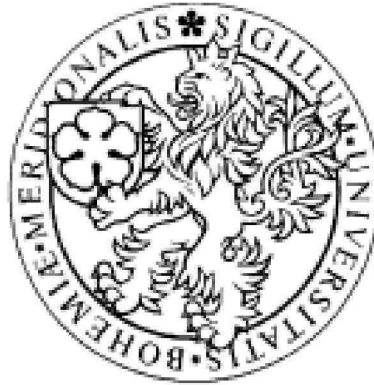


**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra medicínské biologie**



**Získané hyperkoagulační stavy se zaměřením**

**na lupus antikoagulans**

Bakalářská diplomová práce

2008

**Autor práce:** Magda Čechová

**Vedoucí práce:** MUDr. Ivan Vonke, MBA

Čechová M., 2008: Získané hyperkoagulační stavy se zaměřením na lupus antikoagulans. [Acquired hypercoagulable states focus on lupus anticoagulans. Bc. Thesis, in Czech] – 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Hypercoagulable states (thrombophilia) can be defined as a group of inherited or acquired conditions that are associated with predisposition to venous thrombosis, arterial thrombosis or both. Inherited, but also some acquired conditions can be demonstrated by virtue of special laboratory methods. One of those methods is investigation of lupus anticoagulans, which is antibody against phospholipids. These antibodies can cause enhanced blood coagulation, which could later lead to the thrombosis. An appropriate procedure how to investigate lupus anticoagulans was defined.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne .....

.....

Magda Čechová

Děkuji vedoucímu bakalářské práce MUDr. Ivanu Vonkemu, MBA, za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, za jejich pochopení a podporu při tvorbě práce.

## **1. Obsah**

<b>1. Obsah</b> .....	4
<b>2. Úvod a cíl práce</b> .....	6
<b>3. Hyperkoagulační stavy</b> .....	7
<b>3.1. Trombofilie při zvýšené koncentraci koagulačních faktorů</b> .....	8
3.1.1. Zvýšení hladiny protrombinu .....	8
3.1.2. Zvýšení hladiny faktoru VIII .....	9
3.1.3. Hyperfibrinogemie (zvýšení hladiny fibrinogenu) .....	9
3.1.4. Zvýšení hladiny ostatních faktorů .....	9
<b>3.2. Trombofilie při porušené regulaci hemokoagulace</b> .....	9
3.2.1. Deficit antitrombinu.....	10
3.2.2. Deficit proteinu C.....	10
3.2.3. Deficit proteinu S.....	11
<b>3.3. Trombofilie při dysfunkci nebo nedostatku některých koagulačních faktorů</b> .....	11
3.3.1. Dysfibrinogémie.....	11
<b>3.4. Trombofilie při metabolických poruchách</b> .....	12
3.4.1. Hyperhomocysteinemie.....	12
3.4.2. Zvýšení koncentrace lipoproteinu (a).....	13
3.4.3. Hyperlipidémie.....	13
3.4.4. Diabetes mellitus.....	14
3.4.5. Nefrotický syndrom.....	14
<b>4. Získané hyperkoagulační stavy</b> .....	15
<b>4.1. Fyziologické stavy a komplikace léčby</b> .....	16
4.1.1. Věk.....	16
4.1.2. Těhotenství a období po porodu.....	16
4.1.3. Podávání ženských hormonů včetně perorální antikoncepce.....	16
4.1.4. Obezita.....	17
4.1.5. Celková imobilizace a pooperační stavy.....	17
4.1.6. Další fyziologické stavy.....	18
<b>4.2. Patologické stavy</b> .....	18
4.2.1. Trombotická trombocytopenická purpura.....	18
4.2.2. Hyperviskózní syndromy.....	18

4.2.3. Nádorové onemocnění a myeloproliferativní syndromy.....	18
4.2.4. Srdeční selhání.....	19
4.2.5. Paroxysmální noční hemoglobinurie.....	19
4.2.6. Další patologické stavy.....	19
<b>5. Antifosfolipidový syndrom.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Materiál a použité metody.....</b>	<b>21</b>
<b>6.1. Výběr pacientů.....</b>	<b>21</b>
<b>6.2. Odběr a uchování vzorku krve.....</b>	<b>21</b>
<b>6.3. Laboratorní diagnostika APS.....</b>	<b>22</b>
6.3.1. Identifikace LA.....	22
<b>6.4. Některé koagulační testy jako dodatek vyšetření k LA.....</b>	<b>23</b>
6.4.1. Vyšetření funkční hladiny proteinu C.....	23
6.4.2. Vyšetření funkční hladiny proteinu S.....	23
6.4.3. Vyšetření rezistence aktivovaného proteinu C (APC rezistence).....	23
<b>7. Výsledky.....</b>	<b>25</b>
<b>7.1. Vyšetření na lupus antikoagulans.....</b>	<b>25</b>
7.1.1. Příprava plazmy na vyšetření a její uchování .....	25
7.1.2. Vlastní vyšetření LA.....	27
<b>7.2. Zjištěné defekty u vyšetřených pacientů mimo LA.....</b>	<b>33</b>
<b>7.3. Množství defektů v souvislosti s trombózou u vyšetřených pacientů.....</b>	<b>35</b>
<b>8. Diskuze.....</b>	<b>36</b>
<b>9. Závěr .....</b>	<b>39</b>
<b>10. Citovaná literatura.....</b>	<b>40</b>

## **2. Úvod a cíl práce**

Hemokoagulace je složitý komplexní proces zahrnující aktivační i inhibiční procesy, které jsou vzájemně v rovnováze. Porucha této rovnováhy vede k hyperkoagulaci (zvýšený srážlivý stav krve) nebo k hemoragii (krvácivý stav). Hyperkoagulační stavy, neboli trombofilie, jejichž příčinou je posunutí přirozené rovnováhy směrem k prokoagulačním procesům, jsou spojeny s vyšším rizikem žilní trombózy (Urbánková et al. 2001). Trombofilie je tedy stav, kdy je v cévním systému zvýšena tvorba trombů. Trombofilie předchází vlastnímu procesu trombotizace (Kvasnička 2003a).

Pojem trombofilie je často chápán pouze jako sklon k žilní trombóze. Rizikové faktory pro žilní trombózu se zčásti liší od rizik pro trombózy tepen. Podstatou žilní trombózy je vytvoření krevní sraženiny (= trombu), která zcela nebo částečně vyplňuje vnitřek žíly. Akutní nebezpečí představuje uvolnění trombu a jeho doputování až do plicní tepny (= embolie plicní tepny) – někdy až se smrtelným koncem. V dlouhodobějším výhledu může žilní trombóza poškodit tzv. žilní chlopně a přivodit trvalé potíže, např. otoky, bérčové vředy (Chochola et al. 2000). Vznik trombózy může ovlivnit řada faktorů jako je např. poškození žilní stěny, zpomalení proudu žilní krve, zvýšení krevní srážlivosti atd.

Ke klinické manifestaci trombózy je nezbytná přítomnost těchto a dalších rizikových faktorů současně (Rosendaal 1999, Penka et al. 2001). Velmi často nalézáme v rodinách s vysokým výskytem tromboembolické nemoci kombinace jak vrozených (jsou popsány četné rodiny se současným výskytem defektu AT III, PC či PS a FV Leiden), tak získaných faktorů (Penka et al. 2001). Vrozené, ale i některé získané faktory trombózy lze prokázat pomocí speciálních laboratorních vyšetření. Jedním z těchto způsobů je vyšetření na lupus antikoagulans, což jsou protilátky proti fosfolipidům, které způsobují zvětšenou srážlivost krve vedoucí později k trombózám.

Z výše uvedených důvodů bylo hlavním cílem této bakalářské práce provést vyšetření na lupus antikoagulans s podezřením na hyperkoagulační stav a optimalizovat toto vyšetření. Dalším cílem bylo zmapovat získané hyperkoagulační stavy v populaci a popsat jejich význam ve vztahu k trombóze.

### **3. Hyperkoagulační (trombofilní) stavy**

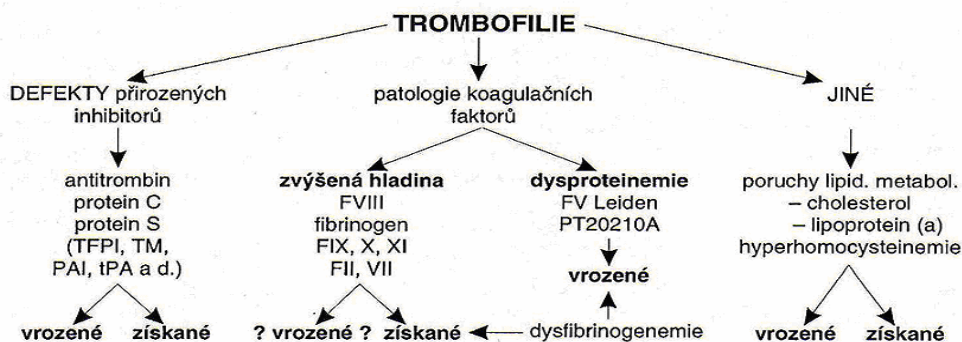
Hyperkoagulační stavy, také nazývané trombofilie anebo protrombotické onemocnění, jsou onemocnění, která zvyšují nebezpečí venózního a arteriálního tromboembolismu (Mant et al. 2006).

Název trombus (thrombos) jako označení pro nitrocévní krevní sraženinu používali již staří Řekové a jeho autorství se připisuje Galénovi (130-200). Ucelená koncepce vzniku cévní trombózy byla popsána až v roce 1856 německým patologem profesorem Rudolfem Virchowem a v zásadě platí dodnes (Kvasnička 2003a). Hlavní příčiny vedoucí k trombóze vystihuje tzv. Virchowova triáda: 1. stáza krve - zpomalení oběhu krve, které způsobuje zvýšení viskozity krve a zakoncentrování koagulačních faktorů v daném místě, 2. poranění cévní stěny – narušení výstelky cévy aktivuje systémy hemostázy a 3. hyperkoagulační stav – defekty systémů hemostázy (Stehlík 2001).

Podle místa vzniku rozdělujeme trombózy na arteriální (tepenné) a venózní (žilní) (Stehlík 2001). Při žilní trombóze dominuje především zástava proudění krve a hyperkoagulace, ke které dochází při aktivaci plazmatických koagulačních faktorů a selhání funkce jejich přirozených inhibitorů v krevní plazmě a cévní stěně. Při vzniku arteriální trombózy se opět v jejím počátku díky prudce proudící krvi uplatňuje aktivace a agregace krevních destiček a dysfunkce endotelu, která je ve většině případů vyvolána aterosklerotickým procesem při zánětu cévní stěny (Kvasnička 2003b, Yee et al. 2001, Ross 1993).

Hyperkoagulační stavy můžeme rozdělit na primární (vrozené) a sekundární (získané). Mezi sekundární hyperkoagulační stavy řadíme těhotenství, nepohyblivost, trauma, pooperační stavy, užívání hormonální antikoncepce, antifosfolipidový syndrom, hyperhomocysteinémie a jiné chorobné stavy. K primárním hyperkoagulačním stavům můžeme přiřadit deficit antitrombinu III, deficit proteinu C a S, faktor V Leiden, mutaci protrombinu, hyperhomocysteinémii, dysfibrinogémii, zvýšenou hladinu faktoru VIII, deficit faktoru XII a poruchy vzniku plasminu (Barger a Hurley 2000).

Hyperkoagulační stavy rozdělujeme ale také z hlediska patofyziologie žilní trombózy. (Obr.1) (Kvasnička 2003a):



**Obr. 1: Rozdělení trombofilie (převzato z Penka et al. 2001)**

TFPI – inhibitor zevní cesty tkáňového faktoru, TM – trombomodulin, PAI – inhibitor aktivátoru plazminogenu, tPA – tkáňový aktivátor plazminogenu, PT – protrombin

### **3.1. Trombofilie při zvýšené koncentraci koagulačních faktorů**

Zvýšená produkce koagulačních faktorů a inhibitorů fibrinolýzy je u některých jedinců podmíněna geneticky (Kvasnička 2003a). Předpokládá se, že mutace příslušného genu vede k poruše translace na úrovni mRNA. Ta pak způsobí nekontrolovatelný přepis mRNA a nadbytečnou tvorbu příslušného proteinu (Cazzola a Skoda 2000).

#### **3.1.1. Zvýšení hladiny protrombinu**

Protrombin je krevní protein, který je za potřebí při hemokoagulaci. Nazývá se také faktor II. (Varga a Moll 2004). Protrombin je prekurzor trombinu v koagulační kaskádě. Trombin je zapotřebí při přeměně fibrinogenu na fibrin, který je primárním cílem koagulační kaskády (Obr. 2). Molekulární hmotnost protrombinu je 72 kDa (Henriksen et al. 1998). Mutace v genu pro protrombin (FII 20210A mutace) byla popsána v roce 1996 jako dědičné onemocnění (Poort et al. 1996). Je to autozomální dominantní mutace (Varga a Moll 2004). Mutace FII 20210A je lokalizována v genu pro faktor II. Gen pro faktor II se nachází na chromozomu 11p11 - q12, má 14 exonů a celkovou délku 21 kb (Poort et al. 1996). Tato mutace je způsobena záměnou nukleotidu G za A v kodonu 20210 (Pollak et al. 2002, Zivelin et al. 2006). Nachází se ve 3' netranslatované oblasti genu (Zivelin et al. 2006, Gehring et al. 2001) a patří mezi mutace zisku funkce (gain-of-function mutace) zvyšující efektivitu štěpení pre-mRNA. Následně dochází k akumulaci mRNA a její translaci do podoby koagulačního faktoru (Gehring et al. 2001). Mutace u postižených jedinců je spojena se zvýšenou produkcí protrombinu a zvýšeným rizikem trombózy (Urbánková et al. 2002).



