

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Diagnostické možnosti přímé generace trombinu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Pavla Pospíšilová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	3.5. 2010

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

V Olomouci dne 3.5.2010

Poděkování : Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr.Ludřku Slavíkovi Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a čas, kterými mi při této práci věnoval. Dále bych chtěla poděkovat ostatním pracovníkům koagulační laboratoře Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc za jejich ochotu a vstřícnost. Poděkování patří i mým rodičům a příteli za jejich morální a finanční podporu při studiu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Pavla Pospíšilová
Název práce	Diagnostické možnosti přímé generace trombinu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Koagulační laboratoř, Hemato-onkologická klinika FN Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010

Hemostáza je komplexní fyziologická odpověď živého organismu na vzniklé krvácení. Je to složitý mechanismus, který je regulován množstvím pozitivních a negativních vazeb.

V současné době existuje mnoho testů, kterými je možné posuzovat funkci hemostatického systému. Tyto testy však vždy postihují jen určitou část hemostatického systému.

Jediným testem, který je schopen zobrazovat celkovou funkci hemostázy, je trombin generační test (TGA). Je založen na principu sledování kinetiky generace trombinu, klíčového enzymu krevního srážení, pomocí fluorogenního substrátu. Výsledkem měření je trombin generační křivka, která odráží aktuální potenciál koncentrace trombinu v plazmě při aktivaci koagulačního systému.

Cílem práce bylo zhodnotit možnosti využití TGA při monitoraci léčby hemostatiky a antitrombotiky. Byl sledován vztah jednotlivých parametrů TGA s hodnotou mezinárodního normalizovaného poměru (INR), jako základního parametru pro nastavení antitrombotické léčby a vliv léčby hemostatiky na množství generovaného trombinu, kde dosud nebyla možná kontrola podávané léčby.

Z výsledků vyplývá, že TGA je vhodným nástrojem pro monitoraci léčby hemostatiky a antitrombotiky, avšak pro využití v klinické praxi je nutná další standardizace.

Klíčová slova	generace trombinu, endogenní potenciál, trombofilie
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Pavla Pospíšilová
Title	Diagnostic possibilities of endogenous thrombin generation
Type of thesis	Bachelor
Department	Coagulation laboratory, Department of Hemato-Oncology, University Hospital Olomouc
Supervisor	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
The year of presentation	2010

Haemostasis is a complex physiological response of a living organism on arised bleeding. It is a complicated mechanism that is regulated by the number of positive and negative structures. Currently, there are many tests which can assess the function of the haemostatic system. These tests always affect only a part of the haemostatic system. The only test that is capable of displaying the overall function of haemostasis, is Thrombin Generation Test (TGA). It is based on monitoring the kinetics generation of thrombin, a key enzyme in blood coagulation, by fluorogenic substrate. The result of measurement is thrombin generation curve, which reflects the current potential of thrombin concentration in plasma during activation of the coagulation system.

The aim of this bachelor thesis was to evaluate the possibility of using TGA in monitoring of haemostatic and antithrombotic therapy. It studied the relationship of each parameter value of TGA with an international normalized ratio (INR), as a basic parameter setting for antithrombotic therapy and haemostatic influence of treatment on the amount of generated thrombin, which has not been possible to check on treatment yet. The results suggest that TGA is a useful tool for monitoring of haemostatic and antithrombotic therapy, but for use in clinical practice requires further standardisation.

Keywords	thrombin generation, endogenous thrombin potencial, thrombophilia
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	8
1. Úvod	9
2. Teoretická část	9
2.1 Hemostatický systém	9
2.2 Poruchy hemostázy a hemokoagulace	14
2.3 Látky ovlivňující hemokoagulaci	18
2.4 Laboratorní vyšetření hemostázy	22
2.5 Měření generace trombinu	23
3. Experimentální část	27
3.1 Cíle experimentální části	27
3.2 Materiál a metody	27
3.3 Vlastní měření	33
4. Výsledky a diskuse	36
5. Závěr	43
Literatura	44
Použité zkratky	47

Seznam obrázků

Obrázek 1: Systémy krevního srážení	9
Obrázek 2: Koagulační kaskáda	13
Obrázek 3: Mutace F V Leiden	16
Obrázek 4: Působení warfarinu v cyklu vitamínu K	21
Obrázek 5: Prodloužení iniciační fáze při správném nastavení antikoagulační léčby .	25
Obrázek 6: Koagulační analyzátor Ceveron® Alpha	28
Obrázek 7: Princip TGA	30
Obrázek 8: Průchod paprsku reakční kyvetou.....	31
Obrázek 9: Trombin generační křivka	31
Obrázek 10: Kalibrační křivka	32
Obrázek 11: Závislost INR na tLag	38
Obrázek 12: Závislost INR na tPeak	39
Obrázek 13: Závislost INR na mPeak	39
Obrázek 14: Závislost INR na AUC.....	40
Obrázek 15: Trombin generační křivka 4.12. 2009.....	41
Obrázek 16: Účinek hemostatik na generaci trombinu.....	42

Seznam tabulek

Tabulka 1: Plazmatické faktory I	11
Tabulka 2: Plazmatické faktory II	12
Tabulka 3: Přehled vrozených trombofilií	17
Tabulka 4: Přehled získaných trombofilií.....	17
Tabulka 5: Přehled trombofilií smíšené etiologie	18
Tabulka 6: Příprava reagensí k sestrojení kalibrační křivky.....	33
Tabulka 7: Koncentrační body trombin/reakční pufr	33
Tabulka 8: Příprava reagensí.....	34
Tabulka 9: Naměřené parametry TGA pacientů na warfarinu.....	37
Tabulka 10: Parametry TGA u pacienta se specifickým inhibitorem.....	40

Cíle práce

1. Literární rešerše funkce hemostázy a možnosti jejího vyšetření
2. Technika laboratorního vyšetřování
3. Možnosti využití TGA při monitoraci krvácivých a trombofilních stavů
4. Zhodnocení efektivity léčby antitrombotiky a hemostatiky pomocí TGA

1. Úvod

Hemostáza je životně důležitý proces, při kterém se organismus snaží zastavit krvácení při současném udržení tekutosti krve v krevním oběhu. Jedná se o složitý mechanismus, za který je především zodpovědná endotelová cévní výstelka, krevní elementy – krevní destičky, červené krvinky, bílé krvinky a plazmatický koagulační systém (Obr.1).

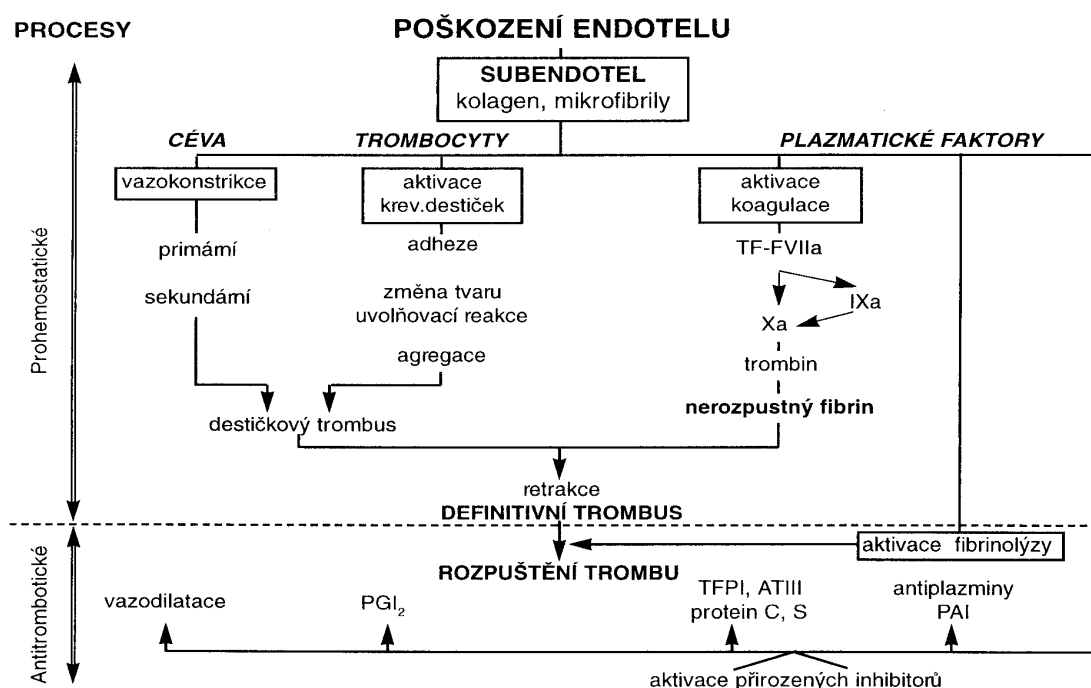
Vzhledem ke komplexnosti celého systému je nezbytná přísná regulace s mnoha kontrolními mechanismy, aby byla zajištěna rovnováha mezi sklonem ke krvácení (hypokoagulace) a ke zvýšenému srážení (hyperkoagulace) (Šlechtová, 2007).

2. Teoretická část

2.1 Hemostatický systém

Hemostáza zahrnuje 4 propojené děje

1. Reakce cév v místě poranění (vazokonstrikce)
2. Činnost krevních destiček (aktivace, adheze a agregace)
3. Hemokoagulace (působení plazmatických faktorů končící vytvořením nerozpustného fibrinu)
4. Fibrinolýza (Trojan et al., 2003)



Obrázek 1: Systémy krevního srážení (upraveno dle Matýšková et al., 1999)

2.1.1 Reakce cév v místě poranění (vazokonstrikce)

Při poranění dochází k velmi rychlé a přechodné vazokonstrikci. Ta je způsobena nejen odezvou poraněné cévy, ale i vazokonstrikčními reflexy sousedních cév a vazokonstrikčně působícími látkami – tromboxan A₂ (derivát kyseliny arachidonové) a serotonin (Trojan et al., 2003).

2.1.2 Činnost krevních destiček

Primární funkcí krevních destiček při poranění je vytvoření provizorní hemostatické zátky (bílý trombus). Destičky cirkulující v krevním řečišti mají diskoidní tvar a jsou velice citlivé na změny prostředí.

Při poranění cévy dojde k obnažení subendotelu (kolagen), na který adherují za pomoci von Willebrandova faktoru a glykoproteinu I. Adhezí dojde k jejich aktivaci – změně tvaru a vzniku pseudopodií. Současně s tím dochází k tvorbě malého množství trombinu a vyplavení dalších stimulujících látek (z delta granúl destiček) podporující jejich agregaci.

Podmínkou agregace destiček je přítomnost specifického komplexu, který je závislý na Ca²⁺, GP IIb/IIIa a fibrinogenu. Fibrinogen působí jako mediátor, jehož dimerické molekuly se váží na aktivované destičky a takto vytváří síť fibrinových vláken pokrývající primární destičkovou zátku. Z delta granúl a membrán destiček jsou uvolňovány stimulační látky (tromboxan A₂, ADP, trombospodin), které podporují a usnadňují agregaci. Začíná se tvořit bílý trombus = **primární zátk**a (Mann, 1997; Trojan et al., 2003).

2.1.3 Hemokoagulace

Hemokoagulace neboli srážení krve je kaskáda enzymatických reakcí, při nichž dochází k aktivaci proenzymů (neaktivní formy) na enzymy (aktivní formy).

Cílem je přeměna fibrinogenu na nerozpustný polymer fibrin účinkem enzymu trombinu. Tohoto procesu se zúčastňuje mnoho plazmatických faktorů (Tab.1), fosfolipidů (PL) a iontů, které jsou přítomny v krevní plazmě (Matýšková et al., 1999; Šlechtová, 2007).

Tabulka 1: Plazmatické faktory I (upraveno dle Matýšková et al., 1999)

Název	Dřívější označení	Zkratka
Faktor I	Fibrinogen	F I
Faktor II	Protrombin	F II
Tkáňový faktor	Tromboplastin	TF
Faktor V	Proakcelerin	F V
Faktor VII	Prokonvertin	F VII
Faktor VIII	Antihemofilický globulin	F VIII
Faktor IX	Antihemofilický faktor	F IX
Faktor X	Stuart-Prowerův faktor	F X
Faktor XI	Rosenthalův faktor	F XI
Faktor XII	Hagemanův faktor	F XII
Faktor XIII	Faktor stabilizující fibrin	F XIII
Prekalikrein	Fletcherův faktor	PK
Vysokomolekulární kininogen	Fitzgeraldův faktor	HMWK
Von Willebrandův faktor		vWF
Plazminogen		PLG
Tkáňový aktivátor plazminogenu		tPA
Urokinasa		uPA

Plazmatické faktory můžeme rozdělit do 3 skupin: koagulační faktory, faktory fibrinolytické a přirozené inhibitory krevního srážení.

