

Lékařská fakulta
Univerzity Palackého v Olomouci

Obor: gynekologie a porodnictví

**Dynamika změn přímé generace trombinu během
fyziologické a patologické gravidity**

MUDr. Veronika Lattová

Školitel: Prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D.

Olomouc 2019

Děkuji svému školiteli Prof. MUDr. Martinu Procházkovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady a metodické vedení během postgraduálního studia.

Děkuji Prof. MUDr. Radovanovi Pilkovi, Ph.D. přednostovi Porodnicko- gynekologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za vytvoření vynikajících podmínek ke studiu.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně a že jsem v ní uvedl veškerou literaturu a ostatní zdroje, z nichž jsem čerpal při zpracování tématu.

MUDr. Veronika Lattová

V Olomouci 17. 8. 2019

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
1. Úvod.....	10
2. Hemostatický systém.....	11
2.1. Cévní stěna.....	11
2.2. Buněčná populace.....	13
2.3. Plazmatický koagulační systém	13
2.3.1. Vnější (extrinsic) systém.....	15
2.3.2. Vnitřní (intrinsic) systém.....	15
2.3.3. Třífázový model.....	17
3. Vyšetřovací metody hemostázy.....	19
3.1. Hodnocení funkce hemostázy podle principů stanovení.....	19
3.1.1. Koagulační metody.....	19
3.1.2. Zákalové metody.....	19
3.1.3. Spektrofotometrické metody.....	19
3.1.4. Imunochemické metody.....	20
3.1.5. Gelifikační testy.....	20
3.1.6. Průtoková cytometrie.....	20
3.1.7. PCR (polymerázová řetězová reakce).....	21
3.2. Rozdělení koagulačních testů.....	21
3.2.1. Globální hemostatické testy.....	21
3.2.2. Skupinové testy.....	22
3.2.3. Specifické testy.....	22
4. Trombin	24
4.1. Stavba trombinu.....	24
4.2. Přeměna protrombinu na trombin.....	25
4.3. Funkce trombinu	25
4.4. Měření generace trombinu.....	27
4.5. Historie TGT.....	28
4.6. Technické možnosti TGT.....	29
4.7. Možnosti použití TGT v praxi.....	30

5. Protein C.....	33
6. Protein S.....	34
7. Antitrombin.....	35
8. Faktor VIII.....	36
9. Hemostáza v graviditě.....	37
9.1. Koagulační faktory v graviditě.....	37
9.2. Inhibitory koagulace v graviditě.....	38
9.3. Fibrinolýza v graviditě.....	38
9.4. Koagulační testy v graviditě.....	39
9.5. Žilní trombóza v graviditě.....	40
10. Diabetes mellitus a hemostáza.....	42
11. Preeklampsie	44
11.1. Klasifikace preeklampsie dle nástupu onemocnění	44
11.1.1. Časná forma onemocnění.....	44
11.1.2. Pozdní forma onemocnění.....	45
11.2. Etiologie preeklampsie.....	45
11.2.1. Placentace.....	46
11.2.2. Dysfunkce endotelu a cirkulujících faktorů.....	47
11.2.3. Porucha imunologická adaptace.....	47
11.2.4. Genetické faktory.....	48
11.3. Preeklampsie- dvoustupňové onemocnění.....	49
11.3.1. První stadium.....	49
11.3.2. Druhé stadium.....	49
11.4. Hemostáza a preeklampsie.....	50
12. Hypertenze v graviditě	52
13. Vlastní výzkumný projekt.....	53
13.1. Cíle práce.....	53
13.2. Pracovní hypotéza	53
13.3. Charakteristika souborů.....	53
13.3.1. Dotazník.....	54
13.4. Statistické metody.....	55
13.5. Laboratorní vyšetření.....	56
13.6. Výsledky.....	57

14. Diskuse.....	69
15. Závěr.....	73
16. Seznam tabulek, obrázků a grafů.....	74
17. Souhrn.....	76
17. 1. Cíl práce.....	76
17.2. Typ studie.....	76
17.3. Klíčová slova.....	76
17.4. Metodika.....	76
17.4.1. Zařazení pacientek.....	77
17.4.2. Laboratorní vyšetření.....	77
17.5. Výsledky.....	77
17.6 Závěr.....	79
18. Summary.....	80
18.1. Aim of the tudy.....	80
18.2. Type of the study.....	80
18.3. Keywords.....	80
18.4. Matherial and methods.....	80
18.5. Results.....	81
18.6. Conclusion.....	82
19. Literatura.....	84
20. Přílohy.....	96
20.1. Publikace a přednášky k tématu vědecké práce.....	96
21. Anglický název práce, anglická klíčová slova	

Seznam použitých zkratk

ACR - poměr albumin kreatinin

APC - aktivovaný protein C

APTT - activated partial tromboplastine time- aktivovaný parciální tromboplastinový čas

AT - antitrombin

α 2M - α 2- antimakrobulin

DM - diabetes mellitus

EID - electro immuno diffusion- elektroimunodifuze

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EOPET - early onset preeclampsia- časná forma preeklampsie

ETP - endogenní potenciální trombinu

FII - faktor II

FVIII - faktor VIII

F IX - faktor IX

FX - faktor X

FXI - faktor XI

FXII - faktor XII

FXIII - faktor XIII

GDM - gestační diabetes mellitus

HbA1 - glykovaný hemoglobin

HLA - human leukocyte antigen

HMWK - High Molecular Weight kininogen - vysokomolekulární kininogen

LIA - Liquid Immuno Assay

LMWH - low molecular weight heparin - nízkomolekulární heparin

LOPET- late onset preeclampsia- pozdní forma preeklampsie

MHC - major histocompatibility complex

NO - oxid dusnatý

PAI - plasminogen activator inhibitor- inhibitor aktivátoru plazminogenu

PAR - protease activated receptor

PC - protein C

PCR - polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce

PE - plicní embolie

PGI - 2- prostacyklin

PPP - platelet poor plasma- plazma chudá na destičky

PRP - platelet rich plasma- plazma bohatá na destičky

PS - protein S

PT - protrombinový čas

TAFI - thrombin activatable fibrinolysis inhibitor- trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy

TF - tissue factor- tkáňový faktor

TFPI - tissue factor pathway inhibitor - inhibitor tkáňového faktoru

TGT- trombin generační test

TGTe - plocha pod křivkou

TGTm - maximální generace trombinu

TGTt - čas od nástupu generace trombinu, lag fáze

t-PA - tkáňový aktivátor plazminogenu

tPA - tkáňový aktivátor plazminogenu

TXA - tromboxan

VTE - venous thromboembolism - žilní tromboembolismus

vWF - von Willebrandův faktor

1. Úvod

Dobře fungující hemostáza je závislá na vzájemném fungování koagulačních faktorů a zároveň na činnosti inhibitorů koagulace a fibrinolytickém systému. Ve fyziologicky probíhající graviditě je rovnováha těchto systémů posunuta směrem k hyperkoagulaci, což je nejmarkantnější v době těsně před porodem a po porodu. Návrat k normálu nastává nejdříve za 4 týdny po porodu. Během těhotenství dochází k progresivnímu nárůstu hladiny faktorů V, VII, VIII, IX, X, XII, von Willebrandova faktoru a fibrinogenu. Faktor XI klesá během celého těhotenství. Během gravidity dochází k aktivaci koagulace a simultánně se zvyšuje fibrolýza bez orgánové dysfunkce. Nejčastěji užívané hodnocení funkce koagulačního systému je založeno na měření tradičních koagulačních časů jako je aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), protrombinový test (PT) nebo jejich alternativy, které sledují v laboratorních podmínkách dobu od zahájení koagulační reakce do vytvoření fibrinové sraženiny. Tyto testy jsou vhodné k orientačnímu zhodnocení případného rizika krvácení nebo k monitorování příslušné antikoagulační terapie. K hodnocení trombotického stavu je užít nelze. Zavedené laboratorní koagulační metody vždy postihují pouze část hemostatického systému a neodrážejí vztah plazmatických a buněčných složek. Stanovení trombinu se jeví jako metoda vhodná k posouzení globální funkce hemostázy a zachycení jejích změn během gravidity.

2. Hemostatický systém

Hemostáza je integrální součástí nespecifické obrany organismu, je úzce provázána se systémy iniciujícími a modulujícími pochody zánětu a imunologické obranné mechanismy. Základním úkolem je zajišťovat v cirkulaci stav tzv. fluidokoagulační rovnováhy. Jde o vysoce dynamický proces. Základními články hemostatického systému jsou enzymatické kaskády a jejich inhibitory, cévní stěna a celulózní součásti krve (1).

Funkcí hemostatického systému je zajištění integrity cévního řečiště a kontinuální cirkulace krve. Poškození cévní stěny spouští sérii procesů, jejichž cílem je omezení krevní ztráty a zároveň také obnovení fungování cévního řečiště. Hemostáza je systém, který funguje na základě interakcí mezi cévní stěnou, krevními destičkami, koagulační a zároveň fibrinolytickou kaskádou. Prvním krokem při poškození cévní stěny je vazokonstrikce, poté destičky adherují k obnaženým vláknům kolagenu, následuje agregace a formace primární destičkové zátky. Koagulační děje stabilizují primární zátku formací fibrinu. Po obnovení endotelu dochází k lýze fibrinového trombu a tím obnovení normálního krevního toku (2).

Hemostáza 4 fáze:

- 1) Reflexní vazokonstrikce
- 2) Adheze, aktivace a agregace destiček
- 3) Hemokoagulace
- 4) Trombolýza a reparace poškození

2.1. Cévní stěna

Má schopnost vazokonstrikce. Je místem interakce jednotlivých složek systému hemostázy. Je zdrojem a zásobárnou některých faktorů, inhibitorů a dalších látek důležitých pro zástavu krvácení. Nejdůležitější složkou z hlediska zástavy krvácení je endotel a subendotelové struktury. Intaktní endoteliální buňka brání adhezi trombocytů a jejich aktivaci kontroluje různými mechanismy:

- Vytváří bariéru mezi krví a tkáněmi.

- Syntetizuje prostacyklin (PGI- 2), který stabilizuje destičky.
- Trvale uvolňuje NO- oxid dusný, který tlumí aktivaci krevních destiček pomocí cyklického guanosinmonofosfátu.
- Produkuje endonukleázy.
- Vytváří negativní elektrostatický náboj, který nedovolí negativně nabitým trombocytům přilnout k endotelu (3).

Endotel ovlivňuje hemostatické procesy

- Cestou aktivace proteinu C.
- Tvorbou heparansulfátů, proteoglykanů- potencují účinek antitrombinu.
- Uvolněním TFPI (tissue factor pathway inhibitor- inhibitor tkáňového faktoru) z endotelových buněk (3).

Proces vazokonstrikce při poranění cévy a následná adheze trombocytů v místě porušeného endotelu se nazývá primární hemostáza a probíhá v řádech sekund. V dalším průběhu se v řádech minut generuje trombin a vzniká fibrinové koagulum, které představuje definitivní hemostatickou zátku, která je pak degradována fibrinolytickým systémem (4).

Tab. Endotelové faktory modulující hemostázu upraveno dle Penka M., Krvácení. (1)

protrombotické působení	antitrombotické působení
tkáňový faktor (TF)	TFPI (tissue factor pathway inhibitor)
von Willebrandův faktor (vWF)	vW protéza (metabolizuje vWF)
PAI-1	t-PA
tromboxan TXA2	prostacyklin PGI-2
platelet activating factor (PAF)	NO
trombinový receptor - PAR (protease activated receptor)	trombomodulin
heparinázy	glykosaminoglykany (heparansulfát)
selektiny, cytoadhezivní molekuly	down regulation těchto molekul
cytokiny	antagonisté, down- regulace receptorů

2.2. Buněčné populace

Z hemostazeologického hlediska jde hlavně o trombocyty. Za patologických stavů, zvláště hyperkoagulačních, nabývají na významu i granulocyty, monocyty, makrofágy, lymfocyty i erytrocyty.

Základní funkce destiček:

- Adheze k defektům cévní stěny.
- Agregace s uvolňovací reakcí, kdy sekretorové mediátory pozitivní zpětnou vazbou dále podporují lokální hemostázu.
- Interakce s faktory a inhibitory koagulační kaskády v komplexech s fosfolipidy a Ca^{2+} .
- Retrakce koagula.
- Významná účast v imunitních pochodech (zánět, rozvoj aterosklerózy).
- Ne zcela jasným mechanismem udržují integritu endotelu (1).

2.3. Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku nerozpustného fibrinu. Krevní srážení je dáno především interakcí mezi systémem krevních destiček, systémem plazmatických koagulačních faktorů, systémem inhibitorů krevního srážení, fibrinolýzou a cévní stěnou. Většina koagulačních faktorů jsou proteiny produkované játry. Některé potřebují k syntéze vitamín K. Většina koagulačních faktorů se nachází v plazmě ve velmi nízkých koncentracích (mimo fibrinogen a protrombin). Poměrně velká skupina faktorů (faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein) patří do skupiny serinových proteáz. Jejich aktivní místo obsahuje serin. Svou činností (tzv. parciální proteolýza) dokáží štěpit a zároveň aktivovat další koagulační faktory. Za jeden z hlavních cílů koagulační kaskády můžeme považovat přeměnu rozpustného plazmatického proteinu fibrinogenu na nerozpustný fibrin (katalyzuje trombin), který následně vytváří vysoce odolnou fibrinovou síť (3).

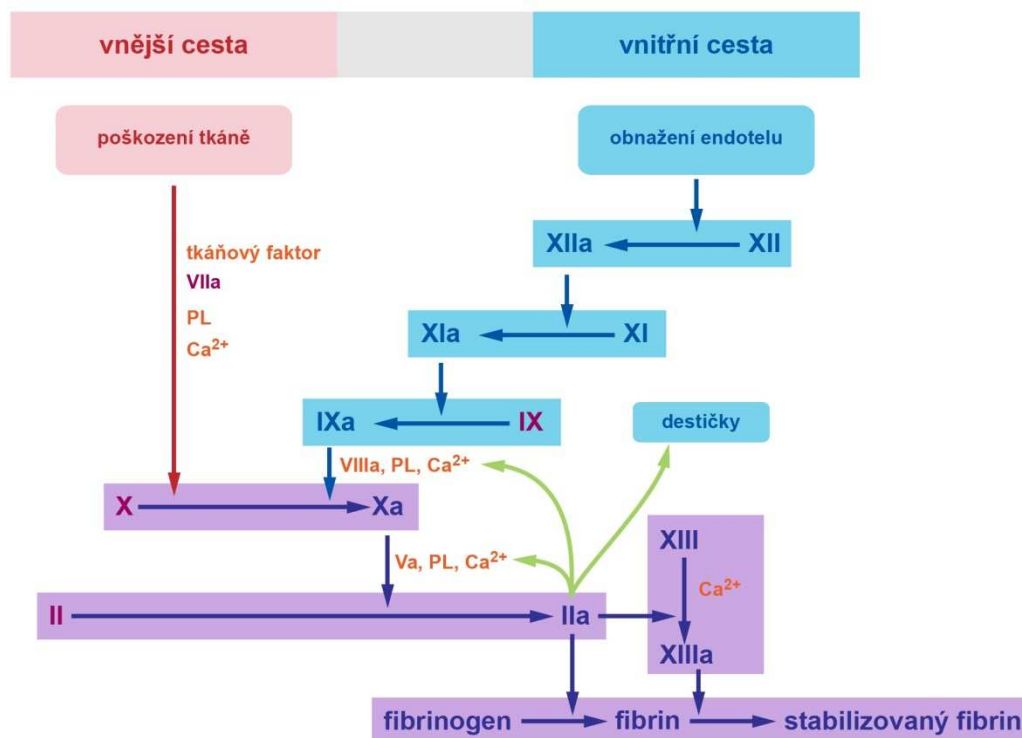
Koagulační systém lze historicky a schematicky rozdělit na zevní a vnitřní. Oba systémy se mohou vzájemně aktivovat, nedají se však od sebe oddělovat (obr.1).

Schématicky můžeme v procesu hemokoagulace definovat dvě fáze:

1) Aktivace faktoru II (protrombinu) na trombin – může probíhat vnitřní či zevní cestou, obě cesty se spojují v místě faktoru X.

K vnější cestě aktivace protrombinu dochází při poruše celistvosti cév při kontaktu s tkáňovým faktorem. Při aktivaci vnitřní cesty většinou není porušena celistvost cév, aktivace nastává při kontaktu se subendotelovými strukturami.

2) Společná část – tvorba nerozpustného fibrinu z fibrinogenu a stabilizace fibrinové sítě.



Obrázek 1: Schéma zevního a vnitřního koagulačního systému, převzato z:

<http://fbt.cz/wp-content/uploads/2013/12/Kapitola-05-04-031.jpg>

2.3.1. Vnější (extrinsic) systém

K aktivaci vnějšího (extrinsic) systému dochází v okamžiku expozice tkáňovému faktoru (TF), který je uvolněn do krve při poranění tkáně, a/nebo je exprimován aktivovanými leukocyty a endoteliemi (fibrocyty, myocyty aj.). Dochází k vazbě FVIIa volně cirkulujícího v plazmě na TF. Vytvořený komplex aktivuje FXa, který společně s FVa vstupuje do komplexu protrombinázy a konvertuje přeměnu protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje tvorbu fibrinu z fibrinogenu. Fibrinové monomery polymerují za pomoci FXIIIa, který stabilizuje fibrinovou sraženinu provázáním α a γ řetězců fibrinu za vzniku nerozpustného homopolymeru fibrinu (3).

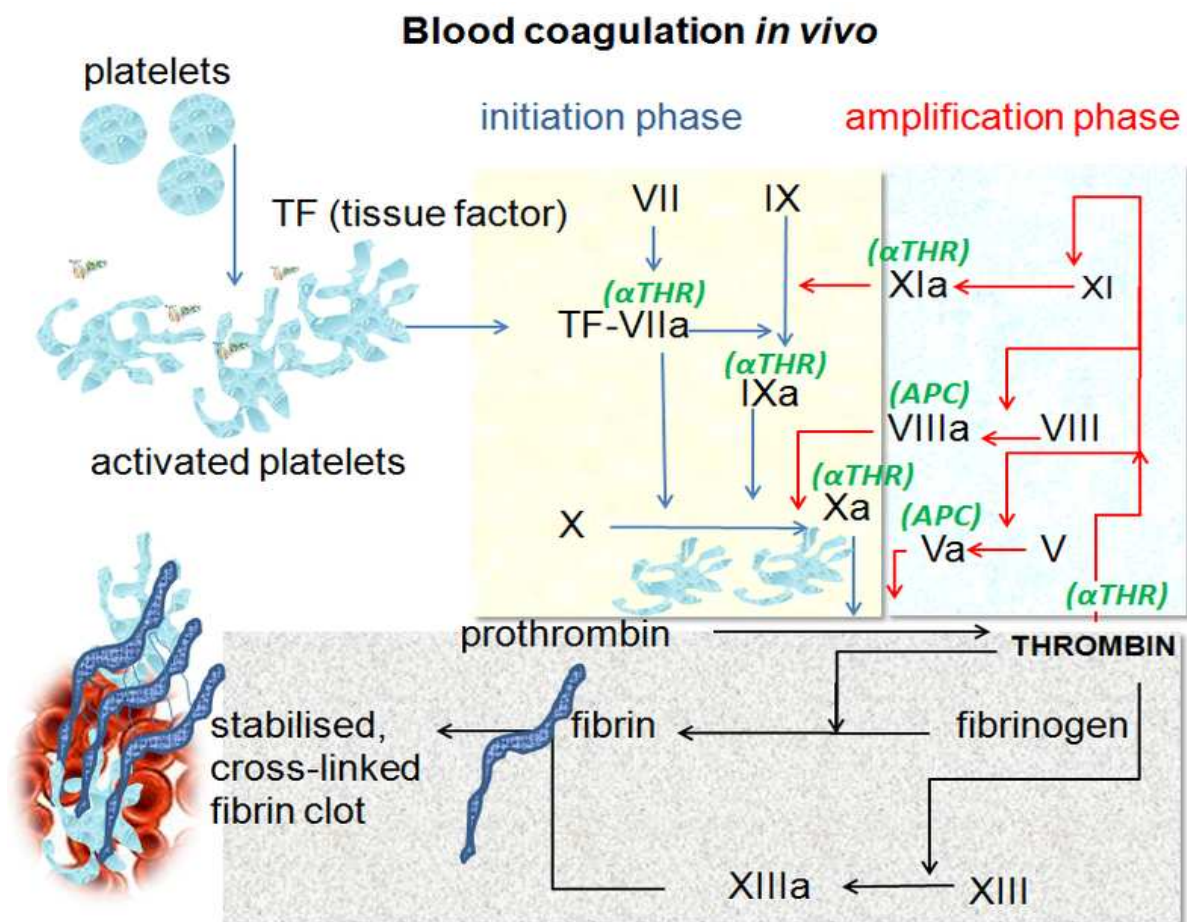
Mechanismu aktivace VIIa není zcela jasná, předpokládá se, že v krvi cirkuluje určité stopové množství FVIIa, které po navázání TF jednak aktivuje FX a dále může autokatalyzovat další přeměnu FVII na FVIIa (1).

2.3.2. Vnitřní (intrinsic) systém

K aktivaci vnitřního systému dochází pomocí negativně nabitých povrchů (5). Takto se aktivuje faktor XII na formu XIIa in vivo například kontaktem s kolagenem, buněčnými fragmenty, bakteriálními endotoxiny. In vitro to může být například: sklo, kaolín, azbest. FXIIa dále aktivuje faktory XI a IX, přičemž během této kaskádové reakce dochází k amplifikaci (zesílení) vyvolávajícího efektu a k aktivaci faktorů V a VIII. F IXa a VIIIa tvoří tenázu, která generuje dostatečné množství FXa a ten společně s faktorem Va v komplexu protrombinázy konvertuje protrombin na trombin. Vzniklý trombin aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Fibrinové monomery polymerují a vzniklý polymer se stabilizuje FXIIIa, která je aktivován trombinem a vzniká tak nerozpustný fibrin (3).

Zevní a vnitřní tenázový komplex tedy aktivuje faktor X na FXa, dochází tak k vytvoření komplexu protrombinázy- jde o komplex FXa+FVa navázaný na fosfolipidy. Protrombináza aktivuje protrombin odštěpením fragmentů F1+2 a přeměňuje jej na aktivní trombin (1).

Ukončení generace trombinu je způsobeno antitrombinem (AT), který se váže na trombin nebo kovalentní vazbou vytvoří komplex s FXa. Navázáním trombinu na trombomodulin je regulována koagulace pomocí přeměny proteinu C do jeho aktivní formy (APC). Následně APC inaktivuje FV a FVIII společně se svým kofaktorem proteinem S. Po obnovení poškozené tkáně dochází k degradaci krevní sraženiny. Plasminogen a tkáňový aktivátor plasminogenu tPA se váží na fibrinová vlákna a následuje formace plazminu. Plazmin lyzuje trombus. Nadbytečná tvorba plazminu je řízena množstvím jeho inhibitorů: α 1- antitrypsine, α 2- antiplazmin, C1 -inhibitor, AT, α 2- antimakrobulin (α 2M). Kontinuální degradací fibrinu vznikají nové produkty lýzy fibrinu, jejichž tvorba vede k další formaci plazminu. Tato stimulace je pak inhibována aktivací trombin aktivovaného inhibitoru fibrinolýzy (TAFI) (2). Správná funkce hemostatického systému vyžaduje udržení rovnováhy mezi jeho prokoagulačními a antikoagulačními složkami. Jejich vychýlení jedním nebo druhým směrem vede k hypokoagulačnímu nebo naopak hyperkoagulačnímu stavu, které se klinicky projevuje krvácením nebo naopak trombotickými komplikacemi.



