

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Hyperkoagulační stavy a vliv hormonální antikoncepce.

Bakalářská práce

Iva Černá

Školitel: MUDr. Ivan Vonke, MBA.

České Budějovice 2014

Bakalářská diplomová práce

Černá, I., 2014: Hyperkoagulační stavy a vliv hormonální antikoncepce. [Hypercoagulable states and the effect of hormonal contraception. Bc. Thesis, in Czech] - p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Venous thrombosis is a multifactorial disease frequently related to the interaction of genetic and acquired factors. The inherited thrombophilia does not always appear, but in certain situations can be life threatening. This danger is especially for women who use hormonal contraception or plan to become pregnant.

This work focuses on the frequency occurrence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations by patients in a hospital of Ceske Budejovice. Acquired frequencies are compared with the values given in the literature. Another point of the study is devoted to the examination of women before prescribing contraception. It is evident from the acquired data that gynecologists do not investigate women so completely and there is potentially possible leakage of women affected by inherited thrombophilia.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 10. 12. 2014

.....

Iva Černá

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Vonkemu za odborné vedení mé bakalářské práce, za cenné rady a připomínky a především za trpělivost a ochotu, kterou mi věnoval. Poděkování patří i panu Mgr. Scheinostovi za poskytnutí výsledků a seznámení s chodem genetické laboratoře. V poslední řadě také mé rodině za neustálou podporu a dodávání pozitivní energie v průběhu studia.

Obsah

Úvod a cíl práce	1
1 Tromboembolická nemoc.....	2
1.1 Trombóza.....	2
1.2 Plicní embolie.....	3
2 Fyziologie krevního srážení	4
3 Hyperkoagulační stavy.....	7
3.1 Vrozené hyperkoagulační stavy.....	7
3.1.1 Rezistence na aktivovaný protein C (APC-R)	10
3.1.2 Mutace faktoru V Leiden	11
3.1.3 Mutace protrombinu	12
3.1.4 Deficit antitrombinu.....	12
3.1.5 Deficit proteinu C	14
3.1.6 Deficit proteinu S.....	14
3.2 Získané hyperkoagulační stavy	15
3.2.1 Těhotenství.....	15
3.2.2 Hormonální antikoncepce	16
4 Materiál a metodika	19
4.1 Preanalytická část vyšetření.....	19
4.2 Oddělení hematologie.....	20
4.3 Oddělení genetiky.....	21
4.4 Dotazník	24
5 Výsledky	25
6 Diskuze.....	33
7 Závěr	37
8 Seznam citované literatury	38
9 Přílohy	43

Úvod a cíl práce

Lidský organismus je velice složitý systém, jehož správné fungování kolísá na tenké hranici. Pokud dojde k překročení této pomyslné hranice, náš organismus onemocní. Jedno takové překročení způsobují i hyperkoagulační stavy, které narušují rovnováhu mezi aktivačními a inhibičními procesy hemokoagulace.

Vrozené trombofilie nás doprovází celý život, přičemž většina lidí o jejich přítomnosti vůbec neví, ale mohou představovat „časovanou bombu“, a to hlavně u žen. Samy o sobě nepředstavují nějak výrazné nebezpečí vzniku krevní sraženiny resp. trombu, ale společně se získanými rizikovými stavy se jejich riziko až několikanásobně zvyšuje. Například s věkem se frekvence výskytu první tromboembolické nemoci zvyšuje až 10x a u velkých operací to může být až 200x více (Beran 2006). Těhotenství a hormonální antikoncepce, dnes velmi rozšířená mezi ženami plodného věku, představují zvýšené riziko.

Výsledkem těchto stavů je krevní sraženina, která nejčastěji vzniká v žilách dolních končetin. Pokud inhibiční systém hemokoagulace a fibrinolytický systém správně fungují, velká část sraženin se sama rozpustí, pokud jsou tyto systémy narušeny, může trombus narůst do velkých rozměrů a následně embolizovat (Kvasnička 2003).

Až u 2% pacientů s hlubokou žilní trombózou může dojít ke komplikaci plicní embolii. I přes moderní progresivní medicínu, velké procento pacientů s plicní embolií umírá (Urbánková et al. 2002).

Proto se tato práce zabývá hlavně vrozenými hyperkoagulačními stavy, jejichž výskyt člověk nijak neovlivní. Prvním cílem této práce je osvojit si stanovení nejčastějších genetických příčin hyperkoagulace, jimiž jsou Leidenská mutace a mutace protrombinu. Současně chce práce porovnat frekvence výskytu těchto mutací u pacientů Nemocnice České Budějovice a.s. (dále jen nemocnice) s obecně stanovenými frekvencemi v odborné literatuře.

Dalším cílem je zpracovat data získaná z dotazníku, který zjišťuje zodpovědnost gynekologů při předepisování perorální kombinované antikoncepce (COC) a chování žen při jejím užívání. Závěrem práce je vytvořen návrh racionálního postupu pro předepisování COC.

1 Tromboembolická nemoc

Tromboembolická nemoc (TEN) je multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku se podílí jak vrozené, tak i získané dlouhodobé či krátkodobé faktory (Poul 2006). Nejpodstatnější klinickou manifestací trombofilie je venózní tromboembolizmus (Kessler 2006). Pod TEN řadíme hlubokou žilní trombózu a plicní embolii. V průmyslových zemích je jednou z hlavních příčin smrti, které ročně podlehne více lidí než AIDS (Musil 2009).

1.1 Trombóza

Trombóza je typické označení pro nitrocévní krevní srážení, jejímž výsledkem je tvorba trombu neboli krevní sraženiny (Pecka 2004).

Trombotické stavy a především žilní trombóza je velice časté onemocnění. Není proto divu, že již ve starověku se o toto onemocnění zajímali ve svých spisech učenci, jako byl Claudius Galén. Ten jako první použil slovo trombus k pojmenování nitrocévní sraženiny a léčil toto onemocnění pijavicemi (Kvasnička 2003).

V roce 1856 německý lékař Rudolf Virchow popsal žilní trombózu a mechanismus jejího vzniku, který označujeme jako Virchowova trias:

- porucha cévní stěny
- zpomalení krevního toku
- narušení funkce nebo koncentrace koagulačních faktorů a jejich inhibitorů neboli trombofilní stavy.

Tyto tři koncepce jsou brány jako obecné příčiny vzniku trombózy a platí dodnes (Vojáček 2004).

Trombózu můžeme rozdělit na 2 druhy podle místa a mechanismu trombotizace:

1. Hluboká žilní trombóza – z Virchowova trias se na ní podílejí hlavně 2 faktory, první z nich je zástava žilního proudění, nebo jeho zpomalení. A hyperkoagulace neboli trombofilie, která je způsobená nedostatečnou funkcí, nebo úplnou dysfunkcí plazmatických koagulačních faktorů, nebo selháním inhibitorů, je druhým činitelem.
2. Arteriální trombóza – ta má odlišný spouštěcí mechanismus. Zde nejde o koagulační faktory, ale o aterosklerotické poškození stěny tepny, při které se spouští agregace krevních destiček. Vzniká bílý trombus. U tohoto typu jde hlavně o dlouhodobé dispozice (Kvasnička 2003).

Presumpce incidence tohoto onemocnění v populaci se uvádí 1/1000. U dětí je výrazně nižší, podle registru z roku 1994 se odhaduje na 0,07/10000. Riziko vzniku trombózy tedy stoupá s věkem, například u lidí nad 75 let je riziko téměř u každé sté osoby. Nejčastějším místem výskytu trombózy jsou hluboké žíly dolních končetin. Dále se může vyskytnout i v žilách horních končetin, mozku, oka nebo v mezenteriální žíle (Urbánková et al. 2002).

Venózní trombóza se klinicky projevuje otokem končetiny, cukavou nebo tlakovou bolestí v oblasti ucpaní, bledostí nebo naopak modrofialovým zbarvením způsobeným nedostatečným okysličováním krve (cyanóza). Také ji provází zrychlený puls, zvýšená teplota a zrychlená srdeční činnost (tachykardie).

Ne vždy se trombóza klinicky projeví, v některých případech bývá němá a poté se manifestuje embolizací do některých důležitých cév, jako jsou například cévy plic (Kvasnička 2003).

1.2 Plicní embolie

Plicní embolie je časté a závažné onemocnění, i přes vysoký záchyt, který činí například ve Francii kolem 100 000 případů, v Anglii 65 000 a v Itálii přes 60 000 pacientů, je jeho diagnóza velkým problémem a vysoké procento pacientů je hospitalizováno s jiným onemocněním jako bronchopneumonie (Kvasnička 2003). Tato čísla jsou pouze orientační, opravdový výskyt je ve skutečnosti mnohem vyšší. Existují studie, které pomocí systematického plicního scanu u pacientů s hlubokou žilní trombózou odhalily 40-50% výskyt plicní embolie (Widimský 2007).

Podle studie ICOPER z roku 1999 je 0,5 – 2% hluboké žilní trombózy doprovázeno akutní plicní embolií, přičemž 11% pacientů, kteří prodělali akutní plicní embolii, umírá do 14 dnů od příhody a dalších 17% umírá do 3 měsíců. Tato vysoká čísla jsou výsledkem včasného nerozpoznání žilní trombózy nebo už vzniklé plicní embolie. Mortalita se zvyšuje i u pacientů s rekurentní embolií, kdy 33,7% nemocných zemřelo do 14 dnů od znovu projevení nemoci a 46,8% zemřelo do 3 měsíců (Kvasnička 2003).

Obecně lze říct, že se plicní embolie vyskytuje nejčastěji ve věku od 60 let. Bohužel tento věk se může výrazně snížit u žen užívajících perorální antikoncepci, která přináší až 3x vyšší riziko incidence žilní trombózy, a tím je ovlivněna i incidence plicní embolie (Vojáček 2004).

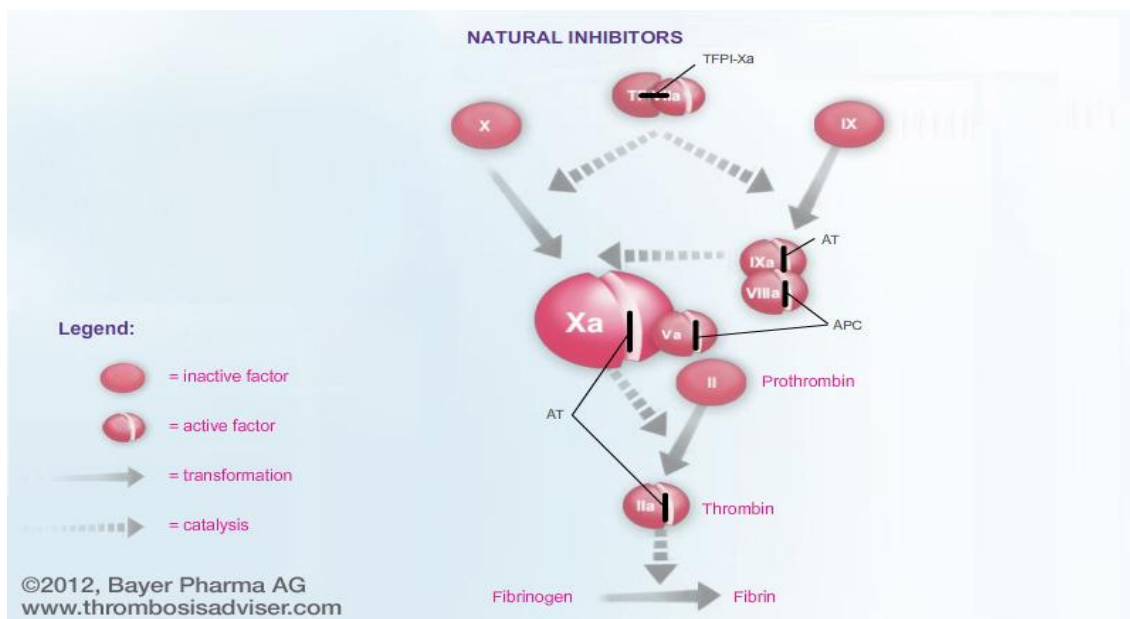
2 Fyziologie krevního srážení

Předpokladem plynulé cirkulace je fluidita krve. Hlavním předpokladem fluidity je celistvá a nesmáčivá vnitřní strana cév, neboli tunica intima, složená z buněk endotelu (Ledvina et al. 2006). Celistvost cévního systému je zabezpečena spoluprací mezi cévní stěnou, trombocyty a plazmatickými bílkovinami obsahující koagulační faktory a jejich inhibitory.

Jestliže dojde k poranění cévní stěny, nastartuje se proces hemokoagulace (Kessler 2006). Hemokoagulační proces je tvořený kaskádou enzymatických reakcí. Tato kaskáda vede k aktivaci koagulace a tvorbě trombu v místě, kde je céva narušená tak, aby se zamezilo větším ztrátám krve a zastavilo se krvácení (Urbánková et al. 2002). Následně také spouští inhibitory koagulace, jejichž hlavním úkolem je pomocí zpětné vazby kontrolovat krevní srážení uvnitř cévního lumenu tak, aby nedošlo k uzavření cévy nebo šíření srážení mimo poraněnou oblast. Záměrem tohoto složitého mechanismu je vytvořit nerozpustné fibrinové síť, pomocí nichž dojde k zastavení krvácení (Procházka et al. 2004).

Většina koagulačních faktorů se řadí mezi glykoproteiny syntetizované v játrech (Pecka 2004). Jsou v neaktivní formě jako proenzymy v krevní plazmě, vyjma tkáňového faktoru. K jejich aktivaci je zapotřebí proteolytické štěpení. Tyto koagulačně aktivní faktory značíme přidáním indexu „a“ za jejich číselné označení (Poul 2006).

Koagulační inhibitory patří do antikoagulačního procesu (Obr. 1). Jejich funkce spočívá v zabránění přílišnému růstu krevní sraženiny. Při nepřítomnosti nebo nefunkčnosti inhibitorů dochází k nadměrnému růstu trombu, což vede k uzavření cévy a neprůtoku krve. Koagulační faktory jsou většinou glykoproteinové povahy. Antitrombin, jako nejdůležitější inhibitor spolu s proteinem C a S jsou obsaženy v plazmě jako plazmatické proteiny. Inhibitor cesty tkáňového faktoru - TFPI a trombomodulin působí společně na povrchu endotelu (Kvasnička 2003).



