



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta zdravotně sociální  
Katedra

Bakalářská práce

# Laboratorní stanovení fibrinogenu koagulačními metodami

Vypracoval: Kateřina Žillová  
Vedoucí práce: prim. MUDr. I. Vonke  
České Budějovice 2016

## Abstrakt

Vyšetření hladiny fibrinogenu patří bezesporu k velmi důležitým vyšetřením krve. V minulosti se často stávalo, že pacient umřel na vykrvácení. V dnešní době už je známé, že fibrinogen patří k důležitým faktorům srážení krve. Nízké hladiny fibrinogenu totiž vedou ke krvácivým projevům. Naopak zvýšená koncentrace fibrinogenu představuje nezávislý rizikový faktor rozvoje kardiovaskulárních onemocnění a je to také rizikový faktor trombóz. Zvýšenou hladinu fibrinogenu ovšem můžeme najít i těhotných.

Ve své práci bych se ráda zabývala porovnáním hladin fibrinogenu mezi muži a ženami. A případně bych ráda porovнала hladiny fibrinogenu u různých onemocnění.

Další můj cíl je porovnat dva přístroje při vyšetření hladin fibrinogenu.

Fibrinogen je glykoprotein s biologickým poločasem 3-5 dní. Fibrinogen je přítomný v plazmě a v granulích krevních destiček. Je syntetizován v játrech. Fibrinogen je substrátem pro trombin, který fibrinogen štěpí, a to za vzniku fibrinových monomerů. Současně je také substrátem pro plazmin. Dále je štěpen i některými dalšími enzymy, které jsou trombinu podobné. Zároveň je i hlavní krevní bílkovinou podporující agregaci krevních destiček.

V teoretické části své práce bych se ráda věnovala detailnějšímu popisu fibrinogenu a hemostázy. Také bych chtěla zmínit koagulační metody.

V praktické části se budu věnovat preanalytické fázi vyšetřování vzorků, kde bych ráda zmínila i chyby, které v této fázi vyšetření mohou vzniknout. Dále budu popisovat analytickou fázi a krátce zmíním i postanalytickou.

Bylo mi umožněno porovnávat celkem 246 vzorků a k tomu ještě 36 vzorků, které byly změřené na dvou různých přístrojích. Z těchto výsledků jsem potom sestavila tabulky a grafy pro různá porovnání.

**Klíčová slova:** fibrinogen, fibrinolýza, koagulace

## **Abstract**

Fibrinogen level test is undoubtedly one of very important blood tests. In the past it happened quite frequently for a patient to bleed to death. Nowadays it is well known that fibrinogen is one of important factors for blood coagulation. Low fibrinogen levels cause bleeding effects. On the other hand, an increased fibrinogen level represents an independent risk factor of cardiovascular diseases development and also a thrombosis risk factor. But it is possible to diagnose increase fibrinogen level at pregnant women.

I would like to deal in my thesis with comparison of fibrinogen levels at men and women. And I would possibly like to compare fibrinogen levels at various diseases.

Another aim of my thesis is to compare two devices for fibrinogen levels testing.

Fibrinogen je glycoprotein with biological half-life of 3-5 days. Fibrinogen is present in plasma and in platelets granules. It is synthesized in liver. Fibrinogen is a substrate for thrombin, splitting fibrinogen with development of fibrin monomers. Simultaneously, it is a substrate for plazmine. It is also split by some other enzymes, similar to thrombin. It is simultaneously the main seralbumine, supporting aggregation of platelets.

In the theoretical part of my thesis I would like to pay attention to detailed description of fibrinogen and haemostasia. I would also like to mention coagulation methods.

In the practical part I will pay attention to the pre-analytic part of samples testing, where I would also like to mention faults that may appeal in this part of examinations. I will also describe the analytical phase and I will mention the post-analytical phase in brief as well.

**Key words: fibrinogen, fibrinolysis, coagulation**

## **Prohlášení**

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

(jméno a příjmení)

## **Poděkování**

**Děkuji svému vedoucímu práce, panu primáři Vonkemu, za laskavý o vlídný přístup. A také bych ráda poděkovala své rodině, za to, že mě po celou dobu trpělivě podporovali ve studiu.**

## Obsah

Úvod .....	7
1. Historie .....	9
1.1 Historie koagulace .....	9
1.2 Historie koagulační kaskády .....	9
2. Fibrinogen v dnešní době.....	11
3. Fyziologie hemostázy .....	14
3.1 Hemostáza.....	14
3.1.1 Hemostáza od narození po dospělost.....	14
3.1.1.1 Fetální a neonatální hemostáza.....	14
3.1.1.2 Hemostáza dětského věku .....	15
3.1.1.3 Hemostáza pozdního věku .....	15
3.1.2 Složky hemostázy .....	15
3.1.2.1 Cévní stěna.....	15
3.1.2.2 Složka tkáňová.....	16
3.1.2.3 Krevní destičky .....	16
3.2 Primární hemostáza.....	18
3.2.1 Tvorba primární zátky .....	19
3.3 Plazmatický koagulační systém .....	19
3.3.1 Koagulační faktory.....	20
3.3.2 Přehled koagulačních faktorů .....	20
3.4 Fibrinolytický systém .....	21
3.4.1 Štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu .....	22
3.4.2 Štěpení nerozpustného fibrinu .....	23
3.4.3 Aktivace fibrinolýzy .....	23
3.4.1 Hyperfibrinolýza.....	23
3.4.2 Hypofibrinolýza .....	24
3.5 Systémy inhibitorů hemostázy.....	24
4. Koagulační metody .....	25
4.1 Koagulační systémy .....	25
4.1.1 Manuální stanovení.....	26
4.1.2 Přístrojové stanovení .....	26
4.1.2.1 Optické koagulometry.....	26
4.1.2.2 Elektromechanické koagulometry- háčkové.....	26
4.1.2.3 Elektromechanické koagulometry- vibrační .....	27
4.1.2.4 Elektromechanické koagulometry- kuličkové .....	27
4.2 Zákalové systémy .....	27
4.3 Spektrofotometrické systémy .....	27
4.4 Imunochemické systémy.....	28
4.5 Gelační testy .....	28
5. Preanalytická část .....	29
5.1 Osoba pacienta.....	29
5.2 Odběr vzorku .....	30
5.2.1 Odběr venózní krve .....	31

5.2.2 Zkumavky na odebranou krev .....	31
5.2.3 Centrifugace .....	32
6. Cíle a hypotézy .....	33
7. Praktická část .....	34
7.1 Preanalytická část – příjem biologického materiálu .....	34
7.1.1 Odmítnutí biologického materiálu .....	35
7.1.2 Laboratorní informační systém .....	35
7.1.3 Odstředování vzorku .....	36
7.2 Analytická část.....	36
7.2.2 Metody stanovení fibrinogenu.....	37
7.2.2.1 Metoda podle Clause .....	37
7.2.2.2 Kintetická turbidimetrie .....	37
7.2.2.3 Imunochemické metody .....	38
7.2.3 Analyzátory .....	38
7.2.3.1 Analyzátor Sysmex CS- 5100 .....	38
7.2.4 Princip samotné analýzy.....	39
7.2.4.1 Koagulometrická metoda.....	39
7.2.4.2 Chromogenní metoda .....	39
7.2.4.3 Imunologická metoda .....	40
7.3 Postanalytická fáze .....	40
8. Výsledky měření .....	41
8.1 Porovnání hladin fibrinogenu .....	41
8.2 Věkové zastoupení pacientů .....	42
8.3 Závislost hladiny fibrinogenu na věku.....	43
8.4 Porovnání diagnóz .....	45
8.5 Jednotlivé diagnózy .....	45
8.6 Porovnání dvou přístrojů .....	48
9. Diskuze .....	50
10. Závěr .....	52
11. Seznam literatury .....	53

## Úvod

Krvácení je jedním z největších problémů medicíny. Jedná se o problém, který není závislý na věku či rase a postihuje jak nemocné, tak do té doby zdravé osoby. Krvácení se může změnit na fenomén bezprostředního ohrožení života, fenomén dramatické situace, která může vyústit ve fatální životní zvrát (Penka, 2014).

Je nadmíru důležité, aby bylo krvácení podchyceno v co nejkratším časovém intervalu. K tomu, aby terapeutická opatření byla co nejúčinnější, je výhodné jejich řízení podle předem stanoveného laboratorního nálezu. Koagulační testy jsou v tomto směru v naprosté většině koncipovány k průkazu hypokoagulace, a tudíž k detekci nebezpečí krvácení (Penka, 2014).

Mezi základní laboratorní vyšetření řadíme vyšetření krevního obrazu a to včetně vyšetření počtu krevních destiček, dále protrombinový čas, aktivovaný parciální tromboplastinový čas a konečně i stanovení hladiny fibrinogenu (Pospíšilová et al., 2013).

Stanovení těchto testů je velmi citlivé a každá laboratoř má za svůj cíl samozřejmě poskytovat správné a spolehlivé výsledky. Hlavním z předpokladů k dosažení těchto cílů, je správné dodržení podmínek preanalytické fáze, transport biologického materiálu a správné zpracování biologického materiálu. Nedodržení těchto podmínek vede k nekvalitním a hlavně k nesprávně stanoveným výsledkům.



# 1. Historie

## 1.1 Historie koagulace

První zmínka, která byla vyslovena o koagulaci byla pravděpodobně vyřčena nejslavnějším lékařem starověku Hippokratem. Hippokrat zjistil, že krev, která byla získána z obětovaného zvířete, ztuhla po ochlazení. Pokud však bylo vzorkem krve třeseno během odběru a odstranila se z ní vznikající vlákna, zůstala krev tekutá.

Britský lékař, William Harvey, který jako první popsal krevní oběh, připisoval srážení krve tzv. smrti krve (Vidner, 2011).

Významnější objev na poli koagulace pak učinil Polli, jež objevil, že se krev normálně sráží jak na vzduchu, tak v kyslíku či dusíku. Proces koagulace byl oddalován oxidem uhličitým, který je obsažen v atmosféře.

Johannes Muller v roce 1832 objevil nerozpustnou substanci ve sraženině krve „fibrin“ a známý patolog Rudolf Virchow pojmenoval jeho hypotetický solubilní plazmatický prekurzor fibrinogen. Fibrinogen poprvé izoloval Prosper Sylvain Denis v roce 1856. Alexander Schmidt krátce nato dokázal, že přeměna fibrinogenu na fibrin je enzymatický proces a enzym, jenž se na něm podílí, nazval trombin.

V roce 1890 se stal objevitel antikoagulačního efektu citrátu a oxalátu Nicolas Maurice Arthus a předvedl, že přítomnost iontů vápníku je nezbytnou podmínkou ke srážení krve. Některé procesy, které vedly ke srážení krve, se však povedlo vysvětlit až ve 20. století.

