



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vliv antifosfolipidových protilátek na globální testy hemostázy**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Adriana Hlavačková</b>
Studijní program:	R170005 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. Mgr. Slavík Luděk, Ph.D.</b>
Konzultant:	<b>RNDr. Ingrid Škorňová</b>
Termín odevzdání práce:	2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Adriana Hlavačková
Název práce	Vliv antifosfolipidových protilátek na globální testy hemostázy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Koagulační laboratoř: Hemato-onkologická klinika FN a LF UP v Olomouci
Vedoucí práce	doc. Mgr. Slavík Luděk, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Tématem diplomové práce je vliv antifosfolipidových protilátek na globální koagulační testy, které poskytují komplexní pohled na koagulační systém. Cílem práce bylo sledování míry trombogenicity různých typů antifosfolipidových protilátek zjištěných screeningovými testy v trombin generačním testu.</p> <p>V teoretické části je popsána patofyziologie hemostázy, která je projevem narušení hemostatické rovnováhy s následným popisem působení antifosfolipidových protilátek. Samostatnou část tvoří laboratorní diagnostika protilátek včetně jejich působení.</p> <p>Experimentální část je zaměřena na popis detekce protilátek - lupus antikoagulans (koagulační metody), protilátky proti kardiolipinu a <math>\beta_2</math>-glykoproteinu I (chemiluminiscenční metody). Následně je popsána detekce vlivu protilátek na generaci trombinu generovaného v trombin generačním testu. Trombin generační test umožnil posouzení trombogenicity protilátek a jejich vlivu na aktuální obraz hemostázy. Finálně byly změřené hodnoty testů pro detekci protilátek korelovány s hodnotami trombin generačního testu.</p>
Klíčová slova	Hemostáza, kardiolipin, protilátka, trombin
Počet stran	75
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Adriana Hlavačková
Title of thesis	Relationship between antiphospholipid antibodies and global coagulation tests
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. Mgr. Slavík Luděk, Ph.D.
The year of presentation	2019

### **Abstract**

The topic of the thesis is the influence of antiphospholipid antibodies on global coagulation tests, which provide a comprehensive view of the coagulation system. The aim of our study was to investigate the level of thrombogenicity detected by thrombin generation test of various types of antiphospholipid antibodies.

The theoretical part describes the pathophysiology of haemostasis, which is a manifestation of haemostatic balance disruption with subsequent description of antiphospholipid antibodies. Laboratory diagnostics of antibodies including their effects form a separate part.

The experimental part is focused on the detection of antibodies - lupus anticoagulants (coagulation methods), antibodies against cardiolipin and  $\beta$ 2-glycoprotein I (chemiluminescence methods). Subsequently, the detection of the effect of antibodies on thrombin generation generated in thrombin generation assay is described. The thrombin generation test made it possible to assess the thrombogenicity of antibodies and their effect on the current hemostasis picture. Finally, the antibody detection test values were correlated with the individual thrombin parameters of the generation assay.

Keywords	Hemostasis, cardiolipin, antibody, thrombin
Number of pages	75
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Slavíka Lud'ka, Ph.D., za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 27.4 2019

Ráda bych poděkovala panu doc. Mgr. Lud'ku Slavíkovi, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení diplomové práce. Poděkování patří také kolektivu koagulační laboratoře Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci za skvělé pracovní prostředí. Na závěr chci zmínit svou rodinu a nejbližší přátele, kterým děkuji za obrovskou podporu.

# OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	8
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	10
SEZNAM TABULEK.....	11
ÚVOD .....	12
CÍLE PRÁCE.....	13
TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1 HEMOSTÁZA .....	14
1.1 Primární hemostáza.....	14
1.1.1 Cévy, cévní stěna.....	15
1.2 Krevní destičky- trombocyty.....	15
2 HEMOKOAGULACE.....	16
2.1 Koagulační faktory.....	16
2.2 Vnější cesta koagulace.....	18
2.3 Vnitřní cesta koagulace .....	19
2.4 Společná cesta koagulace.....	20
2.5 Systém přirozených inhibitorů .....	21
2.5.1 Serpiny.....	22
2.5.2 Systém proteinu C .....	22
2.5.3 Kuniny.....	23
2.5.4 Nespecifické inhibitory.....	23
3 PATOFYZIOLOGIE HEMOSTÁZY .....	25
3.1 Hemofilie .....	25
3.2 Trombofilie .....	25
3.3 Trombóza.....	26
3.4 Nespecifické inhibitory .....	26
3.4.1 Mechanismy působení antifosfolipidových protilátek.....	28
3.4.1.1 Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek při vzniku krvácivých stavů .....	29
3.4.1.2 Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek při vzniku trombocytopenie.....	30
3.4.2 Laboratorní diagnostika antifosfolipidových protilátek.....	31
3.4.2.1 Laboratorní diagnostika lupus antikoagulans (LA).....	32
3.4.2.2 Laboratorní diagnostika kardiolipinových protilátek a protilátek proti $\beta_2$ -GP I36.....	39
3.4.2.3 Globální testy .....	39
3.4.2.3.1 Vliv antikoagulační léčby (warfarin) na globální test TGT.....	42
3.5 Antifosfolipidový syndrom .....	43
4 STATISTIKA.....	45

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	46
1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE .....	46
1.1 Biologický materiál .....	46
2 DIAGNOSTIKA A REAGENCIE .....	47
3 PREANALYTICKÁ ČÁST .....	48
3.1 Odběr vzorku .....	48
3.2 Zpracování vzorku-centrifugace .....	48
3.3 Uchování vzorku .....	48
4 VYŠETŘOVANÝ SOUBOR PACIENTŮ .....	49
5 LABORATORNÍ METODY .....	50
5.1 Výběr pacientů .....	50
5.2 Odběr krve .....	50
5.3 Identifikace lupus antikoagulans .....	50
5.4 Identifikace ACLA a anti- $\beta_2$ glykoprotein I .....	50
5.5 Trombin generační test (TGT) .....	51
6 VÝSLEDKY .....	53
6.1 Grafické a statistické hodnocení výsledků .....	56
7 DISKUZE .....	68
8 ZÁVĚR .....	70
LITERATURA .....	71

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACLA	protilátky proti kardiolipinu
ADP	adenosindifosfát
AK	aminokyselina
anti $\beta_2$ -GPI	anti beta-2-glykoprotein I
APA	antifosfolipidové protilátky
APC	aktivovaný protein C
APS	antifosfolipidový syndrom
APTT	tromboplastinový test
AT	antitrombin
ATP	adenosintrifosfát
AUC	celkové množství vygenerovaného trombinu
C1INH	C1 inhibitor
C4Bbp	C4 vázající protein
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté ionty
DK	doba krvácení
dRVVT	test Russelovy zmije
ECM	extracelulární matrix
ELISA	enzymová imunoanalýza
EPCR	endoteliální receptor pro protein C
FVII	faktor VII
FVIII	faktor VIII
FX	faktor X
FXI	faktor XI
HC II	heparinový kofaktor II
HMWK	vysokomolekulární kininogen



KA	kalikrein
KCT	kaolinový test
LPA	lupus antikoagulans
PC	protein C
PDGF	růstový faktor z destiček
PL	fosfolipidy
PNP	destičkový neutralizační test
PS	protein S
SLE	systémový lupus erythematoses
TEG	trombelastografie
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TGT	trombin generační test
TM	trombomodulin
TT	trombinový test
vWF	von Willebrandův faktor

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> Schéma koagulační kaskády.....	21
<b>Obrázek 2</b> Vliv aktivace destičkových glykoproteinů antifosfolipidovými protilátkami na další procesy .....	31
<b>Obrázek 3</b> Koagulační analyzátor ACL TOP 750 CTS.....	36
<b>Obrázek 4</b> Detekce antifosfolipidových protilátek pomocí metody ELISA.....	37
<b>Obrázek 5</b> Koagulační analyzátor Bio-Flash .....	38
<b>Obrázek 6</b> Graf trombin generačního testu- tvorba trombinu.....	41
<b>Obrázek 7</b> Koagulační analyzátor Ceveron® Alpha .....	42
<b>Obrázek 8</b> Rozdělených pacientů dle pozitivit ve sledovaných protilátkách . .....	55
<b>Obrázek 9</b> Vzájemná korelace výsledků mezi hodnotami LPA a TGT t.....	56
<b>Obrázek 10</b> Vzájemná korelace výsledků mezi LPA a TGT max.....	57
<b>Obrázek 11</b> Vzájemná korelace výsledků mezi LPA a TGT E. ....	57
<b>Obrázek 12</b> Vzájemná korelace výsledků mezi ACA IgG a TGT t.....	58
<b>Obrázek 13</b> Vzájemná korelace výsledků mezi ACA IgG a TGT max.....	59
<b>Obrázek 14</b> Vzájemná korelace výsledků mezi ACA IgG a TGT E. ....	59
<b>Obrázek 15</b> Vzájemná korelace výsledků mezi ACA IgM a TGT t.....	60
<b>Obrázek 16</b> Vzájemná korelace výsledků mezi ACA IgM a TGT max. ....	61
<b>Obrázek 17</b> Vzájemná korelace výsledků mezi ACA IgM a TGT E.....	61
<b>Obrázek 18</b> Vzájemná korelace výsledků mezi Doménou 1 a TGT t .....	62
<b>Obrázek 19</b> Vzájemná korelace výsledků mezi Doménou 1 a TGT max.....	63
<b>Obrázek 20</b> Vzájemná korelace výsledků mezi Doménou 1 a TGT E. ....	63
<b>Obrázek 21</b> Vzájemná korelace výsledků mezi anti- $\beta_2$ GPI IgG a TGT t.....	64
<b>Obrázek 22</b> Vzájemná korelace výsledků mezi anti- $\beta_2$ GPI IgG a TGT max. ....	65
<b>Obrázek 23</b> Vzájemná korelace výsledků mezi anti- $\beta_2$ GPI IgG a TGT E. ....	65
<b>Obrázek 24</b> Vzájemná korelace výsledků mezi anti- $\beta_2$ GPI IgM a TGT t. ....	66
<b>Obrázek 25</b> Vzájemná korelace výsledků mezi anti- $\beta_2$ GPI IgM a TGT max. ....	67
<b>Obrázek 26</b> Vzájemná korelace výsledků anti- $\beta_2$ GPI IgM a TGT E.....	67

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1</b> Mechanismy působení antifosfolipidových protilátek .....	29
<b>Tabulka 2</b> Hodnoty APA u všech vyšetřovaných pacientů. ....	53
<b>Tabulka 3</b> Korelace mezi LPA a hodnotami TGT pomocí Spearmanovy korelační analýzy .....	56
<b>Tabulka 4</b> Korelace LPA a hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu. ....	56
<b>Tabulka 5</b> Korelace mezi ACA IgG a hodnotami TGT pomocí Spearmanovy korelační analýzy .....	58
<b>Tabulka 6</b> Korelace ACA IgG s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu. ..	58
<b>Tabulka 7</b> Korelace mezi ACA IgM a hodnotami TGT pomocí Spearmanovy korelační analýzy .....	60
<b>Tabulka 8</b> Korelace ACA IgM s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu. .	60
<b>Tabulka 9</b> Korelace mezi Doménou 1 a hodnotami TGT za použití Spearmanovy korelační analýzy .....	62
<b>Tabulka 10</b> Korelace Domény 1 s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu	62
<b>Tabulka 11</b> Korelace anti- $\beta_2$ GPI IgG s hodnotami TGT pomocí Spearmanovy korelační analýzy .....	64
<b>Tabulka 12</b> Korelace anti- $\beta_2$ GPI IgG s hodnotami TGT pomocí Mann-Whitney U testu. ....	64
<b>Tabulka 13</b> Korelace mezi anti- $\beta_2$ GPI IgG s hodnotami TGT pomocí Spearmanovy korelační analýzy .....	66
<b>Tabulka 14</b> Korelace anti- $\beta_2$ GPI IgM s hodnotami TGT pomocí Mann-Whitney U testu. ....	66

## ÚVOD

Hemostáza je proces krevního srážení nezbytný pro život, zabraňující ztrátám krve díky tvorbě sraženin v poškozených stěnách krevních cév (William & Gagong, 2005). Jedná se o komplexní, přesně regulovaný proces, který v poraněném místě dokáže zastavit krvácení. Pokud je ale krevní řečiště neporušené, proces hemostázy udržuje tekutost krve. Na tomto procesu se podílí mnoho složek a mechanismů, které mají různé iniciační mechanismy s pozitivními a negativními zpětnými vazbami. Hlavními složkami podílejících se na procesu hemostázy jsou krevní destičky, cévy a plazmatické faktory, ale tento systém je ovlivněn také složkami, které jsou přítomny v krvi a vnitřní straně cévy (leukocyty, červené krvinky, lipidy, bílkoviny atd.) (Penka & Slavíčková, 2011). Hemostáza je složena z několika dějů, které běží současně. Jeden z nich se nazývá hemokoagulace. V tomto procesu se aktivují hlavně koagulační faktory a tvoří se pevné fibrinová zátka. Finální reakcí v hemokoagulaci je fibrinolýza, která je důležitá k rozpuštění fibrinové zátky a obnovuje cévní stěnu za zachování krevního řečiště (William & Gagong, 2005). Pro správnou fluiditu krve je důležitá hemostatická rovnováha, která se zprostředkovává složkami hemostatického děje, adhezivními molekulami a specifickými proteiny, které se váží na membránu cévní stěny. Jestliže je tato rovnováha porušena, může to vést ke vzniku krvácivých stavů nebo naopak ke stavům nadměrného srážení neboli trombofilím (Šlechtová, 2007).

Jedním z mnoha patofyziologických stavů, který může porušením hemostatické rovnováhy nastat je antifosfolipidový syndrom (APS), který je charakterizován klinickými projevy ve formě trombóz nebo reprodukčních ztrát a současně přítomností antifosfolipidových protilátek (APA). Antifosfolipidové protilátky je skupina autoproti látek, které jsou zaměřeny na makromolekuly vázající se na negativně nabitý fosfolipidový povrch. Tyto fosfolipidové povrchy působí v koagulačních reakcích jako katalytické povrchy pro koagulační faktory. Vazba APA na fosfolipidový povrch různých buněčných struktur může mít za následek i aktivaci funkce buňky a tím zvýšit riziko vzniku trombóz nebo poruch reprodukčního systému.

V experimentální části této diplomové práce se pomocí měření generace trombinu snažíme identifikovat rizikovost jednotlivých typů a závažnost výskytu protilátek pro klinickou manifestaci APS ve formě trombotických a těhotenských komplikací. K tomu je využita korelace výsledků trombin generálního testu a závažnost výskytu vyšetřovaných antifosfolipidových protilátek (anti-kardiolipiny, anti- $\beta_2$  glykoprotein I, lupus antikoagulans).

## **CÍLE PRÁCE**

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit vliv antifosfolipidových protilátek jako jednoho z faktorů ovlivňujících aktivaci koagulačního systému na globální testy hemostázy, které monitorují klíčový enzym hemostázy- trombin. Pro analýzu byl použit soubor pacientů s prokázanými antifosfolipidovými protilátkami různého typu.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 HEMOSTÁZA

Hemostáza je proces krevního srážení nezbytný pro život, zabraňující ztrátám krve díky tvorbě sraženin v poškozených stěnách krevních cév (William & Gagong, 2005). Jedná se o komplexní, přesně regulovaný proces, který v poraněném místě dokáže zastavit krvácení. Pokud je ale krevní řečiště neporušené, proces hemostázy udržuje tekutost krve. Na tomto procesu se podílí mnoho složek a mechanismů, které mají různé inianiciační mechanismy s pozitivními a negativními zpětnými vazbami. Hlavními složkami podílejících se na procesu hemostázy jsou krevní destičky, cévy a plazmatické faktory, ale tento systém je ovlivněn také složkami, které jsou přítomny v krvi a vnitřní straně cévy (leukocyty, červené krvinky, lipidy, bílkoviny atd.) (Penka & Slavíčková, 2011). Hemostáza je složena z několika dějů, které běží současně. Jeden z nich se nazývá hemokoagulace. V tomto procesu se aktivují hlavně koagulační faktory a tvoří se pevné fibrinová zátka. Finální reakcí v hemokoagulaci je fibrinolýza, která je důležitá k rozpuštění fibrinové zátky a obnovuje cévní stěnu za zachování krevního řečiště (William & Gagong, 2005). Pro správnou fluiditu krve je důležitá hemostatická rovnováha, která se zprostředkovává složkami hemostatického děje, adhezivními molekulami a specifickými proteiny, které se váží na membránu cévní stěny. Jestliže je tato rovnováha porušena, může to vést ke vzniku krvácivých stavů nebo naopak ke stavům nadměrného srážení neboli trombofilii (Šlechtová, 2007).

### 1.1 Primární hemostáza

Primární hemostáza je proces, jehož cílem je tvorba primární hemostatické zátky, která při porušení celistvosti cévní stěny uzavírá místo poranění a zastavuje krvácení (Levy- Toledano et al., 1997). V primární hemostáze hrají klíčovou roli trombocyty a v sekundární hemostáze je hlavní děj tvorba trombinu, který vede k polymerizaci fibrinogenu. Tyto dva děje se prolínají a tvoří jeden celek. Hemostatický děj je ukončen fibrinolýzou tj. děj umožňující rozpuštění trombu, následné obnovení poškozené části a její funkční průtok. Tímto dějem dochází k vyvolání procesů, které vedou k proliferaci poškozené tkáně a tudíž k úplnému zhojení cévy (Pecka, 2004).

### **1.1.1 Cévy, cévní stěna**

Cévy, kromě kapilár, jsou tvořeny třívrstvou strukturou v podobě intimy, medie a adventicie. Intima je tvořena jednovrstevnou výstelkou endoteliálních buněk, které spojuje polysacharidová intracelulární matrix a obklopuje bazální membrána, která je syntetizována fibroblasty a endoteliemi. Vrstva nacházející se pod bazální membránou se nazývá extracelulární matrix (ECM), jejímiž hlavními buňkami jsou fibroblasty a hladké svalové buňky.

Subendotel se do fyziologického kontaktu dostává s krví jen při poranění, kdy je velmi trombogenní a hned aktivuje všechny systémy hemostázy. Mezi nejvýznamnější hemostatické složky subendotelu patří tkáňový faktor (TF) a kolagen (Penka & Slavičková, 2011).

## **1.2 Krevní destičky- trombocyty**

Krevní destičky se řadí mezi krevní elementy, jejichž průměr je mezi 2 - 4  $\mu\text{m}$  a přibližně jich cirkuluje v krvi 300 000 na 1  $\mu\text{l}$  krve. Na jejich povrchu se nachází receptory pro kolagen, fibrinogen a von Willebrandův faktor, který tvoří součást cévní stěny. V cytoplazmě krevních destiček jsou dva typy granul. První granula jsou tzv. denzní, která je složena ze serotoninu, adenonuklotidů a adenosindifosfátu (ADP). Druhá granula se nazývají alfa granula a ta jsou tvořena srážecími faktory a destičkovým růstovým faktorem (PDGF) (Penka & Slavičková, 2012; Vojáček & Malý, 2004).

Podstatou funkce trombocytů je schopnost interagovat s poškozenou stěnou cévy doprovázena adhezí, aktivací a agregací těchto trombocytů za vzniku primární hemostatické zátky. Jakmile dojde k poranění cévy, dochází k aktivaci receptorů destiček s kolagenem, von Willebrandovým faktorem a lamininem. Po spojení destiček s kolagenem se destičky aktivují a začnou měnit svůj tvar. Této aktivace se účastní tzv. proagregační působky (ADP, fibrinogen, tromboxan A<sub>2</sub>). Následuje hromadění a spojování destiček. Tomuto procesu se říká tzv. agregace. Pro vyvolání agregace je nutná přítomnost a zapojení mnoha látek např. adrenalin, trombin, kolagen, kyselina arachidonová, ADP z denzních granul trombocytů a dalších. Díky své schopnosti reaktivity stahují zátku a tím dochází ke zpevnění za pomoci kontraktibilních bílkovin, které se nachází v membráně. V membráně dochází zároveň také ke kontaktu plazmatických faktorů (Penka & Slavičková, 2011; Sakalová et.al, 2010; Šlechtová, 2007).

## 2 HEMOKOAGULACE

Hemokoagulace je proces navazující na hemostázu, který zahrnuje kaskádu enzymatických reakcí vedoucích k zastavení krvácení. Principem hemokoagulace je vznik nerozpustného fibrinového vlákna, jehož funkcí je zpevňovat primární destičkovou zátku. Fibrinové vlákno je vytvořeno štěpením fibrinogenu trombinem. Existují dva způsoby pro aktivaci koagulační kaskády, které se nazývají vnitřní a vnější cesta. Tyto dva procesy se později spojují a společně působí při aktivaci faktoru X za vzniku důležitého trombinu (Šlechtová, 2007; Penka & Slavíčková, 2011; Kaňková, 2003).

