

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Stanovení heparinem indukované
trombocytopenie-vliv genetických polymorfismů
receptorů destiček na její výskyt**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Gabriela Svobodová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	květen 2013

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

V Olomouci dne 22.4. 2013

.....

Ráda bych poděkovala panu Mgr. Lud'ku Slavíkovi PhD. za jeho ochotu, věnování spoustu času a informací při vykonávání mé diplomové práci. Poděkování patří celému kolektivu Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za vytvoření přátelského kolektivu.

Poděkovat chci i mým rodičům, sestře a partnerovi, kteří mi byli po celou dobu studia morálními oporami.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Gabriela Svobodová
Název práce	Stanovení heparinem indukované trombocytopenie-vliv genetických polymorfismů receptorů destiček na její výskyt
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Koagulační laboratoř: Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá stanovením heparinem indukované trombocytopenie a vlivy genetických polymorfismů destičkových receptorů po vystavení účinku antikoagulačního léku heparinu. Teoretická část popisuje mechanismus hemostázy, postavení krevních destiček při tvorbě krevní zátky a ovlivnění funkce krevních destiček heparinem. Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je klinicko-patologický syndrom postihující přibližně 3-5 % pacientů léčených heparinem. HIT je způsobena tvorbou protilátek proti komplexům destičkového faktoru 4 a heparinu. Klinická manifestace HIT je příčinou poklesu trombocytů nebo dokonce trombotické komplikace. Jednou z pravděpodobných příčin HIT na genetické úrovni je polymorfismus FCG2RA destičkového receptoru. HIT je velmi obtížné diagnostikovat, protože se na jejím vzniku může podílet několik faktorů. K včasné diagnostice HIT jsou důležité laboratorní testy disponující dostatečnou citlivostí, specifitou, spolehlivostí a reprodukovatelností.

Experimentální část popisuje použité metody ke stanovení HIT dle recentní literatury. Literární zdroje se opírají o kombinaci 3 testů - imunologického, funkčního a molekulárně-biologického testu. Protilátky podílející se na rozvoji HIT byly stanoveny imunologickým testem ZYMUTEST HIA IgG, IgM, IgA, který zachycuje protilátky podílející se na vzniku HIT. Jako funkční test bylo použito impedanční agregometrie-MEA. Princip metody spočívá ve vychytávání aktivovaných trombocytů mezi párem elektrod a výsledkem je agregační křivka vyjádřena v agregačních jednotkách (AU) za jednotku času (min).

Vyšetření polymorfismu destičkového receptoru metodou real-time PCR s následnou analýzou křivek tání bylo provedeno pro zjištění možné genetické příčiny HIT. Analýza křivek tání byla využita k identifikaci jednotlivých genotypů a určení frekvencí alel mutovaných a normálních.

Klíčová slova	PF4, heparin, protilátky, heparinem indukovaná trombocytopenie, polymorfismus destičkového receptoru FcyRIIa
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and Surname	Bc. Gabriela Svobodová
Title	Determination of heparin-induced thrombocytopenia- influence of genetic polymorphisms of platelet receptors for its occurrence
Type of thesis	Master
Department	Coagulation laboratory: Departement of Hemato- Oncology, University Hospital, Olomouc
Supervisor	Mgr. Luděk Slavík, PhD.
The year of presentation	2013

Abstract

This thesis deals with the determination of heparin-induced thrombocytopenia and effects genetic polymorphisms of platelet receptors after exposure to the anticoagulant drug heparin. The theoretical part describes the mechanisms of hemostasis, the role of platelet in the creation of blood plug and influence of anticoagulant heparin to function on platelets. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a clinical-pathological syndrome affecting about 3-5% of patients treated with heparin. HIT is caused by the formation of antibodies against complexes of platelet factor 4 and heparin. With manifestation HIT is associated low number platelets or thrombosis. One of the probace cause sof HIT at the genetic level is a polymorphism of platelet receptor FCG2RA. Detection of thrombocytopenia is very difficult, because the formation may be caused by other several factors. For early diagnosis of HIT are important laboratory tests having sensitivity, specificity, reliability and reproducibility. The experimental part describes the methods used to determine HIT from recommended by the literature. Literary sources are based on a combination of free tests-immunological, functional and molecular-biological tests. The antibodies contributing in the development of HIT were determined by ZYMUTEST HIA IgG, IgM, IgA. The test shows antibodies in all classes in the patient's blood plasma. Function and activation of platelets in the full non-shrink blood were investigated impedance aggregometry-MEA. The principle of the method is in the uptake of activated platelets between a pair of electrodes, and the result is aggregation curve expressed in the aggregation units (AU) per unit time (min).

DNA purified from blood plasma and peripheral blood was used to determine polymorphisms of platelet receptor using real-time PCR with following analysis of melting curve. Melting curve analysis was used to identify individual genotypes and to determine the frequency of mutant and normal alleles.

Keywords	PF4, heparin, antibodies, heparin-induced thrombocytopenia, polymorphism of platelet receptor FcyRIIa
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

OBSAH.....	- 5 -
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	- 7 -
CÍLE PRÁCE	- 9 -
TEORETICKÁ ČÁST.....	- 10 -
1 HEMOSTÁZA.....	- 10 -
1.1 Krvetvorba	- 10 -
1.1.1 Destičková vývojová řada.....	- 10 -
1.2 Složky hemostázy	- 11 -
1.2.1 Cévní stěna.....	- 12 -
1.2.2 Složka tkáňová	- 12 -
1.2.3 Krevní destička.....	- 12 -
1.3 Mechanismus hemostázy	- 14 -
1.3.1 Primární hemostáza.....	- 14 -
1.3.2 Plazmatický koagulační systém.....	- 14 -
1.3.3 Fibrinolytický systém.....	- 15 -
1.3.4 Inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy	- 15 -
1.4 Poruchy krevních destiček	- 16 -
2 ANTITROMBOTICKÁ LÉČBA	- 18 -
2.1 Antiagregační léčba.....	- 18 -
2.1.1 Kyselina acetylsalicylová (ASA).....	- 18 -
2.1.2 Ticlopidin a clopidogrel	- 19 -
2.2 Trombolytická léčba.....	- 19 -
2.2.1 Streptokinasa	- 19 -
2.2.2 Urokinasa.....	- 20 -
2.2.3 Tkáňový aktivátor plazminogenu	- 20 -
2.3 Antikoagulační léčba	- 20 -
2.3.1 Antagonisté vitamínu K	- 21 -
2.3.2 Heparin	- 21 -
3 HEPARIN.....	- 23 -
3.1 UFH a LMWH.....	- 23 -
3.2 Struktura heparinu	- 27 -
3.3 Výroba heparinu	- 28 -
3.4 Antitrombotická léčba	- 30 -
3.4.1 Nefrakcionovaný heparin UFH.....	- 30 -
3.4.2 Nízkomolekulární heparin LMWH	- 31 -

4	HEPARINEM INDUKOVANÁ TROMBOCYTOPENIE	- 34 -
4.1	Patofyziologie HIT	- 34 -
4.1.1	Molekulární podstata HIT	- 36 -
4.1.2	Klinická pravděpodobnost výskytu HIT (4T-skóre)	- 37 -
4.2	Metody vyšetření HIT	- 39 -
4.2.1	Sérologické testy	- 39 -
4.2.2	Funkční testy	- 39 -
4.2.3	Mikroskopické hodnocení agregace krevních destiček	- 43 -
4.2.4	Detekce polymorfismu receptorů krevních destiček	- 43 -
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 46 -
5	MATERIÁL A METODY	- 46 -
5.1	Přístrojové vybavení	- 46 -
5.2	Diagnostika a odběrový systém	- 46 -
5.3	Biologický materiál	- 47 -
5.4	Chemikálie	- 47 -
5.5	Metody	- 47 -
5.5.1	Preanalytická fáze - odběr krve	- 47 -
5.5.2	Dárcovské trombocyty	- 48 -
5.5.3	Impedanční agregometrie	- 48 -
5.5.4	ZYMUTEST HIA IgG, IgA, IgM	- 49 -
5.5.5	Příprava krevních nátěrů	- 50 -
5.5.6	Izolace DNA z periferní krve	- 51 -
5.5.7	Izolace DNA z krevní plazmy	- 52 -
5.5.8	Měření koncentrace DNA	- 52 -
5.5.9	Real-time PCR	- 53 -
6	VÝSLEDKY	- 56 -
6.1	Soubor pacientů	- 56 -
6.2	Výsledky měření funkčního testu – MEA	- 57 -
6.3	Výsledky měření imunologického testu- ZYMUTEST HIA IgG, IgA, IgM ..-	- 60 -
6.4	Výsledky mikroskopického hodnocení krevních destiček	- 61 -
6.5	Výsledky genotypizace polymorfismu genu FCG2RA H131R	- 62 -
6.5.1	Optimalizace real-time PCR	- 63 -
6.6	Statistické zpracování dat	- 65 -
7	DISKUSE	- 67 -
8	ZÁVĚR	- 71 -
9	LITERATURA	- 72 -
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 81 -

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schéma hematopoézy	-11-
Obr. 2 Poruchy primární hemostázy	-17-
Obr. 3 Zobrazení účinku trombolytických léčiv	-20-
Obr. 4 Mechanismus účinku UFH a LMWH	-25-
Obr. 5 Struktura farmaceutického heparinu	-27-
Obr. 6 Účinek látek na funkci trombinu	-31-
Obr. 7 Struktura PF4	-33-
Obr. 8 Patofyziologie HIT	-36-
Obr. 9 Heparin-IgI destičková aktivace	-37-
Obr. 10 Výstup metody MEA	-41-
Obr. 11 Multiplate analyzátor	-42-
Obr. 12 Křivka tání DNA	-45-
Obr. 13 Soubor pacientů	-56-
Obr. 14 Soubor pacientů- 4T- skóre	-57-
Obr. 15 Výsledky metodou MEA	-58-
Obr. 16 Výsledky metodou MEA-cut-off 20 AU*min	-58-
Obr. 17 Závislost počtu trombocytů na čase a léčbě	-59-
Obr. 18 Výsledky ZYMUTEST HIA IgG, IgM, IgA	-60-
Obr. 19 Nátěr periferní krve při zvětšení 100x	-61-
Obr. 20 Nátěr periferní krve při zvětšení 1000x	-62-
Obr. 21 Nátěr plazmy bohaté na krevní destičky při zvětšení 100x	-62-
Obr. 22 Křivka tání PCR produktů v LightCycler 480	-64-
Obr. 23 Píky PCR produktů získané zderivováním křivky tání	-64-
Obr. 24 Výsledky genotypizace	-65-

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Přehled plazmatický faktorů	-16-
Tab. 2 Přehled kumarinových derivátů	-21-
Tab. 3 Změna vlastností heparinu po depolymerizaci	-24-
Tab. 4 Porovnání vlastností UFH a LMWH	-26-
Tab. 5 Zastoupení jednotlivých složek heparinu získaného z různých druhů a tkání	-29-
Tab. 6 Warkentinovo 4T-skóre	-38-
Tab. 7 Porovnání metod	-42-
Tab. 8 Příprava krevních nátěrů	-51-
Tab. 9 Množství mixu na jednu reakci PCR	-54-
Tab. 10 Program pro genotypizaci polymorfismu genu FCGR2RA H131R	-55-
Tab. 11 Výsledky MEA-konfirmace 100 IU/ml heparinem	-59-
Tab. 12 Výsledky genotypizace	-65-
Tab. 13 Závislost mezi mutačním stavem a MEA	-66-
Tab. 14 Závislost mezi mutačním stavem a ZYMUTEST HIA IgG,IgM, IgA	-66-

CÍLE PRÁCE

1. Literární rešerše problematiky heparinem indukované trombocytopenie, podílu krevních destiček na rozvoji tohoto patofyziologického jevu
2. Volba optimálních metod pro diagnostiku HIT
3. Zhodnocení efektivity navrženého diagnostického postupu
4. Zjištění vlivů genetických příčin na vznik HIT

TEORETICKÁ ČÁST

1 HEMOSTÁZA

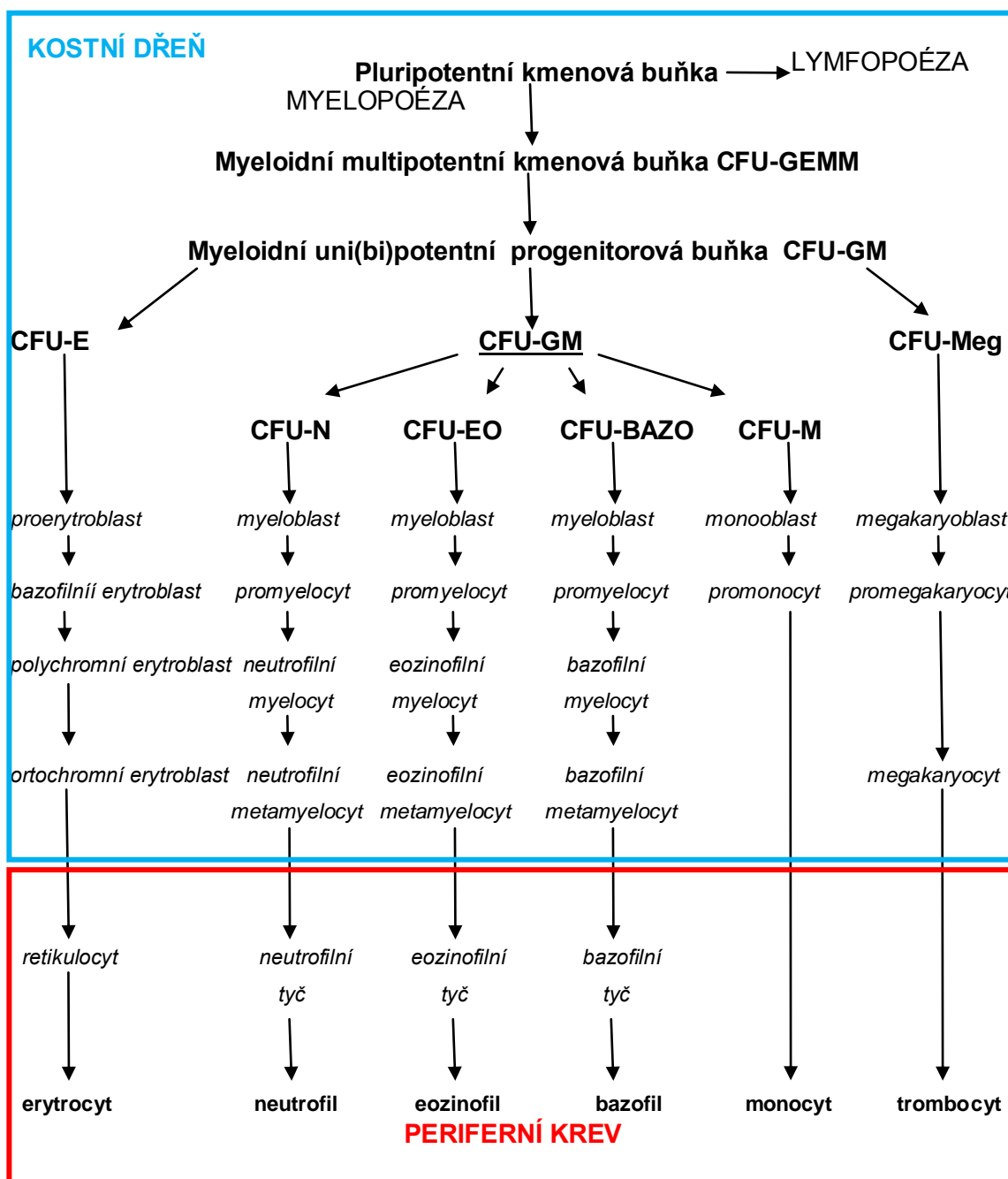
Hemostáza je proces, který nastává v organismu v případě poranění. Jedná se o sled navazujících kroků, které mají za úkol uzavřít krevní trhlínky cévního oběhu a zabránit trvalému krvácení. Na uzavírání se podílejí krevní buňky nazývané krevní destičky. Jedná se o buňky bez jádra a barviva vznikající z větších mateřských buněk megakaryocytů. Krevní destičky se shlukují v místě poranění za vytvoření krevní zátky a za jejich agregaci je zodpovědný plazmatický glykoprotein von Willebrandův faktor. Se shlukováním destiček souvisí i uvolnění dalších fyziologicky významných látek, které se komplexně podílejí na stažení cév a zastavení přítoku krve k místu poranění (Voet&Voetová, 1995).

1.1 Krvetvorba

Krvetvorba neboli hematopoéza probíhá v kostní dřeni bohaté na hemopoetické kmenové buňky. Prekurzorem všech buněk je multipotentní kmenová buňka, jejíž hlavním úkolem je udržovat stabilní počet kmenových buněk a zároveň dávat podněty ke generaci nových zralejších kmenových buněk tzv. committed cells. Hematopoéza je regulována interleukiny a CSF glykoproteiny (colony stimulating factors). Důležitou roli zde hrají interakce mezi kmenovými buňkami a stromatem hemopoetických orgánů (Penka&Tesařová, 2011).

1.1.1 Destičková vývojová řada

Krevní destičky se tvoří ze zralých megakaryocytů. Megakaryocyty vznikají procesem megakaryopoézy z pluripotentní kmenové buňky – CFU Meg. Vývojová řada megakaryocytu začíná megakaryoblastem přes promegakaryocyt, až po samotný megakaryocyt. Megakaryocyt se dále už nedělí, pouze dozrává. Trombopoéza je děj tvorby krevní destičky ze zralého megakaryocytu trvající okolo 5 hodin. Tvorba nových krevních destiček je stimulována hormonem trombopoetinem produkovaným v játrech, který je aktivován při poklesu počtu krevních destiček. Destičky přežívají v periferní krvi po dobu 7-10 dní, poté jsou odstraněny ve slezině (Faber et al., 2012).



Obr. 1 Schéma hematopoézy (přepřacované dle Faber et al., 2012)

1.2 Složky hemostázy

Hemostáza je komplexní děj zahrnující řadu reakcí a složek, které se podílejí na jejím správném fungování. Základními složkami hemostázy jsou: cévní stěna, složka tkáňová a krevní destičky.

1.2.1 Cévní stěna

Základní funkcí cévního systému je rozvádět okysličenou krev k orgánům a odvádět odkysličenou krev. Cévní stěna je složena ze tří vrstev: intima, media a adventicie. Intima je tvořena vrstvou endoteliálních buněk uložených pod bazální membránou, které vystělají vnitřní stranu cév. Tato výstelka představuje aktivní povrch mezi krví a cévní stěnou a také se aktivně účastní cévní hemostázy. Udržuje rovnováhu prostředí a reguluje látkovou výměnu mezi krví a tkání. Pod bazální membránou leží subintima obsahující žírné buňky. Tyto buňky mají schopnost syntézy a skladování heparinu, histaminu a serotoninu. Vrstva media je ohraničena z obou stran elastickou laminou a zodpovídá za pružnost krevních cév a změnu průsvitu cévy. V medii se nacházejí elastická vlákna, kolagen I a III, glykosaminoglykany (GAGs) a strukturální glykoproteiny. Poslední vrstvou cévní stěny je adventicie obsahující fibroblasty a adipocyty (Matýšková et al., 1999).

1.2.2 Složka tkáňová

V místech a okolo míst cévního poranění dochází k uvolnění adenosidifosfátu (ADP) a tkáňového faktoru. ADP má za úkol stimulovat primární agregaci krevních destiček a tkáňový faktor aktivně podílejí se na přeměně protrombinu na trombin (Pecka, 2004).

1.2.3 Krevní destička

Součástí systému krevního srážení jsou i krevní destičky. Destičky tvoří primární cévní zátku v procesu zastavení krvácení. Také se významně podílejí na obnovování vnitřních povrchů cévních stěn (Penka et al., 2001).

V systému hemostázy podléhají řadě interakcí, které mohou vést ke změně jejich metabolismu, tvaru a látkové přeměny. Za aktivaci destiček jsou zodpovědné rozpustné látky krevní plazmy a kontakt s povrchem poškozeného endotelu (Pecka, 2006). Mezi nejsilnější aktivátory patří kolagen s trombinem. Aktivace těmito látkami vede ke změně diskoidního tvaru destiček na pseudopodium, degranulaci, uvolnění prokoagulačních faktorů a uvolnění aktivátorů krevních destiček. Sekretovanými látkami jsou nejčastěji ADP a tromboxan. Deformací destiček se získává mnohem větší povrch, který zprostředkovává interakci s ostatními faktory koagulační kaskády (Lapetina&Siegel, 1983). Aktivace krevních destiček vede ke změnám projevujících se uvnitř buňky anebo na povrchu.

Vnitřní změny:

- Přesun nitrobuněčného vápníku z denzního tubulárního systému, mitochondrií a samotného extracelulárního vápníku.
- Flip-flop mechanismus membrány krevní destičky-přetáčení fosfolipidové dvojvrstvy oběma směry současně s vystavením negativně nabitých fosfolipidů vnitřní vrstvy.
- Poškození membrány s následnou tvorbou membránových mikročástic (Pecka, 2006).

Vnější změny:

- Změna diskoidního tvaru na pseudopodia (výběžky).
- Adheze krevních destiček na poraněné místo v přítomnosti von Willebrandova faktoru, Mg^{2+} a plazmatických proteinů. Adhezi ovlivňuje množství a viskozita krve, velikost a tvar cév a smykové rychlosti. Rychlost adheze je přímoúměrná počtu trombocytů.
- Agregace krevních destiček s cílem vytvořit trombus. Primární agregaci zajišťují Ca^{2+} ionty, GP IIb/IIIa, fibrinogen, ADP a tromboxan. Vzniká nestabilní agregát, který se rozpadne, pokud neproběhne sekundární agregace vedoucí k ireverzibilní agregaci. Průběh agregace ovlivňuje koncentrace primární agregační agens a to je ADP. Vysoká koncentrace stimuluje nevratnou agregaci a tvorbu pevné zátky (Matýšková et al., 1999).

Závěrečným krokem je retrakce krevní destičky, ke které dochází po určité době. Cytoskelet destičky vyvolává stažení destičkového trombu a tím se obnoví průchodnost poraněné cévy. Retrakci vykonávají pouze živé a funkčně zdatné krevní destičky s vysokou spotřebou ATP. Na retrakci koagula a stažení cévní stěny se podílí i fibrinogen schopný vazby na destičkový aktin (Pecka, 2006).

1.3 Mechanismus hemostázy

Komplexnost a správnou funkčnost hemostázy zajišťují čtyři základní procesy:

- Primární hemostáza
- Plazmatický koagulační systém
- Fibrinolytický systém
- Inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy

1.3.1 Primární hemostáza

Hlavním cílem primární hemostázy je vytvoření primární hemostatické zátky, která zastaví krvácení. Děje se účastní krevní destičky a cévní složky (Levy-Toledano et al., 1997). Neaktivované krevní destičky nereagují s endotelem cévní stěny, K aktivaci dochází při poranění, kdy se poškodí cévní stěna a obnaží se kolagenní vlákna. Ke kolagenním vláknům se přichytávají krevní destičky za účasti glykoproteinových receptorů S adhezí destiček je spojeno uvolnění proagregačních a chemických působků a to především PF4, PDGF a fibrinogenu. Sekrece ADP z granulí krevních destiček způsobuje aktivaci ostatních destiček a dává podnět k syntéze TXA2. TXA2 je důležitým stimulem primární agregace krevních destiček. Uvolnění dalších molekul ADP a TXA2 syntetizuje stabilní můstky mezi jednotlivými destičkami a vzniká sekundární agregát - bílý trombus Závěrečným krokem primární hemostázy je přemístění fosfolipidů z vnitřní membránové dvojvrstvy do míst vnějších membránových struktur. Uvolnění fosfolipidů aktivuje další proces hemostázy a tím je polymerace rozpustného fibrinu na nerozpustný fibrin (Pecka, 2004).