Obrázek 2. Schéma koagulace in vivo. Převzato z:

http://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation#mediaviewer/File:Coagulation_in_vivo.png

2.3.3 Třífázový model hemostázy

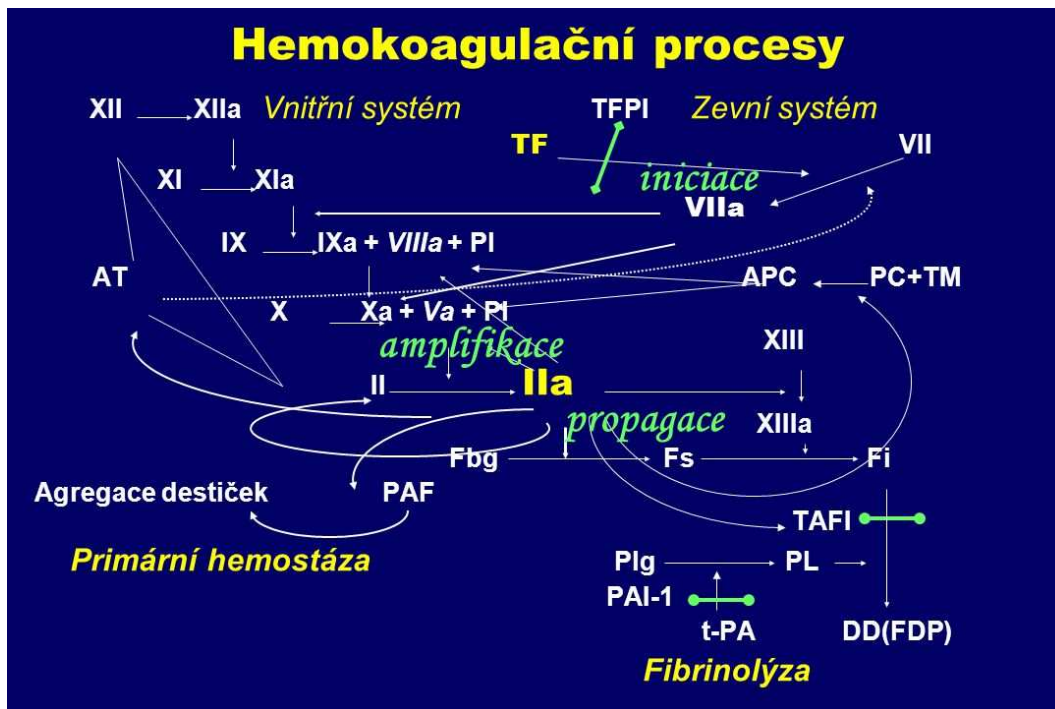
Klasická kaskádová teorie se ukázala jako méně vyhovující v souvislosti s přibýváním znalostí o hemostáze. Zjistilo se, že vcelku přesně odráží procesy in vitro, procesy in vivo jsou však dynamičtější. V současnosti je přijímán třífázový model hemostázy. Podle této teorie můžeme rozlišit tři dynamické fáze- iniciace, amplifikace, propagace.

1. Fáze iniciace - je zahájena expresí TF v místě poranění, zánětem, neoplázií apod. Molekuly faktor VIIa se naváží na TF a tento komplex (TF/ FVIIa) potom aktivuje faktor IX na faktor IXa, faktor X na faktor Xa. Faktor Xa aktivuje další molekuly faktoru VII a působením na protrombin generuje vznik malého množství trombinu, které slouží ke zpětnovazebnému prudkému zvýšení a tvorbě většího množství trombinu ve fázi amplifikace.

2. Fáze amplifikace- trombin aktivuje FXI na FXIa, FVIII na FVIIIa a FV na FVa. FXa aktivuje další molekuly FIX na FIXa. Trombin dále aktivuje trombocyty a leukocyty, čímž jsou na povrchu jejich membrány exprimovány negativně nabitě molekuly fosfolipidů, na které se navážou aktivované faktory IXa, VIIIa a Va. Trombin navíc aktivuje i endotelie v nejbližším okolí poranění a způsobí tak přeladění do „prokoagulační fáze“. Konečným výsledkem amplifikační fáze je vznik většího množství trombinu a vytvoření reakčních povrchů s navázanými molekulami aktivovaných faktorů pro kompletaci vícemolekulových komplexů vnitřní tenázy a protrombinázy (1) (3).

3. Fáze propagace- dochází k vazbě FX na komplex FIXa a FVIIIa (vnitřní tenáza). Aktivovaný faktor Xa pak vytvoří s FVa komplex protrombinázy, který po navázání molekuly protrombinu z ní odštěpí aktivační fragment F1+2 a způsobí tak její aktivaci na trombin. Množství trombinu, vytvořeného ve fázi propagace, již dostačuje k přeměně fibrinogenu na fibrin. Nestabilní solubilní fibrin je stabilizován působením FXIIa (1) (3).

Negativně nabité fosfolipidy, které jsou aktivovány trombocyty, hrají důležitou roli v koagulaci. Na jejich povrchu dochází ke kompletaci klíčových komplexů- vnitřní a zevní tenázy, protrombinázy a komplexu protein C/protein S. Na tyto komplexy se pak jako na receptory navazují další substráty – FX, protrombin, FVIIIa a FVa. Negativně nabité fosfolipidy tak jednak urychlují reakce mezi serinovými protézami a jejich substráty, dále pak lokalizují hemostatickou reakci do míst, kde je jí třeba (1) (3).



Obrázek 3. Hemokoagulační procesy Převzato z <https://slideplayer.cz/slide/2667728/> (Penka)

3. Vyšetřovací metody hemostázy

3.1. Hodnocení funkce hemostázy podle principů stanovení

3.1.1. Koagulační metody

Složky koagulačního systému jsou přítomny v plazmě většinou v neaktivní formě jako proenzymy- zymogeny. Pro zahájení procesu srážení je nutné in vitro proenzymy aktivovat aktivátory. Aktivátory se dělí do tří skupin: nefyziologické (kaolin), fyziologické (tkáňové extrakty nebo čištěné a rekombinantní aktivované fyziologické faktory) a specifické (zmijí jedy). Enzymatické cesty (zejména oblast serinových proteáz) vyžadují nejen aktivované faktory, ale i aktivované kofaktory, fosfolipidy a vápníkové ionty. Jedná se o komplexní, většinou velmi nestabilní směsi, jejichž systémy se dají jen velmi obtížně standardizovat. Techniky koagulačních vyšetření spočívají v měření času reakce od jejího spuštění až po vytvoření koagula nebo fibrinového vlákna. Naměřené časy se porovnávají s časy normální kontrolní plazmy v komerčním provedení. Detekce je vizuální, optická, elektrická, magnetická (3).

3. 1. 2. Zákalové (nefelometrické, turbidimetrické) metody

Jsou fotooptické metody. Vyšetřují zakalení vzorku při tvorbě koagula nebo destičkového agregát při reakci antigen- protilátky.

- Nefelometrie: zjišťuje množství záření rozptýleného na koloidních částicích ve směru kolmém na dopadající paprsek.
- Turbidimetrie: zjišťuje změnu optické hustoty po průchodu systémem.

Detekuje se optická hustota rozptýleného světla procházejícího měřicí kvyetou a dopadající na detektor (3).

3. 1. 3. Spektrofotometrické metody

Stanovují intenzitu zabarvení (absorbance), ke kterému dochází v důsledku štěpení chromogenního substrátu. Detekce: spektrofotometrické stanovení (6).

3. 1. 4. Imunochemické metody

Monitorují reakci antigen protilátky, která je různými způsoby zviditelněna (6).

- a) **ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)**- ke stanovení antigenu se používá protilátka značená enzymem. Detekce enzymatické aktivity se provádí přidáním chromogenního substrátu, který je štěpen za vzniku barevného štěpného produktu, sleduje se intenzita zbarvení. Detekce spektrofotometrickým stanovením barevného produktu.
- b) **EID (elektroimunodifuze)**- vyšetřovaný antigen reaguje s protilátkou v přítomnosti gelu. Vzniká precipitační peak, jehož délka je přímo úměrně koncentraci antigenu. Detekce probíhá elektroforézou.
- c) **LIA (Liquid Immuno Assay)** - protilátka je navázaná na latexové částice, po přidání antigenu dochází k zeslabení průchodu světla (snížení absorbance).
- d) **RIA (radioimunolanalýza)**- používá protilátku se značeným radionuklidem. Detekce čítačem záření gama.
- e) **Aglutinační metody**- jsou semikvantitativní statimovené metody umožňující pozorování aglutinace viditelných částic (červené krvinky, latex) s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu. Vizually se odečítají (6).

3.1.5. Gelifikační testy

Snadno polymerizující složky (např. monomer fibrinu) v přítomnosti některých látek výrazně polymerují, případně tvoří komplexy. V plazmě se pak detekují vločky, vlákna nebo viditelný gel (6).

3.1.6. Průtoková cytometrie

Je využívána ke stanovení receptorů, nebo ostatních antigenů na povrchu buněk. Tato metoda umožňuje rozlišit aktivované a neaktivované buňky a využívá se hlavně

v hematonekologii. Detekce se provádí speciálním stanovením pomocí průtokového cytometru, využívající značených monoklonálních protilátek (6).

3.1.7. PCR (polymerázová řetězová reakce)

Je využívána k identifikaci mutací některých složek hemostatického systému jako jsou FV Leiden, protrombin 20210 a další (3).

3.2. Rozdělení koagulačních testů

Globální testy - popisují celý srážecí systém.

Skupinové testy - zachycují určitou část koagulace.

Specifické testy - stanovují jednotlivé složky systému koagulačních faktorů, primární hemostázy, přirozených inhibitorů a fibrinolýzy (6).

3.2.1. Globální hemostatické testy

Orientační testy popisující celý srážecí systém (6). K vyhodnocení funkce hemostatického systému byla navržena řada testů, z nichž se mnohé v klinické praxi neprosadily např. doba srážlivosti nativní krve, doba krvácivosti v různých modifikacích. Tyto metody jsou zatíženy velkou chybou a jsou obtížně standardizovatelné (3).

Tromboelastografie je metoda nepřímého sledování tvorby trombinu, při které je analyzována plná krev. Tromboelastograf zachycuje kvantitativní údaje, které charakterizují tvorbu krevní sraženiny, její pevnost, stabilitu, schopnost retrakce (velmi dobře popisují některé defekty jako např. hypo- nebo hyperkoagulace, trombocytopenie) (3). Tento test je vhodný hlavně pro urgentní medicínu a případně ke sledování efektu substituční léčby.

Vyšetření celkového hemostatického potenciálu - overall hemostatic potential assay je test monitorující formace fibrinu pomocí měření opacity reakčního produktu.

Test je založen na spektrofotometrické registraci agregace fibrinu v plazmě chudé na proteiny (PPP) která obsahuje malé množství exogenního trombinu, aktivátoru plazminogenu a kalcia (7).

Trombin generační test (TGT) měří individuální kapacitu pro generaci trombinu v plné krvi nebo v plasmě. Může být proto ve srovnání s konvenčními testy potenciálně užitečnější tím, že odráží hemoragický nebo trombotický klinický fenotyp (snížená nebo zvýšená generace trombinu) (8).

3.2.2. Skupinové testy

Popisují určitou část koagulačního děje. Tyto testy se používají k hodnocení rizika krvácení nebo při sledování účinku antikoagulační léčby. Nejsou vhodné k posuzování trombotického stavu.

Tromboplastinový test, Quickův test, protrombinový test (PT) - základní koagulační test zevního koagulačního systému- cesta aktivace protrombinu na trombin pomocí faktorů II, V, VII, X a fibrinogenu. Měří se čas do vytvoření fibrinového vlákna (6).

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT) - základní koagulační test vnitřního koagulačního systému přeměny protrombinu na trombin VIII, IX, XI, XII, prekalkrein a HMWK (vysokomolekulární kininogen).

Trombinový čas (TT) - hodnotí štěpení fibrinogenu trombinem bez účasti dalších koagulačních faktorů (6).

3.2.3. Specifické testy

Do této skupiny laboratorních vyšetření patří testy sloužící ke kvantitativnímu, příp. kvalitativnímu stanovení jednotlivých složek koagulačních faktorů, primární hemostázy, přirozených inhibitorů a složek fibrinolytického systému. Vyšetřuje se jimi i přítomnost nespecifických (antifosfolipidové protilátky) nebo specifických inhibitorů krevního srážení. Patří sem i molekulárně genetické testy, které se používají k

vyšetření vrozených trombofilních dispozic, jako jsou mutace faktoru V Leiden nebo protrombinová mutace (6).

4. Trombin

V roce 1872 popsal Alexander Schmidt trombin jako enzym konvertující fibrinogen ve fibrin a pojmenoval jej „fibrinferment“ (9). Trombin je aktivovaná forma protrombinu, neboli faktoru II (FII) (10). Gen trombinu je lokalizován na 11chromozómu (11p11-q12) (11). Protrombin je složený z 532 aminokyselin. Vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K. Molekulová hmotnost protrombinu je 72 kDa (trombin 37 kDa), biologický poločas je 48 hodin. Koncentrace v plazmě: 100-200 mg/l, 1,4 umol/l. Trombin (FII) je aktivován Na^+ ionty. Jedná se o enzym ze skupiny serinových proteáz, což jsou hydrolytické enzymy, které katalyzují štěpení peptidické vazby, tedy vazby C-N (3). Patří dále do rodiny chymotripsinů, což je velká skupina enzymů vyskytující se v organismu na více místech a účastní se např. trávení, buněčné imunity, oplodnění a embryonálního vývoje. Do zahájení procesu koagulace je FII v neaktivní formě, ze které je štěpen enzymem vzniklým po zahájení koagulační kaskády tzv. protrombinázovým komplexem.

4.1. Stavba trombinu

V aktivní formě se skládá ze dvou polypeptidových řetězců: lehkého A řetězce tvořených z 36 aminokyselinových zbytků a těžkého B řetězce, který je delší a má 259 aminokyselinových zbytků. Tyto řetězce jsou spojeny kovalentní vazbou disulfidickými můstky. Aktivovaný trombin štěpí každý polypeptidový řetězec s pořadím aminokyselin Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser mezi zbytky aminokyselin arginin a glycin. Tato vlastnost štěpení fibrinogenu a aktivaci faktoru VIII mu umožňuje aktivovat koagulační faktory V, VII, XI a XIII; fibrinolytický inhibitor (TAFI) a proteázou aktivované receptory PAR1 a PAR4. Efektivnost těchto reakcí zvýší vazba sodíkového iontu (Na^+) na specifické, Na-vazebné místo v trombinu. Celkově trombin štěpí dvanáct různých substrátů za asistence pěti kofaktor (12)(13). Jsou známé i násobné formy trombinu – alfa, beta a gama trombin. Beta a gama formy však mají mnohem nižší biologickou aktivitu při přeměně fibrinogenu. Funkční místo alfa-trombinu, oblast průběhu chemické reakce (tzv. katalytické místo) se skládá z trojice aminokyselinových zbytků a to histidinu 365, kyseliny asparágové 419 a serinu

527, které jsou ve vzájemné blízkosti (12). Jednou z nejzajímavějších věcí na trombinu je jeho interakce s Na⁺ ionty. Toto spojení je nezbytné pro efektivní štěpení fibrinogenu a aktivaci faktorů V, VIII a XI, které hrají centrální roli v generaci trombinu a v koagulační kaskádě. Sodíkové ionty nejsou nezbytné pro aktivaci proteinu C, což ukazuje, že Na⁺ podporují pouze prokoagulační vlastnosti trombinu. Spojení s Na⁺ přeměňuje trombin na vysoce aktivní formu. Byly popsány případy hluboké žilní trombózy v asociaci s hypernatrémii u pacientů s diabetem (14). Starší studie vedly k závěru, že A-řetězec není nutný pro funkci trombinu, avšak cílené mutace v genu pro A-řetězec navodily těžké krvácení. Tyto funkční defekty protrombinu byly připsány poruchám přestavby a zpracování faktorem Xa. Úplné odstranění A-řetězce zrušením jeho disulfidických vazeb s B-řetězcem vede k denaturaci B-řetězce a tím i ke ztrátě jeho aktivity. Z toho vyplývá, že A-řetězec se svými specifickými disulfidickými můstky je nevyhnutný pro konformační stabilitu trombinu (13).

4.2. Přeměna protrombinu na trombin

Faktor Xa štěpí protrombin v místě Arg³²⁰ za vzniku meizotrombinu. Faktor Xa dále štěpí meizotrombin v místě Arg²⁷¹ a dochází k uvolnění fragmentu F1 a F2, současně α-trombin štěpí meizotrombin:

- v místě Arg¹⁵⁵: oddělí se fragment 1 a fragment 2
- v místě Arg²⁸⁴: se štěpí malý fragment s N koncem (272- 284).

Trombin vznikající touto cestou se nazývá α-trombin. Dalším štěpením B řetězce trombinu autoproteolýzou nebo trypsinem vznikají β trombin (řetězec B se štěpí v místě Arg 71 nebo 73 na B1 a B2 řetězec) a γ trombin (B2 řetězec se dále štěpí v místě Arg 154 na B5 a B4 řetězce) (3).

4.3. Funkce trombinu

Trombin působí jak koagulačně, tak i inhibičně.

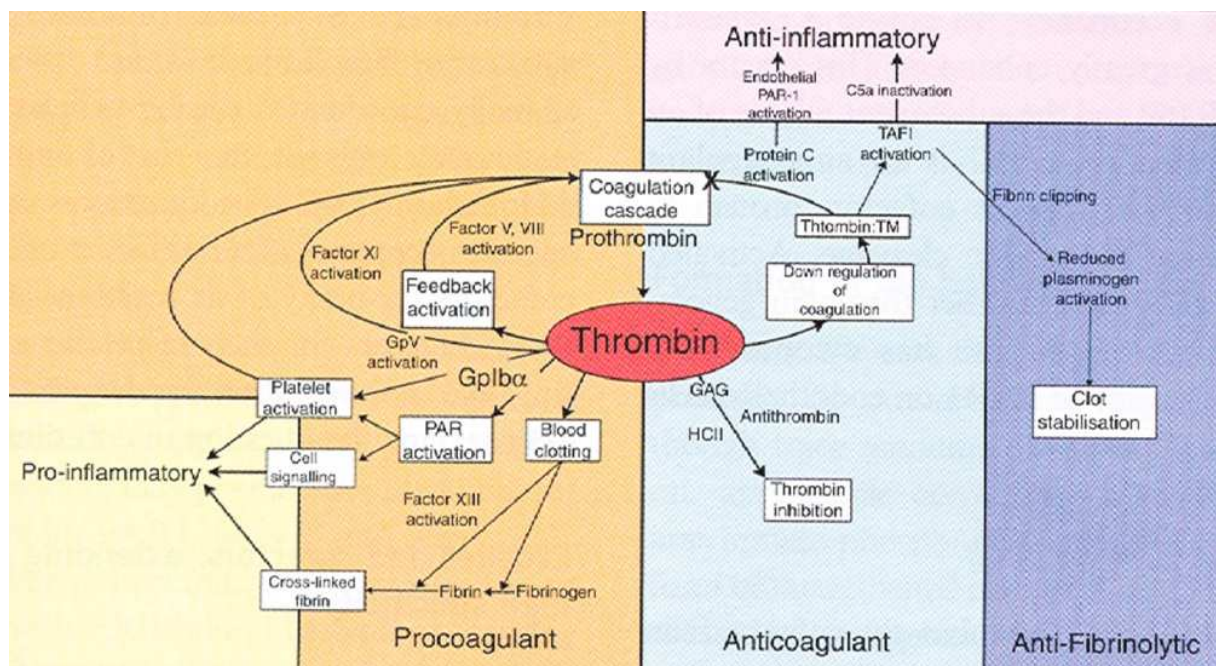
Nejdůležitější aktivity trombinu:

- štěpí fibrinogen na fibrin
- limitovanou proteolýzou aktivuje faktory V a VIII

- aktivuje faktory IX a XIII
- je významným aktivátorem krevních destiček
- na endotelu posiluje tvorbu a sekreci tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA)
- po navázání na trombomodulin aktivuje protein C a TAFI (thrombin activable fibrinolytic inhibitor), který je nezbytný k normální rezistenci fibrinové zátky.

Trombin se dále uplatňuje i v procesech zánětu a hojení (3).

Je také důležitý při embryonální vaskulárním vývoji, angiogenezi, revaskularizaci, neurodegeneraci a neuroprotekcí (obr.4) (15).



Obr. 4: Centrální role trombinu v hemostáze (převzato z J Thromb Haemost, Crawley J., The central role of thrombin in hemostasis) Prokoagulační, antikoagulační, prozánětlivé, protizánětlivé a anti-fibrinolytické působení trombinu. (PAR – proteázou aktivovaný receptor, TM – trombomodulin, GAG - glykosaminoglykany, TAFI – trombinem aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy, Gp – destičkový povrchový glykoproteinový receptor, HCI – heparin kofaktor II, C5a – složka komplementu)

4.4. Měření generace trombinu

Filozofie 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. Historicky se k posuzování koagulace používají širce rozšířené testy jak PT, nebo APTT, jejichž interpretace má celou řadu úskalí: nejsou fyziologické, posuzují jen část koagulační kaskády, mají jen velmi slabou korelaci s klinikou, např. PT nebo APTT je prodlouženo, což neznamená, že lze předpovědět riziko krvácení. Na jejich základě nelze vyselektovat protrombotický stav (16). K vyšetření funkce trombinu jsou k dispozici testy jako TAT (trombin antitrombin komplex), protrombinové fragmenty 1+2 (F1+2), fibrinopeptid A. Tyto metody udávají množství vzniklého trombinu v daný okamžik, nevypovídají však o celkovém hemostatickém potenciálu materiálu (17).

Při použití tromboelastografu probíhá měření pomocí mechanického detekčního systému. Měří se změna elasticity během formace krevní sraženiny, výsledkem je křivka, na které hodnotíme startovací čas, kinetiku formace trombu a maximální amplitudu (6). Další možností je měření turbidity během tvorby krevní sraženiny- výsledkem je křivka trombogramu (18). Tato metoda však ukazuje tvorbu trombinu nepřímou, a její využití je tím limitováno.

Trombin generační test může být proveden dvěma způsoby. První používá manuální testování v daných časových intervalech během srážení krve nebo plazmy, jehož výsledkem je koncentrace trombinu (19).

Druhou možností jsou kontinuální metody, kdy je celkové množství trombinu měřeno změnami v optické denzitě při přeměně chromogenního nebo fluorogenního substrátu během tvorby trombinu ve sledovaném vzorku (20).

4.5. Historie trombin generačního testu – TGT

V roce 1953 publikovali R. Macfarlane a R. Biggs test, kdy použili plnou krev ve skleněných zkumavkách. Z těchto zkumavek vzorky odebírali v minutových intervalech, aktivitu trombinu testovali přidáním fibrinogenu. Trombin se vytvořil během 4-5 minut velmi náhle, poté došlo k výraznému nárůstu koncentrace trombinu. Na základě svých pozorování usuzovali, že dochází ke zpoždění a teprve poté je vytvořen tromboplastin. Z těchto výsledků bylo později dedukováno, že fáze zpoždění je jakýsi ochranný mechanismus k prevenci intravaskulární koagulace (21). Tato metoda byla poté zjednodušena až o mnoho let později Hemkerem, který přišel s testem užívajícím chromogenní substrát. Endogenní trombogenní potenciál (ETP) je termín použitý Hemkerem (22). Tímto testem, bylo vyšetřováno celkové množství trombinu za použití chromogenního substrátu. Běžně je trombin inaktivován antitrombinem a α_2 -makroglobulinem a zatímco trombin po navázání na antitrombin je nereaktivní, trombin ve vazbě na α_2 -makroglobulin si zachovává aktivitu po vazbě na chromogenní substrát. Principem dnes používaných automatizovaných měření je in vitro monitorace vzniku trombinu v plasmě po aktivaci koagulační kaskády tkáňovým faktorem (TF). Reakce probíhá za účasti negativně nabitých fosfolipidů a Ca^{2+} . TF a koncentrace fosfolipidů je používán v různých koncentracích v závislosti na typu používané plasmy a charakteru vyšetření (by-passová léčba u hemofiliků, trombofilní stav, antikoagulační léčba). 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 (8). Výsledkem měření je křivka odrážející aktuální kapacitu systému pro generaci trombinu, která je charakterizována třemi hlavními parametry: dobou do nástupu generace trombinu (**lag time, TGTt**), maximální koncentrací trombinu (**Peak, Cmax, TGTm**) a plochou pod křivkou odrážející celkové množství vzniklého trombinu (**endogenní trombogenní potenciál, ETP, TGT_e**) a inaktivační fází. K vyšetření lze použít plasmu chudou na destičky (PPP) nebo plasmu na destičky bohatou (PRP). Z technického hlediska během vývoje vznikla řada variant testu, používajících různé

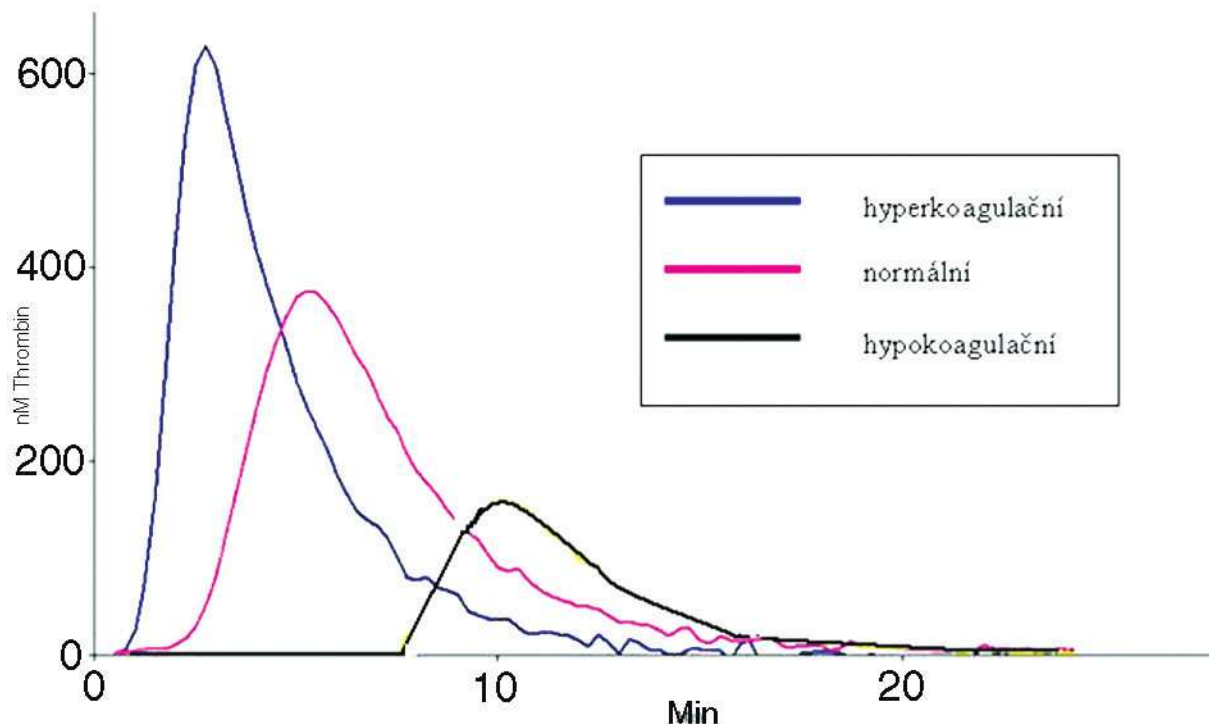
koncentrace tkáňového faktoru a fosfolipidů, přidání inhibitoru kontaktní fáze nebo trombomodulinu (23) (24) (25) (26) (22) (27) (obr. 5).