Hemokoagulace je doprovázena řadou koagulačních faktorů, jejichž syntéza probíhá v játrech a mnoho z nich potřebuje ke své syntéze vitamín K. Tyto faktory jsou označovány římskými číslicemi postupně dle jejich objevení, pokud jsou v aktivní formě, přidává se písmeno „a“. Označení tedy nesouvisí s jejich postupným působením (Trojan, 2003; Pecka, 2004; Baklaja et al., 2008).

### 2.1 Koagulační faktory

Většina koagulačních faktorů (kromě faktoru I a II) se nachází v plazmě v nízkých koncentracích. Kromě tkáňového faktoru se v plazmě všechny faktory vyskytují v podobě proenzymu a pro správnou funkci vyžadují proteolytické štěpení, jehož výsledkem je vznik koagulačně aktivního enzymu z původního proenzymu. Během svého působení v procesu krevního srážení faktory mění svou strukturu, kdy v počátku se jedná o glykoproteiny charakteru proenzymů a kofaktorů (Pecka, 2004).

Základními koagulačními faktory dle Pecka (2004), Matýšková et al. (1999), Achneck et al. (2010), Penka et al. (2011), Thompson et al. (1977), Schloesser et al. (1977), Hu et al. (1998) jsou:

- *Fibrinogen* (Faktor I) je glykoprotein, nacházející se v plazmě i v granulích krevních destiček. Strukturu molekuly tvoří dimer, na kterém se nachází tři rozdílné páry polypeptidových řetězců  $\alpha$ ,  $\beta$ , a  $\lambda$  vzájemně spojené disulfidickými můstky. Fibrinogen ve své struktuře obsahuje tři vazebná místa pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Jestliže se na všechny tři pozice naváže  $\text{Ca}^{2+}$ , fibrinogen nepodléhá štěpení plazminem.
- *Protrombin* (Faktor II) je zařazován do skupiny serinových proteáz, které se podobají trypsinu. Pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  se váže na negativně nabitě PL (fosfolipidy),



kde je protrombinázou štěpen na aktivní formu  $\alpha$  trombin. Je tvořen v játrech a v jeho aktivní formě má kromě enzymatické funkce také neenzymatickou. V procesu koagulační kaskády se trombin zúčastňuje nejen štěpení fibrinogenu, ale také katalyzuje tři skupiny reakcí, jejichž působení vede k regulaci tvorby koagula (aktivace buněk, posílení koagulace a zabránění přílišnému srážení).

- *Tkáňový faktor* (Faktor III) se řadí mezi integrální transmembránový glykoprotein. K plnění své funkce není potřeba žádná proteolytická modifikace, takže je syntetizován plně funkční. Svou bílkovinou složkou je spojen s PL a tato vazba je nutná pro prokoagulační aktivitu. Pro zahájení koagulace je nutná tvorba komplexu tkáňového faktoru s FVII nebo FVIII za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Slouží také jako buněčný receptor pro FVII.
- *Kalcium* (Faktor IV) je nezbytný při procesu karboxylace gama gliomového zbytku, díky kterému je faktor schopen vazby na PL a  $\text{Ca}^{2+}$ .
- *Proakcelerin* (Faktor V) je tvořen v játrech a megakaryocytech, nachází se v plazmě a granulích krevních destiček. Působí jako kofaktorů krevního srážení, ale ani v aktivní formě se nechová jako enzym. K aktivaci faktoru V jsou nutné vápenaté ionty, které jej stabilizují. Jeho složení se podobá faktoru VIII.
- *Prokonvertin* (Faktor VII) je syntetizován v játrech a jeho důležitým zdrojem jsou aktivované makrofágy nebo monocyty. Má proteolytickou vlastnost a jeho schopností je štěpit faktor X. Jeho aktivita se zvyšuje v těhotenství a věkem.
- *Antihemofilický faktor A* (Faktor VIII) je faktor cirkulující v plazmě navázan na von Willebrandův faktor (VWF). Je syntetizován jak v plazmě, tak i ve slezině, ledvinách, slinivce a uzlinách. Jeho hladina se zvyšuje při zánětech, stresu či chronických infekcích. Při působení trombinu dochází k limitovanému štěpení FVIII.
- *Christmas faktor* (Faktor IX) je aktivován FXIa a FVIIa. Jeho aktivní forma má strukturu podobnou trypsinu a je enzymaticky aktivní v komplexu zvaném tenka, která dále aktivuje FX na Xa. Za přítomnosti vápenatých iontů spolu s fosfolipidy je faktor IX schopný zpětné aktivace FVII na VIIa.
- *Faktor Stuarta-Powerové* (Faktor X) je přítomný v séru a tvořen v játrech jako dvouřetězcový GP. Jeho aktivace je spuštěna tenkou nebo komplexem FVIIa-TF. Ve své aktivní formě Xa in vitro je nejmocnějším aktivátorem faktoru VII.
- *Plasma tromboplastin antecedent* (Faktor XI) je faktor cirkulující v krvi v podobě zymogenu (proenzymu) serinové proteázy. Cirkuluje jako monodimer,

který je složený ze dvou identických řetězců a navázán v komplexu s vysokomolekulárním kinikogenem (HMWK). Jeho aktivace je zahájena limitovanou proteolýzou FXIIa, FVIIa a trypsinem. Za přítomnosti negativních PL je schopen zpětné aktivace FXI na FXIa.

- *Hagemanův faktor* (Faktor XII) je složený z těžkého a lehkého řetězce. Nachází se v plazmě i séru, kde je aktivován při kontaktu se subendotelovými strukturami např. při poranění nebo proteázami. Zvýšená hladina tohoto faktoru je u žen po menopauze nebo v těhotenství. Mimo koagulaci zasahuje také do imunologických systémů.
- *Fibrin stabilizující faktor* (Faktor XIII) neboli transglutamináza je složen ze dvou párů rozdílných polypeptidů (A a B řetězec). Je to jediný koagulační enzym, který ve svém aktivním místě obsahuje cystein. Působením na rozpustný fibrin mění nekovalentní vazby na pevné kovalentní. Významnou úlohu hraje v procesu hemostáze, hojení ran a při udržení těhotenství.
- *Vysokomolekulární kininogen* (HMWK) je plazmatický protein, který uvolňuje bradykininy (vazoaktivní peptidy). Jeho syntéza probíhá v játrech a endotelu pupečnickových žil. Váže se na neutrofilů a buňky endotelu vedle aktivovaných trombocytů. Díky tomuto faktoru se na aktivní povrchy naváží i PK a FXI.
- *Fletcherův faktor* (Prekalikrein) je gamaglobulin syntetizovaný v játrech a v plazmě je přítomen ve vazbě na HMWK. Je složen z těžkého a dvou typů lehkých řetězců. Jeho aktivace je způsobena faktorem XIIa nebo XIIf na  $\alpha$ -kalikrein (KA), který aktivuje FXII a ten zvyšuje uvolňování kininů z kininogenů.

## 2.2 Vnější cesta koagulace

K iniciaci vnější cesty hemokoagulace dochází velmi brzy po poškození cévní stěny. Tato hemokoagulační kaskáda je spuštěna po kontaktu TF s volně kolujícím FVIIa v místě poškození. TF je exprimován buňkami subendoteliálních struktur a při cirkulaci v krvi jsou za jeho zdroj považovány monocyty. Vazbou FVIIa a TF vzniká komplex, který je zprostředkován díky  $\text{Ca}^{2+}$  a destičkovým fosfolipidům se nazývá tzv. tetramerní komplex neboli vnější tenasa. Vzniklá tenasa poté štěpí vazbu Arg-Ile FX a vzniká menší množství dvouřetězcové serinové proteázy FXa (Murray, 2002; Baklaja et al., 2008; Šlechtová, 2007; Colvin, 2004).

Aktivovaný FX spolu se svým kofaktorem FVa, destičkovými fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$  vstupují do komplexu aktivátoru protrombinu neboli protrombinazy. Protrombinaza následně konvertuje přeměnu malého množství protrombinu na trombin, který svým množstvím není schopen rozštěpit dostačující kvantum fibrinogenu, ale naopak je schopen aktivace koagulačního faktoru V vnější dráhy, faktor VIII a XI vnitřní dráhy a krevní destičky. Aktivace faktoru XI vnitřní cesty komplexem TF a FVIIa vnější cesty je důležitou interakcí mezi vnější a vnitřní cestou. Tuto fázi v procesu hemokoagulace můžeme nazývat jako iniciace.

Při vzniku komplexu vnější tenazy a protrombinázy dochází k aktivaci inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI). Jelikož je působení komplexu vnější tenasy vázáno na povrch buněk, které exprimují TF, způsobuje v tomto systému aktivace inhibici TF po navázání TFPI. Nastává pokračování hemokoagulační kaskády pouze vnitřní cestou, tzv. amplifikační a propagační fázi (Šlechtová, 2007; Baklaja et al., 2008; Trojan, 2003; Colvin, 2004).

### 2.3 Vnitřní cesta koagulace

V počátku vnitřní cesty koagulace dochází k základnímu kontaktu destičkových fosfolipidů s negativně nabitým povrchem, což jsou struktury obnažené při poškození nebo poranění stěny cév. V této fázi jsou zapojeny čtyři koagulační faktory ( FXII, FIX, FX, FXI ), které interagují s nabitým povrchem, dále  $\text{Ca}^{2+}$ , prekalikrein a vysokomolekulární kininogen (HMWK). Tato kaskáda dějů probíhající ve vnitřním systému se nazývá kontaktní fáze. Průběh kontaktní fáze není zcela znám, ale je předpokládán molekulový průběh, při kterém po kontaktu se subendotelem FXII mění svoji konformaci a stává se přístupným pro kalikrein. Do fáze vstupuje HMWK, jehož úloha spočívá v přenosu prekalikreinu a FXI do místa reakce (Šlechtová, 2007; Murray, 2002; Colvin, 2004; Baklaja et al., 2008; Pecka, 2004; Trojan, 2003).

Během styku s negativně nabitým povrchem je vyvolána autoaktivace faktoru XII, který aktivuje prekalikrein na kalikrein, a ten dále recipročně aktivuje další FXII. Tímto systémem je tvořeno dostačující množství FXIIa pro rychlou aktivaci FXI, který ve své aktivní formě za přítomnosti vápenatých iontů aktivuje FIX na FIXa. Malé množství trombinu vzniklého cestou vnější tenasy a protrombinazy způsobí další aktivace, a to faktoru XI, FIX a hlavně kofaktoru FVIII vnitřního prostředí. Aktivovaný FIX v komplexu se svým kofaktorem FVIIa,  $\text{Ca}^{2+}$  a destičkovými fosfolipidy tvoří tetramerní

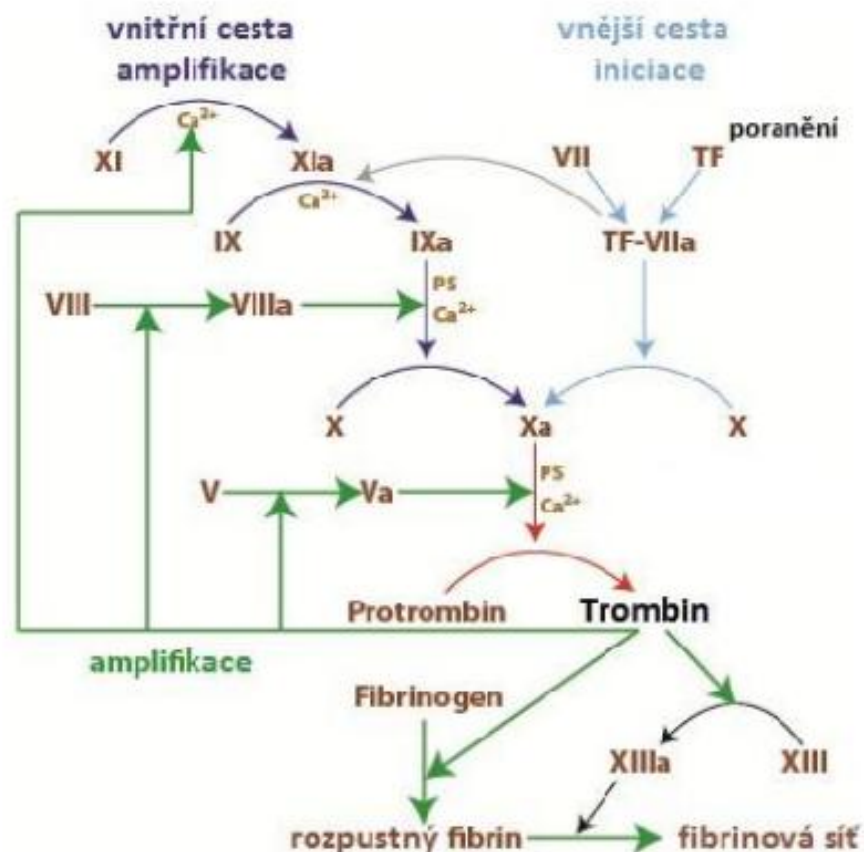
komplex, což je vnitřní tenasa, která následně štěpí vazbu Arg-Ile FX a vniká FXa. Hlavní koagulační faktor Xa je touto vnitřní tenasou generován v dostatečném množství pro pokračování ve společné cestě koagulační kaskády (Trojan, 2003; Pecka, 2004; Murray, 2002; Šlechtová, 2007; Baklaja et al., 2008).

## 2.4 Společná cesta koagulace

Společná cesta zahrnuje vnitřní a vnější systém hemokoagulační kaskády. Faktor Xa, který je vytvořen vnější nebo vnitřní cestou, v této cestě aktivuje protrombin na trombin. Tato aktivace vede ke vzniku protrombinázy, ale je k tomu potřeba vazba faktoru Xa s ostatními složkami jako je FVa,  $\text{Ca}^{2+}$  a destičkové fosfolipidy.

Trombin, který je generován protrombinázou, aktivuje tvorbu hemostatické zátky přeměnou fibrinogenu na nerozpustný fibrin a aktivuje také FXIII za přítomnosti vápenatých iontů. Trombin specificky štěpí molekulu fibrinogenu, která se skládá ze tří různých párů polypeptidových řetězců v aminoterminálním místě  $\alpha$ -a  $\beta$ -řetězců za uvolňování dvojice malých fibrinopeptidů A a B. Tohoto děje se řetězce  $\lambda$  neúčastní. Po odstranění fibrinopeptidů z molekuly fibrinogenu dojde ke zpřístupnění komplementárních míst molekul fibrin-monomerů a následně probíhá spontánní polymerace pomocí nekovalentních vazeb a vzniká fibrin-polymer.

Fibrin-polymer není zcela stabilní a může depolymerovat. Stabilizace nastává v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  faktorem XIIIa, který tvoří kovalentní vazby mezi řetězci sousedním molekul  $\lambda$  řetězců. Po stabilizaci je fibrin elastický, nerozpustný, pevný a odolný vůči působení fibrolytických činidel. Síť fibrinových vláken je podkladem pro zpevnění primární hemostatické zátky a vytváří finální trombus (Pecka, 2004; Baklaja et al., 2008; Trojan, 2003; Šlechtová, 2007; Murray, 2002; Colvin, 2004).



**Obrázek 1** Schéma koagulační kaskády

Převzato a upraveno z: <http://eclinpath.com/hemostasis/physiology/coagulation-cascade-new-model/>

## 2.5 Systém přirozených inhibitorů

Přirozené inhibitory jsou označovány jako regulační proteiny, které jsou důležité v procesu krevního srážení. Jejich funkcí je dosáhnout rovnovážného stavu, tj. regulovat množství vytvořených enzymů vůči množství, které je inaktivováno. Dále zabraňují nekontrolovatelnému srážení krve a tím udržují koagulační rovnováhu. Přirozené inhibitory mohou působit v koagulační kaskádě jak vnitřní, tak vnější cestou (Penka et al., 2011; Pecka, 2004).

### 2.5.1 Serpiny

Dle Pecky (2004) jsou serpiny zařazeny do skupiny inhibitorů serinových proteáz a jsou považovány většinou za nespecifické inhibitory. V játrech jsou serpin-serinové komplexy po uvolnění do cirkulace zachytávány pomocí serpinových receptorů. Jedná se o důležité regulační faktory, které mají pro organismus při nadměrném štěpení u některých patologických stavů vážné následky.

Serpiny rozlišujeme do těchto skupin:

- Antitrombin (AT) je jednořetězcový glykoprotein akutní fáze, který se vyskytuje extravaskulárně. Jeho defekty (vrozené i získané) jsou spojeny s nejvyšším rizikem hyperkoagulačních stavů. AT působí hlavně na endotelu, je inhibitorem pro trombin a má širokou antiproteázovou aktivitu. Sám je schopen pomalu inhibovat faktor Xa, IIa, ale také IXa, ale to jen za přítomnosti heparinu jako kofaktoru.
- Heparin kofaktor II (HCII) má mnohem méně klinický význam než AT. Jedná se o specifický inhibitor trombinu, jehož aktivace probíhá za fyziologických i patologických podmínek, a to převážně dermatanfulfátem, ale i hepariny.
- C1 inhibitor (C1-INH) je nemocnějším inhibitorem faktorů kontaktu, který je schopen inhibice plazminu a nejvíce zasahuje do systému komplementu (C1s). Jeho syntéza probíhá v játrech, kde dochází k uvolňování v průběhu aktivace destiček (Penka et al., 2011; Penka & Buliková, 2009).

### 2.5.2 Systém proteinu C

Systém proteinu C je přirozená antikoagulační cesta, která reguluje tvorbu trombinu, a to schopností štěpit faktor Va a VIIIa. Pomocí antikoagulačních a protizánětlivých vlastností moduluje obranu organismu na cizí stimulus (Penka et al., 2011). Systém je tvořen těmito složkami:

- Protein C (PC) je tvořen v hepatocytech a jeho aktivace probíhá na povrchu endotelu. Při aktivaci působí jako kofaktor reakce specifický receptor trombinu, trombomodulin (TM). Aktivovaný protein C (APC) má v plazmě vcelku dlouhý poločas rozpadu. Jeho aktivace může být také zajištěna faktorem Xa navázaným na TM v přítomnosti negativně nabitých PL. Inhibitorem proteinu C je PCI a  $\alpha_1$ - antitrypsin.

- Protein S (PS) je jednořetězový glykoprotein, který je uložen v endotelu a  $\alpha$  granulách krevních destiček. Jeho tvorba probíhá za účasti vitamínu K v játrech. V plazmě se nachází asi ze 40% ve volné formě, zbytek je vázán. Ve volné formě je protein S kofaktorem PC a podporuje vazbu APC k fosfolipidovým povrchům destiček. Další funkcí je schopnost specificky inhibovat aktivitu TF.
- C4b vázající protein (C4bBP) je regulační protein cesty komplementu. Je složen z 6-7  $\alpha$  řetězců a  $\beta$  řetězce, kdy pouze forma s  $\beta$  řetězcem dokáže vázat protein S, který umožňuje vazby C4bBP na povrch buněk.
- Trombomodulin (TM) je integrální transmembránový glykoprotein, jehož přítomnost je vždy na cévním endotelu, na který se váže trombin. V hemostáze má tři způsoby působení: kofaktor pro aktivaci PC trombinem, za přítomnosti galaktozaminoglykanu v molekule urychluje inaktivaci trombinu antitrombinem a inhibuje proteolytické působení trombinu.
- Endoteliální receptor pro protein C (EPCR) je transmembránový protein, který snižuje antikoagulační vlastnosti APC, ale naopak zvyšuje aktivaci proteinu C na endotelu (Pecka, 2004; Penka et al., 2011).

### 2.5.3 Kuniny

Kuniny jsou zařazovány do inhibitorů proteáz obsahující strukturu zvanou Kunitzova doména v molekule. Do této skupiny inhibitorů patří např. nexin proteáz II a inhibitor zevní koagulační cesty (TFPI), který cirkuluje v plazmě, kde je vázán na lipoproteiny s nízkou hmotností (LDL). TFPI přímo inhibuje faktor Xa a urychlení reakce zprostředkovává heparin (Penka & Slavíčková, 2011).

### 2.5.4 Nespecifické inhibitory

Nespecifické inhibitory jsou inhibitory jakýchkoliv proteáz související nejen v systému koagulace.

Dle Pecky (2004) a Penky & Slavíčkové (2011) se zde řadí:

- $\alpha_2$ –makroglobulin: je tvořen z mnoha buněk včetně hepatocytů a makrofágů v játrech. Je přítomný jak v plazmě, tak i mimo cévní systém. Jeho specifická schopnost spočívá v inhibici proteázy všech tříd, dále tvorba komplexu s proteolytickými enzymy plazmy, leukocytů a bakterií. Při svém působení

molekula  $\alpha_2$  –makroglobulinu změni svou konformaci, obklopí molekulu enzymu a zabrání navázání substrátu do aktivního místa cílového enzymu.

