *Fibrinolytický systém*
- *Inhibitory krevního srážení*

### 2.1 Primární hemostáza

Primární hemostáza je proces tvorby primární hemostatické zátky, neboli agregátu krevních destiček, která uzavírá místo narušení celistvosti cévní stěny a zastavuje tak krvácení.

Neaktivní cirkulující destičky volně smáčené krevním tokem mají oválný diskoidní tvar a nereagují na nenarušenou endotelovou výstelku cévní stěny. Jakmile však dojde k narušení endotelové výstelky a obnaží se pojivová tkáň, dochází k přichycení krevních destiček (adhezi) pomocí jejich receptorů glykoproteinové povahy (GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX) ke kolagenovým vláknům prostřednictvím VWF. Pomocí mezibuněčných signálů se kontaktují další destičky, které ze svých granulí secernují ADP a TXA<sub>2</sub> vznikající metabolismem kyseliny arachidonové. Obě látky jsou stimulatory agregace a váží se na receptory okolních destiček, které aktivují a dochází tak ke změně tvaru na kulovitý s výběžky, struktury a obnažení vazebných míst receptorů GP IIb/IIIa. To umožní vzájemnou vazbu (agregaci) trombocytů bivalentními proteiny (fibrinogen, VWF a vitronektin). Nejprve probíhá primární agregace vyvolaná ADP uvolněným z porušených buněk a tkání, a poté sekundární agregace, při které dochází k vytvoření stabilizujících můstků mezi destičkami a agregace se tak stává nevratnou (Levy-Toledano et al., 1997; Colman et al., 2001; Pecka, 2004, Penka et al., 2011).



**Obrázek 4.** Primární hemostáza – převzato a upraveno dle Kubisz et al. (2006), Kořínková (2017).

Vysvětlivky: ADP – adenosindifosfát, GP IIb/IIIa – glykoprotein IIb/IIIa, TXA<sub>2</sub> – tromboxan A<sub>2</sub>, VWF – Von Willebrandův faktor

### 2.1.1 Proces tvorby primárního destičkového trombu

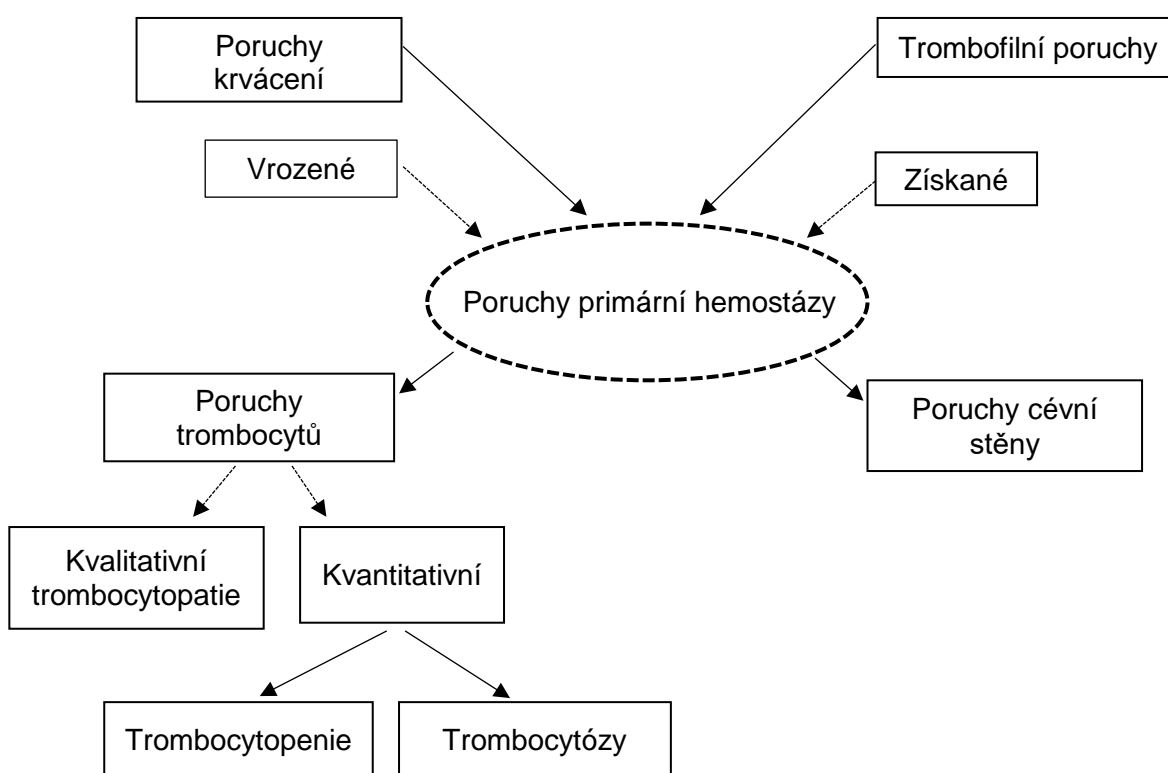
Narušením integrity cévní stěny (poraněním či degenerativním procesem), které je spojené s poškozením cévního endotelu a obnažením kolagenových vláken, se zahajuje vzájemná interakce trombocytů se složkami ECM. Poté následuje celá kaskáda interakcí, jejichž výsledkem je vznik stabilnějšího destičkového trombu. Tento proces se skládá ze tří fází: iniciační, extenzní a konsolidační.

Během iniciační fáze dochází k interakci mezi plazmatickým VWF, vážící se nejen na kolagen ale i na specifický trombocytový receptor pro kolagen, kterým je transmembránový glykoproteinový receptorový komplex trombocytů GP Ib/IIIa. Tato vazba podporuje aktivaci trombocytů, která je spojená se změnou tvaru z diskoidního na pleimorfnní s pseudopódií, a vede k přechodu do aktivované formy, katalyzující přeměnu protrombinu na trombin. Aktivace krevních destiček je také spojená se změnou složení cytoplazmatické membrány, kdy dochází k uvolnění aktivních složek destičkových granul, které mohou mít stimulační vliv na trombocyty. V konsolidační fázi nastává agregace trombocytů zprostředkovaná vazbou fibrinogenu nebo VWF na aktivovaný GP IIb/IIIa. Spolu s tvorbou fibrinové sítě dochází k tvorbě trombu (Kořínková, 2017).

## 2.1.2 Patofyziologie primární hemostázy

Narušení funkce složek primární hemostázy (cévní stěny nebo trombocytů) vede ke vzniku nerovnováhy v koagulačním systému ve smyslu vyšší aktivity – popisované jako trombofilní stav, nebo snížené aktivity, která vede k manifestaci krvácivých poruch.

Vrozené poruchy jsou poměrně vzácné, avšak nejvýznamnější je porucha srážení krve, neboli hemofilie, která je častěji diagnostikovaná u mužů než žen. Z funkčních poruch trombocytů se nejčastěji vyskytuje defekt sekrece a vnitrobuněčné signalizace. Získané poruchy krevních destiček mohou mít imunitní nebo neimunitní příčinu a podle jejich lokalizace je můžeme rozdělit na centrální (kostní dřeň) a periferní. Zvýšená funkce trombocytů může být příčinou zvýšeného sklonu k arteriálním trombózám (Kořínková, 2017).



Obrázek 5. Dělení poruch primární hemostázy – převzato a upraveno dle Pecka et al. (2010), Kořínková (2017)

## 2.2 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku nerozpustného fibrinu. Dochází postupně k přeměně fibrinogenu na fibrin, dále na fibrinové monomery, které spontánně polymerují. Polymery fibrinu se poté propojují kovalentními vazbami působením aktivovaného faktoru XIII. Fibrin vytváří vláknitou síť, ve které se zachycují krevní buňky a dochází ke tvorbě krevní sraženiny (tzv. stabilní fibrinová zátka) na jejímž stažení a hojení se podílejí trombocyty (Sussman, 1992).

## 2.2.1 Koagulační faktory

Většina koagulačních činitelů je tvořena v játrech a některé potřebují k syntéze vitamín K. Většina z nich (mimo faktory I a II) se nacházejí v plazmě ve velmi nízkých koncentracích. Převážná většina faktorů, s výjimkou tkáňového faktoru, je v plazmě přítomna v podobě proenzymu a pro svou správnou funkci vyžaduje proteolytické štěpení, při kterém z původního proenzymu vzniká koagulačně aktivní enzym. Jedná se převážně o glykoproteiny charakteru proenzymů a kofaktorů, které v procesu krevního srážení prodělávají strukturní změny (Pecka, 2004).

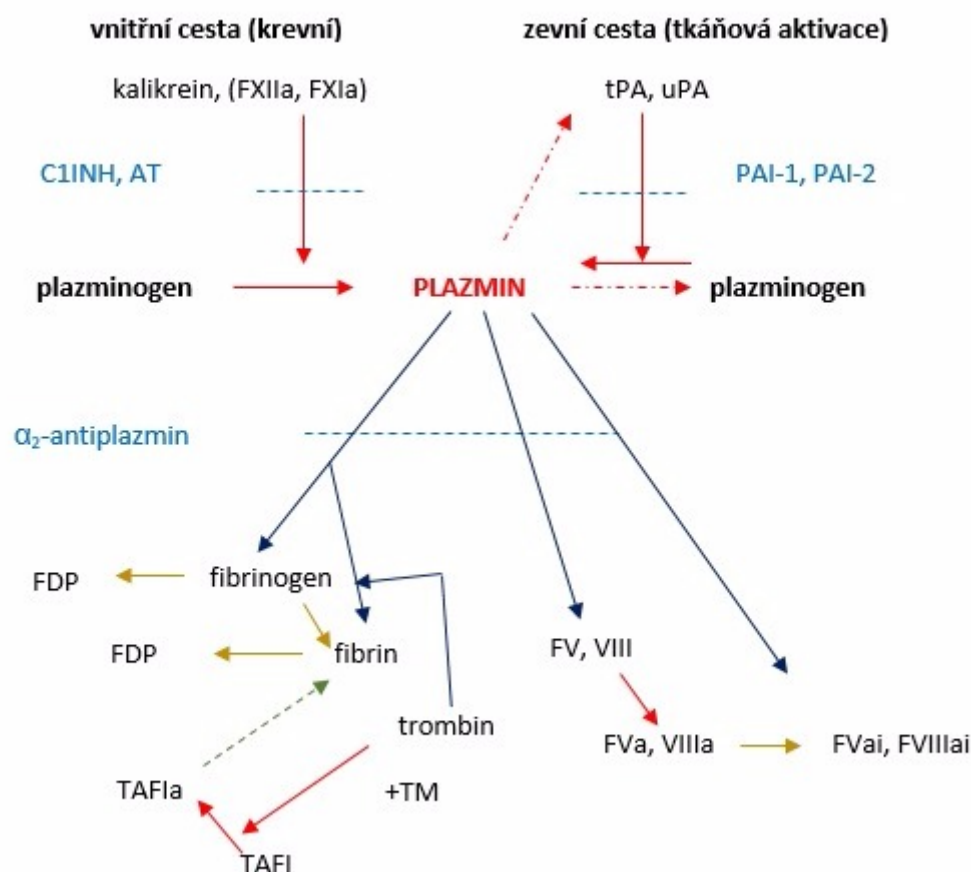
Mezi základní koagulační faktory dle Thompson et al. (1977), Schloesser et al. (1997), Hu et al. (1998), Pecka (2004), Achneck et al. (2010), Penka et al. (2011) patří:

- *Fibrinogen* (Faktor I) je fibrilární protein, přítomný jak v plazmě, tak v  $\alpha$  granulách trombocytů. Molekula je složena ze tří párů polypeptidových řetězců a na udržování jejich stability se podílejí  $Ca^{2+}$  ionty. Fibrinogen může být štěpen trombinem na fibrin, nebo plazminem na fibrinogen.
- *Protrombin* (Faktor II) se váže pomocí vápenatých iontů na negativně nabitě PL, kde je štěpen protrombinázou na aktivní formu  $\alpha$  trombin. Katalyzuje tři skupiny reakcí, které slouží k regulaci tvorby koagula – aktivaci buněk, posílení probíhající koagulace a zabránění nadměrného srážení.
- *Tkáňový faktor* (Faktor III) je syntetizován plně funkční. Jedná se o integrální transmembránový glykoprotein, který patří do skupiny cytokinových receptorů. Jeho bílkovinná složka je úzce spojená s PL což je nutné pro jeho prokoagulační aktivitu. Slouží jako buněčný receptor pro faktor VII a tvorba komplexu s faktorem VII nebo VIIa (aktivovaná forma) zahajuje koagulaci.
- *Kalcium* (Faktor IV) je nezbytný pro karboxylaci gama glutámového zbytku. Bez této karboxylace by nebyl faktor schopen vazby na  $Ca^{2+}$  a PL.
- *Proakcelerin* (Faktor V) se nachází v plazmě a  $\alpha$  granulách krevních destiček. Je aktivován limitovanou proteolýzou trombinem nebo faktoru Xa za přítomnosti vápenatého iontu. Svým složením je podobný faktoru VIII.
- *Prokonvertin* (Faktor VII) je syntetizován v játrech, lokálně jsou jeho důležitým zdrojem aktivované monocyty/makrofágy. Má proteolytickou aktivitu a je schopen štěpit faktor X. Jeho aktivita se zvyšuje věkem a v těhotenství.
- *Antihemofilický faktor A* (Faktor VIII) cirkuluje v plazmě navázán na VWF. Z této vazby se uvolňuje kontaktem s PL nebo trombinem. V přítomnosti fosfolipidů může být faktor VIII štěpen i faktorem Xa. Syntetizuje se především v játrech, slezině, lymfatických uzlinách, slinivce a ledvinách.

- *Christmas faktor* (Faktor IX) je jednořetězcový glykoprotein vznikající v játrech za účasti vitamínu K. Tento faktor je enzymaticky aktivní v komplexu zvaném tenáza (faktor IXa + faktor VIIIa + PL + Ca<sup>2+</sup>).
- *Faktor Stuarda–Prowerové* (Faktor X) je ve své aktivní formě Xa in vitro nejmocnější aktivátor faktoru VII. Reakce je významně rychlejší, pokud je navázán na tkáňový faktor.
- *Plasma tromboplastin antecedent* (Faktor XI) cirkuluje v krvi v podobě zymogenu (proenzymu) serinové proteázy. Je aktivován při tzv. kontaktní fázi plazmatického koagulačního procesu. V obvodové krvi cirkuluje jako monodimer složený ze dvou identických řetězců, vyvázan nekovalentní vazbou do komplexu s vysokomolekulárním kininogenem (HMWK).
- *Hagemanův faktor* (Faktor XII) je aktivován kontaktem se subendotelovými strukturami při poranění (aktivace pevnou fází) nebo proteázami (aktivace enzymatickou fází). Aktivačním povrchem může být i sklo, kaolin, dextran, sulfáty, elagová kyselina, kloubní chrupavka a jiné. Vedle koagulace zasahuje do systémů imunologických.
- *Transglutamináza* (Faktor XIII) je tzv. fibrin stabilizující faktor, který je jediným koagulačním enzymem s cysteinem v aktivním místě. Skládá se ze dvou párů polypeptidů (A a B řetězec). Katalyzuje formaci intermolekulárních vazeb mezi různými proteiny jako např. fibrinovými monomery, α<sub>2</sub>-antiplazminem, fibrinonektinem a kolagenem. Působením na rozpustný fibrin mění nekovalentní vazby na pevné kovalentní (D – dimery).
- *Fletcherův faktor* (Prekalikrein) je gamaglobulin, v plazmě cirkuluje navázán na HMWK. Je aktivován faktorem XIIa na α kalikrein (KA), který aktivuje faktor XII a zvyšuje uvolňování kininů z kininogenů.
- *Vysokomolekulární kininogen* (HMWK) je plazmatický protein, ze kterého se tvoří vazoaktivní peptidy (bradykininy). Váže se na aktivované trombocyty, neutrofilů a buňky endotelu. Jeho těžký řetězec má schopnost inhibovat cysteinové proteázy.

## 2.3 Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém je odpovědný za lýzy fibrinového koagula a hraje také podstatnou roli při degradaci kolagenu, v angiogenezi či u metastáz tumoru. Představuje složitou síť aktivátorů a inhibitorů propojenou množstvím pozitivních i negativních zpětných vazeb, zajišťující jemnou a vysoce přesnou regulaci rovnováhy v systému. Vlastním enzymem je plazmin, vznikající štěpením plazminogenu působením tzv. aktivátorů plazminogenu (tkáňový aktivátor plazminogenu v cévním řečišti – tPA, extravaskulární urokináza plazminogenu – uPA). Plazminogen může být vedle zevní cesty (tPA, uPA) aktivován i vnitřní cestou přes koagulační faktor XII, HMWK a prekalikrein (Pecka, 2004; Penka et al., 2011).



**Obrázek 6** Systém fibrinolýzy – upraveno dle Penky et al. (2011):

Vysvětlivky: C1INH – C1 inhibitor, AT – antitrombin, tPA – tkáňový aktivátor plazminogenu, uPA – urokináza, PAI – inhibitor aktivátorů plazminogenu, TM – trombomodulin, TAFI – trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy, FVai – rozštěpený, neaktivní faktor V, FVIIIa – rozštěpený, neaktivní faktor VIII, zelená tečkovaná čára – inhibice, červeně čerchovaná – pozitivní zpětná vazba, červená čára – aktivace, žlutá čára – štěpení, degradace.



### 2.3.1 Plazminogen

Plazminogen je jednořetězcový glykoprotein syntetizovaný játry ve dvou formacích *Glu-* a *Lyz-* plazminogen. Je přítomen i v jiných tkáních a buňkách (např. eozinofily, ledviny). *Lyz-* plazminogen tvoří menší molekulu a má kratší biologický poločas, než *Glu-* forma. V plazmě se plazminogen vykytuje částečně vyvázan na glykoproteiny bohaté na histidin. Váže se na povrchy nejrůznějších buněk a na membrány krevních destiček, kde je rozeznáván buněčným receptorem GPIIb/IIIa.