1.3.2 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém představuje sled kroků vedoucích ke vzniku nerozpustného fibrinu. K jeho tvorbě dochází postupnou přeměnou fibrinogenu na fibrin a následně na fibrinové monomery. Polymerací fibrinových monomerů za účasti aktivovaného faktoru XIII vzniká nerozpustný fibrin. Fibrinová síť zachycující krevní buňky tvoří stabilní fibrinovou zátku (Sussman, 1992).

Koagulační kaskáda zajišťující přeměnu fibrinogenu na fibrin probíhá dvěma různými cestami:

1. Vnější dráha, která začíná řízenou proteolýzou faktoru VII (prokonvertin). Reakce může být katalyzována aktivovaným faktorem XII nebo trombinem. Aktivovaný prokonvertin je zodpovědný za aktivaci následujícího faktoru X. Aktivace je mnohem rychlejší, pokud probíhá na povrchu fosfolipidové membrány, v přítomnosti Ca^{2+} a tkáňového faktoru (TF). TF je membránový glykoprotein vyskytující se ve stěnách cév, ale také v mozku, plicích a placentě. Pokud se tyto tkáně dostanou do kontaktu s krví následkem poranění, spouští se vnější dráha. A jestliže se přidá i TF, tvoří se krevní sraženina mnohem rychleji (řádově v sekundách), (Voet&Voetová, 1995).
2. Vnitřní dráha je spouštěna aktivací faktoru XII následovaného faktory XI a IX. Kaskádovitá reakce je zesílena aktivací faktorů V a VIII. Faktory IXa a VIIIa tvoří komplex tenasu generující potřebné množství faktoru Xa, který s faktorem Va katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin v komplexu protrombinasy. Monomery fibrinu polymerizují a stabilizují se faktorem XIIIa aktivovaným trombinem. Stabilizace poskytuje vznik nerozpustného fibrinu (Pecka, 2004).

1.3.3 Fibrinolytický systém

Úkolem fibrinolytického systému je rozpustit fibrinová koagula. Krev je za normálních podmínek tekutá, a pokud fibrinové koagulum není rozpuštěno, může dojít k úplnému ucpání krevní cévy. Hlavní složkou fibrinolytického systému je plazminogen, který je prekurzorem aktivního enzymu plazminu. Plazminogen je nejčastěji aktivován tkáňovým aktivátorem plazminogenu nebo urokinasou.

Proces přeměny je zahájen vazbou plazminogenu na fibrinové koagulum. Po vazbě je ihned aktivován svými aktivátory na plazmin, který se generuje pouze v místě koagula. Zvýšená aktivita fibrinolýzy může vést ke krvácivým stavům. Naopak snížená aktivita vyvolává trombotické stavy (Šlechtová, 2007).

1.3.4 Inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy

Hemostáza je z převážné části tvořena proteolytickými enzymy, které mají charakter proteinů. Jejich činnost musí být regulována a kontrolována z důvodu ochrany organismu před poškozením. Důležitými regulátory krevního srážení jsou plazmatické faktory udržující koagulační rovnováhu. Přehled nejdůležitějších plazmatických faktorů je uveden v tabulce (Matýšková et al., 1999).

Tab. 1 Přehled plazmatických faktorů (přepřacované dle Matýšková et al., 1999).

Název	Zkratka	Místo tvorby	Cílový enzym
Antitrombin III	ATIII	Játra, endotel	Ila, Xa
Heparin kofaktor II	HCII	Endotel	Ila, Xa
α_2 -makroglobulin	α_2 MG	Trombo, makrofágy	Ka, plazmin, Ila
C1-inhibitor	C1INH	Játra	XIIa, Ka
α_1 -antitrypsin	α_1 AT	Trombo, mgk	Xa, APC
α_2 -antiplazmin	α_2 AP	Játra	Plazmin
Plazminogen akt. Inhibitor 1	PAI-1	Endotel, trombo	t-PA, U-PA
Plazminogen akt. Inhibitor 2	PAI-2	Placenta	U-PA
Tkáňový faktor inhibitor	TFPI	Endotel	Xa, TF/VIIa
Protein C	PC	Játra (vit. K)	Va, VIIIa
Protein S	PS	Játra (vit. K)	Xa, FVIII
Trombomodulin	TM	Endotel	Ila, (Xa)
Inhibitor akt. PC	iAPC	játra	APC, Ka

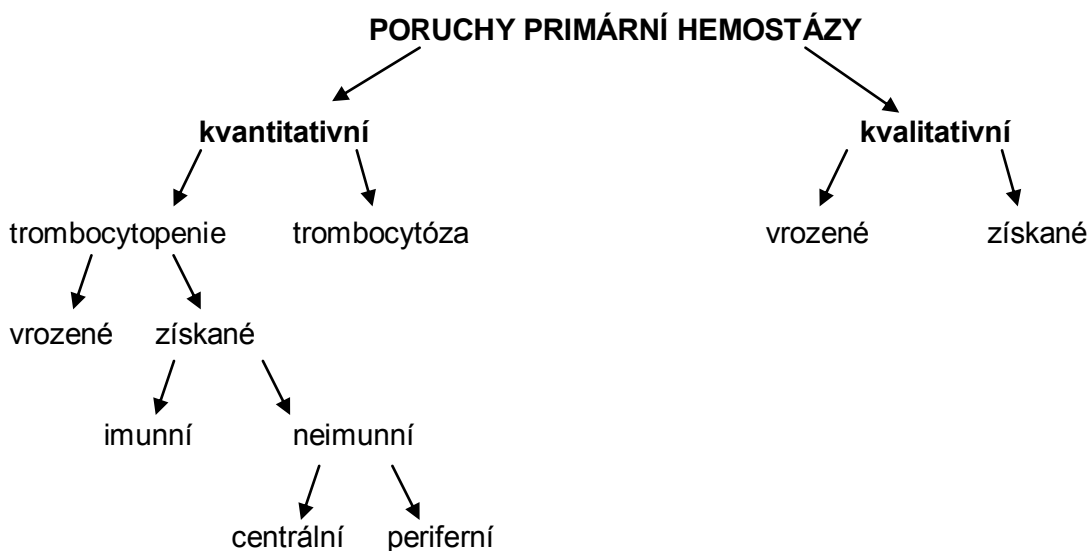
1.4 Poruchy krevních destiček

Funkcí krevních destiček není pouze tvorba krevní zátky v procesu krevního srážení, ale také obnova vnitřního povrchu cév, mají schopnost fagocytózy, přenosu látek a účastnit se v dalších reaktivních systémech díky svým membránovým receptorům.

Poruchy hemostázy obecně rozdělujeme na kvantitativní a kvalitativní, které se dělí na vrozené a získané. Získané poruchy mohou být imunitního nebo neimunitního původu. Vzniklé poruchy se objevují na periférii krve anebo v části dřevňové (Penka&Tesařová, 2011).

Kvantitativní poruchou hemostázy je nejčastěji trombocytopenie. Trombocytopenie je patologický stav charakterizován sníženým počtem krevních destiček pod hodnotu $100 \cdot 10^9/l$. Trombocytopenie je často doprovázena zvýšenou krvácivostí a zvýšeným zánikem, spotřebou či ztrátami krevních destiček z periferní krve. Nejzávažnější příčinou je ovšem porucha tvorby krevních destiček v kostní dřeni. Další častou kvantitativní poruchou je trombocytóza. Jedná se o abnormálně vysoký

počet krevních destiček v periferní krvi. Klinicky se vyskytuje v souvislosti s myeloproliferativními chorobami. Příčin trombocytózy je spousta a nejčastějšími jsou infekce, malignity, zánětlivé onemocnění, nedostatek Fe, splenektomie a krvácivost (Penka et al., 2001).



Obr. 2 Poruchy primární hemostázy (přepřacované dle (Penka et al., 2001).

Vrozené trombocytopenie jsou poměrně vzácné a často se vyskytují s dalšími anomáliemi, jako jsou chromozomální aberace nebo hypoplastické trombocytopenie s aplazií. Získaná trombocytopenie je důsledkem tvorby protilátek proti trombocytům. Jejich vznik je často podmíněn poruchou tvorby krevních destiček, zkrácenou dobou krevních destiček v krevním oběhu a nesprávné rozdělení krevních destiček. Vrozená trombocytopenie je způsobena poruchou membrány krevní destičky nebo jedné z jejích funkcí (adheze, sekrece, agregace, aktivace destiček). Nejčastější poruchou je získaná trombocytopenie vyskytující se u jaterního a renálního selhání v kombinaci léků jako jsou antibiotika, dextransy, lokátory vápníkových iontů a salicyláty (Matýšková et al., 1999)

2 ANTITROMBOTICKÁ LÉČBA

Mechanismy hemostázy se řadí mezi fyziologické procesy, jejichž aktivace se může stát pro organismus nebezpečná. Na útlumu primární hemostázy se podílejí protidestičkové léky, v případě sekundární hemostázy se uplatňují antikoagulantia. Účinky léků lze potom rozdělit:

- Snížení hyperkoagulability systému
- Zamezení případnému shluku trombocytů
- Zabránění zvětšení trombu nebo rozpuštění jeho fibrinolytické složky

Antitrombotickou léčbu dělíme:

- Antiagregační
- Trombolytická
- Antikoagulační (Pecka, 2004)

2.1 Antiagregační léčba

Cílem antiagregační léčby je zamezit tvorbě shluků krevních destiček. Léky se účastní v mnoha aktivačních procesech. Mezi nejčastější patří adheze, uvolňovací reakce a agregace. Aktivně se podílejí na snižování riziku arteriální trombózy, ale současně mohou zvýšit riziko krvácení při jejich předávkování (Pecka, 2004).

2.1.1 Kyselina acetylsalicylová (ASA)

ASA je látka s protizánětlivým účinkem a je schopná nevratné inhibice aktivity cyklooxygenasy (COX). Inhibice cyklooxygenasy způsobí inhibici syntézy tromboxanu A₂, který aktivně vytvářejí krevní destičky hemostázy. Účinek a citlivost COX vůči ASA se liší u obou pohlaví, ale také v jednotlivých tkáních. Působení ASA trvá po celou dobu života krevní destičky tj. po dobu 7 až 10 dnů. Inhibitory syntézy tromboxanu A₂ dělíme na přímé inhibitory a inhibitory receptoru. Přímá inhibice způsobuje zvýšenou produkci jiných cyklických endoperoxidů, jejichž účinek nemá žádný vliv. Inhibitory receptoru jsou mnohem specifitější, ale také nevykazují žádný efekt. Nejvyžívanějšími inhibitory COX jsou indometacin, voltaren a zmíněná ASA ve formě acylpyrinu a aspirinu (Matýšková et al., 1999).

2.1.2 Ticlopidin a clopidogrel

K preventivní léčbě akutní a subakutní trombózy v kombinaci s ASA se podávají ticlopidin a clopidogrel. Podstatou těchto léků je blokáce agregace destiček navozená ADP. ADP je destičkový aktivátor uvolněný z červených krevních buněk. ADP je zodpovědný za destičkovou agregaci a adhezi, které jsou zprostředkované přes receptory P2. Obě dvě léčiva jsou velmi rychle biotransformovány v játrech za účasti enzymů cytochromu P450. Podání ticlopidinu a clopidogrelu prodlužuje krvácivost, inhibuje destičkovou agregaci a prodlužuje retrakci koagula. Farmakologická aktivita léčiv je velmi podobná. Liší se pouze ve vedlejších účincích, které jsou závažné u ticlopidinu. Mezi nejzávažnější patří neutropenie, trombocytopenie, aplastické anémie a trombocytopenické purpury. Méně závažnými komplikacemi jsou alergické reakce a průjemy. U těchto léků je důležitý monitoring a zvažování indikace u každého pacienta (Malý, 2003).

2.2 Trombolytická léčba

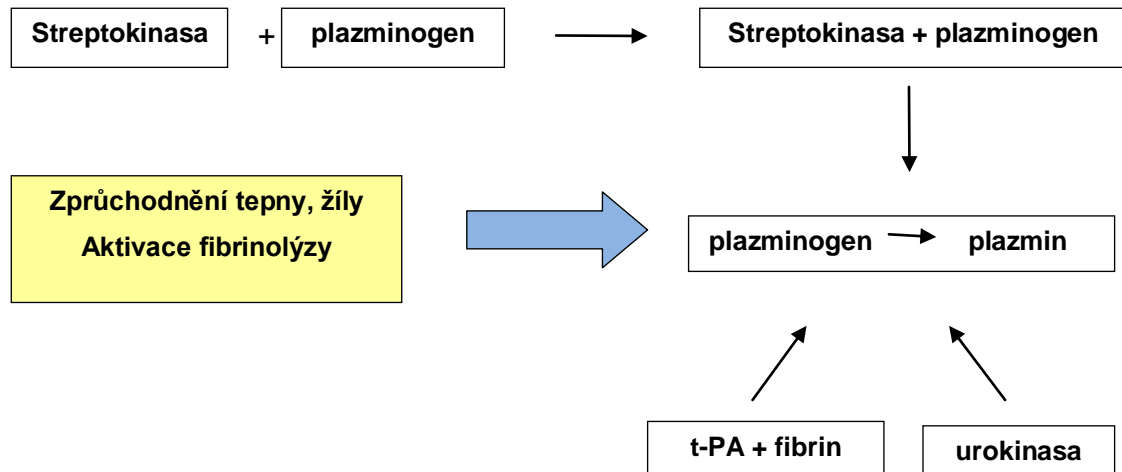
Dalším přístupem je trombolytická léčba, která je založena na potenciaci přeměny plazminogenu na plazmin. Jedná se o nejagresivnější přístup, který je srovnatelný s chirurgickými zákroky. Cílem je rozpustit trombus v rychlém čase. Takový zásah s sebou nese i značná rizika jako je riziko krvácivosti a komplikace spojené s alergickými reakcemi (Penka et al., 2001).

2.2.1 Streptokinasa

Streptokinasa (SK) je produktem metabolismu β -hemolytického streptokoka. SK se aktivuje v přítomnosti plazminogenu. Komplex tvořený plazminogenem a SK indukuje autoaktivaci plazminogenu na plazmin. Nově vytvořený komplex plazmin/SK má za úkol proteolyticky štěpit SK. Meziprodukty všech reakcí aktivně přeměňují plazminogen na plazmin. Vysoká účinnost SK je závislá na dostatečném množství plazminogenu. SK přetrvává v krevní plazmě po dobu 15-30 minut a všechny komplexy SK jsou vychytávány játry, kde probíhá jejich odbourání. Podávání SK je spojené s přítomností protilátek na mířených proti SK, které zůstaly v organismu po infekci β -hemolytického streptokoka (Matýšková et al., 1999).

2.2.2 Urokinasa

Urokinasa je enzym vyskytující se v moči zdravých lidí. Syntetizuje se z epitelálních buněk močového traktu. Aktivace přeměny plazminogenu na plazmin probíhá přímo. V krevní plazmě zůstává po dobu 15 minut. Výhodou užívání urokinasy je, že není antigenní. Tedy nesetkáváme se s tvorbou protilátek proti urokinase ani s alergickými komplikacemi. Urokinasa se může podávat opakovaně (Pecka, 2004)



Obr. 3 Zobrazení účinku trombolýtických léčiv (přepřacované dle Pecka, 2004).

2.2.3 Tkáňový aktivátor plazminogenu

Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) je přímý trombolýtický lék, který se pro klinické využití získává rekombinační DNA technologií. Molekula t-PA má vazebné místo pro fibrin a katalytické místo přeměny plazminogenu na plazmin. Jeho biologický poločas je menší než 10 minut (Mark et al., 1995). Lék se vyznačuje vysokou afinitou k vnitřním strukturám trombu a specificky se váže na fibrin. Vazba je zprostředkována přes NH₂-terminální řetězec. Charakteristickým rysem léku je, že nespouští antigenní odpověď. Jedná se o humánní enzym (Pecka, 2004).

2.3 Antikoagulační léčba

Aktivita antikoagulancií je směřována proti účinku trombinu a také ovlivnění přeměny fibrinogenu na fibrin. Léky jsou navrženy tak, aby prodloužily koagulační časy, snížily koagulační potenciál a snížily riziko krvácení. Do této skupiny zařazujeme především hepariny a antagonisty vitamínu K (Penka et al., 2001).

2.3.1 Antagonisté vitamínu K

Významnými představiteli této skupiny jsou kumarinové deriváty. Kumarinové deriváty snižují koagulační aktivitu faktorů, které jsou závislé na vitamínu K. S nedostatkem vitamínu K, souvisí tvorba forem označovaných jako PIVKA – Protein Induced in Vitamin K Absens. PIVKA ztrácí schopnost vazby na vápenaté ionty, které jsou důležité pro koagulační enzymatické reakce. Inhibice kumarinovými deriváty znemožňuje karboxylaci proteinů zbytku kyseliny karboxyglutamové na kyselinu γ -karboxyglutamovou. Hlavním úkolem této kyseliny je vázat se na Ca^{2+} v průběhu krevního srážení (Matýšková et al., 1999). Kumariny se nejčastěji indikují pacientům trpícím žilní trombózou. Jejich podávání nastává až po předchozí heparinizaci nebo současně. Kumariny lze rozdělit podle doby účinku na krátkodobé a dlouhodobé. Z klinického hlediska je výhodnější užívání dlouhodobějších preparátů pro jejich nižší kolísání účinku a snadnější dávkování. Mezi nežádoucí účinky kumarinů patří krvácení a kožní nekrózy. Předávkování kumariny lze zastavit podáním antidota samotného vitamínu K. Kožní nekrózy se vyskytují v raném stádiu léčby. Důvodem jejich vzniku je nesplnění předešlé heparinizace (Penka et al., 2001).

Tab. 2 Přehled kumarinových derivátů (přepřacované dle Penka et al., 2001)

Název kumarinových derivátů	Doba působení (hodiny)
Pelentan	2
Sintrom	8
Warfin, Coumadine	72
Marcoumar	160

2.3.2 Heparin

Heparin je protisrážlivá látka objevená McLeanem v roce 1916. V organismu ho můžeme najít v játrech, plicích a kůži. Heparin je produkován žírnými buňkami a endoteliem. Strukturně se řadí mezi mukopolysacharidy s vysokým obsahem síry a jeho polyanionický charakter je dán přítomností zbytků kyseliny uronové. Heparin se účastní mnoha reakcí v lidském organismu. Působí na lipidový metabolismus, metabolismus kostí, chrání endotel proti srážení, má imunologický účinek a ochranný vliv při intoxikaci organismu. Vlastnosti a funkce heparinů jsou dány jejich schopností vázat se na proteiny.

Samotný heparin nemá antikoagulační účinek, ten je zprostředkováván dvěma cestami:

1. Antitrombin
2. Uvolnění inhibitoru tkáňového faktoru

Kromě toho, že heparin ovlivňuje primární hemostázu, má schopnost vazby na makromolekulární látky, lymfocyty, granulocyty a makrofágy. Toho se využívá u zánětlivých reakcí. V klinické praxi se heparin podává k prevenci a léčbě tromboembolické nemoci. S podáváním heparinu souvisí i lékové interakce typu krvácení, trombocytopenie, trombóza a osteoporóza. Efekt heparinu a jeho vlastnostech je podrobně zpracován v následující kapitole (Matýšková et al., 1999), (Pecka, 2004).

3 HEPARIN

Nefrakcionovaný heparin (UFH) a nízkomolekulární heparin (LMWH) se řadí mezi antitrombotické léky. V současné době slouží k prevenci a léčbě žilních tromboembolických chorob a trombofilií v těhotenství. Kromě antitrombotických účinků UFH a LMWH byly popsány jiné procesy, ve kterých se tyto aditiva účastní. Mezi neantitrombotické vlastnosti heparinu patří potlačování zánětu a metastatického šíření nádorových buněk, ovlivnění progresu rakoviny včetně enzymu heparinasy, blokování P-a L-selektinu zprostředkovanou buněčnou adhezí a inhibici angiogeneze (Ludwig, 2009), (Borsig 2007). Heparin je v lidském těle metabolizován v játrech enzymem heparinase. LMWHs mají vyšší, předvídatelnější a účinnější biologickou dostupnost než UFH. Jakmile je heparin absorbován krví, hladiny LMWHs v krevní séru jsou stabilnější a přetrvávají mnohem déle než UFH. UFH i LMWH se nevstřebávají svaly, tukem a lymfatickou tkání. Delší poločas rozpadu LMWH je dán jeho sníženou afinitou a vazbou na endotel, makrofág a proteiny nefrakcionovaného heparinu. Interakce mezi heparinem a jeho vazebnými proteiny mění biologickou dostupnost mnohem více u UFH. Snížené krvácení u pacientů léčených LMWH je redukováno vazbou na destičky, endotel a vWF. Antikoagulační monitoring u této skupiny pacientů není potřebný, pouze je-li jejich váha nižší než 50 kg, anebo vyšší jak 80 kg. V těchto případech může docházet ke změnám farmakokinetiky a také plazmatického faktoru Xa (Quader et al., 1998).