### **3.1.2. Zvýšení hladiny faktoru VIII**

Faktor VIII je součástí vnitřního koagulačního systému. Spolu s F IXa, fosfolipidy a vápenatými ionty aktivuje FXa. Je to glykoprotein tvořený v játrech, slezině, RES a ledvinách. V plazmě je vázán na von Willebrandův faktor, z vazby se uvolňuje kontaktem s fosfolipidy nebo trombinem (Lenting et al. 1998). Gen pro faktor VIII je umístěn na dlouhém raménku X chromozomu a jeho velikost je 180 Kb (Gitschier et al. 1984). Gen pro faktor VIII se skládá z 26 exonů, které kódují polypeptidický řetězec o 2351 aminokyselinách (Vehar et al. 1984). Snížení hladiny faktoru vede k hemofilii a zvýšení vede naopak k zvýšenému riziku trombózy. Faktor VIII je proteinem akutní fáze hemostázy.

### **3.1.3. Hyperfibrinogemie (zvýšení hladiny fibrinogenu)**

Fibrinogen, koagulační faktor I, je 340 kD velký rozpustný glykoprotein, který se běžně vyskytuje v krevní plazmě a je přítomen v granulích krevních destiček. Patří mezi klíčové proteiny hemokoagulace, účastní se agregace destiček, ovlivňuje viskozitu plazmy a patří mezi proteiny akutní fáze. Je jako většina koagulačních faktorů syntetizovaný v játrech (Richterová a Gumulec 2007). Molekulu fibrinogenu tvoří dimer, který se skládá ze tří rozdílných párů polypeptidických řetězců  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Řetězce jsou vzájemně vázané disulfidickými vazbami v blízkosti konců aminořetězců (Gorkun et al. 1997, Siebenlist et al. 2005). Jednotlivé řetězce fibrinogenu jsou kodovány třemi různými geny na čtvrtém chromosomu v oblasti q28. Důležitou roli v udržení struktury fibrinogenu hrají  $\text{Ca}^{2+}$  ionty (Richterová a Gumulec 2007, Siebenlist et al. 2005). Hyperfibrinogemie (zvýšení fibrinogenu) je rizikovým faktorem pro žilní i arteriální trombózu, může být však spjata i s vyšším věkem anebo zánětem (Kvasnička 2003a).

### **3.1.4. Zvýšení hladiny ostatních faktorů**

Taktéž ostatní faktory mohou být příčinou trombofilie. Jejich zvýšená hladina není tak významná jako u faktorů již zmíněných, proto zde nebudou jednotlivě uvedeny.

## **3.2. Trombofilie při porušené regulaci hemokoagulace**

Další příčinou trombofilie je nedostatek některého z přirozených inhibitorů koagulace anebo porucha jeho funkce. Jedná se zejména o deficity inhibitorů koagulace, např. deficit antitrombinu, deficit proteinu C, deficit proteinu S atd. (Kvasnička 2003a).

### 3.2.1. Deficit antitrombinu

Antitrombin III (AT III) je jedním z nejdůležitějších přirozených inhibitorů koagulace. Je to jednořetězcový glykoprotein ze skupiny alfa<sub>2</sub>-globulinů. Tvoří se v játrech a v menším množství i v ledvinách a plicích, částečně i v endoteliálních buňkách (Kacerovský et al. 2004). Skládá se ze 432 aminokyselin a jeho molekulární hmotnost je 58-65 kDa. Je to nejdůležitější fyziologický inhibitor serinových proteáz a má hlavní úlohu při regulaci hemostatické rovnováhy. AT III inhibuje koagulační proces tím, že vyvazuje trombin a jiné plazmatické proteázy, jako jsou aktivované faktory IXa, Xa, XIa, XIIa, za vzniku ireverzibilního komplexu (Devraj-Kizuk et al. 1988). Na aktivní místo AT III se naváže heparin a urychlí vznik těchto komplexů. Bez přítomnosti heparinu vznikají tyto komplexy pomalu. Heparin katalyzuje reakci antitrombin - proteáza, aniž by sám byl spotřebován. Jakmile se vytvoří komplex antitrombin - proteáza, heparin se uvolňuje a váže se s dalším antitrombinem (Hořejš et al. 2003).

Gen pro antitrombin je lokalizován na prvním chromozomu (q23 - 25), má sedm exonů a šest intronů. V oblasti čtvrtého intronu byly nalezeny dva polymorfizmy. U deficitu antitrombinu typu I bylo zjištěno 92 různých mutací (ve 12 % se jedná o delece v oblasti 5' konce) (Beauchamp et al. 2000).

Deficit antitrombinu byl poprvé popsán v roce 1965 Egebergem (1965). Vrozený deficit antitrombinu je predispozicí pro venózní tromboembolismus (Bayston et al. 1999), vyskytuje se v poměru asi 1:5 000 osob. Obě pohlaví jsou přibližně stejně zastoupena. Dědí se autozomálně dominantně (Kacerovský et al. 2004).

### 3.2.2. Deficit proteinu C

Protein C je vitamín K-dependentní glykoprotein o molekulární hmotnosti 62 kDa, který cirkuluje v plazmě jako inaktivní zymogen (proenzym, neaktivní prekurzor enzymu) v koncentraci 4 µl/ml (Bauer et al. 1988). Neaktivovaná forma proteinu je tvořena dvěma polypeptidovými řetězci (lehký a těžký), propojenými disulfidickými můstky (Katsumi et al. 1996). Aktivace proteinu probíhá na povrchu endoteliálních buněk navázaným k trombomodulinu. Aktivace probíhá štěpením, které odhalí aktivní efektorové domény pro kofaktory V a VIII. Vzniká tzv. aktivovaný protein C (APC). APC proteolyticky štěpí a tím inaktivuje na membráně navázané plazmatické faktory neenzymového původu (faktor Va a VIIa), což vede k značnému zpomalení aktivovaného koagulačního procesu. Účinnost štěpení výrazně zvyšuje spoluúčast proteinu S, který lokalizuje protein C na fosfolipidové povrchy (Bauer et al. 1988, Katsumi et al. 1996, Sun et al. 2003).

Deficit proteinu C je spojován se žilní trombózou (Bauer et al. 1988, Koeleman et al. 1994) a poprvé byl popsán v roce 1981 Griffinem (1981). Deficit či dysfunkce proteinu C jsou způsobeny mutacemi v genu pro protein C. Těchto mutací bylo popsáno asi 160 (Kvasnička 2003a). Protein C je kódován genem umístěným na druhém chromozomu v pozici 2q13-q21. Jeho velikost je 11,6 kb a zahrnuje 9 exonů, z nichž první není translatován (Gandrille et al. 1995). Protein C se dědí autosomálně dominantně (Koeleman et al. 1994, Gandrille et al. 1995).

### **3.2.3. Deficit proteinu S**

Protein S je vitamin K-dependentní plasmatický glykoprotein (Dahlbäck 1995, Heeb et al. 1989) o molekulární hmotnosti 70 kDa (Rezende et al. 2004). Syntéza proteinu S probíhá hlavně v hepatocytech, dále pak v megakaryocytech, endoteliálních buňkách, osteoblastech atd. (Dahlbäck 1991). Protein S je důležitý kofaktor proteinu C při jeho aktivaci na aktivovaný protein C (APC) a napomáhá inaktivaci faktorů Va a VIII (Simmonds et al. 1998). V krvi koluje ve dvou formách a to jako volný protein S nebo v komplexu s C4b-vázajícím (C4b-binding) proteinem (Zöller et al. 1995).

Deficit proteinu S je spojován se žilním tromboembolismem (Koster et al. 1995, Kvasnička 2003a, Zöller et al. 1995) a poprvé byl popsán v roce 1984 Schwarzem et al. (1984).

Protein S se dědí autozomálně dominantně. Geny pro protein S můžeme rozdělit na dvě skupiny – aktivní gen a pseudogen (Rezende et al. 2002, Simmonds et al. 1996). Aktivní gen (PROS1) je umístěný poblíž centromery třetího chromozomu v oblasti 3q11 (Schmidel et al. 1990). Tento gen obsahuje 15 exonů. Pseudogen (PROS2 nebo PROSP) se nachází na třetím chromozomu v oblasti 3p21. Kódující oblasti těchto 2 genů jsou z 97 % podobné. (Rezende et al. 2002, Simmonds et al. 1996).

## **3.3. Trombofilie při dysfunkci nebo nedostatku některých koagulačních faktorů**

### **3.3.1. Dysfibrinogémie**

Poruchy fibrinogenu jsou obvykle způsobeny genetickými mutacemi, které mají za následek nízkou hladinu proteinu (hypofibrinogémie) nebo abnormální molekulu (dysfibrinogémie) (Dear et al. 2007). Dysfibrinogémie může být vyvolána mutacemi ve třech genech řetězců A $\alpha$ , B $\beta$ ,  $\gamma$ , které dohromady tvoří molekulu fibrinogenu. Zatím bylo nalezeno 260 různých druhů kongenitální dysfibrinogémie a u 100 z nich byla zjištěna mutace DNA, přepisu mRNA nebo syntézy proteinu.

U dysfibrinogemií spojených s trombofilií je nalézána změna molekuly fibrinogenu v oblasti C-terminálních částí A $\alpha$  a  $\gamma$  řetězců nebo v oblasti N-terminální části řetězce B $\beta$ . Výskyt dysfibrinogemií v populaci je velice nízký, většinou je omezen na členy rodiny probanda (Kvasnička 2003a).

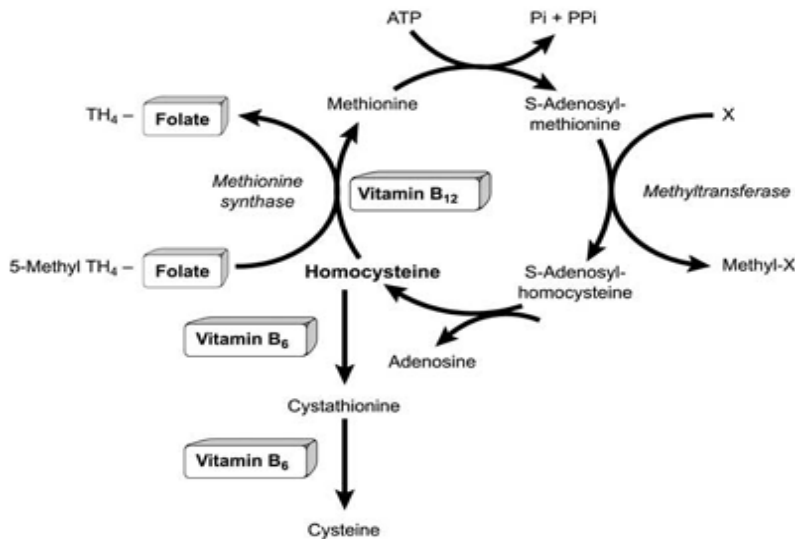
### **3.4. Trombofilie při metabolických poruchách**

#### **3.4.1. Hyperhomocysteinemie**

Homocystein (Hcy) je neesenciální sirná aminokyselina, která je meziproduktem metabolické přeměny methioninu (Met) na cystein (Cys). V biologických tekutinách je přítomen volný nebo vázaný na krevní bílkoviny (Přistoupilová a Přistoupil 2002).

Hyperhomocysteinemie je multifaktoriální metabolické onemocnění (Vlachová 2004, Lijfering et al. 2007, Kluijtmans et al. 2003) podmíněné genetickými a exogenními vlivy a vlivy provázející řadu chorobných stavů (Vlachová 2004, Kluijtmans et al. 2003). Vysoká hladina Hcy je rizikovým faktorem trombózy (Martinelli et al. 2003), kardiovaskulárních onemocnění, komplikací v těhotenství atd. (Dayal et al. 2006, Fokkema et al. 2003).

Metabolismus Hcy je závislý na folátech a vitamin B-dependentních enzymech včetně cystation- $\beta$  syntázy (CBS) (Dayal et al. 2006). Metabolismus Hcy probíhá dvěma metabolickými drahami – remetylační dráha a transsulfurační dráha (Obr. 3). V remetylační dráze je Hcy přeměněn na methionin. Tato reakce vyžaduje kyselinu listovou (folát) a vitamin B12. Metylová skupina se přenesne na Hcy z metylentetrahydrofolátu účinkem methion syntézy, kterou má kobalamin jako prostetickou skupinu. K této reakci dochází především v játrech, ledvinách a mozku. Zbytek homocysteinu, který není remetylován se transsulfuruje. Transsulfurační dráha je závislá na přítomnosti aktivní formy vitaminu B6. V této reakci kondenzuje Hcy se serinem na cystationin. Reakce je katalyzována cystation- $\beta$  syntázou (CBS), jejíž aktivita je závislá na aktivní formě vitaminu B6 jako kofaktoru. Transsulfurační dráha je ireverzibilní (Vlachová 2004, Refsum et al. 2004).



Obr. 3 Metabolismus homocysteinu (převzato z Troyer a Thornton 2007)

### 3.4.2. Zvýšení koncentrace lipoproteinů (a)

Lipoprotein (a) [Lp(a)] je plazmatický lipoprotein. Základem jeho struktury je micela lipoproteinů nízké hustoty (LDL), která je disulfidickou kovalentní vazbou spojena s glykoproteinem apolipoprotein (a) (Šorba a Češka 1999).

Zvýšení Lp(a) je spojeno s protifibrinolytickým a proaterogenním vlivem (Kvasnička 2003a). Lp(a) svou molekulovou strukturou v podstatě odpovídá LDL apolipoprotein, ale liší se postranními řetězci, které jsou do velké míry homologní s plazminogenem. Obsazením endotelových receptorů pro plazminogen je pak vyvoláván protrombotický stav (Vogel et al. 1999). Lp(a) inhibuje přeměnu plazminogenu na plazmin (Šorba a Češka 1999).

### 3.4.3. Hyperlipidémie

Predominantní účinek hyperlipidémie je zvýšení trombotického potenciálu plazmy, který dává vznik zvyšujícímu se nebezpečí ischemické srdeční choroby. Triglyceridy přítomné v plazmě jsou hydrolyzovány lipázou a volné mastné kyseliny jsou pak transportovány skrz endotel. Karboxylová skupina mastných kyselin dodává negativní náboj lipidovým částicím. Povrch těchto negativně nabitých částic se stává dobrým místem pro aktivaci faktoru XII a proteinů kontaktní fáze. V normálním případě je tento účinek minimalizován neutralizací negativně nabitých částic pozitivně nabitými lipidy vázajícími proteiny jako  $\beta$ 2-glykoprotein I a anexin V. Fibrinolytická cesta je tedy stimulována touto aktivací kontaktní fáze (Seghatchian et al 1996).