Z biochemického hlediska jsou děleny do 5 tříd:

1. **Zymogeny** serinových proteas, které se aktivují během koagulace
(F XII, XI, IX, VII, X, II)
2. **Kofaktory**
(F VIII, V, TF)
3. **Fibrinogen**
4. **Transglutaminasa**, která stabilizuje fibrinovou sraženinu
(F XIII)

5. Regulační a jiné proteiny

(protein C, protein S, trombomodulin) (Murray et al., 2002)

Syntéza plazmatických faktorů probíhá v játrech. U některých probíhá jen v přítomnosti vitamínu K. Kromě TF cirkulují v plazmě ve formě proenzymu a k přeměně na aktivní formu musí být proteolyticky štěpeny předchozím enzymem. Aktivitu proteolytických enzymů regulují přirozené inhibitory (Tab.2), které jejich proteolytickou aktivitu snižují. Zpětnovazebnými mechanismy tak udržují celý systém v rovnováze (Šlechtová, 2007).

Tabulka 2: Plazmatické faktory II (upraveno dle Matýšková et al., 1999)

Název	Zkratka
Antitrombin III	AT III
Heparin kofaktor II	HC II
α_2 -makroglobulin	α_2 MG
C1-inhibitor	C1INH
α_1 -antitrypsin	α_1 AT
α_2 -antiplazmin	α_2 AP
Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1	PAI-1
Inhibitor aktivátoru plazminogenu 2	PAI-2
Tkáňový faktor inhibitor	TFPI
Protein C	PC
Protein S	PS
Trombomodulin	TM
Inhibitor aktivovaného PC	iAPC

2.1.3.1 Koagulační kaskáda

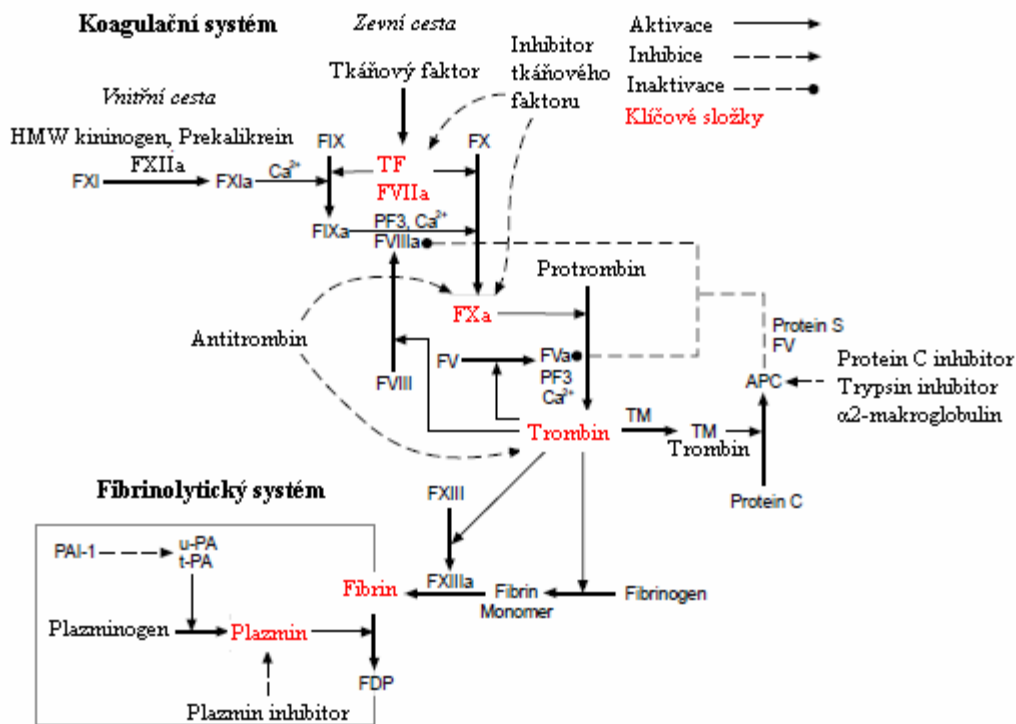
Moderní teorie krevního srážení považuje tento děj jako komplexní, nicméně pro jeho vysvětlení je stále užívána starší teorie koagulační kaskády založené na jejím dělení dle systému aktivace. Koagulační kaskáda je podle způsobu aktivace dělena na **PRIMÁRNÍ SYSTÉM AKTIVACE** (dříve vnější systém) a **PŘÍDATNÝ SYSTÉM AKTIVACE** (vnitřní systém) (Obr.2).

Primární systém aktivace se spouští vytvořením komplexu TF a F VIIa. F VIIa je glykoprotein, který v malém množství cirkuluje v plazmě. Vytvořený komplex za účasti destičkových PL a Ca^{2+} aktivuje F X na F Xa.

Současně vzniká komplex vnější tenasa F IXa–F VIIIa–PL–Ca²⁺. Po aktivaci F Xa dochází ke vzniku protrombinasového komplexu (F Xa–F Va–PL–Ca²⁺). Protrombinasa aktivuje přeměnu protrombinu na trombin. Vzniklé množství trombinu není však schopné aktivovat přeměnu fibrinogenu na fibrin. Dochází tak pouze ke zpětné aktivaci F XI, F IX, kofaktory F VIII, F V a krevních destiček. Během toho procesu dochází k aktivaci inhibitor tkáňového faktoru (TFPI). TFPI se naváže na TF, který je uvolňován z povrchu buněk a primární systém je zablokován.

Přídavný systém aktivace se spouští zpětnými mechanismy. F IXa vytváří s F VIIIa, PL a Ca²⁺ komplex vnitřní tenasu (F IXa–F VIIa–PL–Ca²⁺). Po aktivaci F X, dochází již k dostatečné přeměně protrombinu na trombin (Schenone et al., 2004; Šlechtová, 2007).

Trombin je jediným enzymem, který je schopen aktivovat přeměnu fibrinogenu na fibrin. Je to serinová proteasa, která hydrolyzuje 4 Arg-Gly vazby mezi fibrinopeptidy a α a β částmi v řetězcích Aα a Bβ fibrinogenu. Uvolněním fibrinopeptidu A (FPA) a fibrinopeptidu B (FPB) dochází k tvorbě fibrinových monomerů. Odstranění fibrinopeptidů vede k odkrytí vazebných míst, které umožňují spontánní polymerizaci na rozpustný fibrinový polymer. Působením F XIIIa, vysoce specifické transglutaminasy, vznikají pevné příčné peptidové vazby mezi amidovými skupinami glutaminu a ε-aminoskupinami lysinových zbytků. Vytváří se tak nerozpustné koagulum (Murray et al., 2002).



Obrázek 2: Koagulační kaskáda (upraveno dle Axelsson, 1995)

2.1.4 Fibrinolýza

Fibrinolýza je posledním stupněm koagulační kaskády. Je to fyziologická odpověď organismu a jejím cílem je lýza stabilního fibrinového koagula. Klíčovým enzymem při rozpouštění sraženiny je plazmin, který vzniká aktivací plazminogenu (PLG). Aktivace probíhá jak krevní cestou tak pomocí tkáňových aktivátorů. PLG se naváže na koagulum a přítomnými aktivátory (kalikrein, F XIa, tPA, uPA) dochází k přeměně na plazmin, nastává proteolýza koagula a inaktivace plazminu. Aby nemohlo dojít k nekontrolované proteolýze, je celý tento mechanismus regulován inhibitory - inhibitor aktivátoru plazminogenu, α_2 -antiplazmin a trombinem aktivovaný inhibitor plazminogenu (Šlechtová, 2007).

2.2 Poruchy hemostázy a hemokoagulace

Mohou být vyvolány jak poruchami destiček, tak i nedostatkem některého z koagulačních faktorů. Tyto stavy mohou být vrozené nebo získané a mohou být děleny dle klinické manifestace na choroby se zvýšeným krvácením (hypokoagulace) a na poruchy, při kterých dochází ke zvýšenému srážení (hyperkoagulace, trombofilie) (Matýšková et al., 1999).

2.2.1 Hypokoagulační stavy

Zahrnují skupinu onemocnění, u kterých vzniká nadměrné krvácení buď spontánně nebo na základě neúměrného podnětu. Mohou být vrozené či získané. Vznikají v důsledku poruch hemostatických mechanismů: z destičkových příčin, z poruch plazmatické fáze koagulačního systému - *koagulopatie*, z poruch funkce cévní stěny - *vaskulopatie*, následkem intravaskulární koagulace - *konzumpční koagulopatie* (Kubitsz et al., 2006).

Vrozené poruchy krevního srážení

Vznikají v důsledku deficitu nebo nedostatečné funkce některého z faktorů, které vedou ke krvácivým příhodám. Většinou se vyskytuje porucha jednoho faktoru, může však docházet i ke kombinaci poruch. Nejčastější chorobou z této skupiny je hemofilie.

1. Hemofilie
2. Von Willebrandova choroba
3. Ostatní krvácivé stavy
 - nedostatek F XI
 - nedostatek F VII
 - nedostatek F X
 - nedostatek F XIII

- nedostatek F V
 - nedostatek F II
4. Kombinované defekty
- defekt F V a VIII

(Matýšková et al., 1999; Penka et al.,1994)

Získané poruchy krevního srážení

Většinou se projevují v důsledku jiného onemocnění. Při získaných poruchách dochází ke kombinaci poruch jednotlivých faktorů.

1. Získané inhibitory

Toto autoimunitní onemocnění vzniká v důsledku přítomnosti protilátek (zvláště γ - globulinů) v plazmě. Jsou namířené buď proti jednotlivým koagulačním faktorům (F VIII, V, IX, XII,) tj. SPECIFICKÉ INHIBITORY nebo reagují s imunokomplexy vazbou na negativně nabitě fosfolipidy (Lupus antikoagulans) - NESPECIFICKÉ INHIBITORY. Přítomnost získaných inhibitorů krevního srážení je provázáno nejčastěji těžkými krvácivými stavy, vzácně je spojeno s výskytem trombóz.

2. Nedostatek vitamínu K
3. Jaterní postižení
4. Nádorová onemocnění
5. Paraproteinemie
6. Sepse
7. Urémie (Bulíková et al., 2008; Matýšková et al., 1999)

2.2.2 Hyperkoagulační stavy

Trombofilie je získaná nebo vrozená porucha hemostatického systému, při které dochází ke zvýšení prokoagulační aktivity v krvi vedoucí ke vzniku trombu. Trombóza jako příznak může být spojená jak s řadou chorob (např. rakovina), tak i účinkem léků (hormonální antikoncepce) nebo stavem (gravida) (Heit, 2007).

Žilní tromboembolická nemoc

Nejčastějším klinickým projevem trombofilních stavů je žilní tromboembolická nemoc. Vzhledem k tomu, že se na jejím vzniku podílejí jak faktory vrozené, tak získané i obecné, jde o onemocnění multifaktoriální.

Vyskytuje se idiopaticky (spontánně) nebo jako komplikace po chirurgických zákrocích. Vzniká v důsledku nerovnováhy mezi prokoagulačními, antikoagulačními a fibrinolytickými mechanismy. Mezi typické příznaky patří bolestivost na dolních

končetinách, otok, změna barvy končetiny. Pokud je spojena s plicní embolií projevuje se současně bolest na hrudníku a dušnost (Geerts et al., 2001).