4.6. Technické možnosti stanovení TGT

V současné době jsou komerčně dostupné dva druhy TGT, které používají fluorogenní substrát. První metodou je kalibrovaný automatizovaný trombin generační test (CAT) (Thrombinoscope B.V., Maastricht, The Netherlands), vyvíjený v kolektivu prof. Hemkera od poloviny osmdesátých let. (22)(27)(28)(29)(30). Druhou možností je Technothrombin[®] TGA assay (Technoclone, Vienna, Austria) (31) (32). Dosavadní zkušenosti prokázaly dostatečnou intralaboratorní reprodukcibilitu s intra- i inter-assay koeficientem variace pod 10% v PPP i PRP (33).

Z hlediska metodiky testu bylo popsáno několik jeho variant využívajících:

1. Rozdílné koncentrace TF jako koagulačního iniciátoru testu (24) (25).
2. Rozdílné koncentrace prokoagulačně působících fosfolipidů (26) (16).
3. Přidání inhibitoru kontaktní fáze při měření u stavů s nízkou generací trombinu (hemofilie) (23) (25).
4. Přidání trombomodulinu nebo aktivovaného proteinu C, který zvyšuje senzitivitu testu při deficitu proteinů C, proteinu S nebo APC-rezistenci. (34) (35).



Obrázek 5- Základní generační křivky trombinu (převzato z <http://www.stago.fr>)

4.7. Možnosti použití TGT v praxi

TGT dává ojedinělou možnost zkoumat mechanismy koagulace, které nebyly dosud zcela objasněny.

Cirhóza

Chronické onemocnění jater, které je spojeno s poklesem všech prokoagulačních faktorů (kromě F VIII a von Willebrandova faktoru, které se zvyšují) (36). Tyto změny vedou k prodloužení PT a APTT nad fyziologickou hranici. PT a APTT byly po dlouhé roky používány k posouzení rizika krvácení. PT bylo používáno k určení hranice pro podání čerstvé mražené plazmy a také při posuzování nutnosti substituce koagulačními faktory při řešení krvácení, nebo k preventivnímu podávání před operačními výkony. Díky použití TGT bylo zjištěno, že u pacientů s cirhózou dochází

k současnému poklesu jak prokoagulačních faktorů, tak i antikoagulačně působícího proteinu C a antitrombinu. Díky tomu rovnováha zůstává zachována. Množství generovaného trombinu, při použití TGT s inkorporovaným trombomodulinem (je aktivován protein C) je normální (37). Na základě těchto zjištění nelze PT používat jako spolehlivý test při posuzování rizika krvácení u pacientů s cirhózou a nelze tedy na základě hladiny PT určovat nutnost podání plazmy a koagulačních faktorů. Při použití TGT je samozřejmě sníženo riziko komplikací spojených s nadbytečným podáním plazmy a rekombinačního F VIIa (37). Tyto výsledky umožňují změnu přístupu k pacientům s cirhózou a trombózou portálních žil, u kterých byla donedávna léčba LMWH kontraindikována (38).

Hemofilie

Pacienti s deficitem F VIII musí být substituováni koncentrátem FVIII. Adekvátní množství FVIII je stanovováno na základě rizika krvácení dle charakteru plánovaného operačního výkonu.

U pacientů s hemofilií byla prokázána jednoznačná závislost koagulační aktivity FVIII a peaku i ETP generace trombinu (26)(39). Uvedené parametry se zřetelně liší u zdravých lidí a u pacientů s různou tíží hemofilie. U hemofilických pacientů s přítomností inhibitoru FVIII nelze k monitoraci substituční bypassové terapie konvenční testy vůbec použít. Použití trombin generačního testu se proto potenciálně jeví jako velmi výhodné.

Santagostino ve své práci prokázal, že pacienti s VIII <1 IU/dL se závažnou formou hemofilie vykazují rozdílné fenotypy krvácení i přes stejnou hladinu FVIII. U pacientů s menším krvácením byla prokázána vyšší hladina trombinu (40).

Z dosavadních zkušeností vyplývá možnost použití testu pro lepší monitoraci substituční terapie, než jakou poskytuje měření aktivity koagulačního faktoru (41).

Žilní tromboembolismus

U pacientů s hlubokou žilní trombózou nebo plicní embolií je optimální doba trvání antikoagulační terapie stanovována na základě posouzení rizika a benefitu u jednotlivých pacientů. Podle některých studií je možná předpověď predikce rekurence TEN příhod při použití TGT v kombinaci vyšetření D- dimerů (42).

TGT se jeví slibně i v monitorování účinnosti antikoagulační léčby u perorálních antikoagulancií, heparinu, nízkomolekulárního heparinu, nebo fondaparinuxu. Tyto léky se pak mohou díky individualizaci dávkování stát bezpečnější pro pacienty (41).

5. Protein C

Společně s antitrombinem (AT) a inhibítozem tkáňového faktoru (tissue factor pathway inhibitor - TFPI) je systém proteinu C nejúčinnějším inhibičním systémem hemostázy. Systém proteinu C je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem

Protein C je vitamín K dependentní protein, který je proenzymem serinové proteázy. Protein C tvoří klíčovou složkou přirozené antikoagulační cesty, která je aktivována na povrchu endotelu trombinem navázaným na trombomodulin, vzniká tak aktivovaná forma proteinu C (APC). APC v přítomnosti fosfolipidů a Ca^{2+} iontů proteolyticky štěpí a tím inaktivuje FVa FVIIIa. Inhibice těchto faktorů vede k blokaci nebo menší produkci komplexů tenázy a protrombinázy (3). Deficit proteinu C může být detekován chromogenní nebo koagulační metodou. Koagulační metody mohou dávat falešně vysoké výsledky v přítomnosti přímých inhibitorů trombinu, proto se dnes takřka výhradně používá chromogenní metoda (43)(44). Deficit proteinu C je asociován s výskytem opakovaných žilních trombóz a plicních embolií, speciálně u mladých lidí. Získané deficity proteinu C jsou spojeny s jaterními chorobami, orální antikoagulační léčbou a disseminovanou intravaskulární koagulací.

V kitu je protein C aktivován in vitro proteinovou frakcí získanou z jedu zmije *Agkistrodon contortrix contortrix*. Stanovení proteinu C je založeno na amidolytické metodě využívající chromogenní substrát. Metoda sestává ze dvou kroků:

1. Inkubace plasmy s protein C aktivátorem.
 2. Kvantifikace aktivovaného proteinu C se syntetickým chromogenním substrátem.
- Uvolněný p-nitroanilin je monitorován při 405 nm, jeho hladina je přímo úměrná množství proteinu C v plasmě.

Normální hodnoty: Protein C-72 – 146%.

6. Protein S

Protein S (PS) je vitamin K dependentní protein, který vzniká v játrech a také v endoteliálních buňkách a megakaryocytech. Převážná část proteinu S je uložena v krevních destičkách a v endotelu. Odkud může být uvolněn působením protrombinázy a tenázy. Protein S je kofaktorem proteinu C.

V plasmě jsou přítomny dvě formy proteinu S: volný protein S (40 %) a protein S spojený s komplementem C4-bBP (C4 bound binding protein) (60 %). Tyto dvě formy jsou v dynamické rovnováze. Vázaná forma proteinu S inhibuje FXa. Volná forma se navíc váže na faktory V, Va, VIII. Vyvázáním na tyto faktory blokuje PS vznik tenázy a protrombinázy a inhibuje aktivaci FXa a trombinu, v menší míře i FVIII (3).

Deficit proteinu S může být vrozený nebo získaný. Získané deficity můžeme sledovat v průběhu těhotenství, užívání orální antikoagulační léčby, hormonální kontracepce, při jaterních poškozeních, u předčasně narozených novorozenců a v řadě dalších případů. Deficit proteinu S je spojen s vysokým rizikem žilního trombembolismu hlavně u mladých lidí. U vrozených těžkých defektů se objevují trombotické komplikace už v dětském věku.

IL Test Free Protein S stanovuje přítomnost volného proteinu S pomocí měření turbidity vznikající aglutinací dvou latexových reagensů. Volný protein S absorbovaný na latex spouští aglutinační reakci s druhou latexovou reagensí, která obsahuje monoklonální protilátku citlivou na lidský protein S. Stupeň aglutinace je pak přímo úměrný koncentraci volného proteinu S ve vzorku.

Normální hodnoty: Volný protein S

Muži	69 – 128.8 %	
Ženy	53.2 – 109.1 %	
ženy pod 47 let	51.1 – 108.7 %	
ženy nad 46 let	51.3 – 109.6 %	
ženy pod 46 let	54.2 – 109.6 %	- s hormonální kontracepcí

Je jasně patrné, že hodnoty jsou závislé na pohlaví a pouze lehce na hormonálním stavu. Věk u žen nemá vliv na výsledky.

7. Antitrombin

Antitrombin (AT) je glykoprotein tvořený v játrech. Jedná se o neúčinnější látku, která je schopna neutralizovat účinek trombinu. Nepůsobí však okamžitě, ale má opožděný účinek (15-30 minut). Deficit AT je spojen s vysokým rizikem tromboembolické nemoci (3).

Stanovení hladiny antitrombinu může být využito pro detekci následujících patologických situací:

- vrozené deficiency
- získané stavy jako jsou diseminovaná intravaskulární koagulace, pankreatitida, těžká jaterní selhání, sepse a polytraumata.

Stanovení antitrombinu je založeno na vyšetření pomocí trombinu a chromogenního substrátu. K vyšetřované plazmě je přidáván specifický chromogenní substrát, který je štěpen trombinem. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství zbytkového trombinu a nepřímo úměrná množství antitrombinu ve vzorku. Metoda je specifická pro AT a není ovlivněna heparin kofaktorem II. Normální hodnoty nejsou závislé na pohlaví a pohybují se v rozmezí od 80%- 120%. Nižší hladiny jsou u dětí a novorozenců. Kritickou hodnotou je 30%.

8. Faktor VIII

Stanovení F VIII pomocí lidské deficitní plasmy jako substrátu slouží pro stanovení defektu faktoru VIII na základě aktivovaného parciálního tromboplastinového času (APPT). Deficit faktoru VIII může být způsoben vrozenou poruchou jako je hemofilie A (deficit faktoru VIII) nebo může být způsoben sekundárně v důsledku jaterního poškození nebo disseminované intravaskulární koagulace. Abnormality vnitřního koagulačního systému jsou stanovány na základě modifikovaného APPT. Plasma pacienta je předředěna a přidána k plasmě deficitní na stanovovaný faktor. Korekce koagulačního času deficitní plasmy je přímo úměrná koncentraci (aktivitě %) faktoru v plasmě pacienta, jenž je odečtena z kalibrační křivky.

Normální hodnoty 50 – 150 %.

Kongenitální defekt F VIII je příčinou hemofilie A, což je gonosomálně recesivně dědičné onemocnění způsobující těžká krvácení. Závažnost krvácení je spojena s hladinou F VIII. Pacienti s hemofilí A jsou rozdělováni dle aktivity F VIII do tří kategorií: pod 1 % - těžká hemofilie, mezi 1 – 4 % střední hemofilie a mezi 5 - 25 % lehká hemofilie. Snížené hladiny F VIII mohou být také v důsledku von Willebrandovy nemoci nebo jako sekundární důsledek jaterních poškození nebo disseminované intravaskulární koagulace. Vyšší hladiny F VIII nad 150 % představují lehké trombofilní riziko, které se zvyšuje o 0,1 s každými dalšími 10 % aktivity nad tuto hodnotu. Faktor VIII je reaktant akutní fáze a zvýšení hladiny je pozorováno při zvýšeném stresu, po operacích a u zánětlivých stavů. Zvýšené hladiny jsou zjišťovány také při narození a během těhotenství (45) (46).

9. Hemostáza v graviditě

Během fyziologického těhotenství dochází k hormonálně podmíněným změnám hemostázy. Mění se počet krevních elementů a faktorů koagulační kaskády, jejichž aktivita je v důsledku gravidity výrazně ovlivněna. V důsledku těchto změn stoupá především riziko tromboembolie. Během gravidity nedochází k výrazným změnám v počtu trombocytů, většina autorů se shoduje na mírném poklesu jejich hladiny ve třetím trimestru těhotenství, koncentrace však nedosahují dolní hranice fyziologického rozmezí.

Častým těhotenským nálezem je anémie. V průběhu gravidity sice dochází k nárůstu celkového objemu erytrocytů asi o 18%, ale přírůstek plazmy je výrazně vyšší. Díky tomu dochází k poklesu hematokritu i množství hemoglobinu. Mírný stupeň anémie tak nacházíme asi u 30% těhotných ve třetím trimestru.

Celkový počet leukocytů roste, podílí se na tom především rostoucí hladina neutrofilů. Ve III. trimestru běžně leukocytosa dosahuje hodnot kolem 15×10^9 (47). Složitý hemostatický a fibrinolytický systém je těhotenstvím ovlivněn prokoagulačně. Fibrinolytická aktivita je snížena o více než 50% (47).

Tendence k hyperkoagulačnímu stavu se v průběhu gravidity nejvýznaměji projevuje v období porodu a po porodu. Nejdůležitějším iniciálním faktorem pro hemostázu za porodu je kontrakce uterinních svalů. K návratu koagulačních parametrů do původního stavu před porodem dochází do 4 -6 týdnů po porodu (48).

9.1. Koagulační faktory v graviditě

Během gravidity dochází k progresivnímu nárůstu hladin faktorů V, VII, VIII, IX, X, XII. Vyrůstá i množství von Willebrandova faktoru (vWF) a fibrinogenu. Tyto změny jsou nejvýraznější ve třetím trimestru gravidity (49) (50) (51) (52) (48) (53).

Faktor II a IX buď mírně narůstají, nebo zůstávají beze změn. Naopak jediným faktorem, u kterého dochází k poklesu, je faktor XI (48). Množství tkáňového faktoru je během normálního těhotenství nezměněno (54).

9.2. Inhibitory koagulace v graviditě

Hladiny AT a proteinu C zůstávají během gravidity konstantní, nebo mírně snížené. (50)(51)(52) (48) (53)(55).

Inhibitor proteinu C klesá a snižuje se i hladina volného proteinu S. Nízká hladina proteinu S bývá přítomna až 8 týdnů po porodu (53). TFPI stoupá během normální gravidity (54). Trombomodulin, který je zodpovědný za aktivaci PC trombinem narůstá během gravidity (56).

9.3. Fibrinolýza v graviditě

Fibrinolytická aktivita během těhotenství klesá a zůstává nízká i během porodu. K normálu se pak vrací krátce po porodu.

Zvyšuje se aktivita fibrinolytických inhibitorů. Plazminogen ve své neaktivní formě stoupá v graviditě, jednak sníženou spotřebou a také zvýšenou tvorbou. Tkáňový aktivátor plazminogenu klesá (57).

Zvyšuje se hladina PAI-1, který je produkován endoteliálními buňkami. V graviditě dochází k vzestupu PAI-2, který je ve velkém množství produkován placentou.

Současně s tím postupně klesá i hladina tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA).

Během porodu dochází ke spotřebování krevních destiček a koagulačních faktorů včetně fibrinogenu. Fibrinolýza se po porodu zvyšuje a může vést ke zvýšené hladině D-dimerů. Některé změny v hemostáze, které probíhají v graviditě, se vrací do normálu během 4-6 týdnů po porodu. Počet destiček a hladina volného proteinu S mohou být změněny déle. Hemostáza by proto neměla být vyšetřována dříve, než za 3 měsíce po porodu, nebo po zástavě laktace. Po porodu dochází k rychlému poklesu PAI-1, PAI-2, nicméně byla prokázána přítomnost PAI-2 i 8 měsíců po porodu. Alfa 2 antiplazmin, urokináza, inhibitor kallikreinu se zvyšuje za 6 týdnů po porodu (48) (tab. 2).

Tab. 2 Změny hemostázy v graviditě, upraveno podle Brenner, B. (2004). Haemostatic changes in pregnancy (49).

	Vzestup	Pokles	Beze změny
Prokoagulační faktory	I, V, VII, VIII, IX, X	XI	
Antikoagulační faktory	Solubilní TM	PS	PC
Adhezivní proteiny	vWF		
Fibrinolytické proteiny	PAI-1, PAI-2	t- PA	TAFI
Mikropartikule a antifosfolipidové protilátky	MP		APLA
Lokální změny placenty	TF	TFPI	

9.4. Koagulační testy v graviditě

Běžné testy i nové metody vyšetřování hemostázy ukazují na hyperkoagulaci v těhotenství. V graviditě dochází k nárůstu rezistence aktivovaného proteinu C, je mírně snížený aktivovaný parciální tromboplastinový čas, zvyšuje se počet protrombinových komplexů, PT je v graviditě nižší než 0,9. Měření času krvácivosti není graviditou ovlivněno.

Protrombinové fragmenty 1+2 (F1+2) jsou uvolňovány z protrombinu během jeho aktivace faktorem Xa, proto jsou F1+2 specifickými indikátory množství generovaného trombinu a jsou tedy sensitivními markery aktivace koagulace. Jiným vhodným markerem koagulace v graviditě je trombin antitrombin komplex (TAT), který je tvořen při inhibici vzniklého trombinu navázáním antitrombinu. F1+2 i TAT během gravidity progresivně narůstají a dokazují, že in vivo je během gravidity generováno větší než malé množství trombinu (58) (59).

Dalším testem, který je schopen postihnout změny koagulace v graviditě je calibrated automated thrombogram (CAT), který je testem pro ověření endogenního trombogenního potenciálu. Tento test ukazuje, že v graviditě je zvýšená kapacita k formování trombinu (59).

9.5. Žilní trombóza v graviditě

Hluboká žilní trombóza (VTE- venous thromboembolism) stále jednou z nejzávažnějších komplikací v těhotenství a šestinedělí. Výskyt VTE je udáván na 0,5-3,0 z 1000 těhotných. Riziko výskytu této komplikace v graviditě a puerperiu oproti netěhotným ženám je přibližně 4-5 násobné, v šestinedělí dokonce až 20-násobné. V období gravidity je frekvence výskytu ve všech trimestrech přibližně stejná(60).

Stanovení správné diagnózy hluboké žilní trombózy je obtížné vzhledem ke změnám, které prodělávají těhotné ženy jako např. vazodilatace, edémy dolních končetin, zvětšení intravaskulárního objemu.

Naštěstí vzácnou komplikací je plicní embolie (PE), která postihuje více jak 2 rodičky na 100 000 živě narozených dětí (60). Nediagnostikovaná či pozdě rozpoznaná hluboká žilní trombóza s sebou nese až 25% riziko plicní embólie (PE) a zhruba 15% riziko mateřské mortality, pokud zůstane neléčená. Stanovení správné diagnózy žilní trombózy snižuje morbiditu PE na 1- 3% (61).

Významnými rizikovými faktory jsou věk nad 35 let, trombofilie, systémový lupus, onemocnění srdce, obezita, iontová a tekutinová dysbalance, postpartální infekce, transfúze, afroamerická rasa (62).

U více jako 50% PE se nedaří zjistit zdroj trombu a mnoho pacientek s VTE má klinicky němou PE (63). Nejčastější lokalizace vzniku VTE v těhotenství je podobná, ale ne totožná jako u netěhotných. Během gravidity se v 72% objevuje VTE v ileofemorálních žilách, u netěhotných je nejčastějším zdrojem trombů oblast popliteálních cév. V postpartálním období se lokalizace VTE mění a v 50% se objevuje v popliteálních vénách (64).

Stanovení diagnózy žilní trombózy na základě laboratorních vyšetření je vzhledem ke změnám v hemostáze v graviditě obtížné. Diagnoza hluboké žilní trombózy je stanovována na základě klinického vyšetření a zobrazovacích metod.

D- dimery jsou zvýšeny nejvíce ve II. a III. trimestru (65). Elevováno je i množství komplexu trombin- antitrombin a množství proteinu S klesá. Běžně používané vyšetření D-dimerů, které je užitečné na základě své negativní prediktivní výpovědi je v těhotenství nepoužitelné, protože D- dimery jsou elevovány i ve fyziologické graviditě. Jen některá z laboratorních vyšetření jsou použitelná spíše k ověření

podezření na VTE a vyselektování pacientek ohrožených VTE. Hladina AT je snížena (norma 85-125%) na stupeň korespondující se závažností žilního tromboembolismu z důvodu tvorby komplexu trombin- antitrombin. Vyšetření AT je ukazatelem účinnosti terapie heparinem, nelze jej bohužel použít jako diagnostický test.

Zajímavým poznatkem je, že jedinci s krevní skupinou 0 mají snížené riziko VTE na polovinu, přičemž vysvětlení tohoto jevu je nejasné (66) (67).

10. Diabetes mellitus a hemostáza

Gestační diabetes mellitus (GDM) je porucha metabolismu glukózy různého stupně, která se objeví v těhotenství a spontánně odezní v průběhu šestinedělí. V těhotenství může být kromě GDM zachycen také tzv. zjevný diabetes mellitus (dále také DM), který splňuje diagnostická kritéria diabetu platná pro všeobecnou populaci (glykemie nalačno $\geq 7,0$ mmol/l a/nebo ve 120. min oGTT $\geq 11,1$ mmol/l) a zpravidla přetrvává i po šestinedělí. Péče o těhotné ženy se zjevným diabetem je shodná s péčí o těhotné ženy s pregestačním diabetem (68).