- C-1 inhibitor: glykoprotein syntetizován v játrech a uvolňován při aktivaci destiček. Inhibuje faktor XIIa, XIa a kalikrein a zasahuje do systému komplementu. Za přítomnosti heparinu jeho účinek zesiluje.
- $\alpha_1$ -antitrypsin: syntetizován v játrech, jeho vlastností je inhibice faktoru Xa a působí, jako poměrně silný inhibitor aktivovaného proteinu C. Hlavní roli hraje při inhibici proteáz slinivky břišní a bílých krvinek.



### **3 PATOFYZIOLOGIE HEMOSTÁZY**

Za normálních podmínek proces hemostáza, jak bylo již popsáno, zajišťuje správnou tekutost krve v cévním řečišti. Jakmile dojde k porušení cévní stěny, zabraňuje krvácení krevním srážením. Správná funkce cévní stěny, krevních destiček, koagulačního a fibrinolytického systému je projevem tzv. hemostatické rovnováhy. Rovnováha je za fyziologických podmínek udržována a to tak, že je zabráněno většímu rozsahu krevní ztráty a naopak co nejvíce zamezeno spontánní intravaskulární trombotizací. Pokud je tato rovnováha narušena, dochází ke vzniku krvácivých a trombotických stavů, což můžeme označovat jako získané poruchy krevního srážení (Baklaja et al., 2008; Pecka, 2004; Vokurka, 2008).

#### **3.1 Hemofilie**

Hemofilie se řadí mezi vzácné, dědičné onemocnění, které je spjato s pohlavním chromosomem X. Rozlišujeme dva typy hemofilie: hemofilie A je způsobena defektem faktoru VIII a hemofilie B faktorem IX. Obě skupiny se projevují sklonem ke krvácení, způsobené vrozeným defektem koagulačního faktoru. Chorobou trpí hlavně muži, ženy jsou přenašečky, ale nemocné mohou být jen tehdy, když mají Turnerův syndrom (Xh), nebo mají postiženy oba chromosomy (XhXh). Hemofilie je nemoc, která se vyskytuje po celém světě a krvácení je zapříčiněno selháním sekundární hemostázy. Množství trombinu, vytvořené koagulačním mechanismem, není dostatečné pro vytvoření kvalitní fibrinové zátky, tím pádem krvácení není úplně zastaveno (Penka & Slavíčková, 2011; Smejkal et al., 2017).

#### **3.2 Trombofilie**

Defekt hemostázy, který je označován jako trombofilie, je příčinou vysokého sklonu k trombóze. Vrozená forma této choroby se vyskytuje až 5x více než hemofilie. Příčin vzniku trombofilie může být několik: defekt inhibitorů krevního srážení, reologické faktory ovlivňující krevní tok, porucha faktorů koagulační kaskády (FVII, FVIII, fibrinogen) atd (Penka & Bulíková, 2009; Penka & Slavíčková, 2011).

Trombofilie může být dle Penka et al. (2001) také vyvolána řadou chorobných stavů, jako jsou:

- onemocnění jater
- endokrinní choroby- diabetes mellitus, Cushingův syndrom
- hematologické malignity
- koagulační a fibrinolytické abnormality- nefrotický syndrom, malignity
- choroby autoimunity- Behcetova choroba, ulcerózní kolitida

### 3.3 Trombóza

Trombóza je proces, při kterém dochází k tvorbě krevní sraženiny (trombus) v cévním systému. Vzniklý trombus se dělí do dvou skupin dle toho, v jakém řečišti vzniká, tedy arteriální a žilní. Při arteriální trombóze hrají větší úlohu krevní destičky, které tuto chorobu způsobují. Nejdříve začnou v místě poranění stěny tepny adherovat, následuje shromažďování v místě poraněné cévy (agregační fáze), poté nastává propagace trombu a výsledným krokem je maturace trombu. Mezi největší rizikové faktory vzniku arteriální trombózy jsou diabetes mellitus, obezita, kouření, hypertenze a hypercholesterolemie (Vojáček & Malý, 2004; Fölsh et al., 2003; Pecka, 2004; Baklaja et al., 2008).

Žilní trombóza je způsobena nejčastěji hyperkoagulací, kdy se tromby bohaté na fibrin a červené krvinky tvoří zejména v žilním systému dolních končetin. Tromby nejdříve nějakou dobu setrvávají v místě svého vzniku, poté se dle hemodynamických podmínek mohou uvolnit a proudit krví jako emboly. Rizik pro vznik venózní trombózy je mnoho, ale mezi nejčastější rizika se řadí maligní onemocnění a gravidita, poškozený endotel, chirurgické zákroky (Mackman, 2008; Baklaja et al., 2008; Pecka, 2004).

### 3.4 Nespecifické inhibitory

Nespecifické inhibitory tvoří heterogenní skupina protilátek, které ovlivňují celkové prokoagulační ale i antikoagulační procesy hemostázy. Jejich funkce nespočívá v působení jen proti jednomu koagulačnímu faktoru, ale jsou zaměřeny komplexně na celé děje hemostázy (Penka & Slavičková, 2011). Jednou ze skupin, která tvoří největší část, jsou **antifosfolipidové protilátky** (APA). Patří sem skupina autoprotilátek nebo zkříženě reagujících aloprotilátek, jejichž cílené místo působení je různý antigen s různým významem. Ty skupiny APA, které souvisejí s antifosfolipidový syndromem

jsou většinou autoprotilátky, které jsou zaměřeny na makromolekuly vázané na negativně nabitý fosfolipidový povrch. Konkrétně sem patří protilátky proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I, trombomodulinu, proteinu S, C, protrombinu, TF, faktorům kontaktní fáze, fosfolipáze a dalším. APA mohou souviset také s chorobou srdečních chlopní, nefropatií nebo trombocytopenií (Bártková, 2010; Bulíková & Penka, 2006; Penka & Slavičková, 2011).

Z pohledu diagnózy APS se rozdělují antifosfolipidové protilátky do tří skupin:

- protilátky proti kardiolipinů (ACLA)
- protilátky proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I (anti $\beta_2$ -GPI)
- lupus antikoagulant (LPA)

ELISA metodami lze diagnostikovat skupinu ACLA a anti $\beta_2$ -GPI. Skupina LPA je diagnostikována díky jejich vlastnosti ovlivnit krevní srážení, které jsou závislé na fosfolipidech (Penka & Slavičková, 2011).

*Protilátky proti kardiolipinům = antikardiolipinové protilátky (ACLA):* Kardiolipin je mitochondriální fosfolipid z hovězího srdce. Tato skupina protilátek se dělí do tříd IgG nebo IgM (Roubey, 1994).

*Protilátky proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I (anti $\beta_2$ -GPI):* Stejně jako předchozí skupina se dělí do tříd IgG nebo IgM.  $\beta_2$ -glykoprotein I= primárním cílovým antigenem je apolipoprotein, který je rozpoznáván APA. Řadí se do skupiny plazmatických proteinů s afinitou na molekuly s fosfolipidovým povrchem (Rand, 2007). Své vazebné místo nachází na negativně nabitým povrchu a receptorech na povrchu buněk. Molekula proteinu cirkuluje v plazmě a je spojována hlavně s rizikem vzniku trombózy. Jeho stavební kostru tvoří 326 aminokyselin a je rozdělen do pěti domén. Čtyři domény jsou totožné a každá je sestavena z 60 AK, pátá doména obsahuje navíc 6 AK a C-konec molekuly je obohacen o 19 AK, které vytvoří na doméně velkou negativně nabitou část. Tu poté využívají negativně nabitě fosfolipidy jako vazebné místo. Choroby vznikající trombotickými komplikacemi jsou způsobeny více protilátkami proti  $\beta_2$ -glykoproteinu I, které jsou namířeny proti epitopu, který se nachází na první doméně než na ostatních doménách (Keeling et al., 2012; Agar et al., 2010).

*Lupus antikoagulant (LPA):* Do této skupiny zahrnujeme heterogenní APA, ovlivňující fosfolipid-dependentní koagulační reakce in vitro. Jsou ve spojení s koagulačními testy závislých na fosfolipidech, které jsou například trombinový test (TT), tromboplastinový test (APTT), kaolinový test (KCT) nebo test Russelovy zmije

(dRVVT). APA se společně s koagulačními faktory přetahuje o negativně nabitě fosfolipidy, které v koagulačních reakcích působí jako katalytické povrchy. To při koagulačních testech způsobí prodloužení konečných časů. Proto se LA chová in vitro jako inhibitor koagulace, který není specifický proti žádnému určitému koagulačnímu faktoru. Z klinického pohledu je proto zavádějící označení „antikoagulant“. Pojem „lupus“ také není přesný, protože LPA se nevyskytují jen u pacientů se SLE (systémový lupus erythematoses) a pacienti detekovaní na SLE nemusí být naopak pozitivní na LPA (Hirmerová, 2010).

### **3.4.1 Mechanismy působení antifosfolipidových protilátek**

Jsou studovány dva základní mechanismy působení APA. Prvním je působení na kinetiku fosfolipid-dependentních reakcí, druhým je působení na funkční nastavení částic nebo buněk (trombocyty, monocyty, neurony, fibroblasty, endotelie, aj.). APA mohou také svým působením ovlivnit komplementový systém, inhibovat fibrinolýzu nebo mohou blokovat antitrombotické vlastnosti anexinu V. Ve výsledku všechny zmíněné procesy vedou k protrombotickým, proateromatózním nebo také k protizánětlivým reakcím, které následně provází různé klinické projevy (Buliková et al., 2012). V organismu dochází při působení APA k různým změnám, které nejsou zapříčiněny trombózou nebo mikrotrombotizací, ale přímým působením autoprotilátek na buněčné struktury, jako jsou receptory. Tímto působením může dojít k aktivaci buněk, nepřímému zásahu do reakcí týkajících se imunity nebo nastane jiná funkční změna. V patofyziologii se tyto změny nejspíše vyskytují u reprodukčních ztrát nebo neurologických projevů (Buliková & Penka, 2006).

**Tabulka 1** Mechanismy působení antifosfolipidových protilátek

$\beta_2$ -glykoprotein I	Inhibice aktivace PC, inhibice inaktivace FVa a FVIII cestou APC/PS, inhibice aktivace fibrinolýza komplexem FXII/PK, potenciace aktivace trombocytů, inhibice aktivace AT mediované heparan sulfátem, potenciace tvorby FXa na trombocytech, snížení volného PS cestou inhibice interakce $\beta_2$ -glykoprotein I a C4-vázající protein
Anti-trombin/ Anti-protrombin	Vazba na trombinem aktivované destičky, inhibice uvolnění prostacyklinu pod vlivem trombinu, inhibice aktivace PC
Anti- protein C	Inhibice inaktivace FVa a FVIIIa cestou APC/PS, inhibice aktivace proteinu C
Anti- protein S	Inhibice inaktivace FVa a FVIIIa cestou APC/PS
Anti- fosfolipáza A <sub>2</sub>	Inhibice produkce prostacyklinu z endoteliálních buněk
Anti- trombomodulin	Inhibice aktivace PC
Anti- heparan- sulfát cévní stěny	Inhibice aktivace AT mediované heparan sulfátem
Anti-anexin V	Ovlivnění funkce placentárního antikoagulačního proteinu 1 (anexin V) tvorbou komplexů, blokadí nebo odstraněním anexinu V z jeho přirozených míst nacházejících se v placentě

*Převzato a upraveno dle: Penka & Slavičková (2011)*

### 3.4.1.1 Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek při vzniku krvácivých stavů

Přítomnost APA nemusí mít za následek jen trombotickou tendenci, ale i krvácivou. Ta může být zapříčiněna trombocytopenií, sekundární hypoprotrombinémií, trombocytopatií, nebo přítomností specifických inhibitorů krevního srážení. Sekundární hypotrombinémie je způsobena tvorbou komplexů, které vytváří APA vazbou na molekulu faktoru II, konkrétně na nefunkční místo. Vzniklé komplexy jsou z cirkulace odstraňovány, díky čemuž dochází ke snížení hladiny protrombinu zvýšenou clearance komplexů APA+ protrombinu. Rozhodující je poté v klinickém obraze krvácivá diatéza. Hladina protrombinu může následně dosáhnout až na hodnoty, při kterých mohou nastat provokované (krvácení po drobných úrazech či operacích, silné menstruační krvácení) nebo i spontánní projevy krvácení. Při této situaci je důležité sledovat aktivitu

protrombinového času podle Quicka. Prodlužování protrombinového času nastává pouze v přítomnosti druhotného snížení faktoru II s antifosfolipidovými protilátkami. U APS nebývá trombocytopenie významná. APA svou vazbou na krevní destičky nasedne na funkční místa a tím dojde ke spuštění funkční poruchy trombocytů (Buliková & Penka, 2006; Buliková et al., 2012).

### **3.4.1.2 Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek při vzniku trombocytopenie**

Mezi jedny z důležitých mechanismů působení APA se řadí progresivní aktivace krevních destiček, ke které dochází po vazbě antifosfolipidových protilátek na jejich povrch. V 90. letech 20. století bylo předpokládáno, že se na mírně aktivované trombocyty, produkující negativně nabitě fosfolipidy, váží imunitní komplexy tvořené APA a  $\beta_2$ -GP I. Touto vazbou je spuštěna další aktivace, tvorba mikropartikulí, rozšíření fosfolipidového povrchu s následnou zvýšenou produkcí trombinu. Aktivace destiček a vazbou  $\beta_2$ -GP I vzniká dimerická struktura, která je potřebná pro působení komplexů anti $\beta_2$ -GP I /  $\beta_2$ -GP I (Buliková et al., 2010a). Molekula  $\beta_2$ -GP I může uvolnit kationový protein destičkový faktor 4 a tím zvyšuje na povrchu krevních destiček tvorbu patogenních imunitních komplexů (Giannakopoulos et al., 2013).  $\beta_2$ -glykoprotein I může interagovat s receptorem GPIb/IX/V, jehož podjednotkou je destičkový glykoprotein Ib $\alpha$ , a také s receptorem pro apolipoprotein E, což je receptor pro lipoproteiny s nízkou denzitou. Vazbou protilátek proti  $\beta_2$ -GP I na  $\beta_2$ -GP I se přemostí tyto receptory a důsledkem je zesílení aktivace už mírně aktivovaných krevních destiček, zvýšení přilnavosti destiček a produkce tromboxanu A<sub>2</sub> (Giannakopoulos et al., 2013).

Příčiny vzniku trombocytopenie za přítomnosti APA jsou různé. Nejpravděpodobnější příčinou trombocytopenie je zvýšená spotřeba trombocytů, která je spuštěna různými způsoby. Spotřeba trombocytů může být spuštěna také důsledkem aktivace a přeměny trombocytů v mikropartikule, které obsahují fosfolipidy a zvyšují protrombotické sklony (Buliková et al., 2010a).



### 3.4.2.1 Laboratorní diagnostika lupus antikoagulans (LA)

Principem diagnostiky APS je průkaz antifosfolipidových protilátek. Nutnost pozitivitu testů je minimálně dvakrát v časovém odstupu šesti a více týdnů. Tyto diagnostické testy lze rozdělit podle způsobu detekce APA na koagulační testy (detekce lupus antikoagulans) a stanovení antigenu metodou ELISA (protilátky proti kardiolidům a  $\beta_2$ -glykoproteinu I) (Hluší & Krčová, 2003).

Vyšetření lupus antikoagulans je daleko složitější, než průkaz protilátek proti kardiolidinu a  $\beta_2$ -glykoproteinu I. Při vyšetření LPA se musí velmi rychle zpracovávat plazma (do hodiny) na bezdestičkovou plazmu speciálními centrifugačními metodami a tím není umožněna diagnostika při zasílání vzorků do centrálních laboratoří. Je důležité, aby byla plazma bezdestičková, protože trombocyty ovlivňují vyšetření. Jestliže zpracování plazmy trvá déle než hodinu, výsledky mohou být ovlivněny vyvázáním inhibitoru na destičky a jejich fosfolipidy a dochází k odstranění tohoto komplexu během přípravy plazmy. Výsledky poté mohou být falešně negativní. Další postup je určen metodikou Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu= postup založen na průkazu prodloužení testu, které je závislé na fosfolipidech (jsou použity minimálně dva screeningové testy), kdy k jeho zkrácení nedochází po přidavku normální plazmy a test je upravován přidáváním fosfolipidů. Je také důležité kontrolovat a odlišovat různé další vlivy, jako jsou specifický inhibitor a heparin. Při tomto kroku diagnostiky dochází k úzké spolupráci mezi odesílajícím lékařem a laboratoří vyšetřující vzorek (Bulíková & Penka, 2006).

Pod název lupus antikoagulans řadíme imunoglobuliny třídy IgG, IgM nebo IgA, které jsou zapojeny do hemokoagulace *in vivo*. Jde o zvláštní laboratorní fenomén, který není přímo detekovatelný jako specifický analyt. Patří sem ty APA, které *in vitro* korelují s koagulačními testy, které jsou závislé na fosfolipidech. Negativně nabitě fosfolipidy, slouží pro ATP a koagulační faktory jako katalytické povrchy, a proto o ně mezi sebou soupeří. Díky těmto povrchům dochází k prodlužování výsledných časů u koagulačních testů, mezi které patří kaolinový test (KCT), tromboplastinový test (aPTT), test s jedem Russelovy zmiže (dRVVT) a reptilázový test. *In vitro* tedy lupus antikoagulans působí jako inhibitor koagulace, který ale není specifický ke konkrétnímu faktoru (Hirmerová, 2010).



Při stanovení LPA nastávají komplikace, protože neexistuje 100% citlivý screeningový test. Identifikaci lupus antikoagulans lze stanovit dle Penka et al. (2011) pomocí:

1. Screeningové testy = testy citlivé na LPA v závislosti na fosfolipidech
2. Korekční testy = průkaz přítomnosti inhibitoru (ovlivnění heparinem, vyloučení defektu faktoru)
3. Konfirmační testy = průkaz závislosti LPA (inhibitoru) na fosfolipidech

### **Screeningové testy**

Princip těchto testů spočívá v závislosti na fosfolipidech a citlivosti na lupus antikoagulans. Mezi nejčastěji používané screeningové testy patří APTT a dRVVT s jedním Russelovy zmijs, který aktivuje v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  a fosfolipidů faktor X. Méně často se využívá kaolinový čas, který je vhodný u těhotných žen a reptilázový testu. U všech testů je přítomnost LPA identifikována na základě prodlouženého koagulačního času. Jelikož je u těchto testů snižena citlivost, musí být provedeny minimálně dva screeningové testy zajišťující průkaz prodlouženého koagulačního času. Po přidání normální plazmy a fosfolipidů může nastat, že se čas nezkrátí. V tomto případě je nutné test korigovat a rozlišovat působení dalších faktorů, jako je specifický inhibitor nebo heparin.

Na závěr jsou testy vyhodnocovány dle naměřeného koagulačního času (v sekundách) a poměru ( $R = \text{Ratio}$ ) času testované plazmy proti času kontrolní (normální) plazmy (Penka & Buliková, 2009).

#### ○ *Aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT)*

Test řadíme mezi základní koagulační testy, které mají za úlohu monitorovat vnitřní koagulační systém, hlavně faktory VII, IX, XI, XII a prekalkrein. Nejdříve se k vyšetřované plazmě přidá parciální tromboplastin (kefalin) a  $\text{Ca}^{2+}$  (chlorid vápenatý) a tím dochází v plazmě chudé na destičky k aktivaci vnitřní cesty koagulace. Jestliže chceme aktivaci zrychlit, přidáváme aktivátor, kterým je například polyfenoly, kaolin nebo křemičitany. V případě, že v plazmě detekována přítomnost protilátek typu lupus antikoagulans, lze pozorovat prodloužení koagulačního času. Koagulační čas kontrolní (normální) plazmy z koagulometru se odečte od času vyšetřované plazmy. Výsledky aPTT jsou prezentovány v sekundách a v průběhu testu se měří čas, který je nutný ke spuštění koagulace v jednotkách Ratio ( $R = \text{čas testované plazmy} / \text{kontrolní plazmy}$ ).

Prodloužený APTT-LA čas nemusí být vždy způsoben přítomností protilátek LPA, ale také například přítomností heparinu, specifického inhibitoru, dysfibrinogenémie a deficit koagulačních faktorů (Penka & Slavíčková, 2011; Pecka, 2010).

- *Test s jedem Russelovy zmije (dRVVT)*

Test s jedem Russelovy zmije (ředěný) je screeningový test využívaný k detekci protilátek typu LPA. Po přidání jedu Russelovy zmije k testované plazmě dojde za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  a fosfolipidů k aktivaci faktoru X. Aktivovaná forma faktoru poté aktivuje přeměnu protrombinu na trombin, který následně aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin až na polymerovaný fibrin (Pecka, 2010). Z koagulometru se odečte koagulační čas normální (kontrolní) plazmy od vyšetřované plazmy a vypočítá se poměr R (fyziologické hodnoty  $R=0,80-1,20$ ).

