



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Stanovení trombogenního potenciálu antifosfolipidových
protilátek**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Markéta Korená
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Korená
Název práce	Stanovení trombogenního potenciálu antifosfolipidových protilátek
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Hemato-onkologická klinika, Olomouc
Vedoucí práce	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Antifosfolipidový syndrom je onemocnění, které se manifestuje trombotickými komplikacemi v arteriálním a žilním řečišti a bývá spojován i s těhotenskými komplikacemi. Příčinou vzniku syndromu je autoimunní produkce protilátek proti fosfolipidům, které jsou typu lupus antikoagulans a protilátky proti kardiolipinu, resp. β_2-glykoproteinu I. Cílem práce bylo stanovit trombogenní potenciál jednotlivých druhů antifosfolipidových protilátek pomocí optimalizované metody generace trombinu a ověřit hypotézu na souboru pacientů s pozitivním nálezem jednotlivých typů protilátek. Nejvíce signifikantním parametrem se jevil Lag time, který se při zvyšující se koncentraci zkracoval, a to nejvíce u triple pozitivních pacientů, kde byl rozdíl vidět nejvíce. Tato metoda je tak vhodná pro monitorování generace trombinu, při které se nám APLA projevují.
Klíčová slova	Antifosfolipidový syndrom, antifosfolipidová protilátka, trombin, hemostáza, lupus antikoagulans
Počet stran	62
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Markéta Korená
Title of thesis	The determination thrombogenic potential of antiphospholipid antibodies
Type of thesis	Diploma
Department	Hemato-oncology clinic, Olomouc
Supervisor	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	Antiphospholipid syndrome is a disease manifested by thrombotic complications in the arterial and venous system and that is also associated with pregnancy complications. The cause of the syndrome is the autoimmune production of antibodies against phospholipids, which are of the lupus anticoagulant type and antibodies against cardiolipin, respectively β_2-glycoprotein I. The aim of the work was to determine the thrombogenic potential of individual types of antiphospholipid antibodies using an optimized method of thrombin generation and to verify the hypothesis in a group of patients with a positive finding of individual types of antibodies. The most significant parameter was Lag time, which shortened with increasing concentration, the most in triple positive patients, where the difference was most visible. This method is so suitable for monitoring the generation of thrombin in which the antiphospholipid antibodies are shown.
Keywords	Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibody, thrombin, hemostasis, lupus anticoagulans
Number of pages	62
Language	Czech

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

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Mgr. Luděku Slavíkovi, PhD. za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost při konzultacích a cenné rady, které mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK	10
ÚVOD	11
CÍLE PRÁCE.....	12
TEORETICKÁ ČÁST	13
1 HEMOSTÁZA	13
1.1 PRIMÁRNÍ HEMOSTÁZA.....	13
1.1.1 Cévní složka.....	14
1.1.2 Krevní destičky	14
1.2 HEMOKOAGULACE	16
1.2.1 Koagulační faktory.....	17
1.2.2 Vnější cesta koagulace	19
1.2.3 Vnitřní cesta koagulace	20
1.2.4 Společná cesta koagulace.....	20
1.2.5 Přírozené inhibitory koagulace	21
2 PATOFYZIOLOGIE HEMOSTÁZY	22
2.1 KRVÁCIVÉ STAVY.....	22
2.1.1 Trombocytopenie	22
2.1.2 Trombocytopatie.....	22
2.1.3 Koagulopatie	23
2.1.3.1 Hemofilie.....	23
2.2 TROMBOFILNÍ STAVY.....	23
2.3 TROMBOTICKÉ STAVY	24
3 ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM.....	25
3.1 KLASIFIKACE A DIAGNÓZA APS	27
3.2 LÉČBA ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU	29
3.3 ANTIFOSFOLIPIDOVÉ PROTILÁTKY.....	30
3.3.1 Rozdělení antifosfolipidových protilátek dle metody detekce.....	31
3.3.2 Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek	32
3.3.3 Laboratorní diagnostika antifosfolipidových protilátek.....	33
3.3.3.1 Diagnostika lupus antikoagulans.....	33
3.3.3.2 Diagnostika kardirolipinových protilátek a protilátek proti β_2 -GP I	37
3.3.4 Nové globální testy	38
3.3.4.1 Trombin generační test.....	38
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
1 PŘÍSTROJE A MATERIÁL.....	40
2 DIAGNOSTIKA A REAGENCIE	40

3	PREANALYTICKÁ FÁZE	41
3.1	ODBĚR VZORKU.....	41
3.2	ZPRACOVÁNÍ VZORKU (CENTRIFUGACE).....	41
3.3	UCHOVÁNÍ VZORKU.....	41
3.4	VLASTNÍ MĚŘENÍ – PŘÍPRAVA REAGENCIÍ.....	41
4	SOUBOR PACIENTŮ	42
5	METODIKA	43
5.1	TROMBIN GENERAČNÍ TEST.....	43
6	VÝSLEDKY	44
6.1	OPTIMALIZACE METODY	44
6.2	MĚŘENÉ HODNOTY PACIENTŮ	45
6.3	GRAFICKÉ HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	53
7	DISKUZE	56
8	ZÁVĚR	57
	LITERATURA	58

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACLA	antikardiolipinové protilátky
ADP	adenosindifosfát
AMK	aminokyselina
APLA	antifosfolipidové protilátky
APC	aktivovaný protein C
APS	antifosfolipidový syndrom
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
AT	antitrombin
anti β 2-GPI	anti beta-2-glykoprotein I
AUC	celkové množství vygenerovaného trombinu
β 2-GP I	beta-2-glykoprotein I
Ca ²⁺	vápenaté ionty
dRVVT	test s jedem Russelovy zmije
EB	endotelové buňky
ELISA	enzymová imunoanalýza
HMWK	vysokomolekulární kininogen
KCT	kaolinový test
LA	lupus antikoagulans
LDL	low density lipoprotein
PC	protein C
PK	prekalikrein
PL	fosfolipidy
PS	protein S
PNP	destičkový neutralizační test
RT	reptilázový test
SLE	systémový lupus erythematoses
TEG	tromboelastografie
TF	tkáňový faktor
TGT	trombin generační test
TM	trombomodulin
TT	trombinový test
TGT	trombin generační test
vWf	von Willebrandův faktor

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Schéma primární hemostázy.....	15
Obrázek 2	Schéma koagulační kaskády.....	20
Obrázek 3	Schéma vzniku hluboké žilní trombózy	24
Obrázek 4	Schéma molekuly fosfolipidu.....	30
Obrázek 5	Tvorba komplexů APLA/B2-GP I a jejich vazba na fosfolipidový povrch.	37
Obrázek 6	Průchod paprsku reakční kyvetou.....	39
Obrázek 7	Trombinogram – závislost množství trombinu na čase.....	39
Obrázek 8	Vzájemná korelace výsledků pacientů mezi koncentracemi PL a TGTt.....	44
Obrázek 9	Vzájemná korelace výsledků pacientů mezi koncentracemi PL a TGTm.....	44
Obrázek 10	Vzájemná korelace výsledků pacientů mezi koncentracemi PL a TGTe	45
Obrázek 11	Pacienti rozdělení dle positivity ve sledovaných protilátkách	52
Obrázek 12	Testování pacienti v závislosti nižší koncentrace PL na TGTt	53
Obrázek 13	Testování pacienti v závislosti vyšší koncentrace PL na TGTt.....	53
Obrázek 14	Testování pacienti v závislosti nižší koncentrace PL na TGTm	54
Obrázek 15	Testování pacienti v závislosti vyšší koncentrace PL na TGTm.....	54
Obrázek 16	Testování pacienti v závislosti vyšší koncentrace PL na TGTe	55
Obrázek 17	Testování pacienti v závislosti nižší koncentrace PL na TGTe.....	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled koagulačních faktorů.....	16
Tabulka 2 Nejčastější klinické manifestace APS.....	26
Tabulka 3 Onemocnění provázená výskytem antifosfolipidových protilátek.....	28
Tabulka 4 Mechanismy působení APLA	33
Tabulka 5 Příprava reagensů na TGT	41
Tabulka 6 Hodnoty antifosfolipidových protilátek u všech testovaných pacientů	46

ÚVOD

Hemostáza je jedním z nejdůležitějších dějů odehrávajících se v lidském těle. Jedná se o velice složitý proces, který se skládá z několika fází – primární hemostázy, kdy nastává aktivace koagulačního systému, sekundární hemostázy, kdy dochází k vlastními krevnímu srážení a následně fibrinolýzy, při které dochází k degradaci vzniklé sraženiny, aby se zabránilo vzniku trombózy. Klíčovou roli v procesu krevního srážení hraje trombin, který je důležitý jak v aktivaci fibrinogenu a trombocytů, tak v aktivaci trombomodulinu kontrolujícího fibrinolýzy a s antitrombotickými proteiny C a S tlumí koagulační kaskádu inaktivací koagulačních faktorů.

Mezi patofyziologické stavy hemostázy patří antifosfolipidový syndrom (APS), což je autoimunitní onemocnění, které je charakterizováno trombotickými komplikacemi jak v arteriálním, tak v žilním řečišti. Mezi další typické projevy se řadí opakované potrácení, nedonošení plodu nebo těžká preeklampsie. Příčinou vzniku tohoto onemocnění je autoimunní produkce protilátek proti fosfolipidům, které jsou zaměřeny na makromolekuly vázající se na negativně nabitý povrch fosfolipidů. Fosfolipidy mají za úkol jednak udržovat strukturu plazmatické membrány ve funkčním stavu a jednak je nutná jejich přítomnost ve vnějších, vnitřních i společných krocích aktivace koagulace. Tyto antifosfolipidové protilátky jsou heterogenní skupinou autoprotiátek, které jsou charakterizovány náchylností k trombózám v žilním, tepenném či mikrocirkulárním řečišti a reprodukčními ztrátami.

CÍLE PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit trombogenní potenciál jednotlivých druhů antifosfolipidových protilátek, pro což je nutný vývoj metody, která by dovolila zhodnotit tento potenciál. V rámci tohoto cíle byla optimalizována globální koagulační metoda umožňující hodnocení trombogenního potenciálu, kterou je trombin generační test. V rámci optimalizace této metody pro vyšetření pacientů s antifosfolipidovými protilátkami byla provedena optimalizace koncentrace fosfolipidů jako klíčové komponenty této reakce pro vyšetření pacientů s antifosfolipidovými protilátkami. Následně byla ověřena hypotéza na souboru pacientů s pozitivním nálezem jednotlivých typů protilátek.

TEORETICKÁ ČÁST

1 HEMOSTÁZA

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení po poranění a zabránit ztrátě krve uzavřením defektu cévní stěny. Jedná se o schopnost zabezpečit tekutost krve a její plynulé proudění neporušeným krevním řečištěm. Základními složkami hemostázy jsou krevní destičky, cévní stěna a systém plazmatických proteinů, zahrnující plazmatické faktory, inhibitory koagulace a složky fibrinolýzy. Tyto složky jsou za fyziologických okolností udržované v rovnováze a pokud nastane porucha některé z nich, může vzniknout patologické krvácení, nebo naopak intravaskulární trombóza (Sakalová et al., 2010).

Hemostáza se skládá z několika dějů, jež probíhají současně. Jedním z nich je hemokoagulace, při které se aktivují koagulační faktory a spolu s generací trombinu vzniká fibrinové koagulum, představující definitivní hemostatickou zátku. Konečnou fází je fibrinolýza, která degraduje zátku svým fibrinolytickým systémem a obnovuje tak cévní stěnu (Penka et al., 2014).

1.1 Primární hemostáza

Primární hemostáza je proces tvorby agregátu krevních destiček, tedy primární fibrinové zátky, která uzavírá narušené místo cévní stěny a zastavuje tak krvácení. Účastní se jí krevní destičky a cévní složka. Při poranění cévy dochází k vazokonstrikci (zúžení) cévy a k adhezi trombocytů na místa s porušeným endotelem. Adheze destiček společně s aktivací receptorů zajišťuje aktivaci krevních destiček, které následně začnou agregovat (shlukovat) a dochází tak ke vzniku primární destičkové sraženiny. V primární hemostáze hrají důležitou roli krevní destičky, zatímco v sekundární hemostáze je důležitá tvorba trombinu, která vede k vytvoření fibrinogenu. Oba tyto děje tvoří jeden důležitý celek, který je zakončen fibrinolýzou, umožňující rozpuštění trombu, následnou proliferaci poškozených tkání a celkovým zahojením poškozené cévy (Pecka, 2004).

1.1.1 Cévní složka

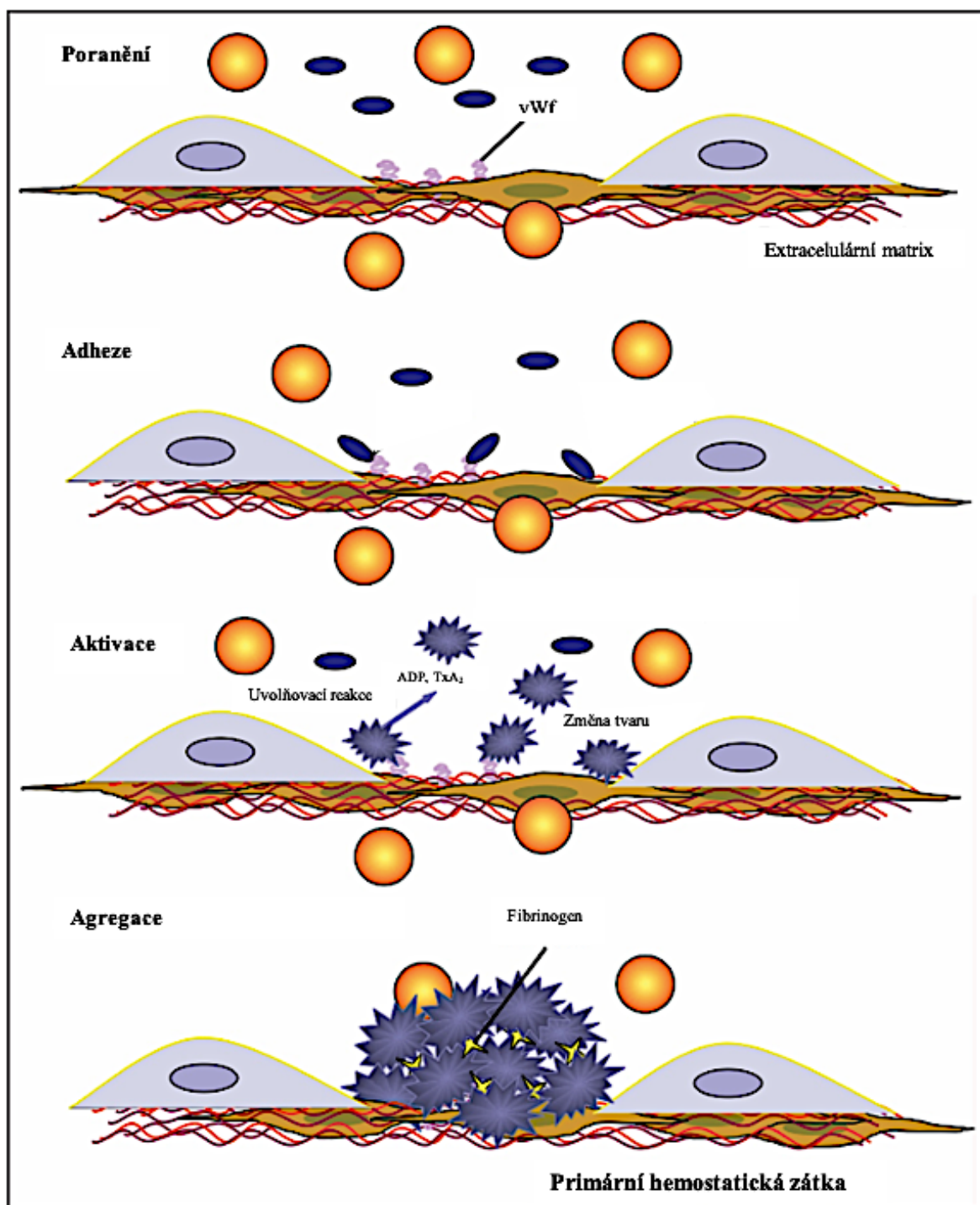
Cévní stěna spolu s endoteliálními buňkami hraje důležitou úlohu v procesu hemostázy. Endotelové buňky (EB) zajišťují nesrážlivost cévní stěny svou účastí na tvorbě bazální membrány a extracelulárního matrix, které tvoří ochranný obal oddělující hemostatické složky krve od reaktivních subendotelových struktur. Další funkcí EB je schopnost udržet trombocyty v neaktivním stavu a bránit tak jejich adhezi na cévní stěnu.

Při poruše endotelu dochází k odkrytí pojiva, kde nejvýznamnějšími hemostatickými složkami subendotelu je tkáňový faktor (TF) a kolagen (Penka et al., 2014).

1.1.2 Krevní destičky

Krevní destičky (tzv. trombocyty) jsou bezjaderné útvary o průměru kolem 3 μm , je jich přibližně 300 000 na 1 μl krve a jejich životnost je 8-12 dní. Trombocyty se tvoří v kostní dřeni odštěpováním z velkých buněk (megakaryocytů), které vznikají opakovaným dělením jader bez dělení buněk. Destičková membrána je tvořena plazmatickým obalem, glykokalyxem, který dále obsahuje glykoproteiny a glykolipidy, jež jsou součástí povrchových receptorů. Důležitými receptory jsou adhezivní glykoproteinové receptory (integriny), receptory pro aktivátory trombocytů (trombin, kolagen, tromboxan A_2 , epinefrin, ADP, serotonin), receptory pro inhibitory agregace trombocytů (prostacykliny a prostaglandiny E, D). Tato membrána se tedy skládá z proteinů a dvojvrstvy lipidů (fosfolipidů a cholesterolu). Fosfolipidy mají za normálních okolností na povrch orientovaný neutrální fosfatidylcholin a sfingomyelin, na vnitřní stranu elektronegativní fosfatidylserin a fosfatidyletanolamin (Sakalová et al., 2010).

Hlavní funkcí krevní destičky je tvorba primární fibrinové zátky, která začíná adhezí krevních destiček k receptorům kolagenních vláken bazální membrány cévní stěny. To je umožněno vzájemnou interakcí mezi receptorem kolagenu bazální membrány, receptorem membrány krevní destičky (lamininem) a von Willebrandovým faktorem. Následně dochází k agregaci destiček, tedy vzájemnému shlukování. Zatímco je adheze indukována menším množstvím adenosin difosfátu (ADP), agregace je navozena velkým množstvím ADP. K agregaci jsou zapotřebí i další látky, především trombin, adrenalin, kyselina arachidonová a kolagen. Další funkcí trombocytů je schopnost stažením fibrinové zátky s následným zacelením a zpevněním poškozeného místa, díky přítomnosti kontraktibilních bílkovin v destičkové membráně (Penka et al., 2012).