Diabetes mellitus je prokoagulační stav. 80% všech pacientů s diabetem typu II umírá na stavy spojené s trombózou. 75% těchto úmrtí se vyskytuje v souvislosti s kardiovaskulárními komplikacemi, o zbývající procenta se dělí cerebrovaskulární příhody a trombotické komplikace periferního cévního zásobení. Hlavním důvodem je abnormální stav cévního endotelu u diabetiků, který je u zdravých lidí primární ochranou před trombózou. Abnormální stav endotelu hraje nezpochybnitelnou roli v aktivaci krevních destiček a koagulačních faktorů. Obrazem těchto změn je tvorba zvýšeného množství trombin-antitrombin komplexů. Při vyšetření je zjišťována i elevace protrombinových fragmentů 1+2. Hladiny plazmatických koagulačních faktorů jako fibrinogen, FVII, FVIII, FXI, FXII, kallikrein a von Willebrandův faktor jsou u diabetiků zvýšené. Naopak hladina antikoagulačně působícího proteinu C klesá. Také fibrinolytický systém je relativně inhibován díky abnormální tvorbě krevního koagula, které je pak resistantní vůči degradaci. PAI-1 je u diabetiků zvýšený. V plazmě je zvýšené množství agregovaných krevních destiček, je potencována agregace trombocytů za působení jejich agonistů, zvyšuje se síla, se kterou dochází ke kontrakci destiček. Hyperaktivita krevních destiček je prokazatelná i díky zvýšení faktorů uvolněných z krevních destiček při jejich aktivaci, jako je beta-tromboglobulin, destičkový faktor 4 a tromboxan B. Pravděpodobným důvodem těchto změn je hyperinzulinémie a hyperglykémie (69).

Ve studii Tripodiho při sledování diabetiků II. typu byla měřena hladina prokoagulačních a antikoagulačních faktorů konvenčními testy a porovnávána

s generací trombinu. V této studii bylo zjištěno, že při použití konvenčních testů se výsledky nelišily od kontrolní skupiny, naopak pokud se k vyšetření plazmy diabetiků II. typu použil trombin generační test, byl ve skupině nemocných nalezen signifikantně vyšší peak generace trombinu. V této studii bylo potvrzeno, že plazma diabetiků II typu obsahuje větší množství prokoagulačních faktorů, což odpovídá zvýšenému riziku aterosklerózy a VTE (70).

V Sowersově studii bylo vyšetřeno 30 žen. U pacientek s gestačním diabetem byla zjištěna snížená fibrinolytická aktivita. Gestační diabetičky měly vyšší hladinu PAI-1 než zdravé ženy. U diabetiček těhotných i netěhotných byl zjištěn kratší TGT, než u kontrolní skupiny. Snížení AT u těhotných, těhotných diabetiček a diabetiček bylo v korelaci s hladinou glykémie a s hodnotami HbA1, z čehož vyplývá, že přísné dodržování diety může ovlivňovat hyperkoagulační stav (71).

11. Preeklampsie

Preeklampsie je pro těhotenství specifické, multiorgánové onemocnění nejasné etiologie. Nejčastěji je charakterizována jako hypertenze po 20. týdnu těhotenství, doprovázené signifikantní proteinurií. Za signifikantní proteinurii v těhotenství považujeme ztrátu bílkovin močí $\geq 0,3$ g/24 hodin (dUCB) nebo hodnotu poměru albumin/kreatinin v jednom vzorku moči ≥ 30 mg/mmol (ACR)

V současnosti je preeklampsie definována jako onemocnění dvou základních charakteristik: abnormální placentace a endoteliální dysfunkce (47).

Preeklampsie byla a zůstává jednou z hlavních příčin mateřské i novorozenecké mortality a morbidity, postihující celosvětově 5-7% gravidit. Je druhou nejčastější příčinou mateřské mortality (72) (73).

11.1. Klasifikace preeklampsie dle nástupu onemocnění

V současné klinické praxi se za zásadní považuje dělení preeklampsie podle doby nástupu onemocnění.

11.1.1. Časná forma preeklampsie

Výskyt preeklampsie před 34 týdnem gravidity se hodnotí jako časná forma onemocnění-**early onset** (EOPET). Tato forma onemocnění je spojena s vyšší morbiditou matek a asi 4x vyšším rizikem intrauterinního úmrtí plodů v dalším průběhu onemocnění.

Porucha fetoplacentární jednotky, která je často spojena s:

- dysfunkcí placenty
- intrauterinní růstovou restrikcí plodu
- sníženým objemem placentární tkáně
- abnormálními nálezy průtoků na uterinních a umbilikálních cévách při dopplerovském vyšetření

- závažnou mateřskou i neonatální mortalitou a morbiditou (47).

11.1.2. Pozdní forma preeklampsie

Je preeklampsie s výskytem onemocnění po 34. týdnu gravidity. Pozdní forma - late onset forma (LOPET) tvoří 80% všech případů onemocnění. Novorozenci se rodí s odpovídající váhou bez známek růstové restrikce. Nebývají přítomny změny průtoku umbilikálními artériemi. Rizikovou skupinou žen pro vznik late onset preeklampsie jsou diabetičky, obézní ženy, ženy s kardiovaskulárním onemocněním a ženy s vícečetným těhotenstvím (47).

Většinou vzniká na podkladě chronického onemocnění matky, je spojena s:

- normálním objemem placentární tkáně
- fyziologickým růstem plodu i normální porodní hmotností novorozence
- fyziologickým nálezem průtoků při dopplerovském vyšetření
- příznivou prognózou pro matku i plod

U 80-90% případů preeklampsie se jedná o čistě maternální syndrom, kdy se rodí eutrofické plody (47).

Na základě sledování dopplerometrických parametrů se objevily studie, které byly schopny se 100% přesností předpovědět IUGR, ale jen s 33% jistotou preeklampsii. To vedlo Huppertze k domněnce, zda odlišnost mezi časnou a pozdní formou netkví ve spojení s IUGR, poněvadž další příznaky jako hypertenze a proteinurie jsou shodné (74).

11.2. Etiologie preeklampsie

Etiopatogeneza preeklampsie je předmětem intenzivního zkoumání a předpokládá se multifaktoriální etiologie. Preeklampsie se vyvíjí pouze v těhotenství, není však nutná přítomnost plodu. Ačkoli hraje placenta klíčovou roli v rozvoji preeklampsie, její nástup, závažnost a progresse je signifikantně ovlivněna mateřskou odpovědí na proteiny a placentární faktory uvolňované placentou (75).

Kombinace placentárních faktorů a vnímavosti mateřského organismu má klíčovou roli v načasování nástupu onemocnění, jeho progresi a závažnosti. Stále nebyla

ukončena a vyjasněna diskuse, zda má časná a pozdní forma onemocnění stejnou etiologii (75). V nedávno vydané práci byla vyslovena hypotéza založená na kardiovaskulární predispozici žen s preeklampsií, ze které vyplývá, že pokud dojde k selhání kardiovaskulárních adaptačních změn na těhotenství, může dojít ke vzniku preeklampsie. V jiných publikacích byl popsán vznik preeklampsie u normálně vytvářené placenty u žen citlivých ke vzniku preeklampsie (74) (76). Podle tohoto nového konceptu je za vznik preeklampsie zodpovědná porucha adaptace kardiovaskulárního systému, nikoli placentární faktory. Nicméně tuto hypotézu bude nutno podrobit dalšímu zkoumání (77).

11.2.1. Placentace

Při normálním vývoji placenty dochází k invazi cytotrofoblastu do mateřských spirálních cév a náhradě hladkých svalových buněk těchto cév. Náhrada hladkých svalových vláken je naprosto klíčovým okamžikem. U zdravých těhotných žen dochází ke zvětšení průměru spirálních artérií čtyřnásobně, cévy ztrácí svou hladkou svalovinu a vnitřní elastickou laminu. Nízkoodporové cévy zasahují až do vnitřní třetiny myometria a nejsou schopny vazokonstrikce (47). Tento stav se nazývá remodeling artérií, začíná na konci prvního trimestru a končí kolem 18. - 20. týdne gestace (47). Jako jednoznačnou příčinu vzniku preeklampsie je přijímána porucha tvorby placenty vedoucí k hypoxii, oxidativnímu stresu a placentárním infarktům. Spirální artérie, což jsou konečné artérie, které omývají intervillózní prostor jsou přítomny jen u fyziologických gravidit. Pro tyto cévy je typické, že hladké svalové buňky jsou nahrazeny fibrinoidní matrix s vnořenými buňkami, o kterých se předpokládalo, že mají svůj původ v trofoblastu. U pacientek s preeklampsií nebyly spirální artérie nalezeny, ale byly přítomny běžné arteriální struktury, které neprošly remodelingem. V těchto artériích zůstala zachována hladká svalovina, která je schopna reagovat vazokonstrikčně a tím redukovat tok krve do placenty (47).

11.2.2. Dysfunkce endotelu a cirkulujících faktorů

Endotel je vrstva buněk, která je umístěna na lumenálnímu povrchu cév a spolu s buňkami hladkého svalstva a fibroblasty tvoří cévní stěnu. Dnes je již známo, že buňky endotelu mohou tvořit velké množství biologicky aktivních látek. Endotel je v rozsahu tvorby těchto působků největším apokrinním, parakrinním a endokrinním orgánem lidského organismu. Endotelové buňky mají výraznou orgánovou specifitu a dokonce se liší v jednotlivých segmentech cév jednoho orgánu. Za fyziologických okolností nejsou endotelové buňky přímo ve styku s proudící krví, ale jsou pokryty vrstvou glykokalyxu, což je ochranná vrstva bránící neúčelné aktivaci endotelu (47). Intaktní endotel má za fyziologických podmínek silný inhibiční efekt na krevní srážení prostřednictvím faktorů, které exprimují na svém povrchu. Klíčovými produkty jsou oxid dusnatý, prostacyclin, trombomodulin, TFPI, které se spoluúčastní na optimální perfúzi tkání (47). Endotelové buňky mají na svém povrchu řadu receptorů, kterými přijímají hemodynamické signály a humorální působky (receptory cytokinů, růstových faktorů, bakteriálních substancí, angiotensinu, F II, FII, FV, FIX, FX). Na základě těchto podmětů dojde k aktivaci endotelu, což vede k uvolňování řady produktů, kterými endotelové buňky řídí vazomotoriku (cévní tonus, krevní tlak, perfúzi orgánů), koagulaci (adhezi a agregaci trombocytů, aktivaci koagulační kaskády a fibrinolýzy), udržování reologických vlastností krve a také zánětlivou reakci (migraci chemotaxi leukocytů, monocytů a makrofágů, fagocytozu, cévní permeabilitu (47) (3). Generalizovaná dysfunkce endotelu je příčinou klinických projevů preeklampsie a HELLP syndromu.

11.2.3. Porucha imunologická adaptace

Imunologická teorie je v souvislosti debatami o etiologii preeklampsie jednou z nejčastěji zmiňovaných. Podle ní je porucha tolerance ke štěpu, který obsahuje cizí, otcovský antigen, provázena zpomalením invaze trofoblastu do myometria a nastartováním kaskády změn vedoucích ve svém důsledku ke vzniku preeklampsie, tzn. porušení remodelace cév a oxidativnímu stresu. Abnormální mateřská imunitní odpověď je nejspíše reakcí na fetální antigeny otcovského původu. Preeklampsie

postihuje častěji primipary než ženy, které již byly těhotné. Protektivní účinek multiparity však zaniká se změnou partnera (78).

Podle zákonů tkáňové transplantace by měly fetální aloantigeny kódované polymorfními geny zděděnými od otce vyvolávat po implantaci blastocysty do děložní stěny mateřskou imunitní odpověď. Důležitým faktorem určujícím antigenicitu zárodku je exprese MHC (major histocompatibility komplex) molekul, které jsou typické pro všechny savce. Schopnost individuální tolerance placentární tkáně je podmíněna expresí neobvyklých typů MHC 1. třídy. Největší pozornost je upřena v současnosti na HLA-G (human leukocyte antigen). Přítomnost HLA-G pravděpodobně hraje podstatnou roli v navození mateřské tolerance plodu, neboť je zodpovědná za ochranu trofoblastu před cytotoxicitou zprostředkovanou NK buňkami (natural killer) decidui (47).

Přesný mechanismus, který řídí invazi trofoblastu je zatím bohužel neobjasněn.

11.2.4. Genetické faktory

O genetické predispozici není vzhledem k rodinnému výskytu pochyb. Zatímco riziko vzniku preeklampsie je v běžné populaci 5 %, pak u dcer preeklamptických matek je riziko 4-5x vyšší a u sester je až 8x vyšší. Zdá se nepravděpodobné, že by se na patogenezi preeklampsie podílel pouze jeden gen. Jedním z dalších faktorů by mohl být genotyp plodu. Mezi geny, u jejichž polymorfismů, je snaha prokázat vliv na patogenezi preeklampsie patří geny pro koagulační faktory, pro TNF α , endotelovou syntézu NO, lipoproteinovou lipázu. Bylo popsáno několik teorií, mimo jiné lokus mateřské náchylnosti na chromosomu 2p13, defekt NADH ubichinonreduktázy vedoucí k vyšší produkci superoxidu. Geneticky podmíněným predispozičním faktorem tak může být i mutace genů pro proteiny regulující funkci komplementu. Předmětem výzkumu je i mitochondriální dědičnost a shoda v HLA (47).

11.3. Preeklampsie – dvoustupňové onemocnění

Model vzniku preeklampsie ve 2 stupních byl vysloven v 90. letech Redmanem (78). Z toho, co dosud o preeklampsii víme, není jasné, proč redukce placentární perfúze vede ke vzniku preeklampsie jen u některých žen a jaký je mechanismus přechodu mezi stadiem 1 a 2.

12.3.1. První stádium

V tomto pojetí je příčinou vzniku preeklampsie zhoršená placentární perfúze, díky které dochází ke tvorbě velkého množství působků, které vstupují do mateřské cirkulace a mohou způsobit rozsáhlou dysfunkci endotelu.

12.3.2. Druhé stádium

Je přechodem do klinické manifestace příznaků u ženy a jedná se o multiorgánové postižení organismu. Pokles perfúze vede ke vzniku vazospasmů, k aktivaci koagulační kaskády, k tvorbě mikrotrombů, okluzi cév a úniku intravaskulární tekutiny do extravaskulárního prostoru. K vazokonstrikci dochází díky zvýšené senzitivitě k vazoaktivním látkám. Centrální poruchou, která vede k těmto změnám je dysfunkce endotelu.

Klíčový moment- přechod 1 stadia do 2 stadia

Co je vyvolávající příčinou přechodu mezi těmito dvěma stupni?

Snížená perfúze placentou není jediným faktorem vedoucím ke vzniku preeklampsie. Ke vzniku preeklampsie tedy nestačí jen redukce perfúze placentou, ale spolupodílí se genetické, behaviorální a enviromentální vlivy. Mnohé ze symptomů, které vedou ke vzniku preeklampsie jsou shodné s rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob.

Jako spojovací článek bylo označeno několik toxinů vznikajících v placentě včetně cytokinů, antiangiogenních faktorů a mikropartikulí syncytiotrofoblastu. Za spojovací článek byl považován i oxidativní stres, za vzniku reaktivních metabolitů kyslíku, jež následně aktivují neutrofile a monocyty, angiogenní faktory, cytokiny (47).

Předpokládá se, že k abnormální placentaci dochází ještě před dokončením remodelace cév zásobujících placentu na základě placentárních proteinů, které jsou

uvolňovány do oběhu dlouho před 10. - 20. týdnem gravidity, kdy teprve dochází k hluboké invazi trofoblastu a přeměně cév (79). Podle Huppertze by k abnormálnímu vývoji mělo docházet v období diferenciaci trofoblastu moruly, nebo později při přeměně trofoblastu do cytotrofoblastu a syncytiotrofoblastu.

11.4. Hemostáza a preeklampsie

Alterace hemokoagulačního systému se podílí na etiologii i na klinických projevech u preeklampsie. Ženy s klinickými projevy preeklampsie jsou ohroženy žilní tromboembolií i možným rozvojem diseminované intravaskulární koagulopatie. Excesivní uteroplacentární trombóza hraje roli v placentární ischemii, kterou je preeklampsie charakteristická. Při detailním porovnání markerů hemostázy u žen s preeklampsií a zdravých rodiček byly nalezeny četné změny (80). U preeklampsie byla zjištěna zvýšená konzumpce faktoru VIII a vyšší obrat fibrinogenu. K dalším změnám patří vyšší hladiny komplexu trombin- antitrombin, protrombinových faktorů 1+2, FDP, D-dimerů, rozpustného fibrinu. Všechny tyto změny značí, že u žen s preeklampsií je vyšší tendence ke generaci trombinu. Co se týče fibrinolytické aktivity, je potvrzeno, že dochází k signifikantní redukci PAI-2, což je pravděpodobně odrazem placentární insuficience. U žen s preeklampsií nalézáme také signifikantní nárůst tkáňového plazminogenu, který je pravděpodobně odrazem tkáňové dysfunkce. Hladiny proteinů C a S jsou snižené. Většina z dostupných výsledků vychází z vyšetření periferní krve, potenciálně by však měl mít větší význam odběr krve z uteroplacentárního řečiště (81).

Bonnar et al. v sérii studií odebírali periferní krev a vzorky krve z uterinních žil při císařském řezu (82)(81). Demonstrovali tak, že hladiny PAI-1 byly vyšší a PAI-2 nižší v uterinních žilách u těhotenství komplikovaných preeklampsií. Při porovnání periferní krve a krve z uterinních žil zjistili, že hladiny trombin- antitrombin komplexu, solubilního fibrinu, FDP, D-dimery, plasmin- α 2- antiplasmin komplexu jsou vyšší v uterinních cévách než v periferní krvi. Krev z uterinních žil žen s preeklampsií měla také nižší hladinu solubilního fibrinu.

Dle dalších několika studií, byla u pacientek s preeklampsií prokázána zvýšená hladina markerů tvorby trombinu jako protrombinové fragmenty 1+2 (F1+2), trombin antitrombin komplexu (TAT)(83) (84)(85)(86).

Další z možností je použití kalibrovaného automatického thrombographu (CAT) jenž vyvinul Hemker et al. (16). ETP kvantifikuje enzymatickou aktivitu trombinu v plazmě a umožňuje hodnocení prokoagulační a antikoagulačních působků, zatímco TAT a F1+2 jsou indikátory probíhající generace trombinu v plazmě (16).

Ve studii Rosenkranzové a kol. bylo potvrzeno signifikantní ETP u žen s preeklampsí (87). Jednalo se o ženy vyšetřené ve III. trimestru. Při použití kontinuálního monitoringu generace trombinu u žen s preeklampsí, byl zjištěn signifikantní vzestup ETP, TTP - čas k dosažení peaku byl u těchto pacientek signifikantně prodloužen, ale nenašly se signifikantní odchylky v peaku trombinu nebo v lag timu. Při použití F1+2 a TAT se potvrdilo jejich zvýšení u žen s preeklampsí oproti kontrolní skupině. I podle těchto výsledků je možné předpokládat, že ženy s preeklampsí mají potenciál k tvorbě většího množství trombinu (87) (83) (84) (85) (86).

12. Hypertenze v graviditě

V graviditě rozjišťujeme preexistující/chronickou hypertenzi. Jedná se o hypertenzní chorobu zjištěnou před těhotenstvím, nebo hypertenzi diagnostikovanou před 20. týdnem těhotenství, nebo je to hypertenze zjištěná v těhotenství a perzistující déle než 6–8 týdnů po porodu. Dělíme ji na esenciální (neznámé etiologie) a sekundární (nefrogenní hypertenze, renovaskulární hypertenze, endokrinní hypertenze, hypertenze z neurogenních příčin, hypertenze při koarktaci aorty, poléková hypertenze apod.).

Druhou skupinou je gestační hypertenze - hypertenze bez signifikantní proteinurie, vznikající po 20. týdnu těhotenství.

Chronická preexistující i gestační hypertenze jsou významným predisponujícím faktorem pro vznik preeklampsie, tyto ženy mají až 5x vyšší riziko rozvoje této komplikace oproti normotenzním gravidním (47).

13. Vlastní výzkumný projekt

13.1. Cíl práce

Cílem práce byla analýza dynamiky změn přímé generace trombinu u zdravých těhotných v průběhu jednotlivých trimestrů v porovnání s těhotnými, léčenými pro chronickou hypertenzi, diabetes mellitus a preeklampsii. Trombin generační test byl vybrán pro svou centrální roli v procesu koagulace. Jeho změny v průběhu těhotenství by mohly lépe zachytit již známé posuny v hemostáze související s probíhajícím těhotenstvím.

13.2. Pracovní hypotéza

Předpokladem je, že by u gravidních žen s preeklampií, hypertenzí a diabetem mellitem ve srovnání se zdravými těhotnými ženami mohlo docházet k vyšší generaci trombinu v důsledku synergického působení jednotlivých trombofilních rizikových faktorů. Tímto testem vyselektovaná riziková skupina žen by mohla výrazně profitovat z přísnější dispenzarizace a eventuální preventivní terapie profylaktickými dávkami LMWH a mohlo by tak dojít ke snížení mateřské a perinatální morbidity a mortality.

13.3. Charakteristika souborů

Soubor tvořily jak zdravé těhotné ženy, zařazené do první skupiny a prospektivně sledované v poradně pro fyziologickou graviditu na Porodnicko gynekologické klinice FN Olomouc, tak ženy s rizikovými faktory (hypertenze, diabetes mellitus) a dále těhotné, u kterých se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie a/ nebo gestační diabetes, které byly zařazené do druhé skupiny a sledovány v poradně pro rizikovou graviditu na Porodnicko gynekologické klinice FN Olomouc.

Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas před zařazením do studie. První odběr venózní krve probíhal na začátku gravidity, do konce I. trimestru, v době standardních těhotenských odběrů. Druhý odběr jsme prováděli v období mezi 24. - 28. týdnem. Třetí vzorek potom mezi 36. - 40. týdnem. Získané krevní vzorky byly

následně zpracovány v koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc. Z krevních vzorků jsme vyšetřovali protein C a S, antitrombin, F II a FVIII. Generace trombinu byla stanovována trombin generačním testem.

Tato výzkumná práce probíhala v rámci grantu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky, registračního čísla NS10319-3/2009 s názvem „Dynamika změn přímé generace trombinu během fyziologické a patologické gravidity“ řešitele Doc. MUDr. Martina Procházky, PhD.

13.3.1. Dotazník

U všech pacientek zařazených do studie byl vyplněn dotazník zjišťující sociodemografické parametry, anamnestické údaje, antropometrické a behaviorální faktory a výsledky gravidity.

Sociodemografické parametry:

1. Věk
2. Vzdělání
3. Rodinný stav

Gynekologická anamnéza:

1. Porody: rok: váha: gestační týden: komplikace:
2. Potraty: rok: gestační týden: komplikace:
3. Menstruační cyklus : délka cyklu: délka krvácení:

Antropometrické parametry:

1. Váha před těhotenstvím
2. Váhový přírůstek v těhotenství
3. BMI

Behaviorální faktory:

1. Kouření (počet cigaret/ den)
2. Alkohol
3. Abusus drog

Osobní anamnéza:

1. Hypertenze před těhotenstvím
2. Anamnéza trombembolické nemoci
3. Diabetes mellitus
4. Onemocnění štítné žlázy

13. 5. Laboratorní vyšetření

Všechny získané krevní vzorky byly následně zpracovány v koagulační laboratoři Hemato- onkologické kliniky FN a LF UP Olomouc.

Trombin generační test

Odběr krve – periferní žilní krev byla odebrána do zkumavek s 3,2% citrátem sodným. Vzorek byl následně za laboratorní teploty centrifugován 10 min. při 3000xg. Získaná horní frakce (plazma chudá na destičky – PPP) byla rozdělena do stejných dávek a uchovávána při -70 °C do doby analýzy.

Pro vyšetření trombin generačního testu byl použit kit TECHNOThROMBIN® TGA (Technoclone, Rakousko) na plně automatickém analyzátoru Ceveron® Alpha (Technoclone, Rakousko). Generace trombinu v měřeném vzorku byla iniciována 7,16 pM rekombinantního tkáňového faktoru (rTF) resuspendovaného v 0,32 μM fosfolipidových micel (obsah fosfatidylcholinu 2,56 μM a fosfatidylserinu 0,64 μM). Vlastní stanovení bylo prováděno následovně: K 40 μl vzorku PPP bylo přidáno 20 μl TRIS pufru a 15 μl 71,6 pM rTF s 3,2 μM fosfolipidových micel. Následně bylo přidáno 25 μl fluorogenního substrátu Z-G-G-RAMC a vlastní reakce byla zahájena 35 μl 25 mM CaCl₂. Kalibrace stanovení byla prováděna na standard trombinu ~800 nmol. Z tohoto standardu byly připraveny kalibrační body s koncentrací ~200, ~400 a ~800 nmol. Z těchto ředění byla provedena měření dle následujícího protokolu. Do reakce bylo pipetováno 90 μl příslušně naředěného standardu trombinu. Další postup byl identický jako v případě vzorku. Vlastní integrovaný fluorescenční reader pracuje s excitační vlnovou délkou 360 nm a emisní vlnovou délkou 465 nm. Detekci fluorescence provádí v minutových intervalech po dobu 60 min. při 37 °C. Vyhodnocení výsledků bylo automaticky prováděno pomocí software Ceveron PC-SW ver. 1.4., kdy primárně měřené referenční fluorescenční jednotky (RFU) byly pomocí kalibrační křivky převedeny na aktuální koncentraci trombinu ve vzorku. Jednotlivé parametry TGT (lag fáze – TGT_t, max. generace trombinu – TGT_m, plocha pod křivkou TGT_e) byly získány derivací z naměřené křivky.