Podobně, jako již zmíněný F XII, funguje i F VII. Koagulační aktivita F VII je příbuzná triglyceridům VLDL (lipoproteiny o velmi nízké hustotě) částic plazmatických

lipoproteinů (Mitropoulos et al. 1989). Zvýšená hladina těchto faktorů, jak již víme, může vést k trombózám.

#### **3.4.4. Diabetes mellitus (DM)**

Diabetes mellitus (lidově cukrovka) je chronické onemocnění metabolismu glukosy způsobené poruchou tvorby inzulínu ve slinivce břišní. Projevuje se zvýšenou hladinou glukosy v krvi. Zároveň však postihuje i hospodaření s ostatními živinami a ovlivňuje tak celkově přeměnu látek v organismu.

Diabetes mellitus podporuje vychýlení hemostázy ve prospěch prokoagulačního systému. Poškození endotelu cévní stěny vede k endoteliální dysfunkci. Změny bazální membrány, její obnažení při deskvamaci endotelu a glykace krevních proteinů vede k uvolňování prokoagulačních faktorů a zvyšuje koagulační pohotovost. U diabetiků se zvyšuje hladina fibrinogenu a faktorů VII a VIII a vzrůstá viskozita krve. Zvýšená hladina koagulačních faktorů zvyšuje agregabilitu erytrocytů (Berková a Berka 2003). Riziko trombózy je tedy u diabetiků zvýšené a zahrnuje velké i malé arterie (Seghatchian et al. 1996). U prokoagulační stavů u diabetiků nalézáme jak změny adhezivní tak i agregace krevních destiček např. tromby koronárních artérií jsou bohaté na destičky, na rozdíl od trombů venózních (Janíčková-Žďárská 2005).

#### **3.4.5. Nefrotický syndrom**

Nefrotický syndrom je souborem klinických a laboratorních příznaků vznikajících v důsledku výraznějších ztrát bílkovin močí při primárních a sekundárních onemocnění glomerulů (Monhart 2001). Nefrotický syndrom je charakterizován velkou (nefrotickou) proteinurií (u dospělých  $> 3,5$  g/24 hodin, u dětí  $> 40$  mg/m<sup>2</sup>), hypoproteinémií, hypalbuminémií, hyperlipidémií a periferními otoky (Ryšavá et al. 2005, Tesař 2002).

Příčinou nefrotického syndromu je zvýšená permeabilita glomerulární kapilární stěny pro makromolekuly, způsobená změnami struktury glomerulární bazální membrány nebo podocytů a membrány mezi pedicelami podocytů (Ryšavá et al. 2005).

Nefrotický syndrom ohrožuje nemocné zejména svými komplikacemi, tj. trombotickou diatézou (žilními a méně často i arteriálními trombózami, s rizikem plicní embolie), infekčními komplikacemi a akcelerovanou aterosklerózou. Zatímco trombotické a infekční komplikace se mohou vyvinout i u velmi krátce trvajících nefrotického syndromu, akcelerovaná ateroskleróza je pouze důsledkem léta trvajících nefrotického syndromu, který není možné dostatečně terapeuticky ovlivnit (Tesař 2002).

#### **4. Získané hyperkoagulační stavy**

Získané poruchy srážení krve se objevují v souvislosti s jiným onemocněním (především s jaterními poruchami, nádorovým onemocněním apod.) (Matýšková et al. 1999). U získaných poruch krevního srážení vznikají mnohočetné odchylky (na rozdíl od vrozených krvácivých nebo trombotických stavů), postihující obvykle více systémů hemostázy – tedy pro- i antikoagulační faktory, systém primární hemostázy či fibrinolýzy. Klinická manifestace pak vzniká dalším vychýlením nově nastolené „rovnováhy“ novým podnětem (např. operačním výkonem, virózou apod.), přičemž mohou být současně přítomny jak trombotické, tak i krvácivé komplikace, nebo naopak převáží buď krvácení či trombózy (Penka et al. 2001, Matýšková et al. 1999).

Získané nedostatky přirozených inhibitorů nebývají většinou izolované, jsou často doprovázeny poruchou koagulačních faktorů. V klinickém stavu potom záleží na tom, která porucha převládne. Obecně mohou být získané defekty z důvodu (Penka et al. 2001):

- a) snížené syntézy – jaterní onemocnění, fyziologicky novorozenec
- b) zvýšené spotřeby – DIC, TEN, operace, velká poranění, septický šok
- c) zvýšené ztráty – nefrotický syndrom, ascites
- d) z jiné příčiny – těhotenství, orální kontraceptiva

Mezi získané stavy, které zvyšují riziko trombů, patří především poškození endotelové výstelky cévně-srdečního systému. Dochází k němu nejčastěji aterosklerotickými změnami, poraněním a zánětem (endokarditis, phlebitis). Dalším získaným faktorem, který zvyšuje riziko vzniku trombů, je zpomalení průtoku krve při srdečním selhání, hyperviskózním syndromu, imobilizaci, místních překážkách odtoku krve z tkáně či vzniku turbulentního proudění, kdy část krve déle setrvává na určitém místě (aktivované koagulační faktory jsou z oběhu odstraňovány především při průchodu krve játry). Jiným získaným faktorem je trombocytóza (esenciální trombocytémie nebo stavy po splenektomii) a patologická přítomnost tkáňového faktoru v cirkulaci (nádorová onemocnění, endotoxémie, sepe, poranění, porod, velké operace). Poškození jaterní činnosti způsobuje nejen nedostatek prokoagulačních faktorů, ale i nedostatek antikoagulačních faktorů a snížené odstraňování aktivovaných prokoagulačních faktorů. (Nečas et al. 2003).

## **4.1. Fyziologické stavy a komplikace léčby**

### **4.1.1. Věk**

Riziko trombózy významně stoupá s věkem. U osob do 40 let se předpokládá incidence žilní tromboembolie 1:10 000, u lidí nad 75 let se vyskytuje s četností 1:100 osob (Malý et al. 2006).

Není zcela jasné, co nejvíce způsobuje závislost žilní trombózy na věku. Nejpravděpodobněji jde o kombinaci snížení mobility, poklesu svalového napětí, zvýšení morbidity a změn stěny cévní. K žilním tromboemboliím závislým na věku můžeme počítat i ty, které vznikly při hormonální terapii u postmenopauzálních žen. S věkem také stoupá koncentrace koagulačních faktorů, především faktoru VIII, II a IX (Malý et al. 2006).

### **4.1.2. Těhotenství a období po porodu**

Těhotenství a šestinedělí jsou obdobím s vyšším rizikem tromboembolické nemoci (TEN), která je ve vyspělých zemích jednou z hlavních příčin mateřské morbidity a mortality (Skalická et al. 2002, Procházka et al. 1999). Těhotenství představuje 5x větší riziko vzniku TEN ve srovnání se stejnou věkovou skupinou žen netěhotných.(Pabinger et al. 2005, Skalická et al. 2002). Nejrizikovější období pro vznik trombózy představuje poslední trimestr, porod a časně poporodní období.

V těhotenství se TEN manifestuje nejen klasickým způsobem, ale i komplikacemi těhotenství jako je samovolný potrat, porod mrtvého plodu, retardace intrauterinního růstu, předčasná abrupce placenty a preeklampsie (Poul 2006).

Nejvýraznější rizikový faktor v graviditě představuje zpomalení krevního toku v důsledku fyziologických změn v těhotenství. Ty zahrnují mimo jiné vazodilataci a zvýšení cévní kapacity. Nermalou měrou ke zvýšenému výskytu žilní trombózy u těhotných přispívá tlak zvětšující se dělohy a porodnické faktory zahrnující dlouho trvající klid na lůžku v průběhu těhotenství a šestinedělí, operační porody, těžké krvácení, sepse, multiparita a pokročilý věk matky. Těhotenství je rovněž spojeno s výraznými změnami hladin koagulačních faktorů a aktivity fibrinolytického systému (Procházka et al. 1999).

### **4.1.3. Podávání estrogenů včetně perorální antikoncepce**

Pohlavní ženské hormony, estrogeny, patří chemicky ke steroidním hormonům, které snadno procházejí buněčnou membránou a působí přímo na genovou expresi v buněčném jádře. Jejich účinky jsou mnohostranné (Rokyta 2000).



Estrogeny jsou dnes převážně užívány v substituční léčbě a hormonální antikoncepci. Hormonální antikoncepce (HA) je nedílnou součástí života moderní ženy (Šmírová et al. 2002) a je užívána více než sty milióny žen po celém světě (Dulíček et al. 2002). Má řadu pozitivních, ale i negativních účinků. Jedním ze závažných účinků HA je její protrombogenní vliv. Je zvýšeno relativní riziko tepenné i žilní trombózy. Hormonální kombinovaná antikoncepce ovlivňuje jak koagulační faktory (estrogeny stimulují proteosyntézu v hepatocytech, proto dochází ke zvýšení hladiny fibrinogenu a vitamin K dependentních faktorů koagulační kaskády tj. FII, FVII a FX), tak inhibitory koagulace i fibrinolytický systém. Relativní riziko tromboembolické nemoci je u žen užívající HA 4x vyšší než u žen, které ji neužívají. Bylo prokázáno, že na vznik trombózy nemá jen vliv estrogení složka HA, ale i typ gestagenu (Šmírová et al. 2002).

Hormonální substituční léčba (HRT) je ve světě užívána již více než 50 let. Je nejen velmi účinnou a rychlou terapií vegetativního klimakterického syndromu, ale současně představuje i výborný léčebný zásah proti postmenopauzální osteoporóze a zvýšenému riziku KVCH (kardiovaskulární choroby). Estrogení deficit je sanován podáním přirozeného estrogenu v různé dávce, v různé aplikační formě a v různém terapeutickém režimu (Burdová 2001). Jednou z kontraindikací HRT je tromboembolická nemoc. Riziko hluboké trombózy a plicní embolizace se u uživatelék HRT zvyšuje 2-4x. Nejvyšší je v prvních 5 letech léčby. Riziko TEN ještě při léčbě zvyšují operace (Jeníček 2001).

#### **4.1.4. Obezita**

Obezita a jí příbuzný noninsulin-dependentní diabetes mellitus (NIDDM) patří mezi velice běžná onemocnění vyspělých zemí. Velmi často jsou spojovány se zvyšujícím se rizikem trombózy a aterosklerózy. Při obezitě často dochází k poruše regulace v koagulačním a fibrinolytickém systému (Samad et al. 2001). Nejznámější je zvýšení tzv. plazminogen aktivátoru inhibitoru-1 (PAI-1). Výsledkem jeho zvýšení je porucha fibrinolýzy.

#### **4.1.5. Celková imobilizace a pooperační stavy**

Častou komplikací imobilizace je trombóza a to především hluboká žilní trombóza, která tvoří 1. fázi TEN. Pacient je tedy ohrožen plicní embolií. Nejčastěji se vyskytuje u nemocných vyššího věku, u nemocných s arteriosklerózou a žilními varixy. Může vznikat už od 2. dne imobilizace. Výrazně ke vzniku trombózy přispívá dehydratace. Můžeme konstatovat, že tuto komplikaci lze považovat za znak nedostatečné ošetrovatelské i lékařské péče.

TEN je významnou komplikací pooperačních stavů, zejména po operacích v dutině břišní, po operacích pro maligní nádory a především po velkých kostních operacích (Šimánek 2003). Proto, aby tyto pooperační komplikace (jako je např. TEN) nevznikaly, je důležitá hlavně péče o pacienta a i přístup pacienta k nemoci.

#### **4.1.6. Další fyziologické stavy**

Mezi další stavy můžeme zařadit například zlomeniny. Závažným aspektem zlomenin je zvýšené riziko vzniku TEN a to hlavně u starších osob (Kudrnová et al. 2007), pak dlouhé lety nad šest hodin, kouření, atd.

### **4.2. Patologické stavy**

#### **4.2.1. Trombotická trombocytopenická purpura**

Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) je onemocnění, které patří do skupiny mikroangiopatických hemolytických chorob. V cirkulaci pacienta při něm dochází k tvorbě mikrotrombů, které způsobují ischemii a selhávání různých orgánů (Carbolová et al 2006).

Jeden z nejvýznamnějších endoteliálních faktorů – von Willebrandův faktor (vWF) má u nemocných s TTP charakteristicky pozměněnou strukturu, která vykazuje zastoupení zvláště velkých multimerů, jež můžeme prokazovat v plazmě nemocných (Penka et al. 2001).

#### **4.2.2. Hyperviskózní syndrom**

Hyperviskózní syndrom je souhrn příznaků vznikajících v důsledku zvýšení viskozity krve, zejm. při zmnožení některých krevních bílkovin jako je např. paraprotein (krevní bílkovina charakteru imunoglobulinu či jeho částí, vznikající při myelomu a některých dalších krevních chorobách). Zvýšená viskozita zhoršuje průtok krve některými oblastmi, což je nejvíce patrné v nervovém systému, na sítnici oka atd. Proto kromě celkových příznaků bývají poruchy vidění, bolesti hlavy, závratě, přechodné obrny aj. Hyperviskózní syndrom zvyšuje riziko tromboembolické příhody (Vokurka et al. 2002).

#### **4.2.3. Nádorové onemocnění a myeloproliferativní syndromy**

U pacientů s nádorovým onemocněním je etiologie TEN poměrně komplikovaná. Nádorové buňky mohou přímo aktivovat systém krevního srážení, indukovat prokoagulační nebo tlumit antikoagulační schopnosti endotelu, destiček, monocytů a makrofágů řadou specifických či nespecifických působků (Gumulec et al. 2003). Patří sem na jedné straně nádorová prokoagulancia, jako tkáňový faktor (TF), který vede ke zvýšené produkci trombinu

(Nand et al. 1987, Korte 2000). FX může přímo aktivovat onkofetální protein produkovaný buňkami karcinomu ledvin, žaludku, atd. Druhá skupina ovlivňuje trombogenezi zvýšenou expresí urokinázového aktivátoru plazminogenu (Gumulec et al. 2003).