## 1.2 Historie koagulační kaskády

Paul Morawitz v roce 1905 poprvé popsal koagulační kaskádu. Také navrhl základní hemostatické schéma. V tomto schématu se uplatňovaly čtyři koagulační faktory: fibrinogen (F I), protrombin (F II), tromboplastin (F III) a vápník (F IV). Celulární složka byla poznána až v polovině 19. století a jejím objevitelem byl nejspíše Alfréd Donné, který popsal krevní destičky. Jejich účast na koagulaci byla popsána v 70. letech 19. století a zásluhy na tom mají Max Schulz a Bizzozzer. Do roku 1983 se

datuje objev glykoproteinových receptorů. Úlohu těchto receptorů popsal Barry Coller (Vojáček, 2003).

Poslední složkou koagulačního systému, která byla popsána byl endotel, který byl po celou dobu považován pouze za pasivní výstelku cévní stěny. Nejmladšího data je práce, která popisuje endotel-celulární interakce. Tyto interakce mají klíčovou roli nejen během hemostázy (Pecka, 2004), ale i v patogenezi řady onemocnění typu aterosklerózy i akutních forem ischemické choroby (Aschermann et al, 2005; Pecka, 2004).

V historii se tedy model koagulační kaskády opakovaně upravoval až po poslední představy komplexního fungování koagulačního systému a jeho napojení na další kaskádové systémy organismu se zapojením buněčných receptorů i extracelulární matrix (Vidner, 2011).

## 2. Fibrinogen v dnešní době

### 2.1 Fibrinogen (faktor I)

Dnes už je všeobecně známo, že fibrinogen je glykoprotein, který je přítomný v plazmě i v granulích krevních destiček. Molekulová hmotnost fibrinogenu je 340kDa. Je syntetizován v játrech (Pecka, 2010).

Hlavním cílem fibrinogenu, při tvorbě koagula, je jeho přeměna na fibrinovou síť. Fibrinogen je tedy syntetizován v játrech a gen pro jeho syntézu je uložen na 4. chromosomu. K jeho funkční formě není nutné, aby zde byl přítomen vitamín K (Pecka, 2004).

Fibrinogen je vláknitý glykoprotein, jenž je složen ze symetrické molekuly, která je tvořena třemi páry řetězců (dvakrát  $A\alpha$ , dvakrát  $B\beta$  a dvakrát  $\gamma$ ). Tato molekula v hemostáze zastává celou řadu prohemostatických i antihemostatických funkcí. Řetězce jsou navzájem propojeny disulfidickými můstky. Z molekuly fibrinogenu se s pomocí trombinu odštěpují fibrinopeptidy A a B (FPA, FPB), přičemž vznikají fibrinové monomery. Tyto monomery pak postupně polymerizují a tvoří se tak primární fibrinová vlákna. Primární vlákna nabývají na tloušťce laterální adicí. Transglutaminační reakce je zajišťována aktivovaným faktorem XIII. Po této reakci, kdy jsou kovalentně spojeny glutaminové zbytky sousedních fibrinových vláken, vzniká definitivní fibrinové koagulum. Fibrinogen má dále tu vlastnost, že výrazně ovlivňuje reologické vlastnosti krve a díky své symetrii, která je dána spojením aktivovaných trombocytů přes jejich receptory GP IIb/IIIa, zajišťuje agregaci destiček. Mimo vazby na trombocyty se fibrinogen dále váže i na receptory aktivovaných leukocytů a endotelií. Fibrinogen je nosičem faktoru XIII. Antihemostatické funkce fibrinogenu spočívají v jeho vazbě aktivního trombinu a ve schopnosti fibrinu potencovat aktivaci PLG přes tPA. Je známo, že afibrinogenemie je spojena s rizikem krvácení, a u pacientů i pokusných zvířat s afibrinogenemií byla prokázána zvýšená generace trombinu. Na druhou stranu, zvýšená koncentrace fibrinogenu představuje nezávislý rizikový faktor rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (Penka, Buliková et al, 2009).

## 2.2 Zvýšené hodnoty fibrinogenu

Koncentrace fibrinogenu v plazmě stoupá u akutních stavů, jako je zánět, trauma, operace, ale i např. infarkt myokardu. V průběhu několika hodin po navození těchto stavů dojde ke zvýšení syntézy fibrinogenu v játrech a jeho hladina se v průběhu 3-5 dnů zvýší na 3-5 násobek výchozí hodnoty. Po této době se vrací k normálu. (Pecka, 2004) Vyšší koncentrace můžeme najít také u chronických zánětů, jako následek zvýšené estrogenní stimulace v těhotenství a u kuřáků (Racek et al, 2006).

Bylo ale zjištěno, že hladina fibrinogenu je také významný nezávislý rizikový faktor aterogeneze. Počet komplikací a rozvoj sklerotických změn jsou úměrné koncentraci fibrinogenu v plazmě před příhodou. Fibrinogen se uplatňuje zvýšenou viskozitou krve, váže na sebe lipoproteiny, infiltruje arteriální stěnu a stimuluje buněčnou proliferaci. Trombogenní efekt fibrinogenu spočívá v podpoře agregace trombocytů a tvorbě fibrinového trombu. Kuřáci mají hodnoty fibrinogenu asi o 0,3g/l vyšší než stejně staří lidé, kteří nekouří. Jelikož koncentrace fibrinogenu stoupá s věkem, lze říci, že hladiny fibrinogenu, a tím i riziko rozvoje aterosklerózy, je u kuřáků v průměru taková jako u nekuřáka, který je starší o 20 let (Racek et al, 2006).

Zvýšené riziko koronární ischemické příhody představuje jakékoliv zvýšení koagulační pohotovosti, stejně jako porucha fibrinolýzy. Jako příklad může sloužit zvýšení koncentrace inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI-1), které je pozorováno u nemocných obézních, s inzulinovou rezistencí a u některých typů mutací genu pro PAI-1 (Racek et al, 2006).

Zvýšená hladina fibrinogenu je také rizikovým faktorem trombózy. Riziko je zvyšováno při hladině nad 3,5 g/l, nad 5 g/l je riziko 3,7 krát vyšší oproti hladině pod 3,5 g/l. Řada studií ukazuje přímou souvislost hladiny fibrinogenu s následnou incidencí aT. Diskutovaným problémem poslední doby je to, zda zvýšení hladiny fibrinogenu spíše neodráží jiné rizikové faktory (včetně vyššího věku). Zvýšená hladina fibrinogenu je zapříčiněna jeho zvýšenou syntézou, anebo jeho sníženou clearancí (Racek et al, 2006; Pecka, 2004).

### **2.3 Snížené hodnoty fibrinogenu**

Některé léky, náhlé přerušení kouření nebo fyzická aktivita, to všechno jsou faktory, které mohou vést ke snížení hodnot fibrinogenu v plazmě. Pokud hladina fibrinogenu klesne na 0,5 g/l dochází většinou ke krvácivým projevům. Také dysfibrinogenémie, která je dnes poměrně častá, se může projevovat krvácivými projevy (Cetkovský et al, 2004).

## **3. Fyziologie hemostázy**

### **3.1 Hemostáza**

Srážení krve řadíme mezi důležitý obranný mechanismus, který pomáhá chránit integritu cévního systému při poranění (Charrin, Vanneste, 1991).

Hemostázu chápeme jako soubor mechanismů, které zabraňují spontánním krvácivým projevům a vedou k zástavě krvácení při poranění cévní stěny. Za fyziologických podmínek hemostáza zajišťuje tekutost krve v inaktivním cévním řečišti. V případě, že je porušena kontinuita cévní stěny, vede krevní srážení k zástavě krvácení. Hemostatická rovnováha je výsledkem normální funkce cévní stěny, krevních destiček a plazmatických činitelů zahrnující systémy koagulační a fibrinolytický a jejich inhibitory. Narušení hemostatické rovnováhy může vyústit na jedné straně v krvácivý stav a na druhé straně ve stavy trombofilní (Matýšková, 1999).

Hemostáza může být zaměňována s hemokoagulací. Přičemž hemostáza je komplexní děj, při kterém dochází k zástavě krvácení. Zatímco hemokoagulace je soubor mechanismů, při kterých se zejména uplatňuje plazmatický koagulační systém.

#### **3.1.1 Hemostáza od narození po dospělost**

Hemostáza je dynamický proces, který prochází, z hlediska vývoje organismu, různými stádii.

##### **3.1.1.1 Fetální a neonatální hemostáza**

Tato hemostáza je nevyzrálá s velmi malou rezervní kapacitou při odpovědi na různé podněty. Koagulační proteiny v tomto období neprocházejí placentární bariérou. Syntéza koagulačních proteinů začíná ve fetu asi v 10. týdnu a jejich koncentrace stoupá tím víc, čím je doba těhotenství delší. Mezi 19. a 29. týdnem je koncentrace koagulačních proteinů asi o 1/3 až 1/2 vyšší než po narození. Kolem 30. až 38. týdne jsou hodnoty faktorů na 1/2 až 3/4 hodnot po narození. U zralého novorozence jsou

hodnoty faktoru K-dependentních a faktorů kontaktu na 1/3 až 1/2 oproti hodnotám, které můžeme naměřit u dospělých. Koncentrace postupně stoupá a asi v 6. měsíci po narození se blíží hodnotám dospělých. Koncentrace fetálního fibrinogenu odpovídá hladině dospělých- fibrinogen má ale sníženou schopnost polymerace (Pecka, 2004).

### **3.1.1.2 Hemostáza dětského věku**

V dětském věku se jednotlivé parametry hemostázy postupně blíží k stejným hodnotám, jako mají dospělí. V tomto období zůstává zachována hemostatická rovnováha, která je velmi křehká a s velmi nízkou rezervní kapacitou. Mírné rozkolísání nestabilní rovnováhy může vést velmi závažným komplikacím. V tomto věku se vyskytuje málo trombóz a trombotických příhod. Rozkolísání rovnováhy vede spíše ke krvácivým komplikacím (Pecka, 2004).

### **3.1.1.3 Hemostáza pozdního věku**

Se stoupajícím věkem (nad 50 let) se hladiny některých faktorů význačně zvyšují (fibrinogen, F VIII, F VIIa). U některých faktorů naopak dochází ke snížení hodnot, a to u protrombinu, F X, AT. Významně se ve vyšších věkových skupinách zvyšují hladiny molekulárních markerů aktivace koagulace a fibrinolýzy oproti mladším věkovým skupinám (Pecka, 2004).