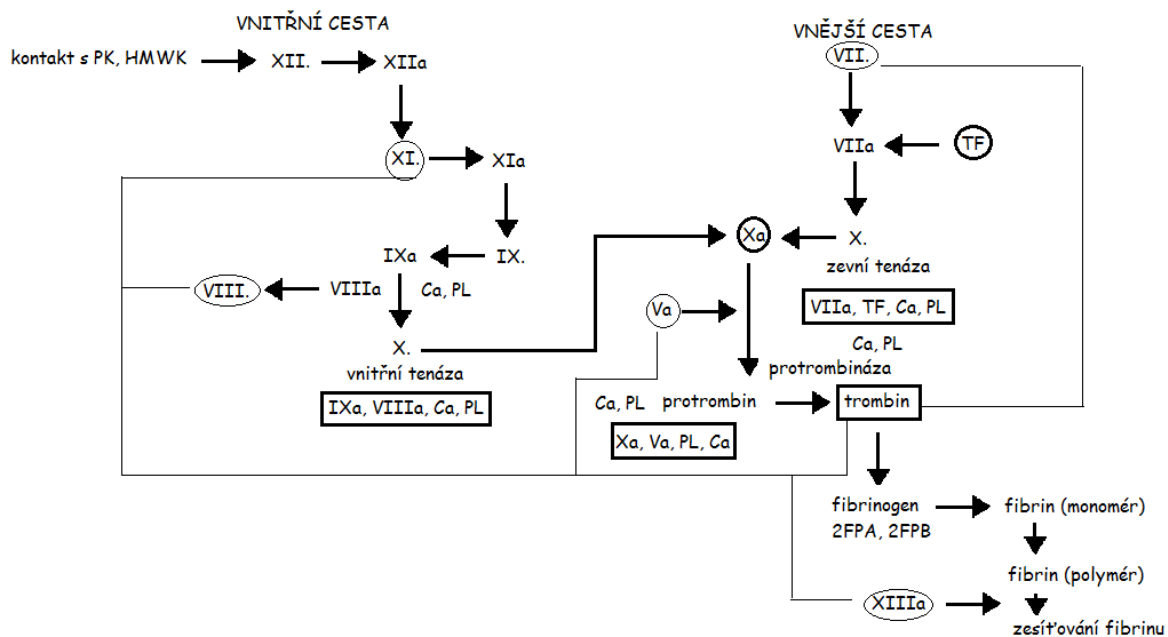
Obr. 1: Vliv inhibitorů v koagulační kaskádě (převzato z thrombosisadviser).

Koagulační kaskáda

Jde o složitý a přesně regulovaný mechanismus, jehož regulaci zajišťuje mnoho aktivačních a inhibičních procesů. Takto hemokoagulace udržuje rovnováhu mezi krvácivostí (hemoragií) a zvýšeným srážením (hyperkoagulační stavy) (Matýšková et al. 1999).

Bílý trombus, jemuž se také říká primární hemostatická zátka, je tvořen hlavně trombocyty. V hemostáze na něj navazuje plazmatický koagulační systém (Obr. 2). Ten se rozděluje na vnitřní, vnější a společnou cestu. Společná cesta začíná štěpením faktoru X (Stuartův-Prowerův faktor) na aktivovanou formu Xa (Pecka 2004). Xa společně s Va (aktivovaný proakcelerin), Ca^{+} ionty, fosfolipidy a fosfatidylseriny vytvoří komplex - protrombinázu - konvertující protrombin na trombin (Rees et al.

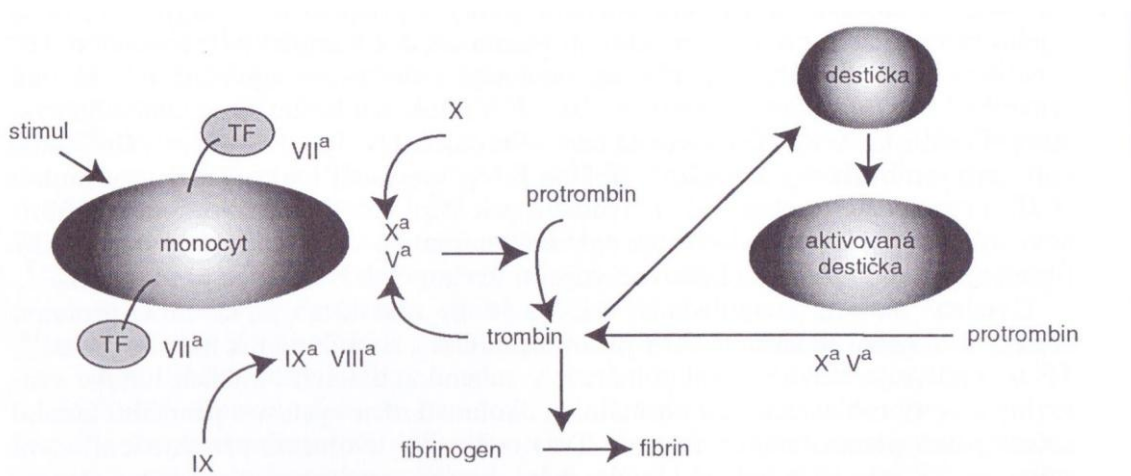
1995). Vzniklý trombin katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Fibrinové monomery spontánně polymerují a vzniklý polymer se stabilizuje na FXIIIa – vzniká nerozpustný fibrin. Po vytvoření fibrinové zátky se k tomuto komplikovanému ději přidává ještě fibrinolytický systém, který je zodpovědný za lýzu fibrinového koagula (Pecka 2004).



Obr. 2: Plazmatická koagulační kaskáda.

Novější pohled rozděluje hemokoagulaci na tři fáze podle nárůstu tvorby trombinu (Obr. 3).

1. První fáze je označovaná jako zahajovací. V této fázi dochází k aktivaci trombinu tkáňovými faktory VIIa, X a IX.
2. Druhá amplifikační fáze koagulace urychluje proces pomocí faktorů V, VIII a XI.
3. Poslední propagační fáze se zúčastňuje velká většina faktorů (F IIa, F IXa, F Xa, F XIa, F Va a F VIIIa). Dohromady ještě zvyšují množství trombinu, který mění fibrinogen na fibrinovou sraženinu (Kvasnička 2003).



Obr. 3: Schéma buněčné hemostázy nahrazující dřívější teorii (převzato z Kvasnička 2003).

3 Hyperkoagulační stavy

Ve světě zdravotnictví je mnoho definic trombofilie. Nejjednodušeji lze říci, že je to zvýšená predispozice k trombóze. Jinak se dá označit jako vrozená nebo získaná porucha srážení krve, která je patofyziologicky a statisticky asociovaná se zvýšeným rizikem trombózy. Předchází vlastní tvorbě krevní sraženiny (Kessler 2006). Hyperkoagulační stavy, jak již bylo řečeno, zvyšují riziko vzniku hlavně hluboké žilní trombózy. Rozlišují se na vrozené (genetické) a získané (Kvasnička 2003).

U 20-30% nemocných s první příhodou hluboké žilní trombózy je možné mezi příbuznými najít alespoň jednoho, který trpí stejnou vrozenou trombofilií (Urbánková et al. 2002). Jedním z hlavních získaných faktorů jsou velké chirurgické operace, a to hlavně ortopedické, jako je náhrada kyčelního kloubu, různá poranění, srdeční selhání, dlouhodobá imobilizace, při které dochází ke stáze, a maligní nádorová onemocnění, jež mají za následek kompresi žil, a mohou uvolňovat tromboplastin (Widimský 2007). Do této skupiny patří také obezita, křečové žíly, těhotenství, období šestinedělí, antikoncepční prevence, kouření, a to hlavně u žen, a hormonální substituce (Pecka 2004). Veliké riziko s sebou nese také zavádění různých katetrů, portů, elektrod a stimulačních systémů do horní duté žíly a srdečních částí. Cizorodý materiál uložený v cévním systému, zvláště pak v blízkosti srdce a plic. Rizikem je také již prodělaná žilní trombóza nebo antifosfolipidový syndrom, myeloproliferativní onemocnění a v neposlední řadě nefrotický syndrom (Widimský 2007).

Do této skupiny se velmi často řadí i věk. Toto zařazení však není úplně přesné, neboť stoupající věk je fyziologický proces, kterému nemůžeme nijak zabránit. Jako rizikový se označuje věk nad 45 let, kdy dochází fyziologicky k dilataci žil, což má za následek zpomalení toku až stázu krve. Také dochází ke snížení fibrinolytické aktivity (Kessler 2006).

3.1 Vrozené hyperkoagulační stavy

Na rozdíl od získaných rizikových faktorů ty genetické ohrožují celý lidský život a nelze je odstranit (Urbánková et al. 2002). Vrozené trombofilie neznamení bezprostřední riziko trombózy. Je spousta lidí, kteří těmito nemocemi trpí a nevědí o nich, a pokud se nepřidají další například získané trombofilie, často se nemoc ani neprojeví. Jsou ale situace, kdy je

dobré vědět, zda má člověk predispozice k tvorbě sraženin. Těmito situacemi jsou například operace, těhotenství nebo užívání hormonální antikoncepce.

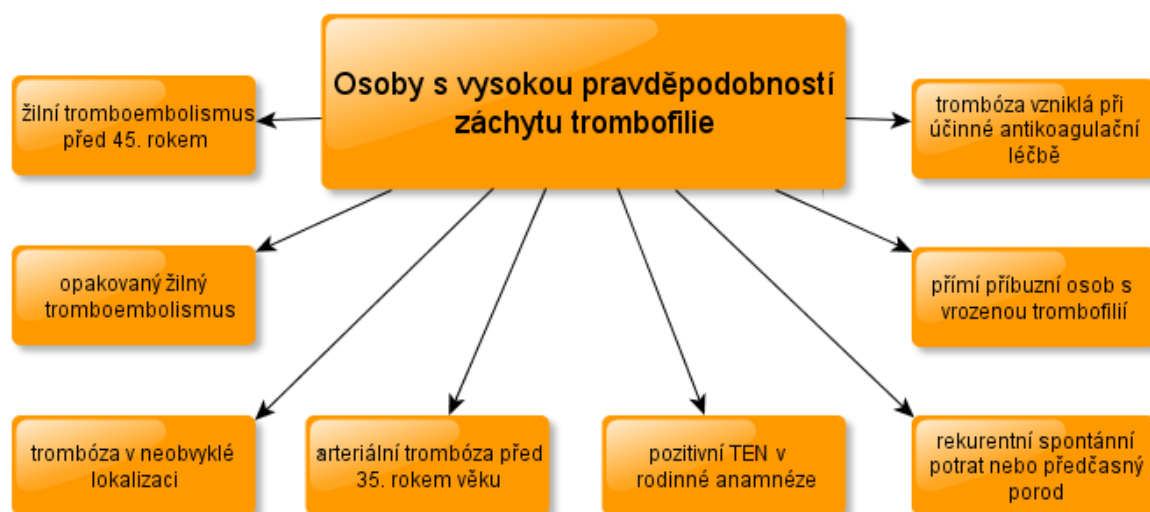
V prevalenci vrozených trombofilií je řada odchylek, a to i u jednotlivých etnik. Nejtypičtější je Leidenská mutace, která se v Asii, Africe a u obyvatel původní Ameriky téměř nevyskytuje (Poul 2006). Zastoupení vrozených trombofilií v populaci a u pacientů s žilní trombózou ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1: Zastoupení vrozených trombofilií v populaci a u pacientů s žilní trombózou (převzato z Vojáček 2004)

Hyperkoagulační faktor	% v populaci	% u pacientů s TEN	Riziko hluboké žilní trombózy
mutace faktoru V Leiden	3 – 15	20 – 40	5 - 10x vyšší
mutace PT 20210A	2 – 5	6 – 18	3x vyšší
defekt proteinu C	0,2 - 0,4	3	8 – 10x vyšší
defekt proteinu S	0,03 – 0,13	1 – 2	5x vyšší
defekt antitrombinu	0,02 – 0,05	1 – 2	50x vyšší

Vysvětlivky: PT = protrombin

O pacientech s trombofilií mluvíme, pokud splňují alespoň jedno z těchto kritérií (Obr. 4).



Obr. 4: Kritéria pro pacienty s vysokou pravděpodobností záchytu trombofilie.

Nejvíce ohrožení jsou pacienti, kteří již v minulosti prodělali žilní tromboembolickou nemoc (TEN) bez zjevné příčiny, anebo příčina vyvolávající TEN nebyla odstraněna a nadále ohrožuje zdraví pacienta jako například maligní nádor (Kessler 2006).

Protein C

Protein C (PC) byl izolován v r. 1976 p. Stefano. Byl popsán jako jednořetězcový plazmatický glykoprotein, jenž se následně štěpí na dvojřetězcový a jehož koncentrace v plazmě činí 4-5mg/l. Je tvořen v játrech a v menší míře i endotelu (Stefano et al. 1996). Patří mezi vitamin K-dependentní plasma-antikoagulační proteiny, neboť jeho tvorba je závislá na vitamínu K (Pecka 2004).