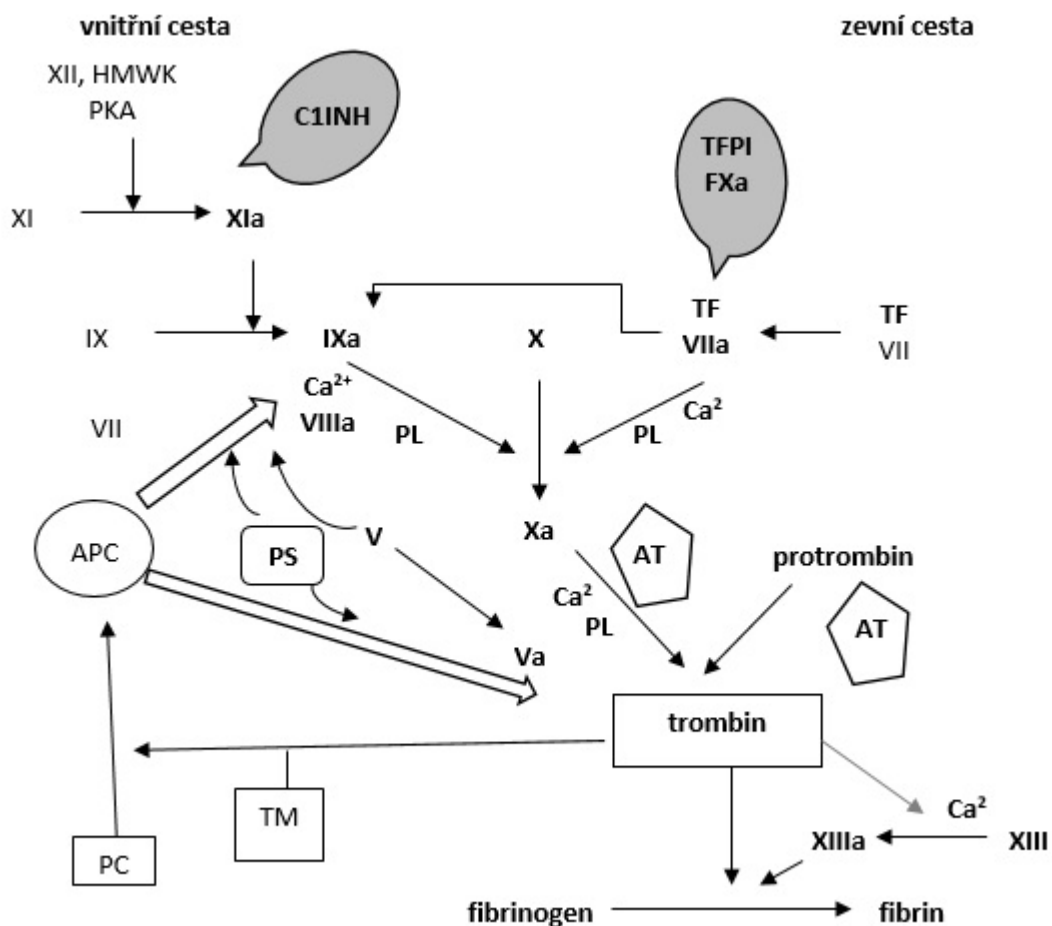
Lidský plazminogen sestává s 5 „Kringle“ modulů spojených disulfidickými vazbami. Dále obsahuje proteázovou doménu a peptid s koncovou aminokyselinou. Domény označované „Kringles“ obsahují afinitní místa pro vazbu lysinu, který je potřebný pro interakci plazminogenu s fibrinem a  $\alpha_2$ -antiplazminem (Pecka, 2004).

K aktivaci plazminogenu dochází současně s aktivací koagulace. K přeměně plazminogenu na plazmin dochází působením aktivátorů plazminogenu, kam dle Pecky (2004) a Penky et al. (2011) patří:

- *Tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA)*: proteináza serinového typu, uvolňována jako jednořetězcová molekula z endotelových buněk po jejich stimulaci trombinem, aktivovaného proteinu C, histaminu, bradykininu aj. Dalším buněčným zdrojem tPA jsou aktivované monocyty a megakaryocyty. Jednořetězcová molekula je proteolyticky štěpena plazminem, tkáňovým kalikreinem, či faktoru Xa za vzniku dvouřetězcové aktivní formy.
- *Urokinázový aktivátor plazminogenu (uPA)*: je uvolňován řadou buněk včetně endoteliálních. V plazmě cirkuluje samostatně. Jeho hlavní funkce se projevuje ve tkáních, kde hraje důležitou roli ve štěpení extracelulárního matrix, a tím umožňuje migraci buněk.

## 2.4 Inhibitory krevního srážení

Inhibitory krevního srážení jsou součástí a zároveň i základním regulačním mechanismem koagulace. Jsou to přirozené složky krve, které tlumí antikoagulačními mechanismy proces jejího srážení vyvolaný plazmatickým koagulačním systémem a fibrinolýzou. Tyto látky inhibují aktivní složky hemostatického procesu - proteolytické enzymy (především serinové proteázy). V organismu slouží k zabránění nekontrolovaného srážení a tím k udržení dynamické koagulační rovnováhy. Působení přirozených inhibitorů v koagulační kaskádě může být vnitřní a zevní cestou (Pecka, 2004; Penka et al., 2011).



**Obrázek 7.** Působení přirozených inhibitorů v koagulační kaskádě – upraveno dle Penky et al. (2011)

Vysvětlivky: APC – aktivovaný protein C, AT – antitrombin, C1INH – C1 inhibitor, HMWK – vysokomolekulární kininogen, PC – protein C, PKa – prekalikrein, PL – fosfolipidy, PS – protein S.

### 2.4.1 Serpiny

Serpiny tvoří velkou skupinu inhibitorů serinových proteáz. Většinou se jedná o nespecifické inhibitory, které tvoří komplex s cílovým enzymem. Serpin-serinová proteáza je po uvolnění do cirkulace vychytávána v játrech serpinovými receptory. Jsou důležitým regulačním faktorem, nadměrné štěpení u některých patologických stavů má pro organismus závažné následky (Pecka, 2004).

Podle Penky et al. (2011) mezi serpiny taktéž řadíme:

- *Antitrombin (AT)*: je protein akutní fáze vyskytující se i extravaskulárně. Regulace syntézy je navázána na regulaci syntézy fibrinogenu. AT působí primárně na endotelu, má širokou antiproteázovou aktivitu a je primárním inhibitorem trombinu. Sám je schopen pomalé inhibice faktoru IIa a Xa, za přítomnosti heparinu jako kofaktoru inhibuje i faktor IXa.

- *Heparin kofaktor II (HCII)*: je fyziologický, specifický inhibitor trombinu. Je přítomen především na cévním endotelu. Jeho účinek je urychlován heparinem a dermatansulfátem.
- *C1 inhibitor (C1INH)*: je nejmocnějším inhibitorem faktorů kontaktu schopný inhibovat i plazmin. Syntetizují ho játra, odkud je uvolňován v průběhu aktivace destiček.
- *Inhibitor aktivovaného proteinu C (PC1), Proteinázový inhibitor závislý na proteinu Z (ZPI), Protein Z (PZ) aj.*

## 2.4.2 Systém proteinu C

Systém proteinu C je klíčovou složkou přirozené antikoagulační cesty, která je aktivována na povrchu endotelových buněk trombinem navázaným k trombomodulinu. Systém je schopen inaktivovat některé faktory krevního srážení (VIIIa a Va) a tím reguluje tvorbu trombinu. Díky antikoagulačním a protizánětlivým schopnostem moduluje obranu organismu na cizí stimulus (Debize et al., 1995, Penka et al., 2011).

Dle Pecky (2004) a Penky et al. (2011) je systém tvořen:

- *Protein C (PC)*: tvořen v hepatocytech a jeho aktivace probíhá na endotelu. Aktivovaný protein C (APC) má v plazmě poměrně dlouhý poločas. Může být aktivován faktorem Xa navázaným na TM za přítomnosti negativně nabitých PL. Jeho hlavním inhibitorem je PCI a  $\alpha_1$ -antitrypsin.
- *Protein S (PS)*: jednořetězcový glykoprotein, který vzniká v játrech za účasti vitamínu K. Uložen v endotelu a v  $\alpha$ -granulách krevních destiček. Asi 40 % PS je v plazmě ve volné formě, zbytek vázán. Působí jako kofaktor APC a usnadňuje vazbu APC k fosfolipidovým povrchům destiček a endotelií. Taktéž specificky inhibuje aktivitu TF.
- *C4b vazebný protein (C4bBP)*: jedná se o regulační protein cesty komplementu složený z 6–7  $\alpha$  řetězců a část také s  $\beta$  řetězcem. Pouze forma s  $\beta$  řetězcem váže reverzibilně PS.
- *Trombomodulin (TM)*: integrální transmembránový glykoprotein trvale přítomný na cévním endotelu, který váže trombin. V hemostáze působí třemi způsoby – kofaktor pro aktivaci PC trombinem:
  - inhibuje proteolytické působení trombinu na makromolekulární substráty
  - obsahuje-li galaktozaminoglykan urychluje inaktivaci trombinu antitrombinem.

- *Endoteliální receptor pro protein C (EPCR)*: transmembránový protein existující ve dvou formách – plazmatická (rozpuštěná) a buněčná (membránová) forma.

### 2.4.3 Kuniny

Jedná se o inhibitory proteáz obsahující strukturu zvanou Kunitzova doména v molekule. Patří sem nexin proteáz II a inhibitor zevní koagulační cesty (TFPI) cirkulující v plazmě navázaný na lipoproteiny o nízké hmotnosti. TFPI přímo inhibuje faktor Xa a reakce je urychlována heparinem (Penka & Slavičková, 2011).

### 2.4.4 Nespecifické inhibitory

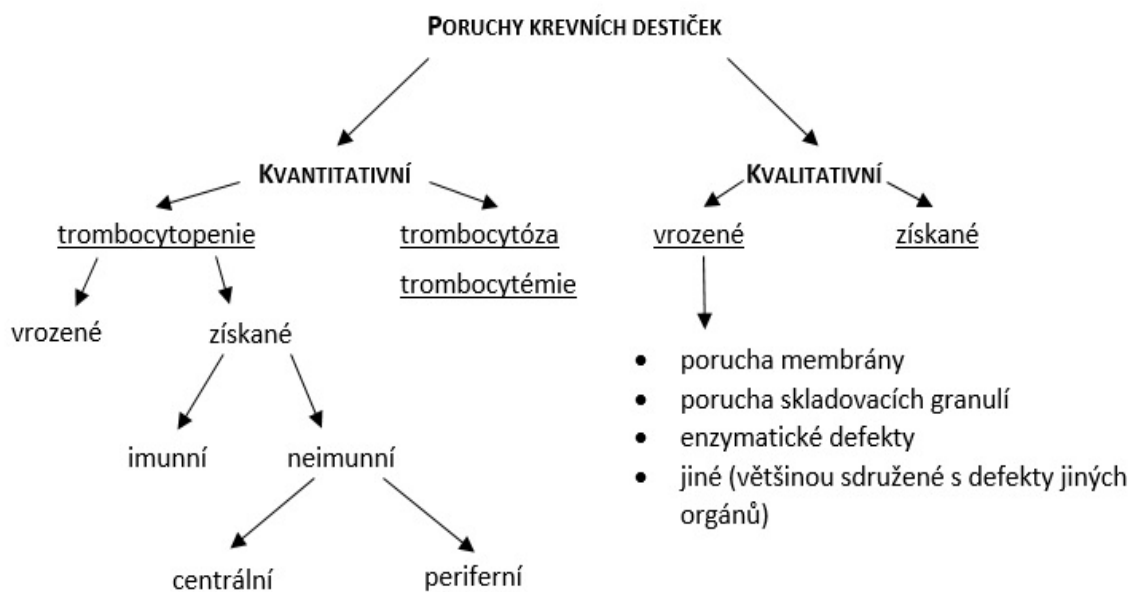
Nespecifické inhibitory inhibují v podstatě jakoukoliv proteázu díky nespecifickým vazbám na cílové molekuly (Pecka, 2004).

K této skupině inhibitorů se podle Pecky (2004) a Penky & Slavičkové (2011) řadí:

- *$\alpha_2$ -makroglobulin*: tvořen hepatocyty v játrech či makrofágy a přítomen v plazmě i extravaskulárně. Je složen ze dvou, či čtyř identických podjednotek a má nejširší spektrum antiproteázové aktivity.
- *C-1 inhibitor*: syntetizován v játrech a uvolňován v průběhu aktivace destiček. Jedná se o nejmocnější inhibitor kontaktní fáze, inhibuje faktor XIIa, XIa a kalikrein.
- *$\alpha_1$ -antitrypsin*: glykoprotein syntetizovaný v játrech. Inhibuje především faktor Xa a je i poměrně silným inhibitorem aktivovaného PC.

### 3 PATOFYZIOLOGIE OBĚHOVÉHO ÚSTROJÍ

Pro porozumění patofyziologickým procesům kardiovaskulární soustavy je důležitá nejen znalost příčin nemocí srdce a cév, ale i podíl účasti krevních elementů na těchto procesech. Krevní destičky jsou klíčovým elementem v těchto procesech a pro organismus jedním z nejdůležitějších induktorů hemostázy a tvorby trombu. Díky tomu patří k jejich biologické výbavě mechanismy a buněčné látky, zprostředkovávající změnu tvaru trombocytů, adhezi k různým povrchům, následnou schopnost agregace a uvolňovací reakce. Několik patofyziologických stavů (hyperkoagulabilita, hypokoaguabilita, trombocytopenie, trombocytóza aj.) je způsobeno poškozením či patologicky sníženou nebo zvýšenou aktivitou krevních destiček. Tyto poruchy dělíme na kvantitativní a kvalitativní.



**Obrázek 8.** Dělení poruch krevních destiček – upraveno dle Matýškové & Hrachovinové (1999)

Eukoagulabilita je ideální stav, kde se aktivátory a inhibitory hemokoagulace nacházejí v rovnováze. Pokud dojde k poranění cévní stěny, a tudíž i k narušení rovnováhy, může dojít k hypokoagulabilitě (nežádoucí krvácivost), naproti tomu bez poranění stěny, dochází ke vzniku krevní sraženiny uvnitř cévy (trombóza) nebo arterie, která zabraňuje průtoku krve (hyperkoagulabilita).

V České republice je úmrtnost na kardiovaskulární choroby jednou z nejvyšších na světě a přibližuje se k 53 % všech úmrtí. Ve světě je úmrtnost celkově na kardiovaskulární choroby kolem 40–50 %, přičemž ateroskleróza věnčitých tepen patří mezi nejčastější příčiny smrti (asi 20–25 %).

Mezi faktory zvyšující riziko onemocnění patří hypertenze, kouření, diabetes mellitus, hyperlipidémie a zvýšená hladina cholesterolu (> 6,2 mmol/l). Prevencí těchto stavů je antiagregační léčba, omezující aktivační schopnost krevních destiček (Matýšková & Hrachovinová, 1999; Nosál & Jančicová, 1990; Povýšil & Šteiner, c2007).

## 3.1 Konzervativní léčba

Jako první je zkoušena konzervativní (neoperativní) léčba. Bývá použita na počátku choroby, nebo když je operace příliš riskantní. Dle jejího průběhu se poté volí invazivnost a průběh potřebné operace.

### 3.1.1 Antiagregační léčba

Antiagregační léčba se používá jako nejzákladnější léčba při změnách hemostázy. Slouží k léčení pacientu při kardiovaskulárních poruchách, především ischemické nemoci srdeční. Pro upravení rovnováhy mezi prokoagulačními a antikoagulačními reakcemi se používají antitrombotika, mezi které dle Hynie (2001) řadíme:

- *Antikoagulancia*: snižující srážlivost krve ovlivněním syntézy a působením koagulačních faktorů.
- *Protideštičkové látky*: zabraňují vytvoření hemostatické látky – slouží jako inhibitory činnosti krevních destiček.

Agregace trombocytů je za určitých patologických podmínek nežádoucí. Je zvyšována rizikovými faktory, jako je tromboxan A<sub>2</sub> vytvářený krevními destičkami a naopak ji snižujeme pomocí prostacyklinu vznikajícího v cévním endotelu a komerčních léků. Protideštičkové léky svým vlivem zmenšují riziko arteriální trombózy, ale jsou také zodpovědné za zvýšení nebezpečí krvácení při předávkování – díky tomu je omezena antiagregační léčba na shlukovací schopnosti destiček (Lüllmann et al., 2009).

## 3.2 Invazivní léčba

Pokud není léčba dostatečně efektivní nebo nebyla včas nasazena je potřeba přejít k invazivním metodám v řešení akutního trombotického uzávěru.

### 3.2.1 Kardiochirurgické řešení

Většina operací srdce probíhá s použitím přístroje pro mimotělní oběh, který vedle dočasné náhrady srdce a plic slouží také jako autotransfuzní přístroj. Jednou z nejpoužívanějších metod je koronární bypass, neboli přemostění zúženého nebo uzavřeného úseku tepny za účelem obnovení perfuze tkáně pro srdeční sval a snížit tak riziko náhlého úmrtí (infarkt myokardu), které je jednou z nejzávažnějších komplikací.

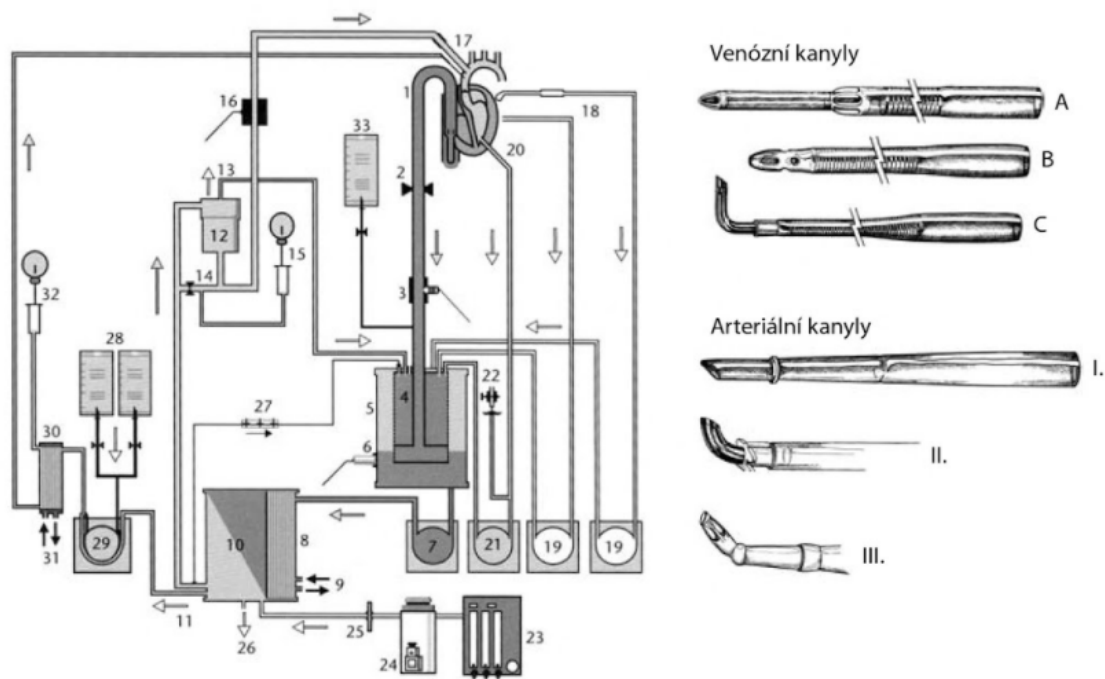
K vytvoření bypassu se používají tepenné a žilní štěpy, které se získávají odběrem žíly dolní končetiny, levé prsní nebo vřetenní tepny. Vlastní operace probíhá především s nezbytným použitím mimotělního oběhu (Wagner, 2009).