## **3.1.2 Složky hemostázy**

Hemostáza je řízená nejvýhodnější souhrou endoteliální bariéry, trombocytů, aktivačních a inhibičních faktorů koagulační kaskády a fibrinolytického systému (Pecka, 2004)

### **3.1.2.1 Cévní stěna**

Důležitou roli v hemostáze hraje cévní stěna s endoteliální výstelkou. Endotel kontroluje jednak protrombotické děje v případně poškození cévy, jednak udržuje

fluiditu krve za fyziologických podmínek. V místě poranění nastává velmi rychlá, ale přechodná vazokonstrikce, Na jejím vyvolání se podílí více faktorů. Změnu průsvitu cévy zajišťuje střední vrstva elastickými vlákny a hladkou svalovinou. Tím se v okamžiku poranění zabrání unikání krve z krevního řečiště. Krev nemůže v postiženém úseku proudit a tedy ani unikat. Při vazokonstrikci dochází především k organizaci primární hemostatické zátky na obnažené subendotelové pojivové tkáni cévní stěny (Trojan, 2003).

### **3.1.2.2 Složka tkáňová**

Z poraněné tkáně a okolních buněk se uvolňuje ADP, které vyvolává primární agregaci a tkáňová faktor, který způsobí přeměnu protrombinu na trombin (Pecka, 2004).

### **3.1.2.3 Krevní destičky**

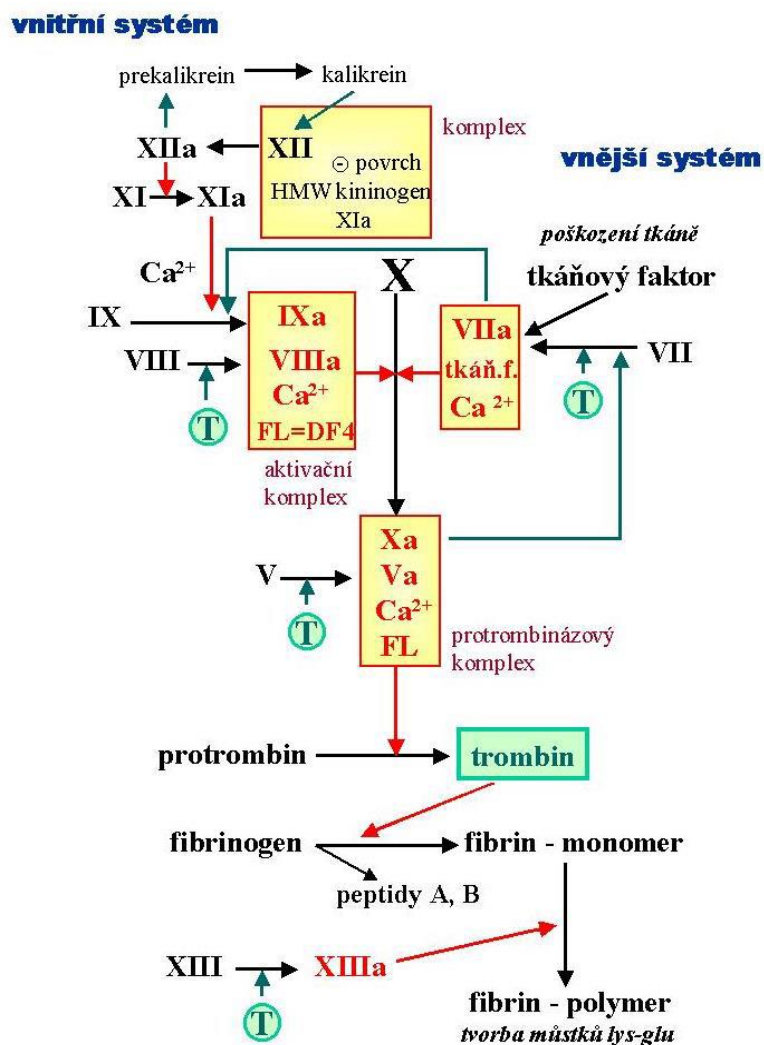
Činnost trombocytů je primárním dějem při poranění nebo poškození cévní stěny a spočívá v jejich adhezi, změně tvaru, agregaci a uvolňovací reakci. Adheze je přilnutí krevních destiček na jakýkoliv povrch s výjimkou dalšího trombocytu. Vedle trombocytů se na ni podílejí struktury subendotelu, plazmatické proteiny a hemodynamické změny. Adheze je přímo lineárně závislá na počtu trombocytů. Zatímco agregace je vzájemné spojení krevních destiček mezi sebou s cílem vytvořit trombus (Pecka, 2004; Matýšková, 1999).

Činností destiček vznikne destičkový (bílý) trombus neboli provizorní hemostatická zátky, která ucpává drobné trhliny.

Při porušení soudržnosti cévní stěny se obnaží subendotelové pojivo a destičky k němu v průběhu několika málo sekund přilnou a adherují. Tato přilnavost je zajištěna dvěma specifickými makromolekulárními proteiny: kolagenem, jehož vláknité struktury jsou hlavní složkou subendotelu a von Willebrandovým faktorem, který je syntetizován cévním endotelem a secernován do plazmy i do subendotelového pojiva. (Pecka, 2004)



Trombocyty se adhezí aktivují a začnou rychle měnit svůj tvar. Činností kontraktilních bílkovin a cytoskeletu se stávají kulovitými a vysílají dlouhé, tenké výběžky-filopodie. Vlivem dalšího aktivátoru destiček- trombinu, jenž se v menším množství rychle vytvoří srážením krve v místě poranění a účinkem dalších stimulujících látek, se destičky začnou shlukovat a zachycují se k sobě navzájem. Mediátorem tohoto děje, tedy agregace, je fibrinogen. Pro něj exponují aktivované destičky na svém povrchu receptory a dimerické molekuly destičky spojují. Současně se z destičkové membrány uvolňuje kyselina arachidonová a je metabolizována na endoperoxidy a tromboxan  $A_2$ . Tyto extrémně labilní látky mají agregační účinky. Podporují růst značného shluku destiček. Adheze, změna tvaru a dosavadní tzv. primární agregace jsou reverzibilní. Destičky se však ještě mohou uvolnit a odplynout krví. Sekundární agregace je ireverzibilní a je spojena s tzv. uvolňovací reakcí, při níž destičky vylučují obsah svých granul. Kromě jiných látek se vylučuje i nejznámější agregačně působící substance-adenozindifosfát. Trombocyty tak mají vlastní účinný amplifikační mechanismus pro rychlé vytvoření velkých agregátů. Dvě pozitivní zpětnovazebné smyčky v podobě uvolňování endoperoxidů a  $TX A_2$  a ADP vylučované z granul. Nakonec se destičky úplně rozpadají a splynou (Trojan, 1994).



Obr. 1 Hemostáza

(Zdroj: www.lfhk.cuni.cz)

### 3.2 Primární hemostáza

Primární hemostáza je proces tvorby primární hemostatické zátky, která uzavírá místo narušení celistvosti cévní stěny a zastavuje tak krvácení. Na primární hemostáze se hlavně podílí krevní destičky a cévní složka (Pecka, 2004).

### **3.2.1 Tvorba primární zátky**

V okamžiku poranění cévní stěny a obnažení subendoteliálních struktur (kolagenu), se ke kolagenním vláknům (GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX) přichytí, prostřednictvím receptorů glykoproteinové povahy, krevní destičky. Tento proces, na kterém se účastní adhezivní proteiny (von Willebrandův faktor, fibronektin), se nazývá adheze. Adhezí se změni tvar trombocytů a společně s aktivací receptorů glykoproteinové povahy se spustí kaskáda biochemických pochodů. Přitom dojde k aktivaci trombocytů. Tento proces aktivace doprovází uvolněním silně působících proagregačních činitelů (ADP, tromboxanu A<sub>2</sub>- TXA<sub>2</sub>, fibrinogenu, aj). Při změně tvaru krevních destiček dojde k přesunu fosfolipidů z vnitřní membránové dvojvrstvy do vnějších membránových struktur. Tento přesmyk, jenž je spojený se změnou náboje povrchových vrstev, se nazývá flip-flop fenomén. Obnažují se také další glykoproteinové receptory- GP IIb/IIIa a dochází k vzájemnému pospojování trombocytů- agregaci. Tato agregace probíhá díky pomoc bivalentních proteinů (fibrinogen, von Willebrandův faktor, vitronektin). Vytváří se bílý rozpustný trombus- primární destičková zátka (Šlechtová, 2007).

### **3.3 Plazmatický koagulační systém**

Plazmatický koagulační systém je myšlena skupinu dějů, které mají vést ke vzniku nerozpustného fibrinu. Při tomto ději dochází postupně k přeměně fibrinogenu na fibrin, potom na fibrinové monomery a tyto monomery následně spontánně polymerují. Polymery fibrinu se pak propojují kovalentními vazbami působením aktivovaného faktoru XIII a vzniká nerozpustný fibrin. Fibrin má tu schopnost, že vytváří vláknitou síť. V této síti se následně zachycují krevní buňky- tvoří se krevní sraženina tzv. stabilní fibrinová zátka. Na smrštění krevní sraženiny se podílejí opět krevní destičky (Pecka, 2004; Šlechtová, 2007).

### 3.3.1 Koagulační faktory

Koagulační faktory se označují římskými číslicemi v posloupnosti podle toho, jak byly objeveny. Aktivované formy se označují písmenem a. V játrech je syntetizována většina koagulačních faktorů a některé faktory ke své syntéze potřebují vitamín K. Vyjma tkáňového faktoru jsou všechny koagulační faktory přítomné v plazmě jako proenzymy a pro svoji aktivitu vyžadují proteolytické štěpení, při němž vzniká koagulačně aktivní enzym (Šlechtová, 2007).

### 3.3.2 Přehled koagulačních faktorů

- Faktor I- fibrinogen- je velký rozpustný protein.
- Faktor II- protrombin- je  $\alpha_2$ -globulin. Při aktivaci je z něj odštěpen lehký N-terminální řetězec.
- Faktor III- tkáňový tromboplastin neboli tkáňový faktor je transmembránový apoprotein, který nabude koagulační aktivity spojením s membránovým fosfolipidem. Vyskytuje se na buňkách, s nimiž přijde krev vyroněná z protržené cévy do styku. Uplatňuje se jako kofaktor v zevním systému.
- Faktor IV- vápenaté ionty- tvoří asi 50% plazmatického kalcia. Jsou nezbytné pro většinu interakcí v koagulační kaskádě.
- Faktor V- proakcelerin- je kofaktorem v komplexu aktivátoru protrombinu.
- Faktor VII- prokonvertin- aktivuje v komplexu zevního systému faktor X.
- Faktor VIII- bývá označován jako antihemofilický faktor. Chybění této složky je nejčastější vrozenou poruchou koagulace a označuje se jako hemofilie A. Uplatňuje se jako regulační protein ve vnitřním systému koagulační kaskády. V plazmě cirkuluje ve vazbě s velkým glykoproteinem nazvaným von Willebrandův faktor. Tento faktor se váže na povrch aktivovaných destiček a účastní se jejich adheze na kolagen.
- Faktor IX- Christmasův faktor- je proenzym, který po aktivaci v komplexu s f. VIIIa, X, d. f. 3 a  $\text{Ca}^{2+}$  přeměňuje f. X na Xa.