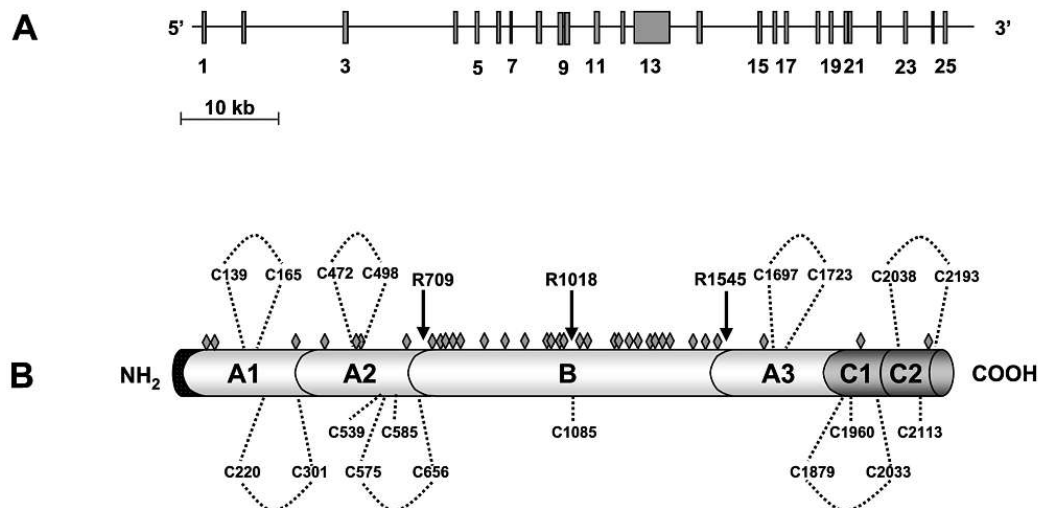
K aktivaci proteinu C dochází hlavně na povrchu cévní stěny. Trombin se zde váže na trombomodulin, čímž sám o sobě sice ztrácí svou aktivační schopnost v koagulační kaskádě, ale díky spojení se svým receptorem aktivuje protein C. Komplex trombinu s trombomodulinem zvyšuje aktivační proces až 2000x (Pecka 2004). Aktivovaný protein C (APC) je součástí systému proteinu C, společně s proteinem S, fosfolipidy a ionty Ca^{2+} . Dohromady tvoří nejúčinnější inhibiční systém hemostázy, jehož funkcí je inaktivovat aktivované faktory Va a VIIIa (Penka et al. 2011). Inaktivace faktorů je dosažena sekvenčním štěpením jejich peptidových vazeb. Například plazmatický Va je štěpen v oblasti Arg 506, což odkryje další štěpná místa Arg 306 a Arg 679. Tímto zanikne vazebné místo pro Xa a faktor V je již pro koagulační proces nepotřebný. Faktor VIIIa je rozštěpen podobně v místech Arg 336 a Arg 562 (Dahlback et al. 2008).

Faktor V

Faktor V jinak nazýván jako proakcelerin je rozhodující protein v procesu krevního srážení. Cirkuluje v krevní plazmě a v menší míře je zastoupen v alfa granulích krevních destiček. Jedná se o jednořetězcový glykoprotein vznikající v játrech a megakaryocytech (Pecka 2004).

Má zásadní funkci jak prokoagulační, tak antikoagulační. Součástí jeho funkce je snadné navázání na povrchy buněčných membrán a společně s faktorem Xa a dalšími komponenty tvořit komplex protrombináza. Tento komplex štěpí protrombin na trombin. Aktivace FV probíhá za přítomnosti Ca^{2+} iontů, kdy se faktor štěpí na těžký (A1 a A2) a

lehký řetězec (A3, C1, C2). Struktura domén faktoru Va je vidět na obrázku 5., svou strukturou je podobný F VIII (Segers et al. 2007).



Obr. 5: Struktura molekuly faktoru Va (Převzato z Segers et al. 2007).

3.1.1 Rezistence na aktivovaný protein C (APC-R)

APC rezistence je charakterizovaná jako úplná rezistence nebo nedostatečná citlivost faktoru V na aktivovaný protein C (Kenneth et al. 1995). Taková snížená citlivost na APC vede k nedostatečné regulaci produkce trombinu. Jako taková je APC rezistence spojena se zvýšeným rizikem vzniku trombózy (Slavík 2013). Je uznávána jako hlavní genetický rizikový faktor pro vznik žilní tromboembolické nemoci, neboť bývá zjištěna až u 60% pacientů s touto chorobou. (Dahlbäck et al. 1996). Nejčastější příčinou vrozené rezistence je bodová mutace v genu faktoru V Leiden, přičemž u 2% může mít vliv i mutace faktoru V Cambridge (Pecka 2004).

Ne vždy je vrozená rezistence zapříčiněna mutací FV, existuje malé procento (cca 5%), kde nejsou přesně známé příčiny APC-R. Díky tomu je pro laboratoře výhodné stanovovat fenotyp i genotyp trombofilie, kde se odhalí původ tohoto hyperkoagulačního stavu (Hudeček et al. 1999). Princip stanovení fenotypu neboli samotné APC rezistence je založen na prodloužení koagulačního času vyšetřované plazmy v přítomnosti aktivovaného proteinu C a vápníkových iontů. Celé stanovení je podstatně založené na prodlouženém času a PPT. Pokud je rezistence touto speciální koagulační metodou potvrzena, je plazma pacienta dále vyšetřena na genotyp, kde se s největší pravděpodobností potvrdí metodou

PCR mutace FV Leiden (Castoldi et al. 2004). Potvrzení FV Leiden pomocí PCR se provádí i kvůli tzv. získané rezistenci, která není způsobená FV, ale je ovlivněna onemocněním lupus anticoagulant, antikoagulační léčbou, například heparinem, těhotenstvím, hormonálními kontraceptivy, koncentrací proteinu S sníženou pod 20%, zvýšením hladiny faktoru VIII nad 200% nebo antagonisty vitamínu K (Penka et al. 2011).

3.1.2 Mutace faktoru V Leiden

Mutace byla poprvé interpretována v roce 1994 profesorem R. M. Bertinem a jeho spolupracovníky, na základě objevu APC-R na universitě v Leidenu (Slavík et al. 2008). Gen pro faktor V je lokalizován na prvním chromozomu 1q21- q25 a zahrnuje 25 exonů a 24 intronů s celkovou velikostí 80 kb (Penka et al. 2011). Mutace FV Leiden je způsobena bodovou mutací v kodonu 506 (F V G1691A). Ta vyvolává při syntéze faktoru V záměnu aminokyseliny argininu v pozici 506 za glycin (F V R 506Q), která způsobí, že vytvořený F V Leiden je rezistentní vůči štěpení aktivovaným PC (Kvasnička 2004).

Jak je patrné z analýzy haplotypů homozygotních jedinců, je tato mutace již velmi stará a její vznik se odhaduje přibližně na 18 000 let před naším letopočtem (Slavík et al. 2008). Prevalence faktoru V Leiden se výrazně liší u jednotlivých etnik (Kessler 2006). Největší procento tvoří bělošská populace, u které se uvádí 3-7% prevalence. Zcela odlišná frekvence a výrazně nižší výskyt je u Afričanů, Asiatů, Eskymáků a původních obyvatel Severní Ameriky. V USA se prevalence uvádí v průměru kolem 5%, za to v Evropě jsou státy jako Španělsko a Itálie, kde prevalence činí nepatrné 2% a naopak ve Švédsku přesahuje i 15% (Urbánková et al. 2002).

Důkaz o tom, že tato mutace je jednou z nejvýznamnějších ve vzniku TEN, nám udává prevalence u pacientů, kteří prodělali první tromboembolickou příhodu. U těchto lidí byla prokázána až ve 20% případů. U nemocných postižených rekurentní formou dosahuje až 52% (Poul 2006). Většinu nemocných s Leidenskou mutací tvoří heterozygotní jedinci, a to až v 99%. U těchto lidí se udává relativní riziko první epizody TEN o 5-8x vyšší než u lidí bez trombofilie. To bezprostředně neznamená, že nosič tohoto genu bude trpět TEN, ta se většinou projeví až po přispění dalšího rizikového faktoru. U homozygotních nosičů je toto riziko o poznání vyšší, uvádí se až 80x, v této situaci je vhodné, aby pacient přistoupil k preventivním opatřením. Ačkoliv je relativní riziko první epizody TEN dobře zdokumentované, údaje o vlivech trombofilii na rekurenci TEN jsou zatím spíše orientační (Kessler 2006).

3.1.3 Mutace protrombinu

Na základě nedávného výzkumu řízeného Poortem v roce 1996 byl zjištěn další vrozený defekt, jenž má za následek zvýšené srážení krve. Základem této studie bylo vyšetření 28 probandů s osobní nebo v rodině se vyskytující žilní trombózou, u kterých nebyly detekovány již známé trombofilie (Poort et al. 1996). Jejich gen pro protrombin byl osekventován v 5' i v 3' nepřepisovatelné oblasti (UTR) polymerázovou řetězovou reakcí. Bylo zjištěno, že porucha je spojená s bodovou mutací v 3'-UTR oblasti mRNA. Přesněji je to oblast 20210, kde místo fyziologického guaninu je adenin. Tato mutace je spojena se zvýšenou produkcí protrombinu a jako taková představuje zvýšené riziko rozvoje trombózy (Slavik et al. 2008).

V současnosti se tvrdí, že mutace ovlivňuje proces polyadenylace, která přidává na mRNA protrombinu poly (A) konec, který zajišťuje stabilitu molekuly a ochraňuje ji před předčasnou degradací. Díky tomu se mRNA protrombinu více translatuje, což zvyšuje její koncentraci v krvi nad 130% (Poort et al. 1996). Protrombin je stejně jako FV syntetizován v játrech, ale na rozdíl od mutovaného proakcelerinu jsou jeho funkce zcela v normálu. Je štěpen faktorem Xa v místě Arg 320 a Arg 271 na meizotrombin a dalším štěpením se z něj stává nejprve α – trombin, β – trombin a poté konečná verze γ – trombin, jehož funkce je štěpení fibrinogenu na fibrin (Pecka 2004).

Stejně jako to bylo u mutace FV Leiden, je tento defekt málo zaznamenáván u lidí afrického a asijského původu. V kavkazské populaci se vyskytuje přibližně u 2% (Slavik et al. 2008). Prevalence se výrazně zvyšuje u lidí, kteří mají v rodinné anamnéze výskyt tromboembolické nemoci. U takto ohrožených lidí je pravděpodobnost výskytu 18% a u lidí s první atakou trombózy je to 6,2% (Kessler 2006).

U této mutace je riziko první ataky žilní trombózy zvýšeno přibližně 3x. Toto riziko výrazně narůstá u žen během těhotenství, porodu a v šestinedělí. Samozřejmě riziko narůstá i v přítomnosti dalších vrozených hyperkoagulačních stavů, v tomto případě jde hlavně o mutaci FV Leiden (Stefano et al. 1996). Protrombinové mutace může také ovlivnit riziko arteriální trombózy, ale toto zjištění není zatím zcela potvrzeno (Slavik et al. 2008).

3.1.4 Deficit antitrombinu

Antitrombin III (AT) je v játrech syntetizovaný plazmový α -2-glykoprotein, který je z velké části zodpovědný za udržování tekutosti krve. Jedná se o nejúčinnější přirozený inhibitor serinových proteáz v těle, který je schopný inaktivovat trombin, ale také další koagulační

faktory jako faktor Xa, XIa, XIIa a IXa (Kvasnička 2003). Inaktivace probíhá stechiometricky vytvořeným komplexem AT s aktivní proteázou v poměru 1:1. Rychlost vzniku komplexu je ovlivněna navázáním heparinu, který mnohonásobně zvyšuje neutralizační aktivitu AT (Poul 2006).

U dospělých se funkční aktivita pohybuje již od 80% a výše. U novorozenců a kojenců asi do 3 měsíců je přirozeně nižší koncentrace AT kolem 50-60% v porovnání s dospělými. Tato snížená hodnota je však kompenzovaná nadbytkem α -2-makroglobulinem (Zapletal 2012).

Musíme ovšem rozeznat sníženou koncentraci AT u nedonošených novorozenců způsobenou bakteriální nebo virovou infekcí, ta může vést k trombotickým komplikacím i fatálním koncům (Kvasnička 2003). Tento nedostatek antitrombinu byl poprvé publikován v roce 1965 panem Egebergem (Urbánková et al. 2002). Je to vzácné autozomálně dominantní onemocnění s nízkou prevalencí v populaci - asi jen u 0,02% (Bertina 2001). „Gen pro antitrombin je lokalizován v 1 chromozomu v oblasti q23-q25, má 7 exonů a 6 intronů“ (Kvasnička 2003). Mutace způsobující nedostatek antitrombinu se vyskytují po celé délce genu (Vojáček 2004). Defekt je spojen s vážným průběhem tromboembolické nemoci, přičemž bylo prokázáno až 50x vyšší riziko vzniku ideopatické hluboké žilní trombózy, tento fakt ukazuje i výskyt deficitu u lidí postižených trombózou, kde se projevuje u 1% pacientů (Slavík et al. 2013).

První manifestace bývají již v brzkém věku, nejčastěji v období puberty, kdy k trombóze dochází bez zjevné příčiny nebo v důsledku lehkého poranění. U žen se může projevit až v těhotenství. Proto je důležité stanovení deficitu hlavně u žen užívajících antikoncepci a s rodinným výskytem tromboembolické nemoci. Především antikoncepce s obsahem estrogenu je vysoce rizikový faktor, neboť ještě více snižuje hladinu antitrombinu v těle. Nebezpečí představuje i často rekurentní forma trombózy (Koliba 2007).

Rozeznáváme dva typy dědičného nedostatku antitrombinu. Deficit antitrombinu I. typu se vyznačuje sníženou koncentrací a současně sníženou činností tohoto proteoglykanu. Tento typ lze prokázat vyšetřením funkce a detekcí antigenu antitrombinu ELISA testem. Deficit antitrombinu II. typu je charakterizovaný pouze nedostatečnou funkcí (Slavík et al. 2013).

Mnohem častěji než vrozený defekt stanovujeme získaný. Ten je způsoben hlavně jaterním onemocněním například cirhózou, dále také medikamentózní terapií nebo zvýšenou ztrátou zapříčiněnou nefrotickým syndromem (Vojáček 2004).

3.1.5 Deficit proteinu C

Další mutace, málo rozšířená, se nazývá deficit proteinu C. Jedná se o autozomálně dominantní mutaci způsobující v kojeneckém věku „purpuru fulminans“, jež může vyústit v úmrtí jedince, nebo u dospělých pacientů léčených dikumarolovanými antikoagulanciemi se často projeví jako ischemická nekróza kůže (Procházka 2004). Podílí se také na vzniku žilní trombózy, a často i v neobvyklém místě jako jsou horní končetiny. Ze 70% je vznik trombózy spontánní, to znamená, že zde nemusí být vliv jiného rizikového faktoru jako je antikoncepce nebo těhotenství (Vojáček 2004). Neméně důležitá je také skutečnost, že postižení touto mutací mají velmi často rekurentní formu tromboembolické nemoci.

Deficit proteinu C se dělí na dva typy. Jako typ I se označuje snížená koncentrace proteinu C, typ II se vyznačuje proteinovou dysfunkcí. Tato charakteristika je pouze doplňková, neboť oba typy se projevují fenotypově stejně. Tak je tomu i u homozygotních a heterozygotních jedinců, kteří nejsou rozdílní v síle projevu nebo četnosti tromboembolických příhod (Slavík et al. 2008). Nedostačující kvantita či kvalita tohoto K-dependentního glykoproteinu je způsobená hlavně mutací, popřípadě mutacemi genu pro protein C. Doposud bylo objeveno na 160 mutací, které jsou překládány do jeho molekuly. Ne všechny mutace jsou původci hyperkoagulačních stavů, některé mohou být klinicky němé.