### 3.2.2 Mimetělní oběh

Primární funkcí přístroje pro mimotělní oběh (MTO) je dočasné odklonění cirkulace krve od srdce a plic, aby chirurg mohl pracovat v bezkrevném operačním poli. Srdce je zde nahrazeno mechanickou pumpou a plíce oxygenátorem (Obr. 9). Přístroj pro MTO slouží také jako autotransfuzní zařízení, protože je veškerá krev z operačního pole nasávána zpět, filtrována a přidávána k hlavnímu venóznímu návratu.

Standardní srdeční operace se odvíjí ve třech fázích: příprava napojení na MTO, fáze MTO s vlastním výkonem na srdci a poslední část s postupným uzávěrem hrudníku. Během operace je pacientovi podán heparin kvůli zamezení vzniku trombózy a zajištění hypokoagulace. Poté je nutné na konci operace neutralizace heparinizace podáním protaminu, který často vyvolává hypotenzi. Po zastavení mimotělního oběhu je prvořadým úkolem zajištění hemostázy

Součástí hlavního okruhu MTO je odvod venózní krve z horní a dolní duté žíly či pravé síně do venózního rezervoáru. Odtud krev odtéká do mechanické pumpy, oxygenátoru a jako okysličená krev se vrací do ascendentní aorty. Mimo hlavního okruhu jsou součástí MTO i další komponenty (venózní klapka, sací systémy aj.). Krev stékající do operačního pole může být také zpracována či rekuperována pomocí koncentrátoru či centrifugy (Cell Saver) než se vrátí do MTO.



**Obrázek 9.** Schéma typického okruhu pro mimotělní oběh – převzato od Wagner (2009)

Vysvětlivky: 1. venózní linka, 2. svorka venózní linky, 3. čidlo venózní kyslíkové saturace, 4. kardiopulmonální filtr, 5. venózní rezervoár, 6. hladinový detektor, 7. hlavní krevní pumpa, 8. Výměník tepla, 9. vstup a výstup pro spojení s generátorem tepla, 10. membránový oxygenátor, 11. výstupy okysličené krve, 12. arteriální filtr, 13. linka pro odvzdušnění, 14. zkrat arteriálního filtru se svorkou, 15. monitorovací tlaková linka, 16. arteriální detektor bublinek, 17. arteriální kanyla, 18. sací linky z operačního pole, 19. sací pumpy, 20. vent pro levé srdce, 21. pumpa ventu, 22. kontrola sání z ventu, 23. zdroj plynů a průtokové regulátory, 24. odpařovač inhalačního anestetika, 25. filtr plynů, 26. výstup plynů z oxygenátoru, 27. odbočka k odběru krevních vzorků a podání léků, 28. kardioplegické roztoky, 29. pumpa kardioplegie, 30. výměník tepla kardioplegie, 31. vstup a výstup pro spojení s generátorem tepla, 32. monitor tlaku kardioplegie, 33. vstup pro infuzi a transfuzi. Venózní kanyly: A. dvoustupňová, B. kavální, C. zahnutá pediatrická venózní kanyla. Arteriální kanyly: I. femorální, II. aortální, III. aortální – difuzní typ.

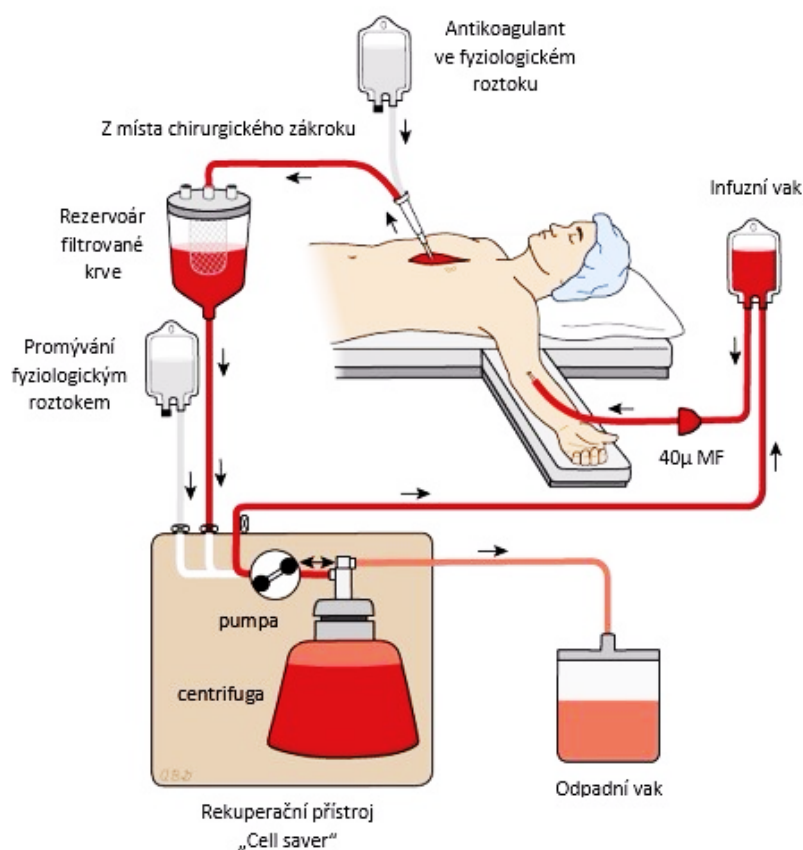
Před napojením pacienta na mimotělní oběh se ve většině případů provádí odběr 800 ml krve (z důvodu eliminace krevních ztrát) a náhrada ztraceného objemu pomocí krystaloidních či koloidních roztoků. Takto odebraná krev se na konci operace využívá jako autotransfuze, jelikož během MTO dochází ke zvýšené ztrátě trombocytů v krevním oběhu. Pro ještě menší ztráty během operace se používá přístroj „Cell Saver“, který shromažďuje, obohacuje a filtruje krev z operačního pole (Wagner, 2009; Qin et al., 2016).



### 3.2.3 Cell Saver

Rekuperací přístroj *Cell Saver* se využívá během operací, při kterých by se krev za jiných okolností stávala odpadem. Slouží k shromažďování krve z operačního pole, kterou posléze obohacuje antikoagulační přísadou a filtruje. Po naplnění zásobníku je krev pumpou přečerpána do centrifugy, kde se odstředuje a posléze promývá fyziologickým roztokem. Získaná suspenze erytrocytů má hodnotu hematokritu 0,45 s příměsí leukocytů a trombocytů. Je nutné aby retransfuze do těla pacienta proběhla nejpozději do 6 hodin od započetí operace (Qin et al., 2016).

- *Výhody rekuperace:* žádné riziko infekcí přenášených krví a transfuzní reakce.
  - Vyloučení chyb AB0 krevní kompatibility.
  - Rychlý návrat ztraceného objemu krve.
  - Vysoká koncentrace erytrocytárního koncentrátu.
- *Nevýhody rekuperace:* finanční náklady jednorázových pomůcek.
  - Časová prodleva v akutních případech masivního krvácení.



Obrázek 10. Schéma operace při použití přístroje *Cell Saver* – upraveno dle [www.caseoftheday.cz](http://www.caseoftheday.cz)

## 4 STATISTICKÉ HODNOCENÍ

Při vyhodnocení souborů naměřených hodnot byly použity neparametrické statistické metody, přesněji Mann–Whitney U test.

Neparametrické testy se používají při porovnání souborů statistických dat, u nichž nelze předpokládat normální rozdělení pravděpodobnosti sledovaného znaku. Testují nulovou hypotézu, která se týká pouze obecných vlastností rozdělení sledované veličiny ve statistických souborech (shodu tvaru křivky, rozdělení v porovnávaných souborech dat). Obvykle bývají použity k orientačnímu hodnocení.

Mann–Whitneyův test se používá při hodnocení nepárových pokusů, tedy když porovnáváme dvě různé výběrové skupiny ( $A$ ,  $B$ ). Dochází k testování hypotézy, že veličina  $X$ , odpovídající skupině „ $A$ “ a veličina  $Y$  odpovídající skupině „ $B$ “ mají totéž rozdělení pravděpodobnosti. Přitom veličiny  $X$  a  $Y$  nemusí odpovídat Gaussovu normálnímu rozdělení, kdy náhodná veličina  $X$  má v celém základním souboru normální rozdělení závislé na parametru střední hodnoty a směrodatné odchylky charakterizující variabilitu náhodné veličiny  $X$  (Bedáňová & Večerek, 2007).

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 Chemikálie

- *Adenosindifosfát* – ADP (HYPHEN BioMed: Neuville-sur-Oise, Francie; konečná koncentrace 200  $\mu$ M)
- *Epinefrin* – EPI (HYPHEN BioMed: Neuville-sur-Oise, Francie; konečná koncentrace 1 mM)
- Fyziologický roztok (0,9% NaCl)
- *Kolagen* – KOL (HYPHEN biomed, Neuville-sur-Oise, Francie; konečná koncentrace 10  $\mu$ g/ml)
- *Ristocetin* – RISTO (Helena Biosciences Europe: Gateshead, Velká Británie; konečná koncentrace 1,5 mg/ml)

### 5.2 Materiál a přístrojová technika

- Agregometr Apact 4004 (LABiTec, Ahrensburg, Německo)
- Vakuové zkumavky (3,8% citrát sodný, Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)
- Jednorázové mikrokyvety (LABiTec, Ahrensburg, Německo)
- Pipety (Eppendorf AG, Hamburk, Německo)
- Plazmaexpresor (Trigon-plus: Říčany u Prahy, Česká republika, vysokorychlostní rotor – AB 50.10A)

## 5.3 Použité metody

### 5.3.1 Odběr krve

Odběr krve může někdy výrazně zkreslit výsledek vyšetření, proto je snaha zajistit určité standardní odběrové podmínky, které do jisté míry zaručí objektivitu vlastního odběru. Patří zde faktory preanalytické, analytické a postanalytické.

Preanalytické faktory jsou velmi obtížně laboratoří ovlivnitelné. Jsou však velmi závažné a nedodržení správných podmínek pro vyšetření má za následek nehodnotitelné výsledky. Mezi tyto faktory patří:

- *Odběr*: musí být proveden co nejšetrněji (pro omezení uvolnění aktivačních látek) do umělohmotných nebo silikonovaných skleněných zkumavek.
  - Pro většinu vyšetření se odebírá nesrážlivá krev – odběr krve do 0,0109 M citrátu sodného v poměru 1 díl citrátu na 9 dílů krve. Poměr chelatujících činidel musí být v plazmě konstantní.
  - Po odběru je nutné okamžité a šetrné promíchání krve ve zkumavce s citrátem a zajištění neprodleného transportu vzorku do laboratoře.
- *Zpracování vzorku*: u většiny testů je nutné zpracování do 2 hodin od odběru, jinak se výsledek považuje za nehodnotitelný.
  - Zpracováním se rozumí odstranění krevních buněk, které interferují ve většině koagulačních testů, centrifugace krve 10 minut při 150–250 g pro získání plazmy bohaté na krevní destičky (PRP) nebo 10–15 minut při 2 500 g pro získání plazmy chudé na krevní destičky (PPP). Následně stažení plazmy do umělohmotných zkumavek bez tknutí krvinek.
- *Skladování plazmy*: obvykle při 18–22 °C do provedení vlastní analýzy.

Mezi analytické faktory ovlivňující vlastní provedení stanovení patří:

- *Dodržování metodických postupů*: je nutné, aby měla laboratoř podrobně vypracované standardní operační postupy pro přípravu diagnostických setů a reagensů, provedení testu, nastavení přístrojů aj.
- *Správné pracovní návyky*: individuální přístup každého pracovníka může ovlivnit správnost stanovení.
- *Zabezpečení správné funkce a kalibrace přístrojů*: je nutné se řídit pokyny výrobce přístroje a jejich pravidelná údržba.
- *Výběr diagnostických setů a reagensů*: důraz kladen na kvalitu a vhodnost použití reagensů pro danou metodiku a rovněž pro daný typ přístroje.

- *Volba kalibračních a kontrolních materiálů:* důležitá je kvalita ale i vhodné kombinace s používanými diagnostickými sety.

Postanalytické faktory ovlivňují výsledky až po samotné analýze. Patří sem rozmezí fyziologických hodnot a vyjadřování výsledků, které je možné několika různými způsoby. (Matýšková & Hrachovinová, 1999; Pecka & Bláha, 2010).

### 5.3.2 Laboratorní stanovení

Obecně dělíme diagnostické laboratorní metody podle principu stanovení na:

- *Koagulační:* základem je stanovení času potřebného k vytvoření fibrinového vlákna, měřeného od přidání startovací reagensie k testovanému vzorku.
- *Nefelometrické a turbidimetrické:* jedná se o fotooptické metody vyšetřující zákal testovacího systému, ke kterému dochází například při tvorbě koagula či agregátů krevních destiček.
  - U turbidimetrických metod zjišťujeme změnu průchodnosti světla testovacím systémem.
  - U nefelometrických metod naopak určujeme intenzitu rozptýleného záření ve směru kolmém na dopadající paprsek.
- *Fotometrické:* základem je stanovení intenzity zabarvení (absorbance), ke kterému dochází v důsledku štěpení specifického homogenního substrátu. Měření se provádí na spektrofotometrech při vlnové délce 405 nm, pokud se jako substrát použije paranitroanilin.
- *Imunologické:* metody jsou založené na reakci antigenu s protilátkou, která je nějakým způsobem zviditelněná (Matýšková & Hrachovinová, 1999; Pecka & Bláha, 2010).

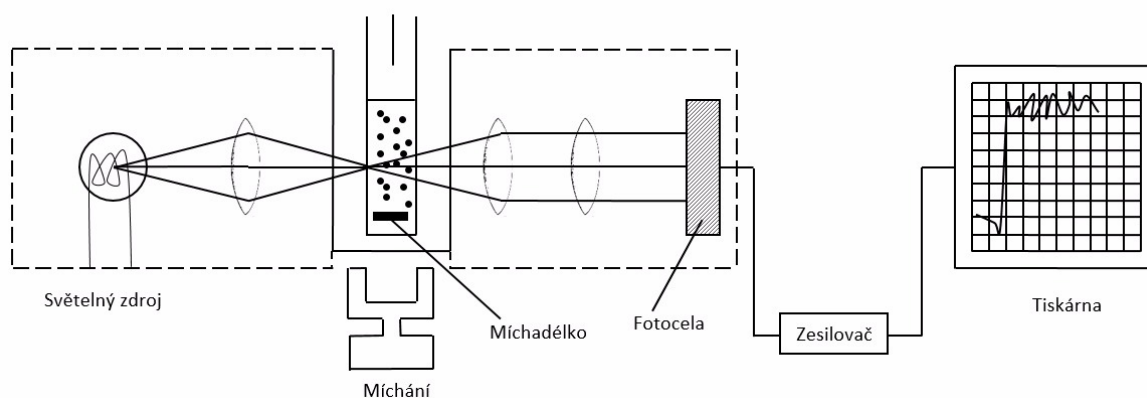
Při mé práci jsem využívala měření agregometrie, která využívá turbidimetrických metod vyšetřujících zákal systému.

### 5.3.3 Agregometrie

Schopnost agregace krevních destiček byla v mé práci sledována pomocí přístroje Apact 4004 (obrázek 11), který se řadí mezi optické agregometry, sledující změnu optické hustoty během agregačního děje. V optických agregometrech je využívána plazma bohatá na krevní destičky čímž se liší od impedančních přístrojů, které pracují s nesrážlivou plnou krví.



Obrázek 11. Agregometr Apect 4004 – převzato z [www.labitec.de](http://www.labitec.de)



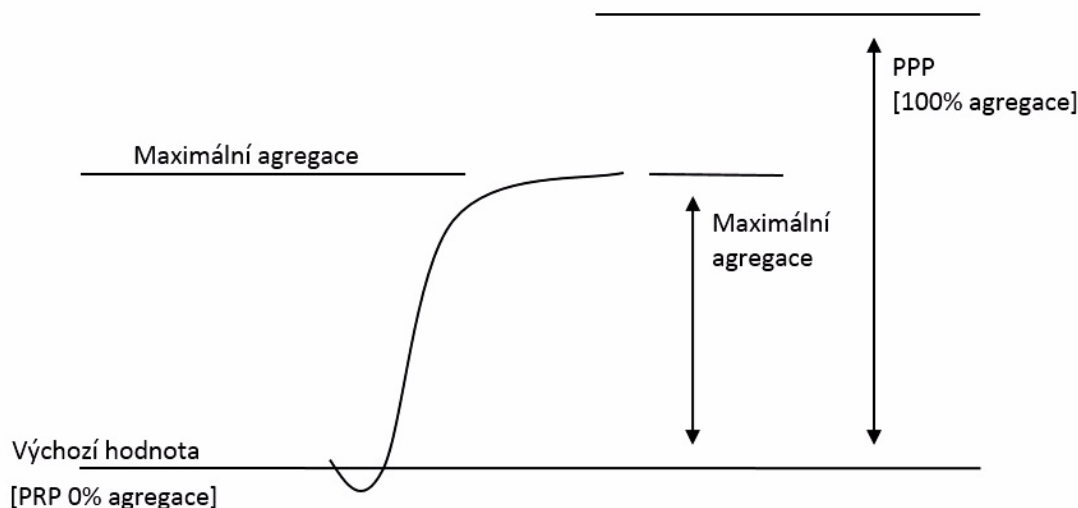
Obrázek 12. Schéma agregometru Apect 4004 - převzato a upraveno dle Pecka et al. (2010)

Agregometry bývají napojeny na záznamový přístroj, na kterém se vyhotoví záznam agregačního děje tzv. agregační křivka (obrázek 13).

Z agregační křivky je pozorovatelná:

- *Maximální amplituda ( $A_{max}$ ):* reprezentující maximální možnou agregační odpověď na daný podnět. Vyjadřuje se v procentech rozdílu propustnosti světla ( $T - transmise$ ) PRP-PPP.
- *Dezagregace ( $D$ ):* procentuální podíl  $A_{max}$  v 6. minutě po přidání induktoru (rychlost agregace, strmost agregační křivky).
- *Doba latence agregační křivky ( $t_{lat}$ ):* hodnota zobrazuje čas od přidání induktoru do doby, při které dochází ke změně transmise světla (kolagen).