3.1 UFH a LMWH

Farmakokinetické omezení nefrakcionovaného heparinu je způsobeno jeho nespecifickou vazbou na proteiny a buňky. Heparin je mukopolysacharid složený ze sulfátového d-glukosaminu a d-kyseliny glukuronové. Esterifikace kyselinou sírovou udává záporný náboj a vazbu pentasacharidové oblasti na různé plazmatické proteiny jako jsou lipoproteiny, fibrinogen a histidin bohaté glykoproteiny. Také má afinitu k proteinům sekretovaným krevními destičkami, především destičkový faktor (PF4) a vysokomolekulární von Willebrandův faktor (Hirsh, 1991), (Barzu et al., 1985). Typickými vedlejšími účinky léčby UFH je krvácení, jako u většiny antikoagulancií, ale také trombocytopenie a osteoporóza (Weitz et al., 1990), (Marciniak, 1973). LMWH jsou získávány z UFH chemickou nebo enzymatickou depolymerizací. Vzniklé fragmenty odpovídají 1/3 heparinu. Molekulová hmotnost je v rozmezí 4000 – 5000

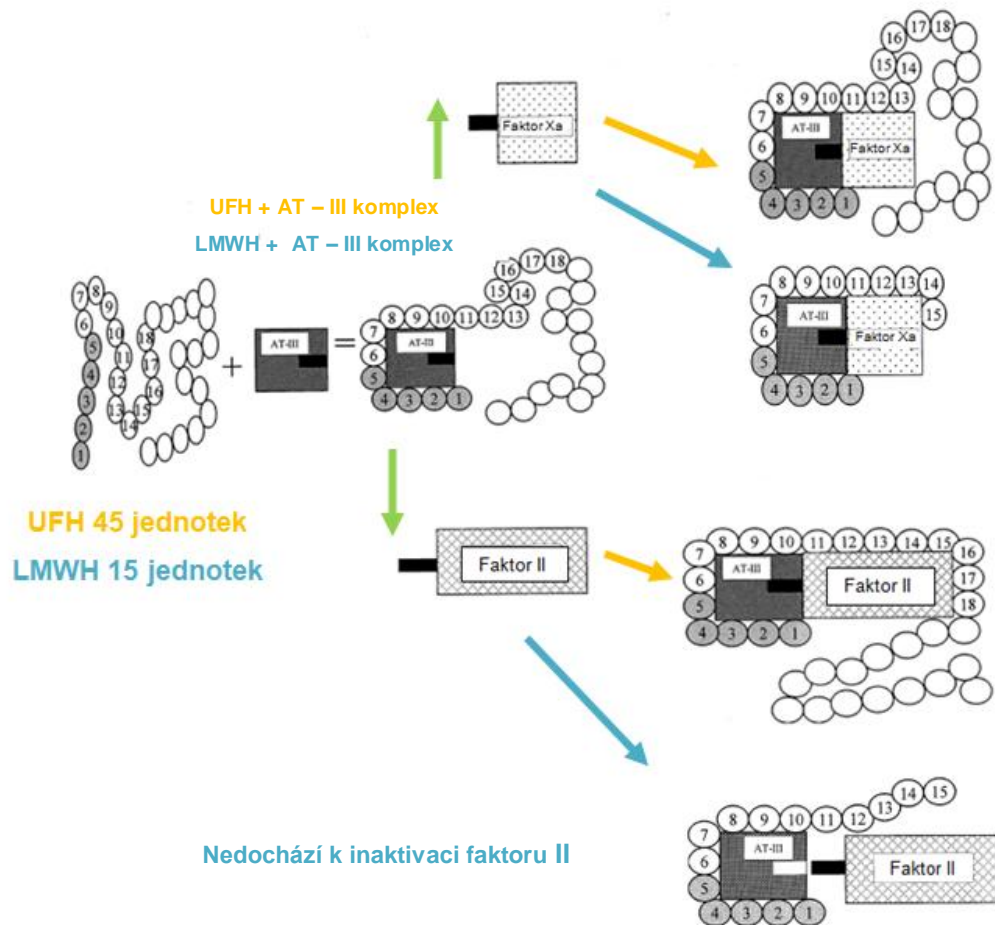
s molekulovou distribucí 1000 – 10 000. Procesem depolymerizace dochází ke změnám vlastností, které jsou zobrazeny v přehledné tabulce.

Tab. 3 Změna vlastností heparinu depolymerizací UFH, (přepřacované dle Hirsh 1998)

Vazba heparinu	Biologický účinek	Klinický důsledek
Protein	Vyšší antikoagulační odpověď	Zbytečný monitoring antikoagulačního účinku
Trombin	Redukce poměru anti-IIa / anti Xa	Neznámý
Makrofág	Mechanismus pročištění ledvin	Delší poločas plazmy, SC léčba jednou denně
krevní destička	Snížená incidence heparinem závislé protilátky	Redukce heparinem indukované trombocytopenie
Osteoblast	Redukce aktivace osteoblastu	Nízký dopad osteopenie

*SC je podkožní

Antikoagulační efekt LMWHs spočívá v aktivaci AT. Tato interakce je zprostředkovaná přes unikátní pentasacharidovou sekvenci nalezené na méně než 1/3 molekul LMWH (Casu et al., 1981), (Choay et al., 1983). Inaktivace trombinu je způsobena vytvořením ternární komplexu z minimálně 18 sacharidů včetně pentasacharidové sekvence. Řetězce LMWH, které vykazují vysokoafinitní pentasacharidy katalyzují inaktivaci faktoru Xa. Důsledkem je, že komerční LMWHs mají poměr anti-Xa / anti- IIa mezi 4:1 nebo 2:1. Zatímco UFH mají tento poměr 1:1 (Holmer et al., 1986), (Holmer et al., 1981).



Obr. 4 Schematické znázornění mechanismu účinku nefrakcionovaného a frakcionovaného heparinu. UFH složen ze 45 sacharidových jednotek na jeden řetězec nefrakcionovaného heparinu se váže na faktor Xa a faktor II. Tím dochází k jejich inaktivaci. K inaktivaci faktoru Xa stačí pouhých 5 sacharidních řetězců heparinu. Inaktivace faktoru II vyžaduje minimálně 18 sacharidových jednotek. Poměr anti-faktoru Xa a anti-faktoru II je větší než jedna v případě LMWHs. Tento poměr je dán molekulovou strukturou LMWH, ten je složen z 15 sacharidových jednotek na jeden řetězec. Není podmínkou, že všechny tyto řetězce se váží na faktor II (přepřacované dle Quader et al., 1998).

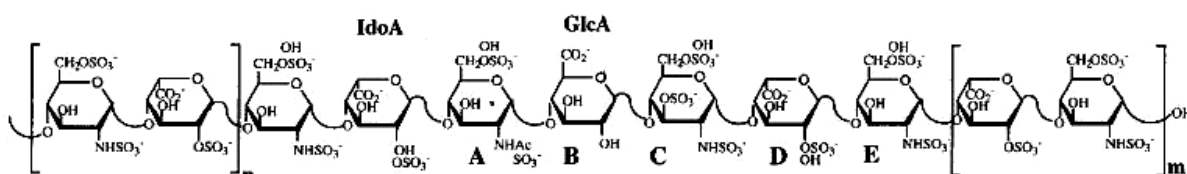
Tab. 4 Porovnání vlastností UFH a LMWH (přepřacované dle Quader et al., 1998).

Vlastnost	LMWH	UFH
Chemická struktura	Střídavé jednotky sulfátového glukosaminu a kyseliny glukuronové	Střídavé jednotky sulfátového glukosaminu a kyseliny glukuronové
Molekulová hmotnost	4 000 – 5 000 Da	5 000 – 30 000 Da
Poločas plazmy $t_{1/2}$	4 – 6 hod	1 – 2 hod
Metabolismus	Heparinasa v játrech	Heparinasa v játrech
Mechanismus účinku	Antifaktor Xa má vyšší aktivitu než antifaktor II	Antifaktor II má vyšší aktivitu než antifaktor Xa
Eliminace	Ledvinami, nezávislý na dávce	Ledvinami, závislý na dávce
Podání léku	Podkožní	Podkožní, intravenózní, perorální
Monitoring antikoagulace	Sérový antifaktor Xa	aPTT
Protijed	Protamin, není velmi účinný	Protamin
Dávka	Liší se v závislosti na indikaci profylaxe-50-100 jednotek v séru proti faktoru Xa kg/den Léčba - 200 jednotek v séru antifaktor Xa/kg/d	Profylaxe-5000 jednotek podkožně 2x nebo 3x/den Terapie-15-18 jednotek/kg /hod upravené tak, aby aPTT byl 1,5 až 2 krát kontrolován

3.2 Struktura heparinu

LMWH a od něj odvozené deriváty LMWHs jsou využívány ke studiu a pochopení molekulárně biochemických procesů v koagulační kaskádě. Izolace serin proteasového inhibitoru, antitrombinu III (AT) a charakterizace koagulačních faktorů trombinu a faktor Xa (inhibován AT), byly podstatné pro vývoj heparinu, který zabrání vytvoření fibrinové sraženiny. V koagulační kaskádě jeden faktor aktivuje další, dokud protrombin (faktor II) není převeden na trombin (faktor IIa) faktorem Xa. Tedy trombin je zodpovědný za přeměnu fibrinogenu na fibrinovou sraženinu (Fareed et al., 1998), (Rosenberg, 1997), (Rosenberg & Damus, 1973), (Lindahl et al., 1994).

Důsledkem studia těchto procesů je snaha o vytváření specifitějších terapeutik než samotný heparin, která by měla pomoci regulaci koagulace a snížení krvácivých komplikací spojených s léčbou hepariny. Frakcionace heparinu založená na velikosti i rozrušení vazeb chemicky a enzymaticky vedla k snížení jeho aktivity proti trombinu. Separace enzymatické aktivity heparinu vůči trombinu a faktoru Xa je výsledkem rozdílných vlastností jednotlivých molekulárních frakcí na inhibici. Faktor Xa přímo interaguje s AT v místě pentasacharidové sekvence heparinu. Vyžaduje přítomnost krátkých heparinových řetězců zahrnujících pouze ty sacharidové jednotky, které umožní jeho inaktivaci (Donayre, 1996).



Obr. 5 Chemická struktura farmaceutického heparinu: klastry trisulfátových disacharidů ($n + m = 16$, MW 12 000), disacharidy s disulfáty a vazebné místo AT (A, B, C, D, E), (přepřacované dle Linhardt&Gunay, 1999).

Stejně jako další přírodní polysacharidy, heparin tvoří polydisperzní směs obsahující velké množství řetězců o různých molekulových hmotnostech (Ashan et al., 1998), (Mulloy et al., 1997). Hlavní stavební složkou je opakující se disacharid se třemi sulfáty, ale i další disacharidní struktury (Linhart et al., 1988), (Loganathan et al., 1990), (Pervin et al., 1995). Právě tyto přídatné disacharidy určují finální strukturu heparinu. Vyznačují se i pentasacharidovým vazebným místem pro AT, které je důležité pro antikoagulační aktivitu léku. Heparinové glykosaminoglykany (GAGS) včetně heparinu a souvisejícího polysacharidu heparan sulfátu jsou syntetizovány stejnou drahou, přesto jsou jejich struktury odlišné. Oba dva slouží k výrobě

farmaceutického heparinu, avšak liší se jejich antikoagulační aktivita. Extrakční metody zajišťují antikoagulační aktivitu eliminací GAGS heparanu sulfátu (Griffin et al., 1995), (Yamada & Sugahara, 1998), (Salmivirta et al., 1996), (Gallagher & Walker, 1985).

Molekulová hmotnost heparinových řetězců je v rozmezí 5000 – 40 000. Sulfatované hepariny se skládají z pravidelně opakujících se trisulfátových disacharidů. U heparinů se středním stupněm sulfatace se vyskytují dlouhé segmenty sulfátových sekvencí zasahující do těchto domén. Jednou z těchto sekvencí je AT pentasacharidové vazebné místo, které nemusí být součástí každého heparinového polysacharidového řetězce. Hepariny s touto sekvencí označujeme jako vysokoafinitní (Linhardt & Gunay, 1999). Farmaceutický heparin obsahuje polydisperzní směs heparinových GAGS, GAGS heparanu sulfátu a malé množství dermatanu sulfátu (Linhardt et al., 1988), (Ahsan et al., 1995), (Neville et al., 1989).

3.3 Výroba heparinu

Léčivo se získává z různých tkání a druhů, které se liší strukturně. Nejvyužívanější tkání pro přípravu farmaceutického heparinu je prasečí střevo. Zpracovávají se i plíce skotu, ale ty mají vyšší stupeň sulfatace a molekulovou hmotnost. Ta je zodpovědná za zvýšenou afinitu k trombinu. Zásadním rozdílem mezi prasečím a hovězím heparinem je afinita AT vazebného místa. Rezidua A v AT sekvenci (Obr. 5), obsahují primárně N-acetylovou skupinu v případě prasečího a N-sulfo skupinu v případě hovězího (Loganathan et al., 1990). Složení jednotlivých disacharidů se může lišit druhově. Materiálem pro syntézu může být celé střevo, anebo střevní sliznice. Obsahem může být i kontaminující heparan sulfát, který může být přítomen ve finálním farmaceutickém produktu heparinu. Na konečném produktu se podílí i chov prasat, kde rozhodujícím faktorem je strava a podmínky, ve kterých prasata vyrůstají (Linhardt & Gunay, 1999).

Tab. 5 Složení heparinů z různých druhů a tkání (přepřacované dle Loganatham et al., 1990).

Průměrný počet v jednom heparinovém řetězci					
Druh	Tkáň	N-acetyl AT vazebné místo	N-sulfo AT vazebné místo	Trisulfátový disacharid	Disulfátový disacharid
vepřové	střevo	0.5 (0.3-0.7)	0.1	10 (10-15)	1.2 (1-2)2)
hovězí	plíce	0.3	0.3	14	1.0
hovězí	střevo	0.3	0.3	10	1.7
Ovčí	střevo	0.7	0.4	11	1.4
slepičí	střevo	0.3	0.2	6.7	1.7
Škeble	-	0.5	0.4	5.0	1.9

O produkci heparinu se dovídáme z vědeckých publikací a patentů. Postupy využívány soukromými sektory jsou tajné. Obecně, všechny syntézy heparinu zahrnují pět základních kroků:

1. Příprava tkáně. Tkáň se získává ze zvířat na jatkách, následně je zpracována. Celá střeva mohou být využita k zařídění vepřových vnitřností, anebo jako střeva zbavena endoteliální výstelky lumenu střeva. Extrakce surového heparinu se uskutečňuje v místě jatek. Účinnost lze zvýšit sběrem odpadu solného roztoku z vepřových střev (Vidic, 1981).
2. Heparin se oddělí od tkáně s použitím vyšších tlaků a teplot. Pokud se přidají proteasy, dojde k rozpuštění všech GAGS. Extrakce surového heparinu zahrnuje hydrolýzu v alkalickém pH proteolytickými enzymy. Natrávenou tkáň lze zfiltrovat, odstraní se tak velké molekuly, peptidy a nukleové kyseliny. Enzymy jsou v této fázi inaktivovány teplotou filtrátu po dobu 15 minut při 90°C (Okuyama et al., 1975), (Williams, 1967).
3. Anexová pryskyřice slouží k selektivnímu zachycení GAGS a heparinů podle hustoty náboje. Po kompletní adsorpci heparinu, se anexová pryskyřice promyje a dojde k její eluci. Koncentrát surového heparinu je zfiltrován, precipitován a vakuově vysušen (Williams, 1967).
4. Purifikace heparinu probíhá v čisté vodě. Hlavním cílem je odstranit všechny přebytečné nečistoty. Filtrace při nízkých hodnotách pH zbaví surový heparin

zbylých proteinů a oxidace v alkalickém pH podporuje dezinfekci. Následuje odbarvení a depyrogenace. Finálním krokem je katexová chromatografie, precipitace etanolem, která redukuje nukleotidy a inaktivuje přítomné viry. Přečištěný heparin je precipitován a ve vakuu vysušen. Druhou možností je rozpuštění v čisté vodě, následována filtrací a lyofilizací (Linhardt&Gunay, 1999).

5. Farmakologicky čistý heparin a jeho využití v medicíně.

3.4 Antitrombotická léčba

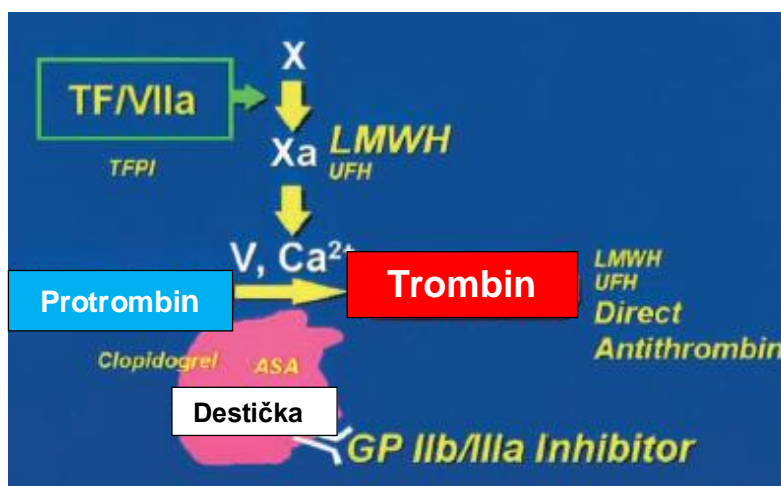
Antitrombotická léčba spočívá v prevenci vzniku krevního srážení za fyziologických poměrů. Obecně brání vytvoření nadbytku trombinu, aniž by došlo k snížení hemokoagulačního potenciálu provázaného prodloužením koagulačních časů (Penka et al., 2001).

3.4.1 Nefrakcionovaný heparin UFH

Užívání UFH má řadu nevýhod. Během léčby je nutný monitoring aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT), citlivost k destičkovému faktoru 4 (PF4), výskyt trombocytopenie s rozvojem heparinem indukované trombocytopenie s trombózou nebo bez ní (Fareed et al., 2000). Cílem UFH je inhibovat koagulační kaskádu ve směru od trombinu. Na trombin působí jako katalytický inhibitor se schopností disociace z komplexu antitrombin/trombin. Tato schopnost umožňuje jedné molekule UFH katalyzovat více molekul trombinu se současným snížením tvorby a aktivity nového trombinu (Elliott&Antmann, 2001), (Weitz et al., 1990). Léčebná strategie UFH vychází z vyšších dávek podávaných formou kontinuální intravenózní infuze, s cílem prodloužit aPTT až 1-1,5-2. Takto nastavenou léčbu lze provádět krátkodobě nebo dlouhodobě s pravidelnou kontrolou hematokritu a počtu krevních destiček (Penka et al., 2001). Hlavním omezením heparinu je neschopnost vazby na kladně nabitě proteiny a povrchy. To je způsobeno AT – nezávislou vazbou heparinu na proteiny plazmy, proteiny uvolněné krevními destičkami a endoteliálními buňkami. Výsledkem je různá antikoagulační odpověď a heparinová rezistence. Zároveň, nemá schopnost inaktivace faktoru Xa v protrombinásovém komplexu nebo v komplexu trombin vázající fibrin. Snášlivost léku se liší u pacientů v závislosti na druhu trombotického onemocnění. Dávkování je upravováno po změření aPTT a změny dávek se upravují na základě aktivovaného srážecího času (ACT). Hodnoty aPTT

závisí na dodávaných reagentiích z důvodů odlišných reakcí na heparin. Měření probíhá po 6 hodinách po obdržení bolusu dávky heparinu. Kontinuální intravenózní dávkování (IV) je následně upraveno podle dosažených výsledků. Dávka se automaticky snižuje se současným užíváním fibrinolytických léků a IV destičkových glykoproteinových receptorů IIb/IIIa (Hirsh et al., 2001).

Během terapie UFH může nastat klinicky závažný krvácivý stav. Účinek UFH je antagonizován IV bolusem protaminu. Protamin je protein získaný z rybích spermií a je schopen vazby na heparin za tvorby stabilní soli. Přibližně 1 mg protaminu neutralizuje 100 U UFH. Poločas doby působení UFH je okolo 60 minut. Pokud je pacientovi nefrakcionovaný heparin podáván subkutánní injekcí, potřebný čas protaminu na neutralizaci je mnohem delší než v případě IV. Kontrolou účinné terapie je aPTT(Hirsh&Raschle, 2004).



Obr. 6 Velikost písma znázorňuje účinky jednotlivých látek. UFH podobně působí na trombin i faktor Xa. Nízkomolekulární heparin má mnohem větší inhibiční účinek, proti faktoru Xa než u samotného trombinu. Látky přímo působící na trombin málo ovlivňují jeho generaci, ale podílí se na jeho účinné inhibici. Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI) a látky jemu příbuzné se v koagulační kaskádě podílejí na inhibici tvorby faktoru Xa a trombinu. V kombinaci s antitrombiny a inhibitory agregace krevních destiček se snižuje tvorba trombů (přepřacované dle Altman, 2012).

3.4.2 Nízkomolekulární heparin LMWH

S užíváním heparinu jsou spojeny poruchy krvácivosti. Omezení spočívá v biofyzikálních a farmakokinetických vlastnostech, ve schopnosti aktivovat imunní odpověď krevních destiček a ovlivnění kostního metabolismu vedoucího k osteoporóze. Naopak za nekrvácivé stavy je zodpovědná AT- nezávislá vazba

heparinu (Young et al., 1994). Všechny tyto nedostatky byly postupně odbourávány u nízkomolekulárních heparinů. Antikoagulační účinek heparinu je regulován trombocyty, fibrinem, vaskulárními povrchy a proteiny plazmy. Krevní destičky ovlivňují účinek heparinu sekrecí PF4 a heparinem neutralizujících proteinů. Také se podílejí na ochraně faktoru Xa inhibovaného heparin/AT komplexem. Fibrinová aktivita je založena na ochraně trombinu vazbou na jeho povrch. Heparin se váže na fibrin a vytváří můstky mezi fibrinem a heparinem vazebnými místy pro trombin. Výsledkem interakce je, že se zvyšuje afinita trombinu k fibrinu. Vazba heparinu na trombin chrání navázaný trombin na fibrinu před inhibicí komplexu heparin/AT. Trombin má také schopnost vazby na proteiny subendoteliálního matrixu a být tak chráněn před inhibicí (Hirsch & Raszschke, 2004).

Efekt LMWH na aPTT je mnohem nižší než u UFH, díky redukované molekulové hmotnosti. Měření odráží aktivitu anti-faktoru IIa. S redukcí molekulové hmotnosti nevymizela inhibice aktivovaného faktoru Xa. Odstranění účinku anti-faktoru Xa na aktivitu trombinu (IIa) bylo popsáno již v roce 1976. Na tomto principu byl popsán biofyzikální model antikoagulačního efektu heparinu (Harenberg, 1990), (Johnson&Mulloy, 1976), (Briant et al., 1989).

Pacientům může být LMWH podáván intravenózně nebo subkutánní injekcí (SC). SC heparinu dosahuje nejvyššího píku anti-faktoru Xa v rozmezí 3 – 5 hodin od jeho podání (Handeland et al., 1990). Poločas působení heparinu je mnohem delší a nezávislý na dávce než tomu je u UFH. Eliminace léku probíhá v ledvinách. Delší odbourávání probíhá u pacientů s renálním selháním (Boneu et al., 1988), (Palm&Mattsson, 1985).

Intoxikace heparinem se neléčí protaminem. Interakce protaminu s heparinem je ovlivněna molekulovou hmotností heparinu. Příčinou malého snížení aktivity anti-faktoru Xa je způsobeno redukovanou vazbou protaminu na LMWH. Syntetický protamin má vysoký podíl na neutralizaci antikoagulačního efektu LMWH, včetně anti-faktoru Xa, a jeví se mnohem méně toxický než samotný protamin (Hirsch&Raschke, 2004).

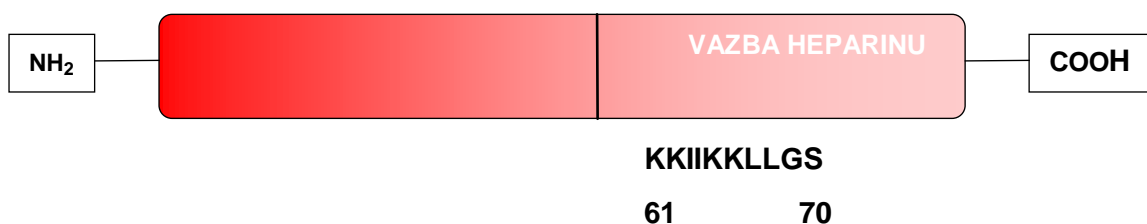
3.4.2.1 Interakce heparin – krevní destička

Léčba heparinem je často doprovázena sníženým počtem krevních destiček a zvýšením jejich markerů. U nefrakcionovaného heparinu je tento efekt mnohem větší než v případě nízkomolekulárního heparinu. Účinek léku a vliv na krevní destičky se rozděluje na neimunní (I.typ) a imunní (II.typ), neboli heparinem indukovaná trombocytopenie. V současné době se mnohem více diagnostikuje II.typ z důvodu

dostupných vyšetřovacích metod. Interakce heparinu s krevní destičkou je zprostředkována glykosaminoglykanem a PF4 (Greinacher, 2011).