Jako hyperkoagulační stav byla tato mutace prezentovaná v roce 1981 panem Griffinem a jeho spolupracovníky (Goldenberg et al. 2008). Prevalence ve zdravé populaci stejně jako u deficitu antithrombinu nebo proteinu S je poměrně malá - jen ve 0,2%. Podle několika studií ukazuje výskyt u osob již trpících trombózou 3% zastoupení (Slavík et al. 2008).

3.1.6 Deficit proteinu S

Protein S (PS) je důležitou složkou systému proteinu C. V tomto komplexu má roli kofaktoru aktivovaného proteinu C, čímž zvyšuje jeho degradační schopnosti (Dahlback 1991). V důsledku toho může systém působit antikoagulačně a proteolyticky štěpit faktory Va a VIIIa.

Tento jednořetězcový glykoprotein se syntetizuje jako většina plazmatických bílkovin v játrech (Pecka 2004). Ženy mají fyziologicky vyšší koncentraci celkového proteinu v krvi než muži, a to skoro o 15%. Díky zvýšenému vyplavování estrogenu dochází fyziologicky k poklesu proteinu S v těhotenství (Kvasnička 2010). Koncentrace obvykle

s věkem mírně stoupá. V cévním systému se objevují dvě formy tohoto proteinu. Až 60% proteinu je v těle vázáno do komplexu se složkou komplementu C4-bBP zbylých 40% je ve formě volné plazmatické bílkoviny (Dahlback 1991). Antikoagulační funkce není zprostředkovaná pouze PS v komplexu s APC. Jeho volná i vázaná forma má sama o sobě inhibiční aktivitu. Váže se na některé faktory v koagulační kaskádě, a tím je blokuje. Jeho aktivita je řízená trombinem, který ho může inaktivovat rozštěpením (Pecka 2004).

Více než 220 mutací bylo popsáno v genu PROS 1, jenž je umístěn na dlouhém raménku 3. chromozomu (Beauchamp et al. 2004). Většina z těchto mutací způsobuje změnu v aminokyselinách proteinu S, což narušuje jeho schopnost kofaktoru. Podle účinku mutace se dělí deficit do tří subtypů. První se vyznačuje poklesem koncentrace proteinu S, další má nedostatečnou aktivitu a u posledního subtypu sice stanovujeme normální hladinu celkového proteinu, ale koncentrace volného je snižena díky zvýšené vazebné aktivitě. Nejčastěji se vyskytuje právě třetí subtyp (Slaviček et al. 2008). Prevalence tohoto deficitu je podobná jako u deficitu proteinu C, a to 0,1-1,0% v normální populaci. U pacientů s žilní trombózou se objevuje u 1-5% (Kvasnička 2010).

3.2 Získané hyperkoagulační stavy

Mezi získané rizikové faktory pro vznik trombózy řadí mnoho různých faktorů a stavů. Samy o sobě většinou nezpůsobují srážení krve, ale mohou se připojit k vrozeným trombofiliím, kde pak několikanásobně zvyšují riziko nemoci. Toto riziko ještě dále stoupá s počtem přidružených získaných stavů. Ženy jsou získanými faktory ovlivněny více, neboť jsou ve svém životě často vystaveny několika specifickým situacím, jako je těhotenství, hormonální substituce a užívání hormonální antikoncepce. Proto těmto faktorům práce věnuje větší pozornost.

3.2.1 Těhotenství

U těhotných žen jsou splněny všechny tři Virchowovy trias (Poul 2006). Díky zvětšujícímu se plodu stoupá tlak na okolní žíly, což vede ke zpomalení toku krve, k čemuž se ještě přidává fyziologická těhotenská hyperkoagulace (Kvasnička 2003). Ta je ovlivněna estrogenem, který zvyšuje hladinu některých koagulačních faktorů, současně přispívá k vzestupu koncentrace inhibitorů fibrinolýzy a také dochází k poklesu hladiny proteinu C a S (Urbánková et al. 2002). Zvýšenou hladinu některých inhibitorů podporuje svojí syntézou i

placenta (Kvasnička 2003). Těmito změnami se tělo gravidní ženy fyziologicky chrání před zvýšenou ztrátou krve při porodu (Urbánková et al. 2002). U žen s dědičně podmíněnou trombofilií to však může znamenat větší riziko trombotické příhody, kterou mimo žilního tromboembolismu doprovází často i závažné komplikace jako samovolný potrat, porod mrtvého plodu, retardace nitroděložního růstu, předčasné odloučení placenty nebo preeklampsie (Poul 2006).

Riziko venózního tromboembolismu (VTE) je u těhotných žen 6 - 10 krát vyšší než u stejně starých netěhotných žen a postihuje 1 z 1000 gravidních pacientek (Kessler 2006). Plicní embolie představuje nejčastější příčinu mortalit v těhotenství a šestinedělí (Poul 2006). Riziko VTE je dále ovlivněné věkem, etnikou, obezitou a samozřejmě vrozenými hyperkoagulačními stavy (Kessler 2006). Souvislost VTE s některými trombofiliemi je popsána v tabulce 2.

Tabulka 2: Riziko VTE u těhotných žen s trombofilií (převzato – Kessler 2006)

Trombofilie	prevalence u těhotných s VTE	relativní riziko v těhotenství	pravděpodobnost VTE/ 1000 gravidit
heterozygotní f. V Leiden	20 – 46	5 – 16	2 – 3
homozygotní f. V Leiden	2 – 4	20 – 40	40
heterozygotní Pro 20210A	6 – 26	3 – 15	3 – 5
smíšený heterozygot f. V Leiden + Pro 20210A	7 - 9	9 – 107	10 – 50
deficit antitrombinu	1 – 19	7 – 64	4 – 333
deficit proteinu C	2 – 14	4 – 7	1 – 9
deficit proteinu S	1 - 12	2 - 3	1 - 3

3.2.2 Hormonální antikoncepce

Do života většiny moderních žen patří neodmyslitelně antikoncepce. Existuje mnoho antikoncepčních metod, ale hormonální antikoncepce respektive hormonální kombinovaná antikoncepce (COC) je u nás nejpoužívanější a také patří mezi nejvíce diskutované rizikové faktory tromboembolické nemoci (Koliba 2007).

Podle nynějších odhadů ji užívá více než 100 miliónů žen po celém světě (Dulíček et al. 2002). U nás ji užívá přibližně 34% žen v plodném období života (Koliba 2007). COC a její spojitost se zvýšeným rizikem venózního tromboembolismu (VTE) je známá už více než 40 let (Dulíček et al. 2002). Poprvé tento vztah popsal pan Jordan na případu zdravotní sestry, u které se projevila plicní embolie po nasazení COC. Schopnost COC způsobit vznik trombózy byla poté potvrzena velkou spoustou studií (Šmírová et al. 2002). Tyto komplikace byly připisovány velkému množství estrogenu (ethinylestradiol – EED) v preparátech (Dulíček et al. 2002). Následovalo pokusné snižování estrogenu v pilulkách až na koncentraci 50 µg EED, přičemž opravdu došlo ke snížení rizika VTE. Dalším snižování koncentrace EED již tento jev nebyl sledován (Hadačová 2012). Rozdělení hormonální antikoncepce popisuje tabulka 3.

Tabulka 3: Rozdělení hormonální antikoncepce podle dávky estrogenu (převzato z Dulíček et al. 2002)

typ preparátu	obsah estrogenu	obsah progestinu
preparát 1. Generace	50-100 µg	nortestosteron, norethisteron, lynestrenol
preparáty 2. Generace	30–40 µg	levonorgestrel (LNG)
preparáty 3. Generace	20–30 µg	desogestrel, gestoden

Díky velké studii WHO v roce 1995 bylo potvrzeno, že EED není jedinou příčinou zvýšeného rizika VTE. Na tomto riziku se podílí i přítomnost progestinu a jeho typ v antikoncepčních přípravcích (Poulter et al. 1995). U uživatelék hormonální antikoncepce se obecně uvádí zvýšené riziko VTE 2x až 4x vyšší v porovnání se ženami neužívajícími tyto pilulky. Riziko je závislé na typu preparátu a netýká se čistě gestagenních přípravků (Seifert et al. 2013). Rozdílným vlivům preparátů odlišné generace se věnoval pan Middeldorp a jeho tým v práci Effect on coagulation of levonorgestrel – and desogestrel. Výsledky porovnávání jednotlivých preparátů byly ohromující (Middeldorp et al. 2000). Preparáty 3. generace byly totiž uváděny na trh s přívlastkem „velmi bezpečné s minimem nežádoucích metabolických účinků“ (Šmírová et al. 2002), přičemž ve studii Middeldorp

uvádí 2x větší riziko VTE než je tomu u preparátů 2. Generace (Dulíček et al. 2002). Rozdílnost ve výskytu VTE ukazuje tabulka 4.

Tabulka 4: Incidence VTE u žen užívající různé generace antikoncepce (převzato Dulíček et al. 2002).

Věk	typ antikoncepce	incidence
15-45 let	bez antikoncepce	0,5 / 10 000
15-45 let	COC 2. generace	2 / 10 000
15-45 let	COC 3. generace	3 - 4 / 10 000

Riziko VTE je dále závislé na době užívání antikoncepce. Rozdíly jsou ukázány v tabulce 5.

Tabulka 5: Závislost rizika VTE na době užívání COC v porovnání se ženami bez COC (převzato Dulíček et al. 2002)

první rok užívání	5,1x větší riziko VTE
od 1. o 5. let	2,5x větší riziko VTE
po 5. roce	2,1x větší riziko VTE

Hormonální antikoncepce a hyperkoagulční stavy

Riziko vzniku VTE u zdravých žen užívajících hormonální antikoncepci bylo zmíněno již výše. Tato rizika jsou samozřejmě odlišná resp. zvýšená u žen s trombofilním stavem. „Jednotlivé trombofilní stavy se liší jak svojí frekvencí výskytu v populaci, tak svým trombofilním účinkem.“ Například heterozygotní Leidenská mutace u uživatelék hormonální antikoncepce zvyšuje riziko až 35x a u mutace protrombinu 16x více než u žen bez COC (Dulíček et al. 2002).

4 Materiál a metodika

Cílem této práce je:

- zjistit frekvence výskytu mutace pro faktor V Leiden a mutace protrombinu G20210A u pacientů nemocnice České Budějovice a.s. (dále jen nemocnice). Součástí tohoto cíle bylo osvojení postupů používaných při vyšetřování těchto deficitů a následné zpracování výsledků.
- porovnat vypočtené frekvence s hodnotami udávanými v odborných publikacích.
- zpracovat a vyhodnotit data získaná z dotazníku a vytvořit racionální návrh pro předepisování hormonální.

4.1 Preanalytická část vyšetření

Pacienti navštěvující hematologickou ambulanci nemocnice s podezřením na trombofilní stavy byli vyšetřeni na základě doporučení od svého praktického lékaře či gynekologa.

Vzorek krve nejprve projde hematologickým oddělením, kde se stanovují základní hemokoagulační vyšetření. Poté je odeslán do laboratoře molekulární biologie a genetiky nemocnice České Budějovice a.s. (dále jen genetická laboratoř), kde se stanovuje mutace G20210A pro protrombin. V případě pozitivní nebo hraniční hodnoty APC rezistence je vzorek vyšetřen i na mutaci G1691A FV Leiden.

Vyšetřování pacientů

V roce 2013 navštívilo hematologické oddělení nemocnice 735 pacientů s žádostí o základní hemokoagulační vyšetření. Tato práce se zaměřuje hlavně na pacienty s vyšetřením APC rezistence, kterých bylo 528. Od ledna 2013 do srpna 2013 byly na oddělení výsledky interpretovány pomocí času, který se měřil do vzniku prvního fibrinového vlákna. Na genetiku byly posílané vzorky s časem pod 110 sekund. Od září 2013 byl za výsledek považován výpočet poměrů dvou měření a každý vzorek byl bez ohledu na výsledek zaslán na genetické vyšetření.

Ve stejném období genetická laboratoř vyšetřila 1087 pacientů na mutaci faktoru FV Leiden a 835 na mutaci protrombinu G20210A.

Odběr a příprava biologického materiálu

Krev byla odebírána do vakuových zkumavek s obsahem 3,5% citrátu sodného, který slouží jako antikoagulační činidlo vážící se na kalcium (BD Diagnostics 2004). Nejlépe do 2 hodin od odběru musí být krev centrifugovaná, a to podle typu vyšetření. Centrifugací se oddělí frakce krvinek od dekalifikované plazmy. Následně je plazma odpipetována, označena a použita ke stanovení.

4.2 Oddělení hematologie

Základní hemokoagulační vyšetření obsahují stanovení APC rezistence, Lupus antikoagulant a funkční hladiny proteinu C, S a antitrombinu III. K těmto vyšetřením patří i screeningové testy prothrombinového času (PT) a aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT).

APC rezistence

Jde o obměnu aPTT testu, jehož principem je měření aktivovaného parciálního tromboplastinového času s přítomností APC a bez přítomnosti APC. Robustnost a specifita je zvýšena eliminací rušivých vlivů v koagulační kaskádě. Toho je docíleno přidáním insuficientní plazmy pro FV do plazmy vyšetřované.

Vzorek plazmy je poté inkubován při 37 °C s hadím jedem. Při prvním měření se spouští koagulace přidáním aktivovaného proteinu C s Ca ionty obsaženými ve sloučenině CaCl₂. V druhém jsou přidány pouze ionty Ca. Ihned po spuštění koagulace je měřen čas do vzniku prvního fibrinového vlákna.

Výsledek je vyjádřen buď časem potřebný k vytvoření prvního fibrinového vlákna, nebo výpočtem poměru dvou měření:

APC rezistence = času aPTT s APC / času aPTT bez APC.

Za pozitivní výsledek lze brát buď čas menší než 90 sekund přičemž šedá zóna je ohraničena časem 90 až 110 sekund nebo hodnotou poměru $\leq 1,2$. Šedá zóna je rozmezí, které je pro každou laboratoř individuální. Toto rozmezí nevykazuje patologické hodnoty, ale je zde zvýšená pravděpodobnost záchytu dědičného deficitu proto i tyto vzorky jsou posílané na genetické vyšetření.