Přístroj Apect 4004 pracuje se vzorky citrátové PRP plazmy, které jsou míchány v kyvetoru agregometru (1 000 ot/min) při konstantní teplotě  $37,4 \pm 0,3$  °C. Měření probíhá při vlnové délce 740 nm pomocí čtyř zabudovaných fotometrů (Matýšková & Hrachovinová, 1999; Pecka & Bláha, 2010).



**Obrázek 13.** Průběh agregační křivky- převzato a upraveno dle <http://www.practical-haemostasis.com>

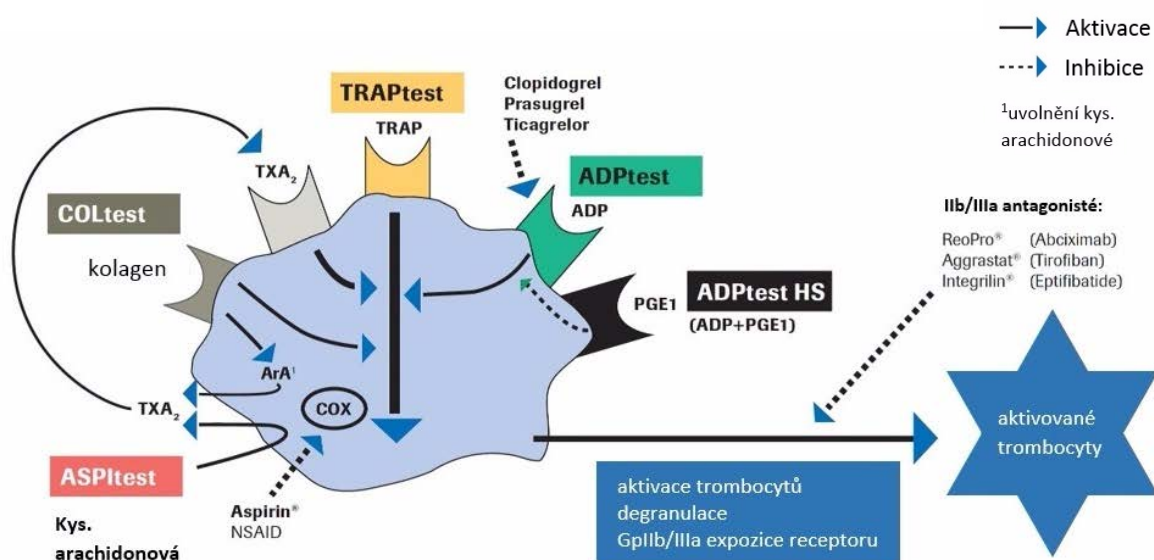
Pro vlastní stanovení byla odebraná krev stočena při 900 rpm po dobu 10 minut pro vytvoření rozhraní mezi plazmou a zbytkem krve. Poté byla pomocí automatické pipety přenesena plazma bohatá na krevní destičky do jednorázových kyvet umístěných v agregometru Apact 4004, kde byly po celou dobu měření zahřívány na 37 °C. Dalším krokem bylo přikrytí mikrokyvet plastovým krytem, aby bylo možné nastavení pozadí přístroje. Následně bylo přidáno 20 µl daného inhibitoru (ADP, EPI, KOL, RISTO) a spuštěna analýza probíhající 600 sekund. Tento postup měření byl u *kontrolní skupiny* prováděn před započítáním operace a na jejím konci, u *porovnávané skupiny* bylo měření provedeno před operací, po ukončení operace a po navrácení trombocytů z přístroje Cell Saver. Jako výsledek měření vypočítal agregometr maximální absorbanci v čase, která byla následně porovnávána mezi jednotlivými pacienty.

### 5.3.4 Testy agregometrie

Při antiagregační terapii se vybírá jeden ze skupiny možných testů, které komplexně pokrývají možné poruchy destičkových receptorů a účinek léčiv. Pro naše měření byly použity následující testy mající různou specifitu účinku na receptory krevních destiček:

- *ASPItest*: k aktivaci trombocytů skrze receptory dochází pomocí přidání kyseliny arachidonové. Samotná AA není agonistou pro krevní destičku, ale substrátem cyklooxygenázy (COX), přeměňující tromboxan A<sub>2</sub> na TXA<sub>2</sub> jehož tvorba způsobuje inhibici. Tento test je nejčastěji používán pro pacienty léčené aspirinem, jelikož blokuje COX a tím snižuje agregaci.

- **ADPtest:** adenosindifosfát patří mezi hlavní aktivátory trombocytů díky přímé reakci s jedním z receptorů. Ticlopidin, Clopidogrel, Prasugrel a Cangrelor blokuji ADP receptor a tím inhibují agregaci trombocytů. Je taktéž používán u pacientů léčených aspirinem, přičemž dochází k většímu poklesu agregace než u předchozího testu.
- **EPItest:** epinefrin (adrenalin) sám o sobě vyvolává agregaci, když je podáván v dávkách výrazně překračujících jeho fyziologickou koncentraci. Adrenalin působí přes  $\alpha_2$ -adrenergní receptor prostřednictvím G-proteinu. Po navázání na membránový receptor trombocytů dochází k odkrytí vazebného místa pro GPIIb/IIIa pro vazbu s fibrinogenem.
- **RISTOtest:** při tomto testu je využívána antimikrobiální látka – ristocetin, který tvoří komplex s VWF. Dochází ke změnám konformace s následnou agregací a aktivací trombocytů. Snížení agregace vzniká buď nepřítomností specifických GPIb receptorů, nebo při nepřítomnosti VWF. Při použití aspirinu se vzniklý komplex s VWF inhibuje (Larson, 1988; Pecka, 2004; Koltai et al., 2017).
- **KOLtest:** Kolagen destičky aktivuje pouze ve své polymerní formě za současné přítomnosti ADP. Prvně dochází k adhezi destiček ke kolagenovým vláknům, k čemuž přispívá interakce pozitivního náboje KOL s negativně nabitým povrchem destiček. Po obsazení příslušných receptorů se vyvolá agregační signál (Fauvel et al., 1978).



Obrázek 14. Mechanismus testů agregačního analyzátoru – převzato a upraveno z [www.narkosguide.se](http://www.narkosguide.se)

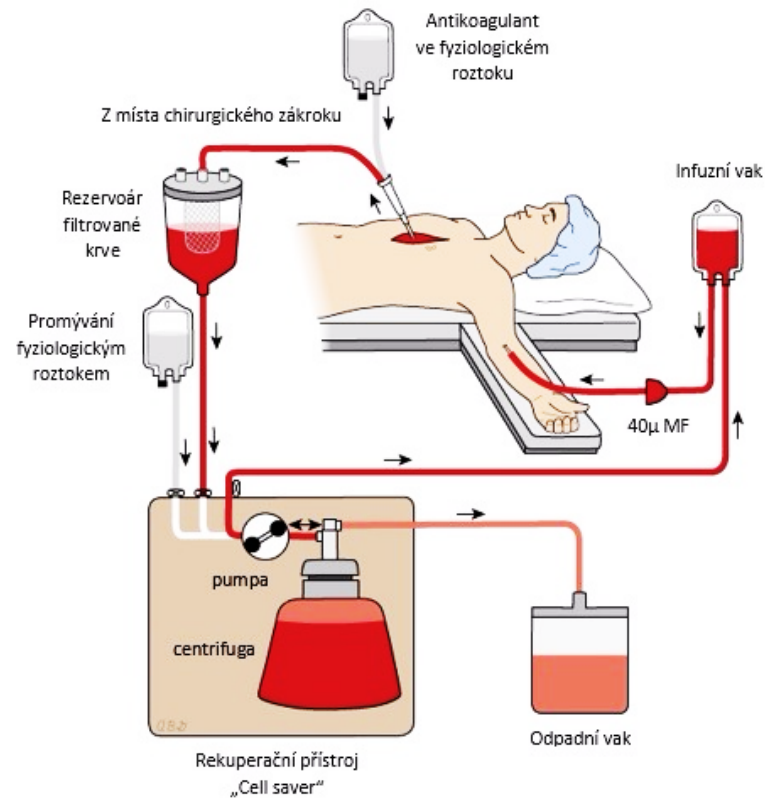


## VÝSLEDKY

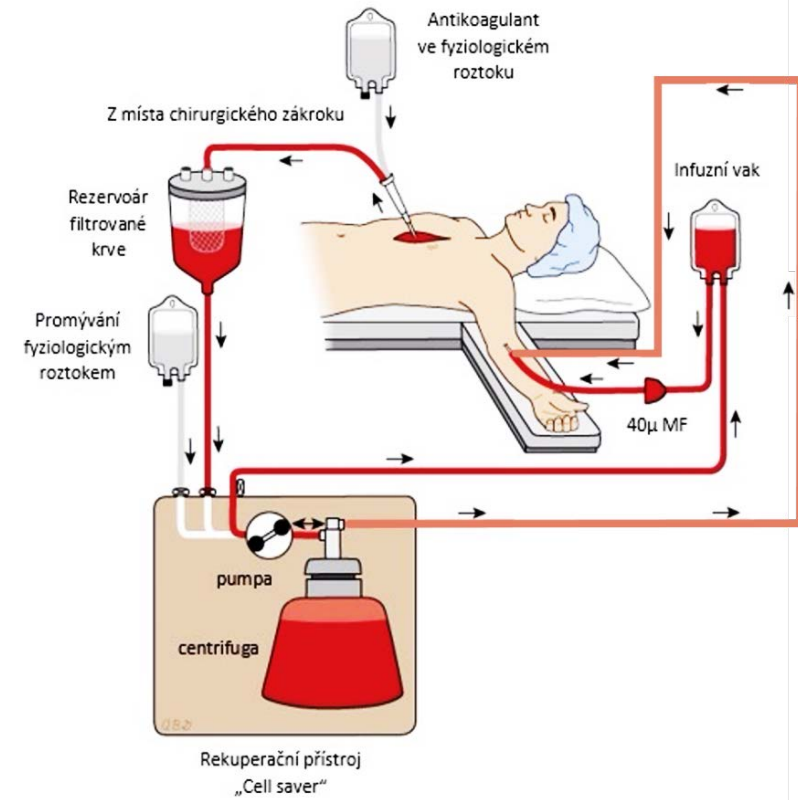
V této kapitole je porovnáván soubor pacientů obsahující údaje o předoperační medikaci, parametrech mimotělního oběhu, transfuzní terapii, charakteristice pacientů, výskyt klinických komplikací a hodnot aktivity krevních destiček v různých fázích operace. Rozlišujeme zde kontrolní skupinu a skupinu pacientů, kdy obě skupiny prodělaly stejné kardiochirurgické zákroky s použitím mimotělního oběhu a rekuperačního přístroje Cell saver ale s rozdílem kroku na konci operace. Před zahájením výkonu, bylo pacientů majícím hodnotu hematokritu nad 0,35 odebráno 800 ml krve. Po ukončení operace nedošlo k navrácení odebrané krve kontrolní skupině, jelikož se krev stala odpadním materiálem (obrázek 16). Agregace u kontroly byla měřena na začátku a konci chirurgického výkonu. U skupiny vyšetřovaných pacientů, byla odebraná krev po ukončení mimotělního oběhu vrácena zpět pacientovi, došlo k tzv. autotransfuzi (obrázek č. 15). Aktivita destiček byla u této skupiny měřena před zahájením operace, po jejím ukončení a nakonec po podání krve (trombocytů). Posledním krokem bylo porovnání a statistické vyhodnocení naměřených hodnot.

## 6 SOUBOR PACIENTŮ

### 6.1 Průběh operace



**Obrázek 16.** Průběh operace bez navracení krve z Cell saveru u kontrolní skupiny pacientů



**Obrázek 15.** Průběh operace s navracení krve z Cell saveru u vyšetřované skupiny pacientů

## 6.2 Vyšetřovaná skupina pacientů postupujících kardiochirurgický zákrok s použitím Cell Saveru

**Tabulka 1.** Údaje o vstupní medikaci pacientů, předoperačních vyšetřeních, antikoagulační medikace při operačním výkonu a její neutralizace a krevní ztráty během operačního výkonu a 24 hodin po něm

Pacient	ASA	CLOP/TIC	LMWH	ACTstart	ACTmax	ACTend	Heparin	Protamin	TT min	TT end	Ztráty OP	Ztráty24	P / K
LS	0	0	1	138	564	164	320	350	34,5	37	300	750	P
UJ	1	0	0	139	628	127	330	350	36	37	200	720	P
AE	0	0	1	134	634	124	320	350	33,6	37	500	450	P
KJ	0	0	0	135	789	135	380	400	32,7	36,9	500	530	P
SF	0	0	0	116	469	134	550	500	34,9	36,7	600	1340	P
NM	0	0	1	133	429	145	240	300	34,4	36,9	200	920	P
JV	0	0	1	118	397		460	500	34	36,6	300	1460	P
TJ	0	0	0	153	752	142	340	400	34,2	36	500	1280	P
DJ	0	0	1	181	514		320	350	34,7	36,9	1000	490	P
DA	0	0	1	115	685	108	440	450	34,6	36,9	800	210	P
VJ	1	0	0	140	708	133	420	480	27,7	37,1	800	320	P
JT	0	0	0	135	476	132	370	400	34,3	36,8	700	1130	P
MR	0	0	0	151	481		370	400	33,3	36,6	400	480	P
VZ	1	0	0	132	578	129	360	450	31,1	36,4	1500	820	P
BF	1	0	0	155	560	138	310	400	34,6	36,5	300	510	K
KE	0	0	1	139	437	122	360	400	33,3	36	500	280	K

Pacient	ASA	CLOP/TIC	LMWH	ACTstart	ACTmax	ACTend	Heparin	Protamin	TT min	TT end	Ztráty OP	Ztráty24	P / K
MT	0	0	1	129	474		430	450	33,3	37	200	580	K
NK	0	0	1	140	595	144	310	350	30,4	35,4	700	1520	K
SJ	0	0	0	127	457	112	360	400	34,8	36	1000	150	K
SD	1	0	0	126	456	117	320	350	30,8	36,9	500	230	K
BJ	1	1	0	121	500	147	330	350	34,5	36,9	600	510	K
OP	0	0	1	126	436	123	290	350	34,8	36,6	700	1390	K
DH	0	0	1	142	608		450	500	34,5	37	300	520	K
KL	1	1	1	120	472		330	350	34,4	37	500	670	K
CK	0	0	0	108	627	117	400	400	33,9	36,2	800	360	P
FL	0	1	0	135	433		390	450	33,8	37	500	830	P
PJ	1	0	0	155	620	113	390	400	34,3	36,9	700	520	P
GJ	0	0	0	117	527	131	340	350	33,6	36,4	1200	330	P
PP	0	0	0	130	677	109	500	500	33,6	36,9	300	530	P
FV	0	0	0	141	486	118	450	450	27	37	500	270	K
MJ	0	0	0	127	537		400	400	31,9	36	400	1490	P
JB	0	0	0	107	630	106	340	450	33,4	36,8	800	350	P

Vysvětlivky: ASA – kyselina acetylsalicylová (0 – NE, 1 – ANO), CLOPI/TICAGR – klopidogrel/ticagrelor (0 – NE, 1 – ANO), LMWH – nízkomolekulární heparin (1 – protidestičková medikace), ACTstar – aktivovaný srážecí čas [s] na začátku výkonu, ACTmax – maximální aktivovaný srážecí čas [s], ACTend – aktivovaný srážecí čas na konci výkonu [s], Heparin – celková dávka [UI], Protamin – celková dávka [mg], TTmin – nejnižší teplota tělesného jádra [°C], TTend – teplota tělesného jádra na konci výkonu [°C], Ztráty OP- peroperační krevní ztráty [ml], Ztráty24 – ztráty z drenů během prvních 24 h na JIP [ml], P/K – pacient či kontrola.

Tabulka 2. Přehled substituční léčby po operačním výkonu

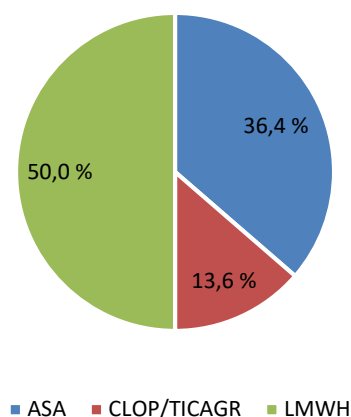
Pacient	EBR	FFP	TAD	FBG	OCPL	TXApoop	Revize	Euroscore	ICULOS	HLOS	Úmrtí	Výkon	Klinické pr.	P / K
LS	2	0	0	0	0	0	0	2,92	4	8	0	MVR,TVP		P
UJ	0	0	0	0	0	1	0	2,64	2	9	0	reACB		P
AE	0	0	0	0	0	0	0	5,41	4	8	0	MVP,ACB	PSY, FiS	P
KJ	2	1	0	0	0	0	0	5,87	5	13	0	MVP,TVP	FiS	P
SF	7	7	0	0	0	0	1	1,34	6	11	0	AA		P
NM	6	6	1	0	0	1	1	1,86	7	22	0	MVP,TVP	PSY, FiS	P
JV	5	4	0	0	0	1	1	2,34	5	18	0	MVP,TVP		P
TJ	0	0	0	0	0	0	0	1,16	3	12	0	AA	FiS, GIT	P
DJ	0	2	0	0	0	0	0	4,07	3	10	0	reAVR	FiS	P
DA	0	0	0	0	0	0	0	8,73	8	15	0	reAVR	PSY, FiS, GIT	P
VJ	1	0	0	0	0	0	0	3,25	3	7		AA		P
JT	1	2	0	0	1	0	0	1,44	4	18	0	AA	FiS	P
MR	0	0	0	0	0	0	0	1,63	4	9	0	AA		P
VZ	2	4	0	0	0	0	0	2,33	12	22	0	AA	FiS, GIT, RI	P
BF	2	0	0	0	0	0	0	5,54	3	9	0	reAVR		K
KE	2	2	0	0	0	0	0	2,14	3	18	0	MVR TVP		K

Pacient	EBR	FFP	TAD	FBG	OCPL	TXApoop	Revize	Euroscore	ICULOS	HLOS	Úmrtí	Výkon	Klinické pr.	P / K
MT	0	0	0	0	0	0	0	9,79	6	10	0	AA,ACB,DSS	CMP	K
NK	4	5	0	0	0	0	0	2,06	3	14	0	AA	FiS	K
SJ	3	0	0	0	0	0	0	4,12	4	17	0	AA	0	K
SD	2	2	0	0	0	0	0	2,77	4	11	0	AA,ACB	PSY, FiS	K
BJ	3	0	0	0	0	0	0	4,17	3	10	0	MVP,ACB	FiS	K
OV	5	4	0	0	2	1	1	2,64	4	19	0	MVR,TVP	0	K
DJ	4	1	0	0	0	0	0	2,74	39	54		MVR.ACB	PSY, RI	K
KL	4	2	0	0	0	0	0	3,00	4	9	0	MVP,ACB	0	K
CK	0	0	0	0	0	0	0	1,80	4	10	0	AA	0	P
FL	2	0	0	1	0	1	0	8,87	4	8	0	reAVR,AA	PSY, AKI	P
PJ	2	0	0	0	0	0	0	8,86	13	13	1	reAVR	FiS, GIT	P
GJ	0	0	0	0	0	0	0	2,13	3	8	0	AA	PSY, FiS	P
PP	2	3	0	0	0	0	0	1,07	3	10	0	AA	0	P
FV	0	3	0	0	0	0	0	1,81	3	20	0	AA	AIM	K
MJ	0	4	0	0	0	0	0	1,46	3	9	0	AA	FiS	P
JB	1	3	0	1	1	0	1	1,26	3	12	0	AA	0	P