Obrázek 1 Schéma primární hemostázy

Převzato a upraveno z: <http://eclinpath.com/hemostasis/physiology/primary-hemostasis/>

Vysvětlivky: vWf – von Willebrandův faktor, ADP – adenosindifosfát, TxA_2 – tromboxan A_2

1.2 HEMOKOAGULACE

Hemokoagulace je soubor reakcí, navazujících na hemostázu, který zahrnuje kaskádu enzymatických reakcí vedoucích k úplné zástavě krvácení. Hlavním principem je vznik nerozpustného fibrinu, který se vytváří za účelem zpevnit primární hemostatickou zátku. Na začátku reakce je fibrinogen, který je přeměňován působením proteolytického enzymu trombinu na monomer fibrinu. Následně se tyto monomery fibrinu propojují svými kovalentními vazbami působením aktivovaného faktoru XIII a vzniká nerozpustný fibrin. Fibrin vytváří vláknitou síť, která zachycuje krevní buňky až do vzniku krevní sraženiny, tzv. konečné fibrinové zátky. Díky její retraktibilitě dochází ke stažení okrajů rány a výslednému hojení (Sussman, 1992).

Koagulační kaskáda se dle způsobu aktivace dělí na vnitřní a vnější cestu. Tyto cesty se poté spojují po vytvoření komplexu tkáňového faktoru s FVIIa, který aktivuje FX na FXa za vzniku protrombinu z protrombinázy a následnému vytvoření důležitého trombinu. Trombin je klíčovým enzymem koagulačního systému, který má důležité funkce, jako je aktivace krevních destiček a přeměna fibrinogenu na fibrinovou síť. (Penka et al., 2011).

Hemokoagulace se účastní koagulační faktory (viz tabulka č.1) a jejich inhibitory. Mezi inhibitory koagulačních faktorů patří antitrombin, systém trombomodulinu, proteinu C a S a inhibitor cesty tkáňového faktoru. Koagulační faktory, jež jsou syntetizovány v játrech, se označují římskými čísly dle doby objevení. Všechny koagulační faktory jsou v krvi v neaktivní formě a po aktivaci se označují indexem „a“, např. FXa (Pecka, 2004).

Tabulka 1 Přehled koagulačních faktorů – převzato a upraveno od Kittnar et al. (2011)

Koagulační faktor	Synonymum
Fibrinogen	Faktor I
Protrombin	Faktor II
Tkáňový faktor	Faktor III, tkáňový tromboplastin
Vápenaté ionty	Faktor IV
Faktor V	Proakcelerin, labilní faktor
Faktor VII	Prokonvertin, stabilní faktor
Faktor VIII	Antihemofilický faktor A
Faktor IX	Christmas faktor
Faktor X	Stuart-Prowerův faktor
Faktor XI	Plasma tromboplastin antecedent
Faktor XII	Hagemanův faktor
Faktor XIII	Fibrin stabilizující faktor
Prekalikrein	Fletcherův faktor
Vysokomolekulární kininogen	Fitzgeraldův faktor, HMWK

1.2.1 Koagulační faktory

Všechny koagulační faktory jsou za normálních okolností v krevní plazmě v neaktivní formě jako proenzymy, které jsou štěpeny na aktivní formy, enzymy. Koagulační faktory jsou syntetizovány v játrech a k některým je zapotřebí vitamin K (FII, FVII, FIX a FX jsou K dependentní), protože je nezbytný pro karboxylaci γ -glutamového zbytku. Bez karboxylace není faktor schopný vázat fosfolipidy a vápenaté ionty Ca^{2+} (Penka et al., 2011). Mezi základní koagulační faktory dle Pecka (2004), Penka et al., (2011) patří:

- *Fibrinogen* (faktor I) je plazmatický protein syntetizovaný v játrech, nacházející se jak v plazmě, tak v α -granulích trombocytů. Molekula fibrinogenu tvoří dimer složený ze tří párů polypeptidových řetězců α , β a γ . V procesu hemokoagulace je působením enzymu trombinu odštěpen fibrinopeptid A a vzniká monomer fibrinu. Fibrinové vlákno obsahuje tři vazebná místa pro Ca^{2+} . Jsou-li tato místa obsazena, nedochází ke štěpení fibrinogenu plazminem.
- *Protrombin* (faktor II) je K dependentní faktor, k jehož syntéze v játrech je zapotřebí vitamin K. Díky Ca^{2+} se váže na negativně nabitě fosfolipidy, kde je pomocí protrombinázy přeměňován na trombin (FIIa). Tato aktivní forma, trombin, jež má velký význam v procesu koagulace, štěpí fibrinogen na fibrin, aktivuje FV, FVIII, FIX, FXIII a aktivuje krevní destičky.
- *Tkáňový faktor* (faktor III, TF) je glykoprotein, který je součástí membrán endoplazmatického retikula. Za normálních okolností se TF na krevních buňkách nevyskytuje. Po kontaktu s krví vytváří TF spolu s FVIIa v přítomnosti Ca^{2+} na fosfolipidovém povrchu komplex, který poté způsobí přeměnu FX na FXa. Je tedy nezbytný pro zahájení přeměny trombinu na aktivní trombin tvorbou komplexu s koagulačními FVII a FVIIa. Tkáňový faktor hraje důležitou roli při vzniku trombotických nemocí a hyperkoagulačních stavů, dále se uplatňuje při zánětech, růstu a metastázování nádorů.
- *Kalcium* (faktor IV) zprostředkovává připojení γ -karboxylové skupiny kyseliny glutamové na membránové fosfolipidy u faktorů závislých na vitaminu K.

- *Proakcelerin* (faktor V) je glykoprotein vznikající v játrech a megakaryocytech a snadno se váže na povrch membrán buněk. Na rozdíl od většiny ostatních koagulačních faktorů není enzymaticky aktivní, ale funguje jako kofaktor. Svým složením se podobá FVIII. Faktor V je aktivován proteolýzou trombinem a FXa za přítomnosti Ca^{2+} . Jeho deficit může způsobit krvácivé stavy, mutace (např. faktor V Leiden), které následně mohou vést k trombóze.
- *Prokonvertin* (faktor VII) je glykoprotein vznikající v játrech, který je v procesu koagulace štěpen na aktivní serinovou proteázu FVIIa. K aktivaci dochází za přítomnosti trombinu, nebo FIXa, FXa a FXIa. Jeho aktivní forma spolu s tkáňovým faktorem vytváří komplex na negativním fosfolipidovém povrchu buněk, který katalyzuje přeměnu FIX na FIXa a faktoru FX na FXa. Jeho aktivita se zvyšuje s věkem a v těhotenství.
- *Antihemofilický faktor A* (faktor VIII) je plazmatický kofaktor v plazmě vázaný na von Willebrandův faktor (vWF). Při kontaktu s negativně nabitými fosfolipidy se FVIII z této vazby uvolní. Na molekule FVIII se zpřístupní vazebné místo pro fosfolipidy, které je ve vazbě s vWF skryté. Faktor VIII je trombinem nebo FXa aktivován na FVIIIa, který následně vytvoří komplex s FIXa, Ca^{2+} a fosfolipidy, který aktivuje FX na FXa. Pokles hladiny FVIII sledujeme při vrozených poruchách (např. hemofilie A, von Willebrandova choroba) a naopak zvýšenou hladinu nalézáme v plazmě při zánětech, infekcích a stresu.
- *Christmas faktor* (faktor IX) je glykoprotein řadící se mezi K dependentní faktory. K aktivaci dochází buď pomocí FXIa nebo komplexem FVIIa společně s TF, fosfolipidy (PL) a vápenatými ionty, který následně aktivuje FX na FXa pro přeměnu protrombinu na trombin. Deficit tohoto faktoru působí hemofilii B.
- *Stuart-Prowerův faktor* (faktor X) je tvořen v játrech za účasti vitamínu K. Aktivace FX na FXa probíhá v přítomnosti komplexu označovaným jako vnitřní tenáza (FIXa, FVIIIa spolu s Ca^{2+} a fosfolipidy), nebo komplexu vnější tenáza (FVIIa, TF spolu s Ca^{2+} a fosfolipidy). Faktor Xa štěpí peptidové vazby protrombinu za vzniku aktivního trombinu jen pokud je FXa vázán s FVa v komplexu protrombináza.
- *Plasma tromboplastin antecedent* (faktor XI) je glykoprotein, který se nachází v krvi v neaktivní formě jako proenzym serinové proteázy. Je aktivován proteolýzou FXIIa za přítomnosti vysokomolekulárního kininogenu (HMWK) a negativně nabitých fosfolipidů, dále je pak možná aktivace i FVIIa, trombinem a trypsinem.

- *Hagemanův faktor* (faktor XII) vzniká v játrech a patří mezi serinové proteázy. Kluže jak v plazmě, tak v séru. Aktivuje se kontaktem se subendoteliálními strukturami při poškození povrchu cévy. Zvýšenou hladinu FXII nacházíme u žen po menopauze a v těhotenství.
- *Fibrin stabilizující faktor* (faktor XIII) neboli transglutamináza se nachází jak v krevní plazmě, kde je vázán na molekulu fibrinogenu, tak v trombocytech, megakaryocytech, monocytech, v placentě a v játrech. K aktivaci FXIII na FXIIIa je důležitý trombin za přítomnosti Ca^{2+} jako kofaktoru. Po aktivaci trombinem vytváří FXIIIa křížové vazby mezi fibrinovými molekulami a vzniká tak nerozpustná sraženina. Faktor XIIIa ovlivňuje hojení ran a má velký význam i při udržení plodu v době těhotenství.
- *Fletcherův faktor* (prekalikrein) je bílkovina účastnící se koagulace společně s FXII a vysokomolekulárním kininogenem (HMWK). Je syntetizován v játrech a slinivce břišní. Prekalikrein je aktivován FXIIa na kalikrein, který aktivuje FXII a umožňuje tak uvolňování kininů z kininogenů (např. bradykinin). Důsledkem je ovlivnění krevního tlaku a krevní srážlivosti.
- *Vysokomolekulární kininogen* (HMWK) je plazmatický protein vznikající v játrech a v endotelu pupečnickových žil. Společně s FXII a prekalikreinem se účastní koagulace a zánětu.

1.2.2 Vnější cesta koagulace

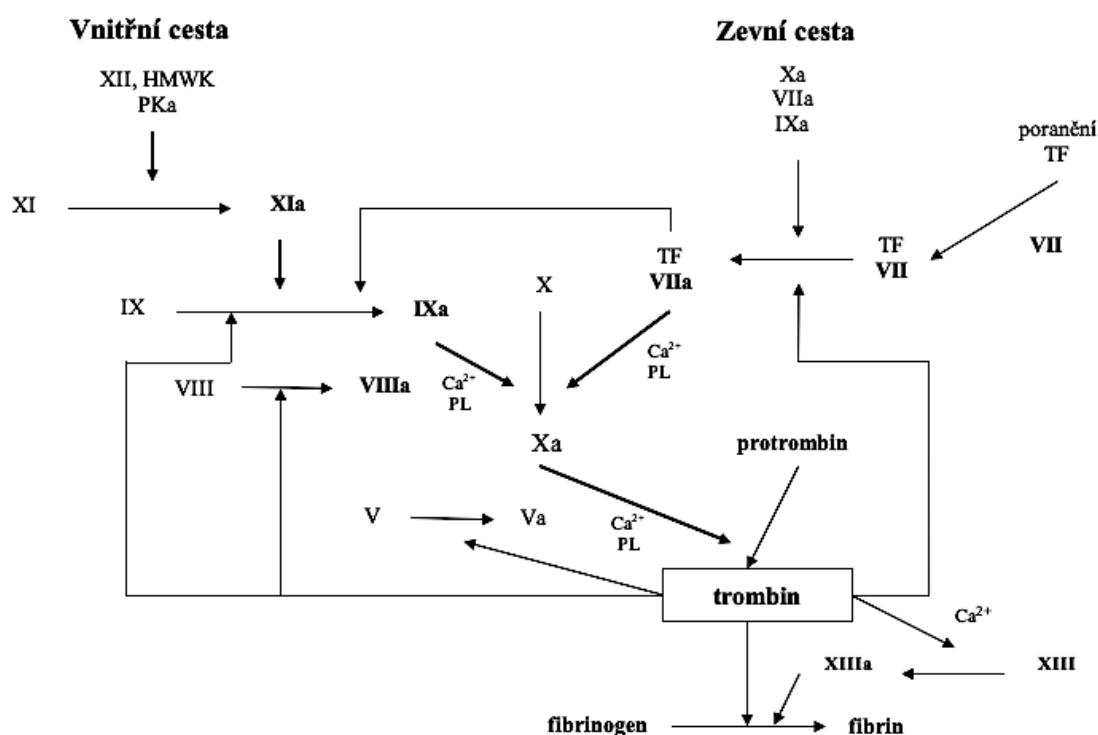
Vnější cesta je pro zahájení koagulační kaskády významnější, přičemž vnitřní cesta ji doplňuje či zesiluje. Vnější cesta je aktivována poraněním cévní stěny, čímž dochází k uvolnění tkáňového faktoru do krve. Komplex TF s lipoproteiny se váže na FVII, čímž jej aktivuje a má tak dvě možnosti působení. Buď aktivuje FIX na FIXa a zasahuje tak do vnitřní cesty koagulace, nebo za přítomnosti Ca^{2+} a destičkových fosfolipidů vytváří tzv. vnější tenázu (komplex TF, FVIIa, PL, Ca^{2+}), která následně aktivuje FX na FXa. Takto aktivovaný FX se ihned naváže na fosfolipidy TF a s pomocí FV vytvářejí aktivátor protrombinu. Tento aktivátor za přítomnosti Ca^{2+} přeměňuje protrombin na trombin. Trombin následně aktivuje další molekuly FV a ty pak ovlivňují přeměnu FX na jeho aktivní formu (Kittnar, 2011).

1.2.3 Vnitřní cesta koagulace

Vnitřní cesta je aktivována po kontaktu krve, resp. faktoru XII s negativně nabitým povrchem – s kolagenem z endotelu v místě poranění. Odhalení kolagenu vede jak k aktivaci FXII, tak k uvolnění fosfolipidů z trombocytů, jež obsahují tkáňový faktor. Aktivovaný FXII štěpí FXI za vzniku FXIa, k čemuž je nezbytná přítomnost vysokomolekulárního kininogenu (HMWK), Ca^{2+} a prekalikreinu. Faktor XIa poté aktivuje FIX, který spolu s FVIIIa a destičkovými fosfolipidy aktivuje FX. Následně aktivovaný FX spolu s FVa, Ca^{2+} a destičkovými fosfolipidy vytvářejí aktivátor protrombinu, který se podílí na přeměně protrombinu na trombin (Kittnar, 2011; Pecka, 2004; Šlechtová, 2007).

1.2.4 Společná cesta koagulace

Společná cesta koagulace zahrnuje vnější a vnitřní systém koagulační kaskády. Po vytvoření aktivátoru protrombinu vnější i vnitřní cestou dochází k přeměně protrombinu (FII) na trombin (FIIa), která je katalyzovaná FXa, FVa a Ca^{2+} ionty. Tato aktivace vede ke vzniku protrombinázy. Vzniklý trombin zajišťuje přeměnu FI (rozpuštěný fibrinogen) na FIIa (nerozpuštěný fibrin). Z fibrinogenu je nejprve odštěpen fibrinopeptid A a B, čímž vznikají fibrinové monomery, dimery, trimery atd. Poté fibrin stabilizující faktor vytvoří vazby mezi fibrinovými vlákny a dává vznik husté nerozpustné fibrinové síti. Vytváří se tak primární hemostatická zátka a proces krevního srážení je u konce (Šlechtová, 2007; Penka, 2011).



Obrázek 2 Schéma koagulační kaskády
Převzato a upraveno dle: Penka et al. (2011)

1.2.5 Přírodní inhibitory koagulace

Současně se zahájením koagulace jsou aktivovány i tzv. přírodní inhibitory koagulace. Ty se podílejí na regulaci koagulační kaskády tak, že kontrolují generaci trombinu a brání nekontrolovatelnému srážení krve mimo místo poranění. Takto udržují rovnováhu mezi množstvím vytvořených a inaktivovaných enzymů. Patří k nim plazmatické proteiny a inhibitory působící na povrchu endotelu. Přírodní inhibitory koagulace působí v koagulační kaskádě jak vnitřní, tak vnější cestou (Kvasnička, 2003; Penka et al., 2011; Kubisz et al., 2006).

Mezi základní přírodní inhibitory koagulace dle Penka et al. (2011); Kvasnička (2003); Sakalová et al. (2010) a Kubisz et al. (2006) patří:

Antitrombin (AT) je jednořetězcový glykoprotein syntetizovaný v játrech a endotelových buňkách. Patří mezi serpiny, jejichž úkolem je inhibovat serinové proteázy. Antitrombin váže trombin, FIXa, FXa, FXIa a FXIIa, s těmito faktory tvoří ireverzibilní komplexy a tím brání jejich uplatnění v koagulaci. Inhibiční aktivitu AT je možné zesílit změnou jeho konformace vazbou na heparin.

Heparin kofaktor II (HCII) je inhibitorem trombinu (FIIa), jež je syntetizován v mastocytech a má mnohem menší klinický význam než antitrombin. Stejně jako AT vytváří komplexy s trombinem. Jeho účinek je urychlován heparinem a především dermatansulfátem.

C1 inhibitor (C1INH) patří opět mezi serpiny a jedná se o inhibitor C1a složky komplementu a faktorů kontaktu (FXIIa, FXIa a kalikrein). Syntéza probíhá v játrech a je uvolňován v průběhu aktivace destiček.

Systém proteinu C je tvořen vitamin K-dependentními proteiny (protein C a jeho kofaktor protein S), trombomodulinem (TM), receptorem pro endotelový protein C (EPCR) a inhibitorem aktivovaného proteinu C. Tento systém je aktivován vazbou trombinu na TM v přítomnosti Ca^{2+} za tvorby komplexu trombin-trombomodulin. Takto vytvořený komplex inhibuje aktivitu trombinu a zároveň zajišťuje aktivaci proteinu C na aktivovaný protein C (APC). Za přítomnosti jeho kofaktoru, proteinu S, inhibuje FVIIIa a FVa. Pokud je ovšem molekula FV zmutována (FV Leiden), nedochází k její vazbě na APC a vzniká trombofilie.

Inhibitor cesty tkáňového faktoru (TFPI) je produkován endotelovými buňkami a při poranění se jeho hladina zvyšuje. Váže se na FXa a tím inhibuje jeho katalytickou roli v koagulační kaskádě. Cirkuluje v plazmě, kde je většinou navázán na lipoproteiny o nízké hmotnosti (LDL), v malém množství je vázán i na trombocyty, které jej uvolňují po stimulaci trombinem.