Kromě přímého zásahu do systému koagulace a primární hemostázy se na trombogenezi u nádorových onemocnění podílí narušení funkce nebo integrity endotelu nádorem, omezení průtoku cévou utlačovanou tlakem tumoru zvenčí s následnou kumulací koagulačních faktorů (I, II, VII, VIII, IX a X) a krevních destiček (Falanga a Rickles 1999). Dále vznik a růst trombů podporují některé komplikace nádorového onemocnění, terapeutické zásahy směřované proti nádoru, atd.

#### **4.2.4. Srdeční selhání**

Srdeční selhání je syndrom, který je způsoben systolickou či diastolickou poruchou srdeční funkce s následnou reakcí celého organismu, zprostředkovanou především neurohumorálními mechanismy. Stav se manifestuje symptomy, které jsou vyvolány městnáním s retencí tekutin a sníženým minutovým výdejem (Vítovec a Špinar 2005).

#### **4.2.5. Paroxysmální noční hemoglobinurie**

Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) je zvláštní druh hemolytické anémie s abnormální hematopoezou klonálního charakteru, s poruchou kmenové buňky a s následnou patologickou reakcí membrány erytrocytu s aktivovaným komplementem séra (Donner 1985). PNH je vzácné onemocnění s výrazným sklonem k trombóze. Prevalence v populaci je 1:500 000. Klinicky se PNH manifestuje chronickou hemolytickou anémií s častým (pravidelně se opakujícím) podrážděním.

Trombóza u pacientů s PNH může nastat na neobvyklých místech, jakými jsou např. portální a hepatické žíly, cerebrální žíly, hluboké žíly, kožní léze, atd. Pacientů s hepatickou venózní trombózou je kolem 15-20%. PNH ve spojení s trombózou vede často ke smrti (Seghatchian et al. 1996).

#### **4.2.6. Další patologické stavy**

Mezi další patologické stavy můžeme zařadit diseminovanou intravaskulární koagulaci (DIC). Je to získaná porucha krevního srážení a procesu zástavy krvácení, která vzniká v důsledku řady onemocnění většinou závažného charakteru. Vede k pestrému obrazu mnohoorgánového poškození, a to především v době prvotní fáze syndromu charakterizované nadměrným srážením krve (Penka et al. 2001).

## **5. Antifosfolipidový syndrom**

Antifosfolipidový syndrom (APS) je získané autoimunitní onemocnění definované klinicky a laboratorně (Hluší a Krčková 2003). Pro APS je charakteristická přítomnost antifosfolipidových protilátek (APA) a současně klinických projevů tj. venózní či arteriální trombózy, mikrotrombotizace v cirkulaci a reprodukční ztráty (viz. Tab. č. 1). Cílovými antigeny APA, které jsou spojovány s manifestací APS, jsou makromolekulární struktury vázané na negativně nabitě fosfolipidové povrchy (Bulíková a Penka 2005). APA můžeme dělit různým způsobem např. na auto- a alloprotilátky, primárně či sekundárně se vyskytující, atd. Nejúčelnější se zdá být dělení podle metody detekce – jako lupus antikoagulans nazýváme heterogenní skupinu protilátek, které ovlivňují fosfolipid-dependentní koagulační reakce in vivo. Jejich antigenním cílem je nejčastěji  $\beta_2$ -glykoprotein I nebo protrombin. Jinou možností detekce protilátek závislých na fosfolipidech je ELISA, podle použitého antigenu pak zjištěné protilátky nazýváme jako antikardiolipinové (v detekční soustavě je použit kardiolipin), antifosfolipidové (v detekční soustavě je použita směs fosfolipidů) nebo anti $\beta_2$ -glykoprotein I-ové (jako antigen použit  $\beta_2$ -glykoprotein I) atd. (Penka et al. 2001).

Protilátky označující se jako lupus antikoagulans (LA), jsou tvořeny buď imunoglobuliny třídy IgG nebo imunoglobuliny třídy M či jejich kombinací (IgG a IgM). Samotné imunoglobuliny typu IgM vedou ke vzniku trombózy vzácně, stává se však, že u trombózy způsobené imunoglobuliny typu IgG jsou IgM zvýšené. Imunoglobuliny třídy IgA jsou u LA vzácné (Kvasnička 2003a). LA reagují s fosfolipidy destiček a endotelu, jež aktivují. Reakcí s LA mohou být inaktivovány inhibitory krevního srážení jako jsou např. protein C, protein S, trombomodulin, AT III, atd. (Field et al. 1999).

Klinické projevy APS jsou pestré. Většina z nich je zapříčiněna trombotizací venózní nebo arteriální částí krevního řečiště nejrůznějších systémů od velkých cév po mikrocirkulaci. Na změnách se podílí trombotická mikroangiopatie, druhotná ischemie zapříčiněná poruchou přítoku na základě okluze arteriálního řečiště, periferní embolizace z venózních, arteriálních či intrakardiálních zdrojů (Bulíková a Penka 2005).

## **6. Materiál a použité metody**

### **6.1. Výběr pacientů**

Za období od ledna do prosince 2007 bylo na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a. s. provedeno 616 vyšetření na lupus antikoagulans. Pacienti byli na vyšetření posíláni na základě žádostí ošetřujících lékařů téměř z celého Jihočeského kraje a to pokud splňovali jednu z těchto podmínek: výskyt opakovaných trombóz, trombóza do 40. roku věku, výskyt trombóz v rodinné anamnéze a opakované spontánní potraty.

### **6.2. Odběr krve a její příprava na zpracování**

Odběry krve byly prováděny do vakuových zkumavek o objemu 3 nebo 4,5 ml. Ve zkumavkách byl obsažen citrát sodný jako antikoagulační činidlo. Úkolem antikoagulačního činidla je vázat vápenaté ionty, čímž se zabrání nechtěné koagulaci. Citrát ve zkumavce je zhruba 4,2%, po nabrání krve do zkumavky se citrát desetkrát zředí a výsledná koncentrace roztoku je přibližně 0,4%.

Do dvou hodin po odběru byla krev zcentrifugována. Centrifugace probíhala dvěma způsoby v závislosti na prováděném vyšetření. Krev na základní koagulační vyšetření (PT, aPTT), vyšetření funkční hladiny AT III a vyšetření na přítomnost antifosfolipidových protilátek (lupus antikoagulans) byla odstředována na chlazené centrifuze JOUAN a to 2 minuty při 2145g, poté byl supernatant odebrán do jiné zkumavky a použit k vyšetření nebo dalšímu zpracování. Pro vyšetření funkční hladiny proteinu C, proteinu S a APC rezistence byla krev centrifugována pomocí chlazené centrifugy JOUAN a to 2 minuty při 2145g, poté byla plazma odebrána do jiné zkumavky. Opět byla odstředěna a to tentokrát 10 minut při 2145g. Po odstředění byl supernatant odebrán a použit k okamžitému měření nebo k uskladnění.

Všechna odstředěná krev, ze které se ihned neprovede žádné vyšetření se uskladní zmrazením při -40 °C a vyšetření se provede během následujících 14 dnů. Všechna zmrazená plazma je označena jménem, příjmením, rodným číslem pacienta a zkratkou oddělení, které o vyšetření žádalo.

### **6.3. Laboratorní diagnostika APS**

Laboratorní diagnostika APS je založena na průkazu fosfolipidových protilátek. Testy musí být pozitivní nejméně dvakrát v odstupu šesti a více týdnů. Diagnostické testy lze

rozdělit podle způsobu detekce APA na koagulační testy (lupus antikoagulans) a stanovení antigenu ELISA metodou (ACLA).

Stanovení antifosfolipidových protilátek ELISA metodou (třídy IgG, IgM a někdy i IgA) je založeno na typu použitého antigenu v detekční soustavě. Podle typu antigenu pak rozeznáváme antikardiolipinové protilátky (ACLA), antifosfolipidové protilátky, anti  $\beta_2$ -glykoprotein I-ové, antiprotrombinové. Protilátky lze stanovit i proti jiným fosfolipidům, jako jsou např. fosfatidyletanolamin, fosfatidylcholin, fosfatidylserin atd. Metoda je poměrně jednoduchá a rychlá, avšak má i své nevýhody, jako je např. špatná standardizace vyšetření, nejasnosti určení „cut off“ rozhraní, atd. Tato metoda není předmětem bakalářské práce, a proto se jí nadále nebudeme zabývat.

Vyšetření koagulační – tedy lupus antikoagulans – je komplikované. Jako lupusové antikoagulans (LA) nazýváme skupinu heterogenních APA, které in vitro ovlivňují koagulační reakce. Antigenním cílem je v tomto případě nejčastěji  $\beta_2$ -glykoprotein I nebo protrombin. LA se vyšetřuje ve specializovaných laboratořích. Zpracování plazmy je pro tento test odlišné od běžných koagulačních vyšetření. Plazma se zpracovává na bezdestičkovou plazmu. Při špatně zpracovaných vzorcích je vysoké procento falešně pozitivních výsledků. LA se identifikuje pomocí několikasupňového vyšetření:

1. screeningové testy (aPTT, kaolinový test, ředěný test s jedem Russelovy zmiže (dRVVT) )
2. průkaz inhibitoru směsnými testy (vyloučení přítomnosti heparinu, deficitu faktoru)
3. konfirmační test (průkaz specifity inhibitoru)

### **6.3.1. Identifikace LA**

Metody, které se používají k průkazu LA na Oddělení klinické hematologie v Nemocnici České Budějovice, a. s., jsou převážně koagulační metody. Používá se nejprve screeningová metoda. Zde se využívá schopnosti LA prodlužovat in vitro základní koagulační testy, jako jsou PT (protrombinový čas, Quickův tromboplastinový čas – monitoruje zevní koagulační systém), aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas – monitoruje vnitřní koagulační systém), TT (trombinový čas – monitoruje štěpení fibrinogenu trombinem = třetí fáze koagulace), atd.

Pokud je screeningový test pozitivní, je dále proveden směsný test, kterým prokážeme přítomnost či nepřítomnost inhibitoru. Principem tohoto testu je sledování korekce prodloužení koagulačních časů (zde aPTT) po přidavku normální plazmy k vyšetřované plazmě pacienta.

Když u směsného testu nedojde ke korekci času, mělo by se přistoupit k tzv. konfirmačnímu testu, který určuje specifitu inhibitoru. Jelikož žádný dostupný konfirmační test doposud Oddělení klinické hematologie nevyhovoval, tak se specifita inhibitoru dourčuje imunologicky.

K identifikaci byla používána souprava aPTT-LA od firmy Diagnostika Stago. Vyšetření bylo prováděno na koagulometru Stago STA-R.

#### **6.4. Některé Koagulační testy jako dodatek vyšetření k LA**

Další laboratorní vyšetření poruch krevního srážení byla prováděna na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a. s. K vyšetření byl používán mechanický koagulometr Stago STA-R. Tento přístroj je plně automatizovaný.

##### **6.4.1 Vyšetření funkční hladiny proteinu C**

K vyšetření funkční hladiny proteinu C byla použita souprava Berichrom Protein C od firmy Dade Behring. Vyšetření je prováděno koagulační metodou. Protein C je přítomen v plazmě v aktivní i neaktivní formě. Neaktivní protein se musí pro toto funkční vyšetření aktivovat. Jako aktivátor proteinu C in vitro slouží jed hada *Agkistrodon contortrix contortrix*, který má podobnou aktivitu jako komplex trombin – trombomodulin, který zajišťuje aktivaci proteinu C in vivo. Stanovení probíhá fotometrickou metodou a je založeno na schopnosti aktivovaného proteinu C štěpit specifický chromogenní substrát. Výsledky aktivity proteinu C se vyjadřují v % a získají se odečtením z kalibrační křivky (závislost času absorbance na %).

##### **6.4.2 Vyšetření funkční hladiny proteinu S**

K vyšetření funkční hladiny proteinu S byla použita souprava STA-Staclot Protein S od firmy Diagnostika Stago. Vyšetření je prováděno koagulační metodou. Vyšetřovanou plazmu je potřeba inkubovat s protein S deficitní plazmou, která je zdrojem nadbytku všech koagulačních faktorů a pokryje jejich případné nedostatky. Poté je přidán aktivovaný protein C, čímž se aktivuje protein S, a vápenaté ionty ve formě  $\text{CaCl}_2$ , čímž se aktivuje koagulace. Měří se čas potřebný k vytvoření fibrinového vlákna, který je závislý na aktivitě proteinu S ve vzorku. Výsledky jsou vyjadřovány v procentech po odečtení z kalibrační křivky.

##### **6.4.3. Vyšetření rezistence aktivovaného proteinu C (APC rezistence)**

K vyšetření rezistence plazmy na aktivovaný protein C byla používána souprava STA – Staclot APC-R od firmy Diagnostika Stago. Vyšetřovaná plazma je inkubována

s plazmou deficientní na FV, která pokryje svými proteiny případné nedostatky ostatních koagulačních faktorů z testované plazmy. Koagulace je aktivována hadím jedem (z *Crotalus viridis helleri*), který aktivuje přímo FX a na něj navazující společnou cestu koagulace. Poté je přidán aktivovaný protein C a CaCl<sub>2</sub> a měří se čas, za který vzniknou vlákna fibrinu. Doporučená hraniční hodnota je 120 s. Pokud je čas roven této hodnotě nebo je menší, jedná se o hodnoty APCR pozitivní.

Tento prováděný test je modifikací testu od firmy Chromogenix, souprava Coatest APC<sup>TH</sup> Resistance-SC. Je to koagulační metoda, která je modifikací aPTT testu. Podstatou tohoto testu je vyšetření aPTT v přítomnosti a nepřítomnosti aktivovaného proteinu C (APC). Do plazmy se přidá aktivovaný protein C a vápenaté ionty ve formě CaCl<sub>2</sub> a měří se čas, za který vzniknou vlákna fibrinu. Pokud je v plazmě přítomen normální faktor V, mělo by dojít k prodloužení aPTT. Výsledkem je poměr časů s přidáním aktivovaným proteinem C a bez něj (Fišerová 2005):

**APC poměr = aPTT v přítomnosti APC / aPTT bez APC**

Plazma je APC rezistentní, pokud je APC poměr  $\leq 2,2$ .