- Faktor X-Stuartův-Prowerův faktor- je centrem v řetězu reakcí při tvorbě protrombinového aktivátoru.
- Faktor XI- Plasma Thromboplastin Antecedent- patří mezi proenzymy kontaktního systému.
- Faktor XII-Hagemanův faktor- stojí na začátku vnitřního systému
- Faktor XIII- fibrin stabilizující faktor- podněcuje tvorbu kovalentních vazeb mezi molekulami fibrin-monomeru a tím vytvoření fibrinové sítě.
- Prekalikrein- je součástí kontaktního systému. Jako enzym podporuje aktivaci faktoru XII a i faktoru XI.
- HMWK- High Molecular Weight Kininogen (kininogen o vysoké molekulové hmotnosti)- je kofaktorem ve fázi kontaktu na začátku vnitřního systému.
- Faktor XIV- takto je označován protein C (spolu s proteinem S). Protein C je proenzym antikoagulační serin-proteázy, protein S je jeho kofaktor (Trojan, 2003).

### 3.4 Fibrinolytický systém

Za lýzu fibrinového koagula je zodpovědný fibrinolytický systém. Ale hraje také podstatnou úlohu při degradaci kolagenu, v angiogenezi a u metastáz tumoru. Lidská krev obsahuje enzymový systém schopný rozpouštět krevní fibrinovou sraženinu. Za fyziologických podmínek systém udržuje hemostatickou rovnováhu. Krevní tok výrazně omezuje fibrinové koagulum, a toto může vést při nekontrolované aktivaci i k uzavření cévy (Pecka, 2004).

Fibrinolýza je nepřetržitý proces, který probíhá v normálně fungujícím organismu s vyšší aktivitou během dne a po fyzické námaze a s nižší aktivitou během těhotenství (Pecka, 2004).

Fibrinolýza je v řadě svých aktivačních a reakčních kroků podobná plazmatickému koagulačnímu systému. Plazminogen je hlavní složkou fibrinolytického systému, který je výchozí látkou serinové proteázy – plazminu. Nejdůležitějšími aktivátory

plazminogenu jsou prekurzory serinových proteáz tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) a urokináza (u-Pa) (Lexová et al, 2000).

V případě, že je přítomno fibrinové koagulum nebo fibrinová vlákna, reaguje organismus aktivací fibrinolytického systému (Davie et al, 1991). Plazminogen je navázán na krevní koagulum, je aktivován na plazmin působením aktivátorů, které se uvolní z endotelu. Plazmin proteolyticky působí na koagulum a je nakonec inaktivován cirkulujícími antiplazminy. Fibrinolýza je fyziologicky vázaná na místo poranění a plazmin je generován pouze na povchu koagula. Schopnost fibrinolýzy specifický štěpit fibrin a ne fibrinogen je dána zvýšenou afinitou jak plazminogenu, tak i jeho aktivátoru (t-PA) k fibrinu (Pecka, 2004).

Je také možno aktivovat fibrinolýzu podáním léků, které se nazývají fibrinolytika. Tyto léky aktivují plazminogen, a tím se spouští proces fibrinolýzy. A hlavně je tento proces fibrinolytiky posilován. Tyto léky lze užívat u trombóz a embolií, při kterých je zvýšená srážlivost krve. Aktivace fibrinolýzy se využívá například v případě akutního infarktu myokardu. V této situaci je nutné, v co nejkratší době rozpustit krevní sraženinu, která vedla k ucpání některé koronární tepny a tím se průtok v tepně obnoví (Vokurka et al, 2007).

### **3.4.1 Štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu**

Vzhledem k tématu své práce, bych se ráda věnovala pouze této části fibrinolytického systému.

Při štěpení fibrinogenu a rozpustných fibrinů vznikají fragmenty. Jednak fragmenty vysokomolekulární (X, Y) a jednak fragmenty nízkomolekulární (D, E). Štěpy X a Y mají antipolymerační účinek a tvoří s monomery fibrinu rozpustné komplexy. Tímto zabraňují monomerům fibrinu v jejich polymeraci, tedy ve vzniku fibrinové sítě- v tom se projevuje jejich antikoagulační účinek. Jsou schopny potlačovat agregaci krevních destiček. Štěpy D a E jsou odbourávány MFS (Pecka, 2004).

### **3.4.2 Štěpení nerozpustného fibrinu**

Při proteolytické degradaci nerozpustného fibrinu plazminem probíhá štěpení podobně. Také jsou zde odštěpovány fragmenty X a Y, které se ale vzhledem k příčným kovalentním vazbám od sebe neoddělují. Konečným stádiem této degradace jsou fragmenty o molekulové hmotnosti 182kDa, pojmenované D-dimery. D-dimery jsou odplavovány do obvodové krve. Molekula D-dimeru se skládá ze dvou D-domén, které vznikají z přilehlých fibrinových jednotek. Tyto jednotky jsou spojeny kovalentně Glu-Lys vazbou mezi jejich  $\gamma$  řetězci. Tato kovalentní vazba zajišťuje odolnost D-dimeru proti štěpení plazminem a laboratorní průkaz D-dimeru je přímým důkazem štěpení nerozpustného fibrinu (Pecka, 2004).

Pro rychlost proteolytické degradace fibrinu je určujícím parametrem tloušťka fibrinových vláken. Byla popsána vzájemná závislost mezi rychlostí fibrinolýzy a průměrem vláken. Opticky hustší gely, s většími póry a s tlustšími vlákny a mechanicky méně odolné se rozkládají rychleji, než gely s tenčími vlákny, které vznikají při větší koncentraci trombinu (Bachman, 1994).

### **3.4.3 Aktivace fibrinolýzy**

Aktivace fibrinolýzy je schopnost organismu odbourávat nerozpustný fibrin. Tento proces řadíme mezi základní fyziologické děje v organismu. Aktivita odpovídá za odbourávání již nepotřebného fibrinového koagula po procesu, kdy došlo ke sražení krve a zhojení rány (Pecka, 2004).

### **3.4.1 Hyperfibrinolýza**

Výrazná produkce plazminu je spojována právě s hyperfibrinolýzou. Jde o velmi nebezpečnou klinickou situaci. Je spojována s těžkými krvácivými stavy a někdy může predisponovat až k trombóze. Hyperfibrinolýza může propuknout u nemocných s traumatem v průběhu sepse a u DIK (Pecka, 2004).

### **3.4.2 Hypofibrinolýza**

Hypofibrinolýza vzniká většinou jako následek při poškození nebo nedostatečné funkci některých komponentů v systému fibrinolýzy. Poškozeným komponentem může být defektní molekula, nebo nízká koncentrace t-PA, u-PA a plazminogenu. Dalším může být nedostatečné uvolňování tPA z endotelu, zvýšená koncentrace některých inhibitorů fibrinolýzy, a to zejména PAI-I a  $\alpha$ -2-antiplazminu a konečně i nefunkční kontaktní systém. Hypofibrinolýza je často spojována s vývojem tromboembolické nemoci (Pecka, 2004).

### **3.5 Systémy inhibitorů hemostázy**

Součástí a zároveň i základním regulačním mechanismem koagulace jsou inhibitory krevního srážení. Ve chvíli, kdy je koagulační kaskáda u konce, je docíleno značného zesílení prvotního aktivačního impulsu. Tento sled reakcí, by mohl v krátké době vést k masivnímu srážení krve, k ucpaní cév a následně ke smrti. Základním principem procesů krevního srážení je udržování dynamické hemokoagulační rovnováhy. Podílí se na něm celá řada mechanismů. Při jeho regulaci je nejvýznamnějším účinek fyziologických inhibitorů koagulačního a fibrinolytického systému. Inhibitory krevního srážení jsou přirozené složky krve, které tlumí antikoagulačními mechanismy proces jejího srážení vyvolaný plazmatickým koagulačním systémem a fibrinolýzou. Pozměněné hladiny, případně funkční abnormality některých inhibitorů představují značné riziko pro vznik trombózy (Pecka, 2004).



## 4. Koagulační metody

V plazmě jsou přítomny jednotlivé složky koagulačního systému většinou ve formě neaktivních složek- proenzymů. Aby mohl proběhnout proces srážení, je nutné tyto složky aktivovat. K této aktivaci se používají aktivátory. Jsou to jednak aktivátory nefyziologické- silika, kaolin, celit, jednak aktivátory fyziologické, kam patří tkáňové extrakty nebo čištěné, či rekombinantní aktivované koagulační faktory. Pak jsou zde ještě aktivátory specifické, které mají svá omezení a řadí se sem zmijí enzymy (jedy). Některé hadí enzymy nejsou závislé na inhibitech a aktivují nejen proenzymy, ale i PIVKA formy těchto koagulačních faktorů. Hadích jedů je možné využít i k inaktivaci inhibitorů proteáz, které by jinak v systému běžných koagulačních testů mohly interferovat s některými složkami systému a vykazovat prodloužené hodnoty koagulačních časů (Zima, 2007; Pecka et al, 2010).

### 4.1 Koagulační systémy

Techniky využívané u koagulačních vyšetření jsou založené na tom, že je měřen čas od spuštění reakce až po vytvoření zjizitelného fibrinového koagula či fibrinového vlákna. Tyto naměřené časy se porovnávají s časy, které jsou u normální kontrolní plazmy. Detekce výsledného koagulačního času může být vizuální (pomocí háčku se zjišťuje tvorba fibrinového vlákna, dnes už se ovšem toto stanovení nepoužívá), optická (ze změny transmise světla dopadajícího přes měřící kyvetu na fotočlánek), elektrická (proběhnutí elektrického impulsu přes fibrinové vlákno, které propojí elektrody napájené elektrickým proudem), magnetická (změnou magnetického pole, která se vyvolá změnou viskozity prostředí, ve kterém se pohybuje ocelová kulička nebo vibruje tenký kovový plátek). Metody zjišťují tvorbu polymerového fibrinu, ne fibrinu stabilizovaného faktorem XIIIa (Pecka et al, 2010).

#### **4.1.1 Manuální stanovení**

Dříve se u koagulačního vyšetření používalo manuálního stanovení, kdy se detekce tvorby fibrinového vlákna v koagulačním médiu určovala pomocí pohybu háčku v temperované vodní lázni (37°C). Měřil se čas od okamžiku přidání startovací reagentie až do vytvoření fibrinového vlákna. Tento způsob se dnes prakticky neužívá. Nyní se hojně využívá přístrojové stanovení (Pecka et al, 2010).