4.3 Oddělení genetiky

Běžně používané molekulárně-biologické metody pro detekci bodové mutace G1691A FV Leiden a mutace G20210A pro protrombin jsou založeny na amplifikaci specifického cílového místa DNA polymerázovou řetězovou reakcí. Pro toto stanovení je zapotřebí čistá DNA.

Izolace genomové DNA z plné krve.

V genetické laboratoři nemocnice je používána metoda Genomic DNA Mini Kit. Tento postup je jednoduchý a efektivní pro získání purifikované DNA ze vzorku. Izolace je založená na jednoduchém procesu lýzy buněk a uchycení DNA na kolonce.

Chaotropní soli obsažené v lyzačním roztoku rozrušují intramolekulární vodíkové vazby mezi dusíkatými bázemi DNA, čímž ji denaturují. Pro eliminaci bílkovin se do vzorku přidá 96% etanol, který zajistí jejich precipitaci. Inkubace a centrifugace vzorku ještě lépe pomohou tomuto procesu. Znečišťující látky jsou z roztoku odstraněny promývacím pufrům. Následně se již čistá DNA nechá uvolnit elučním pufrům do nové mikrozkušavky. Takto zpracovaná DNA má přibližně 20-30 kb a je vhodná pro použití v PCR (Geneaid, ©2008).

Stanovení mutace genu pro faktor V Leiden a genu G20210A pro protrombin metodou PCR v reálném čase.

Vyšetření metodou PCR klade vysoké nároky na čistotu DNA. Tu lze měřit přímou fotometrií, přičemž její absorpční maximum je 260 nm. Při této vlnové délce absorbují i některé bílkoviny, proto čistotu DNA zjistíme pomocí vztahu A_{260}/A_{280} , jehož hodnota pro ideální čistou DNA činí 1,8.

PCR je cyklická reakce sloužící k amplifikaci určitého úseku molekuly DNA. Je prováděna v mikrozkušavce, ve které je obsažen vzorek templátové dsDNA s cílovou sekvencí. Do zkumavky se dále přidává roztok SuperHot master mix od firmy Bioron obsahující DNA polymerázu, PCR pufr, čtyři druhy dNTP a kofaktor MgCl₂. Roztok se doplní směsí specifických primerů a sond (Bioron, [b.r.]).

Pro mutaci Leiden se používá směs dvou primerů o délce 22 nukleotidů:

L0 5'- ACC CAC AGA AAA TGA TGC CCA G - 3'

L1 5'- TGC CCC ATT ATT TAG CCA GGA G - 3'

Směs pro prothrombin obsahovala 4 primery o délce 20, 22 a 24 nukleotidů:

P1A 5'- TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC - 3'

P1B 5'- ATA GCA GTG GGA GCA TTG AAG C - 3'

P2A 5'- GAC CCT GTC TCA AAA ATA AAT AAA - 3'

PAB 5'- GTG ACC AAA TGG CTT TCC AG - 3'

Takto připravená reakční směs se připravuje pro počet vzorků plus dvě pozitivní a jednu negativní kontrolu amplifikace, které kontrolují citlivost reakce. Pro pozitivní kontroly jsou vybrány DNA pozitivních pacientů pro faktor V Leiden nebo G20210A pro protrombin. První je mutantního homozygota (+/+), druhá obsahuje DNA heterozygota (+/-) (Fialová et al. 2012).

Vlastní amplifikace a detekce probíhá v přístroji Rotor-Gene Q. Kde je vzorek opakovaně vystaven měnícím se teplotám podle teplotního profilu ukázaného v tabulce 6.

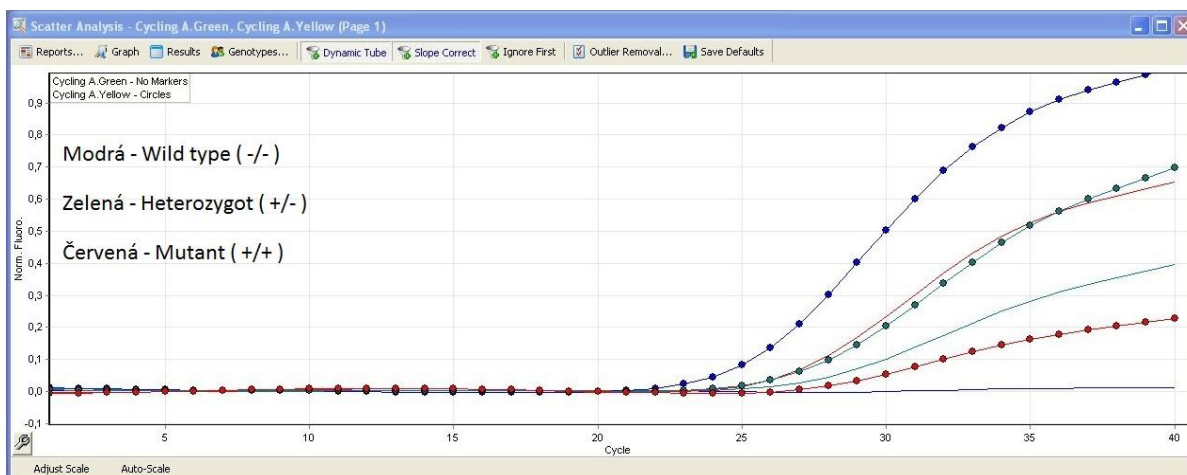
Tabulka 6: Teplotní profil pro PCR. (převzato z Fialová et al. 2012)

Denaturace	94 °C	4min	
Denaturace	94 °C	30 s	35x
Annealing	62 °C	30 s	
Elongace	72 °C	60 s	
Extenze	72 °C	10 min	

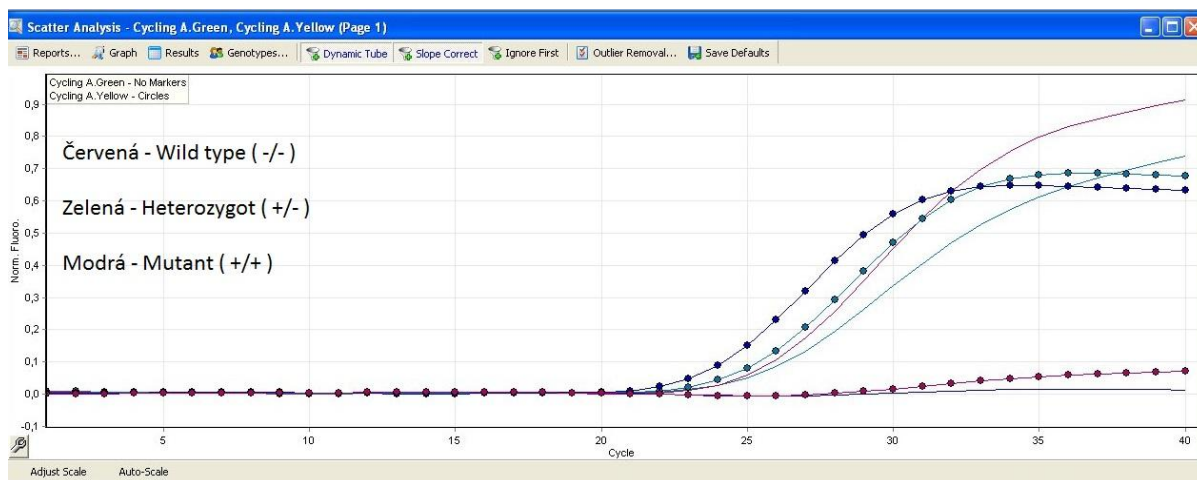
Počáteční denaturace je nezbytná pro rozrušení teplotové DNA a uvolnění vazebných míst pro nasednutí specifických primerů. Poté následuje několikanásobně opakující se cyklus obsahující tři fáze. Denuraci, která slouží k rozdělení dsDNA na dvě ss molekuly. Annealing, v této fázi se sníží teplota na 62 °C a dojde k navázání primerů k jejich komplementárním sekvencím na ssDNA. Ve fázi elongace se teplota zahřeje na 72 °C, při které začne pracovat DNA polymeráza prodlužující vlákno DNA od primeru do konce templátu prostřednictvím volných DTP obsažených v master mixu. Nově vytvořený řetězec slouží jako templát pro další cyklus. Tímto způsobem vzniká za krátkou dobu obrovské množství kopií DNA (Bustin 2004).

Přístroj Rotor-Gene Q je vybaven softwarem, který automaticky detekuje fluorescenci amplikonů. Pomocí kanálů Yellow a Green jsou vyhodnocovány tři typy. Wild type neboli

nemutovaný gen, je rozpoznán pouze Yellow kanálem, naopak Green kanál detekuje mutovaný gen a pokud je fluorescence měřena v obou kanálech jedná se o heterozygota (Scheinost 2012). Příklady, interpretace a výsledky jednotlivých mutací jsou ukázány v obrázku 6 a 7.



Obr 6. Interpretace výsledků mutace V Leiden softwarem Rotor-Gene Q.



Obr. 7: Interpretace výsledků mutace G20210A pro prothrombin softwarem Rotor-Gene Q.

Každá provedená analýza je zkontrolována a vyhodnocena kvalifikovaným pracovníkem. Následně jsou výsledky uloženy na pevném disku, zapsány do laboratorního informačního systému OpenLIMS, vytištěny a předány genetikovi ke klinické interpretaci (Scheinost 2012).

4.4 Dotazník

Dotazník byl do této práce zařazen za účelem rozšíření pohledu na problematiku perorální hormonální antikoncepce (HA). Cílem bylo jednak porovnat předešlý a současný postup předepisování HA, jednak změny v užívání HA u různě starých žen. Zaměřuje se hlavně na to, jaké volí gynekologové postupy při posuzování závažnosti rizika trombózy, a za jakých podmínek doporučují ženám genetické vyšetření.

5 Výsledky

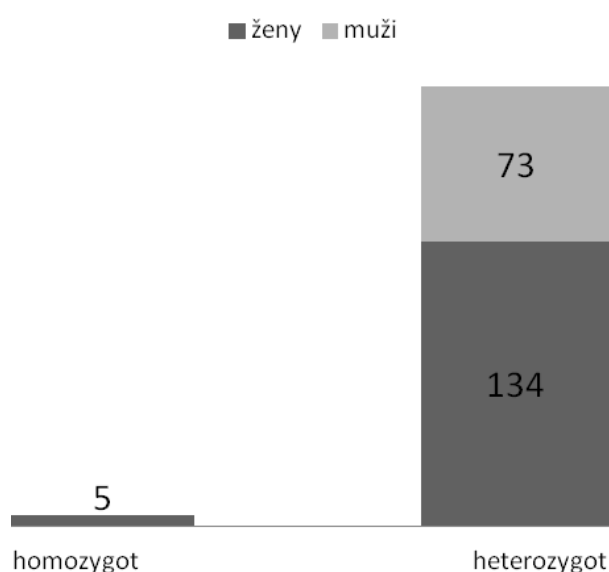
Data získaná z laboratorních vyšetření

V roce 2013 bylo v genetické laboratoři vyšetřeno 1087 pacientů na mutaci faktoru FV Leiden a 835 na mutaci protrombinu G20210A. Z výsledků vyšetření byly vypočítané frekvence výskytu jednotlivých mutací.

Pacienti byli vyšetřeni v rámci předoperačního vyšetření, v těhotenství nebo na základě podezření na dědičnou trombofilii. Požadavky na stanovení faktoru V Leiden a na mutaci protrombinu byly zaslány nejen z oddělení hematologie, ale i z ostatních oddělení a od soukromých lékařů.

Celkově bylo vyšetřeno 1087 pacientů na mutaci faktoru FV Leiden. Z toho ženy byly zastoupeny v 686 a muži v 401 případech. Pozitivní výsledek byl v 19.5%, to znamená 212 pacientů. Homozygotní formu mutace zdědilo 0.5% vyšetřovaných a heterozygotní forma byla prokázána v 19% případů.

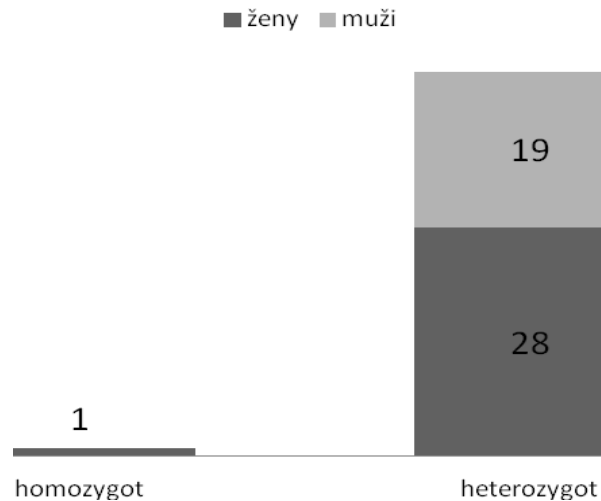
Zastoupení mutace u žen a mužů je znázorněno na obrázku 8.



Obr. 8: Rozdílnost zastoupení pohlaví mutace faktoru V Leiden u pacientů vyšetřovaných v genetické laboratoři.

Stanovení mutace protrombinu G20210A bylo prováděno u 296 mužů a 543 žen. Pozitivní výsledek byl potvrzen v 5.75%, to znamená u 48 pacientů. Homozygotní forma mutace byla u 0.1% vyšetřovaných a heterozygotní forma byla prokázána v 5.6% případů.

Zastoupení mutace u žen a mužů je znázorněno na obrázku 9.

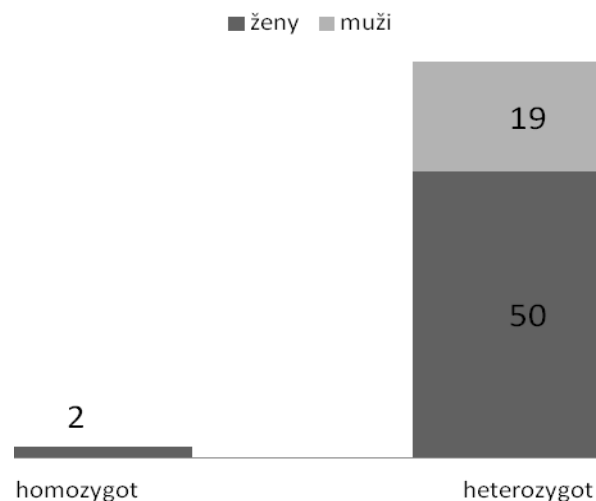


Obr. 9: Rozdílnost zastoupení pohlaví mutace protrombinu G20210A u pacientů vyšetřovaných v genetické laboratoři.