Vysvětlivky: EBR – erytrocytární koncentrát [počet jednotek], FFB – čerstvě zmražená plazma [počet jednotek], TAD – trombocytární koncentrát [počet jednotek], FBG – koncentrát fibrinogenu [á 1g], Ocxplex – koncentrát protrombinového komplexu [á 500 UI], TXApoop – dodatečná dávka kyseliny tranexamové [30 mg/kg], Revize – pro krvácení či časnou tamponádu do 48 hodin (0 – NE, 1 – ANO), Euroscore – logistická hodnota udávající pravděpodobnost časného hospitalizačního úmrtí [%], ICULOS – délka pobytu na JIP [dny], HLOS – délka hospitalizace [dny], Úmrtí – do 30. dne (0 – NE, 1 – ANO), ACB – aortokoronární bypass, AVR – náhrada aortální chlopně, MVR – náhrada mitrální chlopně, TVP – plastika trikuspidální chlopně, MVP – plastika mitrální chlopně, AA – náhrada ascendentní aorty ( re- – reoperace), CMP – cévní mozková příhoda, PSY – organický psychosyndrom, AIM – akutní ischemie myokardu, AKI – akutní selhání ledvin, FiS – pooperační fibrilace síní, GIT – gastrointestinální komplikace, RI – respirační insuficience

Jedna jednotka = 450 ml

## 6.2.1 Údaje o předoperační medikaci

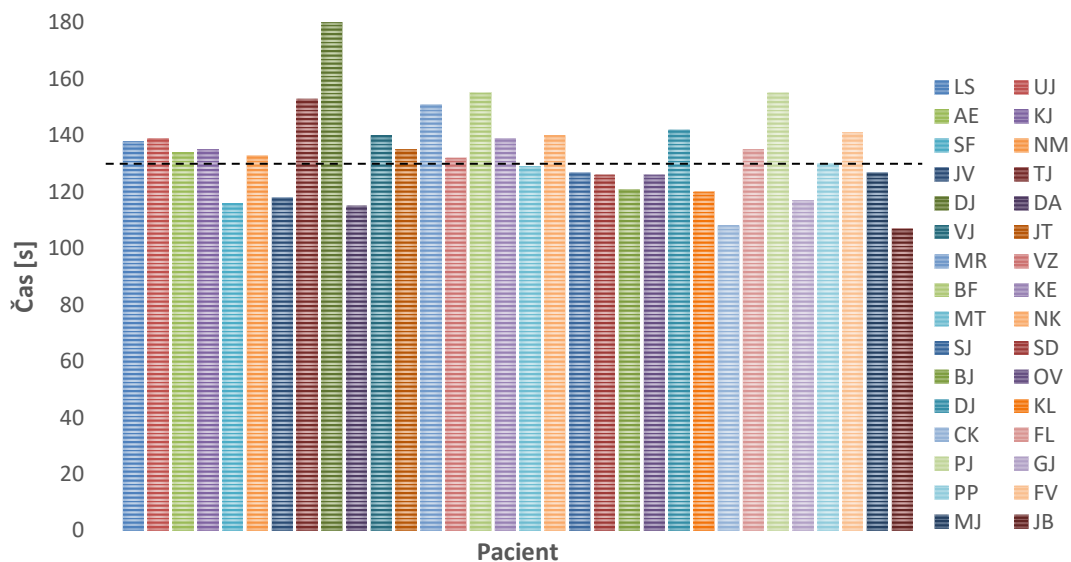


Obrázek 17. Procentuální zastoupení preoperační medikace souboru pacientů

Před zahájením kardiochirurgického výkonu mají nasazenou vstupní medikaci ovlivňující aktivitu krevních destiček, která zahrnuje:

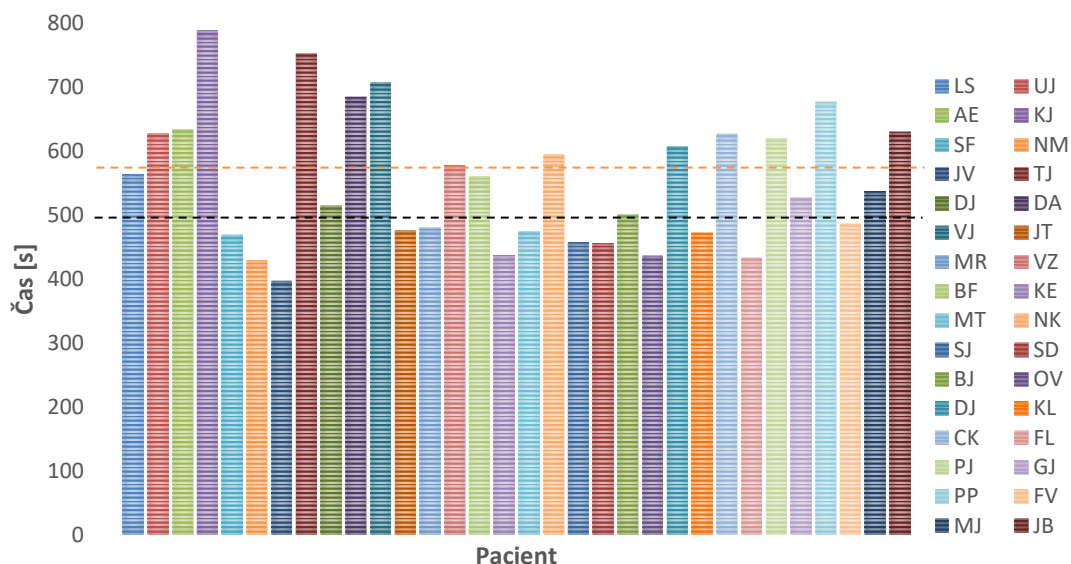
1. Podání kyseliny acetylsalicylové (v 50 %), inhibující aktivitu kolagenu
2. Podání klopidogretu/ticagreloru (v 13,6 %), inhibující aktivitu ADP
3. Podání nízkomolekulárního heparinu

## 6.2.2 Parametry mimotělního oběhu



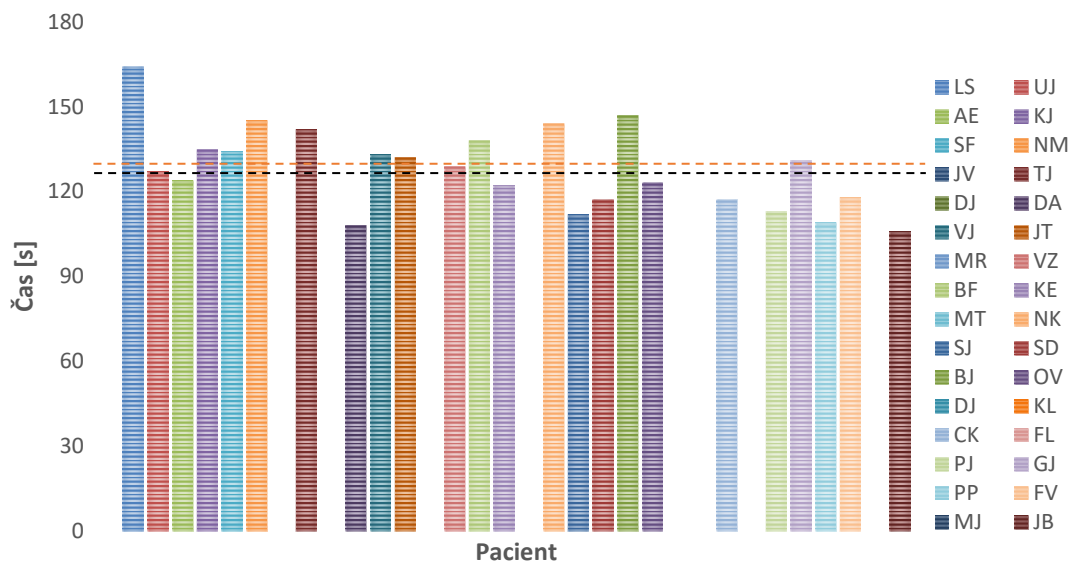
Obrázek 18. Počáteční srážecí čas (ACTstart), aktivovaný kaolinem, udávaných v sekundách na jednotlivé pacienty ze souboru

Po zahájení operace je nutné pacienta připojit na mimotělní oběh, který dočasně nahrazuje funkci srdce a plic. Mezi parametry MTO patří aktivovaný srážecí čas měřený po zahájení výkonu. Průměrná hodnota ACTstart u kontrolní skupiny i skupiny pacientů byla 133,3 s.



**Obrázek 19.** Maximální aktivovaný čas ( $ACT_{max}$ ) udaný v sekundách na jednotlivé pacienty ze souboru

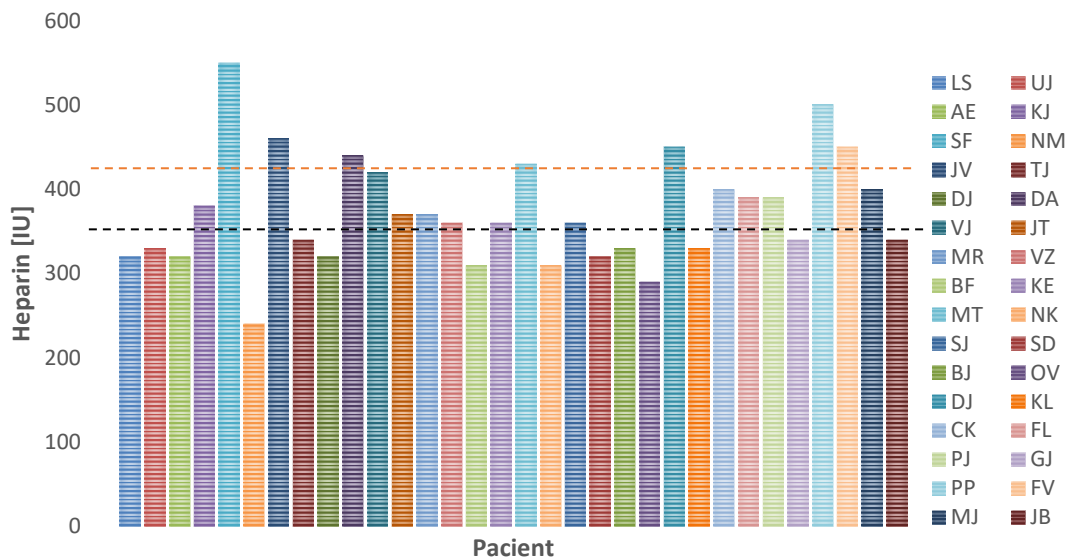
Dalším parametrem MTO je maximální aktivovaný srážecí čas, jehož průměrná hodnota byla u kontrolní skupiny 498,3 s (černá čerchovaná čára), a skupiny pacientů byla 578,8 s (oranžová čerchovaná čára).



**Obrázek 20.** Hodnota aktivovaného srážecího času ( $ACT_{end}$ ) v sekundách na konci operačního výkon

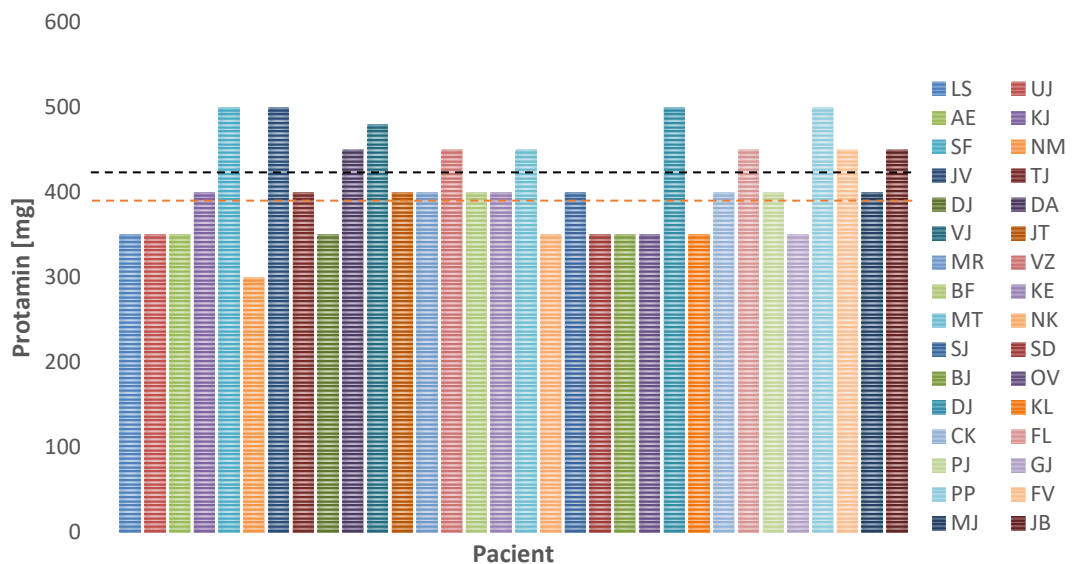
Posledním parametrem MTO je aktivovaný srážecí čas měřený na konci výkonu. Průměrná hodnota  $ACT_{end}$  je u kontrolní skupiny 127,6 s (černě čerchovaná čára), a u skupiny pacientů 128,1 s (oranžově čerchovaná čára).





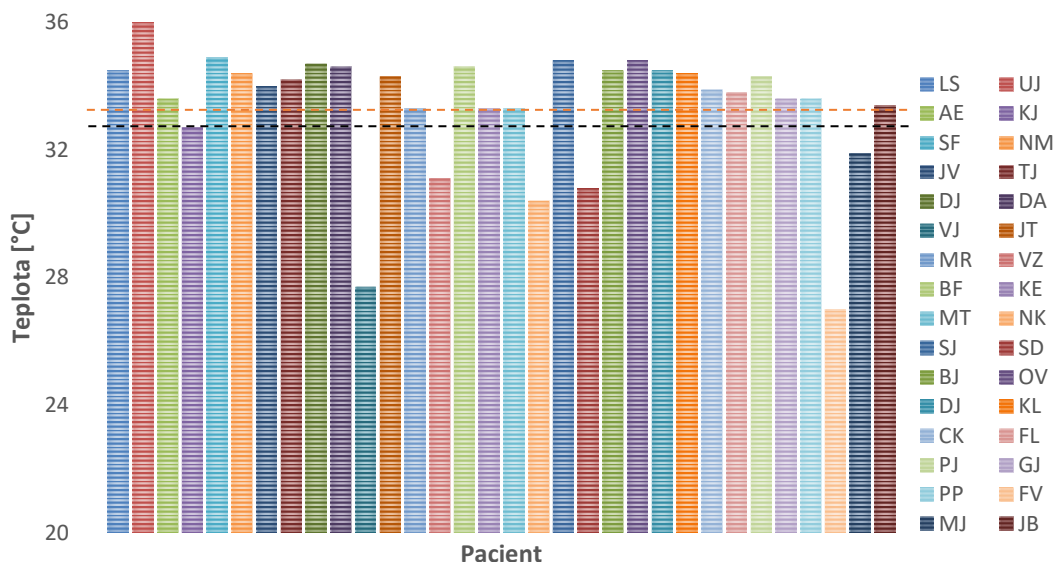
**Obrázek 21.** Celková dávka heparinu během mimotělního oběhu i jednotlivých pacientů v IU

Během MTO je pacientovi podávána antikoagulační medikace mezi kterou patří heparin udávaný v mezinárodních jednotkách. U kontrolní skupiny bylo průměrně podáno 358 IU (černě čerchovaná čára), u skupiny pacientů poté 410 IU (oranžově čerchovaná čára).



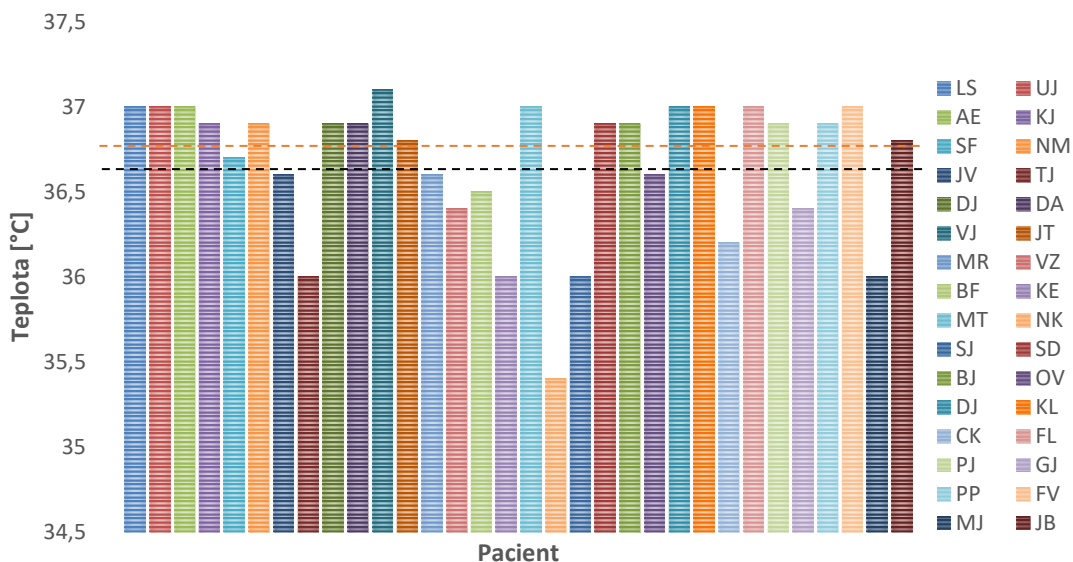
**Obrázek 22.** Dávka protaminu v mg u jednotlivých pacientů během mimotělního oběhu

Průměrná hodnota podána kontrolní skupině 411 mg (černě čerchovaná čára) a u skupiny pacientů 395,5 mg (oranžově čerchovaná čára).