#### **4.1.2 Přístrojové stanovení**

##### **4.1.2.1 Optické koagulometry**

Princip stanovení u tohoto vyšetření spočívá v tom, že monochromatické světelné záření prochází kyvetou se vzorkem, která na fotočlánek propouští nebo odráží jen určité množství záření. Optická hustota dopadajícího záření odráží vlastnosti média v aktuálním stavu koagulačního děje. Optická metoda měří snížení optické hustoty po vytvoření fibrinového koagula nebo fibrinového vlákna. Neměří tedy přímo vzniklé fibrinové koagulum. Optické koagulometry mohou mít problémy se stanovením hemolytických, lipnických a ikterických vzorků. Většina těchto optických metod je závislá na hladině fibrinogenu v plazmě. U výraznějších hypofibrinogenemií mohou tyto metody poskytovat nepřesné výsledky (Pecka et al, 2010).

##### **4.1.2.2 Elektromechanické koagulometry- háčkové**

Princip stanovení je takový, že se do měřicí kyvety vloží dvě elektrody. Levá je pohyblivá, pravá pevná. Na elektrody je napojen elektrický proud. Ve chvíli, kdy dojde k vytvoření fibrinového vlákna, proběhne přes toto vlákno elektrický impuls mezi oběma elektrodami a zastaví se ukazatel času (Pecka et al, 2010).

#### **4.1.2.3 Elektromechanické koagulometry- vibrační**

V tomto případě, je zde vibrující plátek s elektromagnetickou detekcí. Vyhodnocuje se změna frekvence vibrací. Ke zvýšení viskozity a ke zpomalení vibrace kovového plátku dochází při tvorbě fibrinového vlákna. Současně se zastaví ukazatel času. Tento přístroj je poměrně citlivý a není prakticky závislý na koncentraci fibrinogenu. Nevýhodou je poměrně obtížná manipulace s vibračními plátky a existuje určité nebezpečí kontaminace vzorku (Pecka a kolektiv, 2010).

#### **4.1.2.4 Elektromechanické koagulometry- kuličkové**

Kovová kulička je, při tomto principu stanovní, držena magnetickým polem ve stejné poloze a pohybuje se zkumavka. V případě, že má prostředí nízkou viskozitu, může kulička procházet celým systémem a působí jako clona zdroje světelného záření. Narůstání viskozity během koagulačního procesu zpomaluje pohyb kuličky. Pokud je kulička vychýlená ze své polohy, proběhne světelný paprsek a fotočlánkem vybuzený elektrický impuls zastaví ukazatel času (Penka et al, 2012; Pecka et al, 2010).

### **4.2 Zákalové systémy**

Zákalové systémy jsou vlastně fotooptické metody. V případě využívání těchto metod se sleduje průchod nebo odraz světla na částicích koloidního charakteru. Patří sem nefelometrie a turbidimetrie. Nefelometrie zjišťuje intenzitu rozptýleného záření na částicích koloidního charakteru v kolmém směru na dopadající světelný svazek (detektor je umístěn v uhlu 90°). Zatímco turbidimetrie zjišťuje změnu optické hustoty po průchodu světelného paprsku systémem koloidních částic (Pecka a kolektiv, 2010).

### **4.3 Spektrofotometrické systémy**

K posouzení koagulační aktivity především některých serinových proteáz nebo inhibitorů koagulačního systému se používají spektrofotometrické metody, při kterých

se využívají syntetické chromogenní substráty. Používají se u přímých, nebo u nepřímých metod. Výhodou těchto metod je stanovení aktivity jednotlivých složek koagulačního systému bez návaznosti na ostatní složky tohoto systému, jako je tomu například u koagulačních metod (Zima, 2007; Pecka et al, 2010).

#### **4.4 Imunochemické systémy**

V hemostáze se hlavně využívají sendvičové ELISA techniky. Jde o kvantitativní metodu, při které se zjišťuje množství látky pomocí detekce antigenu, ne její funkčnost (Pecka et al, 2010).

#### **4.5 Gelační testy**

Jedná se o orientační metody kvalitativního charakteru. Principem je snadno polymerující složka (např. monomer fibrinu), která je v přítomnosti některých látek (protamin, sulfát, etanol) výrazněji polymerovaná, případně tvoří komplexy. V přítomnosti monomerů fibrinu se po přidání protamin sulfátu nebo etanolu do plazmy objeví vločky, vlákna fibrinu, případně se vytváří viditelný gel. Hodnocení se u těchto testů provádí vizuálně (Pecka et al, 2010).

## 5. Preanalytická část

Preanalytická část je nejdůležitější a nedílnou součástí analýzy a mluví se o ní většinou odděleně z důvodu toho, že zahrnuje více dílčích úkolů, které je nutno před vlastní analýzou vzorku splnit, avšak tyto úkony mohou být a často i jsou, rozhodující pro ovlivnění výsledku. Preanalytická část zahrnuje přípravu pacienta, vlastní odběr, zaslání odebraného vzorku do laboratoře a přípravné práce, někdy i skladování, před provedením vlastní analýzy v laboratoři. Preanalytickou část můžeme rozdělit do dvou skupin a to je- preanalytická část mimo laboratoř a preanalytická část v laboratoři. Dohromady tyto fáze činí asi 56% celkové časové náročnosti laboratorního vyšetření, tedy více jak polovinu a proto je nutné dbát na důležitost preanalytiky (Racek et al, 2006).

V preanalytickém období mohou výsledek ovlivnit tyto faktory:

- osoba pacienta
- odběr vzorku
- transport vzorku
- uchovávání vzorku před analýzou
- příprava vzorku ke zpracování (Racek et al, 2006).

### 5.1 Osoba pacienta

V této fázi mohou vyšetření ovlivnit jednat faktory, které nelze ovlivnit, ale musíme je vzít v úvahu, vzhledem k pozdějšímu hodnocení výsledku, jednak faktory, které jsou ve většině případů ovlivnitelné a jejichž účinek na laboratorní vyšetření můžeme eliminovat (Racek et al, 2006).

Mezi faktory neovlivnitelné řadíme:

- pohlaví: na pohlaví nezávisí většina výsledků laboratorních testů
- rasa, etnická či sociální skupina obyvatel: je známá odlišná frekvence výskytu některých onemocnění či distribuce krevních skupin u příslušníků různých ras

- věk
- cyklické změny
- gravidita
- současně probíhající jiná nemoc
- biologický poločas stanovované látky
- způsob stanovení referenčních hodnot

Mezi faktory ovlivnitelné řadíme:

- fyzickou aktivitu
- psychický stres
- vliv potravy, alkoholu a tekutin
- kouření
- léky
- operace

## **5.2 Odběr vzorku**

Krev obsahuje erytrocyty, leukocyty a trombocyty, které jsou rozptýlené v plazmě. Ve chvíli, kdy je krev mimo krevní řečiště, stává se srážlivou, což zapříčiňuje přeměna rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin (Chromý et al, 2002).

Plazma je tekutá složka krve, je to její nejobjemnější část. Má jantarově nažloutlou barvu. V případě, že je plazma načervenalá, značí nám to hemolýzu, mléčné zakalení poukazuje na emulgované tukové kapénky. Pak mluvíme o tzv. chylózním vzorku. Plazma je tvořena z 90 % vodou, zbytek tvoří organické látky a anorganické soli. Při použití plazmy k vyšetření, musíme krev odebrat do zkumavek s protisrážlivým účinkem, tím získáme plazmu z krve (Chromý et al, 2002).

Sérum získáme tak, že necháme krev srazit. Odebraná krev tedy musí být ve zkumavce s polárním povrchem a bez antikoagulací. Sérum je svým složením velmi podobné plazmě, avšak chybí v něm srážlivé látky, včetně fibrinogenu (Chromý et al, 2002).

### **5.2.1 Odběr venózní krve**

Při vyšetření se nejčastěji využívá krve, která se odebere z vena cubitalis. Svoji úlohu při tomto odběru hraje i poloha pacienta. Pokud pacient u odběru stojí, může se stát, že dojde k tomu, že se tekutina z intravazálního prostoru přesune do intersticia a může dojít k vzestupu koncentrace vysokomolekulárních látek v krvi včetně hematokritu a to až o 10-15%. Toto může nastat i v případě, když je paže stažena turniketem po dobu delší než 1 minuta, anebo po delším cvičení se staženou paží. Proto je lepší poloha vleže a při opakovaném odběru není doporučováno měnit polohu. K hematologickému vyšetření se používá většinou druhá, případně další odběrová nádobka. První se nepoužívá a to proto, že odběrový systém není zcela inertní k fyziologickým vlastnostem krvinek a plazmy (Racek et al, 2006; Pecka et al, 2010).

Při odběru venózní krve může být ovlivněn výsledek nejen polohou, ale například i dezinfekcí, která je použita na kůži. Je-li použita dezinfekce Ajatin, může dojít k hemolýze. Při nasávání krve je třeba, aby došlo k eliminaci přílišného podtlaku, který může vést k mechanické hemolýze (Racek et al, 2006).

Před odběrem krve, by měl pacient dodržovat určitá pravidla, aby nedošlo k chybě v preanalytické fázi. Rozhodně by měl být pacient před odběrem nalačno, poslední jídlo by mělo být večer před odběrem a ráno se může pacient napít malého množství vody, nebo neslazeného čaje. V určitých případech je nutné dodržovat i dietu. Pokud pacient užívá nějaké léky, které by mohly mít vliv na výsledky odběru, měl by pacient tyto léky vysadit alespoň 24- 72 hodin před odběrem. Což se ve většině případů ovšem neděje, takže je důležité v žádance o vyšetření uvést léky, které pacient užívá.

### **5.2.2 Zkumavky na odebranou krev**

Na odebranou krev se používají komerčně vyrobené zkumavky, které obsahují přesně definované množství antikoagulačního nebo koagulačního činidla.

Antikoagulační činidla jsou látky vytvářející komplexy s ionty endogenního vápníku, který je nutný pro srážení krve. Používají se draselné nebo sodné soli kyseliny citronové nebo šťavelové nebo EDTA. Heparin je dalším činidlem, jenž má jiný

mechanismus působení. Aktivuje inhibitor krevní koagulace, zejména antitrombin III. Nesrážlivá krev se používá nejvíce v hematologii (Chromý et al, 2002).

Krev se odebírá do tzv. uzavřeného systému, což znamená odběr do vakuované zkumavky z plastu. Zkumavky mají objem v rozmezí od 2 ml do 10 ml, uzavírají se umělohmotnou zátkou, která je přizpůsobena pro vpich jehly. Zátky jsou rozlišené různými barvami, podle toho, které antikoagulační nebo koagulační činidlo obsahují. Toto barevné rozlišení je dáno normou ISO. Jsou výlučně na jedno použití.