Frekvence výskytu mutací byly vypočítány i z dat získaných na hematologickém oddělení. Vzorky byly zaslány na vyšetření mutace FV Leiden až po stanovení APC rezistence. Od ledna do srpna roku 2013 to byly vzorky s výsledkem ≤ 110 sekund. Od září 2013 byly na genetické vyšetření zaslány všechny vzorky bez ohledu na výsledek APC rezistence.

Stanovení mutace FV Leiden bylo provedeno u 201 pacientů hematologického oddělení. Počet vzorků žen byl 142 a mužů 59. V 71 případech neboli v 34.8% se potvrdila pozitivita. Homozygotní forma byla zjištěna u 1% a heterozygotní u 34%.

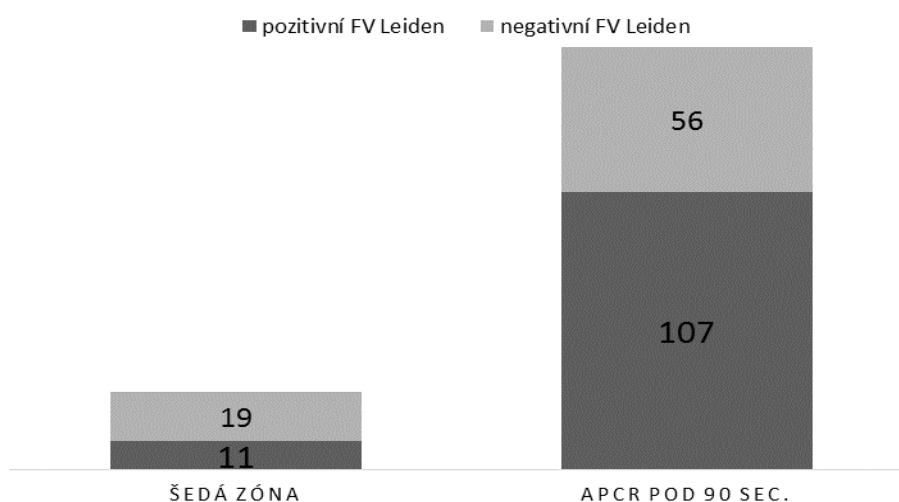
Zastoupení mutace u žen a mužů je znázorněno na obrázku 10.



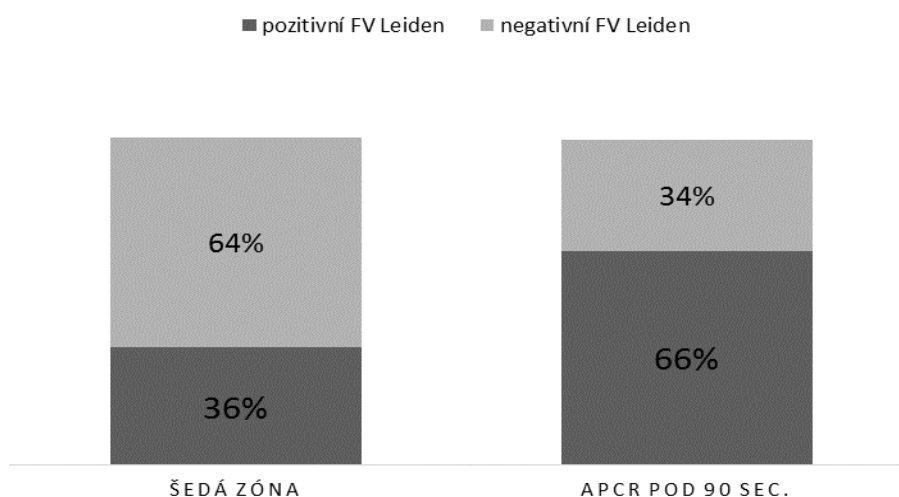
Obr. 10: Rozdílnost zastoupení pohlaví mutace faktoru V Leiden u pacientů hematologického oddělení nemocnice.

Závislost pozitivní mutace FV Leiden na výsledku APC rezistence byla stanovena pouze u vzorků měřených od ledna do srpna 2013. Výsledky jsou rozděleny na šedou zónu, tím je myšlen čas mezi 110 a 90 sekund a pozitivní APC rezistencí neboli časem pod 90 sekund.

V daném období bylo vyšetřeno 528 osob na APC rezistenci. Pozitivní výsledek, tedy čas pod 90 sekund, se objevil u 163 pacientů. Tento počet tvoří 31% z celkového počtu vyšetřovaných. V šedé zóně se nacházelo 30 pacientů. Potvrzení mutace FV Leiden je ukázáno na obrázku 11. a 12.



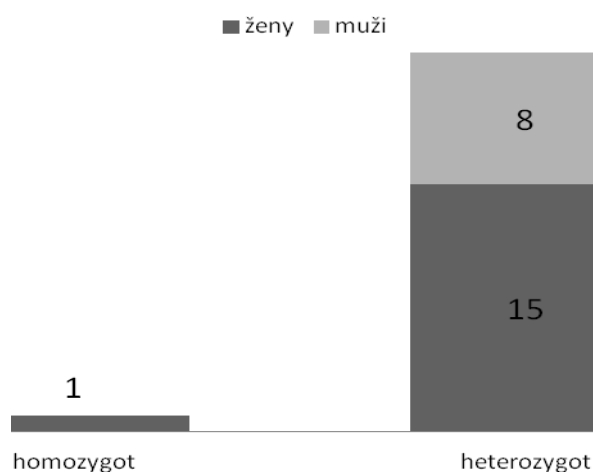
Obr. 11: Pozitivní výsledek mutace FV Leiden u pacientů s APC rezistencí pod 110 sekund.



Obr. 12: Rozdílnost ve frekvenci výskytu pozitivního výsledku mutace FV Leiden v šedé zóně a pozitivní APC rezistenci.

Všechny vzorky hematologického oddělení s požadavkem na základní hemokoagulační vyšetření byly poslány na stanovení dědičné mutace protrombinu G20210A. Tito pacienti byli pozitivní přibližně ve 3%. Ze 734 vzorků, které tvořilo 438 žen a 296 mužů bylo 24 pozitivních. Homozygot byl potvrzen pouze v jednom případě.

Zastoupení mutace u žen a mužů je znázorněno na obrázku 13.



Obr. 13: Rozdílnost zastoupení pohlaví mutace protrombinu G20210A u pacientů hematologického oddělení nemocnice.

Tyto frekvence byly dále porovnávány s obecně uznávanými frekvencemi v odborné literatuře.

Data z dotazníku

Postupem dotazníkového šetření byly získány informace od náhodně vybraných respondentek v období leden-únor roku 2014. Všechny splňovaly tyto požadavky: věk 19 až 59 let, žádná respondentka se nepohybovala ve zdravotnickém prostředí a všechny byly potenciálně zdravé. Data byla sbírána v prachatickém okrese prostřednictvím jednoduchých uzavřených otázek. Dotazník je vložený v příloze č. 1.

Celkem se dotazníkové akce účastnilo 82 žen. Šest z nich ve věku 36 a nad 40 nikdy neužívalo perorální hormonální antikoncepci ani ji nechtělo nikdy předepsat. Tyto ženy nebyly nikdy vyšetřované na genetické mutace a gynekolog je nikdy neobeznámil s rizikovými faktory vzniku trombóz. Těchto šest žen nebylo zařazeno do dalších analýz.

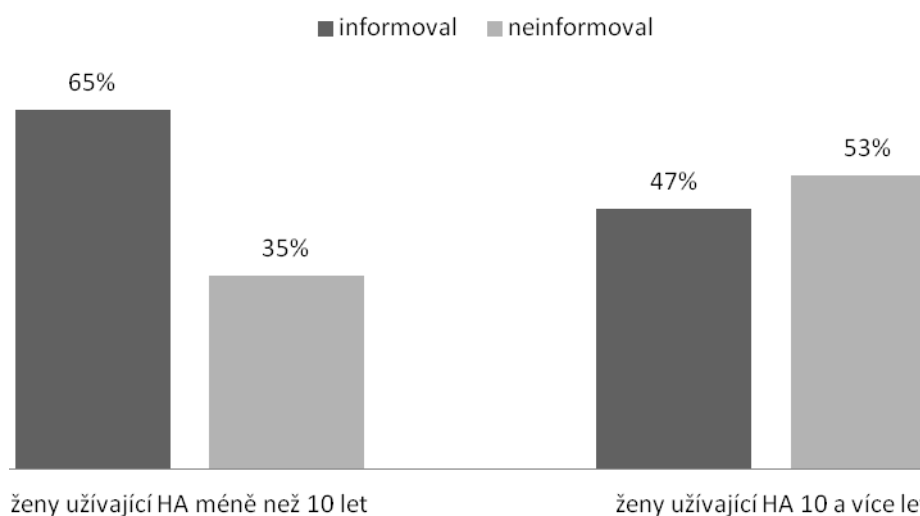
Ženy, které užívaly nebo užívají HA, byly rozděleny do dvou kategorií podle věku. Cílem tohoto rozdělení bylo porovnání starší a mladší generace v otázce délky užívání HA a době jejího prvního předepsání (Tab. 7).

Tabulka 7: Průměrný věk prvního předepsání HA a průměrná doba užívání HA u respondentek.

	Celkový počet respondentek užívající HA	Průměrný věk prvního předepsání HA	Průměrná doba užívání HA
Ženy ve věku od 19 do 34 let	38	19 let	7 roků
Ženy ve věku od 35 do 59 let	38	31 let	10.5 roku

Další analýzy rozdělily ženy podle doby užívání HA, což umožnilo posoudit, zjišťování klinických kritérií potřebných k předepsání HA v rámci několika generací.

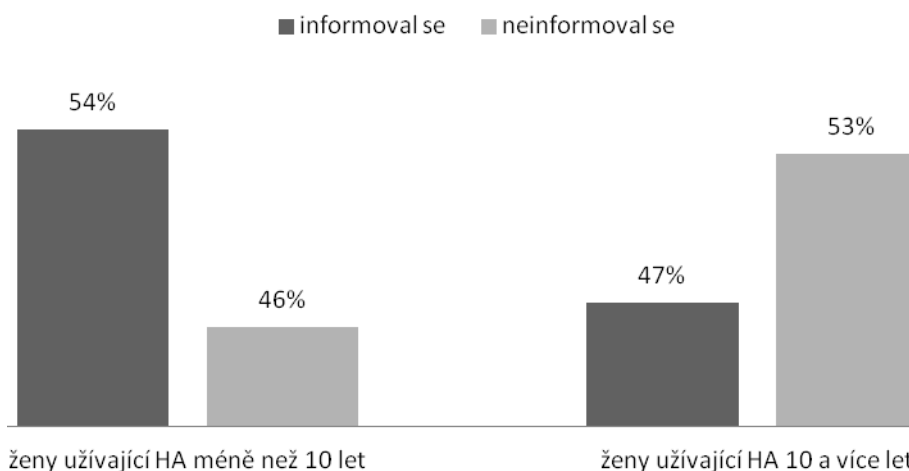
Při předepisování hormonální antikoncepce je nutno ženy informovat o možných rizikových faktorech. U dotazovaných se tak stalo pouze v 65% případů, z čehož vyplývá, že každá třetí žena nebyla informovaná. Ženy užívající HA více než 10 let byly informovány pouze v 47% (Obr. 14). Přestože jsou rizika popsána v každém příbalovém letáku, neměl by na toto lékař spoléhat.



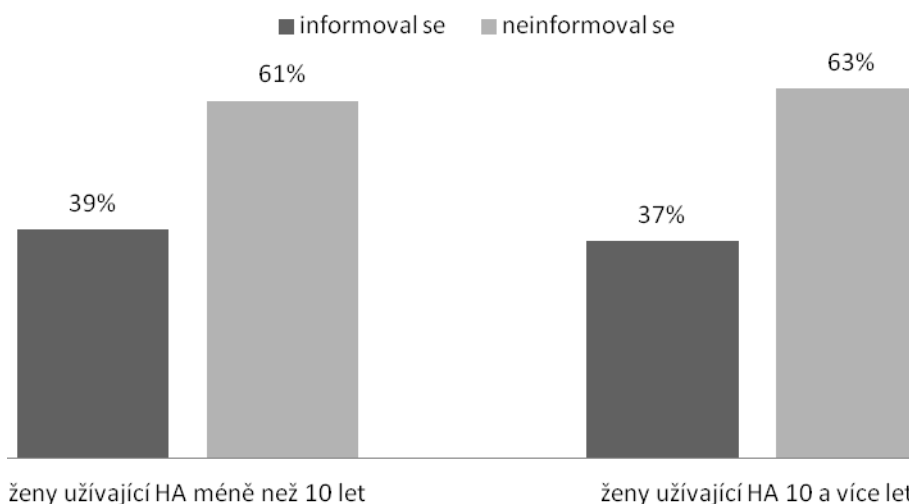
Obr. 14: Četnost žen, které byly informované gynekologem o rizikových faktorech užívání kombinované hormonální antikoncepce.

Mezi informace, které jsou potřebné k vyhodnocení rizika trombózy při užívání HA, patří několik klinických kritérií. Mezi nejdůležitější se řadí správně odebraná rodinná i osobní anamnéza (Obr. 15 a 16), která pomůže při zvažování indikace vyšetření vrozených trombofilních faktorů. Obecné rizikové faktory mají při stratifikaci rizika minimálně stejnou váhu jako vrozené.

U dotazovaných se objevila trombóza v osobní anamnéze dvakrát, a to u 36leté a 39leté ženy, a pouze jedna z nich dostala od lékaře doporučení k vyšetření dědičných trombofilií.