Vyšetření proteinu C, proteinu S, antitrombinu, hladiny F II a F VIII bylo provedeno standardizovanými metodami dle SOP FNOI.

13.6. Výsledky

V období let 2008-2011 byly analyzovány krevní vzorky celkem 303 zdravých těhotných zařazených do první skupiny. Tyto těhotné měly negativní osobní a bezvýznamnou rodinnou anamnézu. 215 žen, tj. 71% byly primipary, 60 žen, tj. 20% byly sekundipary, 28 žen, tj. 6 procent byly terciipary. Průměrný věk těhotných žen byl 28,6 let ($\pm 3,8$ let). Průměrná hmotnost rodiček na začátku gravidity byla 63,6 kg ($\pm 7,8$ kg). Průměrný váhový přírůstek činil 12,03 kg ($\pm 3,4$ kg), průměrná výška rodiček byla 168 cm ($\pm 4,6$ cm).

Z celkového počtu 303 žen se u 18 (6%) vyvinul lehčí až středně těžký stupeň preeklampsie nebo HELLP syndrom s různou tíží klinické manifestace. 23 rodiček bylo zařazeno do studie ve III. trimestru při manifestaci preeklampsie. 20 rodiček (6,6%) porodilo předčasně před ukončeným 37. týdnem gravidity. 3 těhotenství (0,9%) byla ukončena z genetické indikace pro vrozenou vadu plodu. Kompletní protokol studie (odběry ve všech třech trimestrech) tedy absolvovalo 280 těhotných.

Ve druhé skupině jsme vyšetřili v jednotlivých trimestrech celkem 108 těhotných žen s rizikovými faktory a to 15 těhotných s chronickou hypertenzí, 40 gestačních diabetiček a 30 těhotných žen s diabetem I. typu. Dále bylo do studie zařazeno 23 rodiček až v průběhu III. trimestru při manifestaci preeklampsie.

Další parametry jsou shrnuty v tabulkách 3-5.

Tabulka č. 3 Počty pacientek zařazených do studie v jednotlivých kategoriích.

	Počet vyšetřených	Zařazeno ve III. trim.	Nezahrnuto do hodnocení
Fyziologické těhotenství	303	0	23
Preeklampsie	41	23	0
Chronická hypertenze	15	0	0
Diabetes - preexistující	30	0	0
Gestační diabetes	40	40	0

Tabulka č.4 Parita pacientek v jednotlivých kategoriích.

Parita	I.	II.	III. a více
Fyziologické těhotenství	215(71%)	60(20%)	28(6%)
Preeklampsie	37(90%)	4 (10%)	0 (0%)
Chronická hypertenze	5(33%)	8(54%)	2(13%)
Diabetes - preexistující	12(40%)	14(47%)	4(13%)
Gestační diabetes	21(52,5%)	12(30%)	7(17,5%)

Skladba souboru u fyziologických těhotenství je ovlivněna zastoupením prvorodiček v prenatalních poradnách porodnicko - gynekologické kliniky FN Olomouc. Druho- a víceroďičky jsou považovány z hlediska prenatalní péče za méně rizikové a zůstávají delší dobu v péči obvodních gynekologů. Vyšší podíl prvorodiček ve skupině těhotných s preeklampií je dán charakterem onemocnění, resp. parita je považována za jeden z rizikových faktorů. V ostatních kategoriích je poměr statisticky nevýznamný.

Tabulka č. 5 Gestační věk a parametry matek a plodů.

	Věk	Gestační stáří (týdny)	Hmotnost matky (kg)	Novorozenec (g)
Fyziologické těhotenství	28,6	38,5	63,6 (±7,8)	3350
Preeklampsie	31,0	37,4	71,1 (±10,1)	2950
Chronická hypertenze	31,3	38,0	69,2 (±8,7)	3010
Diabetes - preexistující	27,8	37,1	68,7 (±6,5)	3120
Gestační diabetes	26,5	38,2	73,2 (±8,2)	3590

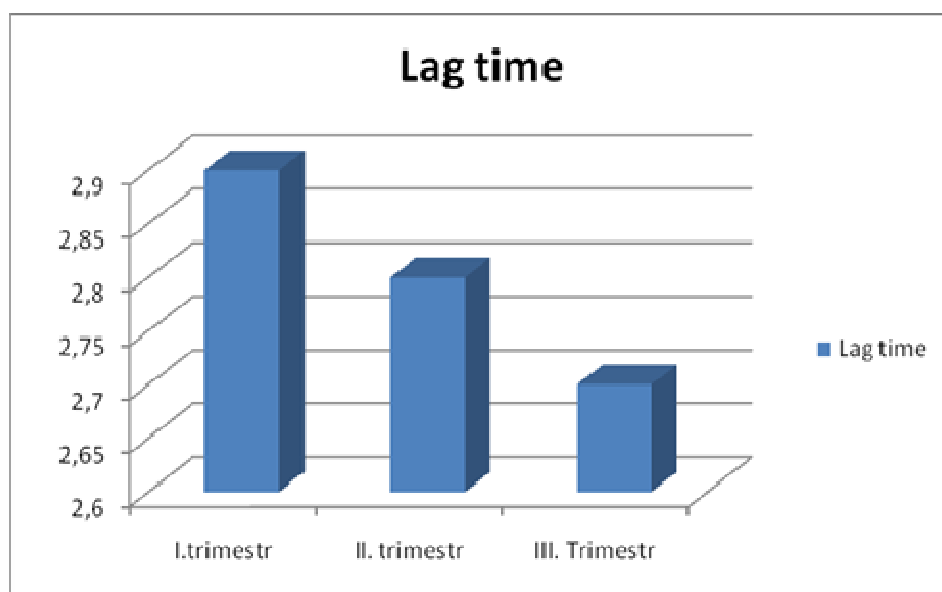
Nižší váha novorozenců matek s preeklampií ($p < 0,01$) je dána nutností elektivního ukončení těhotenství s těžkou preeklampií či syndromem HELLP v nižších gestačních týdnech s ohledem na zdraví matky či plodu. Statisticky vyšší hmotnost u novorozenců matek s gestačním diabetem zase dána vyšším podílem dětí s diabetickou makrozomií.

Laboratorní hodnoty u fyziologické gravidity

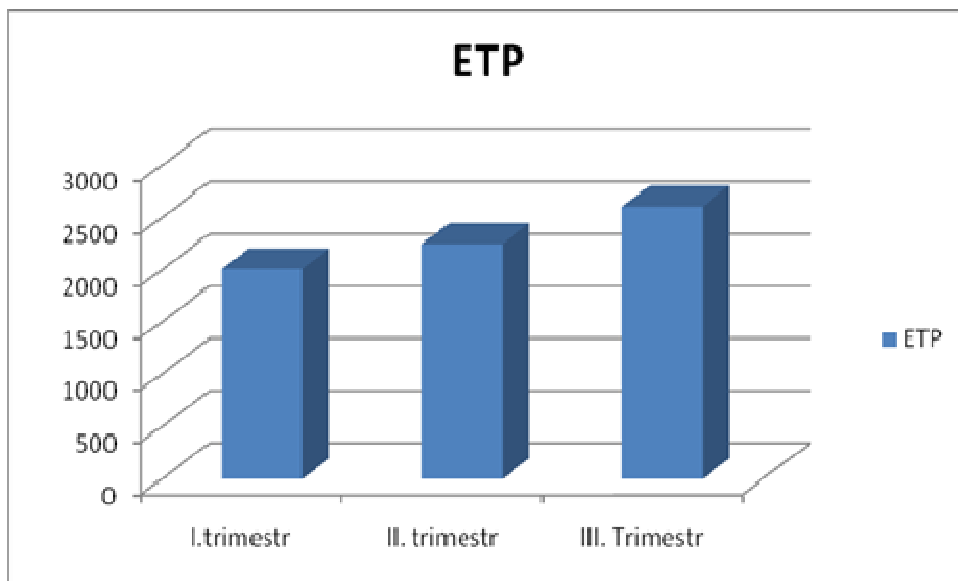
Tabulka č. 6 Porovnání analýzy trombin generačního testu v jednotlivých trimestrech u fyziologické gravidity.

	Lag time	25-75 percentil
I. trimestr	2,9	2,6 - 3,1
II. trimestr	2,8	2,4 - 2,9
III. trimestr	2,7	2,3 - 2,8
	ETP	25-75 percentil
I. trimestr	2010	1980 – 2280
II. trimestr	2250	2015 – 2448
III. trimestr	2611	2168 – 2732
	Peak	25-75 percentil
I. trimestr	451	420 – 470
II. trimestr	522	499 – 548
III. trimestr	578	525 – 609

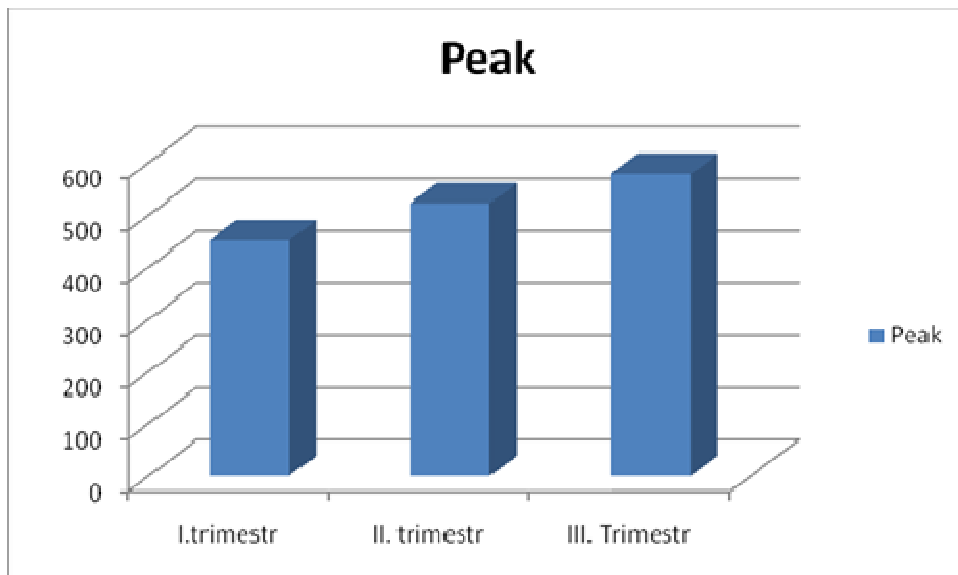
Graf č.1 Lag time u fyziologické gravidity



Graf č. 2 ETP u fyziologické gravidity.



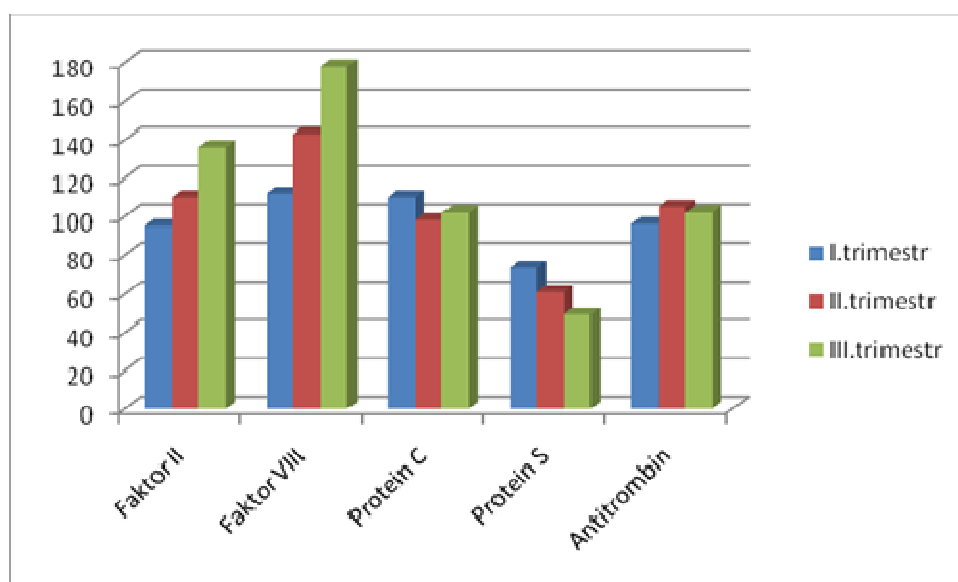
Graf č. 3 Peak u fyziologické gravidity.



Tabulka č. 7 Koagulační parametry v jednotlivých trimestrech.

	Faktor II	Faktor VIII	Protein C	Protein S	Antitrombin
I. trimestr	95	112	110	73	96
II. trimestr	110	143	98	61	105
III. trimestr	136	178	102	49	102

Graf č. 4 Koagulační parametry v jednotlivých trimestrech.



Výsledky hodnocení generace trombinu u fyziologických gravidit odpovídají údajům v literatuře. Lag time, tedy doba do začátku tvorby trombinu zůstává po celou dobu těhotenství stabilní a výsledky, resp. rozdíly nejsou statisticky významné. ETP (endogenní potenciál trombinu nebo plocha pod křivkou) odpovídající množství aktivovaného trombinu v průběhu těhotenství roste. Signifikantní nárůst jsme pozorovali v rozdílech mezi I. a III. trimestrem. Podobně Peak, neboli maximální hodnota koncentrace trombinu, vytváří významný rozdíl mezi I. a III. trimestrem. ETP a Peak tedy v průběhu těhotenství významně narůstají, Lag time se nemění.

Hodnoty ostatních koagulačních parametrů jsou uvedeny v tabulce č. 7 a grafu č. 4. Pozorovali jsme významný nárůst faktoru II. a VIII. a dále pokles volného proteinu

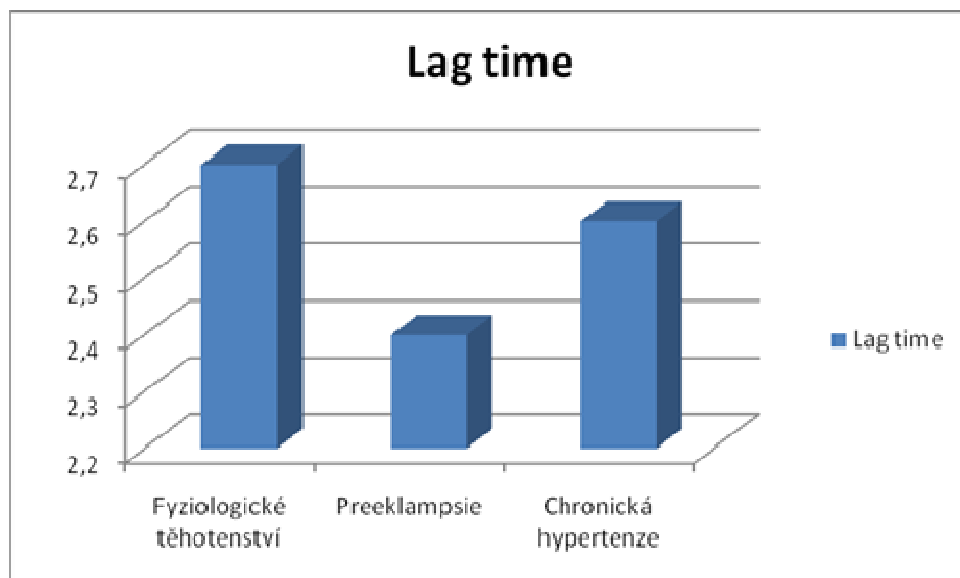
S. U proteinu C došlo rovněž k poklesu, rozdíl však nebyl signifikantní, nesignifikantní změny jsme zaznamenali také u antitrombinu.

Laboratorní hodnoty u rizikových skupin: Preeklampsie a chronická hypertenze

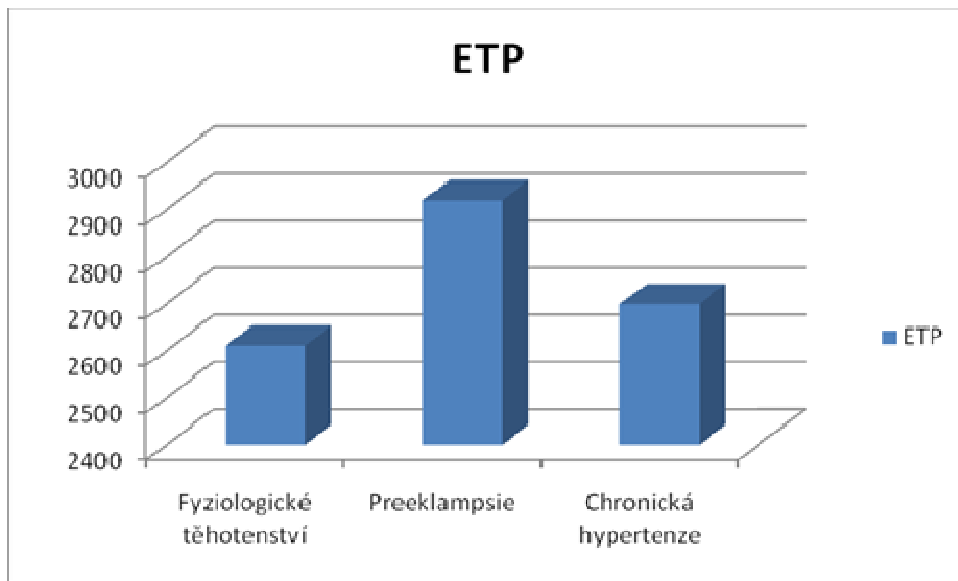
Tabulka č. 8 TGT u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze, srovnání ve III. trimestru.

	Fyziologické těhotenství	Preeklampsie	Chronická hypertenze
ETP	2611	2920	2700
Lag time	2,7	2,4	2,6
Peak	578	668	590

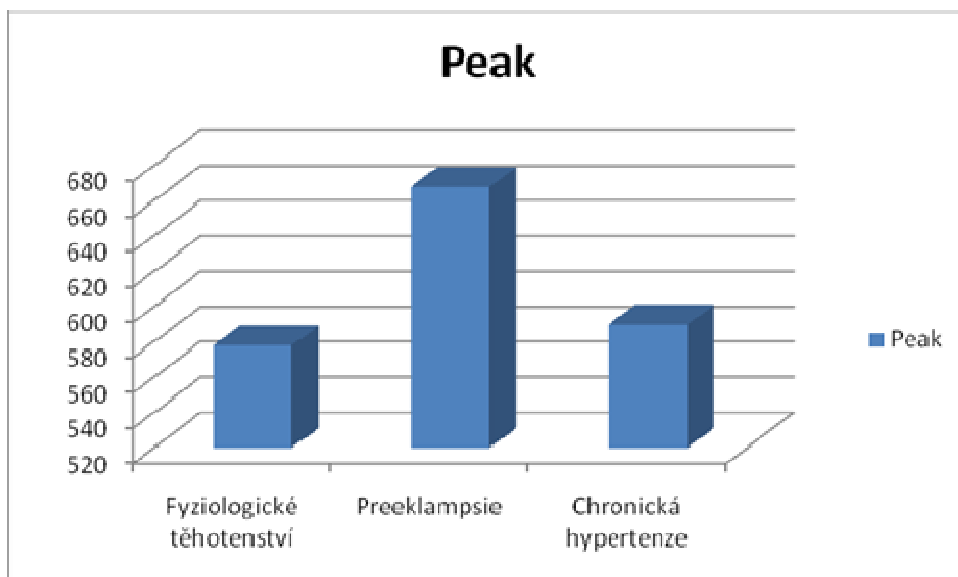
Graf č. 5 Lag time u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze: srovnání ve III. trimestru.



Graf č. 6 ETP u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze: srovnání ve III. trimestru.



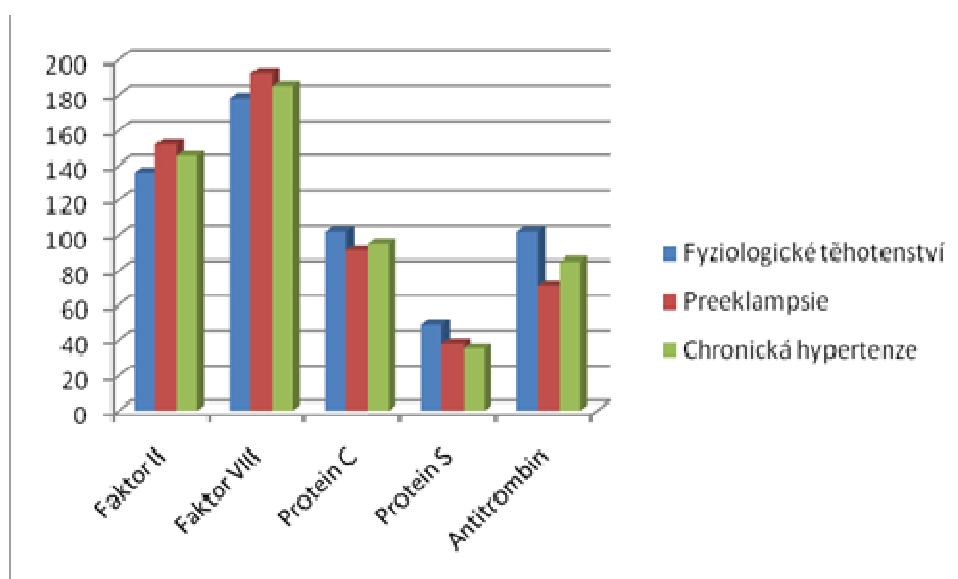
Graf č. 7 Peak u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze: srovnání ve III. trimestru.



Tabulka č. 9 Ostatní koagulační parametry u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze: srovnání ve III. trimestru.

	Faktor II	Faktor VIII	Protein C	Protein S	Antitrombin
Fyziologické těhotenství	136	178	102	49	102
Preeklampsie	152	193	91	38	71
Chronická hypertenze	145	185	95	35	85

Graf č. 8 Ostatní koagulační parametry u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze: srovnání ve III. trimestru.



Tabulka č. 10 Porovnání parametrů TGT v I. a II. trimestru u fyziologických gravidit a těhotenství, u nichž se ve třetím trimestru vyvinula preeklampsie /n=18/.

	<i>I. trimestr</i>		
	Fyziologická gravidita (medián)	Preeklampsie - medián	p<0,01
ETP	2010	2015	NS
Lag time	2,9	2,8	NS
Peak	451	462	NS

	<i>II. trimestr</i>		
	Fyziologická gravidita (medián)	Preeklampsie - medián	p<0,01
ETP	2250	2180	NS
Lag time	2,8	2,8	NS
Peak	522	510	NS

Ze tří hodnocených parametrů Lag time, ETP a Peak jsme zaznamenali signifikantní rozdíly při porovnání fyziologických těhotenství a těhotenství s preeklampií (tabulka č. 8 a graf 5-7) ve všech parametrech při statistické hladině $p<0,01$, u těhotenství s chronickou hypertenzí však tyto rozdíly statisticky významné nebyly. Zajímavé je porovnání 18 těhotných, u nichž se ve III. trimestru vyvinula preeklampsie, s hodnotami sledovaných parametrů v I. a II. trimestru s ostatními těhotnými s fyziologickou graviditou, kdy nebyly shledány statisticky signifikantní rozdíly. (tabulka č. 10). Výsledky svědčí pro aktivaci koagulace až v pozdních fázích těhotenství. Výsledky jsou však ovlivněny výraznou klinickou variabilitou onemocnění. U těžkých, resp. časných preeklampií tato aktivace i signifikantní

rozdíly nastupují podstatně dříve. Tyto změny v koagulačním systému jsou signálními procesy pro ischemické procesy porušení endotelu, jež následně aktivují další patofyziologické procesy.