## **7. Výsledky vlastní práce**

V období od ledna 2007 do prosince 2007 bylo na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a. s. vyšetřeno 616 pacientů na lupus antikoagulans (antifosfolipidové protilátky) a s tím související další vyšetření. Vyšetřovaní pacienti tvořili definovanou skupinu, kdy indikací pro vyšetření byly opakované spontánní potraty, výskyt opakovaných trombóz, trombóza do 40. roku věku a výskyt trombóz v rodinné anamnéze.

Tato práce je především zaměřena na vyšetření lupus antikoagulans (LA). Snahou je dojít k optimalizaci tohoto vyšetření. Práce se dále zabývá mapováním rizik trombózy v populaci pomocí koagulačních vyšetření tj. např. pomocí vyšetření funkčních hladin proteinu C a S, vyšetření rezistence na aktivovaný protein C, atd.

### **7.1. Vyšetření na lupus antikoagulans**

#### **7.1.1. Příprava plazmy na vyšetření a její uchování**

K vyšetření LA se používá speciálně upravená plazma tzv. bezdestičková plazma. Bezdestičková plazma se připravuje stáčením krve na centrifuze. Poté se její srážecí schopnost ověřuje jedním ze základních koagulačních testů. V našem případě to byl test na aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) s „cut off“ hodnotou 32 sekund.

Bylo vyzkoušeno několik způsobů centrifugování, než se došlo k nejpříjemnějšímu pro Oddělení klinické hematologie. Centrifugování se provádělo na chlazené centrifuze JOUAN. Jako první byla vyzkoušena centrifugace krve nejprve 15 minut při 2075g. Toto točení bylo nevyhovující, protože vlivem centrifugace došlo k výraznému prodloužení aPTT (viz. Tab. č. 1). Průměr aPTT u tohoto točení byl 45,9s se směrodatnou odchylkou 6,9s. Jako druhý způsob byla vyzkoušena centrifugace krve 2 minuty při 1500g, vzniklá plazma byla poté odpipetována do jiné zkumavky a opět stočena a to 10 minut při 2860g. Toto točení se zdálo taktéž nevyhovující, aPTT bylo prodlouženo (viz. Tab. č. 1). Průměrná hodnota aPTT u této centrifugace byla 41,4s se směrodatnou odchylkou 5,4s. Jako třetí způsob byla použita centrifugace 2 minuty při 1500g, poté byla plazma oddělena a dále byla stočena 2 minuty při 1500g. Tato centrifugace byla vyhovující, aPTT bylo prodlouženo minimálně (viz. Tab. č. 1). Průměrná hodnota této centrifugace byla 37,2s se směrodatnou odchylkou 5,6s. Tento postup výroby bezdestičkové plazmy je považován Oddělením klinické hematologie za optimální. Po posledním točení se vždy do jiné zkumavky odebere supernatant, který se buď použije k okamžitému zpracování anebo k uskladnění.

**Tabulka č. 1:** Vyzkoušené centrifugace a jejich aPTT

(Centrifugace 1: 15 minut (2075g) minut, stáhnout, zamrazit;

centrifugace 2: 2 minuty (1500g), stáhnout, 10 minut (2860g), stáhnout, zamrazit;

centrifugace 3: 2 minuty (1500g), stáhnout, 2 minuty (1500g), stáhnout, zamrazit)

Vzorek	aPTT (s)		
	Cetrifugace č. 1	Cetrifugace č. 2	Cetrifugace č. 3
1		40,5	40,7
3		42,0	36,1
6	49,5	50,1	43,5
7	39,5	40,2	34,9
8		44,4	41,9
9	42,4	40,2	33,7
11		35,9	30,4
12	57,1	58,8	43,0
14	37,2	38,0	31,4
15		42,8	40,2
18		38,2	39,5
19	43,4	42,0	44,9
23	57,6	53,9	56,5
24	43,0	38,6	32,4
20	41,5		29,4
21		39,9	35,9
22		47,2	37,2
23		37,8	31,7
24			38,2
25		33,9	36,1
26		44,5	36,4
27		40,7	34,1
28		38,6	36,6
29		40,6	33,0
30		40,5	34,8
31		35,9	33,9

Plazma je na Oddělení klinické hematologie skladována při  $-40^{\circ}\text{C}$  po dobu 14 dní. Tato teplota stačí pouze ke krátkodobému skladování. Optimální teplota pro skladování je  $-70^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě je úbytek faktoru VIII v plazmě minimální (zhruba 1% za rok) (ústní sdělení školitele). Plazma pro klinické využití při této teplotě vydrží zmrazená až 2 roky. Při uskladňování plazmy je důležité její rychlé promrazení, jinak by se mohly vytvořit krystaly a plazma by pak byla dále nepoužitelná. K uskladňování je lepší malé množství plazmy, a to zhruba do 1 ml (rychleji se promrazí). Pokud uskladňujeme větší množství plazmy, tak k jejímu mrazení užíváme speciální postupy, např. přístroj shockový freezer.

Chceme-li zmraženou plazmu použít k vyšetření, tak jí rozmrazíme při teplotě 37 °C, stočíme na centrifuze, v našem případě na chlazené centrifuze JOUAN, a to 2 minuty při 1500g, a použijeme k vyšetření.

### 7.1.2. Vlastní vyšetření LA

Celkem bylo provedeno 616 vyšetření na LA. Toto vyšetření je několikastupňové. V prvním kroku jsme se zaměřili na tzv. screeningový test, při němž se využívá schopnost antifosfolipidových protilátek prodlužovat koagulační testy in vitro. Podmínkou tohoto testu by měla být dostatečná citlivost k LA. K tomuto testu byla použita souprava PTT-LA od firmy Diagnostika Stago. Jedná se o modifikovaný test aPTT.

Standardně používaná reagentie na vyšetření aPTT je málo citlivá na LA. Přesto je prodloužení aPTT považováno za významný faktor směřující k pozitivitě LA. Jako ukázka ne vždy prodlouženého aPTT u pozitivních osob na LA slouží tabulka č. 2.

**Tabulka č. 2:** Pozitivní LA a jeho vztah k aPTT.

Počet vyšetření	Pozitivní hodnoty LA (>50s)	Naměřené hodnoty aPTT u pozitivního LA
1	66,3	30,2
2	55,0	36,2
		48,2
		59,3
3	67,4	38,4
4	58,4	33,0
5	95,1	46,2
6	55,3	35,4
7	51,6	25,6
8	56,5	24,2
		24,2
		24,2
		32,5
9	50,5	33,4
10	52,0	34,0
11	79,4	31,8
		56,1
12	73,8	34,2
		29,2
		28,1
		26,0
		25,5
		40,0
		42,5

13	56,6	31,7
14	54,1	30,5
15	51,1	30,5
		30,5
16	140,7	58,3
17	51,7	38,1
		37,8
		34,2
18	56,5	34,0
19	54,0	25,0
		23,6
20	93,0	36,3
		35,2

Za normální hodnoty (negativní zóna) PTT-LA jsou považovány hodnoty menší než 41,9s, rozmezí mezi 42-49,9s se považuje za mírnou pozitivitu LA (šedá zóna) a hodnoty nad 50s jsou pozitivní na LA (pozitivní zóna). Tato část vyšetření byla provedena u všech 616 pacientů. U 523 (85%) se inhibitor neprokázal, u 63 (10,2%) se objevila mírná pozitivita a 20 (3,2 %) bylo plně pozitivních. U jednoho vyšetření, které nebylo dokončeno se objevila závada přístroje, v šesti případech bylo málo materiálu a v dalším případě bylo vyšetření ovlivněno léčbou Warfarinem (Tab. č. 3).

**Tabulka č. 3:** Hodnoty testu LA. Procentuální vyjádření odpovídá počtu požadovaných vyšetření

Počet vyšetření na LA	Počet jedinců	Vyjádření v %
<b>Celkem</b>	616	100
<b>Negativní zóna (&lt;41,9s)</b>	523	85
<b>Šedá zóna (42-49,9s)</b>	63	10,2
<b>Pozitivní zóna (&gt;50s)</b>	20	3,2
<b>Vyšetření nebylo provedeno</b>	10	1,6

Pokud je vyšetření pozitivní, v šedé zóně anebo ho lékař požaduje, tak se dále provádí tzv. směsný test, jehož úkolem je prokázat či neprokázat inhibitor. Pokud dojde k průkazu inhibitoru, tak by se mělo provádět ještě další vyšetření a tím je konfirmační test (test k potvrzení diagnózy nebo onemocnění). Zde se prokazuje specifita inhibitoru a odhalují se falešně pozitivní reakce. Jelikož na trhu nebyl doposud nalezen vhodný konfirmační test, který by vyhovoval postupu vyšetřování LA na Oddělení klinické hematologie, tak průkaz inhibitoru u rizikových osob se zatím provádí pomocí imunometod. Nadále je však konfirmační test hledán.

Vyzkoušené konfirmační testy budou probrány v následující podčásti kapitoly 6.1.2.

## Vyzkoušené konfirmační testy k LA

Ke srovnávání screeningových a konfirmačních testů byl použit stávající screeningový test (LA-aPTT A). Vyzkoušené testy byly od 3 různých firem. Nejprve byly provedeny screeningové testy. Jejich souhrn je v tabulce č. 4. Průměry těchto testů jsou shrnuty v tabulce číslo 5. Kontroly k jednotlivým testům byly používány od té samé firmy, jako byl použit zkoušený screeningový test. Z technických důvodů nebylo možné provést test všech tří firem se vzorky stejných pacientů.

**Tabulka č. 4:** Souhrn screeningových testů jednotlivých firem (fialově jsou vyznačeny kontroly jednotlivých testů, modře jsou vyznačeni pozitivní lidé na LA – pozitivita je od 50s a více)

Firma B			Firma C			Firma D		
Kontrola:	LA – aPTT A	LA – screen B	Kontrola:	LA – aPTT A	LA – screen C	Kontrola:	LA – aPTT A	LA Screen D
<b>B</b>	135,4	93,3	<b>C</b>	***	81,6	<b>D(negativní)</b>	***	34,4
<b>C</b>	36,1	71,1				<b>D (pozitivní)</b>	***	82
<b>Pacient č.1</b>	66,1	56,8	<b>Pacient č.1</b>	35,3	34,3	<b>Pacient č. 11</b>	72,2	63,6
2	126,8	78,7	2	28,0	42,6	24	63,9	44,1
3	91,4	77,4	3	32,1	36,2	26	57,1	47,7
4	41,7	41,0	4	31,1	42,2	4	41,3	32,8
5	45,5	51,5	5	37,1	48,0	15	40,2	33,5
6	29,7	37,9	6	43,7	49,6	3	39,6	36,2
7	39,3	48,2	7	35,4	44,0	25	39,0	31,9
8	43,3	79,7	8	35,3	44,3	7	38,4	32,3
9	32,1	44,8	9	27,9	36,4	12	37,4	32,9
10	28,7	45,1	10	29,0	39,4	9	35,3	30,4
11	41,5	42,9	11	30,2	33,9	27	33,4	33,5
12	33,5	49,4	12	28,2	42,3	17	31,2	31,2
13	47,2	41,7	13	28,2	35,4			
14	44,2	52,4	14	32,8	48,0			
15	35,8	64,8	15	31,7	34,7			
16	39,5	50,0	16	29,0	35,0			
17	51,8	66,6	17	31,5	37,8			
18	34,8	54,1	18	30,8	51,6			
19	39,7	59,9	19	35,7	48,3			
20	34,7	40,5	20	32,2	45,3			
21	29,3	34,4	21	47,3	59,6			
22	32,8	43,9	22	29,7	36,5			
23	74,9	91,5	23	35,2	42,8			

Pacientů, s pozitivním vyšetřením na LA pro firmu B, bylo u stávajícího standardního screeningového testu LA – aPTT A 5 ze 23 (tj. 21,7%). Screeningový test LA-screen B odhalil 12 pozitivních vyšetření z 23 (tj. 52,2%). Tyto dva testy byly porovnávány mezi sebou a odhalily společnou pozitivitu v 5 případech (tj. 10,9%). Pacienti, s pozitivním vyšetřením na

LA pro firmu C, nebyli u stávajícího standardního screeningového testu LA – aPTT A žádní. Screeningový test LA-screen C odhalil 2 pozitivní vyšetření z 23 (tj. 8,7%). Tyto dva testy byly porovnávány mezi sebou a neodhalily žádnou společnou pozitivitu. Pacienti, s pozitivním vyšetřením na LA pro firmu D, byli u stávajícího standardního screeningového testu LA – aPTT A 3 z 12 (tj. 25,0%). Screeningový test LA-screen D odhalil 1 pozitivní vyšetření z 12 (tj. 8,3%). Tyto dva testy byly porovnávány mezi sebou a odhalily společnou pozitivitu v 1 případě (tj. 4,2 %).

**Tabulka č. 5:** Průměry screeningových testů u jednotlivých firem

	Firma B		Firma C		Firma D	
	LA–aPTT A	LA–screen B	LA–aPTT A	LA–screen C	LA–aPTT A	LA–screen D
<b>Průměr</b>	47,14348	54,48696	32,93043	42,09565	44,08333	37,50833
<b>Směrodatná odchylka</b>	22,5881	15,29408	4,781526	6,537083	12,43542	9,373052
<b>Medián</b>	39,7	50,0	31,7	42,3	39,3	33,2

K jednotlivým screeningovým testům byly poté dodělané i testy konfirmační. Těmito testy potvrzujeme po průkazu přítomnosti protilátek směsným testem jejich specificitu proti fosfolipidům v plazmě. Pokud tyto protilátky nejsou přítomny, tak porucha jimi není způsobena a způsobují ji poruchy některého nebo i více faktorů, případně jiný typ protilátky. Přítomnost či nepřítomnost těchto protilátek v plazmě nám určuje poměr mezi screenem a konfirmací. Hodnota „cut off“ je 1,2, přičemž silná protilátka by měla dosahovat hodnoty nad 1,5. Pokud je hodnota poměru nad 1,2, tak tyto protilátky jsou přítomny, pokud je menší, tak plazma je bez těchto protilátek.