GAGs jsou syntetizovány jako proteoglykany s polysacharidními řetězci kovalentně vázané na proteiny. Jedná se o lineární polymery, které jsou v různých místech sulfatovány. GAGs se vyskytují na povrchu buněk a poskytují mechanickou podporu. Zároveň indukují aktivitu enzymových systémů, imobilizují extracelulární enzymy a růstové faktory. Také se podílejí se na ovlivnění dynamických procesů, jako jsou buněčné adheze, proliferace a migrace. Peptidová doména GAGs obsahuje bazické aminokyseliny. Antikoagulační účinek GAGs je zprostředkován přes heparin - AT pentasacharidovou sekvenci. AT pentasacharidová sekvence je součástí GAGs a podílí se na interakci s proteiny (Maccarana&Lindahl, 1993).

Destičkový faktor 4 je lokalizován na chromozomu 4. PF4 je syntetizován ve zrajícím megakaryocytu a poté je zabalen do destičkových alfa-granulí. Zralý PF4 je složen ze 70 aminokyselin se 4 cysteinovými rezidui na konci. Vazebné místo pro heparin se nachází na C konci PF4. (Eisman et al., 1990). PF4 je homotetramer a funkčně se podílí na neutralizaci antikoagulačního heparinu přítomného v plazmě. PF4 je uvolňován aktivovanými destičkami a ihned se váže na polyanionty heparinu. Vzniklý komplex heparinu/PF4 vyvolává imunní odpověď na přítomnost léku. Reakce je způsobena přítomností patogenních protilátek, které se váží na komplex. Imunní komplex indukuje FcR zprostředkovanou destičkovou aktivaci se zesílenou generací trombinu. U některých pacientů může tento jev vyvolat trombocytopenii nebo trombózu (Greinacher et al., 2011).



Obr. 7 Struktura PF4. C-konec bohatý na lysin je vazebným místem pro heparin (Přepřacované dle http://www.haemtech.com/Platelet_Proteins/PF4.htm)

4 HEPARINEM INDUKOVANÁ TROMBOCYTOPENIE

Syndrom heparinem indukované trombocytopenie byl poprvé popsán v roce 1969. Heparinem indukovaná trombocytopenie – HIT je klinicky patologický syndrom, který je vyvolán účinkem heparinu mezi 5 – 10 dnem od začátku podávání. S trombocytopenií souvisí pokles počtu krevních destiček o 50% (Kelton&Warkentin, 2008). Ve vzácných případech může dojít k navození HIT i po ukončení léčby heparinem. HIT se nejčastěji vyskytuje u pacientů po ortopedických a kardiologických zákrocích. Incidence HIT je 1-5% u pacientů léčených UFH, v případě LMWH je nižší (Kroupis et al., 2009).

Klinicky rozlišujeme 2 typy HIT:

1. HIT vzniká jako imunní odpověď na podávání heparinu. Pokles krevních destiček nastává ihned druhý den od začátku léčby. Snížení není natolik výrazné (10-30%) a není doprovázen klinickým projevem trombózy (Králová et al., 2006).
2. HIT je charakterizován poklesem krevních destiček o 50% a současně doprovázen hyperkoagulačním stavem. Ten je zodpovědný za zvýšenou nemocnost a úmrtnost. S HIT II.typu souvisí venózní a arteriální trombózy (Warkentin et al., 1995).

4.1 Patofyziologie HIT

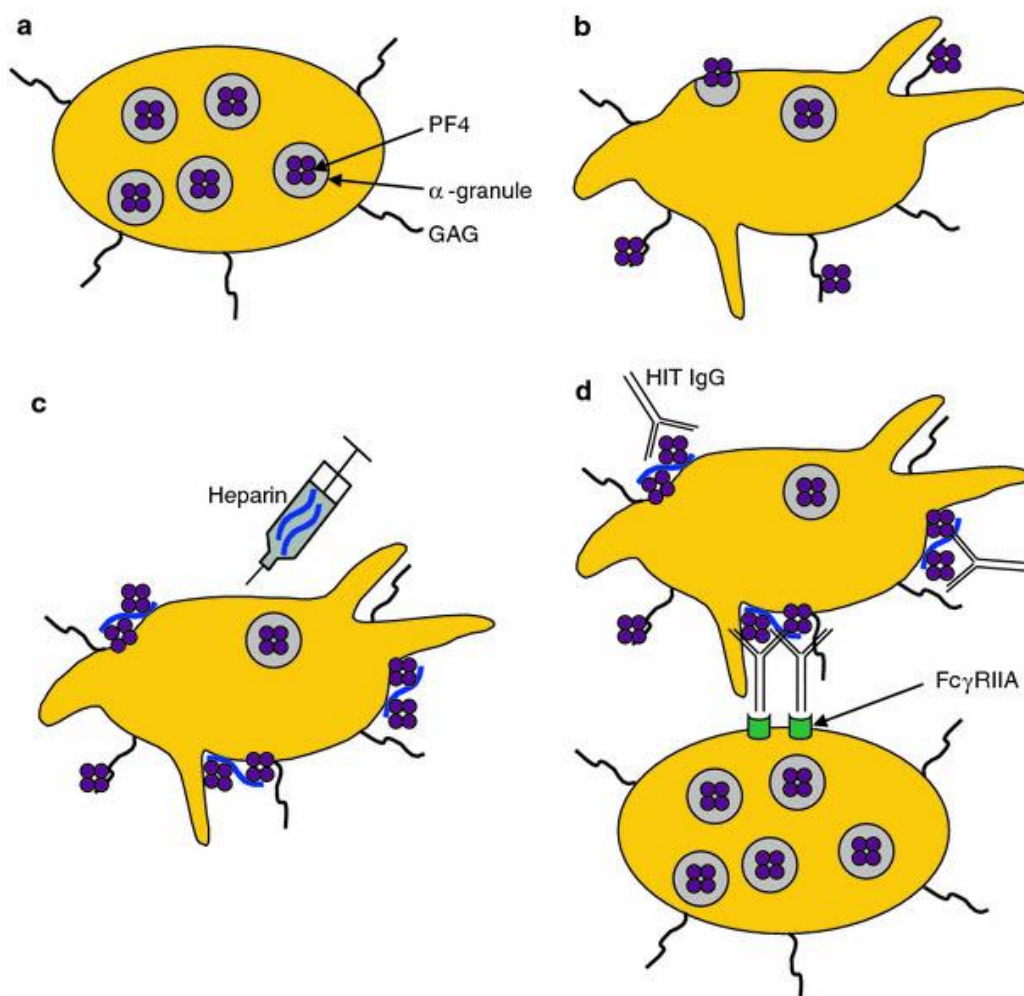
HIT je závažné protrombotické onemocnění způsobené vznikem heparinem indukovaných protilátek. Nejčastěji se jedná o třídy protilátek IgG, IgM a IgA. Protilátky vyvolávají agregaci krevních destiček a to vazbou na komplex PF4 a heparinu, kdy záporně nabitě molekuly LMWH a UFH vykazují vysokou afinitu k PF4. Vazba heparinu na PF4 pak způsobí změnu v konformaci antigenních neoepitopů a generaci protilátek (Warkentin, 2005), (Kroupis et al., 2009), (Arepally&Ortel, 2006). Protilátky se v organismu tvoří po vystavení pacienta účinku heparinu jako odpověď na přítomnost komplexu tvořeného PF4, chemokiny uvolněných z α -granulí destiček a heparinu. Cílem antigenu (heparinu) jsou epitopy na PF4 odkrývající se imunitním systémem až po konformační změně molekuly vyvolanou podaným heparinem. Jakmile se molekuly

protilátek naváží na komplexy PF4/heparinu vyskytujících se na povrchu krevních destiček, dochází k aktivaci destičkového receptoru FcγRIIA přes Fc fragment protilátky. Nejvyšší podíl na patogenezi HIT mají protilátky třídy IgG. Vazba Fc fragmentu protilátky IgG na nízko afinitní receptor krevní destičky FcγRIIa vede k aktivaci signální dráhy a destičkové agregaci. Tato aktivace způsobí rychlou destrukci krevních destiček-trombocytopenii, uvolnění mikročástic a PF4 přes intracelulární tyrosin kinasovou signální dráhu, poškození endotelu a ve finále trombózu (Chong, 2003), (Cuker, 2011).

Klíčovou roli v patogenezi HIT hrají krevní destičky, monocyty a buňky endotelu. Imunní komplexy PF4/heparin aktivují endoteliální buňky. Jejich aktivace výrazně ovlivňuje komunikaci v případě adhezi buněk, ale také lepší zpracování protrombotických molekul jako jsou E-selektin nebo vWF. Tetramery PF4 vykazují vysokou afinitu k molekulám GAGs na povrchu monocytů a významně se podílejí na vytváření antigenních komplexů účastnících se na formování trombu (Cuker, 2011).

S patofyziologií aktivace destiček při HIT souvisí jejich pokles, který nastává až u 70 % pacientů díky vychytávání aktivovaných destiček slezinou. Pokles je zaznamenáván v průběhu 5 - 14 dnů od zahájení léčby heparinem. U pacientů léčených heparinem v předešlých 100 dnech může docházet k nástupu HIT do 24 hodin. Tato progresse je způsobena přítomností protilátek proti komplexu PF4/heparinu, které se vytvořily během první léčby heparinem. K tomuto jevu dochází u 25 až 30% případů HIT (Warkentin&Kelton, 2001). Po ukončené léčbě heparinem nastává k opožděné nežádoucí odpovědi na lék u 5 % pacientů. Tato forma je spojována s výskytem protilátek proti komplexu anti-PF4/heparin a symptomy periferní trombózy (Warkentin&Kelton, 2001).

Trombocytopenii u všech typů HIT lze vyřešit přerušением léčby heparinu. U 50 % pacientů se počet jejich trombocytů normalizuje k původní hodnotě $150 \cdot 10^9/l$ během 4 dnů a nejpozději do 7 dnů u 90 % (Battistelli et al., 2010).

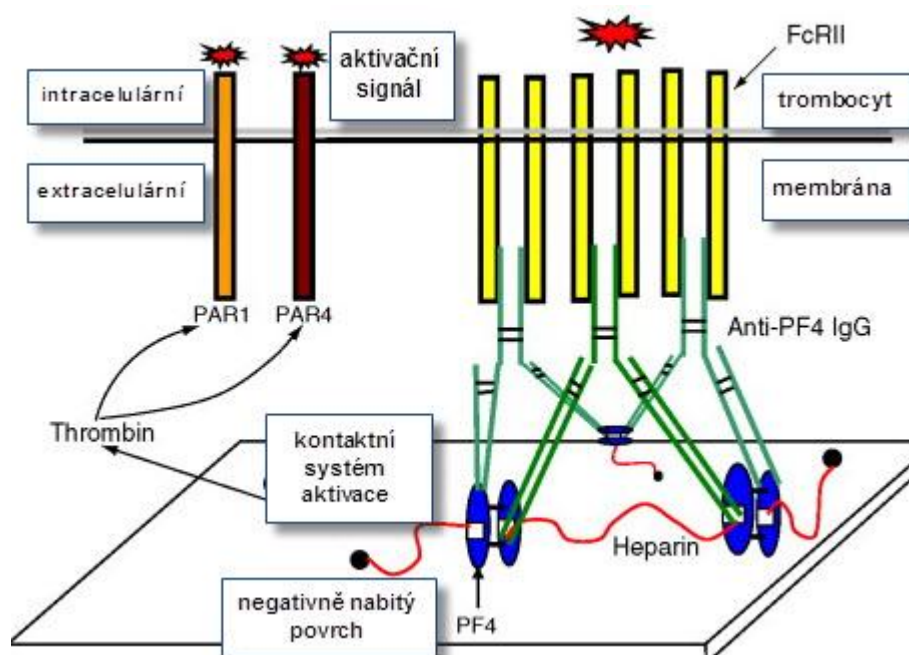


Obr. 8 Patofyziologie HIT. Krevní destička obsahuje PF4 ve svých α-granulích (a). Destičková aktivace způsobuje uvolnění PF4 a současně i vazbu na negativně nabitě GAGs přítomné na destičkovém povrchu (b). Podávaný heparin vytěsňuje přítomné GAGs molekuly a tvoří se imunní komplex složený z heparinu a tetrameru PF4 (c). PF4 prochází konformační změnou vedoucí k vystavení epitopu, na který se váže Fab fragment protilátky IgG vyvolávající HIT. Fc fragment protilátky zprostředkovává aktivaci destičkového receptoru FcγRIIA na stejné destičce či přilehlé. Paralelně dochází k uvolnění PF4, formaci imunního komplexu a aktivaci přilehlých krevních destiček (d), (přepřacované dle Cuker, 2011).

4.1.1 Molekulární podstata HIT

Fcγ receptor, který je exprimován krevní destičkou, je důležitý pro zprostředkování odpovědi humorální a buněčné imunity. Interakce je umožněna protilátkami a efektorovými buňkami. FcγRIIA je nízko afinitní receptor schopný vazby protilátek třídy IgG a jejich podtříd IgG1, IgG2 a IgG3 (Raghavan&Bjorkman, 1996), (Rascu et al., 1997). Gen FCGR2A se nachází v lokusu 1q23 1 chromozomu a je organizován do 7 exonů. Polymorfismus ve 4 exonech vede k jednonukleotidové záměně (single-nucleotide polymorphism, SNP). Výsledkem SNP je změna v sekvenci

kodonu CGT kódující aminokyselinu arginin za kodon CAT kódující aminokyselinu histidin v pozici 131. Záměna aminokyselinové sekvence v extracelulární doméně blízko nebo ve vazebné oblasti pro IgG protilátky způsobuje patogenezi HIT a progresy různých autoimunitních onemocnění (Kroupis et al, 2009). Receptorové varianty FcγRIIa-Arg¹³¹ a FcγRIIa-His¹³¹ váží protilátky podtřídy IgG1 a IgG3. His¹³¹ má vyšší afinitu k IgG3, ale vyznačuje se schopností vazby na protilátky IgG2. Zvýšená afinita receptoru FcγRIIa-His¹³¹ na lidské protilátky podtypu IgG2 je zodpovědná a přispívá k rozvoji HIT. Na rozvoji HIT se podílí faktory genetické i imunní (Rascu et al., 1997), (Warmerdam et al., 1991), (Vitale et al., 2001).



Obr. 9 Schéma znázorňuje heparin a IgG protilátku dependentní destičkovou aktivaci. Aktivace krevních destiček probíhá ve dvou fázích. 1) Heparin, PF4 a autoprotiátky IgG tvoří velký komplex v krevní plazmě. Komplex poskytuje negativně nabitý povrch, který indukuje tvorbu trombinu přes kontaktní systém. Trombin se váže na proteasový aktivovaný receptor 1 a/nebo 4 (PAR1 a PAR4), díky němuž aktivuje krevní destičky. 2) Částečně aktivované krevní destičky váží Fcγ receptory na Fc doménu IgG v komplexu IgG-PF4-heparin. Vazba mezi Fc fragmentem a Fcγ receptorem zahajuje destičkovou aktivaci, agregaci a krevní koagulaci (přepřacované dle Qian et al., 2010).

4.1.2 Klinická pravděpodobnost výskytu HIT (4T-skóre)

Klinická diagnóza HIT je velmi obtížná, protože trombocytopenie může být způsobena i jinými příčinami. Pro správné stanovení HIT je důležité vnímat i

přidružené faktory, které s tím mohou souviset. Správným přístupem analýzy HIT je detekce patogenních krevních destiček, které jsou schopné aktivace komplexu anti-PF4/heparin/IgG protilátky v pacientově krevním séru nebo plazmě (Keeling et al., 2006), (Napolitano et al., 2006), (Warkentin&Sheppard, 2006), (Warkentin, 2005). Manifestaci HIT u pacientů lze určit z Warkentinova 4T-skóre. 4T-skóre uspořádané v tabulce umožňuje rozdělení pacientů do skupin s nízkým, středním a vysokým rizikem. Toto rozdělení poskytuje pravděpodobnostní odhad HIT před samotnou laboratorní analýzou (Denys et al., 2008).

Tab. 6 Přehledné zobrazení Warkentinova 4T-skóre.

Skóre	2	1	0
Trombocytopenie	Pokles trombocytů o více než 50%, minimum $20 \cdot 10^9/l$	Pokles trombocytů o 30-50%, minimum $10-20 \cdot 10^9/l$	Pokles trombocytů o méně než 30%, minimum $10 \cdot 10^9/l$
Timing podání heparinu (pokles krevních destiček, trombóza a jiné následky)	5-10 dnů nebo ≤ 1 den vystavení heparinu v předešlých 15-30 dnů	>10 dnů nebo nezjistitelné	do 4. dne, bez nedávného vystavení heparinu
Trombóza	Nová trombóza, nekróza kůže v místě injekce, akutní systémová reakce po IV heparinu	Progresivní nebo recidivující trombóza, zarudlá kožní léze (v místě vpichu) nebo podezření na dosud neprokázanou trombózu	není
"Other" příčiny trombocytopenie	Není jiná příčina	možná	Jasná jiná příčina

. V levém sloupci najdeme 4T a jejich charakteristiky. Na základě těchto charakteristik se přisuzují body 0,1 a 2. Po sečtení všech bodů rozlišujeme pravděpodobnostní skóre rozvoje HIT: 6-8 = vysoké riziko, 4-5 = střední riziko, 0-3 = nízké riziko (přepřacované dle Denys et al., 2008).

4.2 Metody vyšetření HIT

Průkaz HIT II typu představuje složitou problematiku, kdy je třeba kombinovat klinické a laboratorní data. Vyšetření HIT II laboratorními testy nemusí být vymožeností každé hematologické laboratoře a současně negativita těchto vyšetření nevylučuje klinickou diagnózu HIT II *in vivo* (Novotný & Konvičková, 1998).

4.2.1 Sérologické testy

Princip sérologických testů spočívá v interakci protilátky a cílového antigenu, které spolu vytvoří komplex. V případě ELISA testu se jedná o komplex PF4 a heparinu. Dalším typem sérologického vyšetření jsou gelové testy. Jejich stanovení spočívá v reakci polystyrénových částic potažených komplexem rekombinantního PF4/heparinu nebo polyvinylsulfonátu s HIT protilátkami. Obecně platí, že sérologické testy disponují nejvyšší senzitivitou a nejnižší specifitou. (Albeiro et al., 2003), (Meyer et al., 1999).

4.2.2 Funkční testy

Funkční testy detekují HIT protilátky v pacientově krevním séru nebo krevní plazmě s využitím dárcovských krevních destiček. PF4 dárcovských destiček v přítomnosti heparinu tvoří komplex, který reprezentuje antigen HIT. Imunitní komplex heparin/PF4 se stává cílem HIT protilátek a dochází k aktivaci krevních destiček (Albeiro et al., 2003). Přítomnost HIT protilátek může být stanovena dalšími možnými metodami.

4.2.2.1 Serotonin uvolňovací test - SRA

Zlatým standardem funkčních testů je serotonin uvolňovací test. Princip metody spočívá v inkubaci krevních destiček s radioaktivně značeným ¹⁴C serotoninem a heparinu. Přítomnost HIT protilátek způsobuje aktivaci krevních destiček nesoucí Fcγ receptor a následkem je uvolnění radioaktivně značeného serotoninu. Pozitivita testu je definována jako 20% nebo vyšší uvolňování radioaktivního izotopu z krevních destiček, které byly aktivovány pomocí dvou hladin heparinu, nízké (0,1 U/ml) a vysoké (100U/ml), (Andersson et al., 1979). Pozitivním výsledkem v případě HIT, je aktivace krevních destiček při nízké koncentraci heparinu – 0,1 U/ml. Pokud dochází k aktivaci krevních destiček v přítomnosti nízké a vysoké koncentraci heparinu, tak cíl není

antigenem pouze pro heparin/PF4. Důvodem mohou být modifikované imunitní komplexy nebo protilátky namířené proti destičkovým receptorům. Vyšetření HIT tímto testem se vyznačuje vysokou citlivostí a senzitivitou, které se staly předlohou pro vývoj nových metod ke stanovení HIT.

Modifikací SRA testu je heparinem indukovaná aktivace destiček (HIPA). Metoda je založena na vizuální kontrole shlukování aktivovaných krevních destiček v průběhu času. Vyhodnocení se provádí na mikrotitračních destičkách a výsledek se odečítá proti černému pozadí (Králová et al., 2006). V posledních letech vyšlo několik studií, které popisují možné přístupy detekce protilátek v případě HIT II. Jedním z těchto přístupů může být detekce uvolněného ATP z krevních destiček v případě agregometrie a lumiagregometrie. Obě metody využívají reaktivní a promyté dárcovské trombocyty. Druhou možností je detekce aktivovaných krevních destiček HIT protilátkami pomocí cytoflowmetrie (Stewart et al., 1995), (Tomer et al., 1999).

4.2.2.2 Optická agregometrie - LTA

Optická agregometrie se řadí do skupiny agregačních testů, které vznikly na základě SRA. Metoda spočívá v měření změn optické propustnosti vzorku. Ta závisí na tvorbě shluků krevních destiček senzibilizovaných krevní plazmou obsahující protilátky proti PF4 a v přítomnosti heparinu o definované koncentraci - 0,1 IU/ml. K analýze se využívá dárcovská plazma bohatá na destičky, která se získá centrifugací při 1000g. Pro optickou agregometrii a vícenásobný elektrodový test (MEA), který je dalším možným přístupem vyšetření HIT platí, že jejich provedení je snadné, není zde manipulace s radioaktivním materiálem, rychlá dostupnost a nízká senzitivita. Literární zdroje uvádí, že MEA má potenciál senzitivitu zvyšovat.