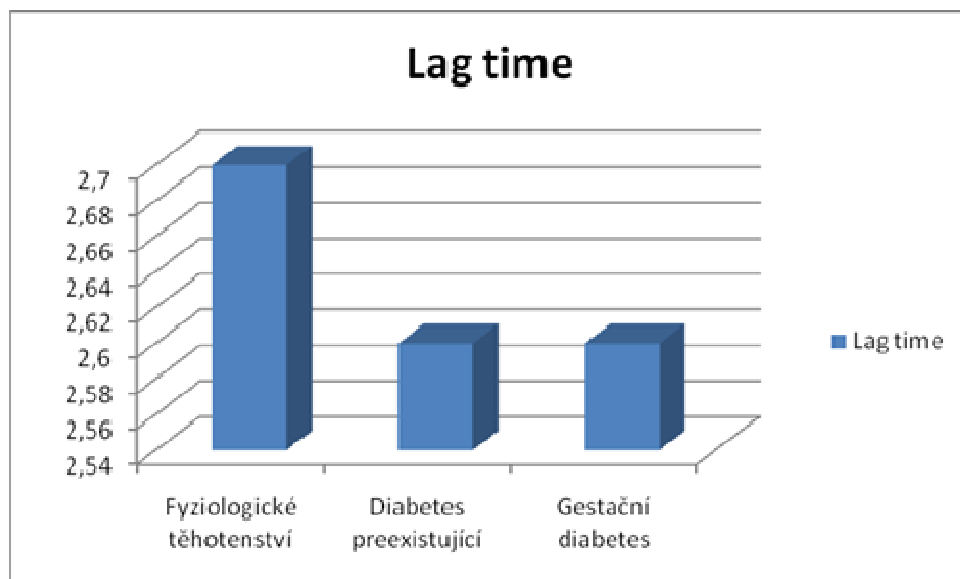
Příčina aktivace koagulace je komplexní. Z ostatních parametrů jsme při srovnání fyziologických těhotenství a těhotenství, u kterých se vyvinula preeklampsie ve III. trimestru zaznamenali významný vzestup faktorů II a VIII, pokles volného proteinu S i antitrombinu. ($p < 0,01$) U chronické hypertenze došlo k podobným změnám, výsledky však kromě proteinu S a antitrombinu nebyly statisticky významné.

Laboratorní hodnoty gestační diabetes mellitus a preexistující diabetes mellitus

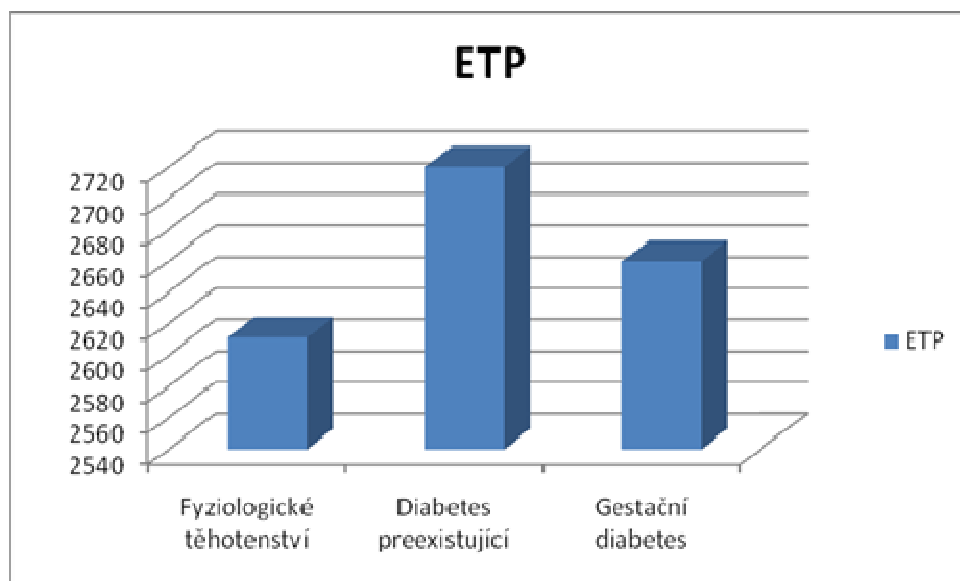
Tabulka č. 11 TGT u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem mellitem- III. trimestr.

	Fyziologické těhotenství	Diabetes preexistující	Gestační diabetes
ETP	2611	2720	2660
Lag time	2,7	2,6	2,6
Peak	578	585	563

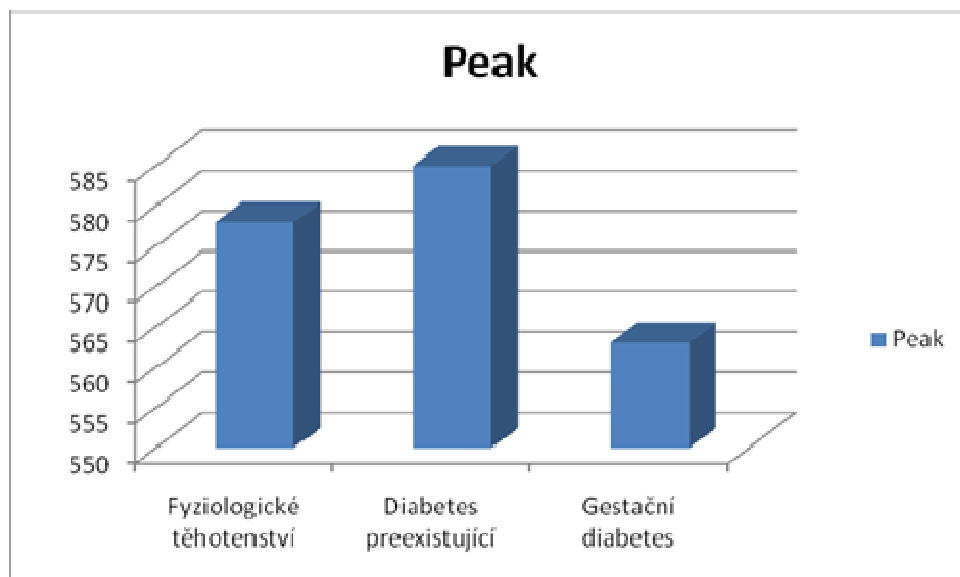
Graf č. 9 Lag time u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem.



Graf č. 10 ETP u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem.



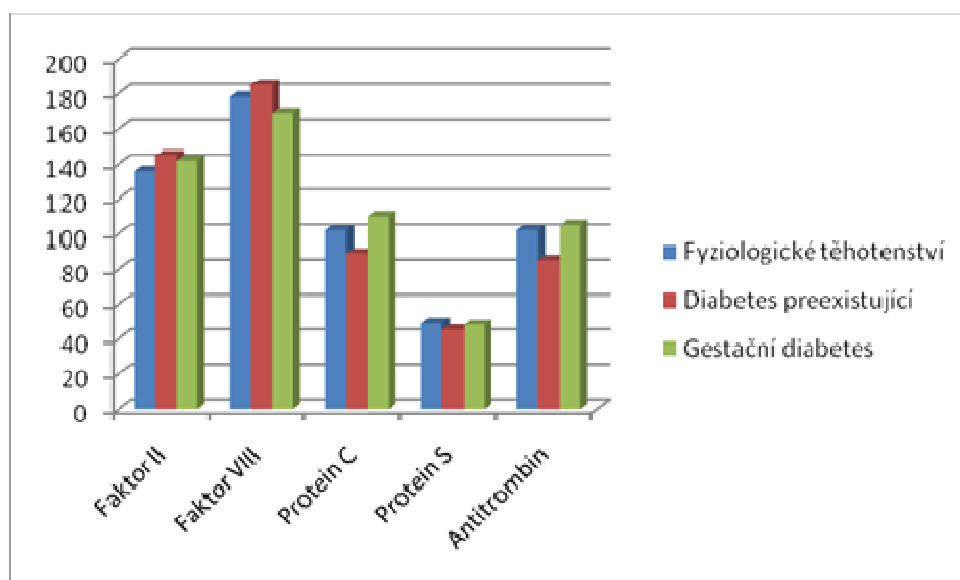
Graf č. 11 Peak u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem.



Tabulka č. 12 Ostatní koagulační parametry u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem.

	Faktor II	Faktor VIII	Protein C	Protein S	Antitrombin
Fyziologické těhotenství	136	178	102	49	102
Diabetes preexistující	145	185	89	45	85
Gestační diabetes	142	169	110	48	105

Graf. 12 Ostatní koagulační parametry u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem.



Při vyhodnocení parametrů TGT u těhotenství diabetiček jsme zaznamenali tendenci ke zkrácení Lag time, nárůstu ETP i Peak, rozdíly však nedosahovaly statisticky významných hodnot. U čtyř pacientek s gestačním diabetem došlo k rozvoji těžké preeklampsie. Při podrobnější analýze této podskupiny byly již rozdíly významné. Svědčí to o významnější podílu preeklampsie na celkové aktivaci koagulace. Při analýze ostatních koagulačních parametrů jsme našli signifikantní změny u těhotných s preexistujícím diabetem v porovnání s fyziologickými těhotnými u faktoru VIII, proteinu C a antitrombinu (tabulka č. 12 a graf č. 12).

14. Diskuze

Dobře fungující hemostáza závisí na vyvážené interakci mezi mnoha prokoagulačními a inhibičními faktory koagulačního a fibrinolytického systému. Během normálního těhotenství je tato rovnováha vychýlená na stranu hyperkoagulace. Tento rozdíl je ještě výraznější v období posledního trimestru a těsně po porodu. Návrat k úrovni před těhotenstvím trvá přibližně čtyři týdny. V těhotenství a především v peripartálním a postpartálním období je až 50- násobně zvýšené riziko VTE oproti netěhotné populaci (88).

Během těhotenství progresivně vzrůstá hladina faktorů VII, VIII, IX, X, XII, dále také stoupá hladina fibrinogenu a von Willebrandova faktoru, jehož hodnoty jsou na svém maximu v období kolem porodu (49)(89). Faktor V se zvyšuje v časně fázi těhotenství, s následným mírným poklesem a stabilizací úrovně v průběhu těhotenství, zatímco faktor XI v průběhu těhotenství klesá. U protrombinu (faktor II) bylo referováno jak progresivní zvýšení hladiny, tak statisticky bezvýznamné změny úrovně. U antikoagulačních faktorů, jako je antitrombin a protein C a které hrají kritickou roli během gravidity, zůstává hladina stabilní (49). Protein S je v plazmě přítomen ve dvou formách: funkční volný protein S a inaktivní protein S v komplexu s C4B vázícím proteinem. Během gravidity dochází k vzestupu C4B proteinu a postupnému poklesu volného proteinu S, což také může přispívat k vzniklému hyperkoagulačnímu stavu (49) (89).

Fibrinolýza je snižena, ale navrácí se k normálu krátce po porodu (49). Aktivita t-PA (tissue plasminogen activator) v graviditě klesá (49) (89). Příčinou této změny je jednak vzestup inhibitoru aktivátoru plasminogenu-1 (plasminogen activator inhibitor-1), ale hlavně vzestup inhibitoru aktivátoru plasminogenu-2 (plasminogen activator inhibitor-2), který je syntetizován placentou. Návrat k normálu nastává taktéž v poporodním období(49)(58).

Konvenční globální testy jako jsou protrombinový čas (PT) a aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) nezachycují odpovídajícím způsobem tento hyperkoagulační stav.

D- dimery jsou senzitivním, nikoli však specifickým markerem koagulace a následné fibrinolýzy. Od roku 1987, kdy byl poprvé popsán vzestup D- dimerů v graviditě, byly

v několika publikacích diskutovány rozdíly v hladině D-dimerů ve fyziologické a v rizikové graviditě (90) (91)(92)(93). Protrombinové fragmenty 1+2 (F1+2) a komplex trombin-antitrombin TAT jsou dalšími senzitivními i specifickými markery koagulace (89)(59). Protrombinové fragmenty 1+2 (F 1+2) jsou uvolňovány z protrombinu během aktivace faktorem Xa, proto F1+2 koncentrace je svým způsobem specifický indikátor vytvořeného množství trombinu a následně také senzitivní marker aktivace koagulace. Hladiny těchto působků kolísají s věkem, u žen v reprodukčním věku zůstávají konstantní. (94), ale během gravidity také stoupají (95) (96) (97).

Komplexy monomeru fibrinu (FMC) jsou používány k monitorování proteolytické aktivity při přeměně fibrinogenu trombinem na fibrin. Jsou proto také nepřímým markerem funkce trombinu (98) (99).

Další metodou, jak lze verifikovat generaci trombinu, je kalibrovaná automatická trombografie, která byla popsána Hemkerem (30). Výhoda této metody je, že vznik trombinu může být monitorován automaticky v cyklech až sto vzorků za hodinu. Výsledný trombogram zachycuje celý proces iniciace, amplifikace, propagace a ukončení koagulace. Vizuální výsledek, respektive plocha pod křivkou, představuje endogenní potenciál trombinu (ETP), který koreluje s hyperkoagulačními stavy a odhaluje individuální riziko vzniku hluboké žilní trombózy. ETP kvantifikuje enzymatickou aktivitu trombinu a umožňuje detekci vlivu jednotlivých prokoagulačních a antikoagulačních působků na tvorbu trombinu.

V prospektivní studii zaměřené na aktivaci koagulačního a fibrinolytického systému u zdravých těhotných prokázala Rosenkranz a kolektiv signifikantní nárůst endogenního potenciálu trombinu a také maximálních hodnot (Peak) tvorby trombinu v průběhu jednotlivých trimestrů (87), avšak čas do iniciace (Lag time) se v jednotlivých trimestrech statisticky nelišil. Podobné výsledky jsme zaznamenali i v naší studii. Z ostatních koagulačních parametrů jsme potvrdili signifikantní vzestup faktorů II a VIII a kontinuální pokles volného proteinu S.

V současné době stále, mimo několik málo publikovaných studií, přetrvává nedostatek dat týkající se generace trombinu v graviditě. V jedné ze studií bylo zdokumentováno, že ETP zůstává nezměněn během gravidity, při použití defibrinované plazmy a velmi vysokých hladin TF (100). V další studii byl prokázán signifikantní nárůst generace trombinu při použití CAT a TF 5pM (87). Dargaud a Joly

v svých studiích dokládají vzestup ETP a Peaku trombinu v časně graviditě (101) (88). Dle jejich výsledků, na rozdíl od našich, se zdá, že na začátku těhotenství dojde k vzestupu generace trombinu a v průběhu gravidity se jeho hodnoty již dále nemění, na rozdíl od ostatních markerů aktivace koagulace. Rozdílné výsledky jsou dány pravděpodobně rozdílnou metodikou, kdy např. ve studii Joly a kol. byl odebírán pouze jen jeden vzorek krve za těhotenství, nebyly tedy porovnány hodnoty generace trombinu během jednotlivých trimestrů.

Rosenkranz et al. prokázala ve své práci korelaci mezi parametry výsledků trombin generačního testu a elevací F1+2 a TAT (58).

Chowdary a kol. dokládají možnost lepšího monitorování pacientek léčených LMWH v graviditě při použití TGT, které odhalí poddávkové pacientky, běžně vyšetřované a sledované na základě hladin anti-Xa. Efektivita LMWH může být ovlivněna hyperkoagulačním stavem doprovázejícím graviditu. Anti-Xa nepřímo vyšetří hladinu LMWH, zatímco TGA spočívá v přímém vyšetření koagulační kapacity plazmy a zahrnuje jak farmakologické pro- a antikoagulanty, tak i ty přirozené (102).

Metoda vyšetření endogenního potenciálu trombinu byla využita rovněž k detekci hyperkoagulačního stavu u některých těhotenských patologií. Preeklampsie představuje multisystémové onemocnění, které se objevuje ve druhé polovině těhotenství a je charakterizováno abnormální cévní odpovědí na patologickou invazi trofoblastů. Zvýšený cévní odpor a dysfunkce endotelu jsou hlavním patofyziologickým důsledkem této abnormální placentace. Komplikace postihuje zhruba 2 – 7 % těhotných a je jednou z hlavních příčin mateřských úmrtí na celém světě. Ve srovnání s fyziologickým těhotenstvím dochází k ještě větší aktivaci hemostatického systému a to včetně zvýšené generace trombinu. V naší studii jsme porovnávali výsledky trombin generačního testu u skupiny těhotných s původně fyziologickým těhotenstvím, u nichž se vyvinula preeklampsie a také výsledky těhotných preeklampsiček zařazených až ve třetím trimestru. Rovněž jsme porovnávali výsledky testu u skupiny těhotných s chronickou formou hypertenze bez přítomnosti proteinurie. Ve shodě s literaturou jsme potvrdili signifikantně vyšší aktivaci generace trombinu u těhotných s preeklampsií (103). Lze tedy shrnout, že ve třetím trimestru v době manifestního onemocnění mají těhotné s preeklampsií signifikantně vyšší ETP v porovnání s fyziologickým těhotenstvím. Těhotné

s chronickou hypertenzí rovněž vykazují mírný nárůst aktivace trombinu, tyto výsledky však nejsou statisticky signifikantní. Vyšetření trombogramu v prvním a druhém trimestru u žen, u nichž se později vyvinula preeklampsie, nevykázalo statisticky významné rozdíly oproti vyšetření trombogramu u skupiny pacientek s fyziologickou graviditou, nelze jej tedy využít v tomto případě jako prediktivní, ale jako pouze vysoce specifický diagnostický test.

V recentní práci Ereze a kol. byla porovnána generace trombinu u žen s preeklampií, normálním těhotenstvím a těhotenstvím s malým plodem bez preeklampsie (SGA, small for gestational age). Výsledkem je zjištění, že pacientky s preeklampií mají delší čas nástupu generace trombinu a generují větší množství trombinu v porovnání se skupinou SGA, což je důležité při vyselektování skupiny pacientek profitujících z podání LMWH (104).

V souladu s literárními údaji jsme u žen s inzulín- dependentním diabetem prokázali aktivaci koagulace (71). Skupina s klinicky manifestním diabetem I. typu zahrnovala velmi heterogenní stadia onemocnění od velmi těžkých stavů s trváním základního onemocnění > 20 let až po těhotné s čerstvě diagnostikovaným diabetem. Při statistickém vyhodnocení lze v průměru u této skupiny pozorovat nárůst jak ETP, tak peaku. Při podrobnější analýze jednotlivých případů jsme však zjistili korelaci se stupněm cévního poškození, respektive délkou trvání onemocnění. U gestačních diabetiček rovněž došlo k mírnému nárůstu ETP a peaku. Vyhodnocení je však, jak jsme již uvedli ve výsledkové části, ovlivněno rozvojem preeklampsie u části těhotných z této skupiny. V literatuře je aktivace koagulace vysvětlována signifikantně nižší hladinou antitrombinu tento pokles je statisticky významný jak oproti netěhotným ženám, tak zdravým těhotným (71). V našem souboru jsme našli statisticky významný pokles AT u těhotných s preexistujícím diabetem mellitem ve srovnání s fyziologickou graviditou.

15. Závěr

Již dlouhá léta je snaha nahradit PT a APTT specifitějšími testy, které umožní přesnější monitorování hemokoagulačních poruch, trombotických komplikací. Jedním z těchto testů, který pomohl lepšímu pochopení koagulace v různých klinických podmínkách je TGT. TGT je potenciálně užitečným testem pro sledování a léčbu hemoragických onemocnění, jako je hemofilie, k monitoraci antikoagulační terapie, ke stanovení rizika rekurence VTE, čímž tento test umožňuje individualizaci antikoagulační terapie (105).

Klinická aplikace tohoto testu doposud naráží na problematiku standardizace a mezilaboratorní variability. Standardizace protokolu, reagensů a normalizace výsledků by mohla minimalizovat v budoucnosti tyto problémy.

Vyšetření trombogramu v prvním a druhém trimestru u žen, u nichž se později vyvinula preeklampsie, nevykázalo statisticky významné rozdíly oproti vyšetření trombogramu u skupiny pacientek s fyziologickou graviditou, nelze jej tedy využít v tomto případě jako prediktivní, ale jako pouze vysoce specifický diagnostický test.

Mezi ostatními koagulačními faktory jsme našli signifikantní vzestup faktorů II a VIII., pokles volného proteinu S i antitrombinu při srovnání fyziologických těhotenství a těhotenství, u kterých se vyvinula preeklampsie ve III. trimestru. Tyto změny jsme našli i ve skupině těhotných s preexistujícím diabetem mellitem v porovnání s fyziologickými těhotnými a to u faktoru VIII, proteinu C a antitrombinu.

16. Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek č. 1 Schéma zevního a vnitřního koagulačního systému.....	14
Obrázek č. 2 Schéma koagulace in vivo.....	16
Obrázek č. 3 Hemokoagulační procesy.....	18
Obrázek č. 4 Centrální role trombinu v hemostáze.....	26
Obrázek č. 5 Základní generační křivky trombinu.....	30
Tabulka č.1 Endotelové faktory modulující hemostázu.....	12
Tabulka č. 2 Změny hemostázy v graviditě.....	39
Tabulka č. 3 Počty pacientek zařazených do studie v jednotlivých kategoriích.....	57
Tabulka č. 4 Parita pacientek v jednotlivých kategoriích.....	58
Tabulka č. 5 Gestační věk a parametry matek a plodů.....	58
Tabulka č. 6 Porovnání analýzy trombin generačního testu v jednotlivých trimestrech u fyziologické gravidity.....	59
Tabulka č. 7 Koagulační parametry v jednotlivých trimestrech.....	61
Tabulka č. 8 TGT u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze srovnání ve III. trimestru.....	62
Tabulka č. 9 Ostatní koagulační parametry u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze srovnání ve III. trimestru	64
Tabulka č. 10 Porovnání parametrů TGT u fyziologických gravidit a těhotenství u nichž se ve III. trimestru vyvinula preeklampsie /n= 18/.....	65
Tabulka č. 11 TGT u fyziologických gravidit a těhotenství s diabetem.....	66
Taulka č. 12 Ostatní koagulační parametry u fyziologických gravidit a těhotenství s diabetem.....	68
Graf č. 1 Lag time u fyziologické gravidity.....	59
Graf č. 2 ETP u fyziologické gravidity.....	60
Graf č. 3 Peak u fyziologické gravidity.....	60
Graf č. 4 Koagulační parametry v jednotlivých trimestrech.....	61
Graf č. 5 Lag time u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze srovnání ve III. trimestru.....	62

Graf č. 6 ETP u fyziologické gravidity preeklampsie a chronické hypertenze srovnání ve III. trimestru.....	63
Graf č. 7 Peak u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze srovnání ve III. trimestru.....	63
Graf č. 8 Ostatní koagulační parametry u fyziologické gravidity, preeklampsie a chronické hypertenze srovnání ve III. trimestru.....	64
Graf č. 9 Lag time u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem.....	66
Graf č. 10 ETP u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem.....	67
Graf č. 11 Peak u fyziologické gravidity a těhotenství s diabetem.....	67
Graf č. 12 Ostatní koagulační parametry u fyziologických gravidit a těhotenství s diabetem.....	68

17. Souhrn

17.1. Cíl práce

Cílem vlastního výzkumného projektu byla analýza dynamiky změn přímé generace trombinu u zdravých těhotných v průběhu jednotlivých trimestrů v porovnání s těhotnými léčenými pro chronickou hypertenzi, diabetes mellitus a preeklampsii. Trombin generační test byl vybrán pro svou centrální roli v procesu koagulace. Jeho změny v průběhu těhotenství by mohly lépe zachytit již známé posuny v hemostáze související s probíhajícím těhotenstvím.

17.2 Typ studie

Prospektivní studie

17.3. Klíčová slova

Trombin generační test, hemostáza, těhotenství, preeklampsie, hypertenze, diabetes mellitus.

17.4. Metodika

17.4.1. Zařazení pacientek

Soubor tvořily jak zdravé těhotné ženy, zařazené do první skupiny a prospektivně sledované v poradně pro fyziologickou graviditu na Porodnicko-gynekologické klinice FN Olomouc, tak ženy s rizikovými faktory (hypertenze, diabetes mellitus) a dále těhotné, u kterých se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie a nebo gestační diabetes. Tyto ženy byly zařazené do druhé skupiny a sledovány v poradně pro rizikovou graviditu na Porodnicko- gynekologické klinice FN Olomouc.

Všechny pacientky podepsaly před zařazením do studie informovaný souhlas. První odběr venózní krve probíhal na začátku gravidity, do konce I. trimestru, v době standardních těhotenských odběrů. Druhý odběr jsme prováděli v období mezi 24. -

28. týdnem, třetí vzorek potom mezi 36. - 40. týdnem. Získané krevní vzorky byly následně zpracovány v koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc. Z krevních vzorků jsme vyšetřovali protein C a S, antitrombin, FVIII a FII. Generace trombinu byla stanovována trombin generačním testem.