Trombofilie

Z hlediska etiologie můžeme trombofilii dělit na:

- Vrozenou
- Získanou
- Smíšenou

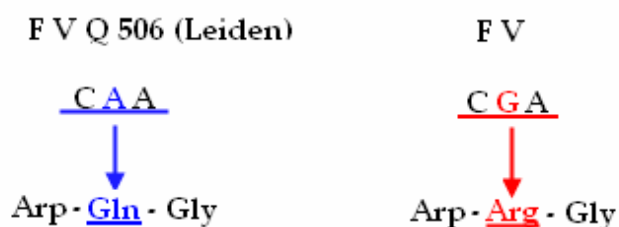
Vrozené trombofilní stavy

Známky trombofilních vrozených stavů:

- žilní trombózy před 45. rokem věku
- opakované žilní trombózy
- jasná rodinná anamnéza tromboembolických příhod
- trombóza v neobvyklé lokalizaci
- opakovaně předčasně ukončená gravidita
- trombóza vzniklá při účinné antikoagulační léčbě (Kessler 2006)

Nejčastější příčina tromboembolických stavů je mutace FV (Leiden G 1691 A) a FII (G 20210 A). Dalšími méně častými příčinami jsou deficiencie antitrombinu III (ATIII), proteinu C (PC), proteinu S (PS), plazminogenu a zvýšená hladina F VIII. Dědičný poklad mohou mít zvýšené hladiny FVIII, FIX, FXI a fibrinogenu (Tab.3).

FV Leiden (G 1691 A) – jedná se o bodovou mutaci v exonu 10 genu kódujícím F V, kde v pořadí nukleotidů dochází k záměně guanosinu (G) za adenosin (A) (G 1691 A) a poté k substituci aminokyseliny argininu (Arg) za glutamin (Gln) v místě 506 (Obr. 3). Vlivem mutace zaniká štěpné místo pro protein C a takto je snížena inaktivace F Va aktivovaným PC.



Obrázek 3: Mutace F V Leiden (upraveno dle Pecka, 2004)

FII protrombin (G 20210 A)- jedná se o bodovou mutaci v exonu 5 genu lokalizovaném na 11. chromozomu, kde dochází k substituci G za A (G 20210 A). To vede ke zvýšení exprese genu pro FII a takto je zvýšena aktivita a koncentrace protrombinu. (Poort, 1997)

Tabulka 3: Přehled vrozených trombofilií (upraveno dle Kessler, 2006)

Deficiencie inhibitorů
AT III
PC
PS
Mutace FV (APCR)
F V Leiden
F V Cambridge
Ostatní
Protrombin 20210A
Disfibrinogenemie

Získané trombofilní stavy (Tab.4)

Mezi typické faktory patří věk nad 45 let, obezita, imobilizace, hormonální léčba, těhotenství, myeloproliferativní onemocnění a trombocytémie, malignita či kouření.

Tabulka 4: Přehled získaných trombofilií (upraveno dle Kessler, 2006)

Antifosfolipidový syndrom
Maligní nádory
Myeloproliferativní onemocnění
➤ polycytemia vera
➤ esenciální trombocytopenie
➤ primární myelofibróza v proliferační fázi
Sekundární trombocytóza
Autoimunní choroby
Paroxysmální noční hemoglobinurie
Nefrotický syndrom
Obezita

Smíšené trombofilní stavy (Tab.5)

Vznik těchto poruch je spojen s řadou rizikových faktorů a to jak vrozených, tak získaných. Většinou reagují společně, a tím se jejich účinek sčítá. (Kessler, 2006)

Tabulka 5: Přehled trombofilií smíšené etiologie (upraveno dle Kessler, 2006)

Hyperhomocysteinemie
➤ mutace MTHFR C677T, A1298C
➤ nedostatek vitamínu B12, kys. listové
Získaná APC rezistence
F VIII
➤ familiární, asociovaný s krevní skupinou jinou než 0
➤ protein akutní fáze
F IX
Fibrinogen

2.3 Látky ovlivňující hemokoagulaci

Cílem působení těchto látek je upravit rovnováhu prokoagulačních a antikoagulačních procesů v organismu (Kubisz, 2006).

2.3.1 Hemostatika

Látky, které zabraňují nadměrnému krvácení. Jsou používány i k zástavě normálního krvácení při poraněních či chirurgických zákrocích.

- Látky obsahující KREVNÍ PRODUKTY

Systémová hemostatika- léky obsahují koagulační faktory (VII, VIII, IX, XIII), fibrin nebo lidský trombin

Místní hemostatika- aplikují se přímo na poranění. Patří sem zmrazená plasma, kolagen nebo želatina

- VITAMIN K

Při jeho nedostatku dochází k tvorbě nefunkčních plazmatických faktorů (PIVKA), které nejsou schopny udržet rovnováhu mezi prokoagulačními a antikoagulačními mechanismy.

➤ ETAMSYLÁT

Syntetická látka, která zvyšuje interakci mezi endotelem a krevními destičkami. Vzhledem k tomu, že nemá vliv na vazokonstrikci, fibrinolýzu ani na aktivitu plazmatických koagulačních faktorů, je používána pouze k zástavě kapilárního krvácení (Hynie, 2001; Květina et al., 2009; SÚKL, 16/ 082/70-C)

2.3.2 Antitrombotika

Antitrombotika jsou látky, které tlumí nežádoucí nadměrnou aktivaci koagulace popřípadě rozpouští již vzniklý trombus (Kubisz, 2006).

Dělí se :

ANTIKOAGULANCIA

Zabraňují vzniku trombu tím, že ovlivňují tvorbu a účinky plazmatických faktorů. Omezují generaci trombinu a tím i přeměnu fibrinogenu na fibrin. Avšak již vytvořený trombus ovlivnit nedokáží, nemají totiž fibrinolytickou aktivitu.

Inhibice koagulace může být zprostředkována různými mechanismy:

- inhibicí iniciální fáze koagulace (inhibitory TF, inhibitory ostatních koagulačních faktorů)
- zamezení přeměny protrombinu na trombin (inhibitory F IXa a F Xa)
- blokáda účinku trombinu (přímé a nepřímé inhibitory trombinu)
- podpora přirozené antikoagulační odpovědi organismu (rekombinantní PC, rekombinantní trombomodulin, antitrombin)
- omezení tvorby faktorů závislých na vitaminu K (antagonisté vit. K)
(Květina et al., 2009; Pecka, 2004)

Přímá antikoagulancia

Inhibují koagulaci za pomoci antitrombinu III (AT III) přímou vazbou na koagulační enzymy.

Nefrakcionovaný heparin (Unfraktioned heparin – UFH)

UFH je heterogenní směs polysacharidů o molekulové hmotnosti 3000 až 30 000 Da. Komplex UFH-AT III inaktivuje jak trombin tak i řadu aktivovaných koagulačních faktorů- F Xa, IXa, XIa a XIIa. K vazbě na AT III je nutná unikátní sekvence pentasacharidů. Pouze jedna třetina podané dávky heparinu se naváže na AT III.

Nevýhodou UFH je schopnost vazby nejen na plazmatické proteiny, povrch endoteliálních buněk, ale i na trombocyty, kdy může docházet k inhibici jejich agregace.

Nízkomolekulární heparin (Low molecular weight heparin - LMWH)

LMWH se získává chemickou nebo enzymatickou depolymerací UFH. Vznikají tak řetězce o molekulové hmotnosti v rozmezí 4500 až 5000 Da. V porovnání s UFH má LMWH sníženou schopnost inaktivovat trombin. Je to v důsledku kratších řetězců, které nedokáží současně vázat AT III a trombin. Pentasacharidová sekvence zprostředkovávající vazbu mezi LMWH a AT III se totiž vyskytuje méně než u jedné třetiny molekul LMWH. Na druhé straně vytvořený komplex LMWH s AT III podporuje inhibici F Xa a dochází tak k výraznému snížení generace trombinu.

Depolymerací se redukuje schopnost vázat se na plazmatické proteiny a povrchy buněk. Tato snížená vazba zvyšuje jak plazmatický poločas, tak i lepší odhad účinku vzhledem k podané dávce (Hirsh et al.,2001; Pecka, 2004).

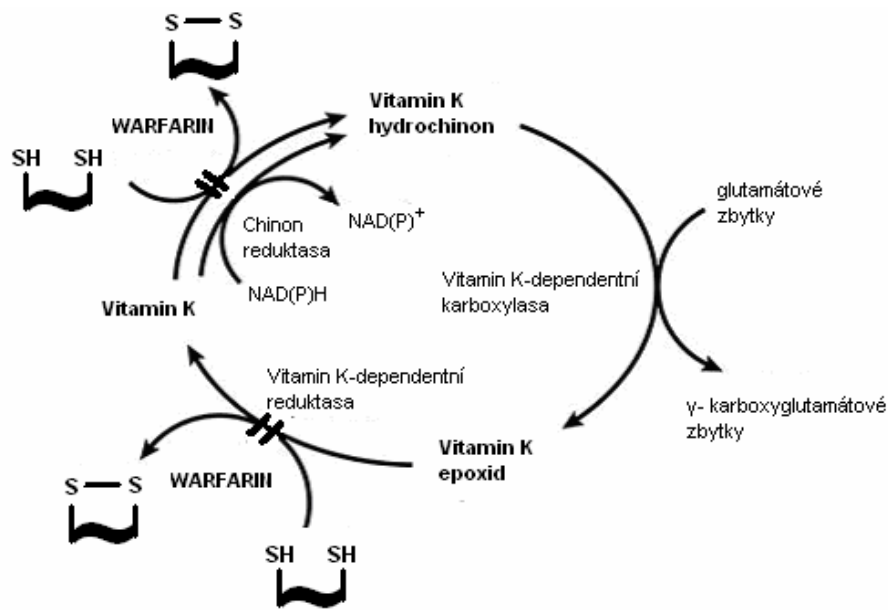
Nepřímá antikoagulancia

Působením těchto látek dochází k inaktivaci jaterní syntézy plazmatických faktorů, jejichž tvorba je závislá na přítomnosti vitamínu K (F II, VII, IX, X, PC a PS). Jako perorální antikoagulancia se používá dikumarinový derivát **etylbiskumacetát** (Pelentan) anebo derivát monokumarinu **warfarin sodný** (Warfarin)

Warfarin sodný je racemická směs dvou optických isomerů R a S. Zatímco antikoagulační účinek warfarinu se projeví do dvou dnů od zahájení léčby, antitrombotické účinky se projeví až po 6 dnech léčby. Nevýhodou při užívání warfarinu je možné ovlivnění užíváním jiných léků, příjmu vitamínu K v potravě a jeho vstřebávání ve střevě. Proto je v průběhu antikoagulační terapie nutná pravidelná kontrola INR, aby nemohlo dojít k poddávkování či předávkování.

Mechanismus účinku warfarinu

Antikoagulační působení se odehrává v endoplazmatickém retikulu jater, kde dochází k tvorbě hydrochinonové (aktivní) formy vitamínu K. Při tzv. cyklu vitamínu K probíhá přeměna 2,3 - epoxidových produktů karboxylační reakce za katalýzy 2,3 - epoxidreduktasy na chinonovou formu vitamínu K, která je poté pomocí NADPH redukována na hydrochinon a tak je celý cyklus pro regeneraci vitamínu K uzavřen (Obr.4). Warfarin inhibuje enzym epoxidreduktasu a tím nedochází k tvorbě hydrochinonové formy vitamínu K, která je nezbytná pro tvorbu aktivních plazmatických faktorů (γ - karboxyglutamátových zbytků) (Hirsh et al.,1995; Hynie, 2001).



Obrázek 4: Působení warfarinu v cyklu vitaminu K

(upraveno dle <http://pi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminK/kcycle.html>)

PROTIDESTIČKOVÉ LÉKY

Inhibují aktivitu krevních destiček, brání vzniku trombu a ostatních funkcí destiček.

Mechanismy účinku jednotlivých protidestičkových látek:

- zábrana adheze destiček na subendotel
- blokáda aktivačních mechanismů
- inhibice agregace krevních destiček
- inhibice uvolnění intracelulárních látek

Nejpoužívanějšími látkami jsou **kyselina acetylsalicylová**, která inhibuje oxygenasu, **sulfinpyrazon** a **indobufen**, což jsou - inhibitory dalších produktů kyseliny arachidonové, **tiklopidin** - přímý inhibitor agregace krevních destiček, **dipyridamol** - inhibitor degradace cAMP v krevních destičkách (Kubisz, 2006).

TROMBOLYTIKA

Cílem těchto látek je rozpuštění vzniklého trombu. K odstranění trombu se především používají léčiva s fybrinolytickým účinkem.