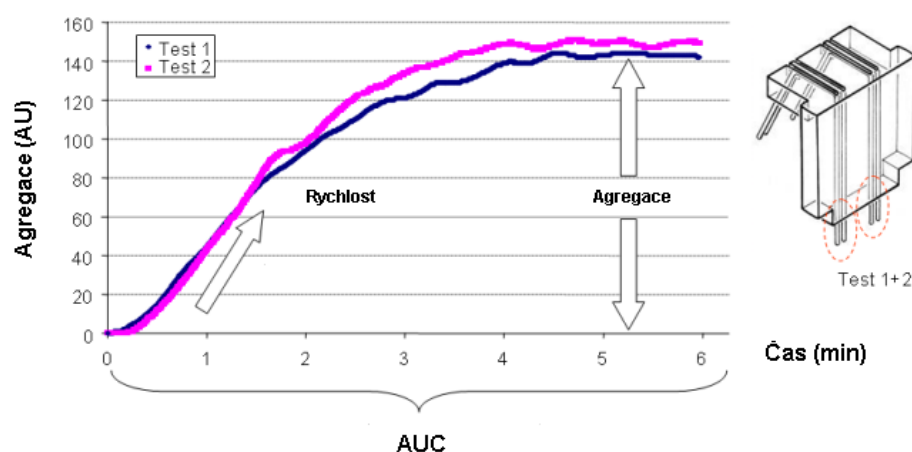
4.2.2.3 Vícenásobná elektrodová agregometrie - MEA

Metoda slouží ke komplexnímu vyšetření funkce krevních destiček v plně nesrážlivé krvi. K vyšetření je využit přístroj Multiplate analyzátor ve spojení s elektronovou interaktivní pipetou. Princip impedanční agregometrie byl již popsán na počátku 80. let minulého století pány Cardinal a Flower. Metoda disponuje vysokou spolehlivostí, kterou zajišťují dvojice nezávislých sensorů v testovací kyvetě. Součástí každé testovací kyvety je magnetické míchadlo a samotný senzor kyvety je složen ze dvou vodivých měděných drátků potažených stříbrem. Přístroj pracuje se softwarem Windows XP a samotná analýza je plně automatizována s vlastní dokumentací. Po ukončení každé analýzy je důležité vyhodnotit výsledky. Výsledkem je křivka

zobrazující závislost agregace destiček vyjádřenou v agregčních jednotkách (AU), na čase v minutách (Pecka et al., 2010).

Mezi vyhodnocované parametry patří:

- Plocha pod křivkou
- Maximální amplituda agregace
- Maximální sklon agregace



Obr. 10. Vyhodnocení metody MEA. Závislost agregace krevních destiček (AU) na čase (min). Obrázek zobrazuje základní parametry: plocha pod křivkou (AUC), maximální sklon agregace a maximální amplituda agregace (přepřacované dle <http://www.multiplate.net/en/parameter.php>).

Pro správnou analýzu je důležité zpracovat biologický materiál do tří hodin od samotného odběru a uchovávat jej při laboratorní teplotě (Pecka et al., 2010).

Metoda MEA detekuje dárcovské trombocyty, které jsou senzibilizovány protilátkami proti destičkovému faktoru 4. Takto aktivované trombocyty mění svůj tvar za vzniku filopodií, které mají větší náboj na povrchu buňky. Aktivované trombocyty jsou vychytávány párem elektrod a dochází ke zvětšení odporu mezi dvojicí elektrod (Pecka et al., 2010). Analyzátor umožňuje změřit 5 pacientů současně, anebo jednoho pacienta pětkrát. Destičková agregace je nejprve indukována nižší koncentrací heparinu o 2 IU/ml. Pokud je pacient pozitivní následuje měření, ale už při vyšší koncentraci heparinu. Vyšší koncentrace heparinu by měla vyvolat inhibici komplexu

protilátky/heparin/PF4. Výhodou metody MEA je mnohem rychlejší agregace než v případě LTA, ke které dochází až s delší časovou prodlevou (Kopp et al., 2010).



Obr. 11 Multiplate® analyzer (přepřacované podle <http://multiplate.net/en/leftinstrument.php>)

Pro správnou diagnostiku HIT II je vhodné využít kombinaci testů ELISA, agregace a SRA. Spojení těchto testů zvyšuje senzitivitu až na 83% (Walenga et al., 1999).

Tab. 7 Přehledné srovnání metod, které slouží ke správné diagnostice HIT.

Typ testu	Specifita	Senzitivita	Použitelnost
Sérologické testy			
ELISA	Nízká	Vysoká	Dostupné, časově náročné
Funkční testy			
SRA	Vysoká	Vysoká	Finančně, časově a personálně náročné
HIPA	Vysoká	Velmi nízká	Dostupné, časově náročné
Lumiagregometrie	Vysoká	Vysoká	Finančně i časově náročné
Flowcytometrie	Vysoká	Vysoká	Finančně i časově náročné
LTA	Vysoká	Nízká	Snadno proveditelné
MEA	Vysoká	Vysoká	Snadno proveditelné
PCR			
real-time PCR	Vysoká	Vysoká	Snadno proveditelné, rychlé a spolehlivá detekce

4.2.3 Mikroskopické hodnocení agregace krevních destiček

Heparinem indukovanou trombocytopenii lze identifikovat také na základě pozorování krevních nátěrů pod světelným mikroskopem. Fyziologicky se krevní destičky vyskytují v periferní krvi jako samostatné krevní buňky vykonávající funkce adheze, agregace a změnu diskoidního tvaru u vzniklého poranění. V případě patologií můžeme pozorovat shluky krevních destiček vyvolané heparinem indukovanou trombocytopenií, ale i jinými příčinami. Přístup je vhodný pro pacienty s komplexně aktivovanými trombocyty, kteří mají akutní klinické projevy- trombózu.

4.2.4 Detekce polymorfismu receptorů krevních destiček

Klinická diagnostika pro stanovení bodových mutací, delecí nebo chromozomových aberací se opírá o metody molekulární biologie. Jednou z nich je real-time PCR. Real-time PCR kvantifikuje amplikon v reálném čase prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním zařízení. Přístroje, ve kterých probíhá cyklické střídání teplot, detekce fluorescence v každém cyklu PCR reakce nazýváme cyclery. Výhodou oproti konvenční PCR reakci je, že není nutná detekce PCR produktů elektroforézou. Real-time PCR může probíhat v různém uspořádání. Pro stanovení bodových mutací v případě HIT se jeví nejlepším přístupem asymetrické uspořádání s využitím hybridizačních sond vázajících se na konkrétní místo komplementárně. Tato modifikace se od standardní PCR reakce liší tím, že výchozí koncentrace primerů se řídí faktorem 100. To znamená, že koncentrace jednoho primeru je 100x vyšší než koncentrace druhého primeru. Dvouvláknová DNA je syntetizována do okamžiku, dokud se jeden z primerů zcela nevyčerpá. Metoda real-time vyžaduje i optimalizaci kinetiky reakce. Produkty v průběhu PCR reakce lze kvantitativně detekovat 3 možnými způsoby:

- Interkalační barvivo schopné vazby na DNA
- Fluorescenčně značená sonda vázající se na střední část amplikonu
- Fluorescenčně značený primer (Šmarda et al., 2005)

Hybridizační sondy se vyznačují vysokým stupněm specifity, jelikož se váží na cílovou sekvenci uvnitř amplikonu. Alelové rozlišení příslušných aminokyselin se provádí analýzou křivek tání po ukončení cyklu PCR reakce (Kroupis et al., 2009)

4.2.4.1 Analýza křivek tání

Analýza křivek tání slouží k identifikaci DNA produktů a genotypizaci. Při zahřátí vzorku DNA se může teplota tání měnit v širokém rozsahu teplot. Teplotu tání ovlivňuje sekvence, délka vlákna a obsah GC bazí. Nesprávné párování bazí mezi dvěma vlákny DNA vede ke snížení T_m . Tento jev je charakteristický pro krátké DNA hybridy a je základem pro genotypizační analýzu. Próby navazující se komplementárně na molekulu DNA tají při vyšší T_m než u prób nekomplementárních. Příčinou jsou jednobodové mutace. Teplota tání je definována jako bod, při kterém polovina molekul DNA taje nebo polovina prób disociuje z molekuly DNA. Program tání probíhá až po ukončení amplifikace cílové molekuly DNA.

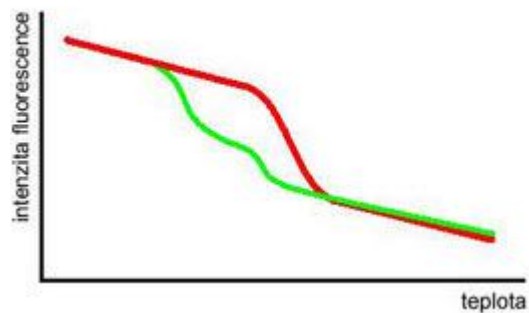
Analýza křivky tání zahrnuje tři základní kroky:

- molekuly DNA se rychle zahřejí na teplotu, která způsobí denaturaci všech molekul DNA
- molekuly DNA se ochladí na teplotu nižší než je hodnota teploty annealingu cílové DNA
- molekuly DNA se pomalu zahřívají a současně dochází k měření fluorescence

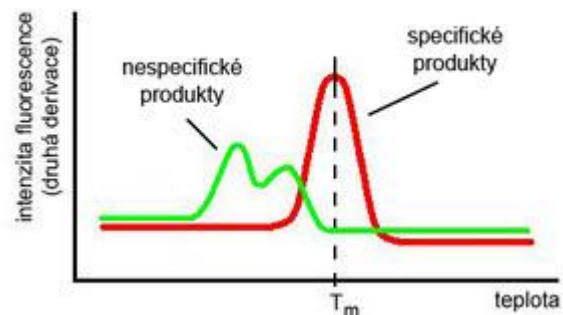
Cílem analýzy křivky tání je monitorování snižující se fluorescence, zatímco teplota se stále zvyšuje a molekula DNA „taje“, což znamená, že se mění dvouvláknová struktura na jednovláknovou. Důvody snižující se fluorescence se liší v závislosti na využití rozdílného detekčního systému.

V případě hybridizačních sond se jedná o separaci cílové próby, která je výsledkem prostorové separace fluorescenčně rezonančního transferu energie (FRET) mezi dvěma barevnými fluorofory. Pokles fluorescence reportérové barvy nastává při určité teplotě. Teplota tání je v tomto případě definována jako bod, ve kterém polovina hybridizačních prób se uvolní z jejich cílové DNA sekvence (přepřacované dle manuálu k instrumentu LightCycler®480 Operator's manual, Software verze 1.2, www.roche-applied-science.com).

A: KŘIVKA TÁNÍ



B: DERIVACE KŘIVKY TÁNÍ



Obr. 12 Křivka tání DNA. Specifické produkty lze odlišit od nesespecifických produktů na základě T_m , která u nekomplementárního párování je většinou nižší (přepřacované dle <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Přístrojové vybavení

- Multiplate[®] analyzer (Dynabyte, Mnichov, Německo)
- LightCycler 480 instrument[™] (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- Centrifuga MEGAFUGE 1.0 R (Heraeus)
- Centrifuga BIOFUGE 22R (Heraeus)
- Centrifuga Z 323 K (Hermle)
- Stolní centrifuga 5424 (Eppendorf)
- Stolní mikrocentrifuga Spectrafuge Mini (Labnet International, Inc.)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- automatické pipety (Eppendorf AG, Hamburk, Německo)
- Pasteurovy pipety 3 ml (East Port)
- zkumavky (Sarstedt)
- destičky LightCycler[®] 480 Multiwell Plate (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- laboratorní plast a sklo
- ledničky (4–8 °C) a mrazicí boxy (-20 °C, -80 °C)
- vortex REAX Control (Heidolph)
- biologický termostat BT 120 (LAB systém)
- Mikroskop BX 51 Olympus (Japonsko)

5.2 Diagnostika a odběrový systém

- Vakuové zkumavky (3,8% citrát sodný, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Rakousko)
- ZYMUTEST HIA IgG, IgA, IgM (HYPHEN BioMed, Francie)
- NucleoSpin Plasma XS (Machery-Nagel, Německo)
- Roztok heparinu 2 IU/ml ve fyziologickém roztoku
- Roztok heparinu 50 IU/ml ve fyziologickém roztoku

5.3 Biologický materiál

- Dárcovské trombocyty
- Krevní plazma
- DNA izolovaná z periferní krve pacientů
- DNA izolovaná z krevní plazmy pacientů

5.4 Chemikálie

- Gentra puregene blood kit (Qiagen, Minneapolis, USA)
 - RBC lysis solution
 - Cell lysis solution
 - Protein precipitation solution
 - DNA hydration solution
- Heparin (5000 UI/ml, Zentiva, Opava)
- Fyziologický roztok NaCl 0,9%
- 70% ethanol
- 100% isopropanol
- methanol
- LightCycler 480 Genotyping Master[®] (TIB MOLBIOL GmbH, Německo)
 - Primer FC_s, 100 μM, 5'-GGAGAAACCATCATGCTGAG-3'
 - Primer FC_as, 100 μM, 5'-CATACCTTGGACAGTGATGATGGTC-3'
 - Melting sonda FL, 20 μM, 5'-GTGGGATCCAAACGGGAGAA--FL-3'
 - Melting sonda LC640, 20 μM, 5'-LC640-TCTGGGATTTTCCATTCTGGAAGAATGTGACC—PH-3'
- LightCycler 480 Genotyping Master[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
 - MasterMix – FastStartTaqDNAPolymerase, reakční pufr, dNTPmix (s UTP náhradou za dTTP) a HighResolutionMelting
- DNA diluent
- barvicí roztok May-Grünwald (Penta, Praha)
- barvicí roztok Giemsa-Romanowski (Penta, Praha)

5.5 Metody

5.5.1 Preanalytická fáze - odběr krve

Pro provedení jednotlivých hematologických vyšetření byl zaveden jednotný postup pro správný odběr krve pacienta. Vzorek je odebírán v ranních hodinách, kdy

pacienti jsou na lačno a v předešlých 12 hodin nekonzumovali sladké nápoje, alkohol a cigarety. Důvodem proč je, krev odebírána v ranních hodinách je, že většina látek a počet krvinek v krevní plazmě během dne významně kolísá (Guder et al., 2003).

Odběr samotné krve se realizuje do jednorázových vakuových zkumavek s použitím jehly VACUETTE® (Greiner Bio-One, Rakousko). Tento postup se využívá z důvodu zajištění bezpečnosti pacienta i pracovníků laboratoře. Nedílnou součástí správného odběru krve jsou i dezinfekční prostředky. Při nedokonalém zaschnutí dezinfekčních prostředků může dojít k hemolýze odebrané krve a následnému znehodnocení odebraného biologického materiálu. Zkumavky obsahují pufrovaný roztok citrátu sodného o požadované koncentraci 0,109 mol/l. Odběrový systém je navržen tak, aby se zajistilo dokonalé promíchání antikoagulantia s krví v požadovaném poměru 1:9. Poté se zkumavka několikrát opatrně převrátí dnem vzhůru a je ihned transportována do hematokoagulační laboratoře, kde je nejpozději do dvou hodin zpracována. V laboratoři se vzorek centrifuguje po dobu 3 minut při 7200 g a z horní vrstvy se odpipetuje 0,5 ml krevní plazmy chudé na destičky (PPP) s následným zamražením a uchováním při teplotě -70°C. Zpětným promícháním centrifugované zkumavky se získá plná krev, která je využita k izolaci DNA a provedení krevního nátěru. Pro vlastní analýzu jsou vzorky rozmrazeny v termostatu nastaveného na teplotu 37°C po dobu 20 minut (Pecka, 2010).

5.5.2 Dárcovské trombocyty

Dárcovské trombocyty se získávají od pacientů, kteří v uplynulém roce nebyli léčeni heparinem. Pacientům se odebírá krev do zkumavek VACUETTE® (Greiner Bio-One, Rakousko) a následně je vzorek plné krve centrifugován po dobu 10 min při 1000 g.

5.5.3 Impedanční agregometrie

Metoda impedanční agregometrie využívá analyzátoru Multiplate s elektronickou interaktivní pipetou zajišťující poloautomatické dávkování. Měření impedanční agregometrie předchází vytemperování analyzátoru na požadovanou teplotu 37°C. Následně je zahájen vlastní experiment. V prvním kroku je napipetováno 300 µl citrátové krve obsahující dárcovské trombocyty a 150 µl roztoku heparinu o koncentraci 2 IU/ml. Probíhá inkubace po dobu 2 minut a při teplotě 37°C. Po uběhnutí 2 minut se přidává 150 µl PPP a je zahájeno měření impedance po dobu 20 minut za kontinuálního míchání vzorku uvnitř kyvet. Výsledkem měření je průměr maximální impedance naměřené po 20 minutách zaznamenané kontinuálně na obou párech

elektrod. Za pozitivní výsledek měření se považují hodnoty s cut-off 20 AU*min, která byla převzata z literárního zdroje Kopp et al., 2010. Pozitivní vzorky jsou změřeny znova, ale při vyšší koncentraci heparinu 50 IU/ml. Vyšší koncentrace heparinu by měla zajistit minimální inhibici aktivovaných destiček, která byla vyvolána destičkovým faktorem 4 při nižší koncentraci heparinu o více než 50 %.

5.5.4 ZYMUTEST HIA IgG,IgA,IgM

Zymutest HIA IgG, IgA a IgM je ELISA test pro stanovení heparinem indukovaných protilátek v krevní plazmě pacienta.

Příprava biologického materiálu:

- Vzorky krevní plazmy byly rozmrazeny po dobu 15 minut při teplotě 37°C
- Testovaná krevní plazma byla ředěna HIA diluentem v poměru 1:100, (20 µl krevní plazmy +1980 µl HIA diluentu), v případě vyšší hladiny heparinem indukovaných protilátek byl vzorek krevní plazmy ředěn v poměru 1:200, (10 µl krevní plazmy +1990 µl HIA diluentu)

Příprava pracovních roztoků:

- HIA pozitivní kontroly IgG, IgA a IgM byly rozpuštěny v 1 ml HIA diluentu vzorku
- Negativní kontrola byla rozpuštěna v 1 ml HIA diluentu vzorku
- Cly-buněčný lyzát byl rozpuštěn ve 2 ml destilované vody
- Immunokonjugáty Anti-IgG(Fcy), Anti IgM(µ) a Anti IgA(α)-HRP byly rozpuštěny v 7,5 ml diluentu konjugátu
- Promývací roztok obsahující pevné částičky se nejprve inkuboval po dobu 30 minut při teplotě 37°C, po rozpuštění všech pevných částiček byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:20, (50 ml promývacího roztoku + 950 ml destilované vody)

ELISA test:

1. Do každé jamky bylo napipetováno 50 µl Cly buněčného lyzátu.
2. Do jamek sloužících jako pozitivní kontrola bylo napipetováno 200 µl pozitivní kontroly IgG nebo IgM nebo IgA, stejně bylo postupováno i u negativní kontroly a naředěných vzorků krevních plazem pacientů.
3. Blankem pro měření je HIA diluent vzorku o objemu 200 µl.
4. Destička byla překryta filmem a inkubována po dobu 60 minut při laboratorní teplotě.
5. Po inkubaci následovala promývací fáze promývacím roztokem o objemu 300 µl v 5 promývacích cyklech.
6. Po promytí bylo přidáno 200 µl imunokonjugátu Anti-IgG(Fc γ) nebo Anti IgM(Fc μ) nebo Anti IgA(α)-HRP.
7. Destička byla překryta filmem a inkubována po dobu 60 minut při laboratorní teplotě.
8. Po inkubaci následovala promývací fáze promývacím roztokem o objemu 300 µl v 5 promývacích cyklech.
9. Po promytí bylo ihned přidáno 200 µl TMB/H₂O₂ substrátu a destička byla překryta filmem a inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.
10. Po ukončení inkubace bylo přidáno 50 µl 0,45M kyseliny sírové ve stejných časových intervalech jako v předešlém kroku.
11. V následujících 10 minutách byl pozorován vývoj zbarvení a poté byla změřena absorbance při 450 nm.
12. Za pozitivní výsledek byly považovány hodnoty s cut-off absorbancí nad 0,5 nm, slabě pozitivní v rozmezí absorbance 0,3 – 0,5 nm a negativní s absorbancí nižší než 0,3 nm.

5.5.5 Příprava krevních nátěrů

Pro pozorování a potvrzení přítomnosti shluků trombocytů byly provedeny krevní nátěry z krevní plazmy pacienta, dárcovských trombocytů a roztoku heparinu o koncentraci 2 IU/ml. Vzorky krevní plazmy byly naředěny v poměrech 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30 a 1:35 na celkový objem 160 µl.

Tab. 8 Příprava krevních nátěrů.

ředění	krevní plazma (μl)	dárcovské trombocyty (μl)	heparin 2 IU/ml (μl)
1:1	40	40	80
1:5	16	64	80
1:10	8	72	80
1:20	4	76	80
1:30	2,7	77,3	80
1:35	2,3	77,7	80

Připravené vzorky byly inkubovány po dobu 6 minut při teplotě 37°C za kontinuálního míchání. Po proběhnutí inkubace jsou vzorky připravené k provedení krevních nátěrů. Barvení krevních nátěrů se řídí zavedeným postupem hematologické kliniky. V prvním kroku je sklíčko fixováno 5 minut naředěným roztokem May-Grünwald připraveného smícháním 450 ml May-Grünwald barvicího roztoku a 150 ml methanolu. Následuje barvení 7 minut naředěným roztokem Giemsa-Romanowski a na závěr se sklíčko opláchne destilovanou vodou, opatrně se osuší a otre se rub sklíček. Sklípka s krevním nátěrem jsou připravena pro pozorování pod světelným mikroskopem Olympus BX 51.

5.5.6 Izolace DNA z periferní krve

DNA byla izolovaná z leukocytů periferní krve pomocí Gentra puregene blood kit (Qiagen, Minneapolis, USA) dle protokolu uvedeného výrobcem.

Velmi důležité je zamezení kontaminace biologického materiálu, z tohoto důvodu se pracuje v rukavicích a pracovní stůl, na kterém pracujeme, se dezinfikuje. V první řadě dochází k lýze erytrocytů. K 300 μl plné krve se přidá 900 μl RBC (red blood cell) lyzačního roztoku a vzorek je několikrát promíchán. Následuje inkubace 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci je vzorek centrifugován (10000 rpm/25°C/3 min) a supernatant je opatrně odebrán pasturovou pipetou. Po lýze erytrocytů následuje lýze buněk 300 μl Cell lyzačního roztoku. Vzorek s lyzačním roztokem byl promíchán a vložen na 1 minutu do ledu. Ke směsi bylo přidáno 100 μl Protein precipitačního roztoku s následným promícháním a centrifugací (10000 rpm/25°C/3 min). Vzniklý supernatant byl přepipetován pomocí pasturovy pipety do čisté ependorfy s 300 μl isopropanolu. Opět byl vzorek promíchán a centrifugován (10000 rpm/25°C/3 min). Supernatant byl rychlým pohybem vyprázdněn na připravenou gázu s následujícím proplachem 300 μl 70% etanolem a centrifugací (10000 rpm/25°C/3 min).

Po ukončené centrifugaci byl supernatant rychle vylit na gázu a vzorek DNA byl překryt čistou gázou. Po vysušení vzorku následuje rozpuštění DNA 50 μ l DNA hydration solution.

5.5.7 Izolace DNA z krevní plazmy

Dalším možným zdrojem DNA je krevní plazma pacientů. DNA byla izolována pomocí NucleoSpin Plasma XS (Machery-Nagel, Německo) dle protokolu uvedeného výrobcem.