2 PATOFYZIOLOGIE HEMOSTÁZY

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení a zároveň schopnost udržet tekutost krve v neporušeném cévním řečišti. V případě narušení cévní stěny dochází k postupné zástavě krvácení, díky rovnováze mezi krevními destičkami, plazmatickými faktory a jejich inhibitory. V momentě narušení této rovnováhy může docházet ke krvácivým či trombotickým stavům (Pecka, 2004; Vokurka, 2008).

2.1 Krvácivé stavy

Krvácivé stavy jsou charakterizovány spontánními krvácivými projevy nebo krvácením. Vznikají po narušení hemostatické rovnováhy důsledkem poruchy hemostatických mechanismů. K těmto mechanismům řadíme: funkce cévní stěny a trombocytů, plazmatický koagulační systém a fibrinolytický systém (Pecka, 2004).

2.1.1 Trombocytopenie

Trombocytopenie je nejčastější poruchou srážení krve a nejčastější příčinou krvácení. Jedná se o snížený počet trombocytů v periferní krvi. Nachází se při hematologických a onkologických onemocnění, při onemocnění jater a sleziny, ale i při infekčních chorobách. Příčinou může být snížená tvorba trombocytů v kostní dřeni, imunitně způsobené zrychlené odbourávání trombocytů, splenomegalie (zvětšení sleziny) či naředění krve. Vyskytují se kožní a slizniční projevy ve formě modřin a purpur (tečkovité krvácení do kůže či sliznic). Časté je i krvácení z dásní, nosu, ženy mívají silnější menstruační krvácení a dochází k výraznému krvácení během chirurgických výkonů (Sakalová et al., 2010).

2.1.2 Trombocytopatie

Trombocytopatie nastává při nedostatečné funkci krevních destiček, a to buď s normálním, případně lehce sníženým či zvýšeným počtem trombocytů. Mohou být vrozené i získané. Vrozené trombocytopatie jsou velmi vzácné a většinou se projevují kožním a slizničním krvácením. Naopak získané trombocytopatie vznikají druhotně jako následek poruchy, jež ovlivňuje funkci krevních destiček. Krvácivé projevy získaných trombocytopenií nejsou moc výrazné a léčba nebývá nutná (Pecka, 2004).

2.1.3 Koagulopatie

Koagulopatie jsou krvácivé stavy, které vznikají při nedostatku jednoho nebo několika koagulačních faktorů či při zvýšených hladinách inhibitorů. Projevují se spontánním krvácením do kůže a tkání. Stanoví se přímým vyšetřením hladiny faktorů a při léčbě se podávají krevní deriváty (Pecka, 2004).

2.1.3.1 Hemofilie

Hemofilie se řadí mezi dědičné krvácivé choroby a je jednou z nejčastějších vrozených poruch krevní srážlivosti. Jsou charakterizované spontánními, opakovanými krvácivými stavy. Bez správné léčby vede krvácení do kloubů a svalů ke vzniku degenerativních kloubních změn. Při tvorbě primární zátky selhává sekundární hemostáza nedostatkem příslušného koagulačního faktoru a dochází tak ke zpomalení zástavy krvácení. Rozlišujeme typ hemofilie A a hemofilie B. Hemofilii A způsobuje nedostatek FVIII, hemofilii B způsobuje nedostatek FIX. Z klinického hlediska se onemocnění rozděluje na hemofilii lehkou, středně těžkou a těžkou. Dědičnost je vázaná na pohlavní chromozom X, tudíž jsou postiženi především muži než ženy. Ženy jsou přenašečky a mohou mít hemofilii v případě, že se u nich vyskytuje Turnerův syndrom. Děti krvácejí obvykle méně než dospělí. Hemofilie se léčí substituční metodou nahrazením nedostatečného faktoru (Kubisz et al., 2011; Penka et al., 2011).

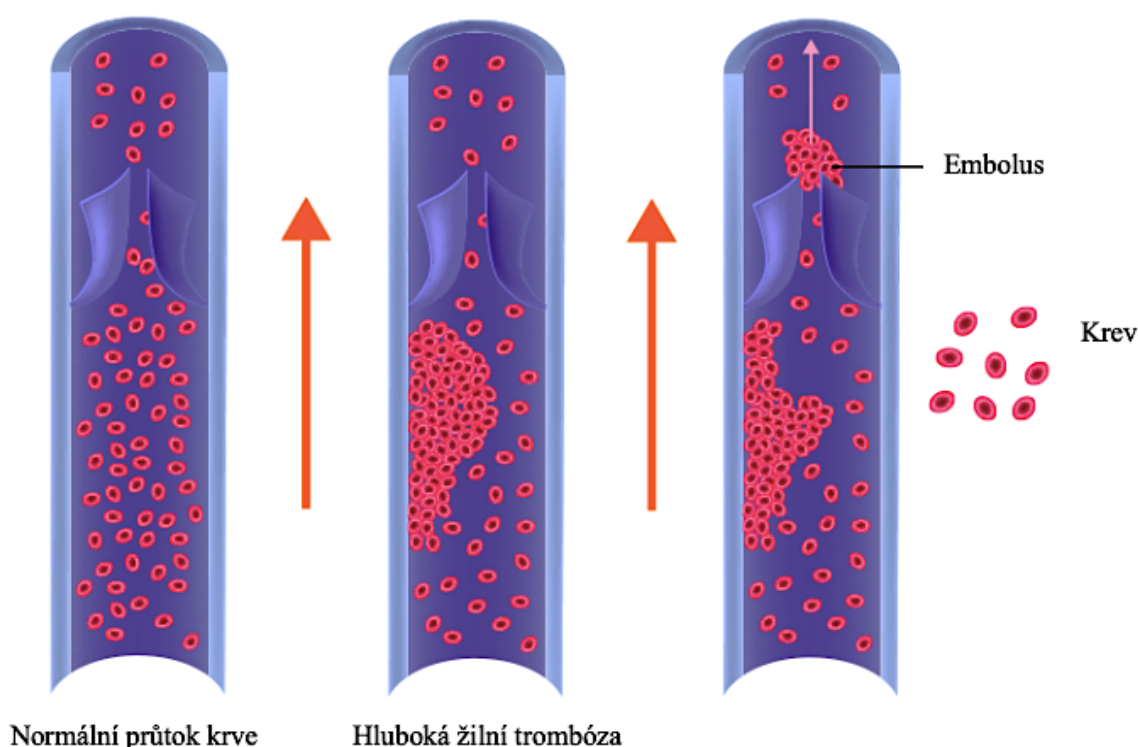
2.2 Trombofilní stavy

Trombofilie je stav charakterizovaný zvýšeným rizikem vzniku nadměrné krevní sraženiny. Představují opačný případ krvácivých stavů, u kterých se hemostatická rovnováha narušuje v opačném směru. Příčinou těchto stavů bývá porušení cévní stěny, špatné složení a funkce krve. Krevní sraženina neboli trombus může vzniknout kdekoli v těle, např. v hluboké žíle na dolní končetině (hluboká žilní trombóza), v koronární tepně (tepenná trombóza) nebo se část sraženiny může utrhnout a ucpat tepnu třeba v plicích (plicní embolie). Nejvýznamnější klinickou manifestací trombofilie je žilní trombóza (Penka et al., 2009; Pecka, 2004). Mezi získané trombofilní stavy řadíme antifosfolipidový syndrom (viz kapitola 3).

2.3 Trombotické stavy

Trombóza je proces, při kterém dochází ke vzniku krevní sraženiny (trombu) v cévním systému a může nastat jak v žilním (venózním) tak arteriálním řečišti. Příčinami vzniku žilní trombózy může být: snížená hladina inhibitorů krevního srážení, únik tkáňového faktoru do krevního oběhu, zpomalení cirkulace krve žilním řečištěm, hluboké a rozsáhlé poškození krevních kapilár nebo rozpad cévního endotelu vyvolaný bakteriemi, či jinými toxiny. Mezi rizikové faktory žilní trombózy patří obezita, větší chirurgické operace, vyšší věk, imobilizace, kouření, nádorová onemocnění či těhotenství.

Při arteriální trombóze dochází k akutnímu uzávěru, který přichází velmi náhle. Uzávěrem krevního proudu vzniká hypoxie, to může vést k ischemii až k nekróze. Příčinou uzavření krevního proudu je embolizace, buď srdečním trombem, který vznikl při infarktu myokardu, srdečním selhání či onemocněním chlopní, nebo embolus může mít původ v aterosklerotickém plátu, který se odlomí a v tomto místě způsobí akutní uzávěr. Rizikovými faktory arteriální trombózy jsou vyšší věk, kouření, vysoký krevní tlak, hypercholesterolémie či diabetes mellitus (Anděl, Gregor et al., 2001; Pecka, 2004).



Obrázek 3 Schéma vzniku hluboké žilní trombózy

Převzato a upraveno z: <http://rshaheenvascular.com/specialty/deep-venous-thrombosis-dvt/>

3 Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom (APS) je autoimunitní onemocnění, které se manifestuje trombotickými komplikacemi jak v arteriálním, tak v žilním řečišti včetně těhotenských komplikací, jako je potrácení, nedonošení plodu nebo těžká preeklampsie. Jde o jeden z nejčastějších trombofilních stavů.

Příčinou vzniku syndromu je autoimunní produkce antifosfolipidových protilátek (APLA). Tyto látky vyřazují fosfolipidy z funkce v rámci koagulačních procesů a zasahují tak do procesu krevního srážení, kdy výsledkem tohoto působení bývá stav zvaný trombofilie (Pecka, 2004; Hirmerová 2010). U pacientů je onemocnění charakterizováno protilátkami typu lupus antikoagulans (LA) a protilátkami proti kardiolipinu (ACLA) resp. β_2 glykoproteinu I. Tyto antifosfolipidové protilátky musí být laboratorně opakovaně prokázány (minimální odstup 12 týdnů) – buď koagulačními testy (LA) nebo imunometodami (ACLA). Patofyziologicky se protilátky projevují potlačením inhibiční cesty proteinu C, což vede k manifestaci trombotických komplikací.

Antifosfolipidový syndrom se většinou vyskytuje u lidí ve středním až starším věku, vyskytuje se 2-5x častěji u žen než u mužů. Výskyt APS se odhaduje přibližně 5 případů na 100 000 osob/rok (Gómez-Puerta, 2014).

U pacientů s antifosfolipidovým syndromem se nacházejí trombózy cév a/nebo poruchy gravidity. V krvi jsou přítomné antifosfolipidové protilátky. Žilní trombózy u APS se nejčastěji diagnostikují v dolních končetinách jako hluboké žilní trombózy, nebo vzniká plicní embolie. Ovšem trombózy se mohou vyskytovat v celém žilním systému, např. arteriální trombóza u APS je nejčastější v mozkových arteriích, kde způsobuje cévní mozkovou příhodu (Kelling aj., 2012). Nejčastější klinické manifestace jsou znázorněny v tabulce č.2.

Méně častý je i katastrofický antifosfolipidový syndrom (CAPS), který bývá spojován s rozsáhlou trombotickou chorobou doprovázenou multiorgánovým selháním s vysokou mortalitou (Asherson et al., 2003).

Tabulka 2 Nejčastější klinické manifestace APS – převzato a upraveno dle Hluší aj. (2003)

Trombózy velkých cév	Hluboké nebo povrchové končetinové žíly, axilární, renální žíly
Neurologie	Migrenózní stavy, tranzitorní ischemie, cévní mozková příhoda, epilepsie, sclerosis multiplex, chorea, multiinfarktová demence
Kardiologie	Trombózy věnčitých tepen s ICHS, infarkt myokardu, plicní hypertenze, kardiomyopatie
Gastroenterologie	Buddův-Chiariho syndrom, trombózy jaterních žil, ischemie střevní
Nefrologie	Glomerulární trombózy, trombotická mikroangiopatie, maligní hypertenze
Endokrinologie	Adrenální trombózy a Addisonova choroba
Revmatologie	SLE-like syndrom, vaskulitis
Dermatologie	Sneddonův syndrom, kožní ulcerace, Raynaudův fenomén, tříštivé hemoragie
Oftalmologie	Arteriální nebo žilní okluze, aneurysmata, vaskulitis, akutní renální nekrózy, neuropatie optického nervu
Hematologie	Trombocytopenie
Chirurgie	Kostní nekrózy, postoperativní trombózy
Transplantace	Orgánové rejekce

3.1 Klasifikace a diagnóza APS

Pokud se APS vyskytne bez spojení s dalším chorobným procesem, je označován jako primární, zatímco sekundární APS se vyskytuje u lidí s jinými autoimunitními chorobami, jako je např. systémový lupus erythematoses (SLE), maligní onemocnění či infekce – viz tabulka č.3 (Carsons, 2004).

Diagnostická kritéria pro antifosfolipidový syndrom se dělí na klinická a laboratorní, k diagnóze je pak nutné splnění nejméně jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria. Dle Penka et al. (2009) zde patří:

- *Klinická kritéria*
 - Trombóza
 - Jedna či více klinických projevů arteriální či venózní trombózy, případně trombózy malé cévy v jakékoli tkáni či orgánu
 - Porucha těhotenství
 - Jedno či více nevyjasněných úmrtí morfologicky normálního plodu v nebo po 10. týdnu gravidity
 - Jedno či více předčasných narození morfologicky normálního novorozence před 34. týdnem těhotenství z důvodu těžké preeklampsie nebo placentární insuficience
 - Tři nebo více nevysvětlitelných spontánních potratů před 10. týdnem gravidity
- *Laboratorní kritéria*
 - Lupus antikoagulans
 - V plazmě prokázán víckrát v časovém odstupu 12 a více týdnů
 - Detekován dle doporučení Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu (ISTH)
 - Musí být provedeny screeningové, korekční a konfirmační testy
 - ACLA
 - Musí být prokázány v séru či plazmě víckrát v časovém odstupu 12 a více týdnů ELISA metodami
 - Výskyt izotypů IgG či IgM ve středním a vysokém titru protilátek
 - Anti β_2 -GP I
 - Musí být prokázány v séru či plazmě víckrát v časovém odstupu 12 a více týdnů ELISA metodou

Tabulka 3 Onemocnění provázená výskytem antifosfolipidových protilátek – převzato a upraveno dle Penka (2005)

Autoimunitní choroby	Malignity	Léky	Infekční choroby	Jiné stavy
SLE	Karcinomy (plíce, ledviny, prostata, děložní čípek, kůže, močový měchýř, střevo, jícn,)	fenothiaziny	malárie	renální selhání
RA	thymom	prokainamid	syfilis	
psoriatická artritida	melanom	interferon	lepra	
Sjögrenův syndrom	lymfom	interleukin 2	tuberkulóza	
sklerodermie	leukémie	chinin/chinidin	borelióza	
Behcethova choroba	myeloproliferace	hydralazin	salmonela	
vaskulitidy	Waldenströмова makroglobulinémie	estrogenní kontraceptiva	mykoplazmové infekce	
polymyalgie		kyselina valproová	streptokoky	
Crohnova choroba		streptomycin	stafylokoky	
diabetes mellitus		penicilin	hepatitidy	
AIHA		propranolol	HIV	

3.2 Léčba antifosfolipidového syndromu

Ideální léčba pacientů s APS je neustálým předmětem diskuzí, jelikož se jedná o vzácně se vyskytující autoimunitní onemocnění a je velice obtížné provést studie na tak malém počtu pacientů s APS. Důležitá je především primární prevence, kdy v úvahu jsou následující postupy dle Buliková & Penka (2009); Malíčková & Fučíková (2001):

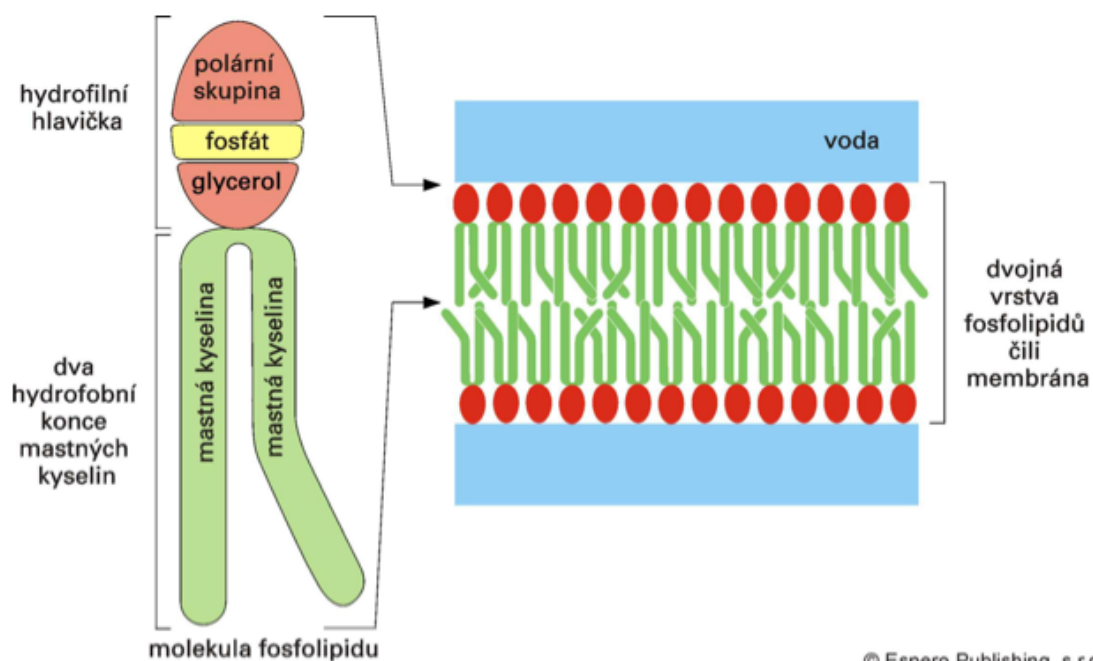
- *Žádná trvalá léčba*
 - Pacientům je doporučeno vyvarovat se dalších rizikových faktorů, jako např. kouření, obezita či orální kontracepce
 - Krátkodobá antitrombotická profylaxe obvykle nízkomolekulárním heparinem je zavedena při dalším navýšení trombofilního rizika – operace, úrazy či imobilizace
 - Nemocní by měli být pečlivě monitorováni
- *Kyselina acetylsalicylová (ASA)*
 - Patří k nejčastěji používané léčbě APS pomocí nízkých dávek aspirinu (75-100 mg denně)
 - Mechanismus účinku ASA spočívá v blokaci cyklooxygenázy a tím přerušení syntézy tromboxanu A₂ v trombocytech a v konečné fázi inhibice jedné z hlavních cest aktivace trombocytů
- *Antikoagulancia*
 - Největší roli má heparin, který se užívá především při akutních tromboembolických příhodách a obvykle po jeho podání následuje několikaměsíční léčba warfarinem
 - Účinek heparinu závisí na vazbě na plazmatický heparinový kofaktor – antitrombin III (ATIII), který inhibuje aktivovaný trombin a následně blokuje přeměnu fibrinogenu na fibrin
 - Warfarin je lék, jehož účinek je založený na blokaci účinku vitamínu K v organismu, vitamin K je důležitý pro tvorbu vitamin K dependentních koagulačních faktorů

Speciální postup terapie se provádí u gravidních žen s APS. Nejúčinnější léčbou se zde ukázaly vysoké dávky intravenózních imunoglobulinů, kdy u asi 85 % těhotných žen došlo k porodu zdravého plodu bez růstové retardace. Tato terapie je finančně náročná, kdy se u jedné ženy pohybuje ve statisících korun. U těhotných žen se při léčbě využívají také vyšší dávky kortikosteroidů, které ovšem vedou k častějším předčasným porodům.