- *Kaolinový test (KCT)*

Jedná se o aPTT bez přídavku aktivátoru, je velmi citlivý na množství trombocytů v plazmě a využívá se hlavně u těhotných žen. Jakmile nastane prodloužení koagulačního času, je nutné ke korekci s normální plazmou přistupovat v poměru 1:1. Vyšetření je důležité zhotovit hned po smísení nebo po 1 a 2 hodinové inkubaci. Pokud se koagulační čas nezkrátí, můžeme indukovat přítomnost LPA v organismu.

- *Reptilázový test*

Reptilázový test využívá reptilázy (jed hada *Bothrops atrox*), který má podobnou aktivitu jako trombin, ale s rozdílem, že působení reptilázy není ovlivněno dalším vlivem, jako je heparin. Díky tomu je reptilázový test využíván ke zjištění vlivu heparinu na prodloužené aPTT a TT (Penka et al., 2014).

### **Korekční testy (směsné testy)**

Pomocí těchto testů lze prokázat přítomnost inhibitoru, a to v případě, že jsou pozitivní screeningové testy, resp. při poměru časů testované a normální plazmy větší než 1,2. Umožňují zjistit, jestli je prodloužení koagulačního času způsobeno vlivem inhibitoru, heparinu nebo defektem faktorů. Principem je sledování korekce prodloužených časů normální plazmou ve směsi vyšetřované a normální plazmy v poměru 1:1 u testů, které byly ve screeningu prodlouženy (nejčastěji aPTT) (Bulíková & Penka, 2006; Penka et al., 2001).

## Konfirmační testy

Tyto testy se využívají jen tehdy, když ve směsných testech nedojde ke korekci prodlouženého času. Využívá se stanovení na základě aPTT a dRVVT testů, jejichž principem je zvýšená koncentraci fosfolipidů s následným průkazem fosfolipidové závislosti inhibitoru. Jestliže je LPA detekován ve výše zmíněných testech, dojde ke zvýšení koncentrace fosfolipidů a následně k neutralizaci LPA. Výsledkem je zkrácení koagulačních časů.

Pod konfirmační testy patří destičkový neutralizační test (PNP), testy s hadími jedy- textarinový čas (test závislý na PL) a sarinový čas (nezavislý na PL), které jsou vyhodnocovány jako poměr časů textarin/ekarin, neboli čas screen/čas confirm/čas. Jako cut-off pro pozitivitu protilátek jsou stanoveny většinou poměry nad 1,2 (nutno zpřesnit hodnocením 99% percentilu). Testy nejsou moc propagovány a doporučovány, protože neexistují žádné standardizované principy komerčních testů (Buliková & Penka, 2006).

- Destičkový neutralizační test (PNP)

PNP řadíme mezi konfirmační testy pro diagnostiku LPA. Princip závisí na neutralizaci inhibitorů typu LPA pomocí fosfolipidů krevní destiček a díky tomu dochází ke zkrácení času aPTT. Získávat fosfolipidy trombocytů lze dvěma způsoby, a to promýváním krevních destiček s kalciovým ionoforem nebo opakovaným zmražením a rozmražením, při čemž dochází k vystavování aniontových fosfolipidů na površích trombocytů. Pro korekci koagulačních časů je nutná přítomnost LPA (Pecka, 2010).

Pro detekci lupus antikoagulans byl použit koagulační analyzátor ACL TOP 750 CTS. Přístroj je vysoce výkonný a je schopný měřit koagulační, chromogenní a imunologické testy. Mezi jeho funkce patří kontrola integrity vzorku před analýzou (naplnění odběrových zkumavek), detekce přítomnosti sraženiny v odběrové zkumavce a hodnocení stupně hemolýzy. Princip spočívá v měření a zaznamenávání doby, která je potřebná ke sražení vzorku plazmy.



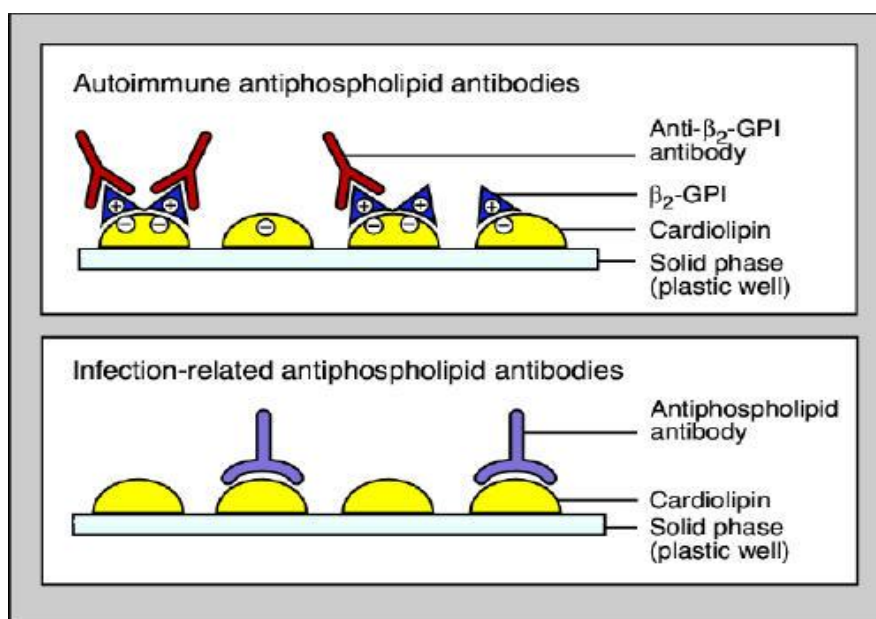
**Obrázek 3** Koagulační analyzátor ACL TOP 750 CTS

Převzato z: <https://www.instrumentationlaboratory.com/en/acl-top-family-series>

### **3.4.2.2 Laboratorní diagnostika kardiolipinových protilátek a protilátek proti $\beta_2$ -GP I**

Detekce protilátek proti kardiolipinu a protilátek proti  $\beta_2$ -glykoproteinu se provádí pomocí chemiluminiscenčních testů nebo ELISA metodik (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Mikyakis et al., 2006). Jsou založeny na principu sendvičové techniky. Test ELISA se provádí pokrytím destičky a to buď  $\beta_2$ -glykoproteinem, nebo aniontovým fosfolipidovým kardiolipinem, poté se přidá pacientova zředěná (1:50) plasma a na závěr se přidá sekundárně značená protilátka, která umožní zobrazit množství navázaných isotopů IgG a IgM (Lakos et al., 2012) protilátek. Mikrotitrační destičky pro ELISA metodu se používají dvojího typu, s vysokou citlivostí (ozářené) a nízkou citlivostí. V případě detekce antikardiolipinových protilátek se detekují ty protilátky, které se váží přímo na kardiolipin a ostatní aniontové fosfolipidy. Detekují se také autoprotiilátky, které se váží na  $\beta_2$ -GP I, jehož povrch byl pokryt aniontovým fosfolipidem (Passam & Krilis, 2004). V diagnostice APS je anti-  $\beta_2$ -GP I ELISA více citlivá než antikardiolipinová ELISA, protože při reakci jsou nejdříve detekovány nespecifické protilátky, které vznikly příčinou různých infekcí a jsou přítomny v plazmě jednotlivce (Hun tet al., 1992). Aby se předešlo problémům v rozlišování mezi nespecifickými protilátkami a APS-relevantními autoprotiilátkami, které korelují s infekcí, je potřeba otestovat APA opakovaně, a to alespoň 6 týdnů od doby průkazu pozitivita pacienta. S největší pravděpodobností opakovaně pozitivní autoprotiilátky značí příbuznost k antifosfolipidovému syndromu. ACLA ELISA nejspíše více detekuje autoprotiilátky, které jsou spojeny s APS, než anti- $\beta_2$ -GP I ELISA a LA testy (Mikyakis et

al., 2006). Testování APA je vcelku jednoduchá metoda, kterou používá mnoho laboratoří. Nevýhodou je špatná standardizace, nejasnosti v „cut-off“ rozhraní a výsledky mezi komerčně dodávanými diagnostickými sety jsou heterogenní. Proto se doporučuje podle mezinárodních klinických kritérií velmi pečlivé hodnocení výsledků a opakování vyšetření (Buliková & Penka, 2006). Chyba v diagnóze APS může být u pacientů, u kterých je zjištěn syfilis, leptospiróza, lymeská borelióza, jejichž projevem je zvýšená hladina ACLA, která u těchto infekcí není spojena s rizikem trombotických komplikací (Rand, 2003).



**Obrázek 4** Detekce antifosfolipidových protilátek pomocí metody ELISA

*Převzato od: Hanly, CMAJ (2003)*

Jestliže přetrvávají zvýšené hladiny APL protilátek, mohou být spojeny se zvýšeným rizikem žilního trombembolismu a porodnickými komplikacemi. Toto spojení definuje laboratorní část kritérií pro Antifosfolipidový syndrom, které poprvé navrhl Harris v roce 1987. Testy pro stanovení protilátek proti ACLA (třídy IgG, IgM), anti-β<sub>2</sub>-glykoproteinu I (třídy IgG, IgM) a protilátek proti lupus antikoagulans jsou definovány v kritériích pro diagnostiku APS dle International Committee for the diagnosis of APS, který je definoval v Sapporu v roce 2006.

Testy pro diagnostiku ACLA a anti-β<sub>2</sub>-glykoproteinu I obsahují β<sub>2</sub>-glykoprotein I na pevné fázi. β<sub>2</sub>-glykoprotein I přítomný v plazmě je také nazýván jako apolipoprotein H, jeho molekulová hmotnost je 44 kDa a obsahuje 5 domén. Pátá doména obsahuje seskupení pozitivně nabitých aminokyselin, která umožňuje vazbu aniontových

fosfolipidů. Byly navrženy dvě hlavní teorie, vysvětlující mechanismus, kterým ACLA a anti- $\beta_2$ -glykoprotein I antifosfolipidové protilátky rozpoznávají  $\beta_2$ GPI. První teorie je toho názoru, že protilátka musí být navázána na dvě molekuly  $\beta_2$ GPI, aby získala zvýšenou aviditu. Druhá teorie “kryptického epitopu“ se domnívá, že ACLA a anti- $\beta_2$ GPI antifosfolipidový epitop je vystaven pouze tehdy, pokud se naváže na  $\beta_2$ GPI negativně nabitý povrch nebo negativně nabitou molekulu, jako je kardiolipin. Epitop se nachází v doméně I.

Anti-  $\beta_2$ GPI IgG/IgM test je chemiluminiscenční dvoukroková imunoanalýza, která je složena z magnetických částic potažených lidským očištěným  $\beta_2$ GPI, který je zachycován ze vzorku, pokud jsou přítomny anti-  $\beta_2$ GPI antifosfolipidové protilátky. Po inkubaci, magnetické separaci a promývacím kroku se přidá indikátor, který je tvořen protilátkou proti lidskému IgG/IgM značenou izoluminolem. Poté se indikátor může vázat k částicím se zachyceným anti-  $\beta_2$ GPI. Po inkubaci se přidají činidla spouštějící luminiscenční reakci a emitované světlo je měřeno jako relativní světelné jednotky (RLUs) pomocí ACL Bio-Flash optického systému. RLUs jsou přímo úměrné koncentraci anti-  $\beta_2$ GPI ve vzorku. Tento test je stejný i pro anti-kardiolipin IgG/IgM

Pro detekci anti-kardiolipinových a anti- $\beta_2$  glykoproteinových protilátek byl použit chemiluminiscenční analyzátor Bio-flash. Tento plně automatizovaný přístroj měří protilátky v lidské citrátové plazmě a séru, pomáhá při diagnostice trombotických poruch, které souvisejí s primárním a sekundárním antifosfolipidovým syndromem v souvislosti a jinými klinickými a laboratorními nálezy.



**Obrázek 5** Koagulační analyzátor Bio-Flash

Převzato z: <https://www.inovadx.com/bio-flashr>

### 3.4.2.3 Globální testy

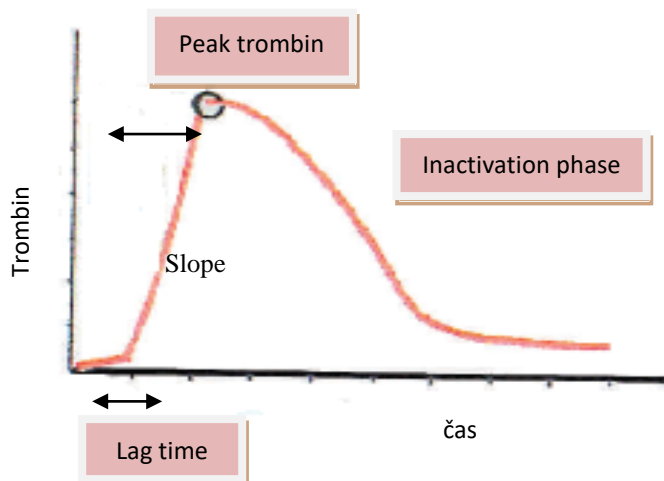
Testy využívající se k vyšetření funkce trombocytů v rámci primární hemostázy (Penka & Buliková, 2009). Jsou ukazatelem celkového projevu hemostázy, které skenují globální funkce destiček, patří sem:

- **Doba krvácení, krvácivost**= test primární hemostázy, jehož citlivost není vysoká. Podstatou je měření času, za kterého dochází v místě řezu či vpichu v kůži k zástavě krvácení. Doba krvácení může být ovlivněna některými látkami jako například kortikoidy (prodlužují dobu krvácení) a salicyláty (zkracují dobu krvácení). Jestliže je DK prodloužena, může to značit různé poruchy, jako je von Willebrandova choroba, trombocytopenie (funkční porucha trombocytů), poruchy cévní stěny atd (Matýšková et al., 1999; Edgar Faber et al., 2012).
- **Test konzumpce protrombinu**= patří mezi nespecifické a málo citlivé globální testy. Principem je stanovení množství protrombinu, který zůstane po vysrážení krve v séru při optimálních podmínkách. Během srážení se většina protrombinu přeměňuje na trombin a cca 10-20% protrombinu zůstává v séru. K opaku dochází při koagulačních poruchách, kdy velké množství nespoteřebovaného protrombinu zůstává v séru. Zbytek protrombinu lze přeměnit na trombin přidáním  $\text{Ca}^{2+}$  a tromboplastinu k vyšetřovanému séru a vzniklý trombin má za následek štěpení zevně dodaného fibrinogenu na fibrin. Při vyšetření se identifikuje množství a funkce protrombinu v hemostáze a také se sleduje aktivita nebo kvantita koagulačních složek, ke kterým dochází před přeměnou protrombinu na trombin (Pecka, 2004; Faber et al., 2012).
- **Trombelastografie (TEG)**= technika zachycující kvantitativní a kvalitativní změny, které jsou charakteristické pro tvorbu krevního koagula jeho závislost růstu na čase. V poslední době je používán automatický rotační trombelastograf, jehož podstatou je měření celkové funkce srážení plné krve (Sakalová et al., 2010). Získáme křivku, která sleduje každou fázi srážení plné krve způsobené přidávkem  $\text{CaCl}_2$  k vyšetřovanému vzorku. Vše je vizualizováno světelným paprskem. Touto metodou se vyšetřují jen závažné hemostatické defekty (Penka et al., 2003; Matýšková et al., 1999).
- **Trombin generační test (TGT)**= globální funkční test, který analyzuje a monitoruje systém hemostázy. Pro měření je používán speciální přístroj-

fluorometr. Plazma pro vyšetření se používá citrátová a je chudá nebo obohacená trombocyty. Principem testu je sledování tvorby trombinu v čase, která nás průběžně informuje o aktuálním obrazu hemostázy. Iniclace trombinu je spjata s působením vnější tenasy a po navázání TFPI na TF dochází k utlumení této cesty a do generace trombinu se zapojuje vnitřní tenasa. Všechny procesy jsou doprovázeny přítomností negativně nabitých fosfolipidů a  $\text{Ca}^{2+}$ . Reakce je způsobena díky fluorogenního substrátu po aktivaci koagulačního systému. Fluorogenní substrát je vznikajícím trombinem štěpen na fluorofor (7-amino-4-methylkumarin) vysílající fluorescenční signál, který je zaznamenáván fluorescenčním detektorem. Vzniklý signál je převáděn na aktuální koncentraci trombinu (nM) v podobě kalibrační křivky, jejíž aktualizace je vždy při změně šarže substrátu s použitím trombinového kalibrátoru (směs o známé hodnotě enzymové aktivity) (Penka et al., 2014). Měří se fluorescence produktu aminomethylkumarinu při vlnové délce 390/460 nm, jehož vznik spočívá v přeměně fluorogenního substrátu působením trombinu. Kalibrační křivka je charakterizována dle Penka et al., (2014) a Pecka (2010) několika body:

- *Lag time (min)*= čas od začátku aktivace do první detekce generace trombinu (iniciační fáze)
- *Time to peak (min)*= čas vyjadřující vytvoření maximální koncentrace trombinu.
- *Peak trombin (nM)*= hodnota pro nejvyšší koncentraci trombinu.
- *AUC (plocha pod křivkou) (nM.min)*= celkové množství vytvořeného trombinu.
- *Slope/velocity (nM/min)*= sklon/strmost křivky. Rychlost formace trombinu na minutu.
- *Inactivation phase*= fáze, při které postupně klesá tvorba trombinu





**Obrázek 6** Graf trombin generačního testu- tvorba trombinu

*Převzato a upraveno dle: Pecka (2010)*

TGT test je v klinice využíván pro sledování léčby pacientů s trombotickým onemocněním. Snaha získat celkový obraz krvácivé tendence u pacientů s diagnózou vysokého rizika krvácení. Taktéž se používá ke sledování antikoagulační léčby (hepariny, kumariny) a substituční léčby u pacientů s hemofilií a von Willebrandovou chorobou (Penka & Buliková, 2009; Penka & Slavíčková, 2011).

Stanovení generace trombinu se provádí na koagulačním analyzátoru Ceveron® Alpha. Jedná se o plně automatizovaný přístroj, který je vybaven fluorescenčním modulem, umístěným nad kyvetovým rotorem. Tento analyzátor umožňuje kromě základních testů (koagulační, turbidimetrické, chromogenní) také fluorogenní testy. Pracuje s emisní vlnovou délkou 465 nm a excitační vlnovou délkou 360 nm. Základní složky analyzátoru: fluorescenční modul, rotor se vzorky, rotor s reakčními kyvetami, čtečka čárových kódů, promývací zařízení, monitor, chlazený prostor na reagenty, sérové a reagenční pipetory.



**Obrázek 7** Koagulační analyzátor Ceveron® Alpha

Převzato z: <https://www.technoclone.com/en/instruments/ceveronr-alpha>

#### **3.4.2.3.1 Vliv antikoagulační léčby (warfarin) na globální test TGT**

Warfarin patří do skupiny kumarinových derivátů, které se používají v antikoagulační léčbě k zabránění karboxylace gama glutamových N terminálních zbytků aminokyselin proenzymů faktorů protrombinového komplexu. Dávkování warfarinu se vztahuje k jeho delšímu biologickému poločasu 2-3 dny a je podáván 1x denně. Antikoagulační léčba zabraňuje tvorbě trombinu, který následně zvyšuje tvorbu fibrinu (vznik trombu). Jak již bylo zmíněno výše, TGT test umožňuje měřit generaci trombinu v čase. Trombin hraje klíčovou roli v systému koagulace, ovlivňuje různé inhibiční a zpětnovazebné smyčky a může mít prokoagulační, ale i antikoagulační vlastnosti. Jeho přeměna je rozhodující pro pevnou fibrinovou síť. Při nevhodné generaci trombinu může docházet k patologickým stavům, jako jsou krvácivé a trombotické onemocnění (Butenas et al., 1999; Berntorp & Salvagno, 2008). Lze tedy předpokládat, že u pacientů léčených warfarinem bude křivka TGT testu a hodnoty generace trombinu pozměněny.

### 3.5 Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom je popisován jako klinický projev hyperkoagulačního stavu, který je doprovázen přítomností antifosfolipidových protilátek. APS vzniká buď samostatně, nebo důsledkem autoimunitního onemocnění. Z klinického hlediska je APS charakterizován různými projevy, jako jsou opakované arteriální či venózní trombózy, reprodukční komplikace a trvalý výskyt antifosfolipidových protilátek. Syndrom je také nazýván jako Hughesův syndrom, kdy svou složitostí patří pod různé medicínské obory (Hirmerová, 2010, Buliková & Penka, 2006). APS se vyskytuje především u lidí s mladým až středním věkem, u žen je 2-5x častější než u mužů. Výskyt APS je odhadován přibližně na 5 případů na 100 000 osob za rok (Gómez- Puerta, 2014).