Prvně byl udělán screeningový a konfirmační test u lidí, o kterých jsme věděli, že jsou pozitivní na LA. Tito lidé byli vyšetřováni testy od firmy B. Fosfolipidové protilátky byly zjištěny pouze ve 2 případech (viz. Tab. č. 6). Tento test dobře nevycházel.

**Tabulka č. 6:** Firma B - screen a konfirmace známých pozitivních lidí (modře – pozitivita na LA; fialově - kontrola; červeně – poměr určující přítomnost fosfolipidových protilátek)

Pacient č.	LA – aPTT A	LA - screen	LA - confirm	Poměr
<b>1</b>	66,1	56,8	47,2	1,20
<b>2</b>	126,8	78,7	54,5	1,44
<b>3</b>	91,4	77,4	71,2	1,09
<b>Kontrola B</b>	135,4	93,3	55,5	1,68

Vyzkoušeli jsme také tento test od firmy B u lidí, kteří přišli do ordinace a mělo jim být uděláno LA vyšetření a nebyla u nich známá pozitivita na LA. Na základě screeningového

testu (LA-screen B) vyšlo pozitivně 13 vyšetření ze 30 (tj. 43,3%). Z těchto 13 pozitivních vyšetření bylo konfirmací potvrzeno 5 pozitivních vyšetření (tj. 38,5%) (viz. Tab. č. 7).

**Tabulka č. 7:** Firma B - screen a konfirmace vyšetřovaných lidí na LA (modře – pozitivita na LA; fialově - kontrola; červeně – poměr určující přítomnost fosfolipidových protilátek)

		LA – aPTT A	LA – screen B	LA – confirm B	Poměr
<b>Kontrola</b>	<b>B</b>	135,4	93,3	55,5	1,68
<b>Kontrola</b>	<b>C</b>	36,1	71,1	50,5	1,41
<b>Pacient č.</b>	1	66,1	56,8	47,2	1,20
	2	126,8	78,7	54,5	1,44
	3	91,4	77,4	71,2	1,09
	4	41,7	41,0	40,1	1,02
	5	45,5	51,5	47,7	1,08
	6	29,7	37,9	36,8	1,03
	7	39,3	48,2	42,2	1,14
	8	43,3	79,7	48,0	1,66
	9	32,1	44,8	41,8	1,07
	10	28,7	45,1	44,2	1,02
	11	41,5	42,9	44,9	0,96
	12	33,5	49,4	42,9	1,15
	13	47,2	41,7	40,3	1,03
	14	44,2	52,4	47,0	1,11
	15	35,8	64,8	46,3	1,40
	16	39,5	50,0	42,6	1,17
	17	51,8	66,6	52,2	1,28
	18	34,8	54,1	48,3	1,12
	19	39,7	59,9	46,0	1,30
	20	34,7	40,5	38,1	1,06
	21	29,3	34,4	35,3	0,97
	22	32,8	43,9	40,5	1,08
	23	74,9	91,5	53,8	1,70
	24	35,1	34,7	36,5	0,95
	25	39,4	40,2	39,5	1,02
	26	36,3	41,4	38,8	1,07
	27	53,6	93,8	54,9	1,71
	28	39,3	42,1	38,9	1,08
	29	40,4	37,4	38,1	0,98
	30	40,3	42,8	39,3	1,09

Dále byly vyzkoušeny testy od firmy C. Na základě screeningového testu (LA-screen C) vyšly pozitivně 4 vyšetření z 26 (tj. 15,4%). Z těchto 4 pozitivních vyšetření bylo konfirmací potvrzeno 1 pozitivních vyšetření (tj. 25,0%) (viz. Tab. č. 8).

**Tabulka č. 8:** Firma C - screen a confirmace vyšetřovaných lidí na LA (modře – pozitivita na LA; fialově - kontrola; červeně – poměr určující přítomnost fosfolipidových protilátek)

	LA - aPTT	LA – screen C	LA – confirm C	Poměr
<b>kontrola C</b>	***	81,6	47,6	1,71
<b>Pacient č.1</b>	35,3	34,3	33,1	1,04
2	28,0	42,6	38,7	1,10
3	32,1	36,2	34,4	1,05
4	31,1	42,2	36,8	1,15
5	37,1	48,0	42,4	1,13
6	43,7	49,6	41,5	1,20
7	35,4	44,0	38,7	1,14
8	35,3	44,3	38,4	1,15
9	27,9	36,4	33,3	1,09
10	29,0	39,4	35,3	1,12
11	30,2	33,9	31,6	1,07
12	28,2	42,3	38,3	1,10
13	28,2	35,4	32,3	1,10
14	32,8	48,0	43,2	1,11
15	31,7	34,7		
16	29,0	35,0		
17	31,5	37,8	35,4	1,07
18	30,8	51,6	42,9	1,20
19	35,7	48,3		
20	32,2	45,3		
21	47,3	59,6	45,5	1,31
22	29,7	36,5		
23	35,2	42,8		
24	33,3	36,2		
25	33,7	62,2	52,1	1,19
26	41,1	60,3	42,4	1,42

Jako poslední byly zkoušeny testy od firmy D. Tyto testy jsou ve fázi zkoušení, a proto zde budou uvedeny částečné výsledky. Na základě screeningového testu (LA-screen D) nám vyšlo pozitivně 1 vyšetření z 12 (tj. 8,3%). Toto jedno pozitivní vyšetření bylo konfirmací potvrzeno (tj. potvrzeno bylo 100%). Co bylo ale zajímavé, že u jednoho vyšetření, které bylo pozitivní na LA, screening pozitivní nebyl, a přesto protilátky vyšly pozitivně (viz. Tab. č. 9 – žlutě zbarveno). Tento případ neumíme vysvětlit. Chyb může být několik např. nízko nastavená „cut off“ hodnota testu, málo konfirmovaných vyšetření, testy spolu dobře nekorelují, atd.



**Tabulka č. 9:** Firma D – screen a konfirmace vyšetřovaných lidí na LA (modře – pozitivita na LA; fialově - kontrola; červeně – poměr určující přítomnost fosfolipidových protilátek; žlutě zabarven atypický případ výskytu protilátek)

	LA - aPTT	LA – screen D	LA - confirm D	Poměr
Kontrola D negativní		34,4	32,5	1,06
kontrola D pozitivní		82	43,2	1,90
Pacient číslo 11	72,2	63,6	74,4	0,85
24	63,9	44,1	34,9	1,26
26	57,1	47,7	42,5	1,12
4	41,3	32,8	30,2	1,09
15	40,2	33,5		
3	39,6	36,2		
25	39,0	31,9		
7	38,4	32,3		
12	37,4	32,9		
9	35,3	30,4		
27	33,4	33,5		
17	31,2	31,2	27,9	1,12

## 7.2. Zjištěné defekty u vyšetřených pacientů mimo LA

Všechna vyšetření byla prováděna na mechanickém koagulometru Stago STA-R. Vyšlé výsledky byly porovnány s prací Fišerové (2005), avšak hodnoty jednotlivých vyšetření nejsou spolu plně komparabilní, protože byla použita jiná metodika. Funkční hladina proteinu C se stanovuje fotometrickou metodou – chromogenním substrátem, výsledky jsou pak odečteny z kalibrační křivky a jsou vyjadřovány v procentech. Za normální, tj. hodnoty bez klinického významu, jsou považovány hodnoty vyšší než 80%, rozmezí mezi 50-79 % se říká šedá zóna, tj. zóna s mírným klinickým významem, hodnoty pod 49%, tj. pozitivní hodnoty, jsou již klinicky významné. Ze skupiny 616 testovaných pacientů bylo provedeno 555 (90,1%) vyšetření na protein C. Z těchto 555 vyšetření bylo 518 (93,3 %) v normě (negativní), 31 (5,6%) představují mírný deficit (šedá zóna) a pouze u 5 (0,9%) se jedná o klinicky významný deficit (pozitivní zóna) (viz. Tabulka č. 10). Vyšetření, které nebylo provedeno, bylo ovlivněno léčbou pacienta Warfarinem.

**Tabulka č. 10:** Zjištěné funkční hladiny proteinu C. Procentuální vyjádření odpovídá počtu požadovaných vyšetření

Vyšetření na PC	Počet jedinců	Vyjádření v %	Vyjádření v % (Fišerová 2005)
<b>Celkem</b>	555	100	-----
<b>Negativní zóna (&gt;80)</b>	518	93,3	90,8
<b>Šedá zóna (50-79,9)</b>	31	5,6	7,8
<b>Pozitivní zóna (&lt;49,9)</b>	5	0,9	1,4
<b>Vyšetření nebylo provedeno</b>	1	0,2	0

Stanovení funkční hladiny proteinu S se provádí koagulační metodou a výsledky se odečítají z kalibrační křivky a udávají se v procentech stejně jako u vyšetření funkční hladiny proteinu S. Za normální (negativní) jsou považovány hodnoty vyšší než 80%, hodnoty 50 – 79,9% představují mírný deficit (šedá zóna) a hodnoty menší než 49,9% jsou již klinicky významným deficitem (pozitivní zóna). Vyšetření bylo provedeno v 552 (89,6%) případech ze 616. Normální funkční hladinu proteinu S mělo 350 (63,4%) jedinců, mírný deficit 163 (29,5%) jedinců, klinicky významný deficit se objevil u 35 (6,4%) jedinců a ve 4 (0,7%) případech nebylo vyšetření provedeno. To z důvodu nedostatku materiálu (1 vyšetření), léčbou Warfarinem (1 vyšetření), technickou závadou (2 vyšetření) (viz. Tab. č. 11).

**Tabulka č. 11:** Zjištěné funkční hladiny proteinu S. Procentuální vyjádření odpovídá počtu požadovaných vyšetření

Vyšetření na PS	Počet jedinců	Vyjádření v %	Vyjádření v % (Fišerová 2005)
<b>Celkem</b>	552	100	-----
<b>Negativní zóna (&gt;80%)</b>	350	63,4	60,5
<b>Šedá zóna (50-79%)</b>	163	29,5	13,8
<b>Pozitivní zóna (&lt;49%)</b>	35	6,4	17,9
<b>Vyšetření nebylo provedeno</b>	4	0,7	7,8

U 552 případů bylo provedeno vyšetření rezistence na aktivovaný protein C (APCR). Vyšetření se provádí koagulační metodou a to pomocí modifikace aPTT testu. Doporučená hraniční hodnota tzv. „cut off“ hodnota tohoto testu je 120s. Hodnoty nad tuto hranici jsou negativní (bez rezistence), rozmezí hodnot od 80-119s řadíme do tzv. šedé zóny (rezistenci nelze vyloučit) a hodnoty pod 79 s spadají do pozitivní zóny (prokázaná rezistence). Jedinců vyšetřených na APC rezistenci bylo 552 (89,6%) z celkového počtu 616. Bez rezistence na APC bylo 414 (75%) pacientů, rezistenci, která nelze vyloučit byla u 88 (16%) pacientů a APC prokázaná rezistence se naplno objevila u 48 (8,7%) pacientů. Vyšetření ve 2 (0,3%) případech nebylo možné dokončit a to z důvodu technické závady na přístroji (viz. Tab. č.12).

**Tabulka č. 12:** Výsledky vyšetření rezistence APC. Procentuální vyjádření odpovídá počtu požadovaných vyšetření

Vyšetření na APCR	Počet jedinců	Vyjádření v %	Vyjádření v % (Fišerová 2005)
<b>Celkem</b>	552	100	-----
<b>Negativní zóna (&gt;120s)</b>	414	75	75,2
<b>Šedá zóna (80-119s)</b>	88	16	18,9
<b>Pozitivní zóna (&lt;79s)</b>	48	8,7	5,0
<b>Vyšetření nebylo provedeno</b>	2	0,3	0,9

### 7.3. Množství defektů v souvislosti s trombózou u vyšetřených pacientů

U některých vyšetřovaných pacientů můžeme najít také kombinaci defektů. Kombinace těchto defektů vede k většímu riziku trombózy. Ve vyšetřovaném souboru 616 pacientů bylo 244 (39,6%) jedinců bez defektu, u 205 (33,3%) se projevil jeden defekt a u 167 (27,1%) byla nalezena kombinace dvou a více defektů (viz. Tab. č. 13).

**Tabulka č. 13:** Množství a kombinace defektů u vyšetřovaných pacientů. Procentuální vyjádření odpovídá počtu požadovaných vyšetření

Počet nalezených defektů	Počet jedinců	Vyjádření v %
<b>Žádný defekt</b>	244	39,6
<b>1 defekt</b>	205	33,3
<b>2 a více defektů</b>	167	27,1

Počet pacientů, u kterých byl nalezen aspoň jeden defekt, tj. u 372 (60,4% z celého souboru vyšetřovaných pacientů), je možno považovat za trombofiliky, čili lidi mající sklon k trombóze. Z této skupiny byly kombinace defektů nalezeny u 167 (44,9%) pacientů. Pokud dojde k výskytu více rizikových faktorů vedoucích k trombóze současně, pak se riziko trombózy vypočítá jejich součinem. A čím větší součin, tím větší riziko trombózy.

V tabulce č. 14 je přehledně zobrazen výskyt jednotlivých deficiencí proteinů v celém zkoumaném souboru a v populaci trombofiliků.

**Tabulka č. 14:** Počet jednotlivých defektů v celé zjišťované skupině 616 pacientů a u trombofiliků

	Procentuální zastoupení u celé skupiny pacientů	Procentuální zastoupení u trombofiliků
<b>Deficience proteinu C včetně mírné deficiente (&lt;79,9%)</b>	5,8	9,7
<b>Deficience proteinu S včetně mírné deficiente (&lt;79,9%)</b>	32,1	53,2
<b>APC rezistence včetně mírné rezistence (&lt;119s)</b>	22,1	36,6
<b>Lupus antikoagulans (&gt;42s)</b>	13,3	22,0
<b>Lupus antikoagulans (prokázané&gt;50s)</b>	0,2	0,3

## 8. Diskuze

Antifosfolipidový syndrom, jak již bylo zmíněno, je onemocnění definované klinicky a laboratorně. V této práci jsem se zaměřila na problémy laboratorního stanovení, konkrétně na stanovení pomocí koagulačních metod. Těmito metodami se stanovuje tzv. lupus antikoagulans (LA), což je laboratorní fenomén, kdy poměrně heterogenní skupina fosfolipid-dependentních autoprotilátok ovlivňuje in vitro reakce závislé na fosfolipidech. Nález těchto autoprotilátok u pacienta je považován za trombofilní stav.