Fibrinolytika

Jejich působení vede k degradaci fibrinu a následné trombolýze.

Mechanismy účinku:

- aktivace plazminogenu na plazmin
- degradace fibrinu
- trombolýza
- rekanalizace cév

Aktivátory přeměny plazminogenu na plazmin jsou urokinasa a tPA (přímé aktivátory). Dále je možná aktivace tzv. proaktivátory jako je streptokinasa. Vzniklý plazmin je nespecifický proteolytický enzym, který degraduje fibrinovou sraženinu a některé koagulační faktory. Všechna fibrinolytika - **streptokinasa, urokinasa, alteplasa a reteplasa** jsou aplikovány intravenózně nebo intraarteriálně (Hynie, 2001; Květina et al., 2009).

2.4 Laboratorní vyšetření hemostázy

Pro běžná stanovení se ve většině laboratoří využívají koagulační testy. Ty jsou založeny na principu stanovení času potřebného k vytvoření fibrinových vláken, měřeného od okamžiku odebrání krve nebo přidání startovací reagensie k testovanému vzorku (Matýšková et al., 1999).

Koagulační testy dělíme:

1. Skupinové - odlišení poruch vnějšího a vnitřního systému a přeměny fibrinogenu
2. Globální (nespecifické) - postihují koagulaci krve v jejím celku, pouze orientační
3. Specifické - vyšetření jednotlivých plazmatických faktorů (Penka et al., 1994)

2.4.1 Skupinové testy

Vzhledem ke komplexnosti celého hemostatického systému zahrnující přísnou regulaci s mnoha kontrolními mechanismy, není možné zajistit zobrazení jeho celkového stavu. Jednotlivé laboratorní testy jsou schopny zobrazovat vždy jen část koagulačního systému. Základní skupinové testy : aktivovaný tromboplastinový čas aPPT, protrombinový čas PT (Quickův) a trombinový čas TT, monitorují pouze první fázi hemostatického systému resp. čas do vzniku koagula. V této fázi je generováno jen 5 % z celkového fyziologického množství formovaného trombinu. Proto tyto testy nejsou schopny zachytit projevy spojené s hyperkoagulací. Ani informace získané z jiných testů, jako je kvalitativní či kvantitativní stanovení koagulačních faktorů anebo aktivity plazmatického systému, nemohou sloužit k posouzení celkového stavu hemostatického systému, protože neexistuje jednoduchý vztah mezi koncentrací faktoru a celkovou funkcí systému (Hemker et al., 2006; Veen et al., 2008).

2.4.2 Globální testy

Využitelnost globálních testů v klinické praxi je v současnosti minimální. Metody, jež měly posoudit celkovou hemostatickou funkci organismu, jsou pro svou nepřesnost a nespecifičnost z velké části nahrazovány testy skupinovými. Stále využívána je

metoda nepřímé monitorace generace trombinu – trombelastografie (TEG). Princip TEG je založen na monitoraci viskozity krve během hemokoagulace. Výsledná tromboelastografická křivka odráží dynamické změny v jednotlivých fázích srážení. I když tato metoda má mnoho výhod (např. stanovení z plné krve nebo rychlost stanovení), jako přesnější a klinicky přijatelnější se jeví test založený na měření kinetiky generace trombinu (Reikvam et al., 2009).

2.5 Měření generace trombinu

Měření generace trombinu bylo poprvé popsáno v roce 1953 hned dvěma skupinami - Macfarlane & Biggs, Pitney & Dacie. Metoda byla zpočátku obtížně proveditelná a měla vysokou variabilitu (Veen et al., 2008).

O 30 let později byla prof. Hemkerem a jeho kolegy vyvinuta automatická metoda, která snížila nepřesnost testu a umožňovala jednodušší použití, čímž bylo měření zrychleno a usnadněno (Hemker et al., 1986).

2.5.1 Role trombinu v hemostáze

Trombin hraje klíčovou roli v procesu krevního srážení. Krevní srážení ovlivňuje nejen svou schopností rychlé generace, ale také enzymatickým účinkem na většinu faktorů v koagulační kaskádě. V místě cévního poranění trombin zajišťuje aktivaci krevního srážení, zároveň je ale schopen pomocí odpovědných proteas celý mechanismus zastavit. Může tedy působit jak prokoagulačně, tak antikoagulačně. Má multifunkční schopnosti, kterými ovlivňuje celkový proces hemostázy. Vedle přeměny fibrinogenu na fibrin je schopen zajistit jak aktivaci kofaktorů F V a F VIII (pomocí zpětné vazby), tak i jejich degradaci. Aktivuje F XIII i F IX a zároveň je účinným induktorem aktivace krevních destiček. Na endotelu posiluje tvorbu a sekreci tPA a dalších látek. Po vazbě na TM aktivuje PC na aktivní formu (APC) a poté již nemůže zasáhnout do procesu srážení krve.

Nadměrná či nedostatečná tvorba trombinu vede k porušení rovnováhy hemostázy. Proto možnost sledování kinetiky jeho generace je vhodné řešení jak posoudit funkci celého hemostatického systému (Baglin, 2005; Crawley et al., 2007).

2.5.2 Možnosti měření generace

Při měření generace trombinu musíme brát v úvahu zásadní rozdíl mezi měřením generace trombinu *in-vivo* a *in-vitro*.

Měření generace trombinu *in-vivo* je založeno na stanovení markerů generace trombinu, jako jsou protrombinové fragmenty 1 a 2 (F₁₊₂), komplex trombin - antitrombin nebo fibrinopeptid A (Baglin, 2005).

Měření *in-vitro* (ve zkumavce) je založeno na stanovení endogenního potenciálu AUC (ETP), což je celkové množství trombinu, které je plazma v daný okamžik schopna vygenerovat (Hemker et al, 1986). Tato metoda iniciuje generaci trombinu přidáním aktivátoru k rekalifikované plazmě. Reakce probíhá za přítomnosti negativně nabitých PL způsobujících v přítomnosti trombinu štěpení chromogenního nebo fluorogenního substrátu (Veen et al., 2008).

Technika využívající chromogenní substrát se provádí v defibrinované plazmě, což není nutné u fluorogenního substrátu, který může být stejně dobře využit jak v plazmě na destičky bohaté (PRP), tak i chudé (PPP) (Hemker et al, 2000; Ramjee, 2000). Výsledné parametry křivky generace trombinu jsou odrazem individuální schopnosti generace trombinu, a tedy i pravděpodobností rozvoje spontánního nebo vyvolaného krvácení nebo trombózy (Baglin, 2005).

2.5.3 Technické parametry TGA

V případě metod, které mají být přijaty do běžné laboratorní praxe je třeba, aby byly reprodukovatelné, standardizované a poměrně snadno proveditelné.

V současné době jsou dostupné dva komerční fluorogenní testy, kalibrovaný automatizovaný trombin generiční test (CAT) (Thrombinoscope B.V., Maastricht, The Netherlands) a Technothrombin® TGA assay (Technoclone, Vienna, Austria). Doposud publikované studie potvrzují dostatečnou intralaboratorní reprodukovatelnost s intra - a inter - assay koeficientem variace < 10% v PPP i PRP.

Mezilaboratorní variabilita je závislá na standardizaci reagensů a metodice. Zavedení nových reagensů nebo pouze jiných šarží může představovat významnou změnu variability, vyžadující rekalibraci testu nebo změnu referenčního rozmezí. Změnou analytických podmínek - změna koncentrace TF, PL nebo substrátu můžeme docílit zvýšení citlivosti testu. Pro dosažení spolehlivých výsledků jsou velmi důležité i pre-analytické podmínky - jako jsou např. odběr krve, její uchování nebo přeprava. Vzhledem k těmto skutečnostem je mezilaboratorní srovnávání výsledků alespoň prozatím problematické (Hemker et al., 2003).

2.5.4 Využití TGA v klinické praxi

Zjednodušení a lepší reprodukovatelnost měření generace trombinu vedla ke zvýšení využití TGA v laboratořích. Výsledné parametry křivky, zvláště hodnota AUC, mohou být využity při hodnocení krvácivých či trombotických rizik anebo v případě posuzování efektivity léčby antitrombotiky či hemostatiky (Obr.5).

Měřené parametry TGA:

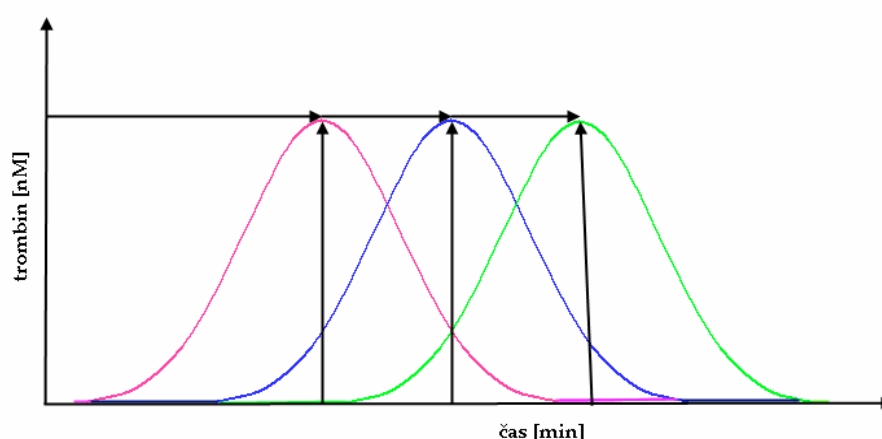
- INR- mezinárodní normalizovaný poměr, nutný pro vyjadřování výsledků PT u pacientů léčených kumariny

$$\text{INR} = [t_p/t_N]^{\text{ISI}}$$

t_p , t_N - časy pacienta a kontroly

ISI - mezinárodní index citlivosti, který vyjadřuje citlivost použitého tromboplastinu k mezinárodnímu standardnímu tromboplastinu

- t_{Lag} [min] - čas do začátku generace trombinu, referenční rozmezí 2,3 - 5,1 min
- t_{Peak} [min] - čas od začátku generace trombinu po jeho maximální koncentraci, referenční rozmezí 6,2 - 9,8 min.
- m_{Peak} [nM] - maximální koncentrace vygenerovaného trombinu, referenční rozmezí 21,7- 214,8 nM
- AUC [nM] = endogenní potenciál (ETP) - celkové množství vygenerovaného trombinu, referenční rozmezí 1014- 1949 nM



Obrázek 5: Prodloužení iniciační fáze při správném nastavení antikoagulační léčby

Z dostupných údajů vyplývá, že zvýšení generace trombinu je spojeno s trombofilními stavy způsobenými např. mutací F V Leiden (R506Q), F II (protrombin G 20210 A) tak i vrozenými deficitem PC, PS a antitrombinu (Luddington, Baglin, 2004; Hirsh, 1995).

Naproti tomu několik studií o hemofilii prokázalo korelaci mezi koagulační aktivitou F VIII (F IX) a AUC i peaku generace trombinu (Chantarangkul et al, 2003). Současně dochází i k dobrému rozlišení hodnot AUC a peaku generace trombinu mezi zdravými osobami a pacienty s různým stupněm závažnosti hemofilie (Luddington, Baglin, 2004). Celková generace trombinu však u dědičných krvácivých poruch vykazuje významné rozdíly mezi pacienty se stejným defektem, které přetrvávají i po léčbě. To otevírá možnost individuální léčby založené na generaci trombinu.

Trombin generační test není tedy jen nástrojem pro lepší pochopení jednotlivých fází hemokoagulace, ale je i možnou cestou monitorace hypokoagulačních či hyperkoagulačních stavů popřípadě jejich prevence (Veen et al., 2008).

3. Experimentální část

3.1 Cíle experimentální části

V současné době existuje mnoho typů antitrombotik s rozlišnými mechanismy účinku. Warfarin spolu s heparinem však patří k nejpoužívanějším antikoagulantům. Jejich působení bylo doposud možné monitorovat pouze pomocí aPPT a PT testů. Ty však plně neodrážejí fyziologické procesy při hemokoagulaci. Proto bylo nutné vyvinout takový test, který by byl schopen monitorovat celkovou funkci hemostázy a zároveň by byl citlivý ke všem typům antikoagulantů. Hlavním cílem experimentální části bylo posoudit možnosti využití TGA při hodnocení efektivity antikoagulační léčby. Jednotlivé naměřené parametry (tLag - čas do začátku generace trombinu, tPeak - čas od začátku generace trombinu po jeho maximální koncentraci, mPeak - maximální koncentrace vygenerovaného trombinu, AUC - celkové množství vygenerovaného trombinu) byly srovnávány s hodnotou INR (mezinárodní normalizovaný poměr) vypočtenou z Quickova testu.