Při klasifikaci je třeba se zaměřit na způsob vzniku APS. Pokud vznikne bez známé příčiny a bez spojení s jiným chorobným procesem, je zařazován mezi autoimunitní choroby a označován jako primární. Jestliže je diagnostikován u pacientů s jiným onemocněním, jako je např. maligní onemocnění, SLE, a infekce, je označován jako sekundární (Carsons, 2004).

Z pohledu diagnózy se kritéria pro APS dělí na klinické a laboratorní. Pro určení diagnózy je nutné splnit nejméně jedno klinické a jedno laboratorní kritérium. Dle Penka et al. (2009) zde patří:

- Klinická kritéria
  - Trombóza- jeden nebo více projevů arteriální nebo venózní trombózy, popřípadě trombózy malé cévy lokalizované v jakékoliv tkáni či orgánu.
  - Poruchy těhotenství- několik nevysvětlitelných potratů morfologicky normálního porodu v/po 12 týdnů gravidity. Několik předčasných porodů morfologicky normálních novorozenců v období před 34. týdnem gravidity z důvodu eklampsie nebo placentární insuficience. Několik nevysvětlitelných následných potratů před 10. týdnem těhotenství.
- Laboratorní kritéria
  - LPA- musí být prokázán v plazmě vícekrát, a to alespoň po 12 a více týdnech. Jsou provedeny screeningové, korekční a konfirmační testy. Detekce se řídí podle doporučení Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu (ISTH)

- ACLA- průkaz v séru či plazmě v časovém rozmezí 12 a více týdnů. Měření je provedeno standardizovaným typem ELISA metody. Výskyt IgG nebo IgM izotopů ve středním nebo vysokém titru protilátek.
- Anti-  $\beta_2$ GPI- průkaz v séru či plazmě spolu s IgG a IgM izotopy v časovém odstupu 12 a více týdnů. Měření je provedeno ELISA metodou.

## 4 STATISTIKA

Při porovnávání dvou skupin v hodnotách kvantitativního znaku, se nejdříve musí ověřit, zda mají hodnoty kvantitativního znaku v obou porovnávaných skupinách normální distribuci. Pro ověření se používá test Shapiro-Wilk, což je jednovýběrový test, jehož výsledkem je potvrzení či zamítnutí nulové hypotézy, že dosazené hodnoty pochází z normálního rozdělení. V případě, kdy v jedné nebo obou skupinách nejsou hodnoty kvantitativního znaku normálně distribuovány, použije se k porovnání skupin Mann-Whitney U test a také Spearmanova korelační analýza. Mann-Whitney U test je neparametrický test, který je nezávislý na rozložení proměnné.

Statistická analýza byla provedena na Ústavu lékařské biofyziky FN UPOL, data zpracovala Mgr. Jana Zapletalová, Dr. za využití software SPSS verze 22. Závislost mezi jednotlivými koagulačními parametry byla posuzována pomocí Spearmanovy korelační analýzy. Mann-Whitney U test byl použit pro analýzu závislosti mezi pozitivitou sledovaných markerů a TGT t, TGT max a TGT E. K testu normální distribuce byl použit test Shapiro-Wilk. Všechny testy byly dělány na hladině signifikance 0,05.

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

- Analyzátor ACL TOP 750 CTS (Instrumentation laboratory, Milano, Itálie)
- Analyzátor Bio-Flash (Instrumentation laboratory, Milano, Itálie)
- Analyzátor Ceveron® Alpha (Technoclone Herstellung von Diagnostika und Arzneimitteln GmbH, Vídeň, Rakousko)
- Stolní centrifuga 5424 (Eppendorf)
- Zkumavky a jehly VACUETTE ® s obsahem 3,2% citrátu sodného (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Rakousko)
- Automatické pipety 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburk, Německo)
- Kyveta ACL TOP
- Kyveta Bio-Flash
- Laboratorní plast a sklo
- Ledničky (4-8°C) a mrazící boxy (-20°C, -80°C)
- Biologický termostat BT 120 (LAB systém)

### 1.1 Biologický materiál

- Nesrážlivá krev s přidavkem citrátu sodného (poměr 1:10)
- Kalibrační a kontrolní plazma

## 2 DIAGNOSTIKA A REAGENCIE

- Destilovaná voda
- CaCl<sub>2</sub> (25 mmol/l)
- ACL TOP 750 CTS
  - Lac Screen
  - Lac Confirm
  - Platelet neutralizing reagent
  - Rinse solution ACL TOP
- Bio-Flash
  - aCL IgG, IgM, beta-2-GPI IgG, IgM, Domain I kartridge
  - aCL IgG, IgM, beta-2-GPI IgG, IgM, Domain I kalibrátor 1
  - aCL IgG, IgM, beta-2-GPI IgG, IgM, Domain I kalibrátor 2
  - aCL IgG, IgM, beta-2-GPI IgG, IgM, Domain I kontrola 1
  - aCL IgG, IgM, beta-2-GPI IgG, IgM, Domain I kontrola 2
  - Rinse Solution Bio-Flash
- Ceveron® Alpha
  - TGA TECHNOTHROMBIN CALIBRATOR- 1nM trombinový kalibrátor
  - Vyšetřovací kit TECHNOTROMBIN® TGA
    - LOW RC TECHNOTROMBIN TGA- 5 pM rekombinační lidský tkáňový faktor (rhTF), nízká koncentrace fosfolipidových micel, pufr Tris-Hepes-NaCl
    - REACTION BUF TECHNOTROMBIN TGA- Tris (tris(hydroxymethyl)methylamin)- Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonová kyselina)- NaCl pufr, hovězí sérový albumin
    - SUB TECHNOTROMBIN TGA- 1 mM fluorogenní peptidový substrát Z-Gly-Gly-Arg-AMC

## 3 PREANALYTICKÁ ČÁST

### 3.1 Odběr vzorku

Před zahájením jakékoliv antitrombotické léčby nebo v definovaném časovém odstupu po přerušení je nutné provést odběr vzorku. Při odběru se musí pracovat co nejšetrněji, aby se zabránilo uvolnění aktivačních látek. Používaný materiál je odebírán do umělohmotných nebo silikonovaných skleněných zkumavek do 0,0109 M citrátu sodného v poměru 1 díl citrátu na 9 dílů krve.

Jelikož jsou výsledky koagulačních testů závislé na poměru  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a  $\text{Ca}^{2+}$  chelatačního roztoku, je nutné optimalizovat množství citrátu sodného v odběrovce u pacientů, kteří mají nízký hematokrit ( $< 0,25$ ). Optimalizace je provedena dle vzorce:

$$\text{ml citrátu sodného} = \frac{(100 - Hct)}{(595 - Hct)} * \text{ml odebrané krve}$$

### 3.2 Zpracování vzorku-centrifugace

Naplněnou zkumavku jemně, ale pořádně promícháme. Optimální centrifugace probíhá při 2500 G po dobu 10 minut při 25°C. Centrifugace se ještě jedenkrát opakuje, aby vyšetřovaná plazma obsahovala co nejmenší množství trombocytů ( $< 10 \text{ G/l}$ ) a tím se zamezilo výskyt falešně negativních výsledků.

### 3.3 Uchování vzorku

Vzorek je nutné zpracovat nejpozději do 2 hodin od odběru, aby se výsledky mohly považovat za hodnotitelné. Oddělená plazma se může napipetovat po aliquotech a zamrazit při -20°C. Zamražení by mělo být provedeno co nejrychleji, není doporučeno opětovné rozmražování a zamražování. Ideální podmínky pro dlouhodobější zamražení je při -80°C nebo v tekutém dusíku při -179°C .

Před vyšetřením se musí vzorky rozpustit při 37°C ve vodní lázni po dobu 5 minut, a to do té doby, až je plazma úplně zhomogenizována.



## 4 VYŠETŘOVANÝ SOUBOR PACIENTŮ

Tato studie byla provedena na souboru vzorků, u kterých byla zjištěna přítomnost lupoidních antikoagulancí a antifosfolipidových protilátek (protilátky proti kardiolipinu a  $\beta_2$ -glykoproteinu I). Skupina vyšetřovaných zahrnovala 85 pacientů, z nichž 64 bylo žen (75%) a 21 mužů (25%). Průměrný věk u žen byl 36,5 let a u mužů 40 let. U všech pacientů byl proveden trombin generační test, který nás informoval o aktuální koncentraci trombinu ve vzorku v závislosti na čase. Následně byla zjišťována vzájemná korelace jednotlivých vyšetřovaných markerů spolu s výsledky TGT.

## 5 LABORATORNÍ METODY

### 5.1 Výběr pacientů

Tato studie byla provedena na souboru krevních vzorků od 85 pacientů s detekovanou pozitivitou antikardiolipinových protilátek, kteří byli posláni do naší laboratoře. Vzorky citrátové plazmy byly okamžitě analyzovány nebo uloženy při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  pro CLIA.

### 5.2 Odběr krve

Odběr krve se provádí v jedné vakuové zkumavce za použití jehly Vacuette® (Greiner Bio-One, Vídeň, Rakousko) s pufrovaným roztokem obsahujícím citrát sodný v koncentraci  $0,109\text{ mol / l}$  (3,2%). Vakuový systém zajišťuje zachování poměru krve a antikoagulans v požadovaném poměru 1:10. Pak byla krev pečlivě promíchána ve zkumavce tím, že náběrovka byla několikrát jemně otočena vzhůru a transportována do laboratoře. Pak byl vzorek centrifugován dvakrát po dobu 10 minut při 3000 g, horní vrstva aspirátu 0,5 ml plazmy chudé na destičky (PPP) byla zmrazena a skladována při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ , dokud nebylo provedeno CLIA stanovení. Pro vlastní analýzu byl vzorek rozmrazen v termostatu při  $37^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 minut.

### 5.3 Identifikace lupus antikoagulans

Protilátky typu lupus antikoagulans byla detekovány dvěma testy závislými na fosfolipidech aPTT-SP (Werfen, Milano, Itálie) a dRVVT (Werfen, Milano, Itálie).

### 5.4 Identifikace ACLA a anti- $\beta_2$ glykoprotein I

ACLA a anti- $\beta_2$  glykoprotein I včetně D1 anti- $\beta_2$ GPI protilátek byly měřeny pomocí CLIA souprav (Werfen, Barcelona, Španělsko). Výsledky jsou vyjádřeny v U / ml. Metoda CLIA byla prováděna na random access analyzátoru BioFlash (Werfen, Barcelona, Španělsko), metodikou používající dvoukrokovou imunoanalýzu založenou na principu chemiluminiscence. Komplex  $\beta_2$ GPI nebo kardiolipin /  $\beta_2$ GPI se používá k potažení magnetických částic a lidský anti-IgG nebo anti-IgM je označen konjugátem. Během první inkubace se specifické protilátky prezentované ve vzorku, v kalibrátorech nebo v kontrolách vážou na pevnou fázi. Během druhé inkubace reagoval konjugát s

protilátkami zachycenými na pevné fázi. Po každé inkubaci se materiál, který není vázán pevnou fází, odstraní odsátím a opakovaným promytím.

Množství značeného konjugátu vázaného na pevnou fázi se vyhodnocuje chemiluminiscenční reakcí a měří se světelným signálem. Generovaný signál, měřený v RLU (Relative Light Units), indikuje koncentraci specifických protilátek přítomných ve vzorku. Pro ACLA IgG nebo IgM jsou koncentrace kalibrátorů vyjádřeny v U / ml (U = jednotky) a kalibrovány proti referenčnímu séru „Harris“. Pro anti- $\beta_2$ GPI IgG nebo IgM jsou koncentrace kalibrátorů vyjádřeny v U / ml a kalibrovány proti internímu referenčnímu standardu, který není dále specifikován výrobcem.

Každý vzorek byl analyzován dvakrát (kalibrátory, kontroly, referenční populace a vzorky pacientů). Stanovili jsme interní mezní hodnoty s použitím 50 zdravých dobrovolníků metodou percentilů (99.). Materiál kontroly kvality poskytovaný výrobcem byl analyzován v každém cyklu.

Kontrolní sada APS IgM nebo IgG poskytuje pozitivní kontrolu připravenou k použití, kde známe množství protilátek ACLA nebo anti-  $\beta_2$ GPI a negativní kontrolu obsahující normální lidské sérum. V důsledku pozitivních kontrol byly hodnoceny nepřesné charakteristiky.

## **5.5 Trombin generační test (TGT)**

Měření generace trombinu bylo provedeno na automatickém fluorogenním koagulometru Ceveron Alpha (Technoclone, Vídeň, Rakousko) za použití diagnostických souprav Technotrombin (Technoclone, Vídeň, Rakousko).

Princip měření trombinové generace vychází z postavení trombinu v koagulačním procesu, kde představuje centrální enzym. Trombin zajišťuje aktivaci krevního srážení, zároveň ale v pokročilých fázích procesu zprostředkovává samotnou inhibici hemostatických pochodů, hraje významnou roli v mezibuněčné signalizaci, ovlivňuje fibrinolýzu a zánětlivé procesy. Uvedené funkce jsou realizovány skrze plejádu enzymatických reakcí, které vyžadují těsnou koordinaci. V řadě reakcí vystupuje trombin jako enzymatický substrát, jindy působí jako kofaktor. Jeho úloha v hemostáze je multifunkční, občas i bivalentní. Monitorování tvorby trombinu se jeví jako vhodný postup pro globální vyšetření funkce hemostázy.

Principem používaného měření je in vitro monitorace vzniku trombinu v plasmě po aktivaci koagulační kaskády tkáňovým faktorem (TF). Reakce probíhá za účasti

negativně nabitých fosfolipidů a  $\text{Ca}^{2+}$ . Generovaný trombin štěpí chromogenní nebo fluorogenní substrát, který je odpovídající metodou detekován. Nevýhodou chromogenních substrátů je jejich pomalejší štěpení trombinem, nižší afinita k trombinu a potřeba blokace vzniku fibrinu ve vyšetřované plasmě. Použití fluorogenního substrátu je vhodnější navíc i proto, že generovaný fluorogenní signál není rušen vznikající sraženinou ani přítomností trombocytů.

Výsledkem měření je křivka odrážející aktuální kapacitu systému pro generaci trombinu, která je charakterizována třemi hlavními parametry: dobou do nástupu generace trombinu (lag fáze), maximální koncentrací trombinu (peak) a plochou pod křivkou, odrážející celkové množství vzniklého trombinu (endogenní trombinový potenciál, ETP).

## 6 VÝSLEDKY

V této kapitole je vyšetřovaný soubor 85 pacientů shrnut v tabulce, kde jsou uvedena naměřená data jednotlivých testů na přítomnost sledovaných protilátek spolu s jejich pozitivitou (červená barva) či negativitou. Výsledky trombin generačního testu jsou taktéž přidány do tabulky a následně byla vyhodnocována korelace mezi hodnotami TGT a hodnotami protilátek, které byly naměřeny koagulačními testy. Po získání všech dat byli pacienti rozděleni na základě počtu pozitivit ve vyšetřovaných markerech.

**Tabulka 2** Hodnoty APA u všech vyšetřovaných pacientů.

Číslo pacienta	LPA	Anti-Kardiolipiny		Anti-β-2 glykoprotein			TGT		
		ACA IgG (U/ml)	ACA IgM (U/ml)	Doména 1 (CU/ml)	β2 IgG (U/ml)	β2 IgM (U/ml)	TGT t (min)	TGT max (nM)	TGT E (nM)
1	Negat.	41,1	3,5	3,7	6,9	3,5	11,7	9	180,4
2	Pozit.	16,8	10,1	<3,6	180,1	6	9,5	42,6	774,5
3	Negat.	57,7	2,3	43,8	6,6	1,9	4,1	221,5	2924
4	Pozit.	485,1	6	4673	2052,2	9,2	5,4	258,3	3169,6
5	Pozit.	132,9	109,3	99,6	800,9	116,2	4,9	380,3	3359,9
6	Pozit.	566,5	4	5787	2805,2	5	6,3	254,8	2911,1
7	Pozit.	3,5	127,5	<3,6	34,5	83,1	4,9	309	2740,1
8	Pozit.	16,2	48,7	26,8	70,7	21,5	5,4	281,9	3327,1
9	Pozit.	667,1	69,1	1185,9	3834,5	70,7	5	250,1	2960,7
10	Pozit.	56,6	4,8	15,1	154,6	15,1	4,4	405,6	3244,9
11	Negat.	100,6	2,8	18,1	13,9	2,1	4,9	194,6	2525,9
12	Pozit.	1336,7	17,5	>1380,3	>6100	25,5	6,6	190,1	2442,9
13	Pozit.	35,5	4,2	7,5	<6,4	1,9	5,6	270,3	2860,2
14	Pozit.	1292	7,7	449,6	>6100	14,1	5	188,4	2241,2
15	Pozit.	62,7	4,9	350,1	7,1	1,9	7,9	120	2070,9
16	Pozit.	745,3	16,4	1139,8	4342,4	12,7	6,4	114,8	1983,6
17	Pozit.	43,2	78,7	40,7	70,1	28,7	5	171,8	2503,5
18	Pozit.	145,6	9	45	635,9	6	5	166,3	2265,7
19	Pozit.	1115,2	235,9	49,2	<6100	422	11	46,3	822,6
20	Pozit.	125,2	96,7	84,8	573,2	116	5,5	176,7	2335
21	Pozit.	81,6	4	155,7	459,4	<1,1	12,3	28,7	467,5
22	Pozit.	728,5	60,8	1377	4125,2	60,3	5,8	223,4	1736,2
23	Pozit.	58,5	110,9	34,7	8	16,3	4,8	221,9	3005,7
24	Pozit.	102,4	4,5	253,9	170,8	6,5	11,7	28	494,4
25	Pozit.	119	14,8	128,4	378,4	22,3	5,4	145	1963,7
26	Pozit.	97,3	84,3	76,8	536	167,2	5,1	292,7	2868,8

27	Pozit.	199,2	90,8	308	479	157,2	7,5	82,6	1027,2
28	Pozit.	674,2	53,9	1561,5	3511,2	56,4	4,4	280,5	3064
29	Pozit.	73,8	76,7	23,4	171,2	219,9	8,4	72	964,2
30	Pozit.	491,4	29,7	777,5	2628,7	35,8	4,8	368,3	3405,1
31	Pozit.	110,7	6	8	167	„<1,1	3,7	550,4	3461
32	Pozit.	56,6	4,8	15,1	154,6	3,5	5,2	327,2	2802,5
33	Pozit.	93,5	76	82,8	611,8	159,8	4,6	403,7	3308,4
34	Pozit.	429,8	5,3	765,2	2903,9	„<1,1	9,6	29,6	424
35	Pozit.	3551	10,4	2031,8	14952	23,9	6,2	233,4	2363,3
36	Negat.	52,8	3,4	32,7	22,7	1,7	3,4	461,2	3399,8
37	Pozit.	863	56,1	429,5	3688,8	84	8,7	67	947,8
38	Pozit.	97,3	84,3	76,8	536	167,2	4,5	430,9	3619,7
39	Pozit.	1186,4	38,8	253,1	„>6100	52,4	9,4	147,7	2140,4
40	Pozit.	564,1	7	5608,9	2087,2	15,9	5,7	398,8	3598,2
41	Pozit.	11,9	412,8	26,2	38,1	400,4	3,5	685,8	3892,1
42	Negat.	31,8	5,4	„<3,6	„<6,4	9,9	3,8	637	4101,7
43	Pozit.	107,1	29	62,7	216,8	43,2	3,8	497,8	3532,5
44	Pozit.	211,2	20,9	177	888,2	39,1	5	190,2	1740,2
45	Negat.	3,3	50,3	„<3,6	„<6,4	90,9	4,1	312,5	2650,6
46	Negat.	5,4	45,2	„<3,6	8,4	25,5	3,1	676,9	4313
47	Negat.	51,5	4,9	24,6	265,7	3,4	4,5	217,2	2737,5
48	Negat.	41,6	74,4	5,5	161,2	187,5	3,6	578,7	3651,6
49	Pozit.	1075,2	37,4	298,1	5714,6	44,3	8,9	79,7	1581,7
50	Pozit.	8,6	2	8,8	55,5	1,8	4,2	366,2	3421,8
51	Pozit.	55,7	99,9	4,5	8,9	192,2	6,6	255	2762,9
52	Negat.	6,4	73,4	„<3,6	„<6,4	2,2	4,2	381	3283,2
53	Negat.	34,4	5,4	„<3,6	„<6,4	„<1,1	4,4	309,3	3169,1
54	Negat.	143,8	4	85,1	401,7	3,7	4,1	383,5	3075,1
55	Pozit.	235,3	21,1	72,1	1154,4	38,5	5	314,8	2697,8
56	Pozit.	47,4	27,4	20,3	35,7	10,9	4,8	378,8	3502,7
57	Pozit.	2011,4	10	„>1380,3	„>6100	10,9	5,7	384,3	3210,2
58	Pozit.	23,1	3,7	52	61,3	3,5	5,1	116	1067,8
59	Pozit.	107,2	27,4	68	197,5	41,4	4,1	424,7	3231
60	Negat.	65,3	3,8	90,8	305,5	1,2	4,4	436,8	3646,9
61	Pozit.	1058,9	168,9	43,5	„>6100	399,1	5,8	115,5	1224,6
62	Pozit.	9,7	326	31,1	37,9	266,1	4,1	371,8	2768,7
63	Pozit.	58,5	110,9	34,7	8	16,3	3,9	424,3	3332,5
64	Pozit.	568	83,2	713,6	2308,2	82,4	4	380,3	3313,9
65	Negat.	143,8	4	85,1	401,7	3,7	4,2	331,2	3018,6
66	Negat.	58,6	2,7	28,5	8	2	5,9	156,6	2203,2
67	Pozit.	966,2	428,2	568,7	„>6100	342,4	7,5	60	1362,2
68	Pozit.	187,6	16	157,2	717,7	20,4	20,7	5,5	74,6
69	Pozit.	1336,7	17,5	„>1380,3	„>6100	25,5	17,4	1,6	19,7
70	Pozit.	679,1	61,5	1351,1	3917,5	51,6	4,6	332,1	3515,1

71	Pozit.	2,9	4,8	59,2	≤6,4	1,3	4,1	495,3	3688,2
72	Pozit.	29,2	4,7	31,2	17,4	1,2	3,8	316,3	3059,3
73	Pozit.	70,1	35,6	36,7	204,2	52,2	4,5	343,5	3208,9
74	Pozit.	34,8	3,5	26,2	6,7	≤1,1	3,8	438,1	3394,5
75	Pozit.	1115,2	235,9	49,2	≥6100	422	6,4	153,7	1595,2
76	Pozit.	56,6	156,9	66,7	348,4	74,2	5,8	338,5	3552
77	Negat.	52,8	3,4	32,7	22,7	1,7	3,7	340,2	3145,2
78	Pozit.	1075,2	37,4	298,1	5714,6	44,3	7,8	154,2	2284,4
79	Pozit.	22,7	3,5	51,6	50,7	1,2	3,8	385,2	3092,5
80	Negat.	49,8	3,9	27	115,3	2,9	3,3	541,3	3455,8
81	Pozit.	47,4	27,4	20,3	35,7	10,9	3,7	687,6	3903,2
82	Pozit.	2011,4	10	≥1380,3	≥6100	10,9	4,9	332,2	2888,9
83	Pozit.	23,1	3,7	52	61,3	3,5	4,7	113,6	1025,1
84	Negat.	65,3	3,8	90,8	305,5	1,2	4,1	420,3	3544,4
85	Pozit.	107,2	27,4	68	197,5	41,4	3,4	561,1	3438,2

Vysvětlivky: LPA- lupus antikoagulans, TGT t- čas do zahájení generace trombinu, TGT max- maximální koncentrace generovaného trombinu, TGT E- celková plocha pod křivkou vyjadřující celkové množství generovaného trombinu



**Obrázek 8** Procentuální zastoupení všech vyšetřovaných pacientů, rozdělených podle počtu pozitivit ve sledovaných protilátkách (LPA, anti-kardiolipiny, anti-  $\beta_2$ -glykoprotein I).