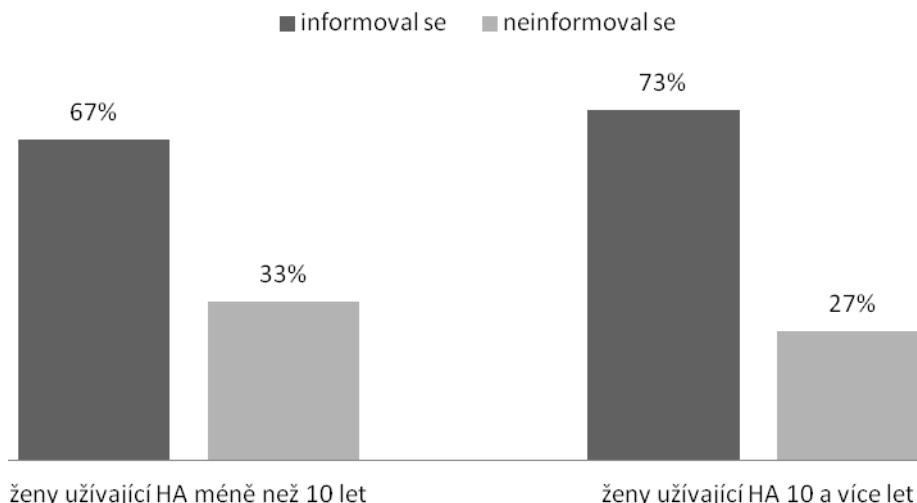
Obr. 15: Četnost žen, které byly gynekologem tázány na výskyt trombózy v osobní anamnéze.



Obr. 16: Četnost žen, které byly gynekologem tázány na výskyt trombózy v rodinné anamnéze.

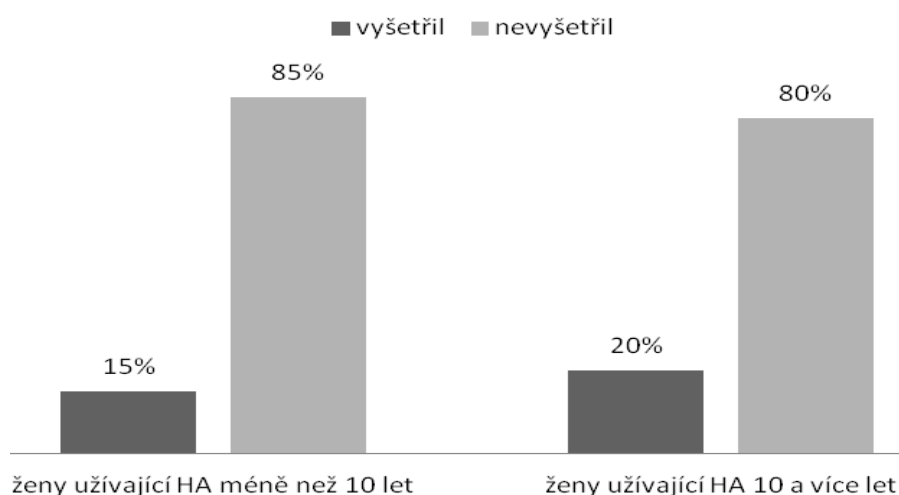
V rodině bývá trombóza důležitá hlavně u blízkých příbuzných, tím jsou myšleni rodiče a sourozenci. Ze 76 respondentek mělo 15 blízkých příbuzných postiženo srážením krve.

Další faktor, na který je nutno se zaměřit, je kouření. Neboť kouření společně s užíváním HA a přítomností dědičného defektu tvoří významné predispozice k tvorbě krevní sraženiny. Respondentky byly na otázku kouření tázány nejčastěji (Obr. 17).



Obr. 17: Četnost žen, které byly gynekologem tázány na kouření.

Mezi nejvíce opomíjené kritérium patřilo vyšetření žil dolních končetin (Obr. 18)



Obr. 18: Četnost žen, kterým gynekolog vyšetřil pohledem i pohmatem žíly dolních končetin.

Na základě zjištěných obecných rizikových faktorů, by měl lékař posoudit, zda ženu doporučit na genetické vyšetření. Stanovení vrozeného hyperkoagulačního stavu by mělo být indikováno, pokud jsou přítomny alespoň dva znaky definující klinickou trombofilií.

Dotazované ženy dostaly doporučení v 11 případech (tab. 8), z nich pouze 2 mají výskyt trombózy u blízkých příbuzných. Ze zbylých 13 žen, které mají výskyt tohoto onemocnění u blízkých příbuzných, nedostala doporučení žádná.

Některé ženy vyšetření podstoupily i bez doporučení. Z těchto 4 probantek 2 měly výskyt trombózy u rodičů. U jedné se potvrdil pozitivní výsledek.

Tabulka 8: Zastoupení pozitivních a negativních výsledků u žen vyšetřovaných na genetické příčiny vzniku trombózy.

	Celkový počet	Podstoupení vyšetření	Pozitivní výsledek	Pozitivní výsledek v %
Ženy s doporučením gynekologa	11	9	3	33%
Ženy bez doporučení gynekologa	4	4	1	25%

6 Diskuze

Mutace koagulačního faktoru V Leiden a protrombinu G20210A jsou nejvíce frekventované deficity způsobující zvýšené riziko tvorby krevní sraženiny. Podle Grody et al. (2001) je přítomnost hlavně Leidenské mutace podstatná u osob, které čeká velká operace nebo u žen, které měly komplikace v těhotenství, potrat nebo pozitivní rodinnou anamnézu.

Podle Kesslera (2006) a Kvasničky (2003) by měly být na hyperkoagulační stavy vyšetřeny osoby se žilním tromboembolizmem v neobvyklé lokalizaci nebo před 45. rokem života, osoby s pozitivní rodinnou anamnézou u přímých příbuzných, ženy, které prodělaly rekurentní spontánní potrat a osoby s vrozenou trombofilií v rodině.

Frekvence v této práci byly spočítány z dat získaných z laboratoře molekulární biologie a genetiky a z oddělení klinické hematologie nemocnice České Budějovice a.s.

K detekci Leidenské mutace byla použita metoda Real-time PCR.

Podle Bertina (2001) je prevalence mutace FV Leiden ve zdravé populaci 3%. Podobné výsledky uvádí ve své práci i Kvasnička et al. (2012), který se zaměřuje na populaci v České republice. Vojáček (2004) ve své knize udává zastoupení této mutace ve velkém rozmezí, které činí od 3 do 15%. Stejně rozmezí uvádí ve své práci i Slavík (2008). Zastoupení homozygotů a heterozygotů ukázal ve své práci Rosendaal (1995), který stanovil frekvenci homozygotů 0.5% a heterozygotů 18%. O něco nižší jsou výsledky studie Noha Irani-Hakime (2000), který udává frekvenci heterozygotů 14% a homozygotů 0.5%. Z dat získaných z genetické laboratoře byla vypočtena frekvence výskytu Leidenské mutace 19.5%. Z toho homozygoti byli v 0.5% a heterozygoti se vyskytovali v 19%. Frekvence pozitivní mutace FV Leiden na hematologickém oddělení byla několikanásobně vyšší (34.8%), přičemž homozygoti tvořili 1% a heterozygoti 34%. Ve srovnání s uvedenými studii jsou mnou vypočtené frekvence razantně vyšší. Tyto hodnoty lze vysvětlit rozdílnou skupinou testovaných pacientů. Na rozdíl od předešlých studií, které se zaměřovaly na zdravou populaci, v hematologické i genetické laboratoři se testovaly hlavně osoby s předpokládaným výskytem dědičné trombofilie.

Druhým vyšetřovaným dědičným deficitem byla mutace protrombinu G20210A. V práci Poorta et al. (1996) a Bertina (2001) je hodnota prevalence 2.3%. Vojáček (2004) udává rozmezí mezi 2% - 5%. Poort (1996) a De Stefano et al. (1998) vyhodnotili ve svých studiích 0% zastoupení homozygotního genotypu a De Stefano et al. (1998) ještě vyhodnotil zastoupení heterozygotů 2.5%. Obecně jsou však homozygoti udávaní v 0.014% (Poort et al. 1996). Mé frekvence z genetické laboratoře odpovídají 5.7% prevalenci. Homozygotní

genotyp je zastoupen v 0.1% a heterozygotní v 5.6%. V hematologické laboratoři je záchyt o něco menší a více se blíží předešlým výzkumům (3.3%). Homozygot se vyskytuje u 0.1% pacientů a heterozygot u 3.2%.

Je zajímavé, že mnou vypočtená prevalence výskytu mutace FV Leiden je vyšší u pacientů poslaných na genetické vyšetření z hematologického oddělení, ale u mutace protrombinu G20210A je to naopak. Domnívám se, že je to důsledek lepší specifikace pacientů vyšetřovaných na mutaci FV Leiden. Tito pacienti jsou totiž nejprve testováni na APC rezistenci, která je fenotypem právě mutace FV Leiden. Pokud se jejich výsledek nachází v šedé zóně nebo je pozitivní, posílá se na genetické vyšetření, kde se ve většině případů mutace prokáže. Vzorky testované na mutaci protrombinu nejsou vyšetřované žádným předešlým stanovením.

APC rezistence je fenotypový projev mutace FV Leiden. Avšak jsou případy, kdy je APC rezistence fyziologická, a přesto se Leidenská mutace potvrdí. To bývá hlavně u hraničních hodnot. A naopak jsou případy, kdy je APC rezistence pozitivní a dědičný deficit se nepotvrdí.

Hematologické oddělení do srpna 2013 považovalo za pozitivní výsledek APC rezistence čas pod 90 sekund. Pro zachycení i těch pacientů, kteří mají APC rezistenci v normě a mohli by mít i přesto Leidenskou mutaci, byla vytvořena tzv. šedá zóna. Toto rozmezí si každá laboratoř určuje sama podle vlastních zkušeností. Hematologické oddělení ji má nastavenou na 90 až 110 sekund. Data, která byla zpracovaná, potvrzují, že žádný vzorek testovaný na APC rezistenci s výsledkem nad 110 sekund nebyl postižen dědičnou mutací FV Leiden. Přičemž v šedé zóně se potvrdila pozitivita mutace Leiden v 36% a u výsledků pod 90 sekund v 66%.

Od září 2013 byla změněna interpretace výsledků. Výsledkem je nyní poměr časů dvou měření. Zde je pozitivita určena hodnotou ≤ 2.1 . U těchto výsledků dosud není stanovena šedá zóna a na genetické vyšetření jsou posílány všechny vzorky, což je i finančně náročné. Ze zpracovaných dat jsem vytvořila návrh pro šedou zónu, která by mohla být v rozmezí 1.21 – 1.43. Vzhledem k malému počtu vyšetřovaných osob je však toto rozmezí nedostačující. Předpokládám, že při dlouhodobějším měření by se vyskytlo několik vzorků, které by měly výsledek APC rezistence vyšší než 1.43, a přesto by měly potvrzenou Leidenskou mutaci.

Dotazník byl do této práce zařazen za účelem rozšíření pohledu na danou problematiku. Neboť i přes skutečnost, že zvyšuje srážení krve a spadá mezi významné rizikové faktory trombózy, patří v současné době neodmyslitelně do života většiny žen.

Vždyť pouze v České republice v roce 2013 užívalo hormonální antikoncepci podle výzkumu UZIS (2013) 52% žen ve fertilním věku (15-49 let).

Dotazník se zaměřoval na důslednost gynekologů při předepisování hormonální antikoncepce. V první otázce jsem se zajímala o délku užívání HA a věk, kdy uživatelky poprvé požádaly o její předepsání. V průměrném věku prvního předepsání HA byl velký rozdíl. U mladší generace (19-34 let) žen byl průměrný věk prvního předepsání 19 let, starší generace měla tuto hranici posunutou o více než deset let (31 let). Toto zjištění přikládám faktu, že dříve nebyla HA tak dostupná jako dnes, a také podmínky, které musela žena splňovat, byly přísnější. Například povinné jaterní testy u každé ženy žádající o HA a alespoň jedno úspěšné těhotenství (ústní sdělení gynekologa).

Dále jsem se informovala, zda byly ženy obeznámeny s rizikovými faktory před předepsáním HA a zda se tázány na osobní a rodinnou anamnézu, která je v indikaci vrozených trombofilií klíčová. U mnou dotazovaných žen se gynekolog ptal na osobní anamnézu pouze v 54% případů u mladší generace a ve 47% u starší generace. S informovaností na rodinnou anamnézu na tom byly obě generace podobně, pouze v necelých 40%. Tento počet je podle mého názoru nedostačující. V České republice se udává 1 případ venózního tromboembolizmu na 1000 obyvatel (Dulíček 2013), u dotazovaných probantek se trombóza u blízkých příbuzných vyskytla u každé páté ženy.

Ze 76 žen podstoupilo vyšetření vrozených trombofilií jen 15. Z nich pouze 3 měly trombózu v rodinné nebo osobní anamnéze, 8 dostalo doporučení na základě jiných predispozic a 4 ženy se nechaly vyšetřit bez doporučení lékaře. Z těchto 15 žen byla vrozená trombofilie potvrzena ve 4 případech, to je 27%.

Data získaná z dotazníku ukazují, že je stále velké procento žen, které nebyly informované o rizikových faktorech užívání HA nebo nebyly dotazované na základní otázky spojené s předepsáním antikoncepce. Mezi nimi je i velký počet žen, které by mohly mít genetické predispozice ke zvýšené tvorbě krevní sraženiny, a přesto nebyly vyšetřeny na vrozené trombofilie.

Právě problematika indikace vyšetření vrozených trombofilních faktorů je v současné době tématem mnoha diskuzí. Někteří se přiklání ke screeningovému vyšetření těchto stavů, druzí jsou naopak odpůrci. Já se přikláním ke straně odpůrců screeningového vyšetření. Podle mého názoru, pokud se gynekologové budou důsledně informovat na všechny rizikové faktory a pečlivě zvažovat genetická vyšetření, nebude potřeba každou ženu preventivně testovat.

Z dat získaných pomocí dotazníku je patrné, že věk uživatelů antikoncepce se razantně snížil. Lze předpokládat, že dnes již nejsou výjimkou 15leté dívky užívající HA. Při pohledu na další získané informace je patrné, že postupy gynekologů nejsou ideální, avšak i při správném postupu nemusí být zjištěny všechny potřebné informace jako například rodinná anamnéza. Pro zlepšení této situace by podle mého názoru bylo vhodnější zaměřit se na ženy samotné a to hlavně na mladé dívky, které teprve zvažují užívání HA. U těch je totiž nejvíce pravděpodobné, že nebudou dostatečně informované o nemocech v rodině nebo rizicích HA. Proto se domnívám, že by se téma HA mělo být více probírat například v rámci sexuální výchovy na základních školách. V hodinách by poté měly dívky možnost získat dotazník, kde by byly shrnuty otázky, na které se lékař při předepisování bude ptát. Dívka by pak jednoduše zjistila potřebné informace a vyplnila je do dotazníku, který by poté předala svému gynekologovi. Tímto způsobem by se předešlo neznalosti důležitých informací pro stanovení rizika hyperkoagulačních stavů.