V druhé části práce byl monitorován vliv hemostatické léčby na množství generovaného trombinu u pacienta se závažnou krvácivou poruchou, kterou byla přítomnost specifického inhibitoru.

3.2 Materiál a metody

3.2.1 Přístrojové vybavení

- Centrifugy Eppendorf 5700, Eppendorf GmbH ,Hamburg, Německo
- Automatické pipety Eppendorf Research, Eppendorf GmbH Hamburg, Německo
- Koagulační analyzátor Ceveron® Alpha, Technoclone, Rakousko - je plně automatizovaný přístroj vybavený fluorescenčním modulem, který umožňuje kromě základních koagulačních, chromogenních, turbidimetrických testů také testy fluorogenní. Integrovaný fluorescenční modul je umístěný nad kyvetovým rotorem a pracuje s excitační vlnovou délkou 360 nm a emisní vlnovou délkou 465 nm (Obr.6).

Základní části automatického analyzátoru:

rotor s reakčními kyvetami (1)

rotor se vzorky (2)

fluorescenční modul (3)

chlazený prostor na reagentie (4)

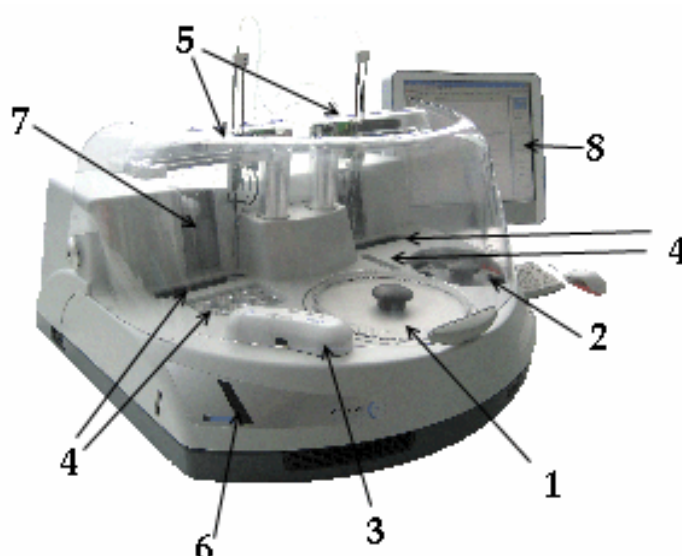
sérové a reagenční pipetory (5)

čtečka čárových kódů (6)

promývací zařízení (7)

monitor (8)

Software Ceveron PC - vyhodnocení výsledků verzí SW 1.4



Obrázek 6: Koagulační analyzátor Ceveron® Alpha

(upraveno dle http://www.technoclone.com/pdf/folder/files/TGA001E.012_Technothrombin_TGA.pdf)

3.2.2 Materiál

- plazma chudá na destičky získaná centrifugací (3 min při 4440 g) odběru žilní krve do 3,2 % citrátu sodném v poměru 1:9
- Vyšetřovací kit TECHNOTROMBIN® TGA, Technoclone, Rakousko
SUB TECHNOTROMBIN TGA – 1 mM fluorogenní peptidový substrát Z-Gly-Gly-Arg-AMC

REACTION BUF TECHNOTROMBIN TGA - pufr Tris (tris(hydroxymethyl) methylamin) - HEPES (4 - (2 - hydroxyethyl) - 1 - piperazin - ethansulfonová kyselina) - NaCl, hovězí sérový albumin

LOW RC TECHNOTROMBIN TGA – 5 pM rekombinantní lidský tkáňový faktor (rhTF), nízká koncentrace fosfolipidových micel, pufr Tris - HEPES - NaCl, používá se k monitoraci bypassové léčby rekombinantním F VIIa, měření trombofilních a krvácivých tendencí

RB TECHNOTROMBIN TGA – 2 pM rhTF, nízká koncentrace fosfolipidových micel, pufr Tris - HEPES - NaCl, používá se při monitoraci bypassové léčby přípravky obsahujícími koncentrát aktivovaného protrombinového komplexu (FEIBA)

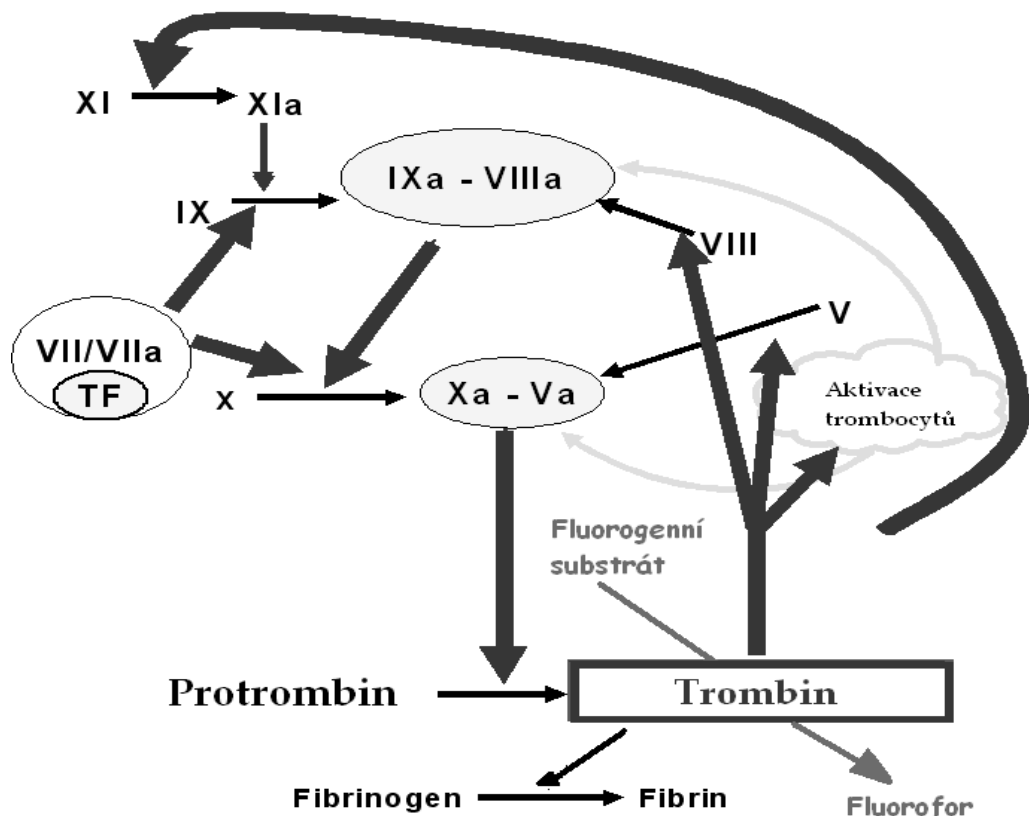
CaCl₂ (25 mmol/l)

- TGA TECHNOHROMBIN CALIBRATOR- 1 mM trombinový kalibrátor, pufr Tris - HEPES - NaCl, hovězí sérový albumin
- Destilovaná voda

3.2.3 Princip metody

Pro experimentální část byl použit kompaktní a plně automatizovaný koagulační analyzátor Ceveron® Alpha a vyšetřovací kit TECHNOTROMBIN® TGA .

Metoda je založena na měření generace trombinu v plazmě chudé na destičky prostřednictvím fluorogenního substrátu po aktivaci koagulační kaskády TF. Iniciací trombinu je spojena s působením vnější tenasy. Po navázání TFPI na TF dochází k utlumení této cesty a dochází ke generaci trombinu za pomoci vnitřní tenasy. Vše probíhá v přítomnosti negativně nabitých PL a Ca²⁺. Vzniklý trombin štěpí fluorogenní substrát na fluorofor (7-amino-4-methylkumarin), jehož signál je zaznamenáván (Obr.7). Fluorescenční signál je zachycen fluorescenčním detektorem, který převádí primární naměřené referenční fluorescenční jednotky (RFU) do počítače.



Obrázek 7: Princip TGA

(upraveno dle http://www.technoclone.com/pdf/folder/files/TGA001E.012_Technothrombin_TGA.pdf)

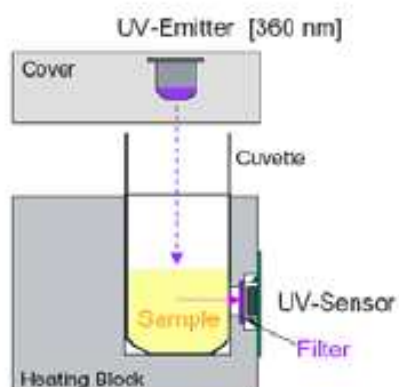
3.2.3.1 Fluorescenční signál

Fluorescence, fosforescence a chemiluminiscence patří pod obecnou luminiscenční techniku. Jsou založeny na principu emise záření.

Při fluorescenci dochází k absorpci záření v ultrafialové oblasti spektra a to vede k excitaci elektronu (resp. molekuly) ze základního stavu do vyšších elektronových vibračních stavů. V důsledku srážek s ostatními molekulami dochází rychle ke ztrátám energie a molekula přechází na nejnižší možný vibrační stav. Do základního stavu se může dostat buď emisí fotonů - zářivý přechod, a nebo vnitřní konverzí (vibrační relaxace), kdy odevzdaná energie rozvibruje molekulu - nezářivý přechod.

Při analýze vzorku vychází z fluorescenčního modulu (zdroj záření) excitační paprsek o vlnové délce 360 nm. Dochází k excitaci molekul fluoroforu a následné fluorescenční emisi. Emisní záření (465 nm) je sledováno UV-senzorem pod úhlem 90°

přes filtr, který selektuje záření o požadované vlnové délce. Poté dochází ke zpracování a vyhodnocení signálu (Obr.8) (McGown, Nithipatikom, 2000).

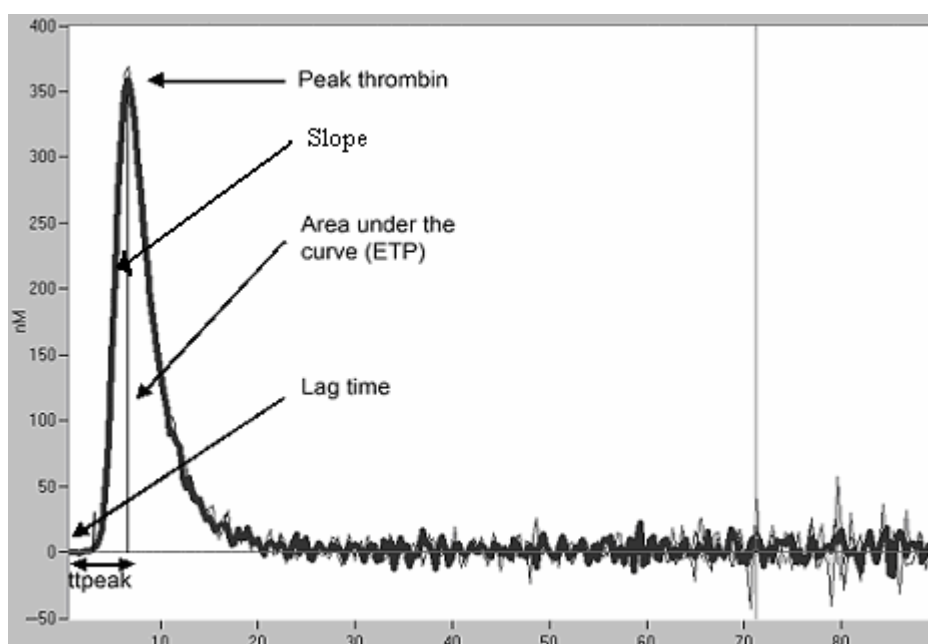


Obrázek 8: Průchod paprsku reakční kvyetou

(upraveno dle http://www.technoclone.com/pdf/folder/files/TGA001E.012_Technothrombin TGA.pdf)