Vysvětlivky: 1/3 pozit. (singlepozitivní)- pacienti pozitivní jen v jedné ze tří sledovaných protilátek

2/3 pozit. (doublepozitivní)- pacienti pozitivní ve dvou ze tří sledovaných protilátek

3/3 pozit. (triplepozitivní)- pacienti pozitivní ve všech třech sledovaných protilátkách

V grafu na obrázku 8 jsou pacienti rozděleni podle počtu pozitivit ve třech vyšetřovaných markerech (LPA, anti-kardiolipiny, anti- $\beta_2$ -glykoprotein I). Největší skupinu (68%) tvoří pacienti, jejichž pozitivita byla prokázána u všech tří markerů. Nejmenší byla naopak skupina pacientů (8%), kteří byli pozitivní jen v jedné protilátce.

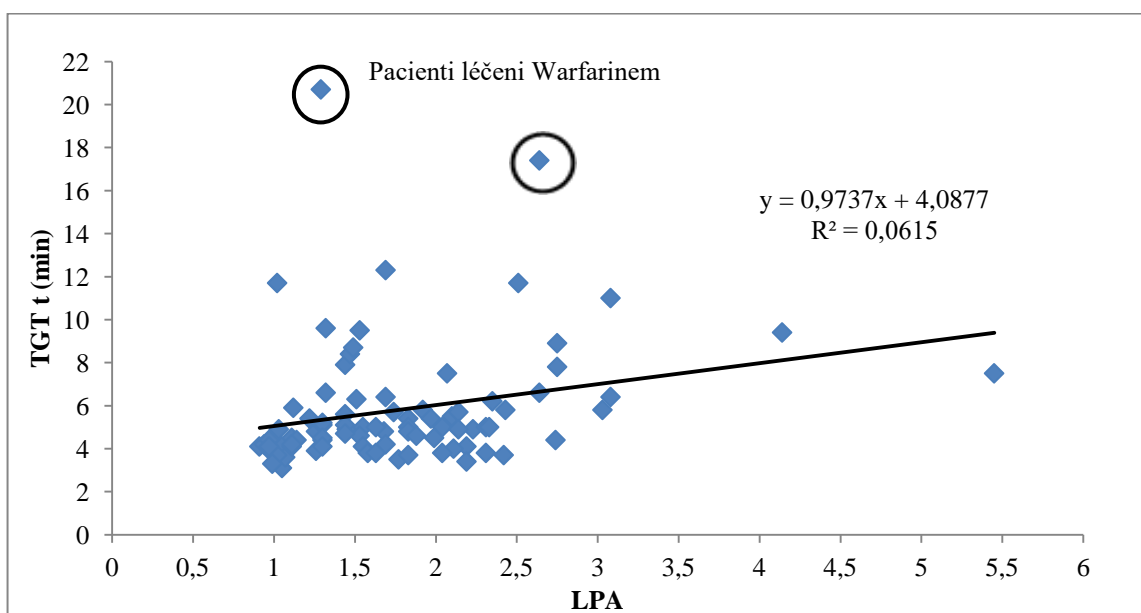
## 6.1 Grafické a statistické hodnocení výsledků

**Tabulka 3** Statisticky vyhodnocená korelace mezi LPA a hodnotami trombin generálního testu za použití Spearmanovy korelační analýzy

list 4		TGT t (min)	TGT max (nM)	TGT E (nM)
LPA	Correlation Coefficient	<b>0,362</b>	<b>-0,257</b>	<b>-0,243</b>
	p	<b>0,001</b>	<b>0,018</b>	<b>0,025</b>

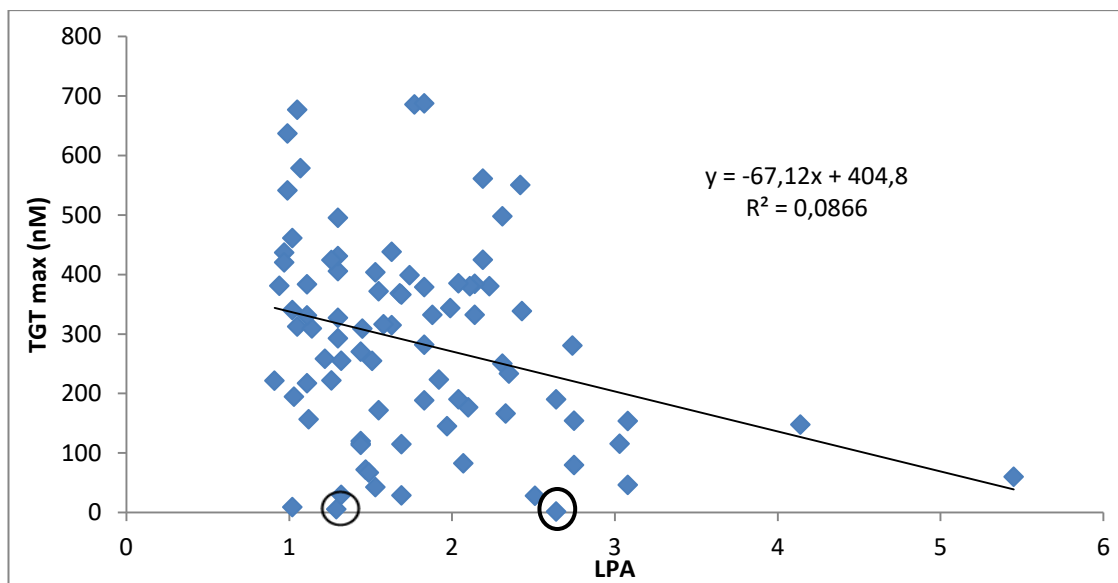
**Tabulka 4** Statistické hodnocení souboru pozitivních a negativních pacientů na LPA a jejich vzájemná korelace s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu.

list 4	LPA pozitivita						Mann-Whitney U test p
	0			1			
	Median	min	max	Median	min	max	
TGT t (min)	<b>4,1</b>	3,1	11,7	<b>5,1</b>	3,4	20,7	<b>0,0003</b>
TGT max (nM)	<b>361</b>	9,0	677	<b>258</b>	1,6	688	<b>0,027</b>
TGT E (nM)	<b>3157</b>	180	4313	<b>2803</b>	20	3903	<b>0,034</b>

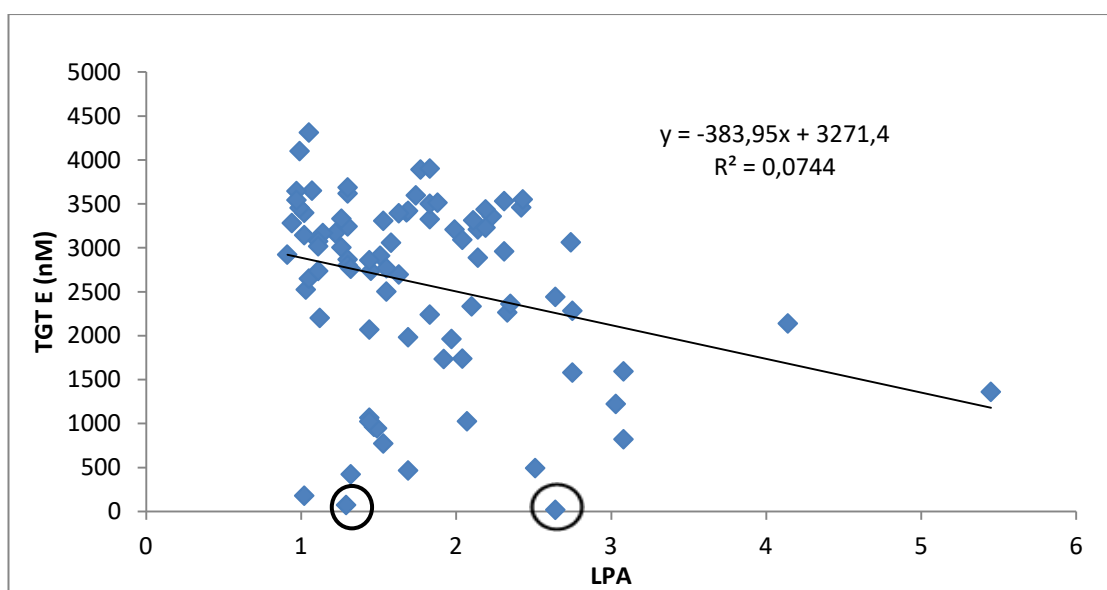


**Obrázek 9** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami LPA a TGT t.





**Obrázek 10** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami LPA a TGT max.



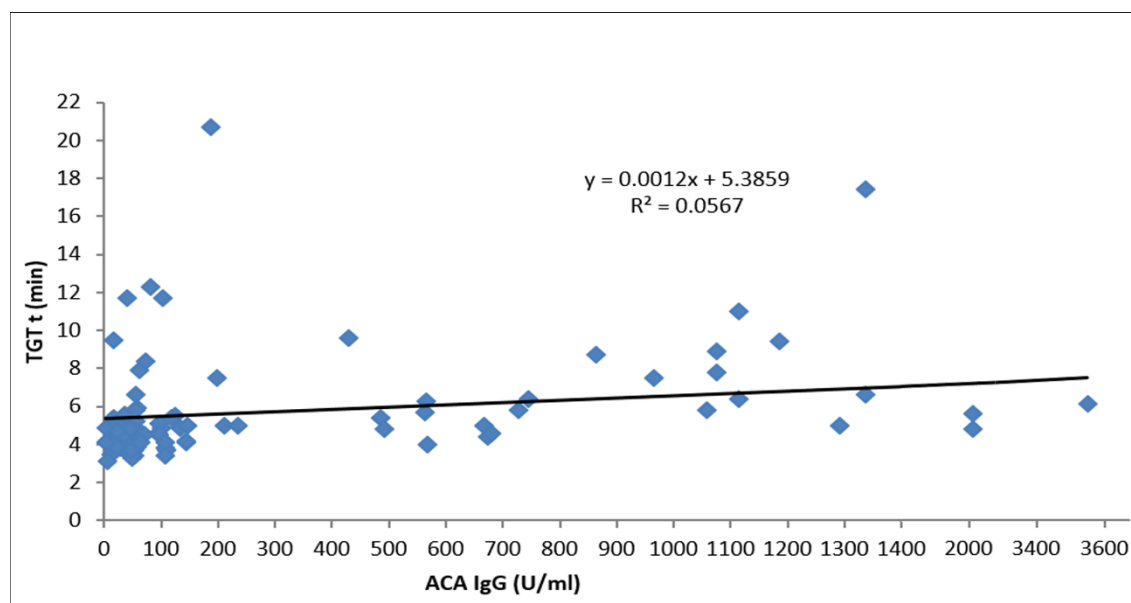
**Obrázek 11** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami LPA a TGTE.

**Tabulka 5** Statisticky vyhodnocená korelace mezi ACA IgG a hodnotami trombin generačního testu za použití Spearmanovy korelační analýzy

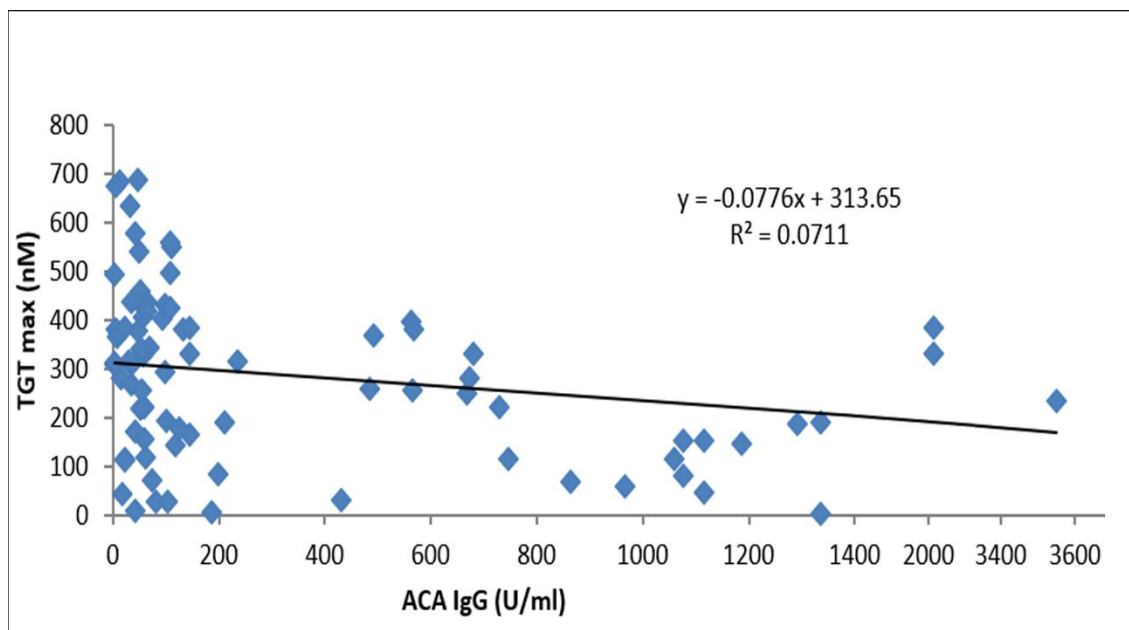
list 5		TGT t (min)	TGT max (nM)	TGT E (nM)
ACA IgG (U/ml)	Correlation Coefficient	<b>0,497</b>	<b>-0,371</b>	<b>-0,355</b>
	p	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,001</b>

**Tabulka 6** Statistické hodnocení souboru pozitivních a negativních pacientů na ACA IgG a jejich vzájemná korelace s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu.

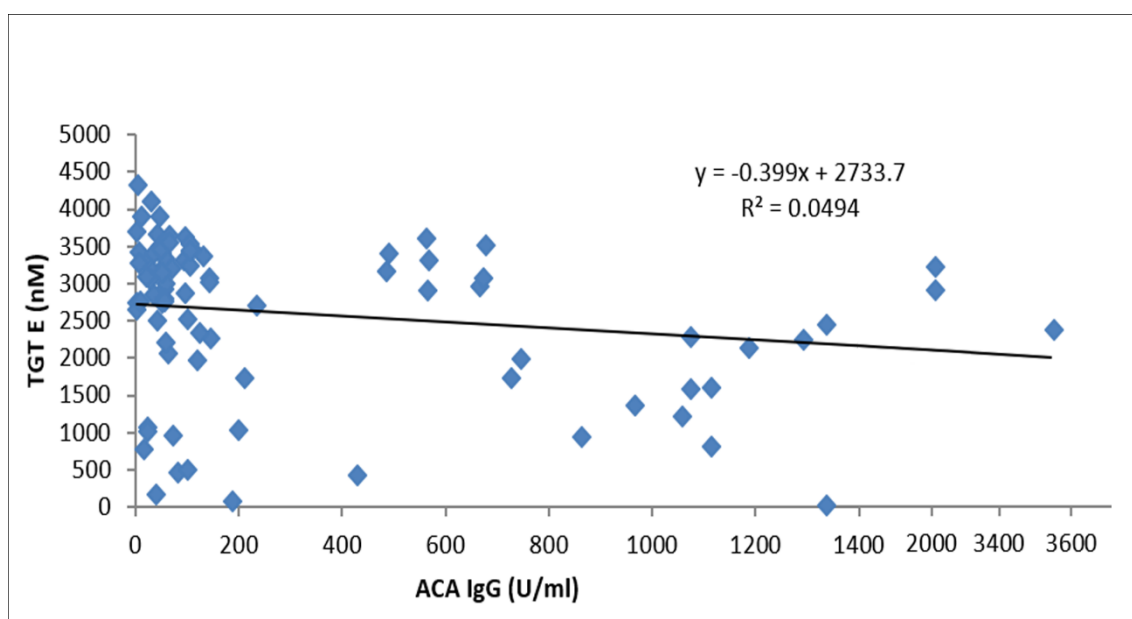
list 5	ACA IgG pozitivita						Mann-Whitney U test p
	0			1			
	Median	min	max	Median	min	max	
TGT t (min)	4,2	3,1	9,5	5,0	3,3	20,7	0,093
TGT max (nM)	366	42,6	686	264	1,6	688	0,107
TGT E (nM)	3327	775	4313	2879	20	4102	0,072



**Obrázek 12** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami ACA IgG a TGT t.



**Obrázek 13** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami ACA IgG a TGT max.



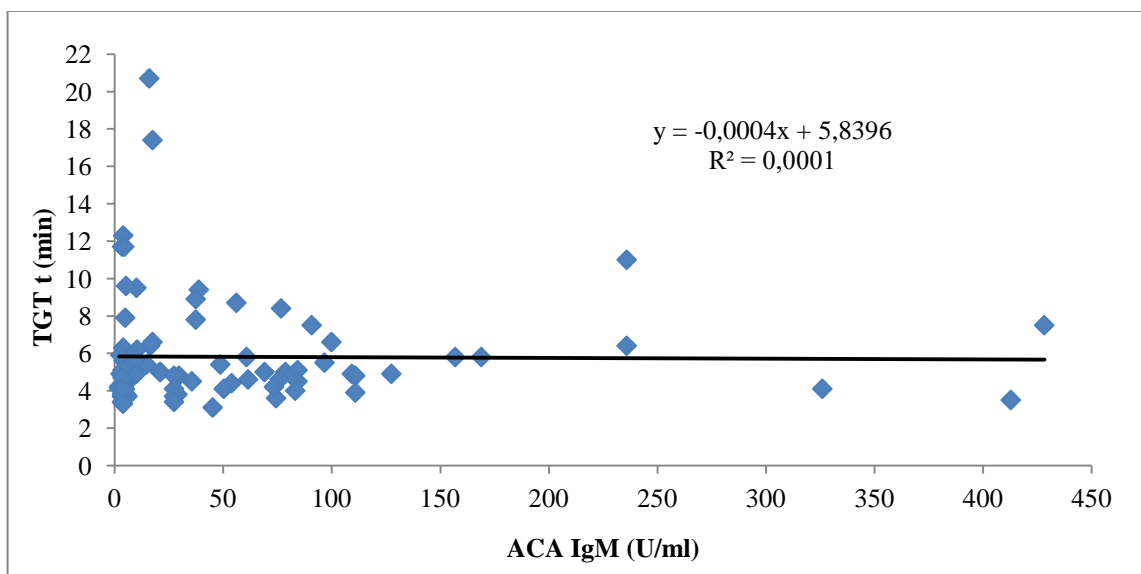
**Obrázek 14** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami ACA IgG a TGT E.