3.3 Antifosfolipidové protilátky

Antifosfolipidové protilátky jsou heterogenní skupinou autoprotilátek, jež jsou charakterizovány náchylností k trombózám v žilním, tepenném či mikrocirkulárním řečišti a reprodukčními ztrátami. Ty z nich, které mají vztah k antifosfolipidovému syndromu (APS), rozpoznávají epitopy proteinů vázajících se na negativně nabitě fosfolipidové povrchy, jako jsou β 2-glykoprotein I (β 2GPI), protrombin, faktor V, protein C a S, trombomodulin, annexin V, vysoko- i nízkomolekulární kininogen a komplex FVII/FVIIa. Fosfolipidy jsou polární lipidy, které se částí formují do buněčné membrány (viz obrázek č.4). Negativně nabitými fosfolipidy jsou fosfatidylserin, fosfatidylinositol, kyselina fosfatidová a kardiolipin, zatímco fosfatidylcholin je neutrálně nabitý a fosfatidyletanolamin dipolární. Fosfolipidy mají za úkol jednak udržovat strukturu plazmatické membrány ve funkčním stavu a jednak je nutná jejich přítomnost ve vnějších, vnitřních i společných krocích aktivace koagulace (Penka & Buliková, 2009; Krejsek, 2004).

Antifosfolipidové protilátky se vyskytují ve třídách imunoglobulinů IgG a IgM, mohou se ovšem vyskytovat i ve třídě IgA, které ale nejsou diagnostickými kritérii APS (Bártková, 2010).



Obrázek 4 Schéma molekuly fosfolipidu – převzato od ALBERTS a kol. (1998)

3.3.1 Rozdělení antifosfolipidových protilátek dle metody detekce

Z diagnostického hlediska APS rozděluje antifosfolipidové protilátky na tři velké skupiny:

- Protilátky proti kardiolipinům (ACLA)
- Protilátky proti β_2 -glykoproteinu I (anti β_2 -GP I)
- Lupus antikoagulans (LA)

Pomocí ELISA metod můžeme diagnostikovat antikardiolipinové protilátky a protilátky proti β_2 -glykoproteinu I. Lupus antikoagulans se diagnostikují na základě jejich schopnosti ovlivňovat reakce krevního srážení, jež je závislé na fosfolipidech, tzv. koagulační reakce (Penka et al., 2011).

Protilátky proti kardiolipinům (antikardiolipinové protilátky = ACLA)

Antikardiolipinové protilátky řadíme do tříd IgG nebo IgM. Kardiolipin je mitochondriální fosfolipid z hovězího srdce (Roubey, 1994). Pokládají se za slabší rizikový faktor trombózy než LA a stejně jako s žilní trombózou bývají spojené s infarktem myokardu (Sakalová et al., 2010).

Protilátky proti β_2 -glykoproteinu I (anti β_2 -GP I)

Stejně jako předchozí skupina protilátek se řadí do třídy IgG nebo IgM. Je známo, že β_2 -glykoprotein I je hlavním cílovým antigenem, jež rozpoznávají antifosfolipidové protilátky (Rand, 2007). Zastupuje tak funkci tzv. plazmatického kofaktoru a pomocí něj se antifosfolipidové protilátky váží na fosfolipidové povrchy. Molekula β_2 -GP I je sestavena z 326 aminokyselin (AMK) a je rozdělena do 5 homologních domén. První čtyři domény jsou identické, kdy každá z nich obsahuje 60 AMK s velkým obsahem tryptofanu, cysteinu a prolinu. Nejdůležitější doména je pátá, která obsahuje sekvenci KNKEKK, jež je odpovědná za vazbu na negativně nabitý fosfolipid (Agar et al., 2010). Nejvíce jsou spojovány s trombózou. Choroby, které vznikají trombotickými komplikacemi, jsou způsobeny více protilátkami proti β_2 -GP I, které jsou namířeny proti epitopu, jež se nachází na první doméně (Keeling et al., 2012).

Lupus antikoagulans

Tímto termínem se vyznačují imunoglobuliny (IgG a IgM), které zasahují do procesu hemokoagulace *in vivo*. *In vitro* se projevuje jako koagulopatie v testech závislých na tromboplastinu, ale *in vivo* může jako součást APS paradoxně zvyšovat koagulaci a predisponovat tak k trombóze. Jedná se o skupinu protilátek, které soutěží s koagulačními faktory o negativně nabitě fosfolipidy, které fungují jako katalytické povrchy a dochází tak k prodloužení výsledných časů při koagulačních testech, např. aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT), trombinový test (TT), kaolinový test (KCT), reptilázový test (RT) nebo test s jedem Russelovy zmije (dRVVT). Pojem „lupus“ není úplně přesný, protože LA se nenachází pouze u pacientů s SLE a naopak pacienti s SLE nemusí být na LA pozitivní (Sakalová et al., 2010; Hirmerová, 2010).

3.3.2 Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek

Působení antifosfolipidových protilátek můžeme rozdělit na dva základní mechanismy. Mezi první mechanismus řadíme APLA, které ovlivňují kinetiku reakcí závislých na fosfolipidech, druhým mechanismem ovlivňují funkční nastavení částic nebo buněk (trombocytů, monocytů, neutrofilů, fibroblastů atd.). Antifosfolipidové protilátky také mohou svým působením ovlivnit komplementový systém, inhibovat fibrinolýzu, nebo dochází k blokaci antitrombotické funkce anexinu V (viz tabulka č. 4). Všechny tyto procesy pak vedou k protrombotickým, proateromatózním či protizánětlivým dějům, a tudíž dochází k různým klinickým manifestacím (Buliková et al., 2012).

Při působení APLA dochází v organismu ke změnám, které nevznikají z důvodu trombózy, ale tyto autoprottilátky působí přímo na různé buněčné struktury (receptory). Takto dochází k aktivaci buňky, nepřímému zásahu do imunitních reakcí či vznikne jiná funkční změna. Tato změna se v patofyziologii pravděpodobně týká reprodukčních ztrát nebo některých neurologických projevů (Buliková & Penka, 2006).

Tabulka 4 Mechanismy působení APLA – převzato a upraveno dle Penka et al., 2009)

Protilátka	Působení
β_2 -glykoprotein I	Inhibice aktivace PC, inhibice inaktivace Fva a FVIII cestou APC/PS, inhibice aktivace fibrinolýzy komplexem FXII/PK, inhibice aktivace AT mediované heparan sulfátem, potenciace aktivace trombocytů, potenciace tvorby Fxa na trombocytech, snížení volného PS cestou inhibice interakce β_2 -glykoproteinu I a C ₄ vázající protein
Anti-trombin/anti-protrombin	Vazba na trombinem aktivované destičky, inhibice uvolnění prostacyklinu pod vlivem trombinu, inhibice aktivace PC
Anti-protein C	Inhibice inaktivace Fva a FVIIIa cestou APC/PS, inhibice aktivace proteinu C
Anti-protein S	Inhibice inaktivace Fva a FVIIIa cestou APC/PS
Anti-fosfolipáza A ₂	Inhibice produkce prostacyklinu z endoteliálních buněk
Anti-trombomodulin	Inhibice aktivace PC
Anti-heparan-sulfát cévní stěny	Inhibice aktivace AT mediované heparan sulfátem
Anti-anexin V	Ovlivnění funkce placentárního antikoagulačního proteinu I (anexinu V) tvorbou komplexů, blokováním nebo odstraněním anexinu V z jeho přirozených míst v placentě

PC – protein C; PS – protein S; F – faktor; APC – aktivovaný protein C; AT – antitrombin, PK – prekalikrein

3.3.3 Laboratorní diagnostika antifosfolipidových protilátek

3.3.3.1 Diagnostika lupus antikoagulans

K laboratorní diagnostice LA se využívá schopnosti APLA *in vitro* prodlužovat koagulační testy závislé na fosfolipidech. Testy musí být pozitivní dvakrát v odstupu šesti a více týdnů. Diagnostické testy APLA můžeme rozlišit dle způsobu detekce na koagulační testy (pro LA) a na ELISA metody (ACLA a anti β_2 -GP I). Koagulační testy jsou mnohem komplikovanější než testování protilátek proti kardiolipinu a β_2 -glykoproteinu I, protože vyšetření LA vyžaduje rychlé zpracování plazmy (do hodiny) na bezdestičkovou plazmu pomocí centrifugačních metod a je tak znemožněna diagnostika vzorků do centrálních laboratoří. Plazma musí být bezdestičková, protože krevní destičky snižují APC-poměr (podíl hodnoty aPTT vyšetřované plazmy za a bez přítomnosti exogenního APC). Pokud plazma nebývá zpracována do hodiny, výsledky mohou být zkresleny vyvázáním inhibitoru na trombocyty a jejich fosfolipidy. Výsledky pak mohou být falešně negativní (Hluší et al., 2003; Buliková & Penka, 2006).

Diagnóza LA se potvrzuje p více než 12 týdnech od prvního pozitivního výsledku. Vyloučí se tak přechodné APLA, které jsou často přítomny u sekundárních infekcí či u jiného akutního onemocnění (Sangle et al., 2011).

V diagnostice LA se používají screeningové, korekční a konfirmační testy, kdy se vyšetření přímo řídí následujícími principy dle Penka et al. (2011), Sakalová et al. (2010):

1. *Screeningové testy* – průkaz patologie testů závislých na fosfolipidech
2. *Korekční testy (tzv. směsné testy)* – průkaz inhibitoru (vyloučení defektu faktoru, ovlivnění heparinem atd.)
3. *Konfirmační testy* – průkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru

Screeningové testy

Principem screeningových testů je závislost na fosfolipidech a citlivost na LA. Mezi tyto nejčastější testy patří aPTT, dRVVT s jedem Russelovy zmije, jež za přítomnosti Ca^{2+} a fosfolipidů aktivuje FX. Dále pak méně využívaným screeningovým testem je kaolinový čas, který se používá u těhotných žen a v neposlední řadě i reptilázový test. U všech testů je přítomnost inhibitoru typu LA identifikována na základě prodlouženého koagulačního času. Je nutné provést minimálně dva screeningové testy zajišťující prodloužení koagulačního času, protože tyto testy vykazují nízkou citlivost. Pokud se po přidání normální plazmy a fosfolipidů nezkrátí čas, je potřeba odlišit působení dalších faktorů, jakými jsou specifický inhibitor nebo heparin. Screeningové testy se vyhodnocují pomocí naměřeného koagulačního času (v sekundách) a poměru ($R = \text{Ratio}$) času testované plazmy k času kontrolní (normální) plazmy (Penka & Buliková, 2009).

- *Aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT)*

Jedná se o základní koagulační test, který má za úkol monitorovat vnitřní koagulační systém, především FVII, FIX, FXI, FVIII a prekalikrein. Nejprve se k vyšetřované plazmě přidá parciální tromboplastin (kefalin) a Ca^{2+} (chlorid vápenatý) a dochází tak k aktivaci koagulačního systému vnitřní cestou. Pro urychlení aktivace je přidáván aktivátor, a to nejčastěji kaolin, křemičitany nebo polyfenoly. Výsledek se vyjadřuje v sekundách (norma 25-35 s) za který dojde ke koagulaci a v jednotkách Ratio ($R = \text{čas testované plazmy} / \text{čas kontrolní plazmy} - \text{norma} = 0,8-1,2$). Tento výsledek je prodloužený při vrozených či získaných defektech faktorů XII, XI, IX a VIII, HMWK, prekalikreinu, specifických inhibitorech a nespecificky je prodloužený u APLA typu LA. Při účinné antikoagulační léčbě heparinem je výsledkem hodnota $R = 1,8-2,0$ (Penka et al., 2011; Sakalová et al., 2010).

- *Test s jedem Russelovy zmijs (dRVVT)*

Je jedním ze screeningových testů, který je široce využíván v klinických laboratořích. Nejvíce je přínosný pro diagnostiku LA a jeho pozitivita je spojena s vyšším rizikem trombozy (Pengo et al., 2009). Vysoká citlivost dRVVT testu k LA je dána sníženým obsahem fosfolipidů a v přítomnosti protilátek typu LA dochází k výraznému prodloužení koagulačního času. Je tomu tak, protože enzym, jež je obsažen v jedu Russelovy zmijs, v přítomnosti fosfolipidů, kalciových iontů, protrombinu a FV přímo aktivuje FX. Aktivovaný FX následně za přítomnosti kefalínu štěpí protrombin na trombin, který aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin, čímž dochází ke vzniku fibrinové sraženiny. Lupus antikoagulans prodlužuje srážecí čas dRVVT (Pecka, 2010).

- *Kaolinový test (KCT)*

Další z méně častých screeningových testů je KCT, kdy se jedná v podstatě o aPTT bez přídavku aktivátoru. Jeho velice citlivý na množství krevních destiček v plazmě a používá se především u těhotných žen. V případě prodloužení koagulačního času dochází ke korekci normální plazmou v poměru 1:1 a vyšetření se musí provést ihned po smísení nebo maximálně po 1-2 hodinové inkubaci. Pokud nedojde ke zkrácení koagulačního času, jedná se pravděpodobně o přítomnost LA v organismu.

- *Reptilázový test*

Jednoduchý test, který v citrátové plazmě měří rychlost přeměny fibrinogenu na fibrin po přidání reptilázy. Reptiláza je hadí jed (*Bothrops atrox*), který vykazuje podobnou aktivitu jako trombin. Na rozdíl od něj však její působení není ovlivněno přítomností heparinu, a proto se využívá ke zjištění vlivu heparinu na prodloužené aPTT a TT (Sakalová et al., 2010).

Korekční testy (směsné testy)

Směsné testy se používají k potvrzení přítomnosti inhibitoru typu LA, pokud jsou prodloužené screeningové testy (tzn., poměr časů testované plazmy k času normálu je větší než 1,2). Zahrnují aPTT i dRVVT testy. Testování se provádí se směsí pacientovy a normální plazmy v poměru 1:1, proto v některých literaturách nacházíme korekční testy zvané jako směsné testy. Ve výsledku ani po přidání stejného množství normální plazmy k plazmě pacienta nedochází ke zkrácení prodloužených koagulačních časů. Prodloužení výsledných časů směsných testů může být zapříčiněno přítomností heparinu, inhibitorů koagulačních faktorů nebo defektem faktorů (Bulíková & Penka, 2006; Tripodi et al., 2011).

Konfirmační testy

Provádí se tehdy, pokud nedochází ke korekci prodloužených časů ve směsných testech, za použití vyššího obsahu fosfolipidů, neutralizací destičkovými fosfolipidy nebo za použití reagentie nezávislé na LA. Pokud je LA prokázán v předchozích testech, zvýší se koncentrace fosfolipidů, dochází k neutralizaci LA a ke zkrácení koagulačních časů (Penka & Buliková, 2009).

Mezi konfirmační testy patří destičkový neutralizační test (PNP – Platelet Neutralisation Procedure) nebo HNP testy (Hexagonal Phospholipid Neutralisation), které jsou na bázi aPTT využívající schopnost PL v hexagonální fázi vázat LA.

Pokud je konfirmační test pozitivní, potvrzuje přítomnost inhibitoru typu LA. Také lze využít testů s hadími jedy, jako např. textarinový čas (závislý na PL) a ekarinový čas (nezávislý na PL, určený pouze k vyloučení vlivu heparinu). Následně se vyhodnocuje poměr časů textarin/ekarin, tedy čas screen/čas confirm s referenční mezí do 1,2 (Penka et al., 2011).

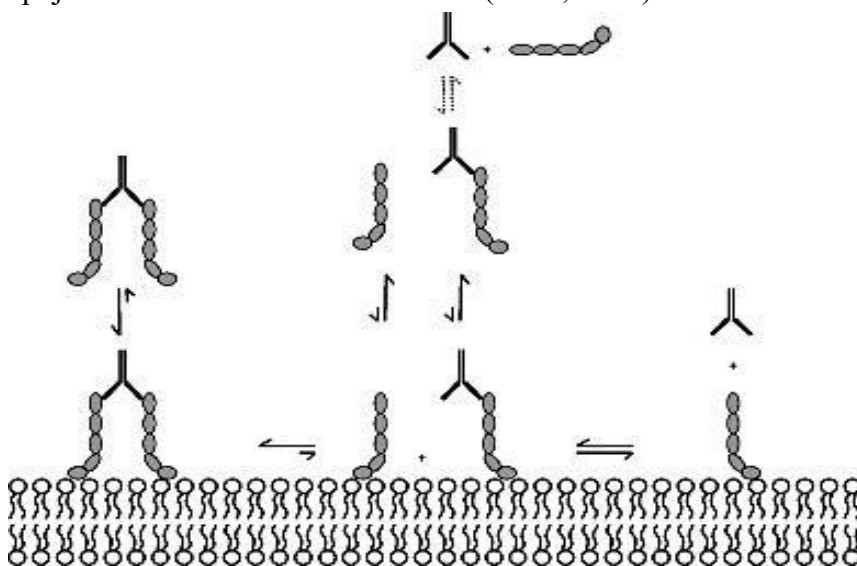
○ *Destičkový neutralizační test (PNP)*

Jedná se o konfirmační test, který je používán k diagnostice LA, jehož principem je schopnost PL krevních destiček neutralizovat inhibitory typu LA a tím zkracovat čas aPTT. Fosfolipidy trombocytů lze získat buď promytím trombocytů s kalciovým ionoforem či opakovaným zmražením a rozmražením, čímž dochází k vystavování aniontových PL na povrchích krevních destiček. Ke zkrácení koagulačních časů dochází, pokud je přítomný LA (Pecka, 2010).