3.2.3.2 Vyhodnocení

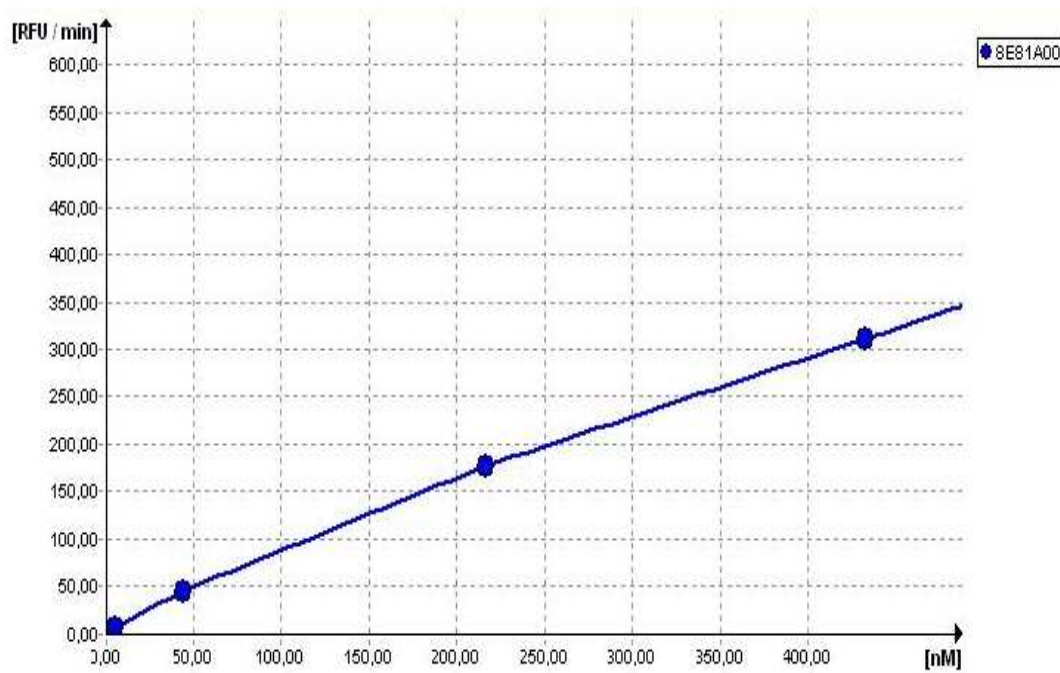
Primárně měřené referenční fluorescenční jednotky (RFU) jsou pomocí kalibrační křivky převáděny na aktuální koncentrace trombinu ve vzorku. Derivací je získána křivka závislosti koncentrace trombinu na čase (Obr.9). Je charakterizována : *lag fází* - čas do začátku generace trombinu, *slope* - rychlost nárůstu generace, *peak*- maximální koncentraci trombinu, *endogenním potenciálem (AUC nebo ETP)* - plocha pod křivkou charakterizující celkové množství generovaného trombinu, *inaktivační fází* .



Obrázek 9: Trombin generační křivka (Veen et al., 2008)

3.2.4 Kalibrační křivka

Aby naměřené RFU mohly být převedeny na aktuální koncentraci trombinu v plazmě, je nutné sestavit kalibrační křivku. Kalibrační křivka závislosti RFU na koncentraci trombinu má lineární charakter (Obr.10). Je získána na základě měření zředěných vzorků trombinového kalibrátoru. Kalibrace se provádí pouze jednou na danou šarži reagensů.



Obrázek 10: Kalibrační křivka

3.2.4.1 Příprava reagensů a koncentračních bodů

Jednotlivé reagensie byly rozpuštěny v požadovaném množství destilované vody (Tab.6). Po řádném rozpuštění byly načteny pomocí čárového kódu (uveden na každé reagensii) koagulačním analyzátozem. Tím se jednak zajistí správná pozice dané reagensie v prostoru analyzátozu, a jednak je zamezeno použití reagensů po expiraci. Poté jsou analyzátozem automaticky vytvořeny koncentrační body (Tab.7) a dochází ke generaci kalibrační křivky.

Tabulka 6: Příprava reagensí k sestrojení kalibrační křivky

Reagencie	Destilovaná voda [ml]
TGA TECHNOTHROMBIN CALIBRATOR	0,50
REACTION BUF TECHNOTROMBIN TGA	1,00
SUB TECHNOTROMBIN TGA	3,00
CaCl ₂	-

Tabulka 7: Koncentrační body trombin/reakční pufr

Poměr trombin/reakční pufr	Koncentrace trombinu [nM]
1:1	432,00
1:2	216,00
1:10	43,20
1:100	4,320

3.2.4.2 Měření

Z každého koncentračního bodu trombinového kalibrátoru bylo pro stanovení odebráno 90 µl standardu trombinu. K jednotlivým vzorkům bylo přidáno 40 µl fluorogenního substrátu (SUB TECHNOTHROMBIN TGA). Samotná reakce byla iniciována 25 µl CaCl₂. Detekce fluorescence byla prováděna v jednominutových intervalech po dobu 10 min při 37 °C. Měření probíhalo v dubletu.

3.3 Vlastní měření

3.3.1 Soubor pacientů

Soubor byl tvořen pacienty užívajícími antikoagulační léčbu. Vzorky žilní krve byly vybrány na základě anamnézy jednotlivých pacientů bez ohledu na pohlaví a věk. Do souboru byli zařazeni pacienti s tromboembolickými komplikacemi či rizikovými faktory s různým trombogenním potenciálem. Léčba byla většinou zahájena podáváním LMWH poté následovala léčba dikumariny – warfarin, kdy byly odebírány vzorky pro stanovení TGA.

Dále byl do souboru zařazen pacient s přítomností specifického inhibitoru, který byl léčen pro závažné krvácivé komplikace. Kontrola substituční (NovoSeven) a eradikační léčby inhibitoru koagulace, který se u tohoto pacienta idiopaticky vyvinul pomocí TGA

metody představuje jedinou možnost, jak efektivně kontrolovat účinek léčby a současně riziko krvácení.

3.3.2 Příprava vzorků

Žilní krev byla odebrána do zkumavek obsahujících 3,2 % citrátu sodného. Vzorek byl poté za laboratorní teploty centrifugován 3 minuty při 4440 g. Získaná plazma chudá na destičky (PPP) byla rozdělena do mikrozkušavek Eppendorf a následně proběhla analýza. Pokud analýza nemohla proběhnout ihned, byl vzorek zamrazen a uchováván při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby vyšetření. Takto uchovaný vzorek musel být před analýzou rozmrazen v termostatu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3 Příprava reagensů

Postup přípravy reagensů k samotnému měření (Tab.8) je shodný s přípravou reagensů k sestrojení kalibrační křivky (viz.3.2.4.1).

Tabulka 8: Příprava reagensů

Reagencie	Destilovaná voda[ml]
SUB TECHNOTROMBIN TGA	3,00
REACTION BUF	
TECHNOTROMBIN TGA	1,00
LOW RC TECHNOTROMBIN TGA (RB TECHNOTROMBIN TGA)	1,00
CaCl ₂	-

3.3.4 Měření

➤ Pacienti na warfarinu

K 40 μl vzorku PPP bylo přidáno 20 μl reakčního pufru (REACTION BUF TECHNOTHROMBIN TGA) a 15 μl TF s negativně nabitými PL (**LOW RC TECHNOTHROMBIN TGA**). Poté bylo přidáno 25 μl fluorogenního substrátu (SUB TECHNOTHROMBIN TGA). Samotná reakce byla spuštěna 35 μl CaCl₂.

➤ Pacient s přítomností specifického inhibitoru

K 40 μl vzorku PPP bylo přidáno 20 μl reakčního pufru (REACTION BUF TECHNOTHROMBIN TGA) a 15 μl TF s negativně nabitými PL (**RB TECHNOTHROMBIN TGA**). Poté bylo přidáno 25 μl fluorogenního substrátu (SUB TECHNOTHROMBIN TGA). Samotná reakce byla spuštěna 35 μl CaCl₂.

V obou případech bylo měření prováděno v dubletu. Detekce fluorescenčního signálu probíhala v jednodominutových intervalech po dobu 60 min. Poté byly hodnoty pomocí softwaru Ceveron PC - SW ver. 1.4. a kalibrační křivky převedeny na aktuální koncentraci trombinu ve vzorku. Vyhodnocení jednotlivých parametrů TGA bylo provedeno derivací naměřené křivky.

4. Výsledky a diskuse

Trombin generační test byl použit u 49 pacientů léčených warfarinem a u 1 pacienta s přítomností specifického inhibitoru. U pacientů na warfarinu byly jednotlivé parametry TGA srovnávány s hodnotou INR Quickova testu.

U pacienta s přítomností specifického inhibitoru byl pomocí TGA dlouhodobě monitorován vliv substituční a eradikační léčby na množství generovaného trombinu.

➤ Pacienti na warfarinu

V Tab.9 jsou uvedeny naměřené parametry TGA pacientů léčených warfarinem. Celkem bylo 49 vzorků u nichž byly měřeny hodnoty INR, tLag, tPeak, mPeak a AUC.

Při správném nastavení antikoagulační léčby by se hodnota INR měla pohybovat v terapeutickém rozmezí (2,0-3,5), což odpovídá prodloužení iniciační fáze trombin generační křivky a prodloužení tPeak. Je-li hodnota INR nižší zvyšuje se riziko trombózy (snížení: tLag, tPeak; zvýšení: mPeak a AUC) . Naopak je-li hodnota INR nad terapeutickým rozmezím zvyšuje se riziko krvácení (zvýšení: tLag, tPeak; snížení: mPeak a AUC)

Z výpočtu korelačního koeficientu byla prokázána pozitivní korelace tLag (0,81855) a tPeak (0,70152) s hodnotou INR. Naopak negativní korelace AUC (-0,57052) a mPeak (-0,46115) s hodnotou INR.

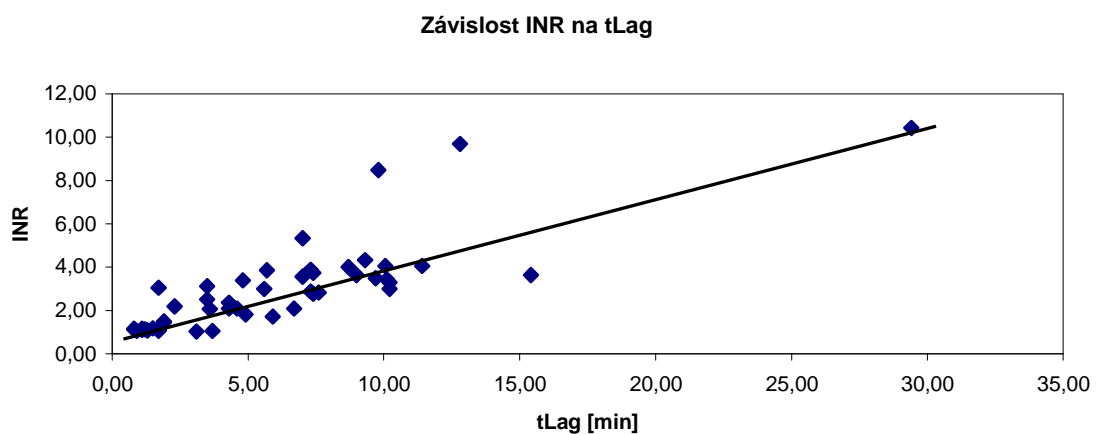
Výsledky některých pacientů se stejnou hodnotou INR mohou dosahovat významných rozdílů TGA parametrů, zvláště pak hodnoty mPeak a AUC. Možnou příčinou mohou být odchylky v hemostatickém procesu (viz. vzorky 7 a 8).

Křivka závislosti INR na tLag a INR na tPeak má lineární charakter. S rostoucí hodnotou INR dochází k prodloužení časů tLag a tPeak (Obr. 11, 12). Křivka závislosti INR na mPeak a INR na AUC má hyperbolický charakter s podstatně vyšší variabilitou. Nad terapeutickým rozmezím INR dochází k významnému snížení mPeak a AUC (Obr. 13, 14).