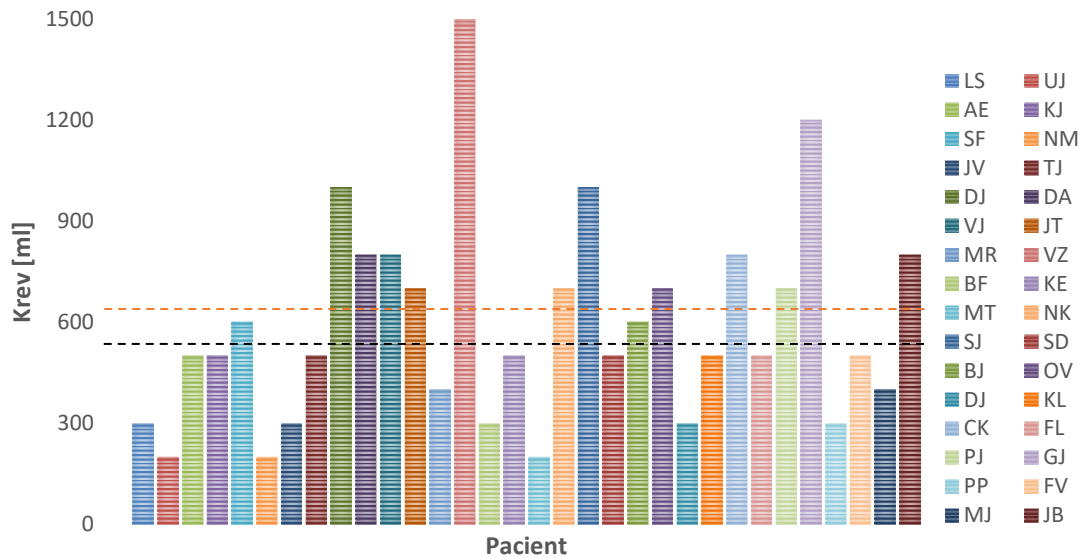
**Obrázek 23.** Nejnižší teplota ( $TT_{min}$ ) tělesného jádra (měřená jícnovým teploměrem) během operace, udávaná v stupních Celsia

Během celé operace je měřena teplota tělesného jádra pomocí jícnového teploměru. Důraz je kladen na nejnižší hodnotu, která u kontrolní skupiny byla průměrně 32,9 °C (černě čerchovaná čára), a u skupiny pacientů 33,5 °C (oranžově čerchovaná čára).



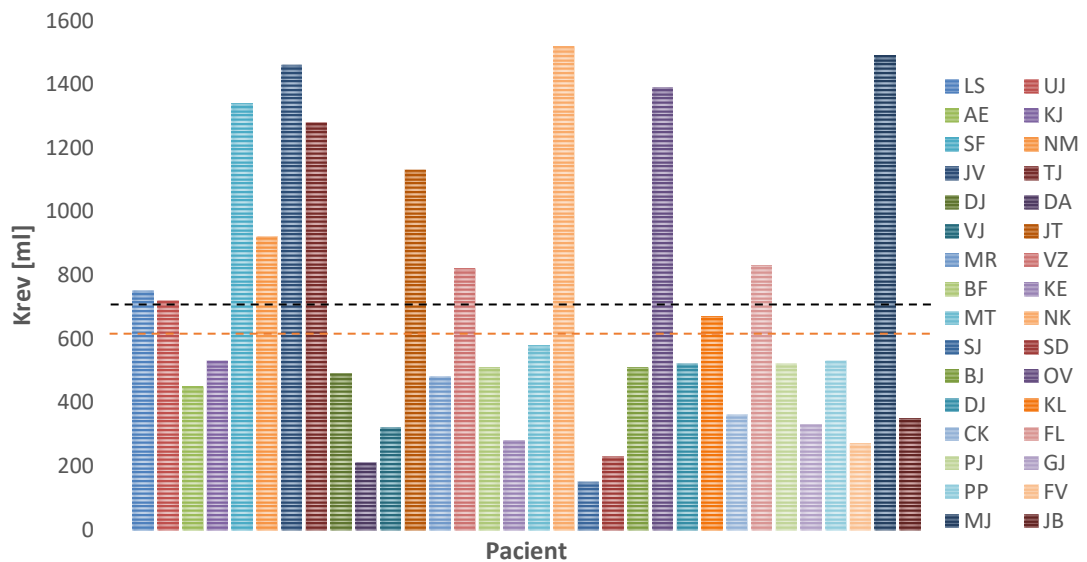
**Obrázek 24.** Teplota ( $TT_{end}$ ) tělesného jádra (měřená jícnovým teploměrem) po výkonu, udávaná v stupních Celsia,

Také je měřena teplota na konci kardiouchirurgického výkonu. U kontrolní skupiny byla průměrná hodnota rovna 36,6 °C (černě čerchovaná čára) a u skupiny pacientů 36,7 °C (oranžově čerchovaná čára).



**Obrázek 25.** Peroperační krevní ztráty (Ztráty OP) u jednotlivých pacientů, udávané v ml

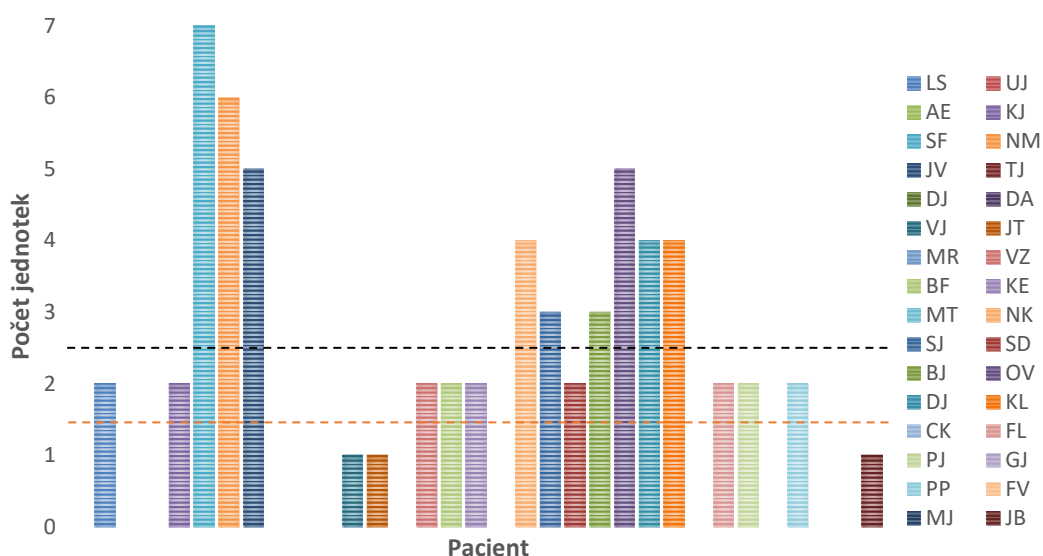
Peroperační krevní ztráty, jsou ztráty krve během kardiochirurgického výkonu. U kontrolní skupiny byly průměrné ztráty 572 ml (černě čerchovaná čára), u skupiny pacientů 619 ml (oranžově čerchovaná čára).



**Obrázek 26.** Krevní ztráty z drenů (Ztráty 24) na oddělení JIP během prvních 24 hodin v ml

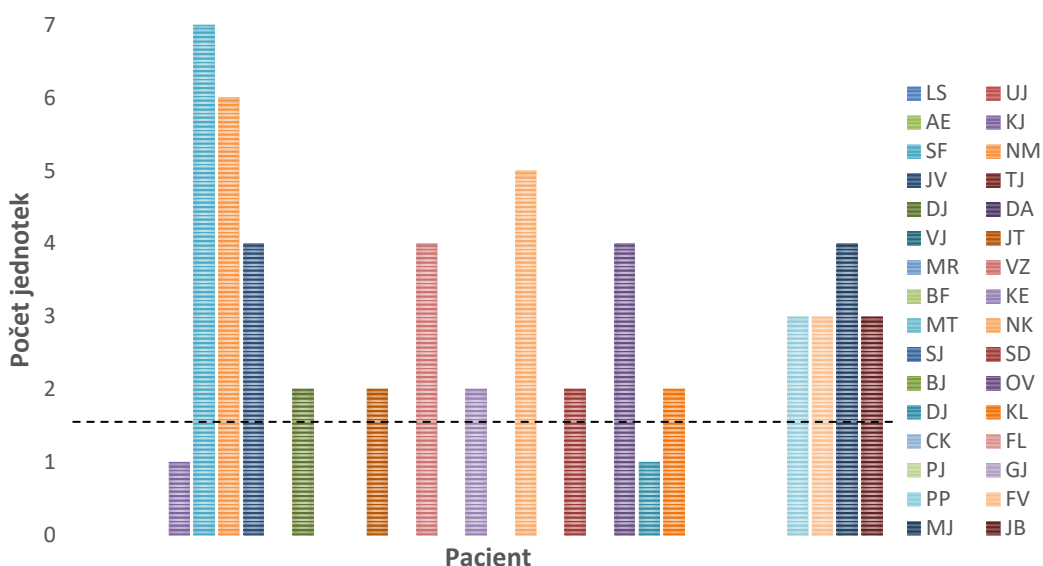
Během 24 hodin po výkonu jsou měřeny ztráty z drenů na oddělení JIP. U kontrolní skupiny byla průměrná hodnota ztrát 729 ml (černě čerchovaná čára) a u skupiny pacientů 602,7 ml (oranžově čerchovaná čára). Dané ztráty bylo nutné nahradit krevní transfúzí.

## 6.2.3 Transfuzní terapie



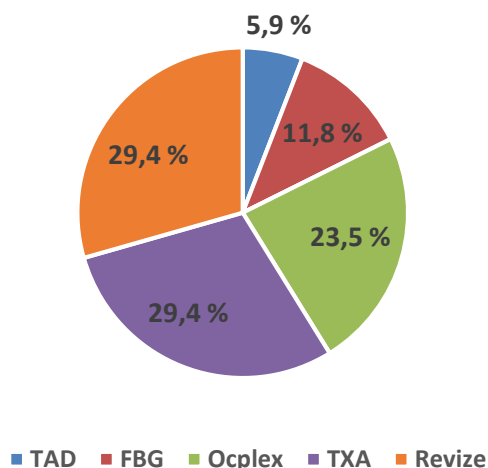
**Obrázek 27.** Počet jednotek erytrocytárního koncentrátu (EBR – jedna jednotka = 500 ml)

Transfuzní přípravky obsahují koncentrované složky lidské krve zpracované pro podání za účelem minimalizace krevních ztrát. U souboru pacientů bylo nutné podání erytrocytárního koncentrátu, jehož průměrná hodnota u kontrolní skupiny byla 2,6 jednotek (černě čerchovaná čára) a u skupiny pacientů 1,6 jednotek (oranžově čerchovaná čára).



**Obrázek 28.** Počet potřebných jednotek čerstvě zmražené plazmy (FFP – jedna jednotka = 450 ml)

Průměrná hodnota jednotek čerstvě zmražené plazmy byla u kontrolní skupiny i skupiny pacientů průměrně 1,7.

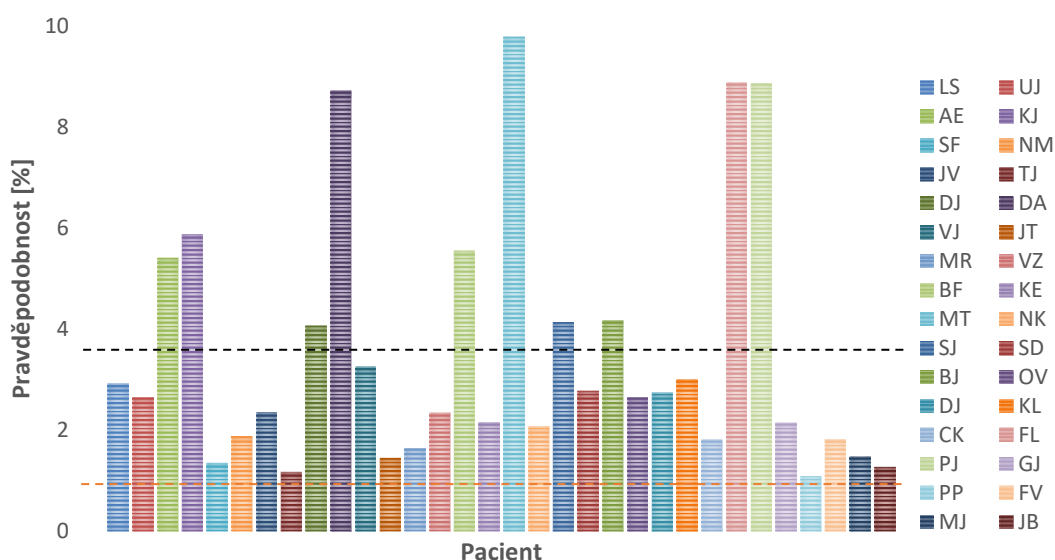


**Obrázek 29.** Podíl jednotlivých transfuzních terapií u souboru pacientů v procentech [%]

Dále se pacientům podával tromboocytární koncentrát (5,9 %), fibrinogenový koncentrát (11,8 %), koncentrát protrombinového komplexu (23,5 %), dodatečná dávka kyseliny tranexamové (29,4 %), kdy všichni pacienti dostali pooperačně 30 mg/kg.

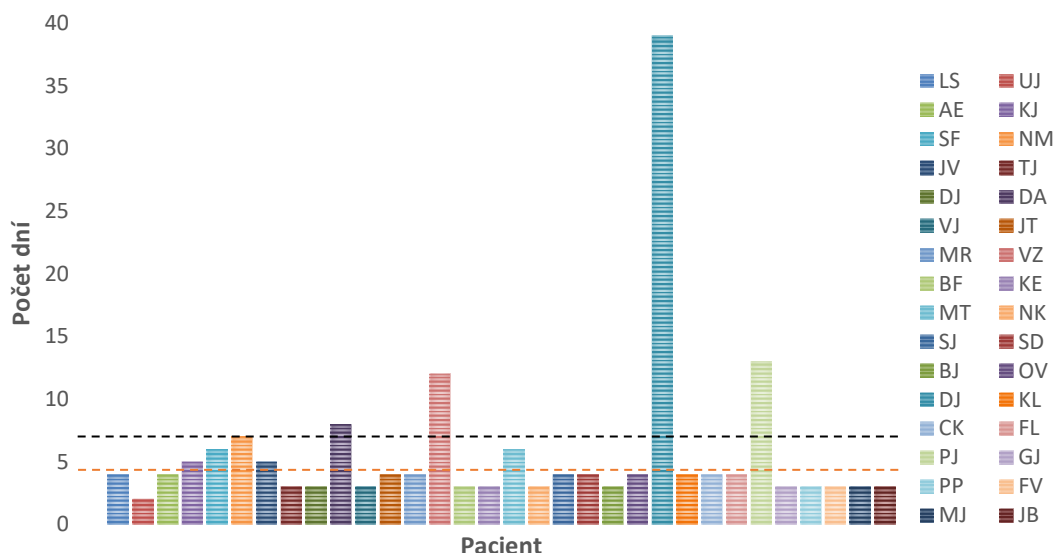
U 29,4 % pacientů bylo nutné do 48 h provést revizi výkonu pro krvácení či časnou tamponádu.

## 6.2.4 Charakteristika pacientů



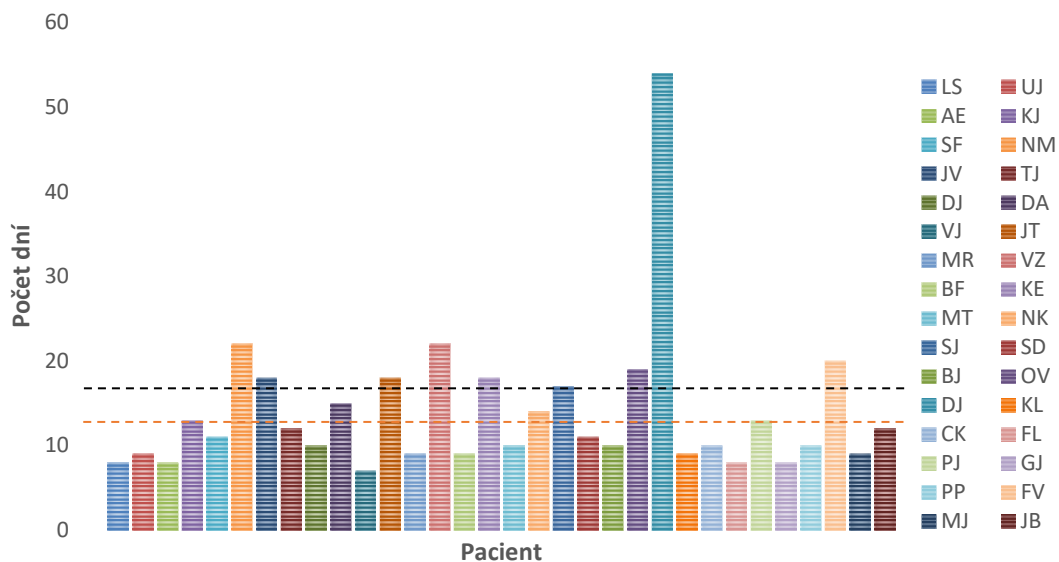
**Obrázek 30.** Logistická hodnota udávající pravděpodobnost časného hospitalizačního úmrtí v % (Euroscore II),

V neposlední řadě je nutná charakteristika jednotlivých pacientů. Důraz je kladen na pravděpodobnost časného úmrtí, která byla u kontrolní skupiny rovna 3,7 % (černě čerchovaná čára) a u skupiny pacientů 1,1 % (oranžově čerchovaná čára).



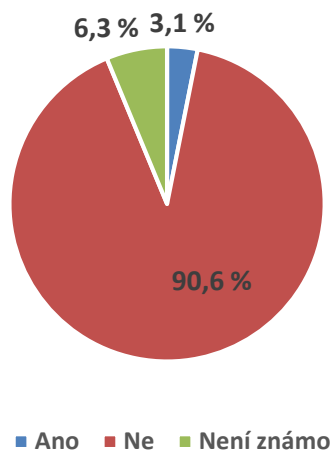
**Obrázek 31.** Délka pobytu na oddělení JIP (ICULOS) udávaná ve dnech

Délka pobytu na oddělení JIP je udávána v počtu dní. U kontrolní skupiny byla průměrná hodnota pobytu 6,9 dní (černě čerchovaná čára), u skupiny pacientů poté 4,9 dní (oranžově čerchovaná čára).