3.3.3.2 Diagnostika kardirolipinových protilátek a protilátek proti β_2 -GP I

Pro laboratorní stanovení hladin IgG a IgM antikardirolipinových protilátek a protilátek proti β_2 -GP I se používají chemiluminiscenční ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testy (Miyakis et al., 2006). Jedná se o tzv. sendvičovou techniku, kdy se nejprve ELISA destička pokryje buď β_2 -GP I nebo aniontovým fosfolipidovým kardirolipinem. Poté se přidá sérum pacienta v předem určeném ředění (1:50) a následně se aplikuje sekundárně značená protilátka, která tak umožní navázání izotypů IgG nebo IgM (Lakos et al., 2012). Mikrotitrační ELISA destičky se používají dvojího typu, jednak jsou to ozářené (vysoce citlivé) destičky a destičky s citlivostí nízkou. V případě detekce protilátek proti kardirolipinům se dokazuje přítomnost protilátek, které se váží přímo na kardirolipin a další aniontové PL. Detekovány jsou i protilátky, které se váží na β_2 -GP I, jež byl potažen na povrchu aniontového PL (Passam & Krilis, 2004). Teoreticky je antikardirolipinová ELISA méně specifická než anti- β_2 -GP I ELISA z důvodu, že ACLA ELISA detekuje nespecifické protilátky, které jsou v plazmě důsledkem různých infekcí (Hunt et al., 1992).

Testování těchto APLA je poměrně jednoduché, které je využíváno mnoha laboratořemi. Mezi hlavní nevýhody této metody patří nízká specifita, nejasnost v určování „cut off“ rozhraní, heterogenita výsledků mezi komerčně dodávanými diagnostickými sety, a především se tato metoda špatně standardizuje. Proto se na základě mezinárodních diagnostických kritérií provádí opakované testování (Buliková & Penka, 2006). Chybná diagnóza APS může nastat u pacientů, kteří mají zvýšenou hladinu ACLA (např. syfilis či lymfická borelióza). U těchto infekcí můžeme nalézt zvýšenou hladinu ACLA, ale nebývá spojována s rizikem vzniku trombóz (Rand, 2003).



Obrázek 5 Tvorba komplexů APLA/B2-GP I a jejich vazba na fosfolipidový povrch – převzato od Hirmerová(2010)

Vytvořený komplex, který má vysokou afinitu k PL povrchu, touto vazbou zabraňuje navázání koagulačních faktorů na stejný povrch – dochází k inhibici koagulace, a tedy k fenoménu „lupus antikoagulans“.

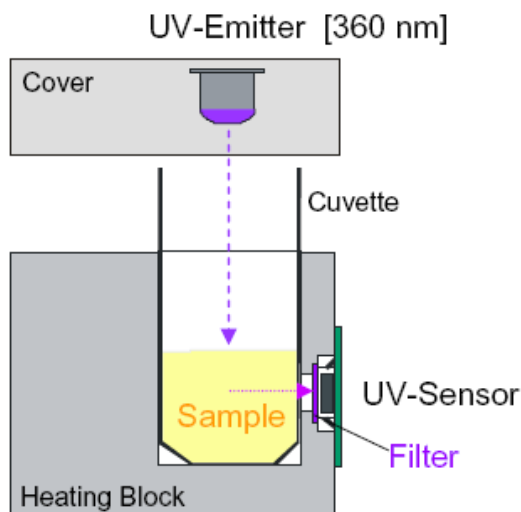
3.3.4 Nové globální testy

V nedávné době se začaly používat testy pro vyšetření celkové hemokoagulační funkce, které jsou schopné odhalit celkově snížený nebo zvýšený trombogenní potenciál krve. Tyto testy jsou založeny na principech klasických koagulačních vyšetření, ovšem navíc využívají i nejnovější techniky. Patří k nim např. trombin generační test (TGT), tromboelastografie (TEG) nebo koagulační vlnová analýza. Klasické koagulační testy jako aPTT či dRVVT měří čas do začátku koagulačního procesu, nové techniky jsou založeny na kvantitativním měření průběhu celého procesu srážení, přičemž odrážejí poměr mezi působením prokoagulačních a antikoagulačních procesů (Sakalová et al., 2010).

3.3.4.1 Trombin generační test

Test generace trombinu (TGT) je nová metoda vyšetření koagulace z pohledu celé koagulační kaskády. Je založena na fluorimetrickém stanovení generace trombinu v čase. Hlavní výhodou je, že se komplexní koagulace dá vyšetřit nezávisle na počtu trombocytů v plazmě i nezávisle na hladině tkáňového faktoru. Test je široce využíván v klinickém výzkumu k měření globálního trombogenního potenciálu při poruchách srážlivosti krve.

Trombin, jež je aktivní formou protrombinu, hraje důležitou roli v koagulaci, kde mimo jiné funkce působí jak prokoagulačně, tak antikoagulačně. Proto využíváme TGT, který je výkonným nástrojem pro získání celkové informace průběhu hemostázy. Principem metody je měření, kdy se k plazmě pacienta přidá fluorogenní substrát, který je po aktivaci koagulační kaskády přeměněn vznikajícím trombinem na fluorofor za přítomnosti fosfolipidů, tkáňového faktoru a Ca^{2+} . Výsledný signál je kontinuálně zaznamenáván fluorometrem a následně vyhodnocen příslušným softwarem. Přesněji se tedy měří fluorescence produktu aminometylkumarinu při vlnové délce 390/460 nm (excitace/emise), který vzniká přeměnou fluorogenního substrátu působením trombinu (Baglin, 2005; Hemker et al., 2004).

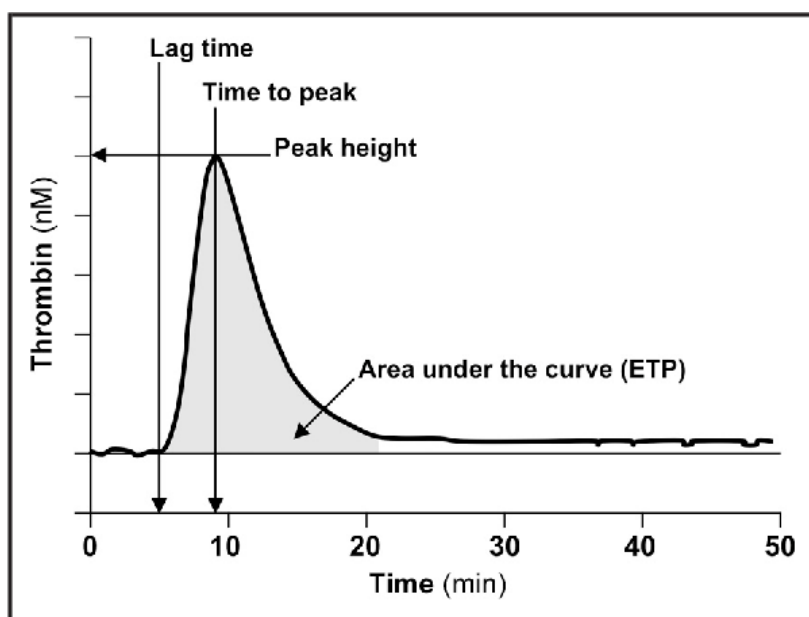


Obrázek 6 Průchod paprsku reakční kyvetou

Převzato z http://www.technoclone.com/pdf/folder/files/TGA001E.012_Technothrombin TGA.pdf

Výsledkem tohoto testu je trombinogram, graf závislosti koncentrace trombinu v plazmě pacienta (v nM) na čase (v min). Dle Pecka (2010) a Penka et al. (2014) z něj můžeme vyčíst několik důležitých hodnot:

- *Lag time (min)* = čas do vytvoření detekovatelné koncentrace trombinu (iniciační fáze)
- *Time to peak (min)* = čas do dosažení maximální koncentrace trombinu
- *Peak (nM)* = maximální dosažená koncentrace trombinu
- *AUC (plocha pod křivkou)* = celkové množství vytvořeného trombinu
- *VI (Velocity index)* = rychlost nárůstu generace trombinu



Obrázek 7 Trombinogram – závislost množství trombinu na čase

Převzato z <https://academic.oup.com/clinchem/article/62/5/699/5611759>

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1 PŘÍSTROJE A MATERIÁL

- Koagulační analyzátor Ceveron® Alpha, Technoclone, Rakousko – plně automatizovaný moderní přístroj, na kterém je možné provádět koagulační, chromogenní, turbidimetrické a fluorometrické měření. Vestavěný fluorescenční reader pracuje s excitační vlnovou délkou 360 nm a emisní vlnovou délkou 465 nm.
- Automatické pipety 1000 µl – Eppendorf AG, Hamburg, Německo
- Ledničky (4-8 °C) a mrazící boxy (-20 °C, -80 °C)
- Laboratorní sklo a plastové stojánky
- Krevní plazma chudá na krevní destičky

2 DIAGNOSTIKA A REAGENCIE

- Destilovaná voda
- Roztok CaCl_2 – 25 mM
- Vyšetřovací kit Technotrombin TGA, Technoclone, Rakousko – soubor reagensů pro fluorescenční měření generace trombinu v plazmě po aktivaci koagulační kaskády prostřednictvím směsi fosfolipidů a tkáňového faktoru
 - LOW RC Technotrombin TGA – 5 pM rekombinační lidský tkáňový faktor s negativně nabitými fosfolipidy (nízká koncentrace fosfolipidových micel)
 - Reaction BUF Technotrombin TGA – reakční pufr
 - SUB Technotrombin TGA – 1 mM fluorogenní peptidový substrát Z-Gly-Gly-Arg-AMC
- TGA Technotrombin calibrator – 1nM trombinový kalibrátor
- Ceveron promývací roztok

3 PREANALYTICKÁ FÁZE

3.1 Odběr vzorku

Nejprve byly vzorky krve odebrány do zkumavek, ve kterých se nacházelo nesrážlivé činidlo, tedy citrát sodný. Vzhledem k tomu, že jsou výsledky koagulačních testů závislé na poměru Ca^{2+} iontů a Ca^{2+} chelatačního roztoku, je nutné provést optimalizaci množství citrátu sodného v odběrovce dle vzorce:

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

Odebraný vzorek musí být patřičně označen štítkem s celkovou identifikací pacienta, tj. příjmení, jméno a rodné číslo pacienta.

3.2 Zpracování vzorku (centrifugace)

Jednotlivé vzorky pacientů jsou následně zcentrifugovány, aby se odstranily krevní buňky od plazmy. Centrifugace probíhá 15-20 minut při 2500-3000 g pro získání plazmy chudé na krevní destičky. Pro co nejmenší obsažené množství trombocytů v plazmě ($< 10 \text{ G/l}$) se centrifugace opakuje, abychom předešli vzniku falešně negativním výsledkům.

3.3 Uchování vzorku

Získanou plazmu pacientů je nutné zpracovat nejpozději do 2 hodin od separace pro co nejideálnější výsledky, případně jde oddělená plazma v aliquotech uchovat a zamrazit při -20°C . Není doporučováno opětovné zmrazování a rozmrazování vzorků. Před vyšetřením je třeba vzorek vytemperovat v termostatu (vodní lázni) při teplotě 37°C po dobu 5 minut, aby mohlo dojít k následnému měření a stanovení.

3.4 Vlastní měření – příprava reagensů

Reagencie byly nejprve rozpuštěny v požadovaném množství destilované vody (viz tabulka č. 5). Po úplném rozpuštění byly reagencie vloženy na své přesné pozice do přístroje Ceveron Alpha a připraveny k použití.

Tabulka 5 Příprava reagensů na TGT

Reagencie	Množství vody (ml)
SUB Technotrombin TGA	3
Reaction BUF Technotrombin TGA	1
RC LOW Technotrombin TGA	1

4 SOUBOR PACIENTŮ

Tato práce byla postavena na souboru pacientů s podezřením na přítomnost lupoidních antikoagulancí a antifosfolipidových protilátek, tedy protilátek proti kardiolipinu a β_2 -glykoproteinu I. Bylo hodnoceno 152 pacientů, z toho 121 žen a 31 mužů. Ženy měly průměrný věk 48 let, zatímco průměrný věk mužů byl o 10 let vyšší. U všech pacientů byl proveden trombin generační test pomocí fluorogenní detekce vznikajícího trombinu za aktivace různých typů a koncentrací fosfolipidů. Následně byla zjišťována vzájemná korelace jednotlivých vyšetřovaných antifosfolipidových protilátek spolu s výsledky trombin generačního testu.

5 METODIKA

Tato diplomová práce navazuje na Bc. práci, kde jsem detailně vyšetřovala kardiolipinové protilátky a protilátky proti β_2 -glykoproteinu I.

5.1 Trombin generační test

Trombin generační test (TGT) se řadí mezi globální funkční testy analyzující a monitorující systém hemostázy za použití speciálního fluorometru. Při samotném vyšetření se používá citrátová plazma, která je chudá nebo bohatá na krevní destičky.

Trombin, jež je aktivní formou protrombinu, je velice důležitý při aktivaci krevního srážení, zároveň je zprostředkovatelem inhibice hemostatických pochodů a uplatňuje se i v mezibuněčné signalizaci, fibrinolýzy a zánětlivých procesech.

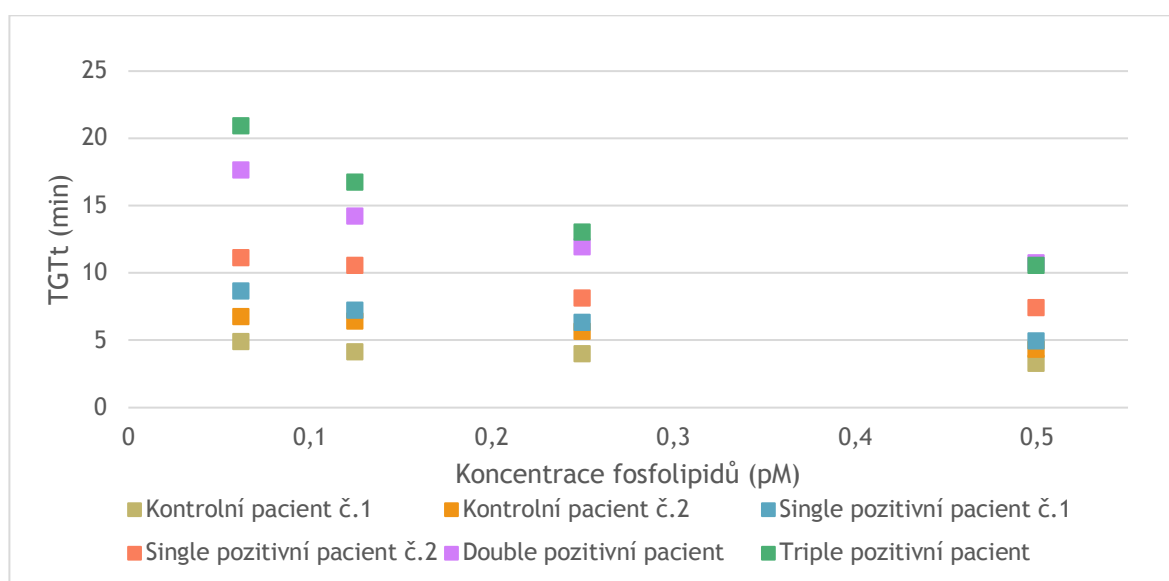
Pro měření se využívá plně automatický a kompaktní přístroj Ceveron Alpha od firmy Technoclone, Rakousko, měřící koagulaci z hlediska celkové koagulační kaskády. Principem TGT testu je sledování tvorby trombinu v čase na základě aktivace koagulační kaskády lidským tkáňovým faktorem (TF), které nás informuje o aktuálním obrazu hemostázy. Reakce probíhá za účasti negativně nabitých fosfolipidů a Ca^{2+} . Princip samotné metody spočívá v měření fluorescence produktu aminometylkumadinu, který se vytváří přeměnou fluorogenního substrátu působením trombinu. Fluorescence je vyvolána dopadajícím monochromatickým zářením o vlnové délce 360 nm, které vyvolá emisi záření o vlnové délce 460 nm. Toto záření je poté snímáno detektory. Ve skutečnosti není fluorogenní signál přímo úměrný aktivitě trombinu (závisí např. na barvě plazmy), proto je nutné používat trombinový kalibrátor. Jedná se o modifikovaný trombin, který je schopen přeměňovat fluorogenní substrát a ve výsledku se sám koagulační kaskády neúčastní.

Výsledkem tohoto měření je křivka – trombinogram, který popisuje generaci trombinu v čase ve srážející se plazmě. Tato křivka je charakterizována třemi hlavními parametry: lag fáze (doba do nástupu generace trombinu), peak (maximální koncentrací trombinu) a plochou pod křivkou, která vyjadřuje celkové množství vzniklého trombinu. Při nevhodné generaci trombinu tak může docházet k patologickým stavům, tzn. krvácivým a trombotickým onemocněním.