Ze zkumavky, ve které je antikoagulační činidlo, získáme krev nesraženou a plazmu a ze zkumavky s koagulačním činidlem získáme sraženou krev. Ke koagulačnímu procesu je ovšem potřebujeme zhruba 30 minut a po následné centrifugaci získáme sérum (Chromý et al, 2002).

### **5.2.3 Centrifugace**

Pro následné vyšetření krve je nutná její centrifugace. Krev odstředíme 5-10 minut při 1000- 2000 otáčkách za minutu. Teplota je 18- 25 °C. Pokud by se prováděl hemokoagulační test, měli bychom odstředovat krev asi 15 minut při 2000 otáčkách. Jestliže se provádí centrifugace vzorků v separačním gelu, centrifugaci nelze opakovat (Chromý et al, 2002).



## 6. Cíle a hypotézy

Cílem mé práce je:

1. Seznámit se s metodou vyšetření fibrinogenu, která je používána v Nemocnici České Budějovice, a. s.
2. Porovnání dvou přístrojů, které jsou využívány k vyšetření fibrinogenu.

Hypotézy mé práce jsou:

1. Vyšetření hladiny fibrinogenu bude u více jak poloviny vzorků nad hodnotu 4,2 g/l.
2. Fibrinogen stoupá se zvyšujícím se věkem.
3. Při porovnávání dvou přístrojů se výsledky nebudou lišit.

## 7. Praktická část

V této části bych se chtěla zabývat popisem toho, jak jsem pracovala se vzorky od preanalytické fáze až po postanalytickou fázi.

### 7.1 Preanalytická část – příjem biologického materiálu

Biologický materiál se přepravuje v boxech, které jsou určeny pro přepravu tohoto materiálu. Zkumavky pro naše vyšetření se přepravují v boxech při standardní laboratorní teplotě 25 °C.

Materiál se přijímá v laboratoři, kam se dostává z různých oddělení v nemocnici, případně i z jiných externích pracovišť. Při předávání materiálu je důležité, aby laborantka, která materiál přijímá, zkontrolovala stav přijímaného materiálu, hlavně to, zda nejsou například nějak poškozeny zkumavky.

Pro vyšetření na fibrinogen se přijímá venózní krev ve zkumavkách BD Vacutainer, které mají objem 4,5 nebo 2,7 ml. Zkumavky obsahují protisrážlivé činidlo pufrovaný citrát sodný (3,8 %), v poměru 9+1. Do laboratoře by se měl biologický materiál dopravit co nejdříve, nejpozději však do dvou hodin od odběru.

Velice důležité je při přijímání biologického materiálu přiřadit k žádankám správné zkumavky. Už při tomto kroku totiž vzniká spousta chyb, které později vedou k špatnému výsledku. Zkumavka musí být správně popsána. Musíme na ní najít příjmení, popřípadě i křestní jméno pacienta a rok narození. Dále musíme zkontrolovat, zda tyto údaje souhlasí s údaji na žádance. Potom musíme zkontrolovat také to, zda krev byla odebrána do správné zkumavky.

Na každé žádance musí být:

- jméno a příjmení pacienta
- rodné číslo
- kód pojišťovny
- datum a čas odběru
- diagnóza

- podpis a razítko lékaře
- označená požadovaná vyšetření

### **7.1.1 Odmítnutí biologického materiálu**

Důležité při přijímání biologického materiálu je, zkontrolovat žádanku i zkumavky s biologickým materiálem. Laborantka po kontrole může biologický materiál odmítnout a to z důvodů:

- nepopsané odběrové zkumavky
- odběrová zkumavka je nevhodná pro požadované vyšetření
- na žádance chybí nějaký údaj
- údaje na žádance nejsou stejné, jako údaje na zkumavce
- poškození zkumavky
- vylití biologického materiálu ze zkumavky
- nedodržení požadovaného objemu biologického materiálu pro dané vyšetření
- sražení vzorku

Pokud nastane některý z těchto důvod, musí se provést o tomto zápis do LISu a do deníku neshod při přijímání materiálu. Musí se zapsat datum a oddělení, ze kterého poškozený vzorek přišel, číslo žádanky, jméno a příjmení pacienta a důvod odmítnutí vzorku.

Pokud není možné vzorek zpracovat, musí se o tomto informovat lékař, od kterého poškozený vzorek přišel a požadovat nový odběr vzorku.

### **7.1.2 Laboratorní informační systém**

Údaje ze žádanky je třeba převést do laboratorního informačního systému, aby mohlo být provedeno požadované vyšetření. V nemocnici v Českých Budějovicích se používá informační systém Fons Open Lims, který je propojen s nemocničním informačním systémem. Pokud tedy zadáme rodné číslo pacienta do LISu, zobrazí se nám o tomto pacientovi všechny dostupné informace, například i vyšetření z jiných

laboratoří. Pokud ovšem pacient žádná předchozí vyšetření neměl, je třeba všechny potřebné údaje do systému zadat. Automaticky se nám však zadává čas a datum zápisu do systému. Pokud tedy zadáme rodné číslo, získáme pro pacienta laboratorní číslo, které se vytiskne na štítky s čárovým kódem. Jeden štítek se nalepí na zkumavky, další pak na žádanku.

### **7.1.3 Odstřed'ování vzorku**

Před samotnou analýzou vzorku je nutné ještě vzorek připravit. Pro vyšetření na koncentraci fibrinogenu je nutné vzorky odstředít (zcentrifugovat).

Při odstřed'ování se oddělují krvinky od séra, nebo plazmy. U odstředivek je využito odstředivé síly. Ve chvíli, kdy se dají zkumavky do odstředivky je nutné, aby odstředivka byla vyvážená. Pokud máme sudý počet zkumavek, nenastává žádný problém, ovšem ve chvíli, kdy jich máme lichý počet, musí sudou zkumavku se vzorkem zastoupit stejně velká zkumavka s vodou. Poté se zavře pečlivě víko centrifugy, nastaví se počet otáček a doba, po kterou chceme vzorek odstřed'ovat.

Po odstředění vzorku je třeba zkontrolovat, jestli není plazma chylózní, nebo hemolytická a poté se zkumavky vloží do stojánku. V případě, že by k tomu došlo, je třeba toto oznámit, protože by mohlo dojít ke zkreslení výsledků. Je nutné požadovat nový odběr vzorku.

## **7.2 Analytická část**

Fibrinogen se stanovuje metodami, které se zaměřují buď na schopnost jeho přeměny na fibrin, nebo sledují pouze jeho množství- přítomnost molekuly fibrinogenu.

Fibrinogen stavujeme v hmotností koncentraci v g/l a fyziologické meze jsou od 1,8 g/l do 4,2 g/l. Za zvýšené hodnoty tedy považujeme koncentraci nad 4,2 g/l.

## **7.2.2 Metody stanovení fibrinogenu**

### **7.2.2.1 Metoda podle Clause**

Fibrinogen se stanovuje jako množství klotabilní bílkoviny. Princip metody spočívá v koagulačním stanovení ředěné plazmy v nadbytku trombinu. Pokud jsou použity vysoké koncentrace trombinu a nízká koncentrace fibrinogenu (10x méně, než je jeho fyziologická hodnota- tato hodnota se získá naředěním vyšetřované plazmy v přístroji) je gelační čas úměrný koncentraci fibrinogenu a nezávislý na množství trombinu. Pokud plazmu naředíme, potlačíme tlumící vliv inhibitorů koagulace. Výsledek se následně odečte z kalibrační křivky v g/l (Pecka et al, 2010).

Stanovení ovlivňují jednak faktory, které působí na aktivní místo trombinu, tak i faktory ovlivňující polymerizaci fibrinu (Pecka et al, 2010).

Optické koagulometry, které využívají nefelometrickou nebo turbidimetrickou „end point“ detekci, odvozují koncentraci fibrinogenu v plazmě z kinetického měření účinnosti protrombinázy. Celkové zvýšení turbidity systému je u těchto metod přímo úměrné koncentraci fibrinogenu jako klotabilní bílkoviny. Metoda velmi dobře koreluje s Clausovou metodou. Může se také používat jako orientační metoda ke zjištění hladiny fibrinogenu v plazmě. Avšak nelze ji používat jako náhradu Clausovy metody (Pecka et al, 2010).

### **7.2.2.2 Kinetická turbidimetrie**

Tato metoda zjišťuje množství fibrinogenové frakce v plazmě. Test zachytí pouze změny v plazmatické koncentraci fibrinogenu.

Princip metody spočívá ve využití hadího jedu Batroxobinu (reptiláza). Batroxobin a jemu podobné zmijí enzymy aktivují hemostatické procesy, při kterých dochází ke štěpení fibrinogenu na fibrin. Zákal, který vzniká v inkubační směsi, se měří turbidimetricky při 330- 340 nm kinetickým postupem. Z hodnot absorbací před a po této přeměně se zjistí koncentrace fibrinogenu ve vyšetřovaném vzorku. Metoda má vhodný měřicí rozsah, velmi dobrou přesnost a může být snadno prováděna v automatických měřících systémech (Pecka et al, 2010).

### **7.2.2.3 Imunochemické metody**

Imunochemické metody nejsou schopny odlišit mezi funkčním fibrinogenem a inaktivní nebo pozměněnou formou fibrinogenové molekuly. Poskytují většinou vyšší hodnoty, než funkční testy. ELISA testy ke stanovení fibrinogenu nenašly v rutinní praxi významnější uplatnění (Pecka et al, 2010).

### **7.2.3 Analyzátoři**

Samotná analýza byla provedena na přístrojích Sysmex CS- 5100 a Sysmex CA-7000. Přičemž na přístroji Sysmex CS- 5100, mám k dispozici vzorků pro porovnání. A potom ještě 36 vzorků, které byly podrobeny analýze na obou přístrojích, a to z důvodu přechodu z CS- 5100 na CA- 7000.

#### **7.2.3.1 Analyzátor Sysmex CS- 5100**

Přístroj umožňuje současné měření koagulačních, chromogenních a imunologických testů. Zdroj světla je lampa. K dispozici jsou vlnové délky 340, 405, 575, 660 a 800 nanometrů. Do přístroje možno vložit současně až 100 vzorků. Přístroj skenuje vzorek při vlnových délkách 405, 575 a 660 nm a detekuje ikteritu, lipemii a hemolýzu. Rovněž kontroluje naplnění primární zkumavky dle uživatelem zadaných kritérií.