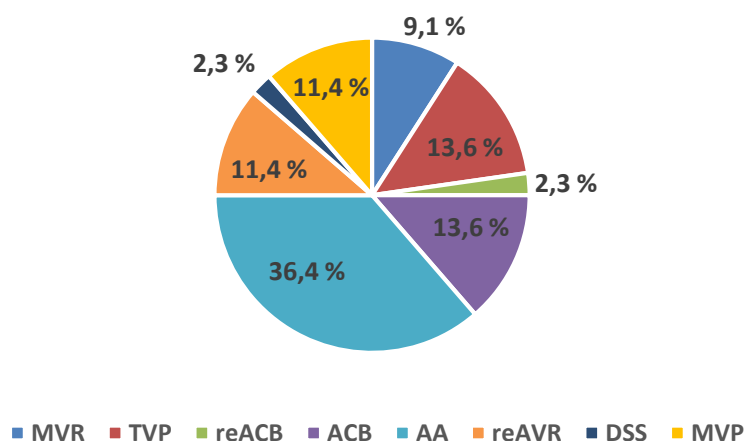
**Obrázek 32.** Délka hospitalizace (HLOS) jednotlivých pacientů udaná ve dnech

Délka hospitalizace vypovídá o průběhu zotavování pacienta. U kontrolní skupiny byla průměrná doba hospitalizace 17,4 dní (černě čerchovaná čára) a u skupiny pacientů 12 dní (oranžově čerchovaná čára).



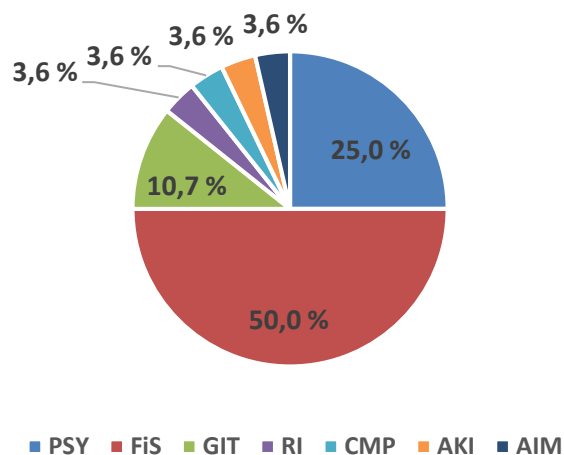
**Obrázek 33.** Procentuální zastoupení úmrtí pacientů do 30. dne od operace

Z grafu je možné vidět procentuální riziko úmrtí u pacientů do 30. dne operace. Byla naměřená vysoká úspěšnost výkonu (bez úmrtí), která byla rovna 90,6 %.



**Obrázek 34.** Procentuální zastoupení jednotlivých typů výkonu u souboru pacientů

Mezi prováděné kardiologické výkony patří: aortokoronární bypass (13,6 %), náhrada aortální chlopně (11,4 %), náhrada mitrální chlopně (9,1 %), plastika trikuspidální chlopně (13,6 %), plastika mitrální chlopně (11,4 %), náhrada ascendentní aorty (36,4 %), operace defektu síňového septa (9,1 %). V některých případech byla prováděna reoperace kardiologického výkonu.



**Obrázek 35.** Procentuální výskyt zásadních klinických komplikací u souboru pacientů

Výskyt zásadních klinických komplikací jsou nedílnou součástí kardiochirurgického výkonu. Patří zde cévní mozková příhoda (3,6 %), organický psychosyndrom (25,0 %), akutní ischemie myokardu (3,6 %), akutní selhání ledvin (3,6 %), nově vzniklá fibrilace síní (50 %), gastrointestinální komplikace (10,7 %) a respirační insuficience (3,6 %).



## 6.3 Kontrolní skupina pacientů postupujících kardiochirurgický zákrok bez navrácení krve z Cell Saveru

Tabulka 3. Souhrn parametrů u kontrolní skupiny pacientů postupujících kardiochirurgický zákrok bez použití přístroje Cell Saver

Pacient	Výkon	Délka ECC	Délka svorky	Trombocyty před OP / po OP	KOL 1	ADP 1	RISTO 1	EPI 1	KOL 2	ADP 2	RISTO 2	EPI 2
MT	BS, ACB, uzPFO	136	100	272 / 177	96	86	99	88	98	78	97	16
BF	reAVR	108	84	158 / 87	37	98	87	91	10	57	80	44
KE	MVR, TVP	128	102	170 / 136	99	99	99	99	99	98	96	83
NK	BS	123	92	206 / 126	82	80	92	93	31	82	99	37
KV	AVR, RF MAZE	104	79	279 / 225	89	78	90	78	44	28	80	77
FV	BS, RF MAZE	200	134	218 / 63	88	89	99	99	21	10	10	52
TE	MVR, TVP	117	84	173 / 140	78	88	86	78	75	45	12	90
VP	BS	204	146	233 / 113	98	99	95	98	75	45	15	66
SD	BS, ACB	183	150	194 / 103	99	98	99	30	43	91	89	27
SJ	SKN + RF MAZE	100	65	299 / 202	71	99	99	99	50	96	95	30
OP	MVR, TVP, MAZEuz, PFO	185	135	371 / 216	91	74	86	77	2	73	95	22
BJ	MVR, reACB	135	102	247 / 116	99	90	98	90	65	75	71	72

Vysvětlivky: Operační výkony: BS, ACB, uzPFO, reAVR, MVR, TVP, AVR, RF MAZE, SKN, MAZEuz, reACB, Délka ECC – délka mimotělního oběhu [min], Délka svorky – délka aortální svorky [min], Trombocyty před OP / po OP – počet trombocytů před a po operaci [množství \* 10<sup>9</sup> v litru krve], KOL 1 – agregace kolagenu na začátku operace [%], KOL 2 – agregace kolagenu po ukončení operace [%], RISTO 1 – agregace ristocetinu na začátku operace [%], RISTO 2 – agregace ristocetinu po ukončení operace [%], ADP 1 – agregace adenosinu na začátku operace [%], ADP 2 – agregace adenosindifosfátu po ukončení operace [%], EPI 1 – agregace epinefrinu na začátku operace [%], EPI 2 – agregace epinefrinu po ukončení operace [%]

## 6.4 Skupina operovaných pacientů s navrácením krve z Cell Saveru

Tabulka 4. Souhrn parametrů u vyšetřované skupiny pacientů postupujících kardiochirurgický zákrok s navrácením krve z přístroje Cell Saver

Pacient	Výkon	Délka ECC	Délka svorky	Objem odběr	Objem PRP	Trombocyty před OP / po OP	PLT in PRP	PLT – ECCend	PLT – apliPRP
SF	BS	130	102	873	546	227 / 170	130	99	138
KJ	AVR, MVR, TVP	213	130	829	572	180 / 153	70	126	115
NM	MVR, TVP	119	92	719	526	134 / 82	176	106	98
UJ	reACB	54	20	863	495	177 / 183	85	151	181
SE	MVP, ACB, MAZE	185	133	942	598	187 / 125	87	101	107
AE	MVR, TVP	132	102	825	521	132 / 80	119	86	124
DA	BS	109	81	1046	674	256 / 122	150	146	144
BP	BS	143	110	890	540	166 / 68	93	88	51
TJ	BS	128	90	810	433	182 / 166	105	189	173
MR	SKN	72	41	913	576	200 / 147	97	161	143
JT	AVP	186	112	899	531	225 / 132	112	144	134
VZ	BS	143	110	927	563	146 / 77	50	95	95
LS	MVR, TVP	116	89	896	510	230 / 122	125	151	150
CK	BS	160	120	890	532	186 / 115	154	145	148
NM	MVR, TVP	135	112	789	458	178 / 142	165	112	135

Vysvětlivky: Objem odběr – objem odebrané krve před zahájením výkonu [ml], Objem PRP – objem plazmy bohaté na krevní destičky [ml], Trombocyty před OP / po OP – počet trombocytů před a po operaci [množství \* 10<sup>9</sup> v litru krve], PLT in PRP - počet krevních destiček v PRP [množství \* 10<sup>9</sup> v litru krve], PLT - ECCend – počet trombocytů na konci MTO [množství \* 10<sup>9</sup> v litru krve], PLT – apliPRP – počet trombocytů po aplikaci PRP [množství \* 10<sup>9</sup> v litru krve].

**Tabulka 5. Agregační parametry vyšetřované skupiny pacientů postupujících kardiochirurgický zákrok s navrácením krve z přístroje Cell Saver**

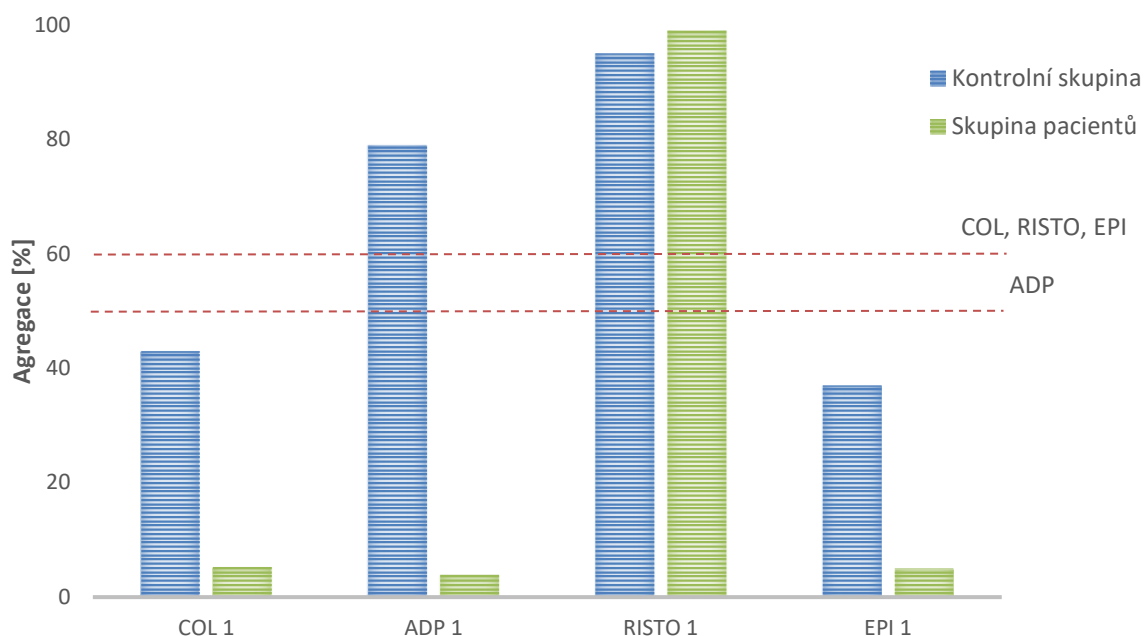
Pacient	KOL 1	ADP 1	RISTO 1	EPI 1	KOL 2	ADP 2	RISTO 2	EPI 2	KOL 3	ADP 3	RISTO 3	EPI 3	KZ
SF	3	17	99	11	69	99	99	82	99	93	89	94	520
KJ	13	3	99	5	35	65	71	29	96	76	84	52	450
NM	2,5	3	72	4,5	1,3	40	51	10,6	5,6	45	43	14,1	1320
UJ	1	1	100	1	11	100	100	18	7	59	93	8	480
SE	1	14	99	3	13	100	100	15	11	83	100	14	620
AE	99	99	99	99	9,6	79	99	45,7	58	99	85	55	380
DA	3	4	99	4	6	52	66	18	3	47	69	10	960
BP	3	29	99	8	91	81	81	70	29	72	70	20	510
TJ	3	3	99	3	28,9	88	90	38,6	3,9	75	95	16,4	620
MR	2,7	2	99	3,6	17	81	73	26	15,7	79	90	29,6	530
JT	6	4	99	12	73	58	81	8	75	58	86	7	480
VZ	13	5	99	1	18,3	74	98	24	22,3	59	88	19,2	1230
LS	3	26	99	7	27	71	94	72	56	88	90	53	720
CK	5	36	98	23	78	65	75	52	99	89	100	68	580
NM	8	24	89	15	66	85	66	18	89	100	99	55	650

Vysvětlivky: KZ – krevní ztráty [ml], KOL 1 – agregace kolagenu na začátku operace [%], KOL 2 – agregace kolagenu po ukončení operace [%], KOL 3 – agregace kolagenu po podání trombocytů [%], RISTO 1 – agregace ristocetinu na začátku operace [%], RISTO 2 – agregace ristocetinu po ukončení operace [%], RISTO 3 – agregace ristocetinu po podání trombocytů [%], ADP 1 – agregace adenosindifosfátu na začátku operace [%], ADP 2 – agregace adenosindifosfátu po ukončení operace [%], ADP 3 – agregace adenosindifosfátu po podání trombocytů [%], EPI 1 – agregace epinefrinu na začátku operace [%], EPI 2 – agregace epinefrinu po ukončení operace [%], EPI 3 – agregace epinefrinu po podání trombocytů [%]

## 6.5 Statistické hodnocení kontroly a pacienta

Tabulka 6. Souhrnné statistické hodnocení souboru pacientů při měření agregace na začátku operace

	Kontrola/pacient						Mann-Whitney U test p
	K			P			
	Medián	Minimum	Maximum	Medián	Minimum	Maximum	
COL 1	43,0	2,0	99,0	5,3	1,0	28,0	0,0005
ADP 1	79,0	21,0	98,0	4,0	1,0	86,0	<0,0001
RISTO 1	95,0	70,0	99,0	99,0	72,0	100,0	0,010
EPI 1	37,0	7,0	99,0	5,0	1,0	94,0	<0,0001



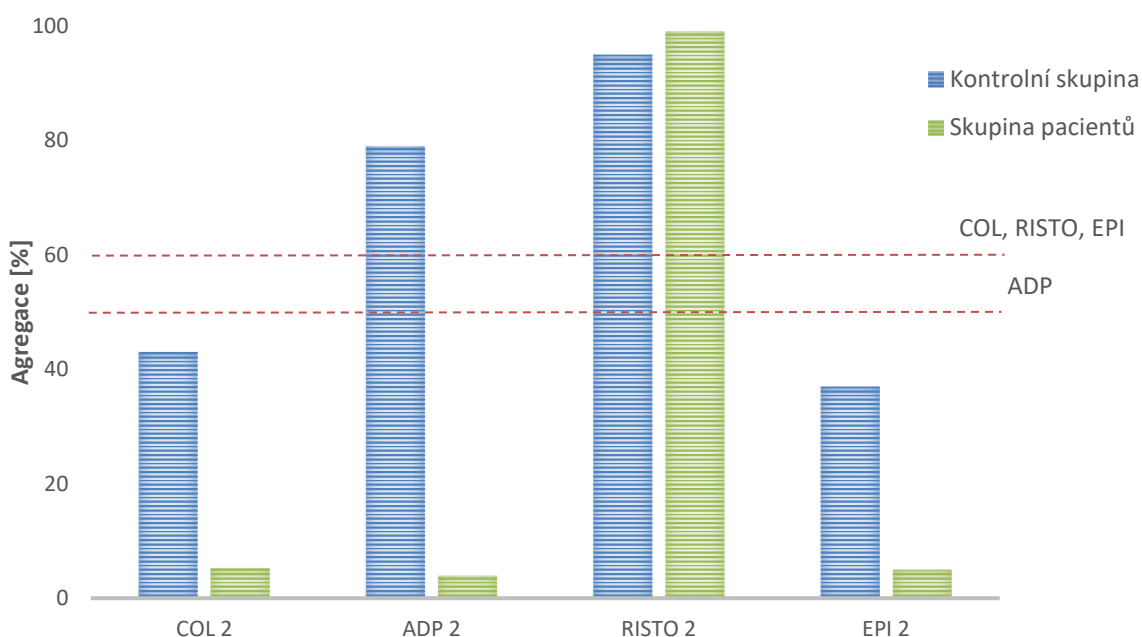
Obrázek 36. Hodnoty agregace jednotlivých induktorů měřené na začátku operace, udávané v procentech.

Vysvětlivky: Porovnání kontrolní skupiny bez navrácení krve z Cell saveru oproti operované skupině s navrácením krve z Cell saveru. Přerušovaná čára COL, RISTO, EPI – ukazuje hraniční procento agregace normálního (> 60 %) a patologického stavu (< 60 %). Přerušovaná čára ADP – ukazuje hraniční procento agregace normálního (> 50 %) a patologického stavu (< 50 %).

Po měření agregace na začátku operace a jejich porovnání u jednotlivých skupin pacientů, prokázal Mann-Whitney U test u skupiny pacientů signifikantně nižší hodnoty parametrů COL1, ADP1 a EPI1 a signifikantně vyšší hodnoty parametru RISTO1 oproti kontrolní skupině.

**Tabulka 7.** Souhrnné statistické hodnocení souboru pacientů při měření agregace před podáním trombocytů z přístroje Cell Saver

	Kontrola/pacient						Mann-Whitney U test p
	K			P			
	Medián	Minimum	Maximum	Medián	Minimum	Maximum	
<b>COL 2</b>	43,0	2,0	99,0	5,3	1,0	28,0	0,0005
<b>ADP 2</b>	79,0	21,0	98,0	4,0	1,0	86,0	<0,0001
<b>RISTO 2</b>	95,0	70,0	99,0	99,0	72,0	100,0	0,010
<b>EPI 2</b>	37,0	7,0	99,0	5,0	1,0	94,0	<0,0001



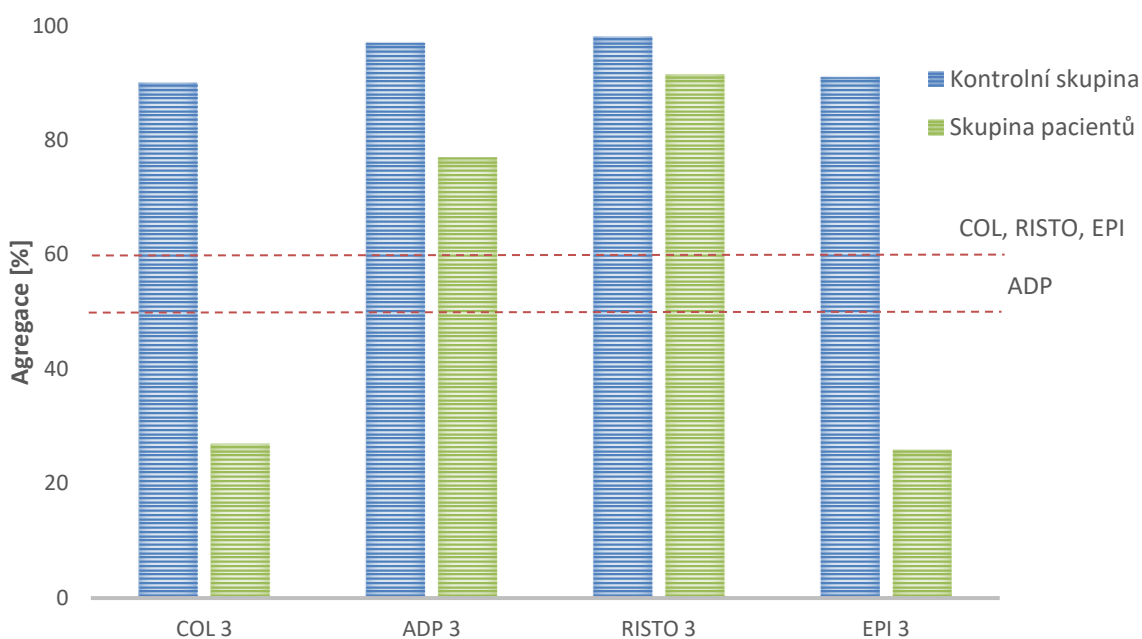
**Obrázek 37.** Hodnoty agregace jednotlivých induktorů měřené na konci operace (před podáním trombocytů) udávané v procentech.