**Tabulka 7** Statisticky vyhodnocená korelace mezi ACA IgM a hodnotami trombin generačního testu za použití Spearmanovy korelační analýzy

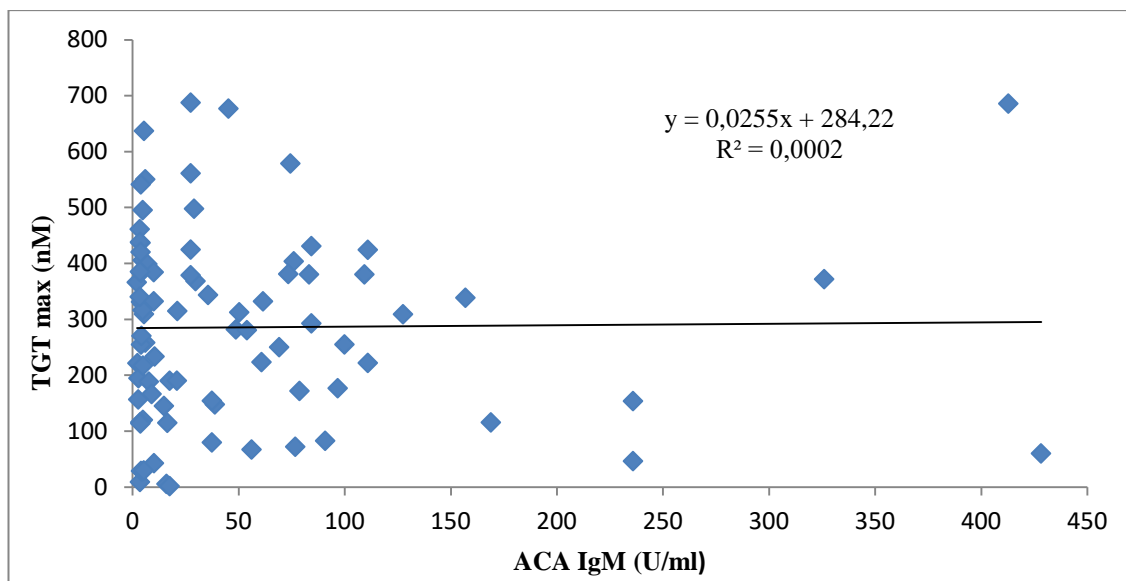
list 6		TGT t (min)	TGT max (nM)	TGT E (nM)
ACA IgM (U/ml)	Correlation Coefficient	0,143	-0,032	-0,012
	p	0,192	0,771	0,914

**Tabulka 8** Statistické hodnocení souboru pozitivních a negativních pacientů na ACA IgM a jejich vzájemná korelace s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu

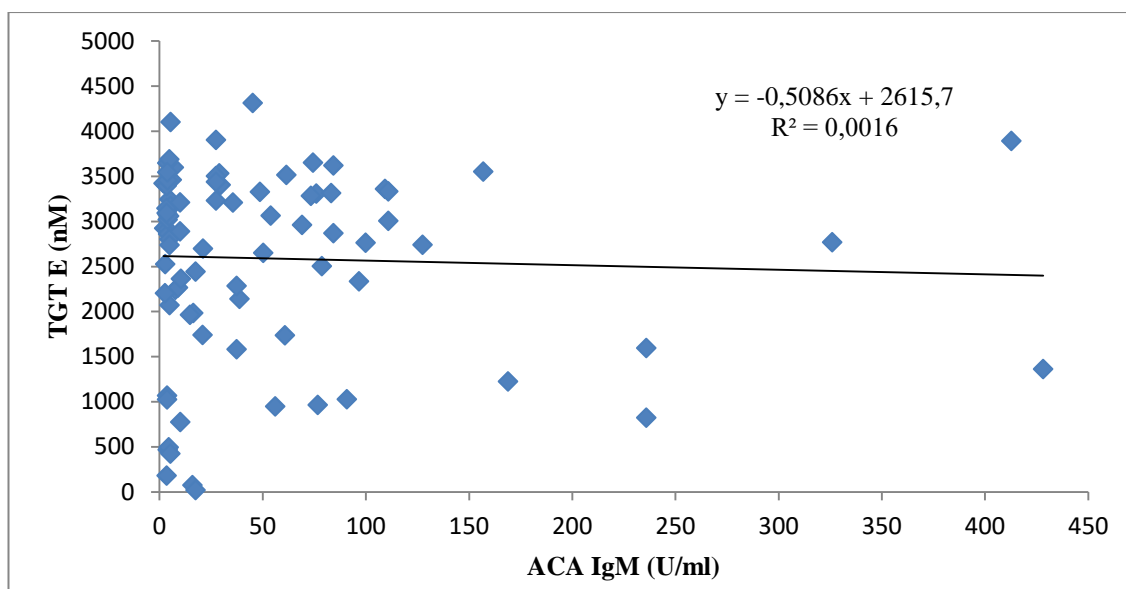
list 6	ACA IgM pozitivita						Mann-Whitney U test p
	0			1			
	Median	min	max	Median	min	max	
TGT t (min)	5,0	3,3	20,7	4,9	3,1	11,0	0,748
TGT max (nM)	258	1,6	637	311	46,3	688	0,351
TGT E (nM)	2889	20	4102	2983	823	4313	0,292



**Obrázek 15** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami ACA IgM a TGT t.



**Obrázek 16** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami ACA IgM a TGT max.



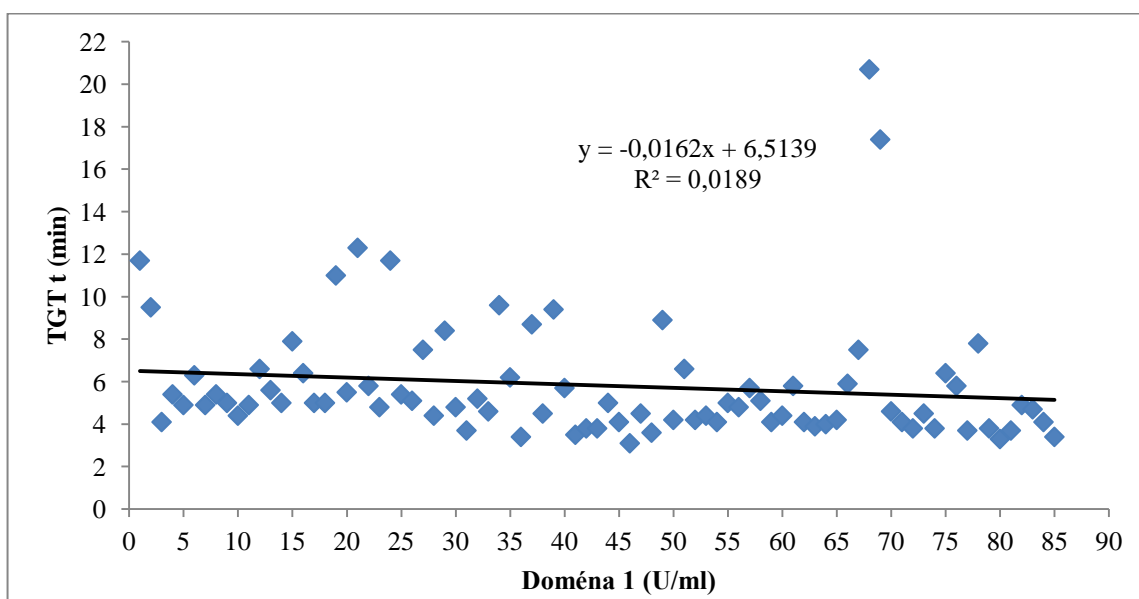
**Obrázek 17** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami ACA IgM a TGT E.

**Tabulka 9** Statisticky vyhodnocená korelace mezi Doménou 1 a hodnotami trombin generačního testu za použití Spearmanovy korelační analýzy

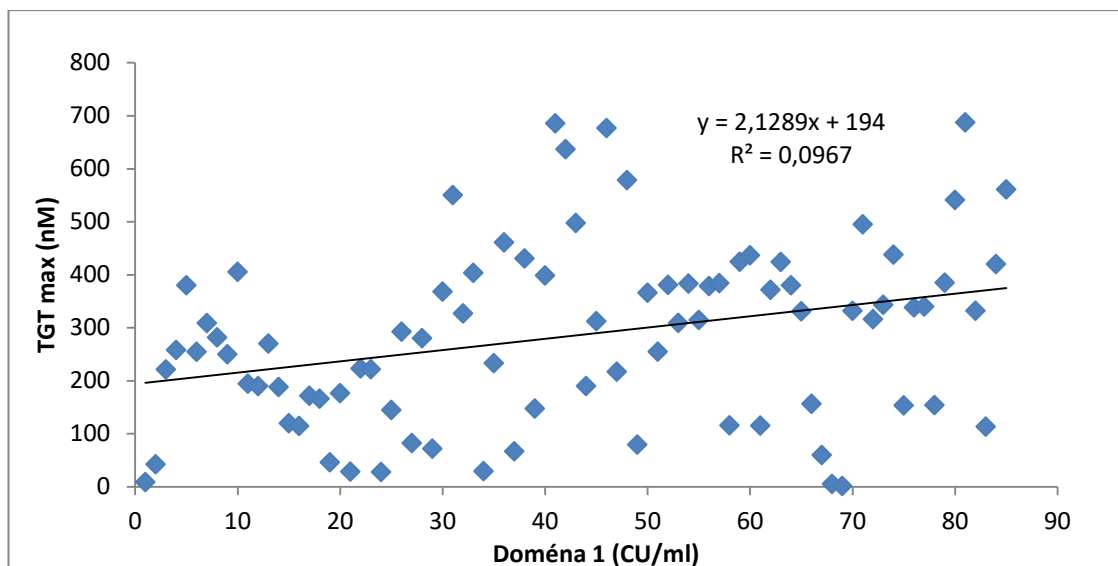
list 7		TGT t (min)	TGT max (nM)	TGT E (nM)
Doména 1 (CU/ml)	Correlation Coefficient	<b>0,411</b>	<b>-0,289</b>	<b>-0,234</b>
	p	<b>0,0001</b>	<b>0,007</b>	<b>0,031</b>

**Tabulka 10** Statistické hodnocení pro soubor pozitivních a negativních pacientů na Doménu 1 a jejich vzájemná korelace s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu

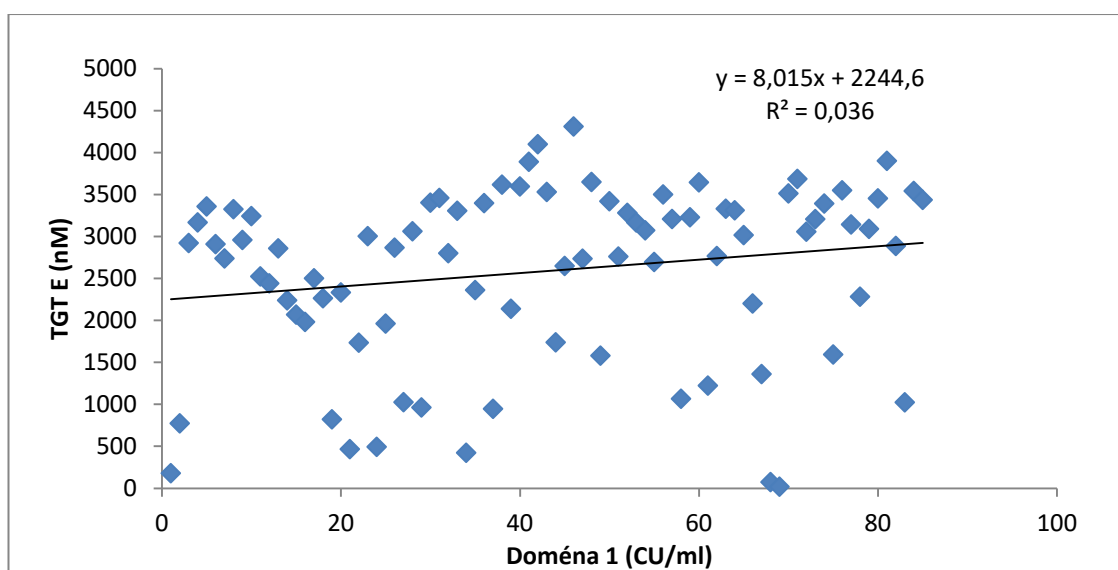
list 7	Doména 1 pozitivita						Mann-Whitney U test p
	0			1			
	Median	min	max	Median	min	max	
TGT t (min)	<b>4,4</b>	3,1	11,7	<b>5,1</b>	3,4	12,3	<b>0,045</b>
TGT max (nM)	<b>320</b>	9,0	677	<b>223</b>	28,0	686	<b>0,047</b>
TGT E (nM)	3015	180	4313	2718	424	3892	0,141



**Obrázek 18** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami Domény 1 a TGT t.



**Obrázek 19** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami Domény 1 a TGT max.



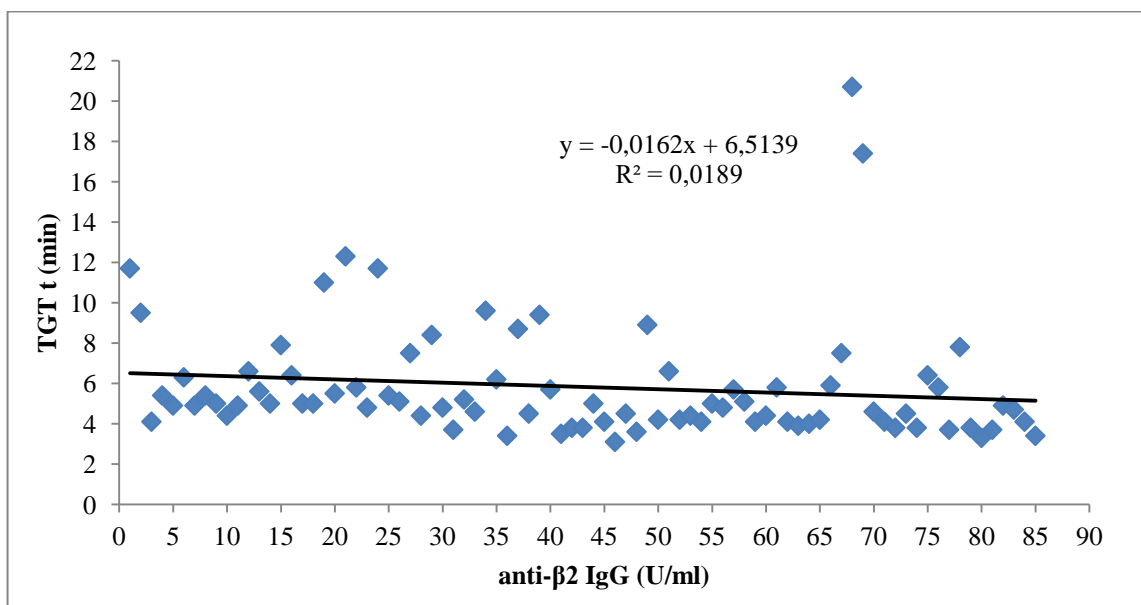
**Obrázek 20** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami Domény 1 a TGT E.

**Tabulka 11** Statisticky vyhodnocená korelace mezi anti- $\beta_2$ GPI IgG a hodnotami trombin generačního testu za použití Spearmanovy korelační analýzy

list 8		TGT t (min)	TGT max (nM)	TGT E (nM)
Beta2 IgG (U/ml)	Correlation Coefficient	<b>0,493</b>	<b>-0,352</b>	<b>-0,331</b>
	p	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>

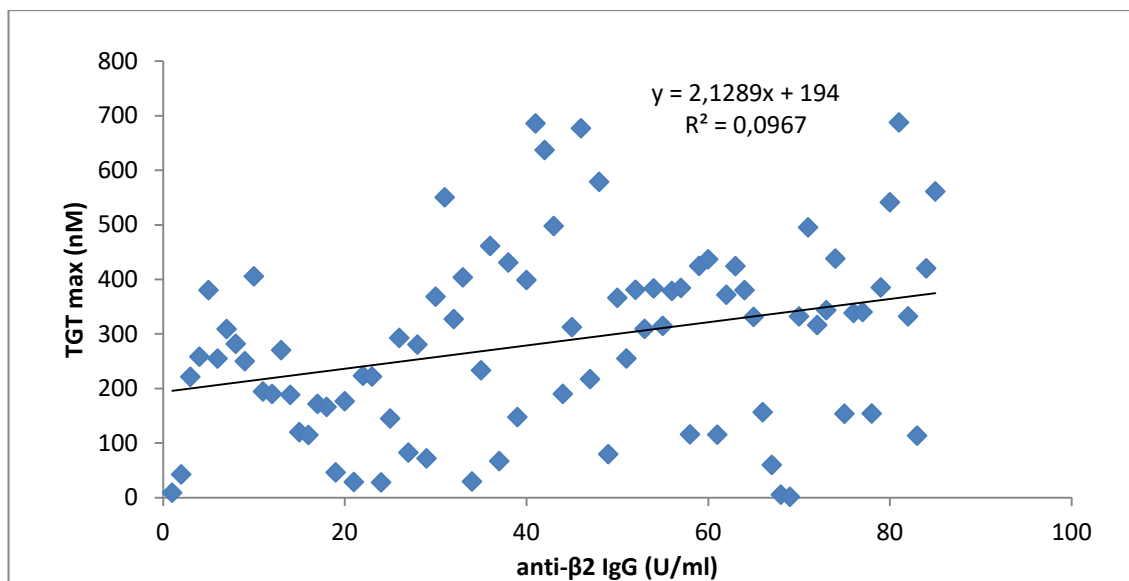
**Tabulka 12** Statistické hodnocení souboru pozitivních a negativních pacientů na anti- $\beta_2$ GPI IgG a jejich vzájemná korelace s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu.

list 8	Beta2 IgG pozitivita						Mann-Whitney U test p
	0			1			
	Median	min	max	Median	min	max	
TGT t (min)	4,2	3,1	11,7	5,0	3,3	20,7	0,116
TGT max (nM)	309	9,0	677	287	1,6	688	0,429
TGT E (nM)	3006	180	4313	2879	20	3903	0,334

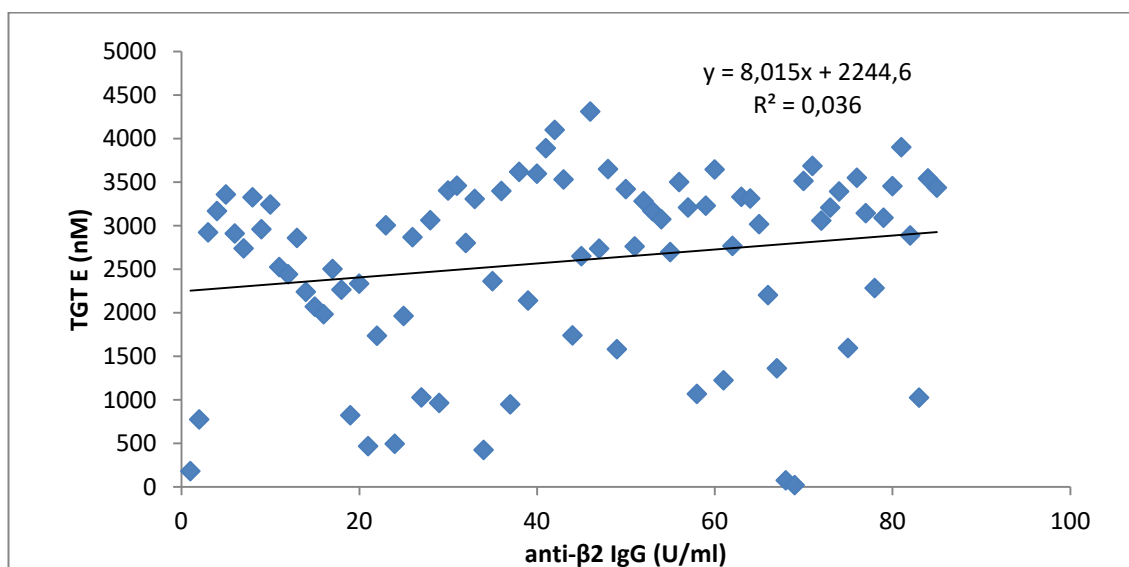


**Obrázek 21** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami anti- $\beta_2$ GPI IgG a TGT t.





**Obrázek 22** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami anti-β<sub>2</sub>GPI IgG a TGT max.



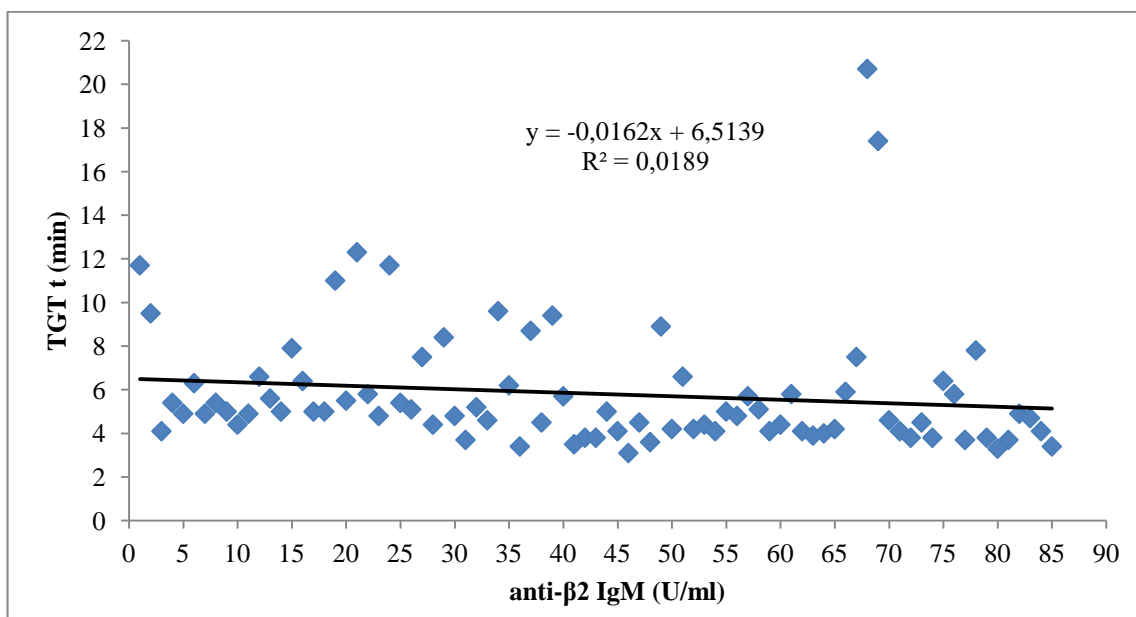
**Obrázek 23** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami anti-β<sub>2</sub>GPI IgG a TGT E.