Pro získání velkého množství DNA byl vybrán protokol s vysokou senzitivitou. Z krevní plazmy pacienta bylo odebráno 240 μ l a k nim bylo přidáno 20 μ l proteinasy K. Vzorek byl promíchán a inkubován po dobu 10 minut při teplotě 37°C. Ke směsi bylo přidáno 360 μ l Binding buffer a zkumavka byla 3x převrácena dnem vzhůru. Každý vzorek byl vložen do zkumavky bez víčka a centrifugován 30 sekund při 2000 g a 5 sekund při 11 000 g. Po každé centrifugaci byla zkumavka bez víčka vyjmuta, její obsah byl odstraněn a vrácena zpět. Do horní části bylo napipetováno 500 μ l promývacího pufru a centrifugace 30 sekund při 11 000 g. Následovalo druhé promytí 250 μ l promývacího pufru a centrifugace 3 min při 11 000 g. Zkumavka bez víčka byla odebrána a vyměněna za novou prázdnou zkumavku bez víčka. Závěrečným krokem byla eluce DNA přidavkem 20 μ l elučního pufru s poslední centrifugací po dobu 30 sekund při 11 000 g. Po ukončení centrifugace získáváme DNA vyizolovanou z krevní plazmy ve spodní části zkumavky bez víčka.

5.5.8 Měření koncentrace DNA

Po vyizolování DNA následovalo měření její koncentrace. Hematoonkologická klinika zavedla standardní operační postup s využitím přístroje Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Otevřením softwaru Nanodrop ND-1000 se nám nabídne okno s výběrem dostupných měření. Pro naši analýzu byly zvoleny nukleové kyseliny-nucleic acid. Poté bylo napipetováno 2 μ l DNA Hydratation solution a v zobrazeném okně bylo zvoleno OK. Přístroj byl automaticky nastaven na DNA-50. V hlavním panelu nukleových kyselin byl označen Re-Blank a v pravém, dolním, zeleném rámečku byla zobrazena hodnota 0,0 ng/ μ l. Po očištění měřícího čidla bylo napipetováno 2 μ l DNA vzorku a v panelu bylo zvoleno MEASURE. Naměřené hodnoty byly použity pro výpočet ředění DNA na konečnou koncentraci 25 ng/ μ l (Standardní operační postup Hematoonkologické kliniky).

5.5.9 Real-time PCR

Vzorky DNA naředěny na požadovanou koncentraci 25 ng/μl byly genotypizovány na detekci polymorfismu genu FCG2RA H131R (rs1801274). Genotypizace byla provedena pomocí analyzátoru LightCycler 480 instrument™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) s využitím specifických primerů LightCycler 480 Genotyping Master® (TIB MOLBIOL GmbH, Německo). Pro detekci polymorfismu byla využita real-time PCR s použitím hybridizačních sond LC640 a fluoresceinem. Tato metoda byla zvolena na základě získaných informací v literárních zdrojích a přístrojových možnostech hematologické laboratoře. Výhodou tohoto uspořádání je, že detekce probíhá přímo ve zkumavce po ukončení amplifikace bez nutnosti jejího otevření, nedochází ke kontaminaci vzorku a je minimalizována manipulace se vzorkem.

LightCycler 480 real-time PCR systém se stal užitečným přístupem ke stanovení nukleových kyselin kvantitativně a kvalitativně. Využívá se především ke studiu genové exprese, objevu a analýze genetických variabilit. Genotypizace SNP probíhá po ukončení amplifikace a může být provedena dvěma způsoby: analýzou koncových bodů nebo analýzou křivek tání. Pro experiment SNP genu FCG2RA byla zvolena analýza křivek tání. Křivky tání byly získávány ve vysokém rozlišení a vyhodnoceny programem Gene Scanning. Principem je stanovení SNP ve vzorcích a rozlišení tvarů jednotlivých křivek porovnávaných se vzorky wild-type (WT). Tvary křivek se výrazně liší u homozygotů a heterozygotů. To je způsobeno výskytem alelických variabilit. Přítomnost mutace způsobuje, že sonda rozpoznávající oblast není komplementární a uvolní se při nižší teplotě, než pokud by vazba byla plně komplementární. Výsledkem je pokles fluorescence. Pokud jsou obě dvě alely mutované, dochází k poklesu fluorescence pouze při nižší teplotě. U vzorku s WT pokles fluorescence nastává až při vyšší teplotě. V případě heterozygotů dochází k částečnému poklesu fluorescence při nižší teplotě a úplnému poklesu při vyšší teplotě (Pecka, 2010), (přepřacované dle https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/htc/index.jsp?&id=htc_010000).

Použité primery:

- FC-s 5'-GGAGAAACCATCATGCTGAG-3'
- FC_as 5'-CATACCTTGGACAGTGATGATGGTC-3'

Použité melting sondy:

- FL 5'-GTGGGATCCAAACGGGAGAA--FL-3'
- LC640 5'-LC640-TCTGGGATTTTCCATTCTGGAAGAATGTGACC—PH-3'

Příprava reagensí:

Nežádoucím jevem celé analýzy je opakované rozmrazování sond a primerů. Proto byl zvolen postup alikvotace reagensí na menší objemy, aby byla zajištěna správná detekce polymorfismu.

- Smícháme 5 μ l FC_s primeru a 5 μ l FC_as primeru s 90 μ l Minimal buffer (1mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA)
- Naředíme 4 μ l FI sondy a 4 μ l LC640 sondy s 16 μ l Minimal buffer (1mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA)

Tab. 9 Množství mixu na jednu PCR reakci o celkovém objemu 20 μ l.

Reagencie	Objem (μl)
GT MM	4
Primery FC_s a FC_as	2
Sonda LC640	1
Sonda FL	1
H ₂ O	10
DNA	2
Celkový objem	20

Tab. 10 Nastavení programu pro genotypizaci polymorfismu genu FCG2RA H131R v LightCycler 480 instrument.

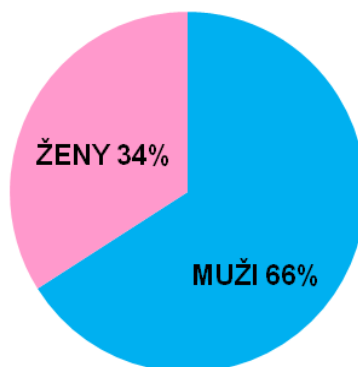
Název programu	Cyklus	Teplota (°C)	Čas	Rychlost (°C/s)
Počáteční denaturace	1	95	10 min	4,40
	40	95	10 s	4,40
PCR amplifikace	40	60	10 s	2,20
	40	72	15 s	4,40
	1	95	1 min	4,40
Melting	1	47	1 min	1,50
	1	70		0,11
Chlazení	1	40	10 s	1,50

6 VÝSLEDKY

6.1 Soubor pacientů

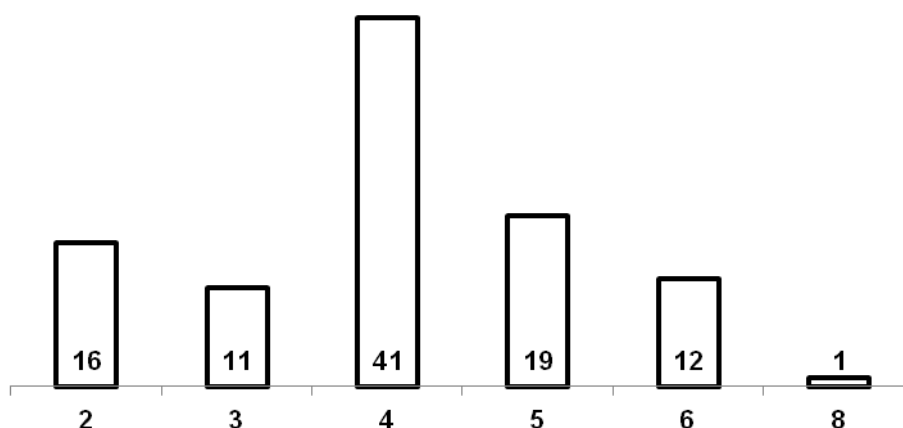
Vyšetření a přítomnost heparinem indukovaných protilátek s následnou detekcí polymorfismu genu FCG2RA H131R zodpovědného za pravděpodobnou příčinu HIT II. typu bylo provedeno na souboru 100 pacientů. Soubor byl tvořen pacienty, kteří byli vyselektováni na základě klinických kritérií definovaných jako 4T – skóre. 4T- skóre bylo stanoveno u každého pacienta jako součet bodů 2, 1 a 0. Body se získávají za léčbu heparinem v předešlých 14 dnech, pokles trombocytů minimálně o 30 % nebo celkové snížení o 50% - minimální počet krevních destiček $20 \cdot 10^9/l$ a manifestace trombózy způsobenou léčbou hepariny s vyloučením jiných příčin vzniku trombocytopenie. Konečný výsledek pak rozděluje soubor pacientů na skupiny s nižším, středním anebo vysokým rizikem vzniku HIT. Procentuální zastoupení mužů bylo 66 % s průměrným věkem 66,9 a mediánem 68,5. Zastoupení žen v souboru vyšetřovaných pacientů bylo 34 % s průměrným věkem 58,4 a mediánem 67.

Soubor pacientů



Obr. 13 Procentuální zastoupení mužů a žen v souboru pacientů vyšetřovaných funkčním, imunologickým a genotypizačním testem.

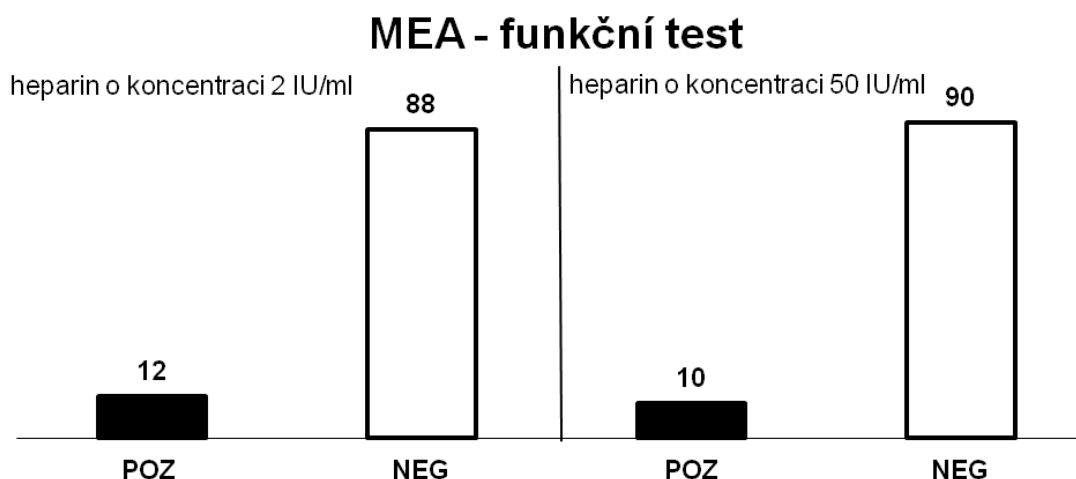
4T - SKÓRE



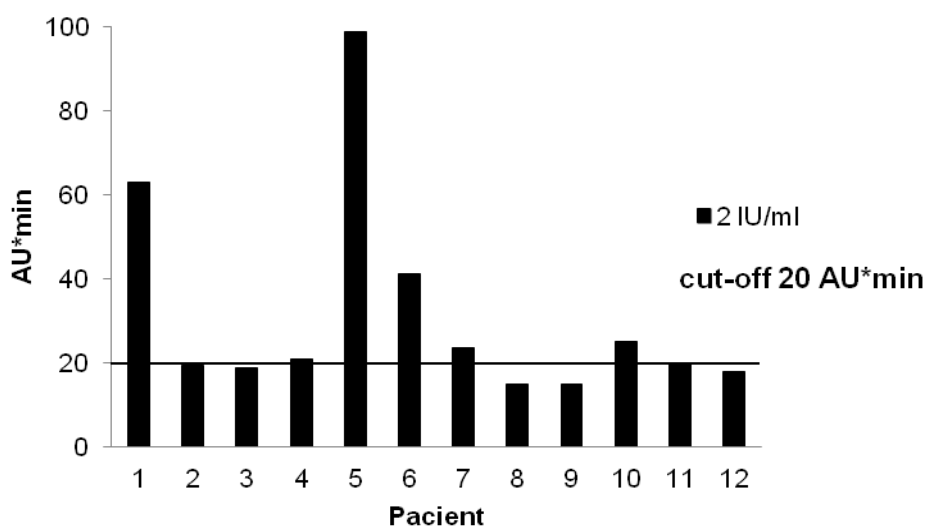
Obr. 14 Rozdělení vyšetřovaných pacientů na skupiny s nižším, středním a vysokým rizikem vzniku HIT. Soubor byl převážně tvořen pacienty s hodnotou 4 v rámci hodnocení 4T – skóre. U těchto pacientů byla splněna podmínka léčby heparinem a pokles počtu trombocytů o 50 %. Všechny 4 faktory podílející se na manifestaci HIT byly zaznamenány u jednoho pacienta s hodnotou 8.

6.2 Výsledky měření funkčního testu – MEA

Funkční test impedanční agregometrie poskytuje informaci o aktivovaných krevních destičkách v přítomnosti heparinu. Aktivace je způsobená přítomností protilátek v krevní plazmě pacienta. Z tohoto důvodu byly využity dárcovské trombocyty od pacientů neléčených heparinem a také, aby se zamezilo autoaktivace krevních destiček vlastními protilátkami. Výsledkem analýzy je agregační křivka trombocytů vyjádřena v agregačních jednotkách v závislosti na čase AU*min. Hodnota AU*min je klinicky i literárně definována v rozmezí 0,0-20,0 AU*min v případě agregace protilátek neaktivovaných destiček. Pozitivní výsledek je definován jako hodnota s cut-off 20 AU*min s následnou confirmací roztokem heparinu o vyšší koncentraci 50 IU/ml.



Obr. 15 Grafické znázornění výsledků metodou MEA. Celkový počet vyšetřených pacientů byl 100 mužů a žen, kteří byli léčeni heparinem. V prvním měření byla plazma chudá na destičky vystavena heparinu o nižší koncentraci 2 IU/ml. Výsledkem bylo, že v případě 12 pacientů byl detekován pozitivní výsledek s cut-off 20,0 AU*min. Pozitivita výsledku při nižší koncentraci heparinu byla potvrzena inhibicí v přítomnosti vyšší koncentraci heparinu 50 IU/ml. Konfirmovaný specifický nálezn pro HIT byl detekován u 10 pacientů. U zbylých dvou pacientů se jednalo o nespecifickou inhibici krevních destiček.



Obr. 16 Přehled naměřených výsledků metodou MEA. Soubor 12 pacientů, u kterých byly detekovány protilátky namířené proti komplexu PF4 a heparin s cut-off hodnotou 20 AU*min.

V rámci klinického hodnocení 4T-skóre predikující manifestaci HIT byla stanovena nejvyšší hodnota – 8. Pacient byl vyšetřen funkčním testem v různých poměrech ředění a stanovila se křivka počtu krevních destiček v závislosti na čase a indikované léčbě. Pacientova plazma byla ředěna normální plazmou v poměrech 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 a 1:35 na celkový objem 320 μ l. Pozitivní výsledky s cut-off

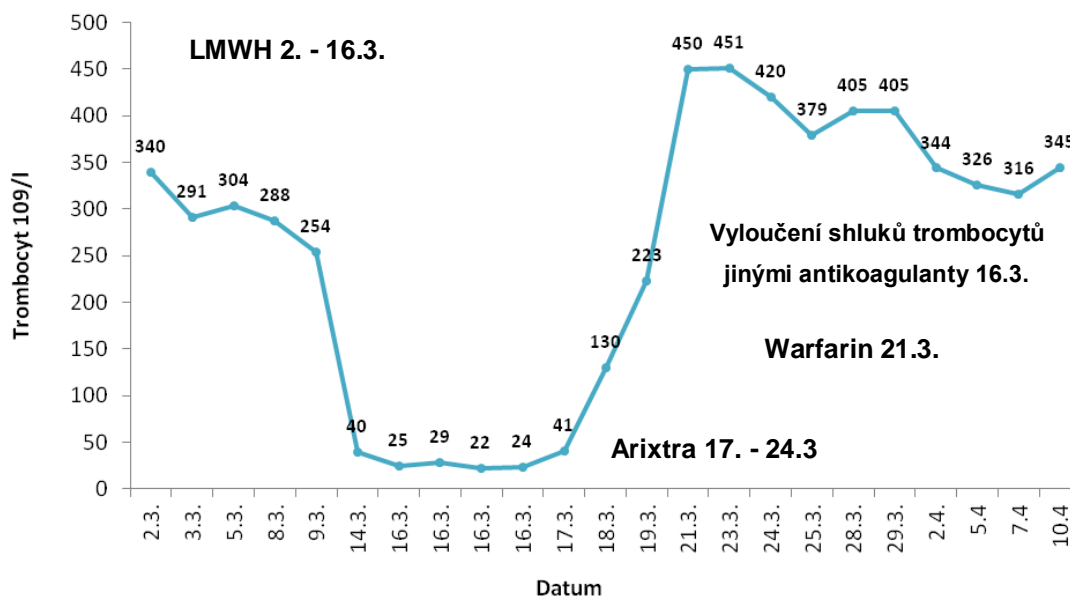
hodnotou 20,0 AU*min byly potvrzeny vyšší koncentrací heparinu 100 IU/ml. Naměřená data jsou uvedena v přehledné tab. 11

Tab. 11 Přehled naměřených dat impedanční agregometrií.

Ředění	Pacient 1(μl)	Pacient 2(μl)	AUC (0,5IUml/100IUml)	Agregace (0,5IUml/100IUml)	Rychlost (0,5IUml/100IUml)
1:1	160	160	1937/3284	99/131,6	6,6/5,4
1:5	64	256	366/1904	13,9/71,6	3,8/4,4
1:10	32	288	412/1818	10,9/64,9	4,6/3,7
1:20	16	304	382/1617	3,0/65,3	3,0/5,1
1:30	10,7	309,3	329/885	4,1/35,3	4,1/7,4
1:35	9,1	310,9	245/809	6,0/27,8	3,5/3,9

Plazma vyšetřovaného pacienta byla ředěna plazmou jiného pacienta na celkový objem 320 μl. Z naměřených dat vyplývá, že hodnoty AUC a agregace jsou mnohonásobně vyšší u ředění 1:1. Ředění normální plazmou v poměrech 1:5 a 1:10 v přítomnosti heparinu 0,5 IU/ml poskytují hodnoty nižší než je cut-off 20 AU*min. Tyto hodnoty lze považovat za pozitivní výsledky pro detekci protilátek vyvolávající HIT.

Závislost počtu trombocytů na čase a léčbě



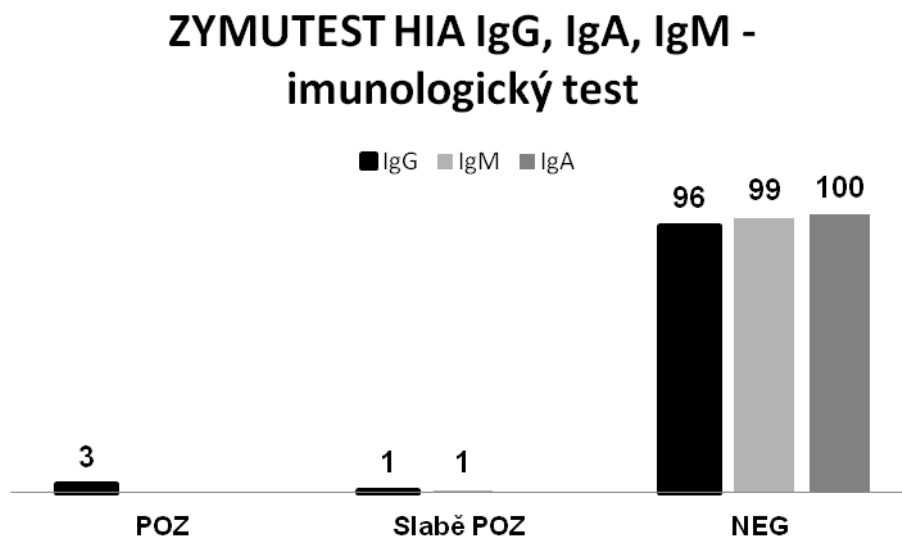
Obr. 17 Antikoagulační léčba byla zahájena u pacienta 12 dnů před analýzou vzorku na přítomnost protilátek vyvolávajících HIT. Antikoagulační lék byl podáván 2x denně v dávce 0,9 IU. Křivka zobrazuje pokles počtu krevních destiček až pod hodnotu 40.10⁹/l. Po vyšetření na přítomnost protilátek podporujících vznik HIT bylo zastaveno podávání LMWH a počet krevních destiček začal ihned stoupat.

6.3 Výsledky měření imunologického testu- ZYMUTEST HIA IgG, IgA, IgM

Soubor pacientů byl vyšetřen imunologickým testem ZYMUTEST HIA IgG,IgM a IgA. Test sloužil ke kompletní typizaci protilátek ve všech třídách. Vyšetření bylo navrženo tak, aby došlo k účinné vazbě heparin-vazebných proteinů a protilátek na imobilizovaný heparin. Systém napodobuje mechanismus vazby protilátek *in vivo* v přítomnosti heparinu a buněčných povrchů jako jsou krevní destičky a buňky endotelu.