V současné době je na trhu k dispozici pestrá paleta diagnostických testů s více či méně vhodnou senzitivitou a specifitou a současně chybí „zlatý standard“, tj. test nebo soustava testů spolehlivě detekující skupinu LA pozitivních pacientů. Z tohoto důvodu téměř nikde nenajdeme data o frekvenci LA v populaci.

Na Oddělení klinické hematologie v Nemocnici České Budějovice, a. s. bylo provedeno 616 vyšetření na LA test. Pozitivní bylo 20 vyšetření ze 616 (tj. 3,2%). Jeden pacient byl pozitivní opakovaně, což znamená, že u něj byly prokázány antifosfolipidové protilátky a může trpět APS syndromem, 523 (85%) vyšetření bylo negativní a 63 (10,2%) spadalo do šedé zóny. Než se začalo provádět vlastní vyšetřování LA, musela být upravena plazma na bezdestičkovou. Stávající centrifugování již nevyhovovalo, jelikož se opakovaně nedařilo připravit skutečně bezdestičkovou plazmu. Proto byla zkoušena jiná schémata centrifugace. Některá byla však zavržena, protože při nich docházelo k velkému prodloužení jednoho ze základních koagulačních testů (aPTT testu) vlivem špatně zcentrifugované krve. Z těchto zkoušených centrifugací byla nejvíce vyhovující centrifugace 2x 2 minuty při 1500g, která se začala k výrobě bezdestičkové plazmy na Oddělení klinické hematologie využívat. Takto vyrobená plazma byla buď uskladněna a nebo použita k dalšímu vyšetření, tj. ke screeningovému testu.

Jako screeningový test byl použit aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT) citlivý na lupus antikoagulans (LA). Standardem byl test PTT LA od firmy Diagnostika Stago. V průběhu testování bylo vyzkoušeno i několik obdobných testů jiných výrobců. Pokud byly tyto testy pozitivní, tak byl dále proveden směsný test, jehož úkolem bylo potvrdit nebo vyvrátit přítomnost inhibitoru. Jednalo se o standardní test používaný pro identifikaci jakýchkoli inhibitorů, proto nebyl do této práce zahrnut. Pokud byl směsný test pozitivní, měl by se dále udělat konfirmační test, který nám potvrdí nebo vyvrátí specifitu inhibitoru. Vyzkoušeno bylo několik konfirmačních testů, ale zatím žádný nebyl vyhovující a tak se specifita inhibitoru u rizikových pacientů vyšetřovala pomocí imunometod. Problémem je, že

pacienti, kteří mají pozitivní screeningový test, by se měli co nejdříve dostavit na ambulanci, aby jim mohl být nabrán nový vzorek. Ne každý však přijde.

Zkoušené konfirmační testy měly řadu problémů. Než byl vyzkoušen konfirmační test, bylo provedeno screeningové vyšetření dané firmy, které bylo srovnáno se stávajícím screeningovým vyšetřením (LA-aPTT A). Citlivost jednotlivých testů se značně lišila (viz. Tabulka č. 4, podkapitola 7.1.2.). K screeningovým testům od dané firmy byly dodělané testy konfirmační (konfirmací potvrzujeme přítomnost fosfolipidových protilátek v plazmě) a byly porovnány. Pokud byl screeningový test pozitivní a konfirmační taktéž, pak ve vzorku plazmy byly protilátky proti fosfolipidům, byl-li screeningový test dané firmy pozitivní a konfirmační test dané firmy negativní, pak nedošlo k potvrzení protilátek proti fosfolipidům. U takovýchto vyšetření (pozitivní screeningový test a negativní konfirmační test) můžeme předpokládat nějakou poruchu faktorů. Během zkoušení těchto testů se nám vyskytl atypický případ vyšetření, kdy screeningový test byl negativní a konfirmační test vyšel pozitivně ( viz. Tab. č. 9, podkapitola 7.1.2., žlutě zbarvený pacient č. 24). Toto by se stávat nemělo a je to známkou nějaké poruchy ve vyšetřovací metodě. Můžeme mít např. nízko nastavenou „cut off“ hodnotu testu, která je v tomto případě 1,2 (je to poměr mezi screeningovým a konfirmačním vyšetřením; hodnoty nad 1,2 znamenají přítomnost fosfolipidových protilátek v séru), sety spolu nespolupracují dobře, málo confirmovaných pacientů, atd. Těchto možných příčin je mnoho. Tyto zkoušené konfirmační testy označovaly jinak pozitivně vyšetřované pacienty. Testy nejsou konzistentní, a proto zatím není doporučeno tyto testy převzít do rutinní praxe. Je nutné je podrobit dalším a rozsáhlejšími kontrolám včetně korelace s imunometodami. Problém velmi nestandardní a nespolehlivé koagulační diagnostiky LA je známý a je hlavní příčinou chybní spolehlivých dat o frekvenci výskytu tohoto onemocnění v populaci.

Pouze podle pozitivních laboratorních testů nemůžeme určit, zdali má pacient antifosfolipidový syndrom či ho nemá. Tyto laboratorní testy musí korelovat s klinickým stavem pacienta a i s dalšími jinými testy. Z jednoho laboratorního vyšetření na toto onemocnění nemůžeme stanovovat diagnózu, testy musí být na to samé vyšetření pozitivní nejméně dvakrát a to v odstupu minimálně 12 týdnů (Bulíková a Penka 2006). Laboratorní vyšetření by nemělo být jednoho druhu. Pozitivita vyšetření by měla být potvrzena více způsoby (minimálně dvěma). Optimální by bylo, kdyby se u koagulačního vyšetření na APS udělal nejprve screeningový test, pak směsný test a po něm test konfirmační. U pozitivních výsledků nebo u rozporuplných výsledků by se dodělaly ještě imunometody a poté by tyto výsledky byly odeslány klinikovi k porovnání s klinickým stavem pacienta. Ten by na tomto základě rozhodl, zda je nutno pacienta léčit či ne.

Bylo zjišťováno také možné riziko trombózy ve vyšetřovaném souboru pacientů. Je známo, že trombóza je multifaktoriální onemocnění a neměli bychom ho tedy stanovovat z jednoho druhu laboratorního testu. Z tohoto důvodu byly provedeny další laboratorní testy. Byly to testy na deficit proteinu C, deficit proteinu S a APC rezistenci. Zjištěné frekvence deficitů proteinů a APC rezistence odpovídají literárním údajům (Kvasnička 2003a, Poul 2006). Kombinace, konkrétně součin, těchto defektů u vyšetřovaných pacientů vede k většímu riziku trombózy. V našem vyšetřovaném souboru bylo 244 (39,6%) pacientů bez defektu a u ostatních, tj. u 392 (60,4%), se projevil aspoň jeden defekt. Počet těchto pacientů, u kterých byl nalezen aspoň jeden defekt, lze považovat za trombofiliky, tj. lidi mající sklon k trombóze. Procentuální zastoupení výskytu jednotlivých defektů v populaci a u trombofiliků můžeme vidět v tabulce č. 14 v podkapitole 7.3.

## 9. Závěr

Na výskyt antifosfolipidového syndromu a rizikových faktorů trombózy v populaci bylo pomocí koagulačních metod na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a. s. vyšetřeno 616 pacientů.

Byla provedena částečná korekce koagulačního vyšetřování antifosfolipidového syndromu. Došlo k optimalizaci centrifugace na bezdestičkovou plazmu. Z původního točení se přešlo na centrifugování dvakrát dvě minuty při 1500g. Byla vyzkoušena řada screenů s nekonzistentními výsledky. Jako optimální se jeví kombinace minimálně dvou screenů. Směsný test funguje dobře. Konfirmační testy je nutné dále testovat, zatím žádný nemá dostatečnou a konzistentní specifitu. Z toho důvodu je nadále nutné považovat pozitivitu LA za neověřenou a výsledky korelovat s dalšími metodami – zvláště imunometodami a klinickým obrazem.

Poslední prováděný konfirmační test je ještě ve fázi zkoušení. Objevila se však v něm malá abnormalita. Po odstranění této abnormality a dalším testováním by bylo možné použít konfirmační test pro běžné vyšetřování pacientů.

Byl zmapován výskyt hyperkoagulačních stavů v souboru vyšetřovaných pacientů a ten byl porovnán s dva roky starými obdobnými daty z bakalářské práce Fišerové (2005). Výsledky jsou obdobné, snížení výskytu proteinu S přičítáme vylepšení laboratorního postupu, zvláště úpravě režimu centrifugace.

Byla také zjištěna populace trombofiliků ve vyšetřovaném souboru pacientů. Z 616 pacientů bylo 372 (60,4%) trombofiliků, což znamená, že u těchto pacientů byl nalezen nejméně jeden defekt způsobující hyperkoagulační stav.

U diagnostiky hyperkoagulačních stavů by se nemělo zapomínat na stavy získané, které jsou neméně důležité jako stavy vrozené. Nejedna lékař tyto získané stavy opomíjí.

## 10. Citovaná literatura

- **Barger, A.P., Hurley, R. (2000).** *Evaluation of the hypercoagulable state: whom to screen, how to test and treat.* Postgrad. Med., Vol.108, No.4, s.59-66
- **Bauer, K.A., Broekmans, A.W., Bertina, R.M., Conard, J., Horellou, M.H., Samama, M.M., Rosenberg, R.D. (1988).** *Hemostatic Enzyme Generation in the Blood of Patients With Hereditary Protein C Deficiency.* Blood, Vol.71, No.5, s.4 18-1426
- **Bayston, T.A., Tripodi, A., Mannucci, P.M., Thompson, E., Ireland, H., Fitches, A.C., Hananeia, L., Olds, R.J., Lane, D.A. (1999).** *Familial Overexpression of Antithrombin Caused by an Asn135Thr Substitution.* Blood, Vol.93, No.12, s.4242-4247
- **Beauchamp, N.J., Makris, M., Preston, F.E., et al. (2000).** *Major structural defects in the antithrombin gene in four families with type I antithrombin deficiency. Partial/complete deletions and rearrangement of the antithrombin gene.* Tromb. Haemost., Vol.83, s.715–721
- **Berková, M., Berka, Z. (2003).** *Srdce a diabetes mellitus.* Interní medicína pro praxi, No.3, s.120-125
- **Bulíková, A., Penka, M. (2005).** *Antifosfolipidový syndrom-diagnostika a léčba.* Vnitřní lékařství, Vol.51, No.7, s.809-817
- **Bulíková, A., Penka, M. (2006).** *Antifosfolipidový syndrom.* Interní Med., No.5, s.240-243
- **Burdová, M. (2001).** *Uživatelka hormonální substituční terapie v ordinaci praktického lékaře.* Interní Med., No.9
- **Carbolová, M., et. al. (2006).** *Plazmaferézy u pacientů s trombotickou trombocytopenickou purpurou.* Florence, No.11
- **Cazzola, M., Skoda, R.C.(2000).** *Translation pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease.* Blood, Vol.95, s.3280–3288
- **Dahlbäck, B. (1991).** *Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system.* Thromb Haemost., Vol.66, s.49-61
- **Dahlbäck, B. (1995).** *The protein C anticoagulant system: Inherited defects as basis for venous thrombosis.* Thromb Res, Vol.77, No.1
- **Dayal, S., Wilson, K.M., Leo, L., Arning, E., Bottiglieri, T., Lentz, S.R. (2006).** *Enhanced susceptibility to arterial thrombosis in a murine model of hyperhomocysteinemia.* Blood, Vol.108, No.7
- **Dear, A., Brennan, S.O., Sheat, M.J., Faed, J.M., George, P.M. (2007).** *Acquired dysfibrinogenemia caused by monoclonal production of immunoglobulin lambda light chain.* Haematologica, Vol.92, No.11, s.111-117



- **Devraj-Kizuk, R., Chui, D.H.K., Prochownik, E.V., Carter, C.J., Ofosu, F.A., Blajchman, M.A. (1988).** *Antithrombin-III-Hamilton: A Gene With a Point Mutation (Guanine to Adenine) in Codon 382 Causing Impaired Serine Protease Reactivity.* Blood, Vol.72, No.5, s.1518-1523
- **Donner, L. (1985).** *Klinická hematologie.* Avicenum, s.150-152
- **Dulíček, P., Kalousek, I., Malý, J. (2002).** *Hormonální antikoncepce a tromboembolická nemoc - jak je to ve skutečnosti.* Interní Med., No.8, s.4-10
- **Egeberg, O. (1965).** *Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia.* Tromb.Diath.Haemorrh., No.13, s.516-530
- **Falanga, A., Rickles, F.R. (1999).** *Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient.* Sem. Thromb. Hemost., Vol.25, No.8, s. 173-182
- **Field, S.L., Hogg, P.J., Daly, E.B., Dai, Y.P., Murray, B., Owens, D., Chesterman, C. (1999).** *Lupus Anticoagulants Form Immune Komplex With Prothrombin and Phospholipid That Can Augment Trombin Production in Flow.* Blood, Vol.94, No.10, s.3421-3431
- **Fišerová, L. (2005).** *Hyperkoagulační stavy a jejich laboratorní stanovení.* Bakalářská diplomová práce
- **Fokkema, M.R., Gilissen, M.F., van Doormaal, J.J., Volmer, M., Kema, I.P., Muskiet, F.A.J. (2003).** *Fasting vs Nonfasting Plasma Homocysteine Concentrations for Diagnosis of Hyperhomocysteinemia.* Clinical Chemistry, Vol. 49, No.5
- **Gandrille, S., Aiach, M., et al. (1995).** *Identification of Mutations in 90 of 121 Consecutive Symptomatic French Patients With a Type I Protein C Deficiency.* Blood, Vol.86, No.7, s.2598-2605
- **Gehring, N. H., Frede, U., Neu-Yilik, G., Hundsdoerfer, P., Vetter, B. et al. (2001).** *Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia.* Nat. Genet., Vol.28, s.389-392
- **Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Baton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J., Lan, R.M. (1984).** *Characterization of the human factor VIII gene.* Nature, s.312-326
- **Gorkun, O.V., Veklich, Y.I., Weisel, J.W., Lord, S.T. (1997).** *The Conversion of Fibrinogen to Fibrin: Recombinant Fibrinogen Typifies Plasma Fibrinogen.* Blood, Vol. 89, No.12, s.4407-4414
- **Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmermann, T.S., et al. (1981).** *Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease.* J. Clin. Invest., Vol.68, s.1370-1373