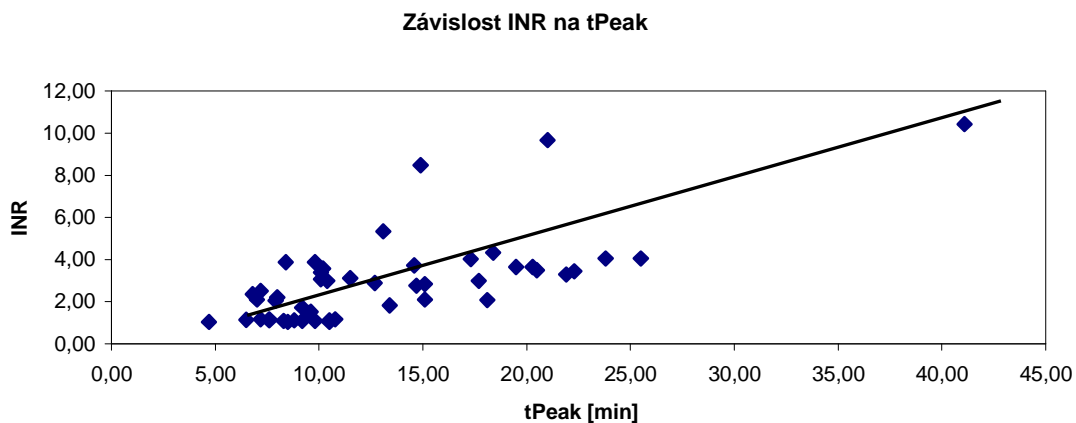
Tabulka 9: Naměřené parametry TGA pacientů na warfarinu

Vzorek	INR	tLag [min]	tPeak [min]	mPeak [nM]	AUC [nM]
1	3,49	9,70	20,50	27,10	551,30
2	2,83	7,60	15,10	38,60	739,20
3	3,40	4,80	10,10	209,80	2148,60
4	3,29	10,20	21,90	29,20	605,50
5	3,45	10,10	22,30	31,10	710,30
6	2,77	7,40	14,70	52,90	911,90
7	3,64	9,00	19,50	44,40	876,20
8	3,64	15,40	20,30	22,00	409,10
9	10,42	29,40	41,10	9,90	107,30
10	8,49	9,80	14,90	54,40	557,40
11	5,33	7,00	13,10	84,20	877,30
12	4,32	9,30	18,40	26,10	398,00
13	3,73	7,40	14,60	42,30	625,10
14	2,99	5,60	10,40	46,90	511,90
15	2,50	3,50	7,20	122,70	925,10
16	2,06	3,60	7,90	144,00	1239,30
17	1,05	3,70	8,50	103,60	914,60
18	2,20	2,30	8,00	274,50	2559,50
19	1,16	1,10	7,60	142,00	1406,60
20	1,11	1,70	10,50	133,40	1753,30
21	1,11	1,10	8,80	129,40	1729,50
22	1,83	4,90	13,40	45,30	818,80
23	1,12	1,20	7,60	178,30	1963,70
24	1,71	5,90	9,20	39,10	743,40
25	1,09	1,30	9,80	121,80	1665,40
26	1,17	1,50	10,80	111,20	1764,60
27	1,09	1,70	9,20	103,50	1023,40
28	3,06	1,70	10,10	127,70	1668,50
29	1,13	0,80	6,50	206,50	2068,90
30	1,16	0,80	7,20	129,60	1527,60
31	4,05	10,06	25,50	24,00	564,30
32	4,02	8,70	17,30	33,10	512,70
33	4,06	11,40	23,80	22,80	486,20
34	3,00	10,20	17,70	29,00	619,70

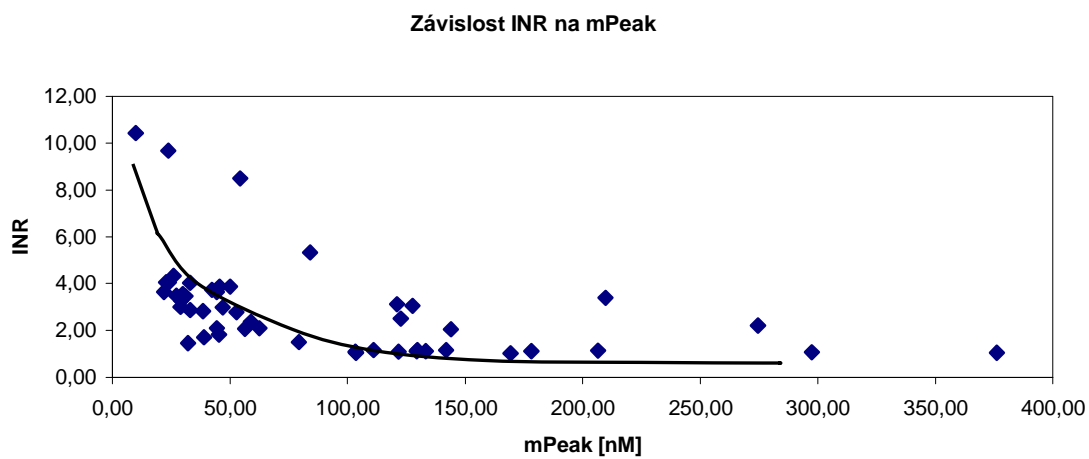
Vzorek	INR	tLag [min]	tPeak [min]	mPeak [nM]	AUC [nM]
35	3,12	3,50	11,50	121,20	1879,30
36	2,10	4,60	15,10	62,60	1184,50
37	2,08	6,70	18,10	56,50	1263,00
38	1,05	0,90	4,70	376,10	2483,60
39	1,08	1,70	8,30	297,50	2847,20
40	1,03	3,10	10,50	169,50	2088,70
41	9,68	12,80	21,00	23,70	335,00
42	3,87	5,70	8,40	50,10	559,00
43	1,46	1,90	9,50	32,20	838,00
44	2,09	4,30	7,00	44,50	648,00
45	3,88	7,30	9,80	45,60	535,00
46	2,88	7,30	12,70	33,10	436,00
47	3,56	7,00	10,20	30,00	814,00
48	1,51	1,90	9,60	79,40	1229,00
49	2,36	4,30	6,80	58,90	706,00
KORELACE		0,81855	0,70152	-0,46115	-0,57052



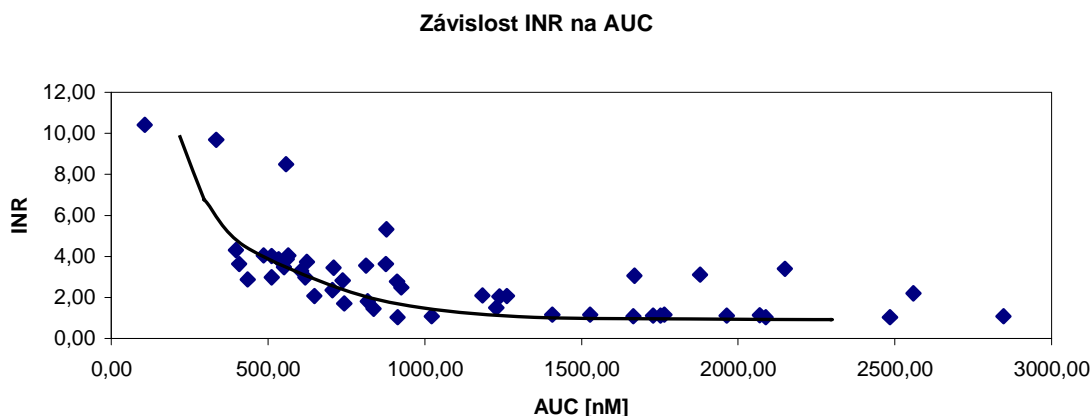
Obrázek 11: Závislost INR na tLag



Obrázek 12: Závislost INR na tPeak



Obrázek 13: Závislost INR na mPeak



Obrázek 14: Závislost INR na AUC

➤ Pacient s inhibítorem

U pacienta byly opakovaně měřeny parametry tLag, tPeak, mPeak a AUC (Tab.10) Během léčby byl sledován jak vliv inhibitoru, tak účinek substituční a eradikační léčby.

Přítomný inhibitor ovlivňoval prokoagulační aktivitu FVIII, kdy došlo k jeho významnému snížení a tedy i výraznému snížení generace trombinu (Obr.15). To dokazují naměřené parametry TGA ze dne 24.11.09 (před léčbou), kdy jsou prodlouženy časy tLag, tPeak a hodnoty mPeak, AUC jsou výrazně sníženy. Po zahájení léčby cytostatiky – 1500 mg Cyklofosfamidu a rekombinantním F VIIa – 1,2 mg NovoSeven dochází k požadovanému snížení tLag, tPeak a naopak ke zvýšení mPeak, AUC. Poté byla indikována kombinovaná léčba cytostatiky - 1500 mg Cyklofosfamidu a imunoglobuliny – 30 mg Gammagard. Vlivem eradikační léčby dochází k významnému zvýšení parametrů mPeak a AUC, naopak ke snížení hodnot tLag a tPeak, což vypovídá o úspěšné eliminaci inhibitoru.

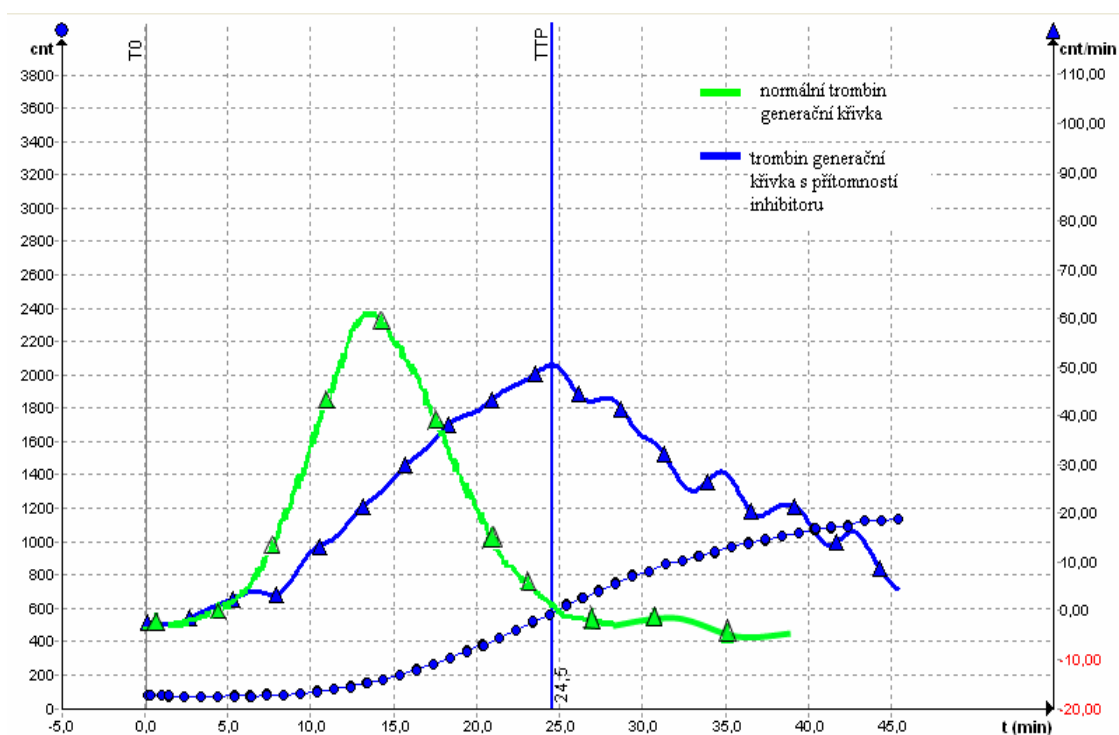
Sledováním parametru AUC během léčby vznikla křivka závislosti koncentrace trombinu na indikované léčbě (Obr.16)