Výsledky měření jsou interpretovány následovně:

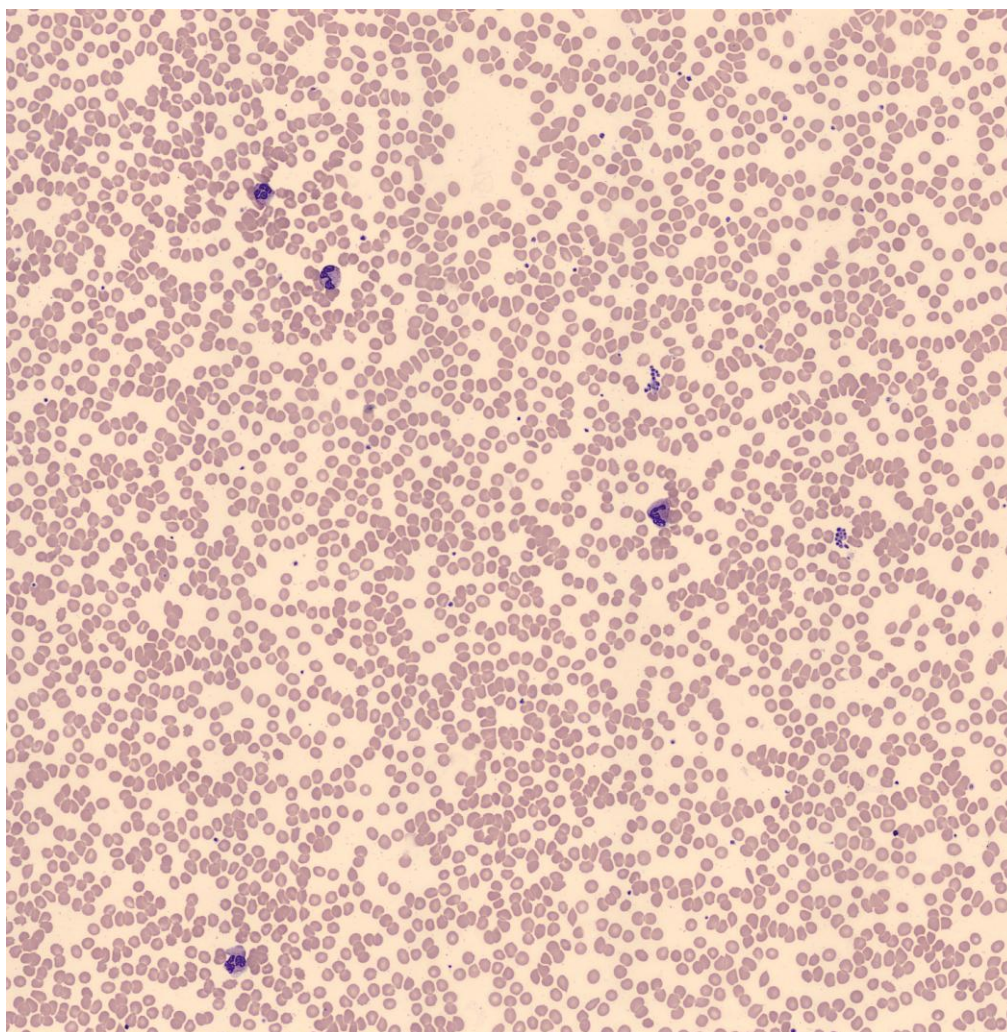
- Pozitivní A450 > 0,50
- Slabě pozitivní A450 0,30 – 0,50
- Negativní A450 ≤ 0,30



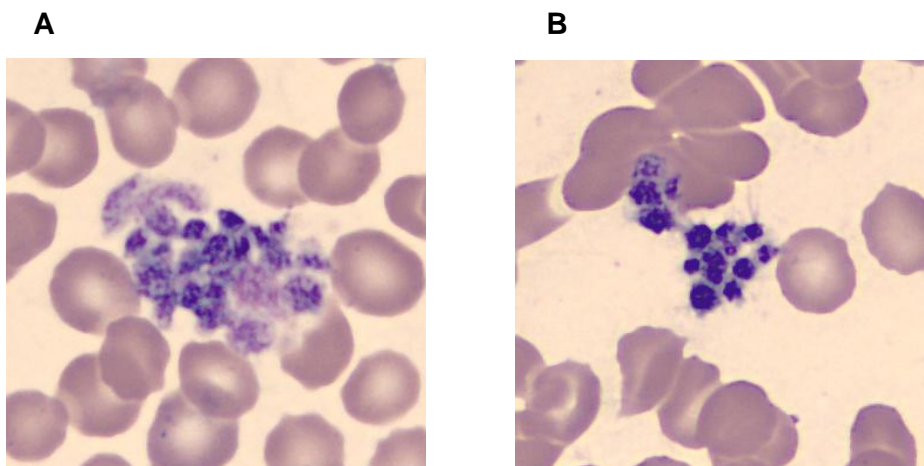
Obr. 18 Vyhodnocení imunologického testu. Z výsledků vyplývá, že na manifestaci HIT se nejvíce podílejí protilátky třídy IgG doplněné o třídu protilátek IgM.

6.4 Výsledky mikroskopického hodnocení krevních destiček

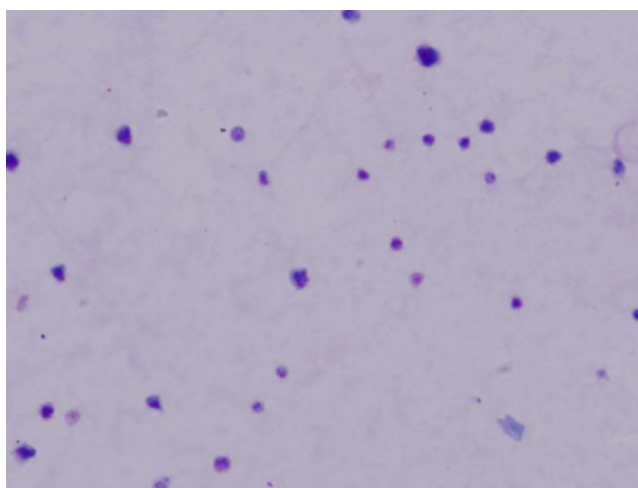
Patologické nálezy shlukujících se krevních destiček vyvolané heparinem indukovanou trombocytopenií byly prokázány krevními nátěry periferní krve a plazmy bohaté na krevní destičky. Preparáty byly připraveny v koncentračních poměrech 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 a 1:30. Viditelné zobrazení shlukujících se trombocytů bylo neoptimálnější u preparátů s koncentrací 1:1 a 1:5.



Obr. 19 Nátěř periferní krve při zvětšení 100x.



Obr. 20 Nátěry periferní krve při zvětšení 1000x. Shluky trombocytů vyvolané vznikem HIT jsou patrné u obou připravených krevní nátěrů o koncentraci 1:1 (A), 1:5 (B).



Obr. 21 Nátěr plazmy bohaté na krevní destičky při zvětšení 100x.

6.5 Výsledky genotypizace polymorfismu genu FCG2RA H131R

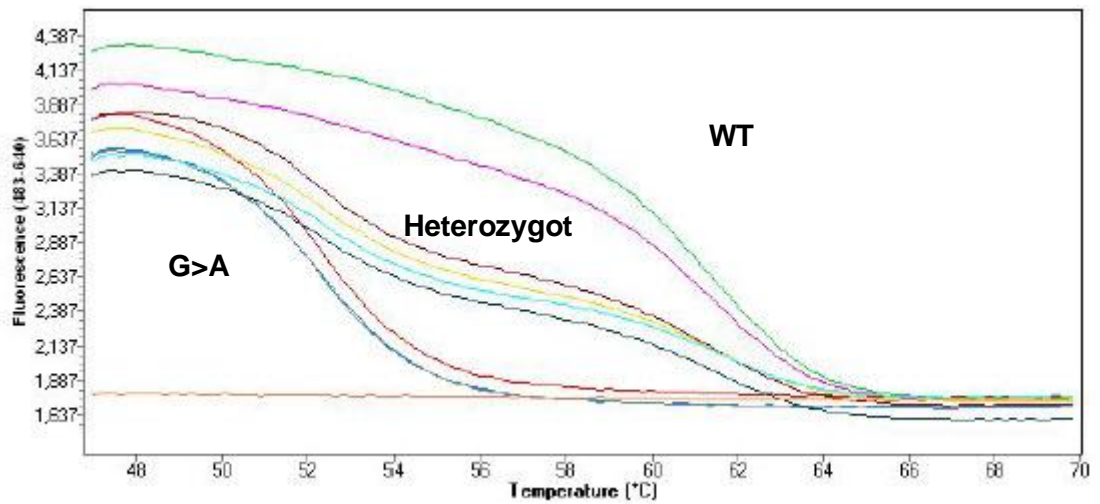
Polymorfismus genu FCG2RA H131R byl detekován u vzorků DNA vyizolovaných z leukocytů periferní krve a krevní plazmy pacientů. Celkový počet vyizolovaných DNA byl 94, pouze v případě 6 vzorků nebyla úspěšná izolace z důvodů nízkého počtu leukocytů v periferní krvi. Pro správné provedení genotypizace je důležitá čistota a koncentrace DNA. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 a naředěna na požadovanou koncentraci 25 ng/μl.

Pro nejúčinnější genotypizaci byla zvolena real-time PCR s využitím instrumentu LightCycler 480. Princip metody spočívá ve dvou separovaných reakcích. V prvním kroku probíhá amplifikace DNA v přítomnosti dvou specifických primerů pro dvě alely- R (arginin), H (histidin). Detekce polymorfismu je zprostředkována dvěma fluorescenčně hybridizačními próbami značené LC640 a fluoresceinem. Pokud dojde k rozpoznání specifického PCR produktu oběma sondami, nastává FRET emise, která je detekována. Druhým krokem, je určení alelové diskriminace s využitím analýzy křivek tání probíhající až po ukončení PCR reakce.

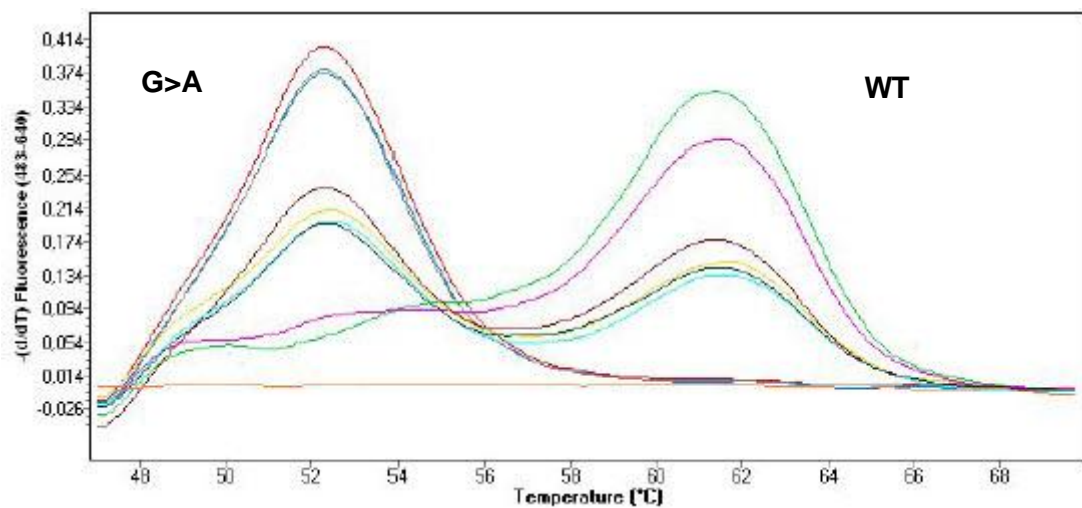
6.5.1 Optimalizace real-time PCR

Metoda real-time PCR byla navržena tak, aby docházelo k nejúčinnější genotypizaci stanovovaného polymorfismu. Na základě získaných literárních poznatků, možností a přístrojového vybavení hematologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc byl zvolen následující postup PCR reakce pro rutinní vyšetření. Celkový objem amplifikační mixu na jednu PCR reakci byl 20 μ l. Mix obsahoval 4 μ l GT MM (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo), 2 μ l primerů Fc_s a Fc_as o konečné koncentraci 5 μ M (TIB MOLBIOL GmbH, Německo), (5 μ M koncentrace primerů se získá smícháním 5 μ l Fc_s s 5 μ l Fc_sa a 90 μ l Minimal buffer), 1 μ l sondy LC640 s konečnou koncentrací 4 μ M, 1 μ l sondy FL s konečnou koncentrací 4 μ M (4 μ M koncentraci u obou sond získáme smícháním 4 μ l sondy s 16 μ l Minimal buffer), 10 μ l PCR H₂O (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo), 2 μ l genomické DNA. Jako negativní kontrola byla zvolena PCR H₂O o objemu 2 μ l.

Pro průběh real-time PCR byl využit analyzátor LightCycler 480 instrument™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Protokol jednotlivých PCR cyklů byl zahájen pre-inkubační fází sloužící jako aktivace PCR reakce při T=95°C po dobu 10 min s následnými 40 cykly denaturace při T=95°C po dobu 10 sek, annealing fází při T=60°C po dobu 10 sek s rychlostí 2,20°C/s a extenzí při T=72°C po dobu 15 sek. Po ukončení PCR reakce následuje program tání DNA, který slouží k efektivnímu rozlišení genotypů homozygotů, heterozygotů a wild typu. Program byl nastaven s počátečním zahřátím při T=95°C po dobu 60 sek, ochlazením při T=47°C po dobu 60 sek s postupně pomalým zahříváním při T=70°C s rychlostí 0,11°C/s. PCR reakce je ukončena chlazením při T=40°C po dobu 10 sek v jednom cyklu. Emitovaná fluorescence je detekovaná při každém ukončení annealing fáze.



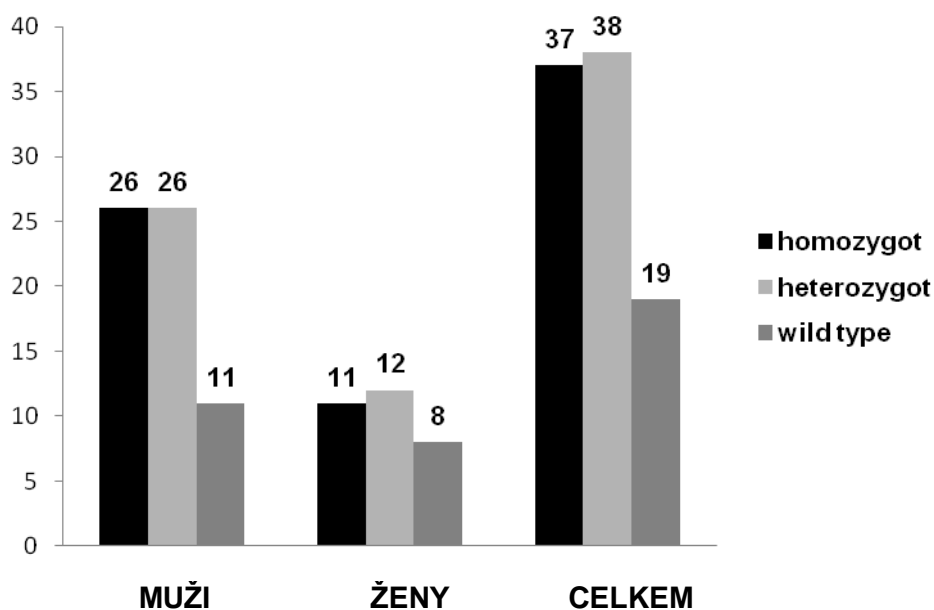
Obr. 22 Křivka tání PCR produktů vyjádřena vynesemím intenzity fluorescence proti teplotě.



Obr. 23 Píky PCR produktů získané zderivováním křivky tání. Píky s maximem 52°C pro mutovaný stav a 61,5 °C pro WT.

Tab. 12 Přehled výsledků genotypizace pro jednotlivé metody.

Počet N	FCGR2A genotyp			Relativní frekvence alel	
	AA (H/H ¹³¹)	AG (H/R ¹³¹)	GG (R/R ¹³¹)	A (H ¹³¹)	G (R ¹³¹)
N=94	37 (39,4%)	38 (40,4%)	19 (20,2%)	59,6%	40,4%
MEA					
N=84, NEG	31 (36,9%)	35 (41,7%)	18 (21,4%)	57,7%	42,3%
N=10, POZ	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)	75%	25%
ZYMUTEST HIA IgG, IgM, IgA					
N=90, NEG	35 (38,9%)	37 (41,1%)	18 (20,0%)	59,4%	40,6%
N=4, POZ	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	62,5%	37,5%



Obr. 24 Grafické znázornění zastoupení jednotlivých genotypů v souboru vyšetřovaných pacientů.

6.6 Statistické zpracování dat

Fisherův exaktní test slouží k porovnávání neznámé hodnoty parametru mezi dvěma základními soubory o malé četnosti. V experimentu jsou porovnávány vždy dva soubory: výsledky genotypizačního testu s funkčním nebo imunologickým testem. Fisherův test se využívá v situacích, kdy nás zajímá, zda rozptyly, přesnosti, stabilita dvou souborů, dvou přístrojů nebo dvou technologií jsou či nejsou shodné. Soubor pacientů vyšetřených třemi různými metodami o malé četnosti N=94 nebyl testován na

shodu, nýbrž na vzájemný vztah mezi mutačním stavem a pozitivním nálezem v jednom z vyšetřovaných testů. Výsledky byly uspořádány do přehledných kontingenčních tabulek s využitím softwaru SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA), (Pavlík et al., 2005).

Tab. 13 Závislost mezi mutačním stavem a MEA.

MEA 2.kolo	homozygot	heterozygot	wild type	celkem
NEG počet	31	35	18	84
%	36,9%	41,7%	21,4%	100%
POZ počet	6	3	1	10
%	60,0%	30,0%	10,0%	100%
Celkem počet	37	38	19	94
%	39,4%	40,4%	20,2%	100%

Fisherův exaktní test neprokázal statistickou významnou závislost mezi impedanční agregometrií - 2.kolo a mutačním stavem ($p=0,461$).

Tab. 14 Závislost mezi mutačním stavem a ZYMUTEST HIA IgG, IgM, IgA

ZYMUTEST HIA IgG, IgM, IgA	homozygot	heterozygot	wild type	Celkem
NEG počet	35	37	18	90
%	38,9%	41,1%	20,0%	100%
POZ počet	2	1	1	4
%	50,0%	25,0%	25,0%	100%
Celkem počet	37	38	19	94
%	39,4%	40,4%	20,2%	100%

Fisherův exaktní test neprokázal statistickou významnou závislost mezi výsledky imunologického testu a mutačním stavem ($p=0,838$).

7 DISKUSE

V současné době je heparin nejčastěji podávaným antikoagulačním lékem pro hospitalizované pacienty. Antikoagulační účinek spočívá ve vazbě heparinu na inhibitor koagulace - antitrombin. Interakce je zprostředkována přes specifickou sekvenci pentasacharidů lokalizovaných na různých místech molekuly heparinu. Komplex heparinu a antitrombinu inaktivuje řadu koagulačních faktorů, z nichž nejdůležitější jsou faktor IIa (trombin) a faktor Xa (Hirsch&Fuster, 1984).

Léčbu hepariny provází také nežádoucí účinky. Zásadním nežádoucím účinkem je rozvoj heparinem indukované trombocytopenie na základě aktivace krevních destiček. Funkce krevních destiček je ovlivněna vazbou heparinu na receptory lokalizované na povrchu membrány a dochází k indukci nebo inhibici agregace (Eika, 1971), (Kelton&Hirsch, 1980). Obecně jsou hepariny rozdělovány na nefrakcionované a nízkomolekulární. Nežádoucím jevem při užívání heparinů je výskyt HIT, který je vyšší u nefrakcionovaných než u nízkomolekulárních heparinů, a to z důvodů vyšší afinity UFH k trombocytům. Incidence tohoto klinicko-patologického syndromu je v rozmezí 3 - 5%.

Pro experiment byl vybrán soubor 100 pacientů, kteří byli definováni na základě Warkentinova 4T-skóre. Pacienti se střední hodnotou 4T-skóre (4,5,6) tvořili převážnou část souboru (72%). Jedná se o pacienty, kterým byl podáván heparin v posledních 14 dnech a počet trombocytů klesl o 30 - 50% a tvoří diagnosticky nejzajímavější skupinu, jelikož nemají mimo poklesu trombocytů jiné klinické symptomy a přitom mají značné riziko výskytu protilátek klíčových pro další rozvoj HIT. U pacientů s nízkou hodnotou skóre (27%) je pozorován pouze pokles trombocytů, aniž by jim byl podáván heparin, a tudíž představují z diagnostického hlediska málo zajímavou skupinu. U pacientů s vysokou hodnotou skóre (1%) je sice vysoká pravděpodobnost výskytu protilátek, ale lze je diagnostikovat na základě trombotických komplikací souvisejících s manifestací HIT. Z klinického hlediska 4T-skóre určuje základní klinické rysy a podmínky ke stanovení včasné diagnózy HIT (Warkentin, 2003). Diagnostika trombocytopenie může být komplikovaná tím, že na jejím vzniku se mohou podílet i jiné faktory. Mezi nejzávažnější faktory patří sepse a vznik mnohočetných krevních sraženin v cévách. Trombotické komplikace mohou nastat i v případě normálního počtu krevních destiček a dlouhodobého užívání heparinu. Stanovení HIT má závažné důsledky, jak pro pacienta, tak i pro lékaře. V takovém případě je léčba heparinem ukončena a pacient přechází na alternativní antikoagulační léky, jako jsou například danaproid a lepirudin. Úskalím užívání těchto léků je především cena a komplikace spojené s krvácením. Selhání a chybná diagnostika HIT, ale může vést až k fatálním následkům, které

zvyšují morbiditu a mortalitu. Z tohoto důvodu jsou velmi důležité laboratorní testy disponující dostatečnou spolehlivostí, specifitou, senzitivitou a reprodukovatelností (Morel-Kopp et al., 2009).

Komplexní diagnostika HIT je velmi obtížná. Výběr metod závisí nejen na dostatečné spolehlivosti, specifitě, senzitivě a reprodukovatelnosti, ale i na časové a cenové dostupnosti. Z dostupných literárních zdrojů vyplývá, že ke komplexnímu stanovení HIT je nejvhodnějším přístupem kombinace vyšetření funkčním testem, imunologickým testem a SRA. Metoda SRA využívající radioaktivně značený ¹⁴C-serotonin není součástí každé hematologické laboratoře a vyžaduje velmi přísné bezpečnostní pracovní podmínky a proškolený personál. Proto byly v experimentální části zvoleny metody, které zachycují protilátky podílející se na rozvoji HIT a testy schopné zachytit protilátky, které se podílejí na aktivaci destiček.

K typizaci heparinem dependentních protilátek existuje celá řada komerčně dostupných kitů zaměřených na třídy protilátek IgG, IgM a IgA nebo jsou kity zaměřené pouze na třídu protilátek IgG. V experimentální části bylo využito ZYMUTESTU HIA IgG, IgM, IgA ((HYPHEN BioMed, Francie), který je schopen zachytit všechny třídy protilátek. Z naměřených výsledků vyplývá, že největší podíl na manifestaci HIT mají protilátky třídy IgG (4%), (obr. 18). Právě protilátky třídy IgG a její podtřídy nejvíce přispívají k vzniku HIT. Nedávné studie se zabývaly specifitou jednotlivých ELISA testů sloužících k typizaci HIT protilátek. Výsledkem bylo, že přesnější diagnostiku HIT poskytují testy zachycující protilátky třídy IgG, které se nejvýrazněji podílejí na rozvoji HIT (Bakchoul et al., 2009). Pozitivní výsledky ELISA stanovení poskytují mnohdy mylnou informaci o přítomnosti patogenních protilátek v důsledku přítomnosti protilátek spojených s antifosfolipidovým syndromem a systémovým lupusem erythematodes, zároveň nám neposkytují informaci o aktivovaných krevních destičkách. Nevýhodou ELISA testů je především cena. Z důvodů vysokých nákladů na vyšetření probíhá stanovení imunologickým testem v řadě diagnostických laboratoří jedenkrát týdně. Konfirmace pozitivních nálezů by měla být provedena do 24 hodin. Výsledky získané imunologickým testem jsou potvrzovány konfirmačním testem, nejlépe funkčním testem demonstrující destičkovou aktivaci v *in vitro* podmínkách (Morel-Kopp et al., 2009), (Pauzner et al., 2009).

Impedanční agregometrie se řadí mezi funkční testy využívající agregometr pracující na impedančním principu (Multiplate). Principem metody je vyšetřit funkci krevních destiček v plné nesrážlivé krvi. Metoda disponuje jednoduchostí a rychlostí samotného vyšetření (Toth et al., 2006). Pro stanovení heparinem indukované trombocytopenie bylo třeba navrhnout optimální detekční systém. V prvním kole měření byla krevní plazma pacientů vystavena nižší koncentraci heparinu o

koncentraci 2 IU/ml. V případě pozitivních výsledků (12), (obr. 15,16) s cut-off hodnotou 20,0 AU*min bylo vyšetření opakováno vyšší koncentrací heparinu 50 IU/ml. Vyšší koncentrace heparinu způsobuje o 20 % nižší inhibici komplexu PF4/heparin než koncentrace heparinu 2 IU/ml. Z výsledků je patrné, že v případě 10 pacientů došlo ke specifické inhibici aktivovaných destiček a u zbylých 2 se jedná o nespecifickou inhibici aktivity destiček vyvolanou jinými faktory (protilátky při autoimunním onemocnění). Výhodami impedanční agregometrie jsou především vynechané kroky centrifugace, promývání vzorků a odstranění radioaktivně značených látek. Tento detekční systém se jeví jako užitečný přístup ke správnému, spolehlivému a reprodukovatelnému vyšetření protilátek podílejících se na manifestaci HIT (Morel-Kopp et al., 2009).