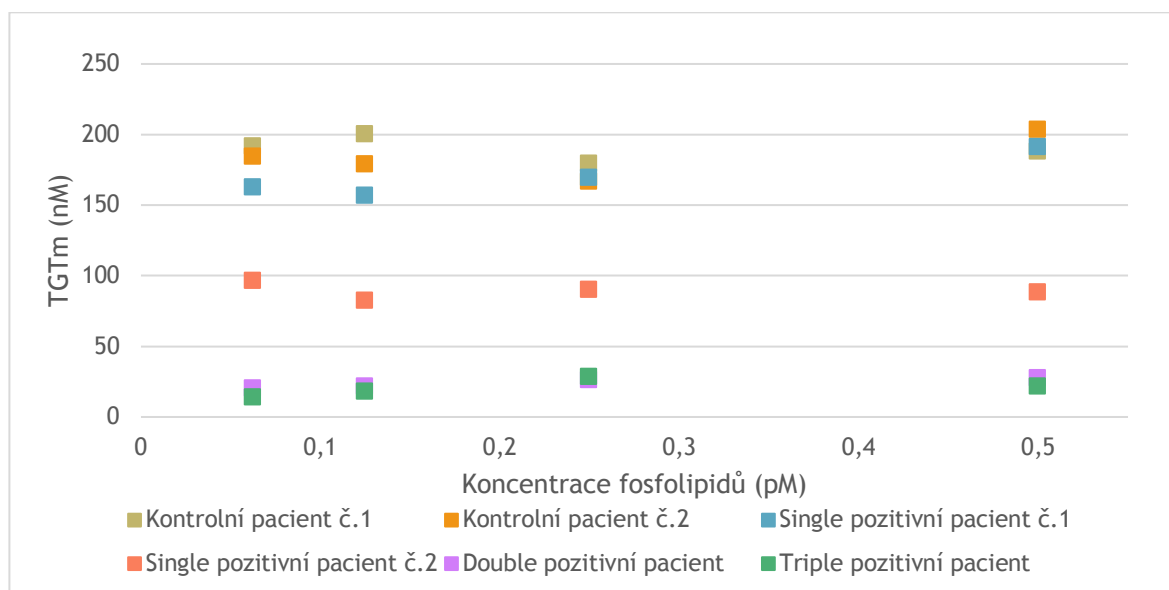
6 VÝSLEDKY

6.1 Optimalizace metody

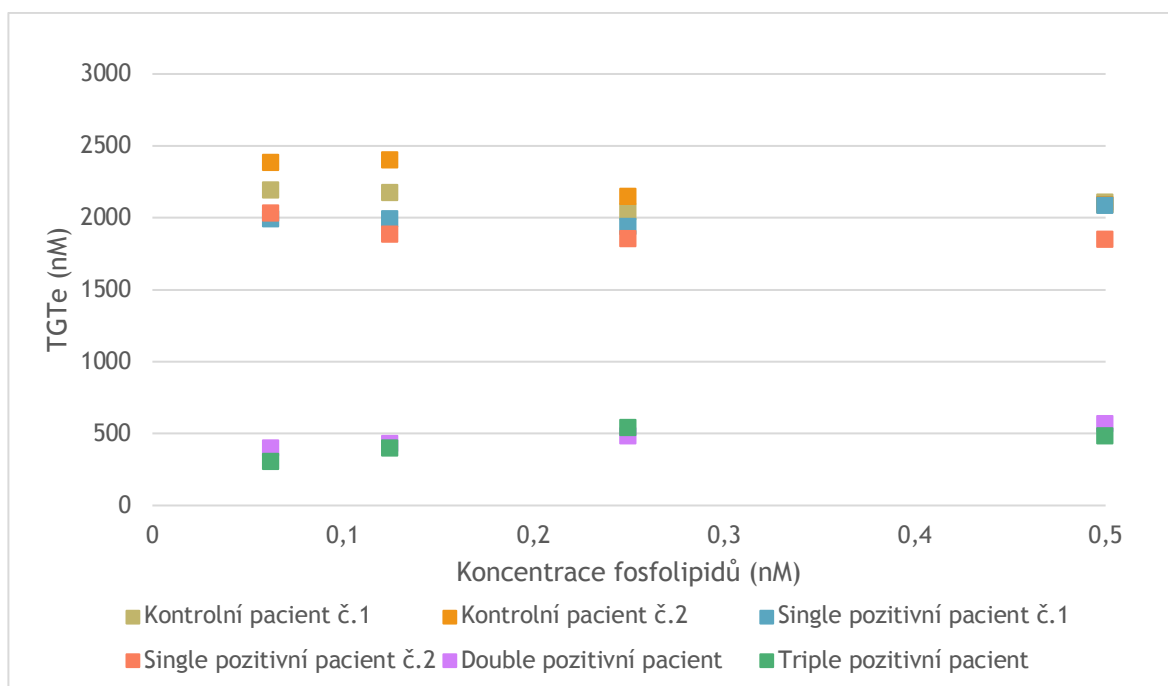
Výsledky optimalizace metody trombin generačního testu je znázorněno na následujících třech grafech, kde jsou uvedena data jednotlivých parametrů pro negativní a různě (několikanásobně) pozitivní pacienty. Na všech následujících grafech můžeme vidět, že hodnoty triple pozitivních pacientů jsou jednoznačně vyšší než u kontrolních pacientů. Double a single pozitivní pacienti mají pak sestupné hodnoty vzhledem ke kontrolním pacientům. Pouze na obrázku č.8 u měřeného parametru Lag time vidíme, že s postupně se zvyšující koncentrací se zkracuje čas do vytvoření první generace trombinu, zatímco na dalších dvou grafech se hodnoty téměř nevychylují.



Obrázek 8 Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů mezi různými koncentracemi fosfolipidů s naměřenými hodnotami TGTt



Obrázek 9 Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů mezi různými koncentracemi fosfolipidů s naměřenými hodnotami TGTm



Obrázek 10 Grafické znázornění vzájemné korelace a porovnání výsledků pacientů mezi různými koncentracemi fosfolipidů s naměřenými hodnotami TGTe

6.2 Měřené hodnoty pacientů

V této kapitole je vyšetřovaný soubor 152 pacientů se suspekci na přítomnost sledovaných protilátek shrnut v tabulce, kde jsou uvedena naměřená data jednotlivých testů včetně positivity (červeně) či negativity. Taktéž se v tabulce nachází výsledky optimalizované metody trombin generačního testu. Všechny vzorky pacientů pro měření trombin generačního testu byly odebrány v rozmezí duben–říjen 2019. Po získání všech naměřených hodnot byli pacienti rozděleni na základě počtu pozitivit ve vyšetřovaných parametrech. Následně jsou hodnoty graficky znázorněny a porovnány na základě dvou různých koncentrací fosfolipidů spolu s kontrolními, single, double a triple pozitivními pacienty. Největší rozdíly byly viděny mezi kontrolními a triple pozitivními pacienty u parametru Lag time, u kterých se tento čas s postupně zvyšující se koncentrací zkracoval téměř o polovinu.

Tabulka 6 Hodnoty antifosfolipidových protilátek u všech testovaných pacientů

Číslo pacienta	Vzorek	LA	Antikardiolipiny		Anti-β ₂ -glykoprotein		TGT		
	Koncentrace (pM) 0,06 (1) 0,5 (2)		ACLA IgG (U/ml)	ACLA IgM (U/ml)	B2 IgG (U/ml)	B2 IgM (U/ml)	TGT t (min)	TGT max (nM)	TGT e (nM)
1	1	negativ.	3,6	4,7	< 6,4	< 1,1	8,3	113,2	2134,2
	2						4,8	49,6	1076,1
2	1	negativ.	5,9	2,1	9,8	< 1,1	10,2	22,7	684,6
	2						5,4	33,6	718,2
3	1	negativ.	5,9	2,1	9,8	< 1,1	16,8	3,5	59,6
	2						7,0	12,7	293,6
4	1	negativ.	< 2,6	1,8	< 6,4	< 1,1	8,0	59,8	867,3
	2						4,4	66,8	880,9
5	1	negativ.	5,7	2,6	< 6,4	< 1,1	7,5	51,2	1138,9
	2						4,2	74,7	1173,0
6	1	negativ.	< 2,6	5,3	< 6,4	2,6	8,5	34,7	863,4
	2						3,9	66,4	1012,9
7	1	negativ.	11,2	3,9	51,4	1,7	8,7	17,4	531,1
	2						5,3	35,6	816,9
8	1	negativ.	< 2,6	5,3	< 6,4	2,6	8,1	47,7	804,6
	2						5,3	56,3	701,7
9	1	negativ.	< 2,6	5,3	< 6,4	2,6	5,3	128,7	1184,3
	2						4,6	44,7	698,1
10	1	negativ.	5,6	117,6	6,4	199,0	10,7	28,3	719,0
	2						5,8	45,0	874,6
11	1	negativ.	5,6	4,7	6,4	1,8	10,4	16,1	436,6
	2						5,0	44,7	953,8
12	1	pozitiv.	89,6	5,3	447,1	2,3	13,0	51,8	1192,0
	2						7,0	74,0	1343,4
13	1	negativ.	4,9	2,8	< 6,4	< 1,1	10,2	113,4	2141,9
	2						6,4	130,5	1988,3
14	1	negativ.	4,9	2,8	< 6,4	< 1,1	8,2	150,1	2306,3
	2						4,8	147,5	2239,6
15	1	negativ.	< 2,6	6,9	< 6,4	3,8	10,7	114,3	2173,9
	2						6,3	107,4	2147,7
16	1	negativ.	< 2,6	6,9	< 6,4	3,8	9,5	159,3	2639,1
	2						5,5	225,3	2844,2
17	1	negativ.	< 2,6	6,9	< 6,4	< 1,1	11,1	106,7	2063,3
	2						6,2	153,1	2065,4
18	1	negativ.	6,3	2,3	< 6,4	1,2	9,1	70,7	1567,7
	2						5,0	131,7	1953,7
19	1	pozitiv.	2,9	6,5	7,1	1,3	7,8	236,8	2875,6
	2						5,1	187,2	2775,4
20	1	negativ.	23,5	3,5	6,7	1,2	5,5	209,6	2628,3
	2						3,1	201,5	2698,4
21	1	negativ.	9,5	2,5	< 6,4	< 1,1	7,2	189,5	2338,7
	2						5,7	113,8	1744,5
22	1	pozitiv.	4	2,5	< 6,4	< 1,1	10,9	138,7	2249,4
	2						7,0	146,7	2131,0

23	1	negativ.	8,2	7,3	27,2	8,6	12,1	42,0	909,5
	2						5,6	57,9	840,9
24	1	negativ.	2,8	2,5	< 6,4	2,5	8,7	122,3	2001,4
	2						5,1	147,7	1891,9
25	1	negativ.	7,7	29,6	7,3	5,8	6,9	41,5	873,9
	2						4,0	56,8	769,2
26	1	negativ.	2,6	5,6	< 6,4	5,6	10,2	34,4	806,4
	2						5,9	40,1	641,1
27	1	negativ.	6,3	2,0	7,2	2,0	9,2	118,7	1768,5
	2						5,8	45,1	1225,5
28	1	negativ.	9,1	4,0	9,6	< 1,1	7,7	133,6	2179,1
	2						4,6	116,4	1767,2
29	1	pozitiv.	< 2,6	89,8	< 6,4	4,0	12,9	17,4	427,1
	2						7,8	31,2	727,1
30	1	pozitiv.	15,1	4,0	30,4	< 1,1	11,0	6,8	146,2
	2						8,0	24,5	574,1
31	1	pozitiv.	6,9	78,1	7,2	1,2	6,0	20,9	549,6
	2						2,5	52,0	1079,1
32	1	negativ.	3,7	1,2	< 6,4	< 1,1	10,0	82,4	1443,4
	2						4,9	69,8	1117,7
33	1	negativ.	3,8	6,1	< 6,4	3,3	9,4	63,7	1330,4
	2						6,0	73,3	1181,6
34	1	negativ.	13,4	41,3	6,7	2,9	11,5	48,2	1258,0
	2						6,9	58,2	1440,4
35	1	negativ.	4,5	4,6	7,9	< 1,1	10,8	60,2	1166,2
	2						5,5	112,9	1280,0
36	1	negativ.	3,4	9,6	8,1	3,2	5,2	218,1	2103,6
	2						4,5	92,6	1565,7
37	1	pozitiv.	9,4	33,4	23,5	6,4	10,2	44,0	1021,7
	2						5,5	86,8	1399,2
38	1	negativ.	4,2	2,8	< 6,4	< 1,1	9,2	34,3	759,4
	2						4,9	36,9	723,5
39	1	negativ.	43,8	2,6	116,4	< 1,1	10,6	22,8	548,6
	2						5,2	54,6	1004,4
40	1	negativ.	< 2,6	2,6	< 6,4	< 1,1	7,0	103,0	1414,6
	2						4,5	122,6	1494,6
41	1	negativ.	9	2,2	7,8	< 1,1	4,3	234,4	1909,4
	2						2,5	367,1	2026,5
42	1	negativ.	9,9	1,7	< 6,4	< 1,1	10,2	275,8	2212,5
	2						5,1	331,1	2238,5
43	1	negativ.	< 2,6	1,3	< 6,4	< 1,1	8,0	56,5	854,5
	2						5,5	62,5	847,0
44	1	negativ.	3,5	4,2	< 6,4	< 1,1	8,5	68,6	1087,7
	2						4,4	98,0	1221,8
45	1	negativ.	3,5	4,3	< 6,4	< 1,1	7,6	74,6	1372,2
	2						4,6	92,0	1350,1
46	1	negativ.	44,5	3,4	< 6,4	< 1,1	8,7	70,2	1392,4
	2						4,9	80,0	1249,2

47	1	negativ.	16	4,3	40,7	< 1,1	4,9	379,2	2863,1
	2						2,5	530,9	211,7
48	1	negativ.	3,6	5,2	< 6,4	1,6	12,8	177,8	2147,9
	2						5,9	328,4	2305,8
49	1	negativ.	4,1	2,1	< 6,4	1,6	8,4	675,3	3148,1
	2						4,2	546,9	2956,5
50	1	negativ.	3,6	1,3	< 6,4	< 1,1	5,0	297,6	3293,1
	2						2,9	409,5	3087,3
51	1	negativ.	4,6	1,7	< 6,4	< 1,1	3,5	383,6	3099,8
	2						2,1	451,4	2828,3
52	1	pozitiv.	8,5	2,1	< 6,4	< 1,1	5,9	263,0	3137,5
	2						2,5	486,4	3312,0
53	1	negativ.	17,2	1,1	< 6,4	< 1,1	7,6	387,9	2502,0
	2						3,8	335,1	2539,8
54	1	pozitiv.	25,9	77,3	9,7	63,4	9,5	116,5	2198,6
	2						4,3	208,2	2523,1
55	1	negativ.	3,5	2,0	< 6,4	< 1,1	10,4	452,6	3067,2
	2						4,8	430,9	2802,0
56	1	negativ.	3,5	2,0	< 6,4	< 1,1	4,2	387,3	3126,6
	2						3,6	362,8	2640,8
57	1	negativ.	15,8	< 1,0	8,9	< 1,1	5,8	245,6	2449,6
	2						3,5	209,1	2351,6
58	1	negativ.	8,4	59,4	8,9	95,0	4,9	229,2	2438,8
	2						3,2	362,8	2296,2
59	1	negativ.	7,7	1,6	8,9	< 1,1	8,9	263,1	1674,9
	2						5,3	299,2	1548,5
60	1	negativ.	9,3	9,4	< 6,4	9,6	9,8	77,8	1475,6
	2						3,9	168,0	1725,1
61	1	negativ.	5,3	1,5	< 6,4	< 1,1	6,7	167,1	2480,6
	2						3,2	143,7	2274,9
62	1	negativ.	8,6	2,5	< 6,4	< 1,1	7,1	133,3	2216,8
	2						3,7	240,1	2520,4
63	1	negativ.	98,7	2,9	7,4	2,2	7,6	103,1	1938,6
	2						4,1	131,8	1893,9
64	1	negativ.	5,7	8,9	9,0	4,1	7,1	273,1	2644,7
	2						3,6	321,4	2644,7
65	1	negativ.	9,1	2,4	< 6,4	< 1,1	10,1	186,7	1903,1
	2						4,9	213,1	1867,5
66	1	negativ.	12,7	2,4	32,9	< 1,1	9,8	168,8	2390,6
	2						4,5	176,4	2370,6
67	1	negativ.	2,7	6,1	< 6,4	1,4	7,9	129,5	2139,3
	2						3,9	178,7	2120,4
68	1	negativ.	9,8	4,3	< 6,4	< 1,1	9,2	387,1	3465,2
	2						5,1	531,1	3608,2
69	1	negativ.	16,8	2,2	< 6,4	< 1,1	11,2	207,6	2649,5
	2						6,2	250,5	2681,3
70	1	negativ.	4,5	9,3	< 6,4	< 1,1	7,8	214,4	2943,5
	2						4,1	261,4	2951,1

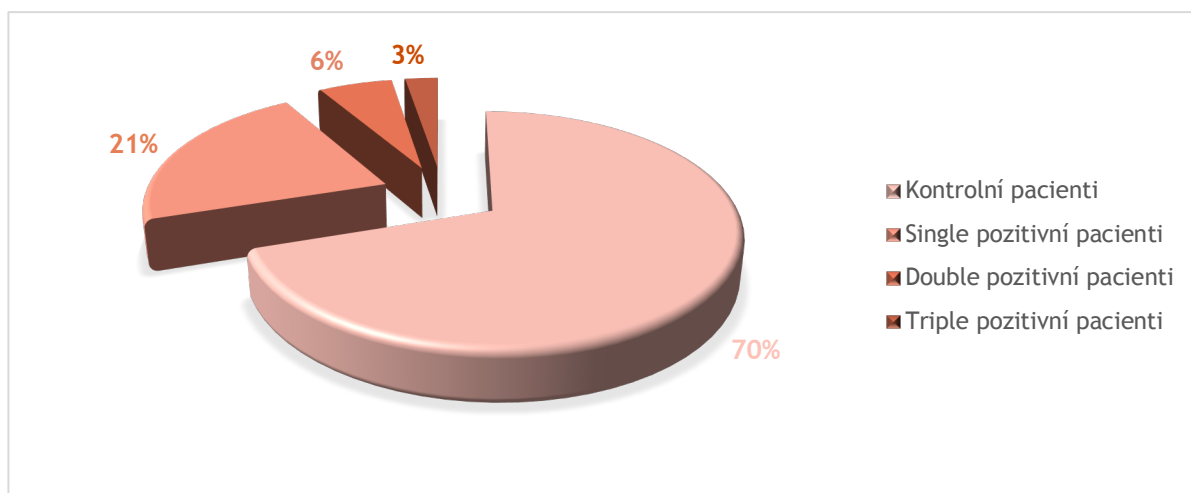
71	1	negativ.	< 2,6	1,7	< 6,4	< 1,1	9,3	172,5	2661,1
	2						5,4	222,9	2749,5
72	1	negativ.	< 2,6	1,7	< 6,4	< 1,1	7,7	138,9	2313,1
	2						4,1	168,3	2509,1
73	1	pozitiv.	< 2,6	1,7	< 6,4	< 1,1	11,8	43,2	944,3
	2						5,3	144,1	2096,1
74	1	negativ.	3,1	1,7	< 6,4	< 1,1	8,2	479,3	3729,4
	2						4,1	523,8	3487,2
75	1	negativ.	6,7	1,1	< 6,4	< 1,1	7,2	346,5	3826,3
	2						3,9	423,9	3561,4
76	1	negativ.	5,4	2,4	7,2	< 1,1	7,3	77,5	924,3
	2						3,7	91,4	873,5
77	1	negativ.	4,9	1,7	< 6,4	< 1,1	9,5	224,5	3011,4
	2						4,8	196,9	2978,6
78	1	negativ.	5,1	2,8	< 6,4	1,2	7,7	132,1	2617,7
	2						4,5	130,9	2741,8
79	1	pozitiv.	< 2,6	1,0	< 6,4	< 1,1	8,5	215,4	3312,6
	2						5,6	364,1	3658,2
80	1	pozitiv.	4,5	4,6	< 6,4	2,4	11,1	143,5	2863,1
	2						6,4	360,6	3274,8
81	1	negativ.	4,9	4,0	< 6,4	3,3	9,1	196,9	2987,8
	2						6,2	175,1	2985,8
82	1	negativ.	6,7	5,0	< 6,4	1,4	7,9	386,3	3990,5
	2						5,5	405,7	3829,6
83	1	negativ.	3,2	2,7	9,7	1,3	7,3	142,7	2427,1
	2						4,8	156,5	2183,3
84	1	negativ.	7,9	2,8	7,1	< 1,1	8,7	324,5	3128,7
	2						3,5	278,1	3067,8
85	1	negativ.	2,7	4,1	< 6,4	1,4	7,1	358,4	2694,3
	2						4,1	356,9	2786,8
86	1	pozitiv.	2,7	4,1	< 6,4	1,4	8,9	181,8	2234,4
	2						4,2	406,8	2649,1
87	1	negativ.	2,7	4,1	< 6,4	1,4	6,7	189,5	1836,8
	2						4,6	116,9	1718,8
88	1	negativ.	2,7	4,1	< 6,4	1,4	7,7	601,8	2981,3
	2						3,5	380,3	2298,5
89	1	pozitiv.	5,5	2,6	< 6,4	< 1,1	9,6	136,2	2061,6
	2						6,6	132,1	2003,8
90	1	negativ.	4,4	1,1	< 6,4	< 1,1	6,8	592,6	3847,2
	2						3,6	509,3	3485,1
91	1	negativ.	36,2	5,9	6,5	< 1,1	10,5	591,7	2931,2
	2						4,9	598,1	3262,4
92	1	negativ.	15,5	3,3	6,9	1,6	9,3	291,1	3013,2
	2						4,1	258,1	2762,6
93	1	negativ.	3,4	1,1	9,1	< 1,1	7,1	182,1	2858,6
	2						4,2	203,4	2774,1
94	1	negativ.	< 2,6	1,9	6,5	< 1,1	7,5	118,1	1147,6
	2						4,6	142,2	1267,3