- Uživatelsky definovatelná automatická rediluce a reanalýza.
- Kontinuální doplňování vzorků, reagensů a kyvet.
- Současné měření vzorků, kalibrací a kontroly kvality.
- Čtečka čárových kódů pro vzorky i reagensie.
- 2D čtečka čárových kódů pro načítání hodnot a šarží kalibrátorů a kontrol.
- Paměť na výsledky od 10000 vzorků.
- Obousměrná komunikace s LIS, externí tiskárna.
- Program kontroly kvality, včetně statistického hodnocení. "
- Management uživatelů- přístup jednotlivých uživatelů jištěn heslem.

### **7.2.3.2 Analyzátor Sysmex CA-7000**

CA- 7000 je plně automatizovaný koagulační analyzátor pro In Vitro diagnostiku, který je schopen rychle a s velkou přesností zpracovat velký objem vzorků. Analýzu vzorků provádí s použitím metody koagulační, chromogenní a imunologické metody. Analyzátor má k dispozici velký počet zabudovaných funkcí, včetně prioritního zpracování statimových vzorků a kontroly kvality. Zpracovaná data mohou být v analyzátoru uložena, zobrazena nebo vtištěna (uživatelský manuál, 2012).

Samotná analýza je provedena poté, kdy jsou zadány informace o analýze, a to do programu Work List. Tato informace může být zadána jedním z následujících způsobů:

- manuální zadání- informace se zadá manuálně na obrazovku
- on-line registrace- čísla racků a ID vzorků jsou zadávána manuálně, ale parametry analýzy se přenášejí z HOST computer
- On-line registrace- parametry analýzy jsou získány z HOST, ID vzorků jsou načítány čtečkou čárových kódů.

### **7.2.4 Princip samotné analýzy**

#### **7.2.4.1 Koagulometrická metoda**

1. Detekce koagulační reakce – červené světlo, prochází směsí krevní plazmy a reagentie. Změnou fibrinogenu na fibrin dojde ke změně zákalu a tím i ke změně intenzity rozptýleného světla. Takto je měřen koagulační čas.

2. Průkaz bodu koagulace- čas nutný k dosažení určitého množství rozptylu světla, které je nastaveno pro bod detekce koagula. Za start detekce se považuje rozptyl světla 0% a za kompletní koagulaci je považován rozptyl světla 100%.

#### **7.2.4.2 Chromogenní metoda**

Pokud je použita reagentie s chromogenním substrátem, měří se změna zabarvení vzniklá uvolněním p- nitroanilinu jako změna absorbance při 405 nm. Vypočítá se změna optické hustoty za časový interval.

#### **7.2.4.3 Imunologická metoda**

Pokud je použita latexová reagencie, měří se změna absorbance vzniklá tvorbou latexového agregátu při reakci protilátka- antigen. Měří se při 575 nebo 800 nm po kontaktní časový interval.

### **7.3 Postanalytická fáze**

Výsledky z měření jsou přeneseny do LISu. Výsledky kontroluje laborantka s vysokoškolským vzděláním, ta výsledky propouští, ale samotnou interpretaci výsledků má na starosti lékař u lůžka. Na různá oddělení nemocnice se výsledky dostávají prostřednictvím nemocničního informačního systému. Tištěné výsledky roznáší zřízenci v rámci nemocnice. Doktor dostává výsledky on-line.

I v této fázi vznikají chyby. Základními postanalytickými vlivy jsou:

- informace o kritických hodnotách jednotlivých vyšetření a analýz
- transport výsledků na klinické jednotky
- nekvalitní tisk výsledků
- chyby při výdeji výsledků (záměna výsledků, chybná interpretace výsledků, chybná desetinná čárka či jednotka měření, aj.)
- nedostatečná či chybná komunikace mezi laboratoří a klinickou jednotkou
- chybná klinická interpretace
- chybné uvedení odpovídajících referenčních intervalů (fyziologických mezí) a kritických mezí (cut off, mez stanovitelnosti a detekce)



## 8. Výsledky měření

Porovnávala jsem celkem 246 vzorků, z toho 216 vzorků od žen a 30 vzorků od mužů. Potom jsem ještě porovnála 36 vzorků, které byly měřené na přístroji Sysmex CS- 5100 a na přístroji Sysmex CA- 7000, a to s použitím reagensů stejné šarže.

Fibrinogen se stanovuje ve fyziologických mezích od 1,8 do 4,2 g/l. Za zvýšené se považují hodnoty od 4,2 g/l.

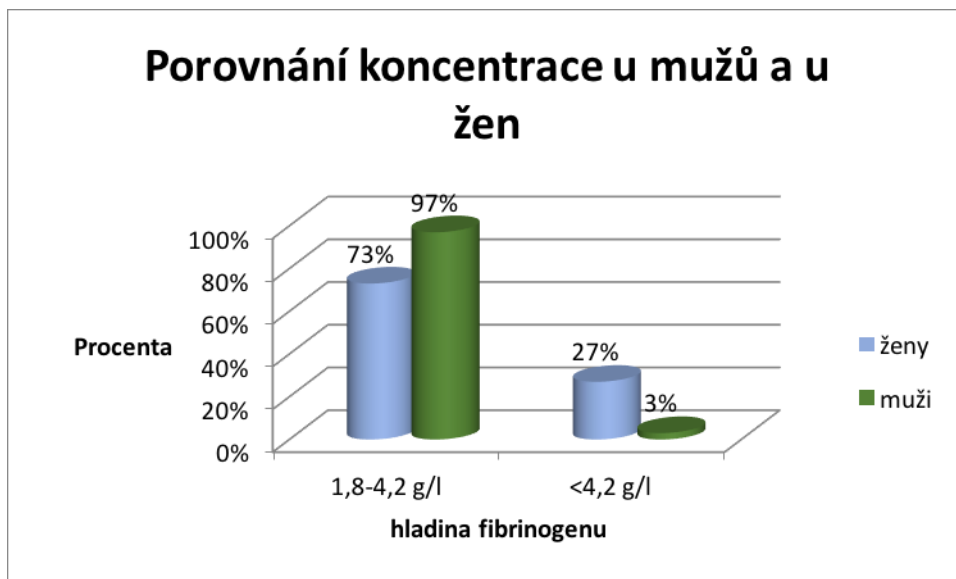
### 8.1 Porovnání hladin fibrinogenu

Tabulka 1: koncentrace fibrinogenu u mužů a u žen

Koncentrace fibrinogenu	>1,8 g/l	1,8 – 4,2 g/l	< 4,2 g/l
Ženy	0	158	58
muži	0	29	1

V tabulce č. 1 můžeme vidět, že hladina fibrinogenu byla u 158 žen a u 29 mužů v normálu. Zvýšená hladina fibrinogenu byla naměřena u 58 žen a pouze u jednoho muže.

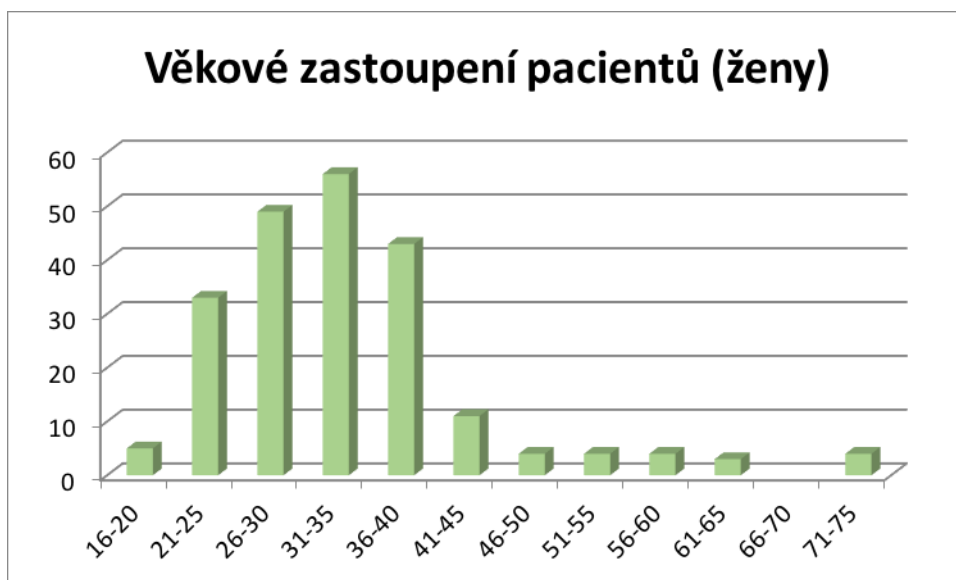
Graf 1: Porovnání koncentrace u žen a u mužů



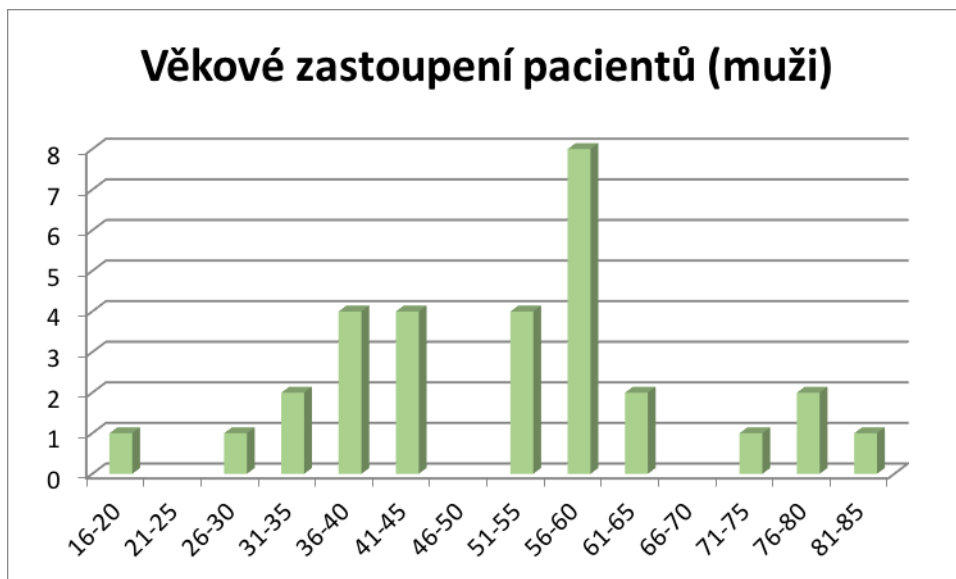
Z grafu č. 1 je patrné, že hladina fibrinogenu byla u 73 % žen a u 97 % mužů v normálu, avšak u 27 % žen a u pouhých 3 % mužů byla hladina fibrinogenu zvýšená.