Jednou z pravděpodobných příčin HIT je podle řady odborných prací genetický polymorfismus genu FCGR2A. Polymorfismus způsobuje záměnu AMK arginin v poloze 131 za histidin. Produktem tohoto genu je FcγRIIa destičkový receptor zodpovídající za aktivaci destiček v přítomnosti HIT protilátek. Pro genotypizaci polymorfismu byla zavedena a optimalizována metoda real-time PCR využívající analyzátor LightCycler 480 instrument™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Ke stanovení polymorfismu destičkového receptoru byly využity primery a sondy (TIB MOLBIOL GmbH, Německo). Produkty PCR reakce byly detekovány pomocí analýzy křivek tání po vzoru literárního zdroje Kroupis et al., 2009. Genotypizačním testem bylo vyšetřeno 94 DNA vzorků. Distribuce jednotlivých genotypů a frekvence alel je zaznamenána v tab. 12. V souboru vyšetřovaných pacientů bylo zastoupení normálního genotypu 20,2 % s relativní frekvencí alely pro arginin 40,4 % (H/R¹³¹+R/R¹³¹). Zastoupení genotypu mutovaného stavu bylo 39,4% s relativní frekvencí alely pro histidin 59,6 % (H/H¹³¹+ H/R¹³¹). Rozvrstvení genotypů bylo provedeno i u použitého imunologického a funkčního testu. Pacienti pozitivní metodou MEA vykazovali vyšší procento mutovaného stavu (N=6, 60%), v případě heterozygotů tomu bylo (N=3, 30%) a wild type (N=1, 10%). Stejně zastoupení genotypů bylo i v případě vyšetření imunologickým testem, mutovaný stav (N=2, 50%), heterozygot (N=1, 25%), wild type (N=1, 25%). Cílem práce bylo vyjádřit vliv genetického polymorfismu destičkového receptoru podílejícího se na vzniku HIT. Byla provedena korelace mezi pozitivními nálezy imunologického, funkčního testu vůči výskytu mutovaného stavu. K tomu byl využit software SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA) s využitím Fisherova exaktního testu. Pacienti s pozitivními výsledky stanovené funkčním a imunologickým testem vykazovali vyšší zastoupení mutovaného genotypu. Z tohoto důvodu bylo provedeno statistické zpracování pozitivních nálezů obou metod vůči výskytu genetického polymorfismu. Výsledkem bylo, že mezi mutovaným stavem a funkčním testem byla prokázána závislost, která však nebyla signifikantně významná

($p=0,461$), (tab. 13). Vztah mezi pozitivními nálezy imunologického testu a mutovaného stavu byla rovněž prokázána závislost, která nebyla signifikantně významná ($p=0,838$) z důvodu vysokého zastoupení mutovaného stavu ve vyšetřovaném souboru pacientů (tab. 14). Z naměřených dat je patrné, že frekvence mutovaného stavu je v populaci velká a nemusí být jedinou příčinou manifestace HIT. Výskyt a frekvence mutovaného stavu může být dána i geografickým rozmístěním (Lehrnbecher et al., 1999). Takto navržená metoda, která slouží k detekci polymorfismu genu FCGR2A (H131R) je technicky nenáročná a velmi rychlá (1,5 hod). Přesnost genotypizace je 100%, pokud se pracuje s DNA získanou z periferní krve (Kroupis et al., 2009). Rozvoj DNA mikročipů výrazně přispěl k navržení systému detekující polymorfismy Fc γ destičkových receptorů, které mohou sloužit k rozdělení pacientů s vysokým rizikem vzniku HIT. Tento přístup může být v budoucnu užitečným nástrojem pro správnou a přesnější diagnostiku HIT (Gruel et al., 2004).

8 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo teoretické zpracování funkce krevních destiček při heparinem indukované trombocytopenii a diagnostice tohoto klinicko-patologického jevu.

S rozvojem vyšetřovacích metod v hematologických laboratořích dochází k výraznému zlepšení diagnostiky HIT. Dostupné literární zdroje zabývající se problematikou HIT popisují nejvhodnější přístup účinné diagnostiky - SRA, ELISA, funkční test. Z diagnostického hlediska byl zvolen přístup vyšetření v následujícím pořadí. V první fázi včasné diagnózy byl použit funkční test MEA včetně konfirmace. Následně bylo vyšetření doplněno imunologickým testem.

Pro použití funkčního testu byla optimalizována metoda o konfirmační krok, jež spočíval v určení koncentrace heparinu v případě pozitivních výsledků. Nesprávná funkce krevních destiček při rozvoji trombocytopenie byla prokázána krevními nátěry pozorovanými světelnou mikroskopií. Neoptimálnější se jevily krevní nátěry v ředících poměrech 1:1 a 1:5. Závěrečným krokem byl genotypizační test souboru pacientů (N=94) využívající real-time PCR s následnou analýzou křivek tání. Metoda byla optimalizována (koncentrace primerů, koncentrace sond, melting program) pro rutinní vyšetření pacientů s podezřením na HIT.

Efektivita diagnostického postupu byla navržena s cílem správného a přesného stanovení HIT. Pro imunologické testy platí, že jsou schopny zachytit protilátky podílející se na rozvoji HIT, nýbrž nám neposkytují informaci o samotné aktivaci trombocytů. Zatímco metoda MEA poskytuje informaci o aktivovaných trombocytech v přítomnosti heparinu, ale nepodává informaci o protilátkách neaktivující trombocyty, ale mohou způsobit aktivaci s opožděnou reakcí. Molekulární metoda real-time PCR je citlivá, rychlá, přesná, instrumentálně nenáročná a 100% účinná v genotypizaci vzorků. Je důležitým ukazatelem patofyziologie HIT a následné léčby pro vyšetření genetického polymorfismu.

Cílem práce bylo i vyhodnotit, zda existuje vztah mezi pozitivními nálezy imunologického a funkčního testu proti genotypizačnímu testu. Výsledkem Fisherova exaktního testu byl existující vztah mezi imunologickým testem ($p=0,838$) a funkčním testem ($p=0,461$) vůči frekvenci mutovaného stavu, ale závislost není signifikantně statisticky významná, zejména z důvodu vyššího procentuálního zastoupení polymorfismu v souboru pacientů. Zastoupení mutačního stavu v souboru pacientů pravděpodobně prokazuje, že se jedná o mutaci s četným výskytem v populaci. Takto navržený postup diagnostiky HIT se jeví neúčinnější a může být využíván k rutinnímu vyšetření v laboratořích.

9 LITERATURA

Ahsan A, Jeske W, Hoppensteadt D, Lormeau JC, Wolf H, Fareed J. (1995), Molecular profiling and weight determination of heparins and depolymerized heparins, *J Pharm Sci* **84**, 724-7.

Albeiro L., Kimmerle S., Baumann A. et al. (2003), Rapid determination of anti-heparin/platelet factor 4 antibody titers in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, *Am J Med* **114**, 528–536.

Andersson L. O., Barrowcliffe T.W., Holmer E., Johnson E.A., Söderström G. (1979), Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma, *Thromb Res* **15**, 531-41.

Antman EM (2001), the search for replacements for unfractionated heparin, *Circulation* **103**, 2310-4.

Arepally GM, Ortel TL. (2006), Clinical practice. Heparin-induced thrombocytopenia, *N Engl J Med* **355**, 809-817.

Bakchoul T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs U.J. (2009), Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, *J Thromb Haemost* **7**, pp. 1256–1259.

Barzu T, Molho P, Tobelem G, Petitou M, Caen J (1985), Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture, *Biochem Biophys Acta* **845**, 196 –203.

Boneu B, Caranobe C, Cadroy Y, Dol F, Gabaig AM, Dupouy D, Sie P. (1988), Pharmacokinetic studies of standard UFH and low molecular weight heparins in the rabbit. *Semin Thromb Hemost* **14**, 18 –27.

Borsig L. (2007), Antimetastatic activities of modified heparins: selectin inhibition by heparin attenuates metastasis, *Semin Thromb Hemos* **33**, 540-6.

Briant L, Caranobe C, Saivin S, Sié P, Bayrou B, Houin G, Boneu B. (1989), Unfractionated heparin and CY 216: pharmacokinetics and bioavailabilities of the

antifactor Xa and IIa effects after intravenous and subcutaneous injection in the rabbit, *Thromb Haemost* **61**, 348-53.

Casu B, Oreste P, Torri G, Zoppetti G, Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinay P. (1981), The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin-binding sequence, *Biochem J* **197**, 599–609.

Cuker A (2011), Heparin-induced thrombocytopenia: present and future, *J Thromb Thrombolysis* **31**, 353-66.

Denys B, Stove V, Philippé J, Devreese K (2008), A clinical laboratory approach contributing to a rapid and reliable diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, *Thromb res* **123**, 137-45.

Donayre CE. (1996), Current use of low molecular weight heparins, *Semin Vasc Surg* **9**, 362-71.

Edgar Faber a kolektiv (2012), Základy hematologické diagnostiky, pp 42-43, Univerzita Palackého v Olomouci.

Eika C. (1971), Inhibition of thrombin induced aggregation of human platelets by heparin, *Scand J Haematol* **8**, 216-22.

Eisman R, Surrey S, Ramachandran B, Schwartz E, Poncz M. (1990), Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt, *Blood* **76**, 336-44.

Fareed J, Hoppensteadt DA, Bick RL. (2000), An update on heparins at the beginning of the new millennium, *Semin Thromb Hemost* **26**, 5-21.

Fareed J, Jeske W, Hoppensteadt D, Clarizio R, Walenga JM. (1998), Low molecular-weight heparins: pharmacologic profile and product differentiation, *Am J Cardiol* **82**, 3L-10L.

Gallagher JT, Walker A (1985), Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin, *Biochem J* **230**, 665-74.

Greinacher A, Holtfreter B, Krauel K, Gätke D, Weber C, Ittermann T, Hammerschmidt S, Kocher T. (2011), Association of natural anti-platelet factor 4/heparin antibodies with periodontal disease, *Blood* **118**,1395-401.

Greinacher A. (2011), Platelet activation by heparin, *Blood* **117**,4686-7.

Griffin CC, Linhardt RJ, Van Gorp CL, Toida T, Hileman RE, Schubert RL 2nd, Brown SE (1995), Isolation and characterization of heparan sulfate from crude porcine intestinal mucosal peptidoglycan heparin, *Carbohydr Res* **276**,183-97.

Gruel Y, Pouplard C, Lasne D, Magdelaine-Beuzelin C, Charroing C, Watier H (2004), The homozygous FcγRIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes, *Blood* **104**, pp. 2791–2793.

Harenberg J. (1990), Pharmacology of low molecular weight heparins, *Semin Thromb Hemost* **16**, 12-8.

Hirsh J, Fuster V. (1994), Guide to Anticoagulant therapy. Part 1: Heparin, *Circulation* **89**, 1449- 68.

Hirsh J. (1991), Heparin, *N Engl J Med* **324**,1565–1574.

Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. (2001), Mechanism of action and pharmacology of unfractionated heparin, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1094-6.

Hirsh J, Raschke R. (2004), Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy, *Chest* **126**,188S-203S.

Hirsh J. (1998), Low-molecular-weight heparin: A review of the results of recent studies of the treatment of venous thromboembolism and unstable angina, *Circulation* **98**, 1575-82.

Holmer E, Kurachi K, Soderstrom G. (1981), The molecular-weight dependence of the rate-enhancing effect of heparin on the inhibition of thrombin, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa and kallikrein by antitrombin, *Biochem J* **193**, 395– 400.

Holmer E, Soderberg K, Bergqvist D, Lindahl U. (1986), Heparin and its low molecular weight derivatives: anticoagulant and antithrombotic properties, *Haemostasis* **16**, 1–7.

<http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>,
26.2. 2013

http://www.haemtech.com/Platelet_Proteins/PF4.htm,
14.3. 2013

https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/htc/index.jsp?&id=htc_010000,
7.3. 2013

Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu BJ, Gatti G. (1983), Structureactivity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin and eliciting high anti-factor Xa activity, *Biochem Biophys Res Commun* **116**, 492– 499.

Chong BH. (2003), Heparin-induced thrombocytopenia, *J Thromb Haemost* **1**, 1471-8.
Johnson EA, Mulloy B. (1976), The molecular-weight range of mucosal-heparin preparations, *Carbohydr Res* **51**, 119-27.

Keeling D, Davidson S, Watson H; Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (2006), The management of heparin-induced thrombocytopenia, *Br J Haematol* **133**, 259-69.

Kelton JG, Warkentin TE. (2008), Heparin-induced thrombocytopenia: a historical perspective, *Blood* **112**, 2607-16.

Kelton JG, Hirsh J. (1980), Bleeding associated with antithrombotic therapy, *Semin Hematol* **17**, 259-91.

Králová S., Klodová D., Gumulec J., Novotný J., Klaricová K., Wróbel M., Brejcha M., Šumná E. (2006), Heparinem indukovaná trombocytopenie, *Vnitř lék* **52**, 98-106.

Kroupis C, Theodorou M, Kounavi M, Oliveira SC, Iliopoulou E, Mavri-Vavayanni M, Melissari EN, Degiannis D. (2009), Development of a real-time PCR detection method for a FCGR2A polymorphism in the LightCycler and application in the heparin-induced thrombocytopenia syndrome, *Clin Biochem* **42**,1685-93.

LAPETINA, E .G., SIEGEL, F. L. (1983), Shape change induced in human platelets by platelet-activating factor. Correlation with the formation of phosphatidic acid and phosphorylation of a 40,000-dalton protein, *J Biol Chem*, **258**, 7241-7244.

Lindahl U, Lidholt K, Spillmann D, Kjellén L. (1994), More to "heparin" than anticoagulation, *Thromb Res* **75**, 1-32.

Linhardt RJ, Rice KG, Kim YS, Lohse DL, Wang HM, Loganathan D (1988), Mapping and quantification of the major oligosaccharide components of heparin, *Biochem J* **254**, 781-7.

Linhardt RJ, Gunay NS. (1999), Production and chemical processing of low molecular weight heparins, *Semin Thromb Hemost* **25**, 5-16.

Loganathan D, Wang HM, Mallis LM, Linhardt RJ. (1990), Structural variation in the antithrombin III binding site region and its occurrence in heparin from different sources, *Biochemistry* **29**, 4362-8.

Ludwig RJ.(2009), Therapeutic use of heparin beyond anticoagulation, *Curr Drug Discov Technol* **6**, 281-9.

Maccarana M, Lindahl U. (1993), Mode of interaction between platelet factor 4 and heparin, *Glycobiology* **3**, 271-7.

Malý M (2003), Antiagregační léčba blokátory adenosindifosfátového receptoru, *Remedia* **13**,110–116.

Marciniak E. (1973), Factor Xa inactivation by antithrombin 3: evidence for biological stabilization of factor Xa by factor V-phospholipid komplex, *Br J Haematol* **24**, 391–400.

Matýšková M, Zavřelová J, Hrachovinová I (1999), Hematologie pro zdravotní laboranty, 2. díl Krevní srážení, pp 7-80, 186-199, IDVPZ Brno, Brno.

Meyer O., Salama A., Pittet N. et al. (1999), Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4), *Lancet* **354**, 1525–1526.

Mohammed A Quader, MD, Lisa S Stump, MS, RPh, and Bauer E Sumpio, MD, PhD, FACS, (1998), Low Molecular Weight Heparins: Current Use and Indications, *J Am Coll Surg* **187**, 641-58

Morel-Kopp M.C., Aboud M., Tan C.W., Kulathilake C, Ward C. (2010), Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies, *Thromb Res* **125**, 234 – 239.

Morel-Kopp MC, Aboud M, Tan CW, Kulathilake C, Ward C. (2010), Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies, *Thromb Res* **125**, 234-239.

Mulloy B, Gee C, Wheeler SF, Wait R, Gray E, Barrowcliffe TW. (1997), Molecular weight measurements of low molecular weight heparins by gel permeation chromatography, *Thromb Haemost* **77**, 668-74.

Napolitano L.M., Warkentin T.E., AlMahameed A, Nasraway S.A. (2006), Heparin-induced thrombocytopenia in the critical care setting: diagnosis and management, *Crit Care Med* **34**, pp. 2898–2911.

Neville GA, Mori F, Holme KR, Perlin AS. (1989), Monitoring the purity of pharmaceutical heparin preparations by high-field ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Pharm Sci* **78**, 101-4.

Novotný J., Konvičková L. (1998), Heparinem indukovaná trombocytopenie – přehledný referát, *Vnitř Lék* **44**, 282–287.

Okuyama T, Yoshida K, Sakurai M et al. (1975), Method of separating and recovering mucopolysaccharides from connective tissue of animals, WO 3862003.

Palm M, Mattsson CH. (1987), Pharmacokinetics of heparin and low molecular weight heparin fragment (Fragmin) in rabbits with impaired renal or metabolic clearance. *Thromb Haemost* **58**, 932–935.

Pauzner R, Greinacher A, Selleng K, Althaus K, Shenkman B, Seligsohn U (2009), False-positive tests for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus, *J Thromb Haemost* **7**, pp. 1070–1074.

Pecka M. (2004), Laboratorní hematologie v přehledu- fyziologie a patofyziologie hemostázy, pp 208-230, FINIDR, Český Těšín.

Pecka M. (2010) Preamalytická fáze. Praktická hematologie, (Pecka M., ed.), pp. 43–55, 317-318, Finidr, Český Těšín.

Penka M, Buliková A, Matýšková A, Zavřelová J (2001), Hematologie I, Neonkologická hematologie, pp 99-175, Grada Publishing, spol s.r.o., Tiskárky Havlíčkův Brod, a.s.

Penka M, Tesařová E a kolektiv (2011), Hematologie a transfuzní lékařství I, Hematologie, pp 27-29, 222-239, Grada, Praha.

Pervin A, Gallo C, Jandik KA, Han XJ, Linhardt RJ (1995), Preparation and structural characterization of large heparin-derived oligosaccharides, *Glycobiology* **5**, 83-95.

Qian Y, Pan J, Zhou X, Weiser P, Lu H, Zhang L. (2010), Molecular mechanism underlines heparin induced thrombocytopenia and thrombosis, *Prog Mol Biol Transl Sci* **93**, 395-421.

Raghavan M, Bjorkman PJ. (1996), Fc receptors and their interactions with immunoglobulins, *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 181–220

Rascu A, Repp R, Westerdal NA, Kalden JR, van de Winkel JG. (1997), Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms, *Ann N Y Acad Sci* **815**, 282–95

RNDr. Jiří Pavlík, CSc., a kolektiv (2005), Aplikovaná statistika, pp 111-115, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, VŠCHT Praha.

Rosenberg RD, Damus PS (1973), The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor, *J Biol Chem* **248**, 6490-505.

Rosenberg RD. (1997), Biochemistry and pharmacology of low molecular weight heparin, *Semin Hematol* **34**, 2-8.

Salmivirta M, Lidholt K, Lindahl U (1996), Heparan sulfate: a piece of informatik, *FASEB J* **10**, 1270-9.

Stewart M.W., Etches W.S., Boshkov K. et al. (1995), Heparin-induced thrombocytopenia: an improved method of detection based on lumi-aggregometry, *Brit J Haematol* **91**, 173–177.

Sussman, f. f. (1992), Normal pathways of coagulation, *Sem Hematol* **29**, 157-158.
Šlechtová J. (2007), Hemostáza – jak ji možná neznáme, *Klin. Biochem. Metab.*, **15**, 97–101).

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J (2005), *Metody molekulární biologie*, pp 73-106, Brno, Masarykova univerzita.

Tomer A., Masalunga C., Abshire T.C. (1999), Determination of heparin-induced thrombocytopenia: A rapid flow cytometric assay for direct demonstration of antibody-mediated platelet activation, *Am J Hematol* **61**, 53–61.

Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W (2006), Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood, *Thromb Haemost* **96**, pp. 781–788.

Vidic H-J (1981), Process for the preparation of heparin, WO 4283530.

Vitale M, Tazzari P, Ricci F, Mazza MA, Zauli G, Martini G, Caimi L, Manzoli FA, Conte R. (2001), Comparison between different laboratory tests for the detection and prevention of heparin-induced thrombocytopenia, *Cytometry* **46**, 290-5.

Voet D., Voetová J. G. (1995), *Biochemie*, pp. 1228-1238, Victoria Publishing, Praha.

Walenga J.M., Jeske W.P., Wood J.J. et al. (1999), Laboratory tests for heparin-induced thrombocytopenia: a multicenter study, *Semin Hematol* **36**, 22–28.

Warkentin T.E. (2003), Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management, *Br J Haematol* **121**, pp. 535–555.

Warkentin T.E., Sheppard J.I. (2006), Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies, *Transfus Med Rev* **20**, pp. 259–272.

Warkentin TE (2005), New approaches to the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, *Chest* **127**, 35S-45S.

Warkentin TE, Kelton JG. (2001), Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia, *N Engl J Med* **344**, 1286-1292.

Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, Kelton JG. (1995), Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin, *N Engl J Med* **332**, 1330-5.

Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ. (1991), A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding, *J Immunol* **147**, 1338–43.

Weitz JI, Hudoba M, Massel D, Maraganore J, Hirsh J. (1990), Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors, *J Clin Invest* **86**, 385–391.

Williams RE (1967), Process for the recovery of heparin, WO 3337409.

Young E, Wells P, Holloway S, Weitz J, Hirsh J. (1994), Ex-vivo and in-vitro evidence that low molecular weight heparins exhibit less binding to plasma proteins than UFH. *Thromb Haemost* **71**, 300 –304.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACT	aktivovaný srážecí čas
ADP	adenosindifosfát
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ASA	kyselina acetylsalicylová
AT	antitrombin III
ATP	adenosintrifosfát
AU	agregační jednotka
COX	cyklooxygenasa
CSF	colony stimulating factors
faktor Xa	trombokinasa
FcγRIIA	destičkový receptor
GAGs	heparinové glykosaminoglykany
HIPA	heparinem indukovaná aktivace destiček
HIT	heparinem indukovaná trombocytopenie
IV	intravenózní dávkování
LMWH	nízkomolekulární heparin
LTA	optická agregometrie
MEA	vícenásobná elektrodová agregometrie
PAR 1,4	proteasový aktivovaný receptor 1, 4
PDGF	růstový faktor z destiček
PF 4	destičkový faktor 4
PPP	plazma chudá na destičky
SC	subkutánní injekce
SK	streptokinasa
SNP	jednonukleotidová záměna
SRA	serotonin uvolňovací test
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA2	tromboxan A2
UFH	nefrakcionovaný heparin
vWF	von Willebrandův faktor