95	1	negativ.	3,5	< 1,0	< 6,4	< 1,1	8,2	220,1	3041,9
	2						4,9	249,2	3293,5
96	1	pozitiv.	6,1	2,5	< 6,4	< 1,1	7,1	356,6	2880,2
	2						3,9	326,9	2691,4
97	1	pozitiv.	6,1	2,5	< 6,4	< 1,1	8,1	251,8	3051,8
	2						4,6	282,1	3333,4
98	1	negativ.	8,8	3,2	< 6,4	1,5	5,8	456,2	3627,1
	2						2,9	402,1	3892,1
99	1	negativ.	8,0	3,1	< 6,4	< 1,1	9,2	610,9	4073,1
	2						4,8	490,6	4007,4
100	1	pozitiv.	5,1	2,0	< 6,4	< 1,1	8,6	470,3	3746,5
	2						5,1	398,1	3844,1
101	1	pozitiv.	3,9	6,4	< 6,4	3,0	9,3	365,8	2947,3
	2						5,7	419,6	3172,3
102	1	negativ.	3,9	6,4	< 6,4	3,0	9,6	181,8	2315,6
	2						4,5	208,8	2592,2
103	1	negativ.	76,8	4,3	510,1	2,0	10,3	198,9	2888,1
	2						5,1	203,6	2978,1
104	1	negativ.	8,4	3,4	< 6,4	1,2	7,6	336,9	2433,4
	2						3,9	480,1	3023,2
105	1	pozitiv.	< 2,6	2,2	< 6,4	1,6	9,4	438,5	3756,8
	2						4,3	605,7	3693,6
106	1	negativ.	7,3	1,4	< 6,4	< 1,1	6,1	605,5	4302,5
	2						4,2	701,9	4627,7
107	1	negativ.	9,8	3,4	< 6,4	1,6	5,1	631,9	4016,8
	2						3,7	608,3	3989,4
108	1	pozitiv.	7,2	26,3	7,7	2,1	10,2	172,2	2712,6
	2						5,9	151,6	2629,8
109	1	negativ.	4,2	2,7	< 6,4	< 1,1	6,1	581,7	3804,2
	2						3,7	557,7	3727,1
110	1	pozitiv.	6,1	3,1	9,5	1,8	9,6	191,4	2169,5
	2						5,6	166,9	2295,2
111	1	negativ.	6,1	3,1	9,5	1,8	6,3	347,1	3466,1
	2						3,9	355,7	3477,4
112	1	negativ.	11,9	10,9	38,0	14,7	8,3	178,1	2847,8
	2						4,5	271,5	3207,6
113	1	pozitiv.	3,7	2,2	6,6	< 1,1	10,1	699,5	3820,4
	2						5,3	353,6	3254,8
114	1	negativ.	2,9	2,6	7,2	< 1,1	6,6	395,6	3141,8
	2						3,8	292,7	3044,1
115	1	negativ.	7,4	2,7	8,9	< 1,1	6,3	199,8	2074,8
	2						3,5	235,4	2472,2
116	1	negativ.	7,4	2,7	8,9	< 1,1	7,1	210,5	3200,6
	2						4,2	590,5	4204,3
117	1	pozitiv.	2,8	2,3	< 6,4	< 1,1	9,2	416,4	5636,2
	2						5,9	489,4	4987,8
118	1	negativ.	2,8	2,3	< 6,4	< 1,1	9,0	147,6	1894,5
	2						3,7	243,8	2351,7

119	1	pozitiv.	3,2	5,9	< 6,4	1,3	11,2	76,5	1221,4
	2						7,1	82,3	1329,3
120	1	negativ.	< 2,6	2,4	< 6,4	< 1,1	5,4	433,1	3605,2
	2						3,1	398,6	3598,1
121	1	negativ.	6,8	5,5	< 6,4	< 1,1	5,1	394,3	3019,1
	2						3,2	406,2	3179,8
122	1	negativ.	6,8	5,5	< 6,4	< 1,1	5,9	764,1	4192,1
	2						3,4	841,1	4689,9
123	1	negativ.	37,4	7,4	< 6,4	3,7	9,5	205,3	2869,7
	2						5,3	251,5	3098,1
124	1	pozitiv.	3,3	1,7	< 6,4	< 1,1	11,1	70,8	1477,2
	2						7,1	80,1	1675,1
125	1	negativ.	4,9	3,6	7,4	4,7	8,4	348,1	3503,8
	2						4,6	540,6	4414,3
126	1	negativ.	7,6	4,8	< 6,4	2,3	7,1	260,3	3598,9
	2						4,7	181,3	2282,1
127	1	negativ.	7,6	4,8	< 6,4	2,3	6,5	318,1	3441,5
	2						4,2	390,1	3833,6
128	1	negativ.	7,6	4,8	< 6,4	2,3	8,4	212,3	3156,8
	2						5,6	256,1	3476,6
129	1	pozitiv.	142,2	30,3	308,0	33,7	9,8	197,3	2511,4
	2						6,6	122,1	2004,8
130	1	negativ.	7,8	2,6	< 6,4	< 1,1	8,7	206,1	3264,7
	2						5,4	279,1	3472,9
131	1	negativ.	7,8	2,6	< 6,4	< 1,1	8,9	174,5	2234,6
	2						5,1	196,2	2458,8
132	1	pozitiv.	3,5	1,1	< 6,4	< 1,1	10,7	177,2	2567,1
	2						5,5	201,6	2636,9
133	1	negativ.	3,5	1,1	< 6,4	< 1,1	7,5	131,1	2197,7
	2						4,1	213,9	2581,8
134	1	negativ.	3,6	2,2	< 6,4	1,2	8,1	197,3	2615,6
	2						5,1	220,4	2662,3
135	1	negativ.	3,6	2,2	< 6,4	1,2	7,7	122,1	2078,1
	2						4,1	172,1	2359,1
136	1	negativ.	3,0	2,6	< 6,4	1,2	7,2	179,1	2211,9
	2						4,2	220,8	2423,3
137	1	negativ.	3,0	2,6	< 6,4	1,2	9,9	114,9	1919,9
	2						4,9	195,5	2338,8
138	1	negativ.	< 2,6	3,7	< 6,4	1,3	8,3	148,4	2017,6
	2						4,2	246,6	2516,4
139	1	negativ.	< 2,6	3,7	< 6,4	1,3	6,8	352,5	2795,1
	2						4,1	291,1	2931,1
140	1	negativ.	3,6	3,9	< 6,4	< 1,1	6,7	262,2	2523,3
	2						3,9	398,8	2891,3
141	1	negativ.	3,7	4,9	9,9	2,7	6,9	340,3	3226,3
	2						4,0	363,5	3398,1

142	1	negativ.	3,7	4,9	9,9	2,7	7,3	169,6	2397,3
	2						4,6	215,9	2541,2
143	1	pozitiv.	9,7	4,9	34,1	2,6	10,2	178,2	2214,2
	2						5,6	247,1	2486,9
144	1	negativ.	8,9	4,2	< 6,4	< 1,1	5,8	452,1	3447,1
	2						3,9	452,0	3940,1
145	1	negativ.	19,0	2,3	< 6,4	< 1,1	7,1	211,4	2552,1
	2						4,1	208,6	2580,9
146	1	negativ.	8,9	4,2	< 6,4	< 1,1	7,3	398,4	3679,4
	2						4,5	347,1	3063,2
147	1	negativ.	2,8	1,7	< 6,4	1,6	9,5	107,1	1474,4
	2						5,9	137,4	1778,1
148	1	pozitiv.	2,8	1,7	< 6,4	1,6	7,9	207,9	2755,5
	2						4,9	292,1	3328,7
149	1	negativ.	2,6	2,8	6,4	2,6	6,2	382,6	3165,9
	2						3,7	358,3	3428,7
150	1	pozitiv.	2,6	9,1	6,4	5,1	9,1	503,9	3258,4
	2						5,2	525,1	3829,3
151	1	negativ.	2,6	9,1	6,4	5,1	5,7	541,6	3359,4
	2						3,3	619,6	3718,7
152	1	negativ.	3,1	1,9	< 6,4	< 1,1	8,4	227,8	2940,7
	2						4,9	319,9	3461,9

Vysvětlivky: LA – lupus antikoagulans, TGTt – čas do vytvoření první generace trombinu, TGT max – maximální koncentrace generovaného trombinu, TGTe – celková plocha pod křivkou vyjadřující celkové množství generovaného trombinu

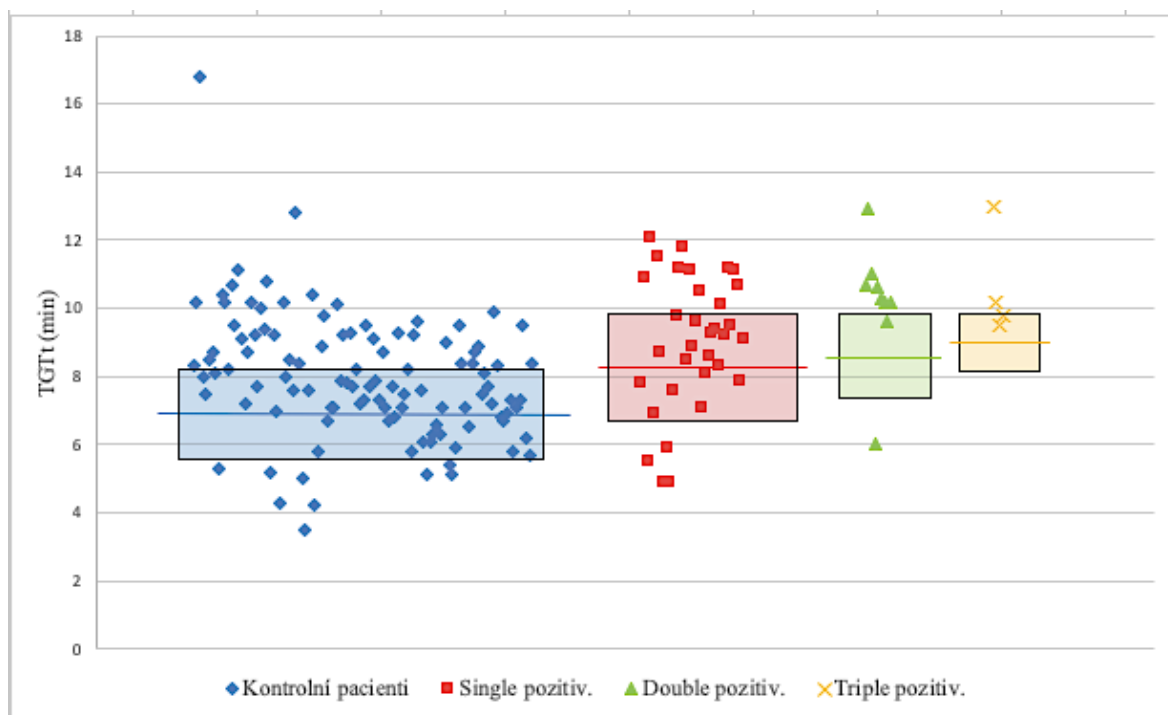


Obrázek 11 Procentuální zastoupení všech pacientů rozdělených na základě positivity ve sledovaných protilátkách

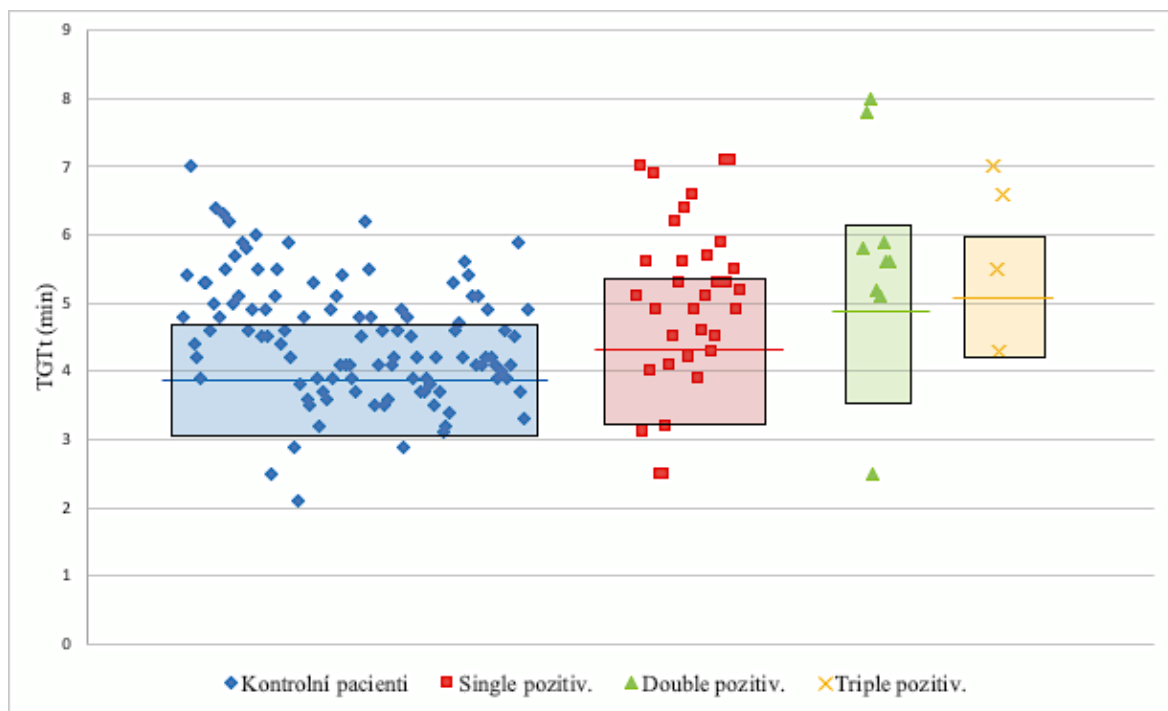
Na obrázku 11 jsou pacienti rozděleni na základě počtu pozitivit ve třech vyšetřovaných markerech (LA, antikardiolipiny a anti-β₂-glykoprotein I). Největší skupinu pacientů tvoří kontrolní (negativní) pacienti (70 %), kteří nebyli pozitivní ani v jedné protilátce. Naopak nejmenší skupinu (3 %) tvořili pacienti, u kterých byla prokázána pozitivita u všech tří markerů.

6.3 Grafické hodnocení výsledků

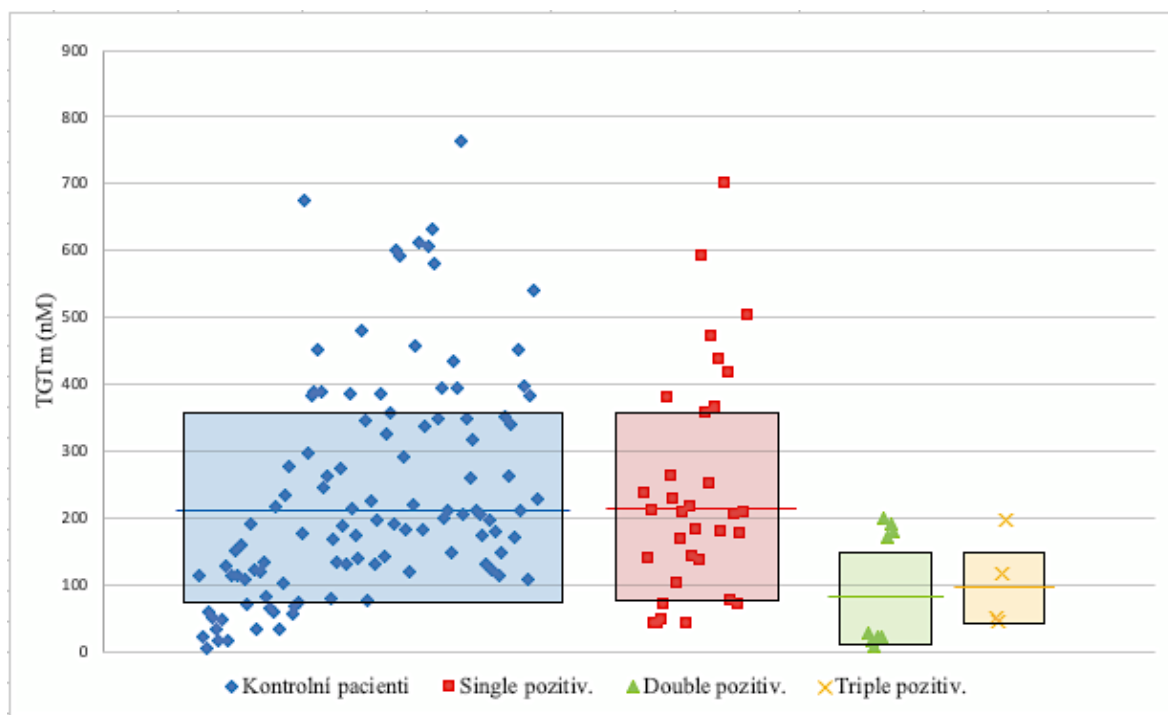
Výsledky jsou graficky znázorněny a porovnány mezi sebou na základě rozdílných koncentrací fosfolipidů u každého parametru trombin generačního testu zvlášť.