Tabulka 10: Parametry TGA u pacienta se specifickým inhibítorem

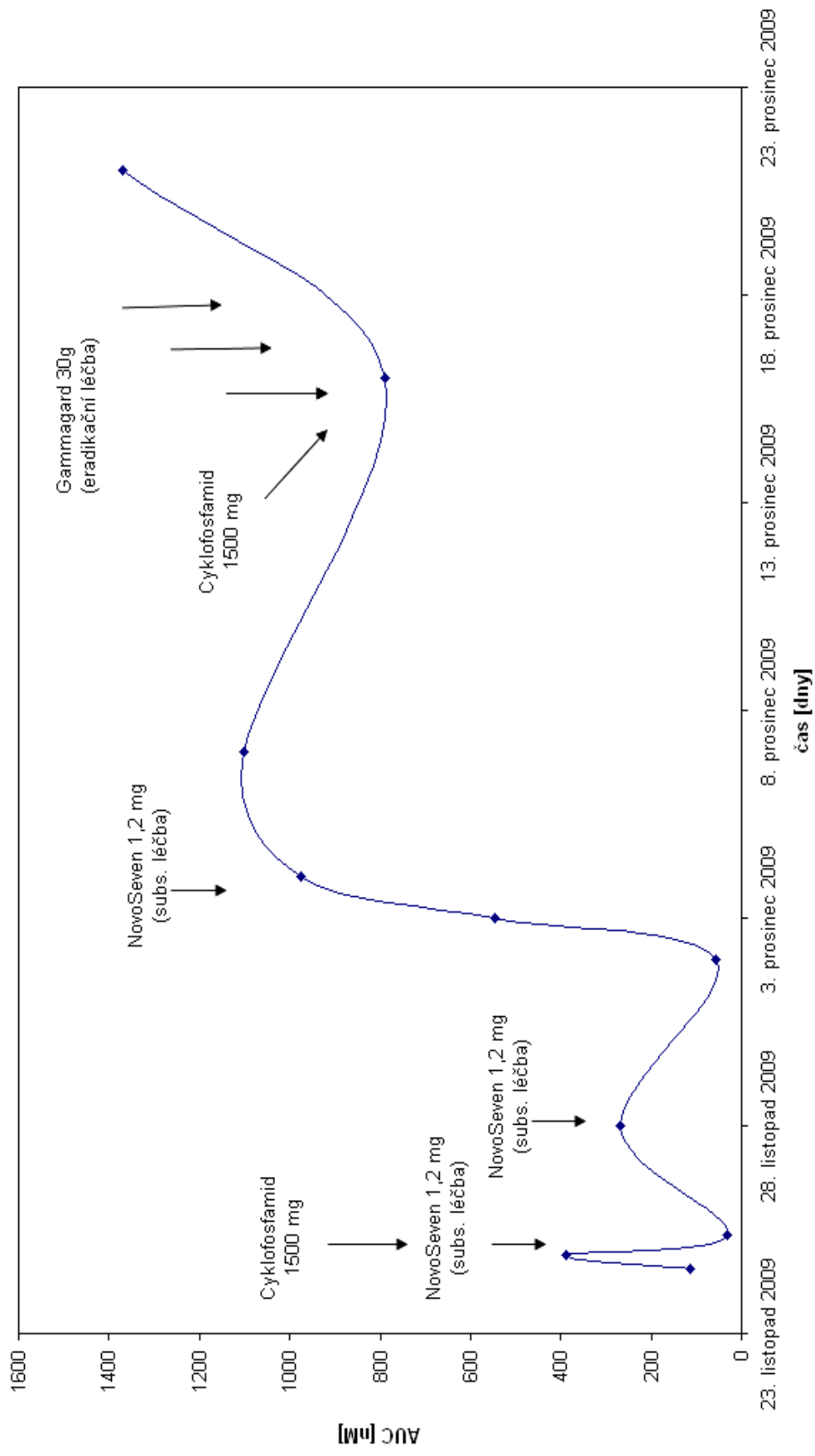
Čas[dny]	tLag [min]	tPeak [min]	mPeak [nM]	AUC [nM]
24.11.09 *	11,00	22,60	7,20	112,60
24.11.09	8,20	10,90	23,40	387,80
25.11.09	12,60	26,70	3,00	32,90
28.11.09	9,80	42,20	15,50	267,60
2.12.09	18,90	42,20	4,60	55,80

Čas[dny]	tLag [min]	tPeak [min]	mPeak [nM]	AUC [nM]
3.12.09	7,00	35,10	21,30	546,50
4.12.09	7,60	24,30	48,70	974,70
7.12.09	7,30	27,90	61,70	1100,10
16.12.09	7,70	12,90	95,10	787,70
21.12.09	7,20	16,50	83,20	1370,50

* před zahájením léčby



Obrázek 15: Trombin generační křivka 4.12. 2009



Obrázek 16: Účinek hemostatik na generaci trombinu

5. Závěr

Účinek antikoagulační léčby u pacientů léčených warfarinem byl posuzován srovnáváním parametrů TGA s INR. Prvotním ukazatelem účinné, popř. neúčinné antikoagulační léčby byla hodnota INR. Terapeutické rozmezí je staveno individuálně, avšak ve většině indikací se pohybuje v rozmezí 2–3,5. Při hodnotách pod terapeutickým rozmezím se zvyšuje riziko vzniku trombózy naopak při hodnotách vyšších, se zvyšuje riziko krvácení. Z hodnocení jednotlivých parametrů vyplývá, že parametry tLag a tPeak pozitivně korelují s hodnotou INR a křivky závislosti daných parametrů na INR mají lineární charakter. Naopak mPeak a AUC negativně korelují s hodnotou INR a křivka závislosti daných parametrů má hyperbolický charakter.

Léčba pacienta s inhibítorem měla dva hlavní cíle. Prvním bylo potlačení krvácení (eliminace klinických projevů) pomocí rFVIIa, druhým byla eliminace inhibítora vlivem eradikační léčby, kdy byla kombinována léčba cytostatiky a imunoglobuliny.

Léčba byla zahájena 1500 mg Cyklofosfamidu, který potlačil autoimunitní reakci a 1,2 mg NovoSeven, který aktivuje proces srážení pomocí rFVIIa. Poté byla zahájena léčba imunoglobuliny - Gammagard (30mg). Vlivem eradikační léčby tak došlo k eliminaci inhibítora a významnému zvýšení celkové koncentrace trombinu. To je podloženo i srovnáním naměřených parametrů TGA během celé léčby, kdy došlo k významnému zvýšení mPeak, AUC a naopak ke snížení tLag a tPeak.

Z výsledků tedy vyplývá, že TGA je vhodným nástrojem pro posuzování efektivity léčby jak hemostatiky, tak antitrombotiky. Avšak i přes nesporné výhody je nutné podotknout, že TGA vyžaduje další standardizaci, a proto jím zatím není možné nahradit tradiční koagulační testy.

Literatura

Baglin T. (2005) The measurement and application of thrombin generation. *Br. J. Haematol.* **130**, 653 – 661.

Buliková A., Smejkal P., Zavřelová J., Chlupová G., Penka M. (2008) Získané inhibitory krevního srážení. *Interní Med.* **10**, 336 – 339.

Crawley J.T.B., Zanardelli S., Chion C.K.N.K., Lane D.A. (2007) The central role of thrombin in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 95 – 101.

Geerts W.H., Heit J.A., Clagett G.P. et al. (2001) Prevention of venous thromboembolism. *Chest* **119**, 132 -175.

Heit J.A. (2007) Thrombophilia: Common questions on laboratory assessment and management. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **1**, 127 – 135.

Hemker H.C., Al Dieri R., De Smedt E., Béguin S. (2006) Thrombin generation, a function test of the haemostatic - thrombotic system. *J. Thromb. Haemost.* **96**, 553 – 561.

Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., de Smedt E., Wagenvoord R., Lecompte T., Béguin S. (2003) Calibrated automated trombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Tromb.* **33**, 4 – 15.

Hemker H. C., Wilems G.M., Béguin S. (1986) A computer assisted method obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *J. Thromb. Haemost.* **56**, 9 - 17.

Hirsh J., Anand S.S., Halperin L. J., Fuster V. (2001) Guide to anticoagulant therapy: heparin. *Circulation* **103**; 2994 - 3018.

Hirsh J., Dalen E.J., Deykin D., Poller L., Bussey.H. (1995) Oral anticoagulants: Mechanismus of action, clinical effectiveness and optimal therapeutic range. *Chest* **108**, 231 - 246.

Hynie S. (2001) Farmakologie v kostce, pp. 269 - 276, TRITON, Praha.

- Kessler P. (2006) Trombofilní stavy. *Interní Med.* **9**, 374 – 379.
- Kubisz P. a kolektiv (2006) Hematológia a transfuziológia, pp. 210 - 214, GRADA Publishing, Bratislava.
- Květina J., Herink J., Vopršalová M. (1999) Základy farmakologie II.díl Speciální farmakologie nervstva, kardiovaskulární soustavy, dýchacího systému, ledvin, pp. 98 -105, VFU Brno, Brno.
- Luddington R., Baglin T. (2004) Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 1954 - 1959.
- Mann K.G. (1997) Thrombosis: theoretical considerations. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 1657 -1664.
- Matýšková M., Zavřelová J., Hrachovinová I. (1999) Hematologie pro zdravotní laboranty, 2.díl Krevní srážení, pp. 67 – 102, IDVPZ Brno, Brno.
- McGown L., Nithipatikom K. (2000) Molecular fluorescence and phosphorescence. *Appl. Spectrosc. Rev.* **35**, 353 - 393.
- Murray R.K., Harfenist E.J. (2002) Plasmatické proteiny, imunoglobuliny a krevní koagulace. *Harperova biochemie*, pp. 701 – 725, H&H, Jihlava.
- Pecka M. (2004) Laboratorní hematologie v přehledu - Fyziologie a patofyziologie hemostázy, pp.153 - 230, FINIDR, Český Těšín.
- Penka M., Krahulcová E., Mytýšková M. (1994) Hematologie, pp. 89 - 98, IDVPZ Brno, Brno.
- Reikvam H., Steien E., Hauge B., Liseth K., Hagen K.G., Størkson R., Hervig T. (2009) Thrombelastography. *Transfus. Apher. Sci.* **40**, 119 -123.
- Schenone M., Furie B.C., Furie B. (2004) The blood coagulation cascade. *Curr. Opin. Hematom.* **11**, 272 - 277 .

Šlechtová J. (2007) Hemostáza - jak ji možná neznáme. *Klin. Biochem. Metab.* **15**, 97 - 101.

Trojan S. a kol. (2003) Lékařská fyziologie, pp.140 - 151, GRADA Publishing, Praha.

Van Veen J.J., A. Gatt, M. Makris (2008) Trombin generation testing in routine clinical practise: are we there yet?. *Br. J. Haematol.* **142**, 889 - 903.

Použité zkratky

a ₁ AT	α ₁ -antitrypsin
a ₂ AP	α ₂ -antiplazmin
a ₂ MG	α ₂ -makroglobulin
aPPT	aktivovaný tromboplastinový čas
AT III	antitrombin
AUC	celkové množství vygenerovaného trombinu
C1INH	C1-inhibitor
F I	faktor I
F II	faktor II
F IX	faktor IX
F V	faktor V
F VII	faktor VII
F VIII	faktor VIII
F X	faktor X
F XI	faktor XI
F XII	faktor XII
F XIII	faktor XIII
GP	glykoprotein
HC II	heparin kofaktor II
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonová kyselina
HMWK	vysokomolekulární kininogen
iAPC	inhibitor aktivovaného proteinu C
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
LMWH	nízkomolekulární heparin
mPeak	maximální koncentrace vygenerovaného trombinu
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PAI-2	inhibitor aktivátoru plazminogenu 2
PC	protein C
PIVKA	proteiny tvořené v nepřítomnosti vitamínu K

PK	prekalikrein
PL	fosfolipidy
PLG	plazminogen
PPP	plazma chudá na destičky
PRP	plazma bohatá na destičky
PS	protein S
PT	protrombinový čas
rF VIIa	aktivovaný rekombinantní faktor VII
RFU	referenční fluorescenční jednotka
rhTF	rekombinantní lidský tkáňový faktor
TEG	trombelastografie
TF	tkáňový faktor
TFPI	tkáňový faktor inhibitor
tLag	čas do začátku generace trombinu
TM	trombomodulin
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
tPeak	čas od začátku generace trombinu po jeho maximální koncentraci
TRIS	tris(hydroxymethyl)methylamin
UFH	nefrakciovaný heparin
uPA	urokinasa
vWF	von Willebrandův faktor