7 Závěr

- V průběhu zpracování této práce jsem si osvojila postupy analýzy mutace faktoru V Leiden a mutace protrombinu G20210A
- Stanovila jsem frekvence těchto mutací u vzorků poslaných do laboratoře molekulární biologie a genetiky a u pacientů oddělení hematologie.
- Prevalence mutací testovaných skupin jsou vyšší než v odborné literatuře.
- Data získaná s dotazníku ukazují na nedostatečné vyšetření rizikových faktorů před předepsáním HA.
- Pro zlepšení komunikace mezi pacientkou a gynekologem bych doporučovala vytvořit krátký dotazník, který by byl dostupný například na internetu. Na základě tohoto dotazníku by gynekolog stanovil riziko vzniku trombózy a následně pak ženu doporučil na další vyšetření.
- V rámci vyšetření hyperkoagulačních stavů by mělo být stanovení proteinu C a S, APC rezistence a v neposlední řadě mutace FV Leiden a protrombin A20210G.

8 Seznam citované literatury

BERAN, Stanislav, 2006. *Hyperkoagulační stavy* [online]. Postgraduální medicína. 4/2006. [cit. 12.4.2014]. ISSN 1212-4184. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/hyperkoagulacni-stavy-264356>.

KVASNIČKA, Jan, 2003. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha: Grada. ISBN 8071699934.

Natural inhibitors. [online]. [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: <http://www.thrombosisadviser.com/en/resources/image-library/>

URBÁNKOVÁ, Jana, Chochola M., Vařejka P., Jirát S., Heller S., Karetová D. a Aschermann M., 2002. *Hyperkoagulační stav a hluboká žilní trombóza*. Kardiologická revue 4/2002, 282-284. ISSN 2336-288X.

POUL, H., 2006. *Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci*. Spolek pro trombózu a hemostázu vydáno u příležitosti konání XII. Pařízkových dní.

KESSLER, Petr, 2006. *Trombofilní stavy*. Interní medicína pro praxi 9/2006 , 374-379. ISSN 1212-7299.

MUSIL, Dalibor, 2009. *Rizika a prevence tromboembolické choroby*. Interní medicína pro praxi 6/2009, 61-65. ISSN 1212-7299.

PECKA, Miroslav, 2004. *Laboratorní hematologie v přehledu III. Fyziologie a patofyziologie hemostázy*. Český Těšín : Finidr. ISBN 80-86682-03-X.

VOJÁČEK, Jan, 2004. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 80-247-0501-X.

WIDIMSKÝ, Jiří, 2007. *Nové algoritmy v diagnostice a stratifikaci nemocných s akutní plicní embolií*. Intervenční a akutní kardiologie 6/2007 (Suppl. B): B6–B10. ISSN 1213-807X.

LEDVINA, Miroslav, Stoklasová, A., Cerman, J., 2006. *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0851-0.

PROCHÁZKA, M., Procházková J., Lubušský M., Slavík L., 2004. *Trombofilní stavy v porodnictví – I. část*. Praktická gynekologie 4/2004, 12-16. ISSN 1211-6645.

MATÝŠKOVÁ, Miloslava, Zavřelová, J., Hrachovinová, I, 1999. *Hematologie pro zdravotní laboranty 2. díl Krevní srážení*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-278-7.

REES, D.c., Cox M., Clegg J.B., 1995. *Word distribution of faktor V Leiden*. Lancet. 1995. ISSN 1133-1134.

DE STEFANO, Valerio, Finazzi G., Mannucci PM., 1996. *Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management*. Blood. Vol 87, No 9/ 1996. ISSN 1528-0020

PENKA, Miroslav, Tesařová E. a kolektiv, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.

SEGRS, Kenneth, Dahlback B., Nicolaes G., 2007. *Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms*. Thromb Haemost 98/2007, 530-542.

OURIEL, Kenneth, Green R., DeWeese J., Cimino C., 1995. *Activated protein C resistance: Prevalence and implications in peripheral vascular disease*. Journal of Vascular Surgery. Vol 23, 1/1995, 46-52. ISSN 23:46-52.

SLAVIK, Luděk, 2013. *Genetics and molecular pathophysiology of thrombotic states*. Pregnancy Thrombophilia - The Unsuspected Risk. ISBN: 978-953-51-1199-3, InTech, DOI: 10.5772/56528.

DAHLBACK B., Hillarp A., Rosen S., Zoller B., 1996. *Resistance to activated protein C, the FV: Q506 allele and venous thrombosis*. Annals of Hematology. 72/1996. ISSN 1432-0584.

HUDEČEK, J., Ivánková J., Dobrtotová M., Hybenová J., Pullmann R., Kubisz P., 1999. *Analysis of phenotype resistance to activated protein C (ACP resistance)*. Vnitřní lékařství 1999. Roč. 45/12. ISSN 0042-773X.

CASTOLDI, Elisabetta, Brugge J., Nicolaes G., Girelli D., Tans G., Rosing J., 2004. *Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations*. Blood Vol.103 11/2004. ISSN 1528-0020.

SLAVIK, Luděk, Krcova V., Hlusi A., Procházková J., Procházka M., Ulehlová J., Indrák K., 2008. *Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics*. Biomedical Papers 2009, 153(1),19-25. ISSN 1213-8118.

POORT, SROV., Rosendaal F., Reitsma P., Bertina R., 1996. *A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis*. Blood, Vol 88, 10/1996. ISSN 1528-0020.

ZAPLETAL, Ondřej, 2012. *Trombofilní stavy a jejich klinický význam v dětské populaci České republiky*. Disertační práce. Brno: Masarykova univerzita, lékařská fakulta, dětská interní klinika, oddělení dětské hematologie FN Brno. Školitel Prof. MUDr. Hana Hrstková, CSc.

BERTINA, Rogier, 2001. *Genetic approach to thrombophilia*. Journal of Thrombosis and Haemostasis 86/2001, 92-103. ISSN: 1538-7836.

KOLIBA, Peter, 2007. *Rizika a přínos hormonální antikoncepce*. Interní medicína pro praxi 9/2007, 520-524. ISSN 1212-7299.

GOLDENBERG, N., Manco- Johnson M., 2008. *Protein C deficiency*. Haemophilia 14/2008. 1214-1221. ISSN: 1365-2516.

DAHLBACK, B., 1991. *Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant systém*. . Journal of Thrombosis and Haemostasis 12/1991, 49-61. ISSN: 1538-7836.

KVASNIČKA, Jan, 2010. *Dědičné trombofilie- doporučení k provádění genetických testů v klinické praxi*. Časopis lékařů českých 2010. 149(10). ISSN 0008-7335.

BEAUCHAMP, N., Dykes A., Parikh N., Campbell T., Daly M., 2004. *The prevalence of, and molecular defects underlying, inherited protein S deficiency in the general population*. British Journal of Haematology 2004, 152 (5). ISSN: 1365-2141.

DULÍČEK, Petr, Kalousek J., Malý J., 2002. *Hormonální antikoncepce a tromboembolická nemoc- jak je to ve skutečnosti*. Interní medicína pro praxi 8/2002. ISSN 1212-7299.

ŠMÍROVÁ, S., Chochola M., Aschermann M., 2002. *Hluboká žilní trombóza v souvislosti s užíváním estrogen-gestagení perorální antikoncepce*. Kardiologická revue 4/2002, 279-281. ISSN 2336-288X.

HADAČOVÁ, Ivana, 2012. *Trombóza a hormonální antikoncepce u mladistvých dívek*. Pediatrie pro praxi. 2012, 13(4), 225-226. ISSN 1213-0494.

POULTER N., Chang C., Farley T., Meirik O., Marmot M., 1995. *Venous thromboembolic diseases and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study*. World Health Organization collaborative study of cardiovascular disease and steroid hormone contraception. Lancet 1995. ISSN 1133-1134.

SEIFERT, Bohumil, Jirsová E., Kliská D., Kostálová D., Keřková P., Pospíšilová B., 2013. *Hormonální antikoncepce*. Informační listy Státního ústavu pro kontrolu léčiv určené široké laické veřejnosti. 04/2013. Dostupné také na <http://www.olecich.cz/>.

MIDDELDORP, S., Meijers J., Ende A., Bouma B., Rosing J., Prins M., Buller H., 2000. *Effects on coagulation of levonorgestrel and desogestrel containing low dose oral contraceptives. A cross-over study*. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2000, 84(1). ISSN: 1538-7836.

Katalog produktů, 2004. Oxford: BD Diagnostics, Preanalytical systém.

Genomi DNA mini kit. [online]. [cit. 2014-06-28]. Dostupné z: <http://www.geneaid.com/sites/default/files/GB5.pdf>

Superhot master mix. [online]. [cit. 2014-06-28]. Dostupné

z: <http://www.bioron.net/en/products/pcr-products/mastermixes/qpcr/superhot-master-mix-2x/>

FIALOVÁ, M., Šantová D., 2012. *Příprava pozitivních kontrol pro stanovení mutace v genu G1691A pro faktor V Leiden a v genu G20210A pro prothrombin*. České Budějovice: Nemocnice České Budějovice a.s. 2012.

BUSTIN, Stephen, 2004. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line. ISBN: 0-9636817-8-8.

SCHEINOST, Ondřej, 2012. *Stanovení mutace genu pro faktor V Leiden (FVL) metodou PCR v reálném čase*. České Budějovice: Nemocnice České Budějovice a.s. 2012.

GRORY, Wayne, Griffin J., Taylor A., Korf b., Hejt J., 2001. *American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing*. *Genetics in Medicine* 2001, 3(2), 139–148. ISSN: 1098-3600.

KVASNÍČKA, J., Hájková J., Bobčíková P., Kvasnicka T., Dusková D., Poletínová S., Kieferová V., 2012. *Prevalence of thrombophilic mutations of FV Leiden, prothrombin G20210A and PAI-1 4G/5G and their combinations in a group of 1450 healthy middle-aged individuals in the Prague and Central Bohemian regions*. *Journal of Czech Physicians*, 2012. 151(2), 76-82. ISSN: 0008-7335.

ROSENDAAL F., Koster T., Vandenbroucke J., Reitsma P., 1995. High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance). *Blood*. 1995, Vol 85, No 6, 1504-1508. ISSN: 1528-0020.

IRANI-HAKIME Noha, Kreidy R., Almawi W., 2000. The prevalence of factor V R506Q mutation-Leiden among apparently healthy Lebanese. *American Journal of Hematology*. 2000, Vol. 65, 45–49. ISSN: 1096-8652.

De Stefano V., Chiusolo, Paciaroni, Casorelli, Rossi, Molinari, Servidei, 1998. *Prothrombin G20210A Mutant Genotype Is a Risk Factor for Cerebrovascular Ischemic Disease in Young Patients*. *Blood*. 1998, Vol. 91 (10). ISSN: 1528-0020.

Činnost oboru gynekologie a péče o ženy, 2013. Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, 20/2013.

DULÍČEK Petr, 2013. *Výskyt venózního tromboembolismu u žen v časové souvislosti s užíváním hormonální antikoncepce*. Transfuze a hematologie dnes : časopis Společnosti pro transfuzní lékařství a Hematologické společnosti, 2013, No. 1, p. 33-38. ISSN: 1213-5763

9 Přílohy

Dotazník

Zdravím Vás milé ženy,
jmenuji se Iva Černá a jsem studentkou 3.ročníku oboru biomedicínský laboratorní technik. Prosím Vás o vyplnění tohoto dotazníku, který mi bude podkladem pro výzkum mé bakalářské práce, ve které se zabývám vlivem antikoncepce na vznik trombóz (zvýšené srážení krve, které má za následek např. plicní embolii). Vyplněním dotazníku mi pomůžete zjistit zodpovědnost gynekologů vůči Vám a informovanost žen o rizikových faktorech tohoto onemocnění. Dotazník je anonymní.

HA = hormonální antikoncepce

- 1) Jaký je Váš věk?...
- 2) Užíváte nebo jste někdy užívala hormonální antikoncepci? **Ano** / **Ne**
- 3) Pokud byla odpověď **Ano** (odpovídejte na další otázky počtem roků nebo měsíců):
 - Jak dlouho jste HA brala dohromady?
 - Pokud jste měla v braní přestávky delší než 3 měsíce kolik jich přibližně bylo ?
 - Jak dlouhá byla nejdelší přestávka (přibližně) ?
 - Jaká byla nejdelší doba braní HA bez přestávky (přibližně)
- 4) Informoval Vás gynekolog o rizikových faktorech hormonální antikoncepce? **Ano** / **Ne**
- 5) Informoval se Váš gynekolog:
 - Zda jste prodělala trombózu? **Ano** / **Ne**
 - Zda máte v rodinné anamnéze trombózu? **Ano** / **Ne**
 - Zda kouříte? **Ano** / **Ne**
 - Vyšetřil pohledem a pohmatem žíly na dolních končetinách? **Ano/ Ne**
- 6) Prodělala jste někdy trombózu? **Ano** / **Ne**
- 7) Prodělal někdo v rodině trombózu? **Ano** / **Ne**
- 8) Pokud ano, kdo? (zakroužkuj skupinu) - rodiče, sourozenci, děti
 - teta, strýc, bratřenci a sestřenice ...
 - vzdálenější příbuzní
- 9) Bylo Vám někdy doporučeno doktorem laboratorní vyšetření na srážlivost krve? **Ano** / **Ne**
- 10) Podstoupila jste někdy toto vyšetření? **Ano** / **Ne**
- 11) Pokud **Ano** výsledek byl **negativní** nebo **pozitivní** ?
- 12) Rizikové faktory; zaškrtněte co je (✓) a co není (x) rizikovým faktorem pro vznik trombózy:
(prosím bez nápovědy internetu a jiných informačních zdrojů)

Operace

Sádrová fixace

Těhotenství

Polytraumata

Žaludeční vřed

Hormonální antikoncepce

Upoutání na lůžko

Otřes mozku

Děkuji za Váš čas.