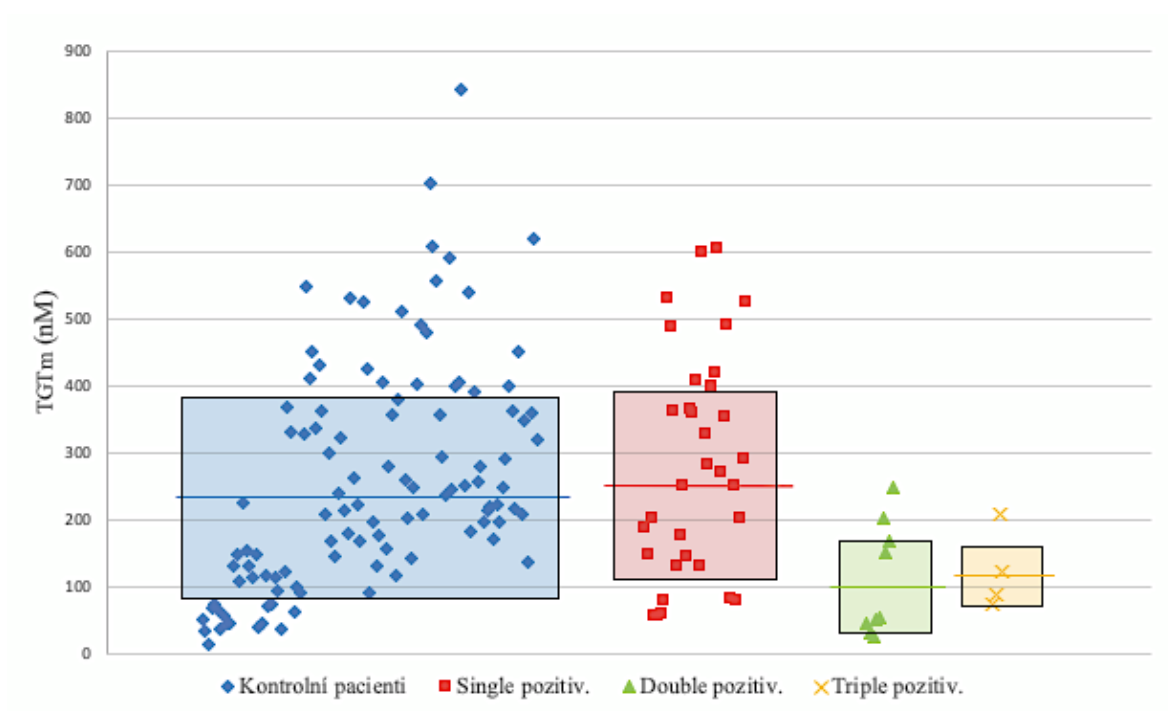
Obrázek 12 Zastoupení kontrolních a pozitivních pacientů v závislosti nižší koncentrace fosfolipidů (0,06 pM) na TGTt



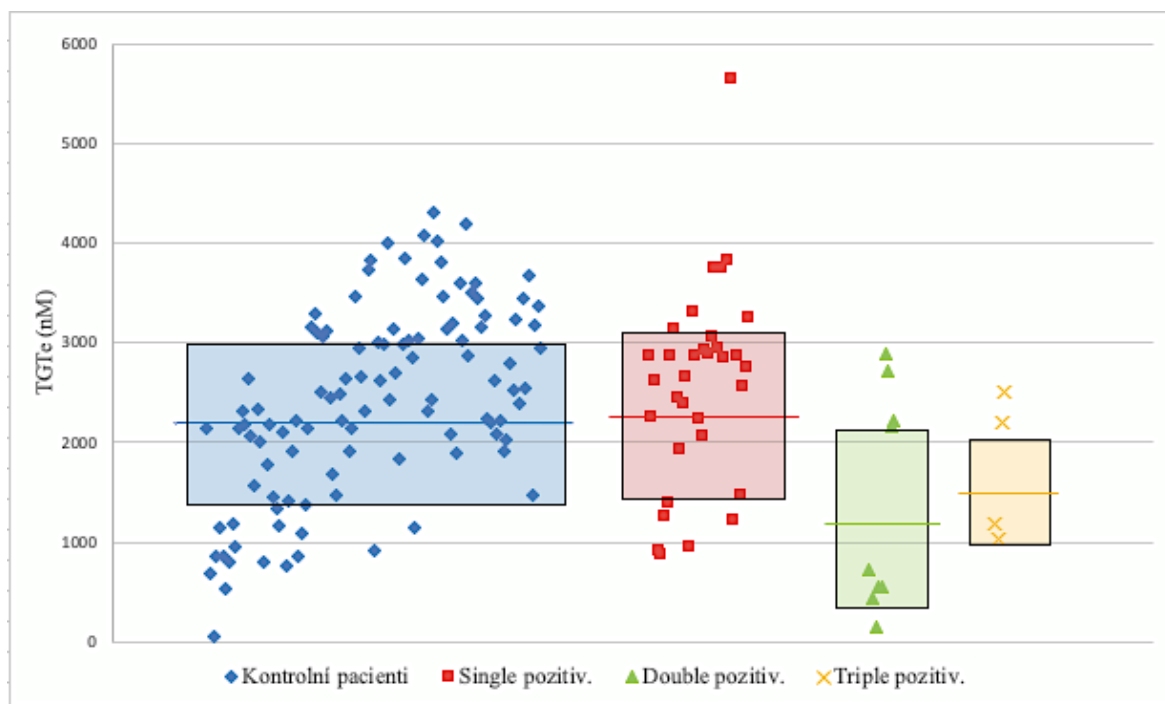
Obrázek 13 Zastoupení kontrolních a pozitivních pacientů v závislosti vyšší koncentrace fosfolipidů (0,5 pM) na TGTt



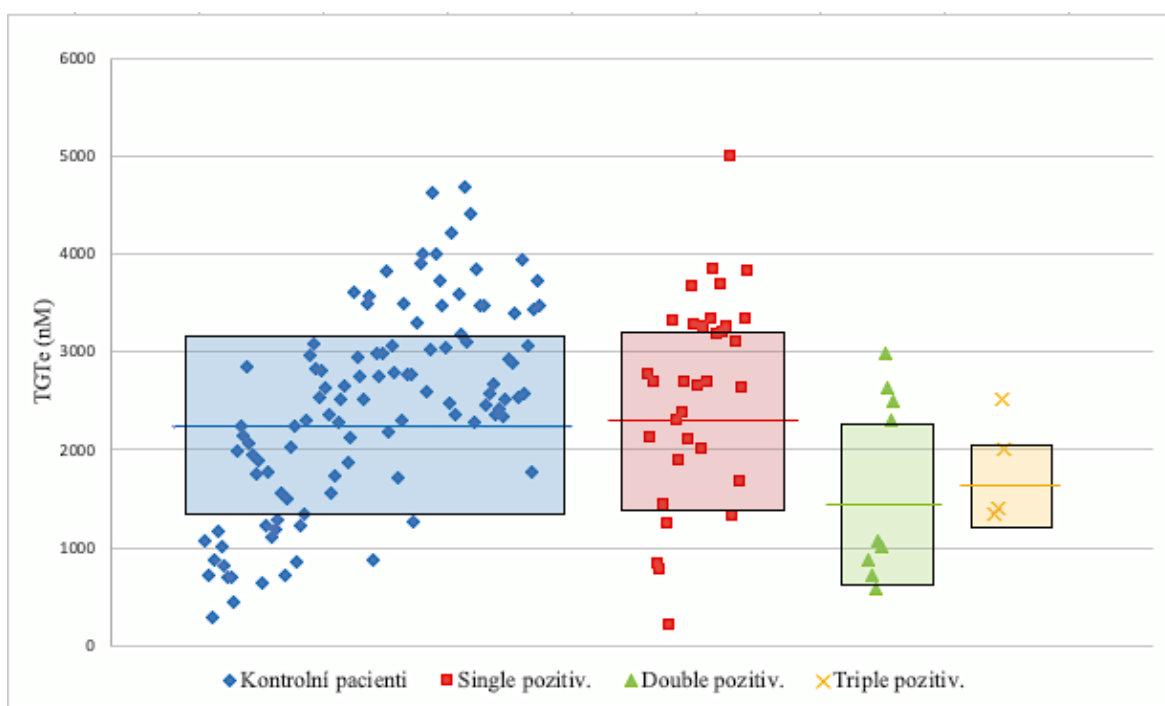
Obrázek 14 Zastoupení kontrolních a pozitivních pacientů v závislosti nižší koncentrace fosfolipidů (0,06 pM) na TGT max



Obrázek 15 Zastoupení kontrolních a pozitivních pacientů v závislosti vyšší koncentrace fosfolipidů (0,5 pM) na TGT max



Obrázek 17 Zastoupení kontrolních a pozitivních pacientů v závislosti nižší koncentrace fosfolipidů (0,06 pM) na TGTe



Obrázek 16 Zastoupení kontrolních a pozitivních pacientů v závislosti vyšší koncentrace fosfolipidů (0,5 pM) na TGTe

7 DISKUZE

Cílem bylo stanovit závažnost trombogenního potenciálu jednotlivých druhů antifosfolipidových protilátek na souboru pacientů s pozitivním nálezem APLA. Metoda, která byla pro tento cíl zoptimalizována, vychází z trombin generačního testu. Optimalizace metody probíhala na kontrolních a pozitivních pacientech, kde byly korelovány 3 zásadní parametry TGA (tLag, Peak a AUC) v závislosti na použité koncentraci fosfolipidů. Pro vývoj této metody byla použita škála různých koncentrací fosfolipidů (0,0625-0,5 nM) pro všechny 3 parametry. Parametr času poskytoval nejvyšší rozdíly při koncentraci 0,0625 nM, proto se jeví jako nejcitlivější. Zatím ani jedna z prací Zuily et al., (2012), Sciascia et al., (2016), Sheng et al., (2001), Sakai et al., (2009), Hanly et al., (2003), Efthymiou et al., (2015) neuvádí žádnou optimalizaci této metody pro single, double a triple pozitivní pacienty. Výsledky této optimalizace nám poukazují na výrazné prodlužování času do začátku nástupu generace trombinu (tLag) u pozitivních pacientů v nízkých koncentracích fosfolipidů, zatímco zbylé dva parametry se nejeví jako signifikantní. U kontrolních pacientů rozdíl nebyl až tak patrný, zatímco u triple pozitivních (pozitivní ve třech sledovaných protilátkách) pacientů se tLag se zvyšující se koncentrací výrazně zkracoval. Existuje značný počet studií, které tvrdí, že pozměněná generace trombinu může vést k hemoragickým či trombotickým onemocněním (Baglin, 2005), protože čím méně trombinu se vytvoří, tím menší je riziko vzniku těchto onemocnění.

Následně byla tato hypotéza ověřena na celkovém souboru 152 pacientů, v němž se nacházeli jak kontrolní (70 %), single (21 %), double (6 %), tak triple (3 %) pozitivní pacienti. Nejvíce se dle naší optimalizace projevil parametr času do začátku nástupu generace trombinu, který se zkracoval postupně se zvyšující se koncentrací fosfolipidů. V nejnižších koncentracích u parametru Lag time tedy dochází ke generaci trombinu později, ale je stejně velká a vygeneruje se stejné množství trombinu. Nejvíce byl zaznamenán rozdíl v generaci trombinu u triple pozitivních pacientů, jejichž hodnoty dosahovaly vyšších hodnot, než double a single pozitivní pacienti. Stejně jako Pengo et al., v roce 2010, mohu říci, že triple pozitivní pacienti mají největší riziko manifestace trombotických i těhotenských komplikací.

8 ZÁVĚR

Optimalizace metody trombin generačního testu pro detekci trombogenního potenciálu na souboru pacientů vedla ke zlepšení pouze parametru Lag time trombin generačního času, kde se nám podařilo rozlišit pacienty podle rizikovosti. Tento parametr se jevil nejvíce signifikantním, protože se při zvyšující se koncentraci zkracoval, a to především u triple pozitivních pacientů, kde byl rozdíl vidět nejvíce.

Hypotézu jsme ověřili na souboru 152 pacientů s prokázanými protilátkami, kde se parametr Lag time se zvyšující se koncentrací signifikantně zkracoval. Největší rozdíl byl zaznamenán u triple pozitivních pacientů, jejichž hodnoty dosahovaly vyšších hodnot, než u double a single pozitivních pacientů.

Využití optimalizované metody pro monitoraci rizika vzniku trombembolické komplikace, bude vyžadovat dlouhodobější klinické sledování tohoto souboru pacientů.

LITERATURA

AGAR C., van Os G. M. A., MÖRGELIN M., SPRENGER R. R., MARQUART, et al. (2010). β 2-glykoproteinu I can exist in two conformation: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. The american society of hematology. 116(8), s. 1336-1343.

ANDĚL M., GREGOR P., HORÁK J., WIDIMSKÝ P. (2001). *Vnitřní lékařství díl III, Hematologie*, Galén.

ASHERSON R. A., CERVERA R., de Groot P. G. et al. (2003). Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus*; 12: s. 530-534.

BAGLIN, T. (2005). *The measurement and application of thrombin generation*. *British Journal of Haematology*;130: 653-661.

BÁRTKOVÁ A. (2010). Antifosfolipidový syndrom: jedna z příčin ischemických mozkových příhod v mladším věku. *Neurológia pre prax*. 11 (5), s. 315.

BULIKOVÁ A, PENKA M. (2006). Antifosfolipidový syndrom. *Interní Med*. 5, s. 240–243.

BULIKOVÁ A., SMEJKAL P., CHLUPOVÁ G., MATÝŠKOVÁ M., ŠLECHTOVÁ M. (2012). Profylaxe a léčba antifosfolipidového syndromu – současné možnosti, úskalí a perspektivy do budoucna. *Vnitřní lékařství*. 58(7a 8), s. 110-122.

CARSONS S. (2004). Antiphospholipid syndrome.

DEBIZE C., MASSIGNON D., COUER P. (1995). Antiphospholipid antibodies and thrombotic risk: relationship to thrombomodulin, D- -dirners and prothrombin fragment 1 + 2. *Nouv. Rev. Fr. Hématol*. 37, Suppl II, s. 93-96.

EFTHYMIIOU, M., LAWRIE, A.S., MACKIE, I., ARACHCHILLAGE, D. et al., (2015). Thrombin generation and factor X assays for the assessment of warfarin anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome. *Thrombosis research*, 135(6), pp.1191-1197.

GÓMEZ-PUERTA JA, CERVERA R. (2014). Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*, 48-49: s. 20-25.

HANLY, J.G., SMITH, S.A. and ANDERSON, D., 2003. Inhibition of annexin V binding to cardiolipin and thrombin generation in an unselected population with venous thrombosis. *The Journal of rheumatology*, 30(9), pp.1990-1993.

HEMKER H.C., AL DIERI, R., BÉGUIN, S., (2004). *Thrombin generation assays: accruing clinical relevance* Curr. Opin. Hematol; 11: 170-175.

HIRMEROVÁ J. (2010). Antifosfolipidový syndrom. *Postgraduální medicína*, 1.

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

HUNT J. E., McNEIL H. P., MORGAN G. J., CRAMERI R. M., CRILIS S. A. (1992). A phospholipid-beta₂-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus*. 1(2), s. 75–81.

KEELING D., MACKIE I., MOORE G. W., GREER I. A., GREAVES M. and British Committee for Standards in Haematology. (2012). Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *British Journal of Haematology*, 157, s. 47-54.

KITTAR O. (2011). *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3068-4.

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

KUBISZ P., a kolektiv. (2006). *Hematológia a transfuziologie*. Učebnica. Praha: Grada Publishing, s. 323.

KVASNIČKA J. (2003). *Trombofilie a trombotické stavy*. Praha: Grada Publishing, s. 299.

LAKOS G., FAVALORO E. J., HARRIS E. N., MERONI P. L., et al. (2011). International consensus guidelines on anticardiolipin and anti- beta2-glycoprotein I testing: Report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis a Rheumatology*.

MALÍČKOVÁ K, FUČÍKOVÁ T. (2001). Antifosfolipidový syndrom a antifosfolipidové protilátky. *Čas. Lék. Čes.*140(15):465-468.

MIYAKIS S., LOCKSHIN M. D., ATSUMI T., BRANCH D. W. et al. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis*. 4(2), s. 295–306.

PASSAM F., KRILIS S. (2004). Laboratory tests for the antiphospholipid syndrome: current concepts. *Pathology*. 36(2), s. 129–138.

PECKA M. (2004). Laboratorní hematologie v přehledu. [3. díl], Fyziologie a patologie hemostázy. FINIDR, Český Těšín.

PECKA M. (2010). Praktická hematologie-Laboratorní metody. FINIDR, Český Těšín.

PENGO V., TRIPODI A., REBER G., RAND J. H., ORTEL T. L., GALLI M., de Groot G. (2009). Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Sv. 7, 10, s. 1737-1740.

PENGO V., RUFFATTI A., LEGNANI C., GRESELE P., BARCELLONA D., et al. (2010). Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 8(2), s. 237–242.

PENKA M., BULIKOVÁ A. (2009). *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada.

PENKA M., PENKA I., GUMULEC J. (2014). Krvácení. Praha. Grada Publishing.

PENKA M., & SLAVÍČKOVÁ E. (2012). Hematologie a transfuzní lékařství. II, Transfuzní lékařství. 1. Praha: Grada Publishing.

PENKA M., TESAŘOVÁ E. a kolektiv. (2011). *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Brno: Grada Publishing, a. s.

RAND J. H. (2003). *The antiphospholipid syndrom*. The annual review of medicine. 54, s. 409-424.

RAND J. H. (2007). The antiphospholipid syndrom. American society of hematology, 1.

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

SANGLE N.A., SMOCK K. J. (2011). Antiphospholipid Antibody Syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 135, s. 1092-1095.

SAKAI, Y., ATSUMI, T., IEKO, M., AMENGUAL, O., FURUKAWA, et al. (2009). The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 60(8), pp.2457-2467.

SAKALOVÁ A., BÁTOROVÁ A., MISTRÍK M., MIKULÁŠ M. a kolektiv. (2010). *Klinická hematológia*. Osveta.

SCIASCIA, S., BALDOVINO, S., SCHREIBER, K., SOLFIETTI, L., RADIN, et al., (2016). Thrombotic risk assessment in antiphospholipid syndrome: the role of new antibody specificities and thrombin generation assay. *Clinical and Molecular Allergy*, 14(1), p.6.

SHENG, Y., HANLY, J.G., REDDEL, S.W., KOUTS, S., GUERIN, J., et al., (2001). Detection of 'antiphospholipid' antibodies: a single chromogenic assay of thrombin generation sensitively detects lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies, plus antibodies binding β 2-glycoprotein I and prothrombin. *Clinical & Experimental Immunology*, 124(3), pp.502-508.

SUSSMAN M., (1992). f. f.: Normal pathways of coagulation. *Sem. Hematol*. 29, Č. 3, s. 157-158.

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

TRIPODI A., de GROOT P. G., PENGGO V. (2011). Antiphospholipid syndrome: laboratory detection, mechanisms of action and treatment. *Journal of internal medicine*. Sv. 270, 2, s. 110-122.

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

ZUILY, S., AISSA, K.A., MEMBRE, A., REGNAULT, V., LECOMPTE, T. and WAHL, D., (2012). Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 21(7), pp.758-760.