17.4.2. Laboratorní vyšetření

V koagulační laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc byly vyšetřeny dále uvedené parametry následujícími technikami: Generace trombinu byla stanovována plně automaticky pomocí kitu (Technothrombin TGA, Technoclone, Vienna, Austria) a analyzátoru Ceveron Alpha (Technoclone, Vienna, Austria). Vyšetření proteinu C, proteinu S, faktoru II a VIII a antitrombinu bylo provedeno podle standardizovaných protokolů dle SOP FNOI.

17.5. Výsledky

V období let 2008-2011 byly analyzovány krevní vzorky celkem 303 zdravých těhotných zařazených do první skupiny. Tyto těhotné měly negativní osobní a rodinnou anamnézu. Z celkového počtu 303 žen se u 18 (6%) vyvinul lehký až středně těžký stupeň preeklampsie nebo HELLP syndrom s různou tíží klinické manifestace. 20 rodiček (6,6%) porodilo předčasně a nebyl u nich proveden odběr ve III. trimestru. 3 těhotenství (0,9%) byla ukončena z genetické indikace pro vrozenou vadu plodu. Kompletní protokol studie (odběry ve všech třech trimestrech) tedy absolvovalo 280 těhotných.

Ve druhé skupině jsme vyšetřili v jednotlivých trimestrech celkem 108 žen. 85 těhotných žen s rizikovými faktory bylo vyšetřeno ve všech trimestrech (15 těhotných s chronickou hypertenzí, 40 gestačních diabetiček a 30 těhotných žen s diabetem I. typu) a dále bylo do studie zařazeno 23 rodiček až v průběhu III. trimestru při manifestaci preeklampsie

Výsledky souboru fyziologická gravidita

Lag time zůstává po celou dobu těhotenství stabilní a výsledky, resp. rozdíly nejsou statisticky signifikantní. ETP odpovídající množství aktivovaného trombinu v průběhu

těhotenství roste. Signifikantní nárůst jsme pozorovali v rozdílech mezi I. a III. trimestrem. Podobně Peak, neboli maximální hodnota koncentrace trombinu vytváří signifikantní rozdíl mezi I. a III. trimestrem. ETP a Peak tedy v průběhu těhotenství signifikantně narůstají, Lag time se nemění.

Pozorovali jsme signifikantní nárůst faktoru II a VIII a dále pokles volného proteinu S. U proteinu C a antitrombinu nedošlo k signifikantním změnám.

Výsledky souboru preeklampsie a chronická hypertenze

Z hodnocených parametrů Lag time, ETP a Peak jsme zaznamenali signifikantní rozdíly při porovnání fyziologických těhotenství a těhotenství s preeklampií při statistické hladině $p < 0,01$ u ETP a Peak. U těhotenství s chronickou hypertenzí však tyto rozdíly významné nebyly. Zajímavé je porovnání 18 těhotných, u nichž se ve III. trimestru vyvinula preeklampsie. Při porovnání výsledků TGT této skupiny pacientek v I. a II. trimestru, s ostatními těhotnými s fyziologickou graviditou nebyly prokázány statisticky významné rozdíly. Ve III. trimestru došlo naopak ke statisticky významnému vzestupu faktorů II a VIII, poklesu volného proteinu S i antitrombinu. U chronické hypertenze došlo k podobným změnám, výsledky však kromě proteinu S a antitrombinu nebyly statisticky významné.

Tyto výsledky svědčí pro aktivaci koagulace až v pozdních fázích těhotenství. Výsledky jsou však ovlivněny výraznou klinickou variabilitou onemocnění. U těžkých, resp. časných preeklampií tato aktivace i signifikantní rozdíly mohou nastupovat podstatně dříve.

Výsledky souboru preexistující diabetes a gestační diabetes

Při vyhodnocení parametrů TGT u těhotenství diabetiček jsme zaznamenali zkrácení Lag time, nárůst ETP i Peak oproti skupině těhotných žen s fyziologickou graviditou, rozdíly však nedosahovaly statisticky významných hodnot. U čtyř pacientek s gestačním diabetem došlo k rozvoji těžké preeklampsie. Při podrobnější analýze této podskupiny byly již rozdíly významné. Svědčí to o významnějším podílu preeklampsie na celkové aktivaci koagulace. Při analýze ostatních koagulačních

parametrů jsme našli signifikantní změny pouze ve skupině těhotných s preexistujícím diabetem mellitem a to u faktoru VIII, proteinu C a antitrombinu.

17.6. Závěr

Trombin generační test je užitečným nástrojem a indikátorem celkového koagulačního potenciálu plazmy. V průběhu těhotenství dochází k signifikantním změnám v generaci trombinu a tyto změny jsou nejvýraznější ve III. trimestru gravidity a u pacientek s preeklampsií. Vyšetření trombogramu v I. a II. trimestru u těhotných žen, u nichž se později vyvinula preeklampsie však nevykázalo statisticky významný rozdíl oproti ženám s fyziologickým průběhem těhotenství. Vzhledem k tomu, že k signifikantním změnám dochází až ve III. trimestru, nelze jej tedy využít v tomto případě jako prediktivní, ale pouze jako diagnostický test.

18. Summary

18.1. Aim of the study

The aim of the research project was to analyze the changes in thrombin in healthy pregnancies during each trimester compared to pregnant women treated for chronic hypertension, diabetes mellitus and preeclampsia. The thrombin generation test was chosen for its central role in the coagulation process. Its changes during pregnancy could better capture the already known shifts in hemostasis associated with ongoing pregnancy.

18.2. Type of the study

Prospective study

18.3. Key words

Thrombin generation test, hemostasis, pregnancy, preeclampsia, hypertension, diabetes mellitus.

18.4. Materials and methods

First group consisted of healthy women, prospectively followed up in a counseling center for pregnancy in the University Hospital Olomouc.

The second group included patients with known risk factors: hypertension, gestational diabetes, type 1 diabetes.

A venous blood sample was taken in the 1st trimester, 2nd trimester (between 24-28th week) and 3rd trimester (between 36th- 40th week).

All patients signed an informed consent before enrollment to the study.

The blood samples were examined in the coagulation laboratory of the Hemato-oncological Clinic of the University Hospital Olomouc. The following parameters were examined in the coagulation laboratory of the Department of Hematology of the

Faculty Hospital and Faculty of Medicine, Palacký University in Olomouc: Thrombin generation was determined fully automatically using a kit (Technothrombin TGA, Technoclone, Vienna, Austria) and a Ceveron Alpha analyzer (Technoclone, Vienna, Austria). Protein C, Protein S, F II, F VIII and Antithrombin was examined by standardized protocol SOP FNOI.

18.5. Results

In the period 2008-2011, blood samples from 303 healthy pregnant women were analyzed. The patients in this group had a negative personal and family history. Of the total number of 303 women, a mild to moderate degree of preeclampsia or HELLP syndrome with varying severity of clinical manifestations were developed in 18 women (6%). 20 mothers (6.6%) gave birth prematurely before the 37th week of pregnancy. 3 pregnancies (0.9%) were terminated from the genetic indication. Thus, the complete study protocol (sampling in all three trimesters) was completed by 280 pregnant women.

In the second group, 15 pregnant women with chronic hypertension, 40 pregnant women with gestational diabetes mellitus and 30 pregnant women with type I diabetes melitus. 23 mothers were enrolled in 3rd trimester do to manifestation of preeclampsia.

Results of group I: women with normal pregnancy

Lag time remains stable throughout pregnancy and the differences are not statistically significant. ETP (endogenous thrombin potential or area under the curve) corresponding amount of activated thrombin increases during pregnancy. A significant increase was observed between 1st and 3rd trimester. Peak (maximum thrombin concentration) shows a significant difference between 1st and 3rd trimester. Thus, ETP and Peak increase significantly during pregnancy, Lag time does not change. We observed a significant increase in factor II and VIII. and, further, the decrease in free S protein. The changes in protein C and Antithrombin was not significant.

Results of women with preeclampsia and chronic hypertension

In Lag time, ETP and Peak parameters we observed statistically significant changes when comparing physiological pregnancies and pregnancies with preeclampsia at a statistical level $p < 0.01$. On the other hand, the changes between physiological pregnancies and pregnancies with chronic hypertension were not significant.

18 pregnant women, who developed preeclampsia in the 3rd trimester did not show statistically significant changes in TGT in the 1st and 2nd trimester in comparison with physiological pregnancies. In the contrary in the 3rd trimester, there was a significant increase in factors II and VIII, decrease in free protein S and antithrombin. Similar changes occurred in pregnancies with chronic hypertension, but the results were not statistically significant except for protein S and antithrombin. However, the results are influenced by significant clinical variability of the disease. For early preeclampsia, this activation and significant changes in TGT could occur earlier. The results thus suggest activation of coagulation only in the late stages of pregnancy.

Results of women with gestational diabetes and type I diabetes

When evaluating TGT parameters in pregnant women with diabetes, Lag time was shortened, ETP and Peak increased, however, the differences did not reach statistically significant values. Four patients with gestational diabetes developed preeclampsia. In a more detailed analysis of this subgroup, changes were already significant. This suggests a more significant proportion of preeclampsia in overall coagulation activation. When analyzing other coagulation parameters, we found significant changes in pregnant women with preexisting type I diabetes compared to physiological pregnancies in factor VIII, protein C and antithrombin.

18.6. Conclusion

Thrombin generation test is a useful tool and indicator of total plasma coagulation potential. Significant changes in TGT occur during the pregnancy and the most significant changes develop in the 3rd trimester. This significant changes can be also seen in the group of patients with preeclampsia. The examination of thrombogram in pregnant women in 1st and 2nd trimester, who later developed preeclampsia did not

show a statistically significant changes and therefore this test cannot be used as a predictive, but only as a diagnostic test.

20. Literatura

Literatura byla vytvořena pomocí citačního programu Citace PRO v normě ČSN ISO 690 (číslování)

- (1) PENKA, Miroslav, Igor PENKA a Jaromír GUMULEC. *Krvácení*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0689-4.
- (2) VAN GEFFEN, Mark a Waander L. VAN HEERDE. Global haemostasis assays, from bench to bedside. *Thrombosis Research*. 2012, **129**(6), 681-687. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.12.006. ISSN 00493848. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384811006566>
- (3) PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu*. 1. Český Těšín: Finidr, 2004, s. 131-136. ISBN 80-86682-03-x.
- (4) PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu*. 1. Český Těšín: Finidr, 2004, s. 56. ISBN isbn80-86682-03-x.
- (5) LEVI, M, C E HACK, J P DE BOER, D P BRANDJES, H R BÜLLER a J W TEN CATE. Reduction of contact activation related fibrinolytic activity in factor XII deficient patients. Further evidence for the role of the contact system in fibrinolysis in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 1991, **88**(4), 1155-1160. DOI: 10.1172/JCI115416. ISSN 0021-9738. Dostupné také z:
<http://www.jci.org/articles/view/115416>
- (6) FABER, E. Základy hematologické diagnostiky. *Základy hematologické diagnostiky*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012, s. 47-50. ISBN 978-80-244-2935-9.
- (7) ANTOVIC, Aleksandra. The Overall Hemostasis Potential: A Laboratory Tool for the Investigation of Global Hemostasis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2010, **36**(07), 772-779. DOI: 10.1055/s-0030-1265294. ISSN 0094-6176. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1265294>
- (8) HLUŠÍ, A, V SLAVÍK, V KKRČOVÁ a K INDRÁK. Globální hodnocení funkce hemostázy – část I. Trombin generační test. *Transfuze Hematol. dnes*. 2010, **16**(2), 65-70.
- (9) SCHMIDT, Alexander. Neue Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. *Pflüger, Archiv für die Gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere*. 1872, **6**(1), 413-538. DOI: 10.1007/BF01612263. ISSN 0031-6768. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/BF01612263>
- (10) MANN, Kenneth G. Thrombin Formation. *Chest*. 2003, **124**(3), 4-10. DOI: 10.1378/chest.124.3_suppl.4S. ISSN 00123692. Dostupné také z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369215317529>

- (11) ROYLE, N. J., D. M. IRWIN, M. L. KOSCHINSKY, R. T. A. MACGILLIVRAY a J. L. HAMERTON. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11?q12 and 3q21?24, respectively. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 1987, **13**(3), 285-292. DOI: 10.1007/BF01535211. ISSN 0740-7750. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01535211>
- (12) PINEDA, Agustin O., Zhi-Wei CHEN, Sonia CACCIA, Angelene M. CANTWELL, Savvas N. SAVVIDES, Gabriel WAKSMAN, F. Scott MATHEWS a Enrico DI CERA. The Anticoagulant Thrombin Mutant W215A/E217A Has a Collapsed Primary Specificity Pocket. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**(38), 39824-39828. DOI: 10.1074/jbc.M407272200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M407272200>
- (13) CRISTOFARO, Raimondo, Andrea CAROTTI, Sepideh AKHAVAN, Roberta PALLA, Flora PEYVANDI, Cosimo ALTOMARE a Pier Mannuccio MANNUCCI. The natural mutation by deletion of Lys9 in the thrombin A-chain affects the pKa value of catalytic residues, the overall enzyme's stability and conformational transitions linked to Na binding. *FEBS Journal*. 2006, **273**(1), 159-169. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.05052.x. ISSN 1742-464X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2005.05052.x>
- (14) DI CERA, Enrico, Michael J. PAGE, Alaji BAH, Leslie A. BUSH-PELC a Laura C. GARVEY. Thrombin allostery. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2007, **9**(11). DOI: 10.1039/b616819a. ISSN 1463-9076. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b616819a>
- (15) MARAGOUDAKIS, Michael E. a Nikos E. TSOPANOGLIOU. *Thrombin: physiology and disease*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-09636-0.
- (16) HEMKER, H. Coenraad, Peter GIESEN, Raed AL DIERI, Véronique REGNAULT, Eric DE SMEDT, Rob WAGENVOORD, Thomas LECOMPTE a Suzette BÉGUIN. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003, **33**(1), 4-15. DOI: 10.1159/000071636. ISSN 1424-8832. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/71636>
- (17) TEN CATE, Hugo. Thrombin generation in clinical conditions. *Thrombosis Research*. 2012, **129**(3), 367-370. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.10.017. ISSN 00493848. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384811005573>
- (18) MOSESSON, MW a M KAMINSKI. The acceleratory effect of thrombin on fibrin clot assembly: Mosesson MW1, Kaminski M. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1990, **1**(5), 475-8. ISSN 0957-5235.
- (19) MACFARLANE, RG a R BIGGS. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol*. 1953, **6**(1), 3-8.
- (20) HEMKER, H, S WIELDERS, H KESSELS a S BÉGUIN. Continuous Registration of Thrombin Generation in Plasma, Its Use for the Determination of the Thrombin Potential. *Thrombosis and Haemostasis*. 2018, **69**(04), 617-624. DOI: 10.1055/s-0038-1649638. ISSN 0340-6245. Dostupné

také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1649638>

- (21) DOUGLAS, Stuart. COAGULATION HISTORY, OXFORD 1951-53. *British Journal of Haematology*. 1999, **107**(1), 22-32. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1999.01689.x. ISSN 0007-1048. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.1999.01689.x>
- (22) HEMKER, HC a S BÉGUIN. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost*. 1995, **74**(1), 134-8.
- (23) VAN VEEN, J. J., A. GATT, P. C. COOPER, S. KITCHEN a M. MAKRIS. Between-batch variation of calibrator activity can significantly influence fluorogenic measurement of thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006, **4**(11), 2514-2516. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02168.x. ISSN 15387933. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2006.02168.x>
- (24) VAN VEEN, Joost J, Alex GATT, Peter C COOPER, Steven KITCHEN, Annette E BOWYER a Mike MAKRIS. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2008, **19**(3), 183-189. DOI: 10.1097/MBC.0b013e3282f4bb47. ISSN 0957-5235. Dostupné také z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001721-200804000-00001>
- (25) LEWIS, S. J., E. STEPHENS, G. FLOUROU, N. J. MACARTNEY, L. S. HATHAWAY, J. KNIPPING a P. W. COLLINS. Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *British Journal of Haematology*. 2007, **138**(6), 775-782. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06722.x. ISSN 00071048. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2007.06722.x>
- (26) CHANTARANGKUL, V, M CLERICI, C BRESSI, PL GIESEN a A TRIPODI. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*. 2003, **88**(1), 547-554. ISSN 0390-6078.
- (27) HEMKER, H.C., P. GIESEN, R. ALDIERI, V. REGNAULT, E. DE SMED, R. WAGENVOORD, T. LECOMPTE a S. BÉGUIN. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2002, **32**(5-6), 249-253. DOI: 10.1159/000073575. ISSN 1424-8832. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/73575>
- (28) HEMKER, H, G WILLEMS a S BÉGUIN. A Computer Assisted Method to Obtain the Prothrombin Activation Velocity in Whole Plasma Independent of Thrombin Decay Processes. *Thrombosis and Haemostasis*. 2018, **56**(01), 009-017. DOI: 10.1055/s-0038-1661594. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1661594>
- (29) HC, Hemker, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R a Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*. 2000 Apr;**83**(4):322. 2000,

834(322), 589-91.

- (30) HEMKER, H., Raed AL DIERI, Erik DE SMEDT a Suzette BÉGUIN. Thrombin generation, a function test of the haemostatic thrombotic system. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **96**(11), 553-561. DOI: 10.1160/TH06-07-0408. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH06-07-0408>
- (31) VARADI, K., P. L. TURECEK a H. P. SCHWARZ. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy. *Haemophilia*. 2004, **10**(2), 17-21. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2004.00936.x. ISSN 1351-8216. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2516.2004.00936.x>
- (32) HRON, Gregor, Marietta KOLLARS, Bernd R. BINDER, Sabine EICHINGER a Paul A. KYRLE. Identification of Patients at Low Risk for Recurrent Venous Thromboembolism by Measuring Thrombin Generation. *JAMA*. 2006, **296**(4), 397-402. DOI: 10.1001/jama.296.4.397. ISSN 0098-7484. Dostupné také z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.296.4.397>
- (33) GEROTZAFAS, Grigoris T, François DEPASSE, Joël BUSSON, Lena LEFLEM, Ismail ELALAMY a Meyer M SAMAMA. Towards a standardization of thrombin generation assessment: The influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thrombosis Journal*. 2005, **3**(1), 1-11. DOI: 10.1186/1477-9560-3-16. ISSN 14779560. Dostupné také z: <http://thrombosisjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-9560-3-16>
- (34) VAN HYLCKAMA VLIEG, A., S. C. CHRISTIANSEN, R. LUDDINGTON, S. C. CANNEGIETER, F. R. ROSENDAAL a T. P. BAGLIN. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *British Journal of Haematology*. 2007, **138**(6), 769-774. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06738.x. ISSN 00071048. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2007.06738.x>
- (35) REGNAULT, Véronique, Suzette BÉGUIN a Thomas LECOMPTE. Calibrated Automated Thrombin Generation in Frozen-Thawed Platelet-Rich Plasma to Detect Hypercoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003, **33**(1), 23-29. DOI: 10.1159/000071638. ISSN 1424-8832. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/71638>
- (36) TRIPODI, Armando, Massimo PRIMIGNANI, Veena CHANTARANGKUL, Ylenia VISCARDI, Alessandra DELL'ERA, Federica M. FABRIS a Pier Mannuccio MANNUCCI. The coagulopathy of cirrhosis assessed by thromboelastometry and its correlation with conventional coagulation parameters. *Thrombosis Research*. 2009, **124**(1), 132-136. DOI: 10.1016/j.thromres.2008.11.008. ISSN 00493848. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384808005422>
- (37) TRIPODI, Armando, Francesco SALERNO, Veena CHANTARANGKUL, Marigrazia CLERICI, Massimo CAZZANIGA, Massimo PRIMIGNANI a Pier MANNUCCI MANNUCCI. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests.

Hepatology. 2005, **41**(3), 553-558. DOI: 10.1002/hep.20569. ISSN 0270-9139. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20569>

- (38) VILLA, Erica, Calogero CAMMÀ, Marco MARIETTA et al. Enoxaparin Prevents Portal Vein Thrombosis and Liver Decompensation in Patients With Advanced Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2012, **143**(5), 1253-12604. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.07.018. ISSN 00165085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508512010116>
- (39) DARGAUD, Yesim, Suzette BÉGUIN, Anne LIENHART, Raed AL DIERI, Christine TRZECIAK, Jean BORDET, Coenraad HEMKER a Claude NEGRIER. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **93**(03), 475-480. DOI: 10.1160/TH04-10-0706. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH04-10-0706>
- (40) SANTAGOSTINO, E., M. E. MANCUSO, A. TRIPODI, V. CHANTARANGKUL, M. CLERICI, I. GARAGIOLA a P. M. MANNUCCI. Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010, **8**(4), 737-743. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03767.x. ISSN 15387933. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2010.03767.x>
- (41) TRIPODI, A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*. 2016, **62**(5), 699-707. DOI: 10.1373/clinchem.2015.248625. ISSN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2015.248625>
- (42) EICHINGER, S., G. HRON, M. KOLLARS a P. A. KYRLE. Prediction of Recurrent Venous Thromboembolism by Endogenous Thrombin Potential and D-Dimer. *Clinical Chemistry*. 2008, **54**(12), 2042-2048. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112243. ISSN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.112243>
- (43) ZOTZ, Rainer, Beate MARUHN-DEBOWSKI a Rüdiger SCHARF. Mutation in the Gene Coding for Coagulation Factor V and Resistance to Activated Protein C: Detection of the Genetic Mutation by Oligonucleotide Ligation Assay Using a Semi-automated System. *Thrombosis and Haemostasis*. 2018, **75**(01), 053-055. DOI: 10.1055/s-0038-1650521. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1650521>
- (44) GESSONI, G., S. VALVERDE a F. MANONI. Comparison between two functional assays to detect factor V Leiden. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2010, **32**(11), 188-189. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2009.01144.x. ISSN 17515521. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-553X.2009.01144.x>
- (45) TIRADO, Isabel, José MATEO, José SORIA et al. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **93**(03), 468-474. DOI: 10.1160/TH04-04-0251. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH04-04-0251>

- (46) SLAVÍK, L a J ÚLEHLOVÁ. Diagnostika trombofilií ve světle moderních metod. *Laboratorní technologie* [online]. 2013, **1**(1), 7-12 [cit. 2019-02-08]. Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/12013/lab01.pdf>
- (47) VLK, Radovan, Martin PROCHÁZKA, Ondřej ŠIMETKA a Petr JANKŮ. *Preeklampsie*. 1. Praha: Maxdorf, 2015, s. 54-61. Jessenius. ISBN 978-80-7345-460-9.
- (48) HELLGREN, M. a M. BLOMBÄCK. Studies on Blood Coagulation and Fibrinolysis in Pregnancy, during Delivery and in the Puerperium. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 1981, **12**(3), 141-154. DOI: 10.1159/000299596. ISSN 1423-002X. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/299596>
- (49) BRENNER, Benjamin. Haemostatic changes in pregnancy. *Thrombosis Research*. 2004, **114**(5-6), 409-414. DOI: 10.1016/j.thromres.2004.08.004. ISSN 00493848. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384804004475>
- (50) CLARK, P., J. BRENNAND, J. A. CONKIE, F. MCCALL, I. A. GREER a Isobel WALKER. Activated Protein C Sensitivity, Protein C, Protein S and Coagulation in Normal Pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **79**(06), 1166-1170. DOI: 10.1055/s-0037-1615035. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1615035>
- (51) CERNECA, Federico, Giuseppe RICCI, Roberto SIMEONE, Monica MALISANO, Salvatore ALBERICO a Secondo GUASCHINO. *Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis*. 1997, **73**(1), 31-36. DOI: 10.1016/S0301-2115(97)02734-6. ISSN 03012115. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211597027346>
- (52) SATTAR, Naveed, Ian GREER, Ann RUMLEY, Grace STEWART, James SHEPHERD, Chris PACKARD a Gordon LOWE. A Longitudinal Study of the Relationships between Haemostatic, Lipid, and Oestradiol Changes during Normal Human Pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **81**(01), 71-75. DOI: 10.1055/s-0037-1614421. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1614421>
- (53) U, Kjellberg, Andersson NE a Rosén S. APC resistance and other haemostatic variables during pregnancy and puerperium. *Thromb Haemost*. 1999, **1**(81), 527-531.
- (54) BELLART, Jordi, Rosa GILABERT, Jordi FONTCUBERTA, Elena CARRERAS, Ramón MIRALLES a Lluís CABERO. Coagulation and Fibrinolysis Parameters in Normal Pregnancy and in Gestational Diabetes. *American Journal of Perinatology*. 1998, **15**(08), 479-486. DOI: 10.1055/s-2007-994069. ISSN 0735-1631. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-994069>
- (55) GATTI, L., P. M. TENCONI, D. GUARNERI, C. BERTULESSI, M. W. OSSOLA, P. BOSCO a G. A. GIANOTTI. *Hemostatic parameters and platelet activation by flow-cytometry in normal pregnancy: a longitudinal study*. 1994, **24**(4), 217-219. DOI: 10.1007/BF02592466. ISSN 0940-