Vysvětlivky: Porovnání kontrolní skupiny bez navrácení krve z Cell saveru oproti operované skupině s navrácením krve z Cell saveru. Přerušovaná čára COL, RISTO, EPI – ukazuje hraniční procento agregace normálního (> 60 %) a patologického stavu (< 60 %). Přerušovaná čára ADP – ukazuje hraniční procento agregace normálního (> 50 %) a patologického stavu (< 50 %).

Po změření agregace na konci operace (před podáním trombocytů) a jejich porovnání oproti odlišným skupinám, prokázal Mann-Whitney U test u skupiny pacientů signifikantně nižší hodnoty parametrů COL2, ADP2 a EPI2 a signifikantně vyšší hodnoty parametru RISTO2 oproti kontrolní skupině.

**Tabulka 8.** Souhrnné statistické hodnocení souboru pacientů při měření agregace po podání trombocytů z přístroje Cell Saver

	Kontrola/pacient						Mann-Whitney U test p
	K			P			
	Medián	Minimum	Maximum	Medián	Minimum	Maximum	
<b>COL 3</b>	90,0	26,0	99,0	27,0	4,3	91,0	0,0002
<b>ADP 3</b>	97,0	71,0	99,0	77,0	40,0	100,0	0,049
<b>RISTO 3</b>	98,0	85,0	99,0	91,5	51,0	100,0	0,203
<b>EPI 3</b>	91,0	30,0	99,0	26,0	8,0	94,0	0,0001



**Obrázek 38..** Hodnoty agregace jednotlivých induktorů měřené na konci operace (po podání trombocytů) udávané v procentech.

Vysvětlivky: Porovnání kontrolní skupiny bez navrácení krve z Cell saveru oproti operované skupině s navrácením krve z Cell saveru. Přerušovaná čára COL, RISTO, EPI – ukazuje hraniční procento agregace normálního (> 60 %) a patologického stavu (< 60 %). Přerušovaná čára ADP – ukazuje hraniční procento agregace normálního (> 50 %) a patologického stavu (< 50 %).

Po měření agregace na konci kardiochirurgického výkonu (po podání trombocytů) prokázal Mann-Whitney U test u skupin pacientů signifikantně nižší hodnoty parametrů COL3, ADP3 a EPI3 oproti kontrolní skupině. Soubory se nelišily signifikantně v parametru RISTO3.

## DISKUZE

Trombocyty jsou v dnešní době široce studovány, což potvrzuje řada publikací, které se zaměřují na ovlivnění funkce jednotlivých receptorů krevních destiček. Funkce receptorů krevních destiček může být ovlivněná řadou vrozených nebo získaných stavů, stejně jako medikací. V současné době je protideštičková léčba, široce používána v řadě kardiologických a neurologických indikacích. Nicméně existují pacienti, u nichž tato léčba selhává, a je nutné akutní komplikace řešit kardiochirurgickým výkonem.

V naší práci jsme se zaměřili na studování funkce krevních destiček právě při těchto kardiochirurgických výkonech. Počet pacientů v této práci je dán nízkou frekvencí komplexních výkonů a poměrně přísnými kontraindikacemi (vstupní hematokrit nad 0,35 pro provedení odběru 800 ml krve předoperačně ke zpracování). Zde jsme navrhli systém monitorování funkce krevních destiček u pacientů postupujících kardiochirurgický výkon, tak abychom byli schopni posoudit ovlivnění funkce krevních destiček samotným výkonem stejně jako řadou dalších faktorů, které se projevují při mimotělním oběhu, který je nedílnou součástí každého kardiochirurgického výkonu. Jedná se zejména o podání antiagregačních léků před výkonem (LMWH – 50 %, ASA – 36,4 a CLOP/TICAGR – 13,6 %), antikoagulačních léků v průběhu výkonu, a neutralizací jejich účinků po výkonu (heparin – průměrná dávka 384 UI, protamin – průměrná dávka 403 mg).

V samotné práci jsme si položili otázku, zda je pro pacienty výhodné zpětné podání krevních destiček, získaných z Cell saveru před operačním výkonem. Pro zodpovězení této otázky jsme jednak zjišťovali funkci krevních destiček pomocí laboratorních vyšetřovacích metod (hodnoty agregace krevních destiček na počátku operace, po jejím ukončení a po konečném podání trombocytů) a současně hodnotili klinický stav pacientů po samotném operačním výkonu, zejména z hlediska krevních ztrát.

Z laboratorního hlediska jsme při porovnání agregační funkčnosti trombocytů ve sledované a kontrolní skupině zjistili, že krevní destičky odebrané do Cell saveru disponují značně sníženou agregační schopností jak je patrné z grafů na obrázek 36 a 37, což potvrzují i statistická hodnocení v příložených tabulkách. Nicméně po podání krevních destiček z Cell saveru se agregační parametry ve studované skupině a kontrolní do jisté míry vyrovnávají, jak je patrné z grafu na obrázek 38.

Při porovnání laboratorních výsledků s klinickými daty je důležité se zaměřit na parametry krevních ztrát v pooperačním období, které do značné míry korelují s potenciálem koagulačního systému zastavit krvácení. Zde vidíme, že námi studovaná skupina vykazuje oproti kontrolní nižší krevní ztráty (602,7 ml a 729 ml).

## ZÁVĚR

Po statistickém porovnání naměřených hodnot u obou skupin, jsou viditelné signifikantně nižší hodnoty parametrů agregační schopnosti trombocytů po indukci COL, ADP a EPI. Po stimulaci ristocetinem byly v případě měření aktivity na počátku a po ukončení operace hodnoty signifikantně vyšší a při měření aktivity po podání trombocytů se hodnot agregace signifikantně nelišily. Bylo tedy prokázáno znatelné zvýšení aktivity krevních destiček po retransfuzi odebrané krve. Hlubší ozřejmění dopadu procedury na funkci trombocytů vyžaduje pokračování studie na rozsáhlejším souboru pacientů a další rozvoj laboratorních metodiky, zejména exprese TF při aktivaci trombocytů jako základního působku ovlivňujícího koagulační mechanismy.

Dle krevních ztrát byly u skupiny pacientů větší ztráty krve v průběhu operace, což může svědčit o tom, že pacientům byly prováděny závažnější kardiochirurgické výkony. Nicméně pooperační krevní ztráty byly i přesto u skupiny pacientů nižší oproti skupině kontrolní, což může svědčit pro protektivní účinek podání krevních destiček z přístroje Cell saveru.

Použití trombocytů z přístroje Cell saver na základě našich zjištění může vést k menším krevním ztrátám v pooperačním období, což může mít kladný vliv na přežití pacientů.



# PŘÍLOHY

## Seznam použitých zkratk

AA	kyselina arachidonová
ADP	adenosindifosfát
$A_{max}$	maximální agregace
AMP	adenosinmonofosfát
AT	antitrombin
ATP	adenosintrifosfát
C1INH	C1 inhibitor
C4bBP	C4b vazebný protein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
COX	cyklooxygenáza
ECM	extracelulární matrix
EDRF	endothelium dependent relaxing factor
EPCR	endoteliální receptor pro protein C
EPI	epinefrin
Faktor I	fibrinogen
Faktor II	protrombin
Faktor III	tkáňový tromboplastin
Faktor IV	kalcium
Faktor IX	Christmas faktor
Faktor V	proakcelerin
Faktor VII	prokonvertin
Faktor VIII	antihemofilický faktor A
Faktor X	Stuartův-Prowerův faktor
Faktor XI	Plasma tromboplastin antecedent
Faktor XII	Hagemanův faktor
Faktor XIII	transglutamináza
FBG	fibrinogen
GP	glykoprotein

HCII	heparin kofaktor II
HMWK	vysokomolekulární kininogen
KA	kalikrein
KOL	kolagen
LDL	low density lipoproteins
LRG	glykoproteiny bohaté na leucin
MTO	mimotělní oběh
PAF	faktor aktivující destičky
PAR	trombinový receptor
PC	protein C
PC1	inhibitor aktivovaného proteinu C
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule
PGH2	endoperoxid H2
PL	fosfolipidy
PPP	plazma chudá na krevní destičky
PRP	plazma bohatá na krevní destičky
PS	protein S
PZ	protein Z
RISTO	ristocetin
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor zevní koagulační cesty
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TM	trombomodulin
TNF	tumor nekrotizující faktor
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA2	aktivovaný tromboxan A <sub>2</sub>
uPA	extravaskulární urokináza plazminogenu
VWF	Von Willebrandův faktor
ZPI	proteinázový inhibitor závislý na proteinu Z

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1.</b> Morfologie krevní destičky .....	15
<b>Obrázek 2.</b> Vybrané receptory na membráně krevní destičky .....	16
<b>Obrázek 3.</b> Schéma adheze a agregace.....	18
<b>Obrázek 4.</b> Primární hemostáza .....	20
<b>Obrázek 5.</b> Dělení poruch primární hemostázy .....	21
<b>Obrázek 6</b> Systém fibrinolýzy .....	24
<b>Obrázek 7.</b> Působení přirozených inhibitorů v koagulační kaskádě.....	26
<b>Obrázek 8.</b> Dělení poruch krevních destiček.....	29
<b>Obrázek 9.</b> Schéma typického okruhu pro mimotělní oběh .....	32
<b>Obrázek 10.</b> Schéma operace při použití přístroje Cell Saver .....	33
<b>Obrázek 11.</b> Agregometr Apact 4004.....	38
<b>Obrázek 12.</b> Schéma agregometru Apact 4004 .....	38
<b>Obrázek 13.</b> Průběh agregační křivky-.....	39
<b>Obrázek 14.</b> Mechanismus testů agregačního analyzátoru.....	40
<b>Obrázek 15.</b> Průběh operace s navrácení krve z Cell saveru.....	42
<b>Obrázek 16.</b> Průběh operace bez navrácení krve z Cell saveru.....	42
<b>Obrázek 17.</b> Procentuální zastoupení preoperační medikace .....	47
<b>Obrázek 18.</b> Počáteční srážecí čas aktivovaný kaolinem.....	47
<b>Obrázek 19.</b> Maximální aktivovaný čas.....	48
<b>Obrázek 20.</b> Aktivovaný srážecí čas na konci operačního výkonu .....	48
<b>Obrázek 21.</b> Celková dálka heparinu během mimotělního oběhu .....	49
<b>Obrázek 22.</b> Dávka protaminu během mimotělního oběhu.....	49
<b>Obrázek 23.</b> Nejnižší teplota tělesného jádra během operace .....	50
<b>Obrázek 24.</b> Teplota tělesného jádra po výkonu.....	50
<b>Obrázek 25.</b> Peroperační krevní ztráty.....	51
<b>Obrázek 26.</b> Krevní ztráty z drenů na oddělení JIP.....	51
<b>Obrázek 27.</b> Počet jednotek erytrocytárního koncentrátu.....	52
<b>Obrázek 28.</b> Počet jednotek čerstvě zmražené plazmy.....	52
<b>Obrázek 29.</b> Podíl jednotlivých transfuzních terapií.....	53
<b>Obrázek 30.</b> Pravděpodobnost časného hospitalizačního úmrtí v % .....	53
<b>Obrázek 31.</b> Délka pobytu na oddělení JIP .....	54
<b>Obrázek 32.</b> Délka hospitalizace.....	54
<b>Obrázek 33.</b> Zastoupení úmrtí pacientů do 30. dne od operace.....	55
<b>Obrázek 34.</b> Zastoupení jednotlivých typů výkonů .....	55
<b>Obrázek 35.</b> Výskyt zásadních klinických komplikací.....	56
<b>Obrázek 36.</b> Agregace induktorů měřené na začátku operace .....	60
<b>Obrázek 37.</b> Agregace induktorů měřená na konci operace.....	61
<b>Obrázek 38.</b> Agregace induktorů měřená na konci operace po podání trombocytů.....	62

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1.</b> Údaje o vstupní medikaci pacientů atd. ....	43
<b>Tabulka 2.</b> Přehled substituční léčby po operačním výkonu.....	45
<b>Tabulka 3.</b> Souhrn parametrů u kontrolní skupiny pacientů .....	57
<b>Tabulka 4.</b> Souhrn parametrů u kontrolní skupiny pacientů .....	58
<b>Tabulka 5.</b> Agregáčn� parametry kontrolní skupiny pacientů .....	59
<b>Tabulka 6.</b> Statistick� hodnocení při měření agregace na za�atku operace.....	60
<b>Tabulka 7.</b> Statistick� hodnocení při měření agregace před podáním trombocytů .....	61
<b>Tabulka 8.</b> Statistick� hodnocení při měření agregace po podáním trombocytů .....	62

## SEZNAM LITERATURY

Achneck, H. E., Sileshi, B., Parikh, A., Milano, C. A., Welsby, I. J., & Lawson, J. H. (2010). Pathophysiology of bleeding and clotting in the cardiac surgery patient: from vascular endothelium to circulatory assist device surface. *Circulation*, 122(20), 2068-2077.

Bedáňová I., Večerek, V. (2007). *Základy statistiky pro studující veterinární medicíny a farmacie*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.

Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., et al. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10), 3527–3561.

Colman, R. W., Hirsh, K., Marder, V. J. et al. (2001). *Hemostasis and Thrombosis*. New York: Lippincott Williams and Wilkins.

Davies, P. F. (1993). Endothelium as a signal transduction interface for flow forces: cell surface dynamics. *Trombosis and Haemostasis*, 70(1), 124–128.

Debize, G., Massignon, D., Couer, P. (1995). Antiphospholipid antibodies and thrombotic risk: Relationship to thrombomodulin, D-dimers and prothrombin fragment 1 + 2. *Nouvelle Revue Francaise D'Hematologie*. 37, 93–96.

Evans, W. H., & Graham, J. M. (1988). *Membrane structure and function*. Oxford: Oxford IRL Press.

Favuel, F., Legrand, Y., Caen, J. P. (1978). Platelet adhesion to type I collagen and alpha 1 (I)3 trimers: involvement of the C-terminal alpha 1 (I) CB6A peptide. *Thrombosis Research*, 12(2), 273–285.

Hu, Ch., Baglia, F. A., Mills, D. C. B., Konkle, B. A., Walsh, P. N. (1998). Time-specific expression of functional XI expression. *Blood*, 91, 3800–3807

Hynie S. (2001). *Speciální farmakologie. Díl 4. Látky ovlivňující kardiovaskulární systém*. Praha: Karolinum.

Chap, H., Perret, B., Plantavid, M., et al. (1987). Topography of platelet membrane phospholipids. In: *Platelets in biology and pathology III* (MacIntyre, D. E.). Amsterdam: Elsevier Science.

- Koltai, K., Kesmarky, G., Feher, G., Tibold, A., Toth, K. (2017). Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanism, Techniques and Clinical Implication. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(8), 1803.
- Kořínková, L. (2017). Využitie automatického hodnotenia hemostázy v laboratórnej diagnostike trombocytopatií a porúch primárnej hemostázy. Dizertační práce. Univerzita Komenského v Bratislavě, Jesseniova lékařská fakulta v Martine.
- Kroll, M. H., Hellums, J. D., McIntire, L. V., Schafer, A. I., & Moake, J. L. (1996). Platelets and shear stress. *Blood*, 88(5), 1525–1541.
- Kroll, M. H., Schafer, A. I. (1995). The analysis of ligand–receptor interactions in platelet activation. In: *Immunopharmacology of platelets* (Joseph, M.). London: Academic Press.
- Kubisz, P. et al. (2006). *Hematológia a transfuziologie*. Praha: Grada Publishing.
- Larson, P. O. (1988). Topical hemostatic agents for dermatologic surgery. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, 14(6), 623–632.
- Levy-Toledano, S., Gallet, C., Nadal, F., Bryckaert, M., Maclouf, J., & Rosa, J. P. (1997). Phosphorylation and dephosphorylation mechanisms in platelet function: a tightly regulated balance. *Trombosis and Haemostasis*, 78(1), 226–233.
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. (2009). *Toxikologie a farmakologie*. Praha: Grada Publishing.
- Matýšková, M., & Hrachovinová, I. (1999). *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví.
- Nosál, R., & Jančinová, V. (1990). *Krvné doštičky v biológii a medicíne*. Bratislava: Veda
- Pecka, M. (2004). *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: Finidr.
- Pecka, M. (2006). *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: Finidr.
- Pecka, M., & Bláha, M. (2010). *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art.
- Penka, M., & Slavíčková, E. (2011). *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada.
- Poredoš, P. (2001). Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clinical and Applied Trombosis/Hemostasis*, 7(4), 276–280.

- Povýšil, C., & Šteiner, I. (c2007). *Speciální patologie* (2., dopl. a přeprac. vyd). Praha: Galén.
- Qin, C., Gu, J., Hu, J., Qian, H., Fei, X., Li, Y., et al. (2016). Platelets activation is associated with elevated plasma mitochondrial DNA during cardiopulmonary bypass. *Journal Cardiothoracic Surgery*, 11(1), 90.
- Rivera, J., Lozano, M. L., Navarro-Nunez, L., & Vicente, V. (2009). Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*, 94(5), 700–711.
- Roth, G. J. (1991). Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood*, 77(1), 5–19.
- Schloesser, M., Zeerleder, S., Lutze, G., Halbmayer, W. M., Hofferbert, S., Hinney, B., et al. (1997). Mutations in the human factor XII gene. *Blood*, 90(10), 3967-3977.
- Schnitzer, J. E. (1997). The endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis disease. In: *Vascular Endothelium* (G. V. R. Born, C. J. Schwartz – eds.). Stuttgart: Schattauer.
- Schroit, A. J., & Zwaal, R. F. (1991). Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1071(3), 313–329.
- Sussman, I. I. (1992). Normal Pathways of coagulation. *Seminars in Hematology*. 29(3), 157–158.
- Thompson, R. E., Mandle, R., Jr., & Kaplan, A. P. (1977). Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *The Journal of Clinical Investigation*, 60(6), 1376–1380.
- Trojan, S. (2003). *Lékařská fyziologie* (Vyd. 4., přeprac. a dopl). Praha: Grada
- Wagner, R. (2009). *Kardioanestezie a perioperační péče v kardiochirurgii*. Praha: Grada Publishing.