**Tabulka 13** Statisticky vyhodnocená korelace mezi anti- $\beta_2$ GPI IgG a hodnotami trombin generačního testu za použití Spearmanovy korelační analýzy

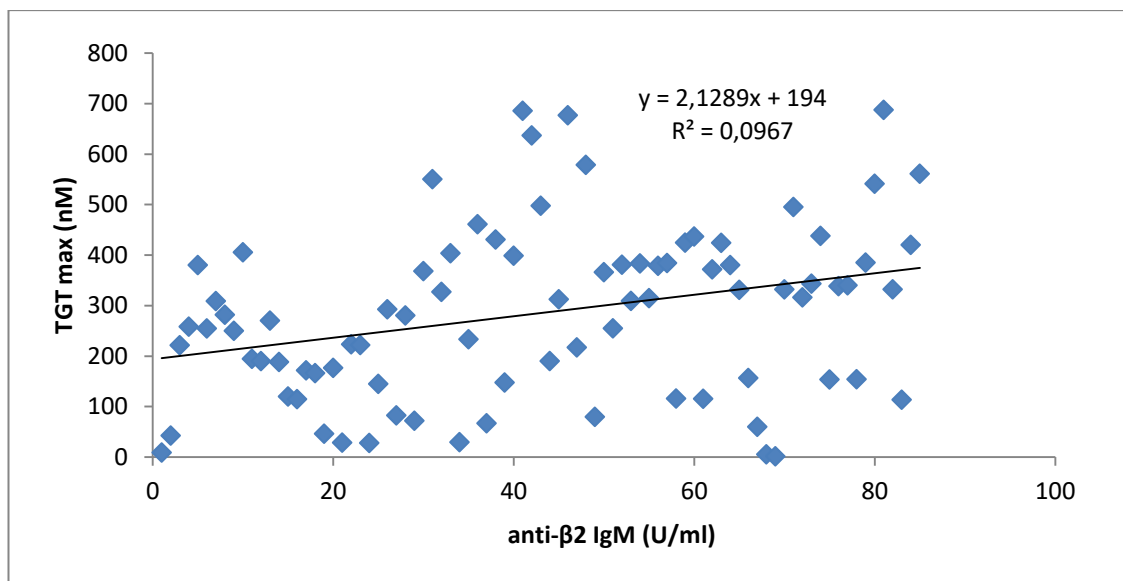
list 9		TGT t (min)	TGT max (nM)	TGT E (nM)
Beta2 IgM (U/ml)	Correlation Coefficient	0,207	-0,101	-0,110
	p	0,058	0,360	0,317

**Tabulka 14** Statistické hodnocení souboru pozitivních a negativních pacientů na anti- $\beta_2$ GPI IgM a jejich vzájemná korelace s hodnotami TGT za použití Mann-Whitney U testu.

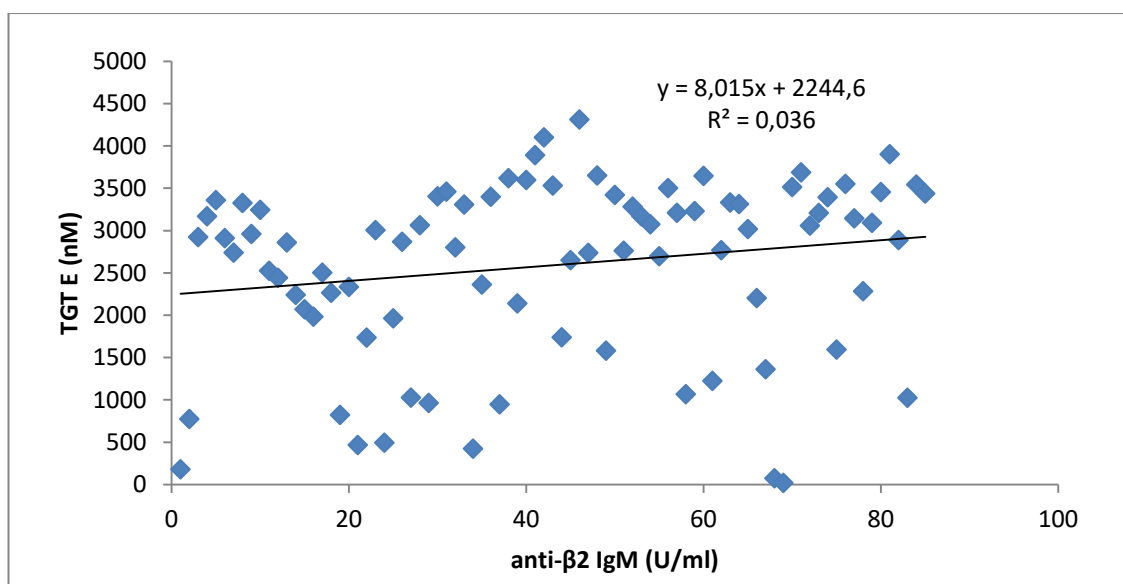
list 9	Beta2 IgM pozitivita						Mann-Whitney U test p
	0			1			
	Median	min	max	Median	min	max	
TGT t (min)	4,8	3,3	12,3	5,0	3,1	20,7	0,136
TGT max (nM)	322	9,0	688	281	1,6	686	0,365
TGT E (nM)	3039	180	4102	2740	20	4313	0,342



**Obrázek 24** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami anti- $\beta_2$ GPI IgM a TGT t.



**Obrázek 25** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami anti-β<sub>2</sub>GPI IgM a TGT max.



**Obrázek 26** Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů s naměřenými hodnotami anti-β<sub>2</sub>GPI IgM a TGT E.

## 7 DISKUZE

Správný průběh hemostázy je charakterizován dynamickou rovnováhou mezi prokoagulačními a antikoagulačními složkami. V dnešní době se potenciál této rovnováhy k posunu v reakci na podnět nejdříve hodnotí měřením jednoho nebo více faktorů a poté se předpovídá, jaký účinek nebo aktivita těchto faktorů bude mít na potenciál celého systému pro generování trombinu. Pro klinickou manifestaci APS je třeba identifikovat rizikovosti jednotlivých typů a závažnost výskytu protilátek (ACLA, anti-  $\beta_2$ GPI, LPA) včetně jejich struktury. Několik studií popsalo souvislost mezi nerovnováhou parametrů TGT a rizikem vzniku trombotické manifestace APS. V roce 2010 Pengo et al. prokázali, že triple pozitivní (pozitivní ve třech sledovaných protilátkách) pacienti nesli větší riziko manifestace trombotických i těhotenských komplikací. V dalších studiích bylo prokázáno, že LPA je silným rizikovým faktorem pro vznik trombózy ve srovnání s jakoukoliv jinou APA (Galli et al., 2003). Z hlediska posouzení vlivu struktury protilátek se jeví odlišné riziko manifestace trombotických komplikací u protilátek proti doméně I a proti doméně V. Dievana-Verdoold et al. (2011) prokázali v experimentální práci úspěšné klonování protilátek  $\beta_2$ GPI s pozitivní Doménou 1  $\beta_2$ GPI a pozitivní LPA aktivitou. Při posuzování generace trombinu pomocí kalibrované automatizované trombografie pak prokázali, že prodloužení času je ovlivněno přítomností protilátek proti  $\beta_2$ GPI a taktéž protilátek LPA pozitivních v testu dRVVT a aPTT. Oproti tomu Durigutto et al. (2019) neprokázal na myších modelech rizikovost protilátek proti doméně V. Tyto poznatky jsou v souladu s našimi výsledky, kdy jsme našli pomocí Mann-Whitney U testu pozitivní korelaci mezi nálezem protilátek LPA a prodlouženým časem do první generace trombinu ( $p=0,003$ ), sníženým maximem tvorby trombinu ( $p=0,027$ ) a sníženou celkovou generací trombinu ( $p=0,034$ ). Signifikantní výsledky byly taktéž prokázány Mann-Whitney U testem u pozitivních protilátek Domény 1-  $\beta_2$  GPI a prodlouženého času do první generace trombinu ( $p=0,045$ ) a maximální koncentrace generovaného trombinu ( $p=0,047$ ).

Výsledky měření generace trombinu v našem souboru pacientů z klinického hlediska jsou také v souladu s prací Slavík et al. (2017), kde byla nalezena pozitivní korelace nálezu Domény 1-  $\beta_2$  GPI protilátek s klinickou manifestací APS. Oproti tomu kardirolipinové protilátky nevykazovaly signifikantní korelaci s generací trombinu (IgG  $p=0,093$ , IgM  $p=0,748$ ), maximální koncentrací generovaného trombinu (IgG  $p=0,107$ ,

IgM  $p=0,351$ ) a celkovou generací trombinu (IgG  $p=0,072$ , IgM  $p=0,292$ ). Z toho je patrné, že typ protilátek ovlivňuje klinickou manifestaci APS.

## 8 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo využití kombinace standardizovaných testů průkazu protilátek s novou funkční metodou generace trombinu, jako klíčového enzymu iniciujícího vznik trombu. Pro zhodnocení bylo využito chemi-luminiscenčních testů na stanovení ACLA a anti- $\beta_2$  GPI a klasických koagulačních testů pro diagnostiku LPA a jejich korelace s trombin generačním testem, jako metodou poskytující nejbližší obraz in vivo situace působení protilátek.

Výsledkem naší práce byl průkaz signifikantní závislosti struktury protilátek (typu LPA a Doména 1-  $\beta_2$  GPI) s generací trombinu, což podporuje diskutovanou hypotézu o korelaci struktury protilátek a klinické manifestaci trombotických komplikací u APS.

Z tohoto důvodu se domníváme, že trombin generační test by mohl být vhodným nástrojem pro diagnostiku pacientů ohrožených manifestací APS ve formě trombotických komplikací.

## LITERATURA

Agar, C., van Os G. M., Mörgelin M., Sprenger R. R., Marquart J. A., Urbanus R. T., Derksen, R. H., Meijers J. C., de Groot, P. G. (2010).  $\beta$ 2-glykoprotein I can exist in two conformation: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood. The american society of hematology.* 116(8), s. 1336-1343.

Baklaja R., Pešic M. Č., Czarnecki J. (2008). *Hemostasis and Hemorrhagic Disorders.* Bad Harzburg: Fermentation-Biotec GmbH.

Bártková A. (2010). Antifosfolipidový syndrom: jedna z příčin ischemických mozkových příhod v mladším věku. *Neurologie pro praxi.* 11(5), s. 320–326.

Berntorp E., Saalvagno G. L. (2008). Standardization and clinical utility of thrombin – generation assays. *Seminars of trombosis and hemostasis.* 34(7), s. 670-682.

Buliková A., Haruštiaková D., Zavřelová J., Dušek L., Penka M. (2010a). Trombocytopenie u pacientů s průkazem antifosfolipidových protilátek nebo antifosfolipidovým syndromem. *Vnitřní lékařství.* 56 (1), s. 81-90.

Buliková, A., & Penka, M. (2006). Antifosfolipidový syndrom. *Interní medicína pro praxi.* 5, s. 240-243.

Buliková, A., Smejkal. P., Chlupová, G., Matýšková, M., Šlechtová, M. (2012). Profylaxe a léčba antifosfolipidového syndromu - současné možnosti, úskalí a perspektivy do budoucna. *Vnitřní lékařství.* 58(7a 8), s. 110-122.

Butenas S., Van't Veer C., Mann K. G. (1999). „Normal“ thrombin generation. *Blood. American society of hematology.* 94(7), s. 2169 –2178.

Carsons S. (2004). Antiphospholipid syndrome.

Colvin B. T. (2004). Physiology of haemostasis. *Vox Sanguinis.* 87, s. 43-46.

Dienava-Verdoold I., Boon-Spijker M. G., de Groot P. G., Brinkman H. J., Voorberg J., Mertens K., Derksen R. H., de Laat B. (2011). Patient-derived monoclonal antibodies directed towards beta2 glycoprotein-1 display lupus anticoagulant activity. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 9(4), s. 738–747.

Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2010/05/10.pdf> ; Staženo 11.3 2019

Durigutto P, Grossi C, Borghi MO, Macor P, Pregolato F, Raschi E, Myers MP, de Groot PG, Meroni PL, Tedesco F. (2019). New insight into antiphospholipid syndrome: antibodies to  $\beta$ 2glycoprotein I-domain 5 fail to induce thrombi in rats. *Haematologica*. 104(4), s. 819-826.

Faber E., Juránová J., Zuchnická J., Procházka V., Hluší A., Pospíšilová D., Minařík J., Papajík T., Szotkowski T., Vondráková J., Rusiňáková Z., Gumulec J., Ščudla V. (2012). *Základy hematologické diagnostiky*. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta.

Fölsch U. R., Schmidt R. F., Kochsiek K., Rokyta R., Mareš J. (2003). *Patologická fyziologie*. 1. vyd., s. 586. Praha: Grada Publishing.

Galli M., Luciani D., Bertolini G., Barbui T. (2003). Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood*. American society of hematology. 101(5), s. 1827–1832.

Ganong W. F. (2005). *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd., s. 890. Praha: Galén.

Giannakopoulos B., Krilis S. A. (2013). The pathogenesis of the antiphospholipid syndrom. *The new England Journal of medicine*. 368(11), s. 1033-1044.

Gómez-Puerta J. A., Cervera R. (2014). Diagnosis and classification of the anthiphospholipid syndrome. *Journal of autoimmunity*. 48-49, s. 20-25.

Hanly J. G. (2003). Antiphospholipid syndrome: an overview. *CMAJ*. 168(13), s. 1675-1682.

Hirmerová J. (2010). Antifosfolipidový syndrom. *Postgraduální medicína*. 1.



Hluší A., Krčová V. (2003). Antifosfolipidový syndrom. *Interní Medicína pro praxi*. 5(9), s. 434-436.

Hunt J. E., McNeil H. P., Morgan G. J., Cramer R. M., Krilis S. A. (1992). A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus*. 1(2), s. 75–81.

Kaňková K. (2003). *Patologická fyziologie pro bakalářské studijní programy*. 1.vyd., s. 165. Brno: Masarykova univerzita.

Keeling D., Mackie I., Moore G. W., Greer I. A., Greaves M. and British Committee for Standards in Haematology. (2012). Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *British Journal of Haematology*. 157, s. 47-54.

Krejsek J, Kopecký O. (2004). *Klinická imunologie*. 1. vyd. s. 595-596. Hradec Králové: NUCLEUS HK.

Křepelka P. (2007). *Trombofilie a medicína. Postgraduální medicína.*, 1.

Lakos G., Favaloro E. J., Harris E. N., Meroni P. L., Tincani A., Wong R. C., Pierangeli S. S. (2011). International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: Report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis a Rheumatology*.

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), s. 226–233.

Mackman N. (2008). Triggers, Targets and Treatments for Thrombosis. *Nature*. 451(7181), s. 914-918.

Matýšková M., Zavřelová J., Hrachovinová I. (1999). *Hematologie pro zdravotní laboranty. Krevní srážení 2.díl*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví.

- Miyakis S., Lockshin M. D., Atsumi T., Branch D. W., Brey R. L., Cervera R., Derksen R. H., DE Groot P. G., Koike T., Meroni P. L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyjannopoulos P. G., Krilis S. A. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis*. 4(2), s. 295–306.
- Murray R. K. (2002). *Harperova biochemie*. 4. vyd., s. 872. Jinočany: Nakladatelství H+H.
- Passam F., & Krilis S. (2004). Laboratory tests for the antiphospholipid syndrome: current concepts. *Pathology*. 36(2), s. 129–138.
- Pecka M. (2004). *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie hemostázy*. 1. vyd.. s. 237. Český Těšín: Finidr s.r.o.
- Pecka M. (2010). *Praktická hematologie-Laboratorní metody*. FINIDR, Český Těšín.
- Pengo V., Ruffatti A., Legnani C., Gresele P., Barcellona D., Erba N., Testa S., Marongiu F., Bison E., Denas G., Banzato A., Padayattil Jose S., Ilieeto S. (2010). Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 8(2), s. 237–242.
- Penka M., & Bulíková A. (2009). *Neonkologická hematologie*. Praha: Grada Publishing.
- Penka M., & Slavičková E. (2011). *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada Publishing.
- Penka M., & Slavičková E. (2012). *Hematologie a transfuzní lékařství. II, Transfuzní lékařství. 1*. Praha: Grada Publishing.
- Penka M., Bulíková A., Matýšková M., Zavřelová J. (2001). *Hematologie I. Neonkologická hematologie*. Praha: Grada Publishing.
- Penka M., Penka I., Gumulec J. (2014). *Krvácení*. Praha. Grada Publishing.
- Rand J. H. (2003). The antiphospholipid syndrom. *The annual rewiev of medicine*. 54, s. 409-424.

Rand J. H. (2007). The antiphospholipid syndrom. *Blood*. American society of hematology. 1, s. 136-142.

Roubey R. A. (1994). Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood*. American society of hematology. 84(9), s. 2854- 2867.

Sakalová A., Bátorová A., Mistrík M., Hrubíško M. (2010). *Klinická hematológia*. 1.vyd., 295 s. Martin: Osveta.

Salmon J. E., Girardi G. (2008). Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation. *Journal of reproductive immunology*. 77(1), s. 51-56.

Slavik L., Janek D., Ulehlova J., Krcova V., Hlusi A a Prochazkova J. (2017). Detection of Anti-Domain I  $\beta_2$ - Glycoprotein I Antibodies as New Potential Target in Antiphospholipid Syndrome Diagnosis. *Journal of Hematology and Thromboembolic Diseases*. 5(5), s. 276.

Smejkal P., Blatný J., Hluší A., Blažek B., Čermáková Z., Černá Z., Ďulíček P., Hak J., Hrdličková R., Komrska V., Ovesná P., Pospíšilová D., Procházková D., Šlechtová J., Timr P., Ullrychová J., Vonke I., Walterová L., Penka M. (2017). Konsenzuální doporučení Českého národního hemofilického programu (ČNHP) pro diagnostiku a léčbu pacientů s hemofilií. *Transfuze a hematologie dnes*, vyd. 2, 23(2), s. 82–99.

Šlechtová J. (2007). Hemostáza - jak ji možná neznáme. *Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie*, 15(36), s. 97–101.

Trojan S. (2003). *Lékařská fyziologie*. 4. vyd., Praha: Grada Publishing.

Vojáček J., & Malý M. (2004). *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. s. 276. Praha: Grada Publishing.

Vokurka M. (2008). *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 2. vyd., s. 217. Praha: Karolinum.