5437. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02592466>

- (56) MOERLOOSE, de, N. MERMILLOD, J. AMIRAL a G. REBER. Thrombomodulin Levels during Normal Pregnancy, at Delivery and in the Postpartum: Comparison with Tissue-type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **79**(03), 554-556. DOI: 10.1055/s-0037-1614943. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1614943>
- (57) NAKASHIMA, Akira, Takao KOBAYASHI a Toshihiko TERAO. Fibrinolysis during Normal Pregnancy and Severe Preeclampsia Relationships between Plasma Levels of Plasminogen Activators and Inhibitors. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 1996, **42**(2), 95-101. DOI: 10.1159/000291899. ISSN 1423-002X. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/291899>
- (58) ROSENKRANZ, Andrea, Michael HIDEN, Bettina LESCHNIK, Weiss EVA-CHRISTINE, Dietmar SCHLEMBACH, Uwe LANG, Siegfried GALLISTL a Wolfgang MUNTEAN. Calibrated automated thrombin generation in normal uncomplicated pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **99**(02), 331-337. DOI: 10.1160/TH07-05-0359. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH07-05-0359>
- (59) DARGAUD, Yesim, Stephanie HIERO, Lucia RUGERI, Catherine BATTIE, Pascal GAUCHERAND, Claude NEGRIER a Christine TRZECIAK. Endogenous thrombin potential, prothrombin fragment 1 2 and D-dimers during pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **103**(02), 469-471. DOI: 10.1160/TH09-10-0679. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH09-10-0679>
- (60) CM, Pettker a Lockwood CJ. Pathophysiology and diagnosis of thromboembolic disorders in pregnancy. *Management of high-risk pregnancy: an evidence-based approach*. 5th ed. Oxford: Blackwell Pub., 2007, s. 133-141. ISBN 978-1405127820.
- (61) TOGLIA, Marc R. a John G. WEG. Venous Thromboembolism during Pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 1996, **335**(2), 108-114. DOI: 10.1056/NEJM199607113350207. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199607113350207>
- (62) JAMES, Andra H., Margaret G. JAMISON, Leo R. BRANCAZIO a Evan R. MYERS. Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: Incidence, risk factors, and mortality. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006, **194**(5), 1311-1315. DOI: 10.1016/j.ajog.2005.11.008. ISSN 00029378. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293780502452X>
- (63) EZE, Augustine R., Anthony J. COMEROTA, Robb P. KERR, Russell N. HARADA a Frank DOMERACKI. Is Venous Duplex Imaging an Appropriate Initial Screening Test for Patients With Suspected Pulmonary Embolism?. *Annals of Vascular Surgery*. 1996, **10**(3), 220-223. DOI: 10.1007/BF02001885. ISSN 08905096. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890509606606341>

- (64) GREER, Ian A. Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *The Lancet*. 1999, **353**(9160), 1258-1265. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)10265-9. ISSN 01406736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673698102659>
- (65) EDELSTAM, G., C. LOWBEER, G. KRAL, S. A. GUSTAFSSON a P. VENGE. New reference values for routine blood samples and human neutrophilic lipocalin during third-trimester pregnancy. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2009, **61**(8), 583-591. DOI: 10.1080/003655101753267937. ISSN 0036-5513. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/003655101753267937>
- (66) JICK, Hershel, Barbro WESTERHOLM, Martin P. VESSEY, George P. LEWIS, Dennis SLONE, William H. W. INMAN, Samuel SHAPIRO a Jane WORCESTER. VENOUS THROMBOEMBOLIC DISEASE AND ABO BLOOD TYPE. *The Lancet*. 1969, **293**(7594), 539-542. DOI: 10.1016/S0140-6736(69)91955-2. ISSN 01406736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673669919552>
- (67) BICK, Rodger L. *Hematological complications in obstetrics, pregnancy, and gynecology*. 1. New York: Cambridge University Press, 2006. ISBN 978-0-521-83953-2.
- (68) ANDĚLOVÁ, K., K. ANDERLOVÁ, D. ČECHUROVÁ et al. GESTAČNÍ DIABETES MELLITUS Doporučený postup. *Čes. Gynek*. 2017, **82**(1), 79-81.
- (69) CARR, Marcus E. Diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2001, **15**(1), 44-54. DOI: 10.1016/S1056-8727(00)00132-X. ISSN 10568727. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105687270000132X>
- (70) TRIPODI, Armando, Adriana BRANCHI, Veena CHANTARANGKUL, Marigrazia CLERICI, Giuliana MERATI, Andrea ARTONI a Pier Mannuccio MANNUCCI. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2011, **31**(2), 165-172. DOI: 10.1007/s11239-010-0506-0. ISSN 0929-5305. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11239-010-0506-0>
- (71) SOWERS, J. R., M. L. TUCK a P. K. SOWERS. Plasma Antithrombin III and Thrombin Generation Time: Correlation with Hemoglobin A1 and Fasting Serum Glucose in Young Diabetic Women. *Diabetes Care*. 1980, **3**(6), 655-658. DOI: 10.2337/diacare.3.6.655. ISSN 0149-5992. Dostupné také z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.3.6.655>
- (72) WALKER, James J. Pre-eclampsia. *The Lancet*. 2000, **356**(9237), 1260-1265. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02800-2. ISSN 01406736. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600028002>
- (73) ROBERTS, JM a DW COOPER. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *The Lancet*. 2001, **357**(9249), 53-56. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03577-7. ISSN 01406736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600035777>
- (74) HUPPERTZ, Berthold. Placental Origins of Preeclampsia. *Hypertension*. 2008, **51**(4), 970-975.

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607. ISSN 0194-911X. Dostupné také z:
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607>

- (75) HUPPERTZ, Berthold. Biology of preeclampsia: Combined actions of angiogenic factors, their receptors and placental proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018, (), 1-8. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.11.024. ISSN 09254439. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443918304861>
- (76) HUPPERTZ, Berthold. The Critical Role of Abnormal Trophoblast Development in the Etiology of Preeclampsia. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2018, **19**(10), 771-780. DOI: 10.2174/1389201019666180427110547. ISSN 13892010. Dostupné také z:
<http://www.eurekaselect.com/161631/article>
- (77) PERRY, Helen, Asma KHALIL a Basky THILAGANATHAN. Preeclampsia and the cardiovascular system: An update. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2018, **28**(8), 505-513. DOI: 10.1016/j.tcm.2018.04.009. ISSN 10501738. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050173818300598>
- (78) ROBERTS, J.M a C.W.G REDMAN. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *The Lancet*. 1993, **341**(8858), 1447-1451. DOI: 10.1016/0140-6736(93)90889-O. ISSN 01406736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0140673693908890>
- (79) HUPPERTZ, Berthold. Placental Origins of Preeclampsia. *Hypertension*. 2008, **51**(4), 970-975. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607. ISSN 0194-911X. Dostupné také z:
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607>
- (80) O'RIORDAN, Máiread N a John R HIGGINS. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2003, **17**(3), 385-396. DOI: 10.1016/S1521-6934(03)00019-1. ISSN 15216934. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693403000191>
- (81) HIGGINS, J.R. 2A.1 Haemostasis in pre-eclampsia. *Thrombosis Research*. 2007, **119**(), 14-15. DOI: 10.1016/S0049-3848(07)70009-9. ISSN 00493848. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384807700099>
- (82) BONNAR, John, Leisha DALY a Brian SHEPPARD. Changes in the Fibrinolytic System During Pregnancy. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 1990, **16**(03), 221-229. DOI: 10.1055/s-2007-1002673. ISSN 0094-6176. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-1002673>
- (83) DE BOER, Karin, Jan W. TEN CATE, Auguste STURK, Judocus J.J. BORM a Pieter E. TREFFERS. Enhanced thrombin generation in normal and hypertensive pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1989, **160**(1), 95-100. DOI: 10.1016/0002-9378(89)90096-3. ISSN 00029378. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002937889900963>
- (84) VAN WIJK, Marja, Kees BOER, René BERCKMANS, Joost MEIJERS, Joris VAN DER POST, Auguste

- STURK, Ed VAN BAVEL a Rienk NIEUWLAND. Enhanced Coagulation Activation in Preeclampsia: the Role of APC Resistance, Microparticles and Other Plasma Constituents. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **88**(09), 415-420. DOI: 10.1055/s-0037-1613231. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1613231>
- (85) CHAIWORAPONGSA, T., J. YOSHIMATSU, J. ESPINOZA, Y. M. KIM, S. BERMAN, S. EDWIN, B. H. YOON a R. ROMERO. Evidence of in vivo generation of thrombin in patients with small-for-gestational-age fetuses and pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009, **11**(6), 362-367. DOI: 10.1080/jmf.11.6.362.367. ISSN 1476-7058. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/jmf.11.6.362.367>
- (86) TANJUNG, M. Thamrin, H. Djafar SIDDIK, Herman HARIMAN a Stephen C.L. KOH. Coagulation and Fibrinolysis in Preeclampsia and Neonates. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2016, **11**(4), 467-473. DOI: 10.1177/107602960501100415. ISSN 1076-0296. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/107602960501100415>
- (87) ROSENKRANZ, Andrea, Michael HIDEN, Bettina LESCHNIK, Weiss EVA-CHRISTINE, Dietmar SCHLEMBACH, Uwe LANG, Siegfried GALLISTL a Wolfgang MUNTEAN. Calibrated automated thrombin generation in normal uncomplicated pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **99**(02), 331-337. DOI: 10.1160/TH07-05-0359. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH07-05-0359>
- (88) JOLY, Berangere, Virginie BARBAY, Jeanne-Yvonne BORG a Veronique LE CAM-DUCHEZ. Comparison of markers of coagulation activation and thrombin generation test in uncomplicated pregnancies. *Thrombosis Research*. 2013, **132**(3), 386-391. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.07.022. ISSN 00493848. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384813003253>
- (89) FRANCHINI, Massimo. Haemostasis and pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **95**(03), 401-413. DOI: 10.1160/TH05-11-0753. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH05-11-0753>
- (90) FRANCALANCI, Isa, Paolo COMEGLIO, Agatina Alessandrello LIOTTA et al. D-dimer concentrations during normal pregnancy, as measured by ELISA. *Thrombosis Research*. 1995, **78**(5), 399-405. DOI: 10.1016/0049-3848(95)00073-Z. ISSN 00493848. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004938489500073Z>
- (91) KLINE, J. A. D-Dimer Concentrations in Normal Pregnancy: New Diagnostic Thresholds Are Needed. *Clinical Chemistry*. 2005, **51**(5), 825-829. DOI: 10.1373/clinchem.2004.044883. ISSN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2004.044883>
- (92) EICHINGER, Sabine. D-Dimer Testing in Pregnancy. *Seminars in Vascular Medicine*. 2005, **05**(04), 375-378. DOI: 10.1055/s-2005-922483. ISSN 1528-9648. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2005-922483>

- (93) DAMODARAM, M., M. KALADINDI, J. LUCKIT a W. YOONG. D-dimers as a screening test for venous thromboembolism in pregnancy: Is it of any use?. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2009, **29**(2), 101-103. DOI: 10.1080/01443610802649045. ISSN 0144-3615. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01443610802649045>
- (94) LOWE, G. D. O., A. RUMLEY, M. WOODWARD, C. E. MORRISON, H. PHILIPPOU, D. A. LANE a H. TUNSTALL-PEDOE. EPIDEMIOLOGY OF COAGULATION FACTORS, INHIBITORS AND ACTIVATION MARKERS: THE THIRD GLASGOW MONICA SURVEY I. ILLUSTRATIVE REFERENCE RANGES BY AGE, SEX AND HORMONE USE. *British Journal of Haematology*. 2003, **97**(4), 775-784. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1997.1222936.x. ISSN 0007-1048. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2141.1997.1222936.x>
- (95) HELLGREN, Margareta. Hemostasis during Normal Pregnancy and Puerperium. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2003, **29**(2), 125-130. DOI: 10.1055/s-2003-38897. ISSN 0094-6176. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2003-38897>
- (96) HUI, Chen, Meng LILI, Chen LIBIN, Zhang RUI, Guo FANG, Gao LING a Zhang JIANPING. Changes in coagulation and hemodynamics during pregnancy: a prospective longitudinal study of 58 cases. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2012, **285**(5), 1231-1236. DOI: 10.1007/s00404-011-2137-x. ISSN 0932-0067. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00404-011-2137-x>
- (97) BOMBELI, Thomas, Pascale RADDATZ-MUELLER a Joerg FEHR. Coagulation activation markers do not correlate with the clinical risk of thrombosis in pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2001, **184**(3), 382-389. DOI: 10.1067/mob.2001.109397. ISSN 00029378. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937801785997>
- (98) GRIS, Jean-Christophe, Sylvie BOUVIER, Eva COCHERY-NOUVELLON, Jean-Luc FAILLIE, Géraldine LISSALDE-LAVIGNE a Jean-Yves LEFRANT. Fibrin-related markers in patients with septic shock: Individual comparison of D-dimers and fibrin monomers impacts on prognosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **106**(12), 1228-1230. DOI: 10.1160/TH11-07-0489. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH11-07-0489>
- (99) SCHUTGENS, Roger, Fred HAAS, Mariette AGTEROF, Marike VOS a Douwe BIESMA. The role of fibrin monomers in optimizing the diagnostic work-up of deep vein thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **97**(05), 807-813. DOI: 10.1160/TH06-04-0222. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH06-04-0222>
- (100) EICHINGER, Sabine, Ansgar WELTERMANN, Karl PHILIPP et al. Prospective Evaluation of Hemostatic System Activation and Thrombin Potential in Healthy Pregnant Women with and without Factor V Leiden. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **82**(10), 1232-1236. DOI: 10.1055/s-0037-1614366. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1614366>
- (101) DARGAUD, Yesim, Stephanie HIERO, Lucia RUGERI, Catherine BATTIE, Pascal GAUCHERAND, Claude NEGRIER a Christine TRZECIAK. Endogenous thrombin potential, prothrombin fragment

- 1 2 and D-dimers during pregnancy. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017, **103**(02), 469-471. DOI: 10.1160/TH09-10-0679. ISSN 0340-6245. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/TH09-10-0679>
- (102) CHOWDARY, Pratima, Despoina ADAMIDOU, Anne RIDDELL et al. Thrombin generation assay identifies individual variability in responses to low molecular weight heparin in pregnancy: implications for anticoagulant monitoring. *British Journal of Haematology*. 2015, **168**(5), 719-727. DOI: 10.1111/bjh.13193. ISSN 00071048. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.13193>
- (103) MACEY, M.G., S. BEVAN, S. ALAM, L. VERGHESE, S. AGRAWAL, S. BESKI, R. THURAISSINGHAM a P.K. MACCALLUM. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thrombosis Research*. 2010, **125**(3), 76-81. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.09.013. ISSN 00493848. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004938480900406X>
- (104) EREZ, Offer, Roberto ROMERO, Edi VAISBUCH et al. The pattern and magnitude of “ in vivo thrombin generation” differ in women with preeclampsia and in those with SGA fetuses without preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2017, **31**(13), 1671-1680. DOI: 10.1080/14767058.2017.1323327. ISSN 1476-7058. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14767058.2017.1323327>
- (105) TRIPODI, A. A(nother) Test Meant to Fill the Gap between In Vivo and Ex Vivo Hemostasis. *Clinical Chemistry*. 2014, **60**(9), 1137-1140. DOI: 10.1373/clinchem.2014.227884. ISSN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2014.227884>
- (106) EICHINGER, S. Thrombin generation and venous thromboembolism. *Hämostaseologie*. 2017, **28**(0102), 37-39. DOI: 10.1055/s-0037-1616919. ISSN 0720-9355. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1616919>

20. Příloha

20.1. Publikace a přednášky k tématu vědecké práce

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v časopisech s IF

Slavík, L., Novák, M., Ulehlova, J., Prochazka, M., Prochazkova, J., Lattova, V., Polak, P., Pilka, R., Possibility of Coagulation Activation Determination with Tissue Factor in Pregnancy Complications October 2016, Clinical laboratory 62(10):1851-1856, DOI: 10.7754/Clin.Lab. 2016.151234

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Lattová V., Procházka M., Úlehlová J, Trombin generační test u fyziologické a rizikové gravidity, Česká gynekologie 2011, 76, č. 5 s. 367-370.
2. Lattová V., Procházka M., Procházková J., Úlehlová J., Slavík L., Lubušský M., Brychtová P, Preeklampsie a trombin generační test, Česká gynekologie, 2013, 78, č. 5 s. 466-472.

Přehledné/ souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Brychtová, P, Procházka, M., Lattová, V., Lubušský M., J. Procházková, L. Slavík, J. Úlehlová, O. Šimetka Incidence, etiologie a klinický význam trombocytopenie v graviditě, Česká gynekologie, 2013, 78, č. 6, s. 560-565

2. Lattová V., J. Dostál; M. Pešková A. Sobek jr., Procházka M., Opakované selhání implantace embrya a trombofilie, Česká gynekologie, 2015, 80, č. 1 s. 5-10.
3. Lattová V., Dostál J., Vodička J., Procházka M., Riziko tromboembolie v souvislosti s in vitro fertilizací, Čes. Gynek. 2019, 84, č. 3 s. 229-232

Publikovaná abstrakta

1. Procházka, M., Procházková, J., Hluší, A., Měchurová, A., Pilka, R., Šimetka, O., Slavík, L., Úlehlová, J., Lattová, V., Látalová, E., Stanovení generace trombinu u těhotných s fyziologickou graviditou, Celostátní konference České gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP Karlovy Vary, 4. - 6.6. 2010, poster, abstrakta.
2. Lattová V., Slavík L., Úlehlová J., Procházková J., Pilka R., Procházka M. Stanovení generace trombinu u těhotných s fyziologickou graviditou, Transfuze a hematologie dnes, XXIV. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, 24. – 26. 6. 2010, s. 100, poster, abstrakta.
3. Procházková J., Dhaifallah I., Šimetka O., Měchurová A., Pilka R., Lubušský M., Slavík L., Úlehlová J., Lattová V., Procházka M., Markery aktivace endotelu během fyziologické gravidity a těhotenství s rozvojem preeklampsie Transfuze a hematologie dnes, XXIV. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, 24. – 26. 6. 2010, s. 100, poster, abstrakta.
4. Lattová V, Procházková J., Procházka M, Slavík L. Úlehlová J., Pilka R., Trombin generační test u novorozenců, XXVIII. Konference sekce perinatální medicíny České gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP 6. -8. 4. 2011, Kongresové centrum hotelu Parkhotel, Plzeň, poster, abstrakta.
5. Procházka M., Procházková J., Slavík L., Úlehlová J., Lattová V., Pilka R., Thrombin generation test in pregnancy, Fetus and Placenta: A perfect

harmony, IFPA Meeting, Santiago, Chile, 19. - 22. 10. 2010, Placenta, 2010, ISSN 0143-4004, Book of abstract.

6. Lattová V., Procházka M., Procházková J., Úlehlová J., Slavík L., Pilka R., Thrombin generation test in neonates, 10. World congress of perinatal medicine, Punta del Este- Uruguay, 8. - 11. 10. 2011, Book of abstract.
7. Prochazkova J, Prochazka M, Slavik L, Ulehlova J, Lattova V, and Pilka R., Thrombin generation test in neonates, 10th World Congress in Fetal Medicine, 6/2011, Malta, Book of abstrakt.
8. Procházka M., Procházková J., Lattová V., Slavík L., Úlehlová J., Pilka R Thrombin generation test in neonates, XXIII. Congress The International Society on Thrombosis and Haemostasis, 7/2011, Kjoto, Japan, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011, Vol. 9, suppl. 2, Book of abstract.
9. Lattová V., Slavík L. Úlehlová J., Procházková J., Pilka R., Procházka M., Stanovení generace trombinu u těhotných s fyziologickou graviditou. XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí 22 . - 25. 6. 2011, Olomouc, sborník abstrakt.
10. Procházka M., Procházková J., Slavík L., Úlehlová J., Lattová V., Lubušský M., Pilka R., Thrombin generation test in pregnancy, , The 4th International Symposium on Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis, 4. - 6. 2011, Berlin, Germany, Thrombosis Research, 2011, Vol. 127, suppl. 3, p. 146, Book of abstract.
11. Prochazkova J., Prochazka M., Slavik L., Ulehlova J., Lattova V., and Pilka R., Thrombin generation test in neonates, 56. Jahrestagung der Gesellschaft für Hämostase-und Thromboseforschung e.V. St. Gallen, 1.- 4.2. 2012, Hämostaseologie Jan. 2012. Book of abstract.
12. Prochazkova J., Prochazka M., Slavik L., Ulehlova J., Lattova V., Lubusky M., Pilka R., Thrombin generation test in pregnancy, 56. Jahrestagung der Gesellschaft für Hämostase-und Thromboseforschung e.V. St. Gallen, 1.- 4. 2. 2012, Hämostaseologie Jan. 2012, Book of abstract.

13. Prochazkova J, Prochazka M, Slavik L, Ulehlova J, Lattova V, and Pilka R.,
Thrombin generation test in neonates, , 10th World Congress in Fetal
Medicine, 26-30 June 2011, Malta, Book of abstract.

20.2. Publikace a přednášky mimo téma vědecké práce

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v časopisech s IF

1. Klásková E., Tüdös Z., Sobek A., Zapletalová J., Dostál J., Zbořilová B.,
Sobek A. Jr., Adamová K., Lattová V., Dostálová Z., Procházka M., Low-level
45,X/46,XX mosaicism is not associated with congenital heart disease and
thoracic aorta dilatation:prospective magnetic resonance imaging and
ultrasound study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jun;45(6):722-7.

Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Šimetka O., Špaček R., Vašek P., Lattová V., Michalec I., Procházka M.,
Srovnání efektivity misoprostolu a dinoprostu při indukci druhotrimestrálního
abortu, *Česká gynekologie* 2011, 76, č. 6, s. 472-476.

Přehledné/ souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Publikovaná abstrakta

1. Svobodová M., Lattová V., Smékalová K., Lakomá P., Foltýnová M.,
Hejtmánek P., Dostál J., Srovnání úspěšnosti přenosu jednoho embrya, 12.
Česko- Slovenská konference reprodukční gynekologie, 23. Symposium
asistované reprodukce, Brno, 11/2013, poster, abstrakta.
2. Smékalová K., Foltýnová M., Svobodová M., Lakomá P., Dostál J., Lattová V.,
Hejtmánek P., Vývoj embryotransferů jednoho embrya ve FN Olomouc od

- roku 2010 do současnosti, 12. Česko- Slovenská konference reprodukční gynekologie, 23. Symposium asistované reprodukce, Brno, 11/2013, poster, sborník abstrakt.
3. Lattová V., Pešková M., Dostál J., Lakomá P., Smékalová K., Hejtmánek P., Žaludová M., Úspěšná léčba neplodnosti u pacientky po terapii kraniopharyngeomu, 13. Česko- Slovenská konference reprodukční gynekologie, 24. Symposium asistované reprodukce, Brno, 11/2014, poster, sborník abstrakt.
 4. Žaludová M., Smékalová K., Lakomá P., Pešková M., Lattová V., Hejtmánek P., Dostál J., Vliv délky kultivace embrya v kultivačním médiu na porodní hmotnost novorozence, 13. Česko- Slovenská konference reprodukční gynekologie, 24. Symposium asistované reprodukce, Brno, 11/2014, poster, sborník abstrakt.
 5. Pešková M., Adamová K., Dostál J., Lattová V., Godava M., Vrtěl R., Ehrmann J. jr., Slobodová Z., Kvapilová M., Čapková, P., Filipová H., Lakomá P., Žaludová M., Smékalová K., Vodička R., Chimerismus 46, XX/46, XY a úspěšné těhotenství a porod zdravých dvojčat po IVF, 13. Česko- Slovenská konference reprodukční gynekologie, 24. Symposium asistované reprodukce, Brno, 11/2014, poster, sborník abstrakt.