- **Gumulec, J., Penka, M., Ryšková, J., Donociková, B., Brejcha, M., Richter, J., Radina, M., Kučerová, M. (2003).** *Tromboembolická nemoc v onkologii: Etiopatogeneze nemoci a depistáž rizikových pacientů.* Kardiologická revue, No.1
- **Henriksen, R.A., Dunham, C.K., Miller, L.D., Casey, J.T., Menke, J.B., Knupp, C.L., Usala, S.J. (1998).** *Prothrombin Greenville, Arg517=Gln, Identified in an Individual Heterozygous for Dysprothrombinemia.* Blood, Vol.91, No.6, s.2026-2031
- **Hluší, A., Krčková, V. (2003).** *Antifosfolipidový syndrom.* Interní medicína pro praxi, No.9
- **Hořejš, J., Kudrna, K., Trča, S. (2003).** *Prevence tromboembolické nemoci u zlomenin horního konce kosti stehenní.* Sanquis, No.25, s.18
- **Chochola, M., Vařejka, P., Staněk, F., et al. (2000).** *Novinky v diagnostice a léčbě hluboké žilní trombózy dolních končetin.* Čas. lék. čes., Vol.139, s.583
- **Janíčková Žďárská, D. (2005).** *Diabetes mellitus ve vztahu ke kardiovaskulárním chorobám.* Int. Med. pro praxi, No.7-8, s.332-335
- **Jeníček, J. (2001).** *Možnosti hormonální substituční léčby.* Interní Med., No.9
- **Kacerovský, M., Bradáč, B., Hossner, P., Pulkert, J. (2004).** *Trombofilní stavy v těhotenství a šestinedělí – hereditární deficit antitrombinu.* Gynekolog, No.3
- **Katsumi, A., Senda, T., Yamashita, Y., Yamazaki, T., Hamaguchi, M., Kojima, T., Kobayashi, S., Saito, H. (1996).** *Protein C Nagoya, an Elongated Mutant of Protein C, Is Retained Within the Endoplasmic Reticulum and Is Associated With GRP78 and GRP94* Blood, Vol.87, No.10, s.4164-4175
- **Kluijtmans, L.A.J., Young, I.S., Boreham, C.A., Murray, L., McMaster, D., McNulty, H., Strain, J.J., McPartlin, J., Scott, J.M., Whitehead, A.S. (2003).** *Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults.* Blood, Vol.101, No.7, s.2483
- **Koeleman, B.P.C., Reitsma, P.H., Allaart, C.F., Bertina, R.M. (1994).** *Activated Protein C Resistance as an Additional Risk Factor for Thrombosis in Protein C-Deficient Families.* Blood, Vol.84, No.4, s.1031-1035
- **Korte, W. (2000).** *Changes of the coagulation and fibrinolysis system in malignancy: their possible impact on future diagnostic and therapeutic procedures.* Clin. Chem. Lab., Vol.38, No.8, s.679-692
- **Koster, T., Rosendaal, F.R., Briet, E., et al. (1995).** *Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study).* Blood, Vol.85, s.2756-2761
- **Kudrnová, Z., et al. (2007).** *Tematická příloha: Angiologie - Zkušenosti s fondaparinuxem u zlomeniny lemuru.* Medical Tribune, Vol.6, No.3

- **Kvasnička, J. (2003a).** *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi.* Grada Publishing a.s.
- **Kvasnička, J. (2003b).** *Žilní a tepenná trombofilie.* Interv. Akut. Kardiol., No.2, s.23-29
- **Lenting, P.J., van Mourik, J.A., Mertens, K. (1998).** *The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function.* Blood, Vol.92, No.11, s.3983-3996
- **Lijfering, W.M., Veeger, N.J.G.M., Brouwer, J.L.P., van der Meer, J. (2007).** *The risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinemic subjects may be a result of elevated factor VIII levels.* Haematologica, Vol.92, s.1703-1706.
- **Malý, J., Dulíček, P., Penka, M., Gumulec, J. (2006).** *Prevence žilní tromboembolické nemoci ve vnitřním lékařství a v neurologii.* Spolek pro trombózu a hemostázu - Sekce pro trombózu a hemostázu ČHS ČLS JEP, No.3
- **Mant, M., et al. (2006).** *Hypercoagulable/Thrombophilic States.* The Thrombosis Interest Group of Canada
- **Martinelli, I., Battaglioli, T., Pedotti, P., Cattaneo, M., Mannucci, P.M. (2003).** *Hyperhomocysteinemia in cerebral vein thrombosis.* Blood, Vol.102, No.4
- **Matýšková, M., Zavřelová, J., Hrachovinová, I. (1999).** *Hematologie pro zdravotní laboranty 2.díl - Krevní srážení.* Mikada
- **Mitropoulos, K.A., Miller, G.J., Reeves, B.E.A., Wilkes, H.C., Cruickshank, J.K. (1989).** *Factor VII coagulant activity is strongly associated with the plasma concentration of large lipoprotein particles in middle-aged men.* Atherosclerosis, Vol.76, s.203
- **Monhart, V. (2001).** *Nefrotický syndrom.* Interní medicína pro praxi, No.5, s.231
- **Nand, S., Fischer, S.G., Salgia, R., Fischer, R.I. (1987).** *Haemostatic abnormalities in untreated cancer: incidence and correlation with thrombotic and hemorrhagic complications.* J Clin. Oncol., Vol.5, No.12, s.1998-2003
- **Nečas, E., et al. (2003).** *Patologická fyziologie orgánových systémů – část I.* Karolinum, s.113-116
- **Pabinger, I., Grafenhofer, H., Kaider, A., Kyrle, P.A., Quehenberger, P., Mannhalter, C., Lechner, K. (2005).** *Risk of pregnancy-associated recurrent venous thromboembolism in women with a history of venous thrombosis.* Journal of Thrombosis and Haemostasis, No.3, s.949-954
- **Penka, M., Buliková, A., Matýšková, M., Zavřelová, J. (2001).** *Hematologie I. Neonkologická hematologie.* Grada Publishing, spol. s.r.o., s.131–166
- **Pollak, E.S., Lam, H.S., Russell, E.J. (2002).** *The G20210A mutation does not affect the stability of prothrombinmRNA in vivo.* Blood, Vol.100, s.359-362

- **Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H., Bertina, R.M. (1996).** *A common genetic variation in the 3-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.* Blood., Vol.88, s.3698-3703
- **Poul, H. (2006).** *Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci.* Sekce pro trombózu a hemostázu ČHS, ČLS JEP, No.3
- **Procházka, M., Krčková, V., Prášilová, J., Kudela, M., Slavík, L. (1999).** *Tromboembolická nemoc a těhotenství.* Gynekolog, No.2, s.79
- **Přistoupilová, K., Přistoupil, T. (2002).** *Homocystein a civilizační choroby. Jeho význam v metabolismu a v lékařské diagnostice.* Vesmír, Vol.81, No.11, s.624
- **Refsum, H., Smith, A.D., Ueland, P.M., Nexø, E., Clarke, R., McPartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., McPartlin, C., Sčoty, J.M. (2004).** *Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion.* Clinical Chemistry, Vol.50, No.1, s.3–32
- **Rezende, S.M., Lane, D.A., Mille-Baker, B., Samama, M.M., Conard, J., Simmonds, R.E. (2002).** *Protein S Gla-domain mutations causing impaired Ca<sup>2+</sup>-induced phospholipid binding and severe functional protein S deficiency.* Blood, Vol.100, s.2812-2819
- **Rezende, S.M., Simmonds, R.E., Lane, D.A. (2004).** *Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S–C4b binding protein complex.* Blood, Vol.103, No.4
- **Richterová, R., Gumulec, J. (2007).** *Vyšetření polymorfismu v  $\beta$ -fibrinogen genu.* Onkologické centrum J.G.Mendela, Nový Jičín. Noviny, No.6
- **Rokyta, R. (2000).** *Estrogeny, paměť, bolest a ochrana neuronů. Jsou estrogeny zázračné hormony?* Vesmír, Vol.79, No.12, s.670
- **Rosendaal, F.R. (1999).** *Venous thrombosis: a multicausal disease.* Lancet, Vol.353, s.1167-1173
- **Ross, R. (1993).** *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, Vol.362, s.801-809
- **Ryšavá, R., Tesař, V., Merta, M. (2005).** *Nefrotický syndrom.* Interní medicína pro praxi. No.3, s.131-134
- **Samad, F., Pandey, M., Loskutoff, D.J. (2001).** *Regulation of tissue factor gene expression in obesity.* Blood, Vol.98, No.12, s.3353-3357

- **Seghatchian, M.J., Samama, M.M., Hecker, S.P. (1996).** *Hypercoagulable states: Fundamentals Aspects, Acquired Disorders and Congenital Thrombophilia.* CRC Press, Inc., s.217-221, 285-291
- **Schmidel, D.K., Tatro, A.V., Phelps, L.G., Tomczak, J.A., Long G.L. (1990).** *Organization of the human protein S genes.* Biochemistry, Vol.29, s.7845-7852.
- **Schwarz, H.P., Fisher, M., Hopmeier, P., et al. (1984).** *Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease.* Blood, Vol.64, s.1297-1300
- **Siebenlist, K.R., Mosesson, M.W., Hernandez, I., Bush, L.A., Di Cera, E., Shainoff, J.R., Di Orio, J.P., Stojanovic, L. (2005).** *Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing chains.* Blood, Vol.106, s.2730-2736
- **Simmonds, R.E., Ireland, H., Kunz, G., Lane, D.A. and the Protein S Study Group (1996).** *Identification of 19 Protein S Gene Mutations in Patients With Phenotypic Protein S Deficiency and Thrombosis.* Blood, Vol.88, No.11, s.4195-4204
- **Simmonds, R.E., Lane, D.A. Loscalzo, J., Shafer, A.I. (1998).** *Regulation of coagulation.* Thrombosis and Hemorrhage. 2nd ed. Baltimore, Williams and Wilkins, s. 45-76.
- **Skalická, L., Chochola, M., Mrázek, V., Vařejka, P., Jirát, S., Heller, S., Urbánková, J., Aschermann, D., Karetová, D. (2002).** *Trombóza a těhotenství.* Kardiologická revue, No.4, s.273-275
- **Stehlík, J. (2001).** *Detekce leidenské mutace pomocí PCR u trombofiliků.* Magisterská diplomová práce, České Budějovice, s.10
- **Sun, Y.H., Shen, L., Dahlbäck, B. (2003).** *Gla domain-mutated human protein C exhibiting enhanced anticoagulant activity and increased phospholipid binding.* Blood, Vol.101, s.2277-2284
- **Šimánek, M. (2003).** *Pooperační hluboká žilní trombóza a plicní embolie. Kardiovaskulární systém - kazuistika KAR-21 ze dne 02.10.2003.* KC SOLID, spol. s r.o., klinika.kcsolid.cz
- **Šmírová, S., Chochola, M., Aschermann, M. (2002).** *Hluboká žilní trombóza v souvislosti s užíváním estrogen-gestagení perorální antikoncepce.* Kardiologická revue, No.4
- **Šorba, J., Češka, R. (1999).** *Genetická predispozice pro mnohočetný metabolický syndrom: 4.část. Apolipoprotein E a lipoproteid (a).* Čas. Lék. čes., Vol. 138, No.7, s.203-208
- **Tesař, V. (2002).** *Nefrotický syndrom: doporučené postupy pro praktické lékaře.* ČLS JEP, s.2

- **Troyer, E., Thornton, S. (2007).** *B Vitamin Deficiency: A Preventable Coronary Artery Disease Risk Factor.* Biosyntx: Nutritional Support For Healthy Eyes, Vol.800, No.3, s.688-6815
- **Urbánková, J., et al. (2001).** *Hyperkoagulační stavy.* Cor Vasa, Vol.43, No.9, s.458-462
- **Urbánková, J., Chochola, M., Vařejka, P., Skalická, L., Jirát, S., Heller, S., Karetová, D., Aschermann, M. (2002).** *Hyperkoagulační stav a hluboká žilní trombóza.* Kardiologická revue, No.4, s.282-285
- **Varga, E.A., Moll, S. (2004).** *Prothrombin 20210 Mutation (Factor II Mutation)* Circulation, Vol.110, s.15-18
- **Vehar, G.A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D.P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W.I., Harkins, R.N., Tuddenham, E.G.D., Lawn, R.M., Capon, D.J. (1984).** *Structure of human factor VIII.* Nature, s.312:337
- **Vítovec, J., Špinar, J. (2005).** *Diagnostika a léčba chronického srdečního selhání.* Medicína pro praxi, No.3
- **Vogel, R.A., et al. (1999).** *Kardiovaskulární choroby: Cholesterol, hypolipidemika a endotelová funkce.* Medicína, Vol.6, No.3, s.9
- **Vokurka, M., Hugo, J., et al. (2002).** *Velký lékařský slovník.* Maxdorf
- **Yee, K.O., Ikari, Y., Schwartz, S.M. (2001).** *An update of the Grützbag Hypothesis: the role of thrombosis and coagulation in atherosclerotic progression.* Tromb. Haemost. Vol.85, s.207 – 217
- **Zivelin, A., Mor-Cohen, R., Kovalsky, V., Kornbrot, N., Conard, J., Peyvandi, F., Kyrle, P.A., Bertina, R., Peyvandi, F., Emmerich, J., Seligsohn, U. (2006).** *Prothrombin 20210G A is an ancestral prothrombotic mutation that occurred in whites approximately 24 000 years ago.* Blood, Vol.107, s.4666-4668
- **Zöller, B., Berntsdotter, A., de Frutos, P.G., Dahlbäck, B. (1995).** *Resistance to Activated Protein C as an Additional Genetic Risk Factor in Hereditary Deficiency of Protein S.* Blood, Vol.85, No.12, s.3518-3523