## 8.2 Věkové zastoupení pacientů

Graf 2: Věkové zastoupení pacientů (ženy)



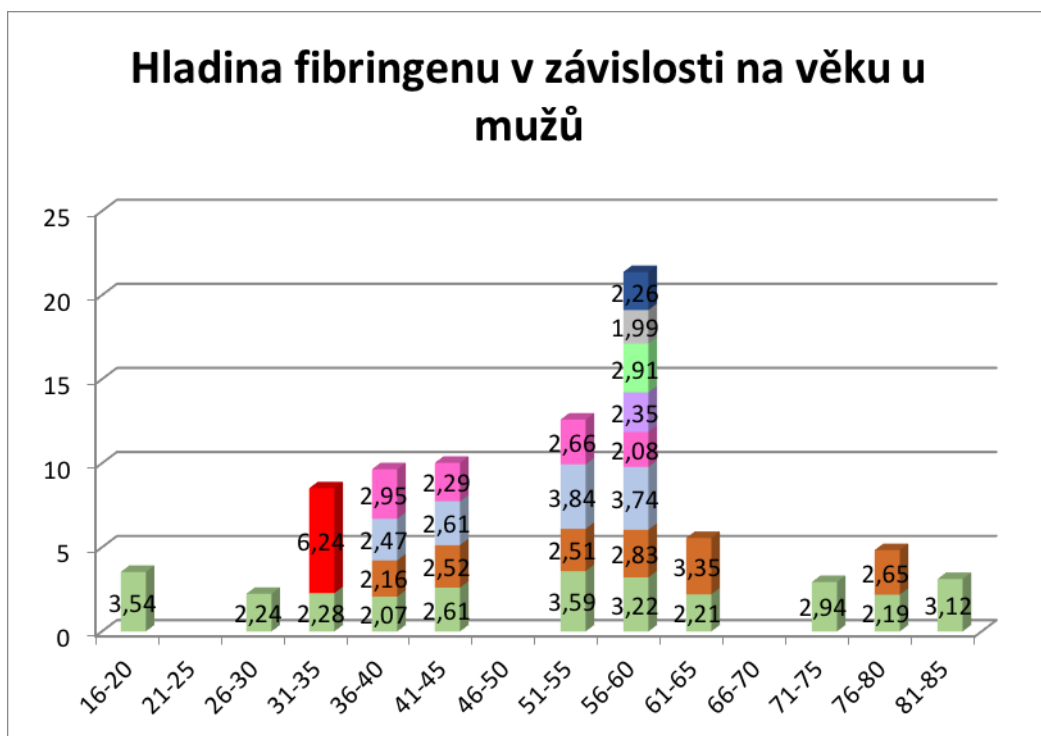
Graf 3: Věkové zastoupení pacientů (muži)



Z grafu č. 2 a 3 můžeme vidět největší zastoupení u žen ve věku od 21 do 40 let. U mužů je tomu ve věku 56-60 let.

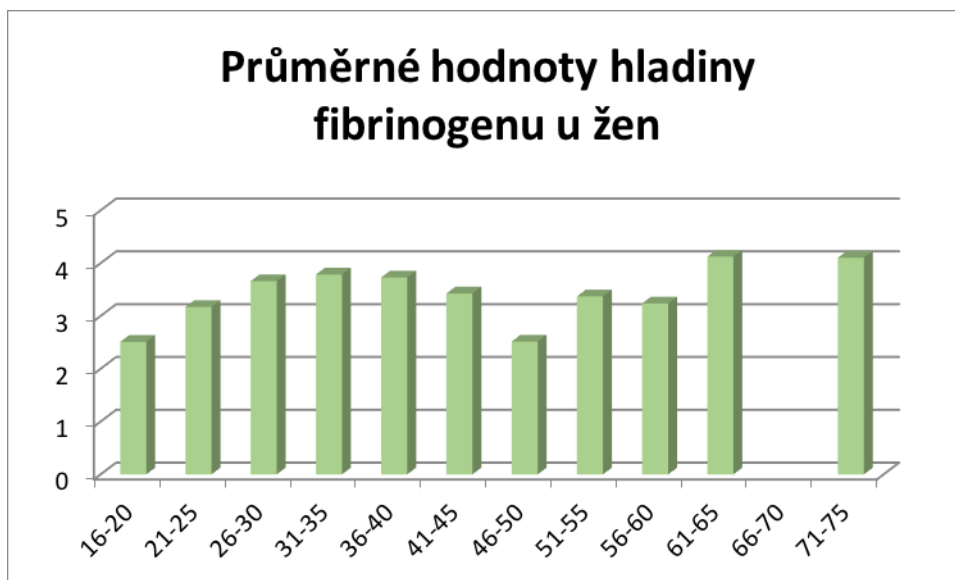
### 8.3 Závislost hladiny fibrinogenu na věku

Graf 4: hladina fibrinogenu v závislosti na věku u mužů



Na grafu č. 4 můžeme vidět, že se hladina fibrinogenu u mužů moc neměnila. Červeně je vyznačený jeden pacient, který měl hodnoty fibrinogenu zvýšené.

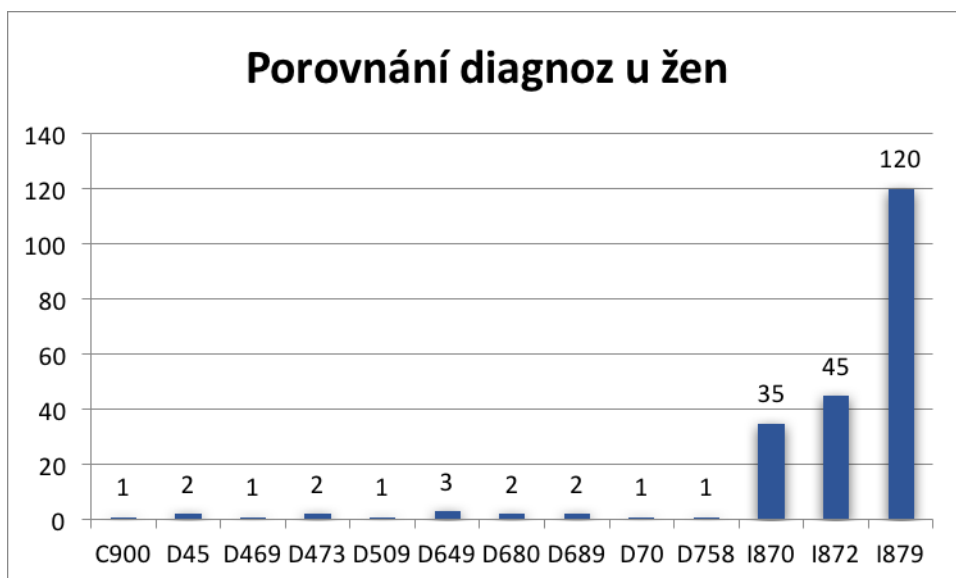
Graf 5: průměrné hodnoty hladiny fibrinogenu u žen



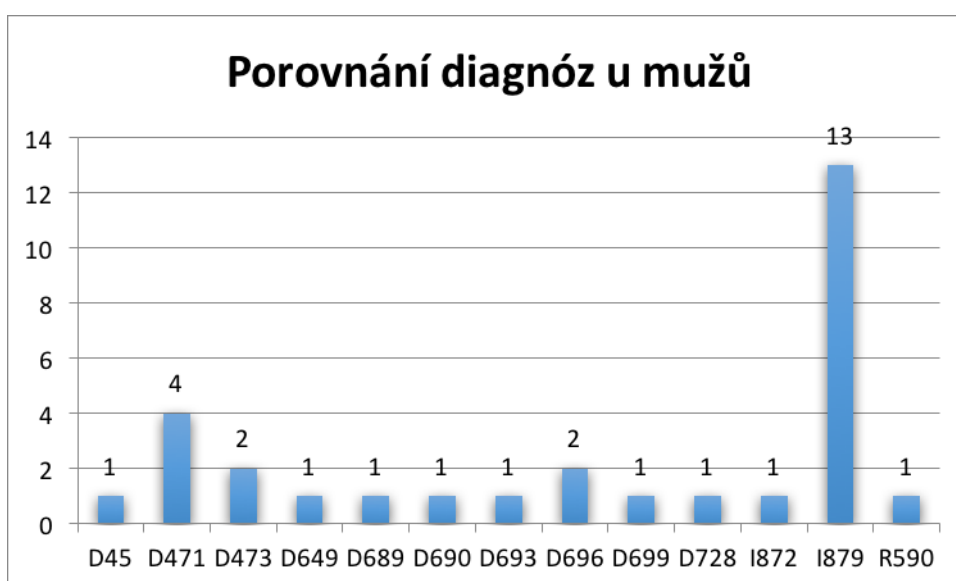
Graf č. 5 slouží k tomu, abych zjistila, zda hodnoty hladiny fibrinogenu stoupají v závislosti na věku.

## 8.4 Porovnání diagnóz

Graf 6: porovnání diagnóz u žen



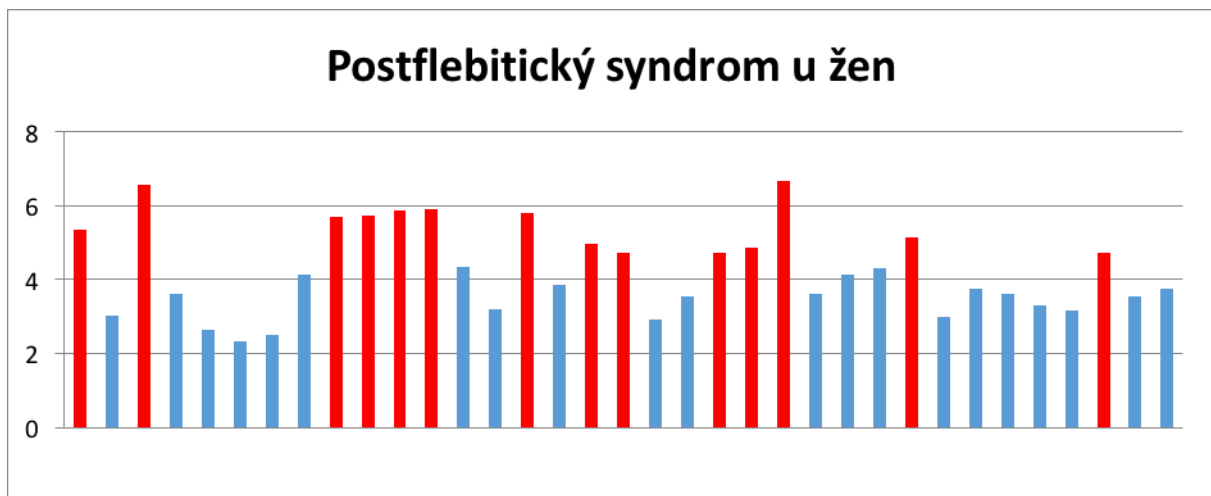
Graf 7: porovnání diagnóz u mužů



## 8.5 Jednotlivé diagnózy

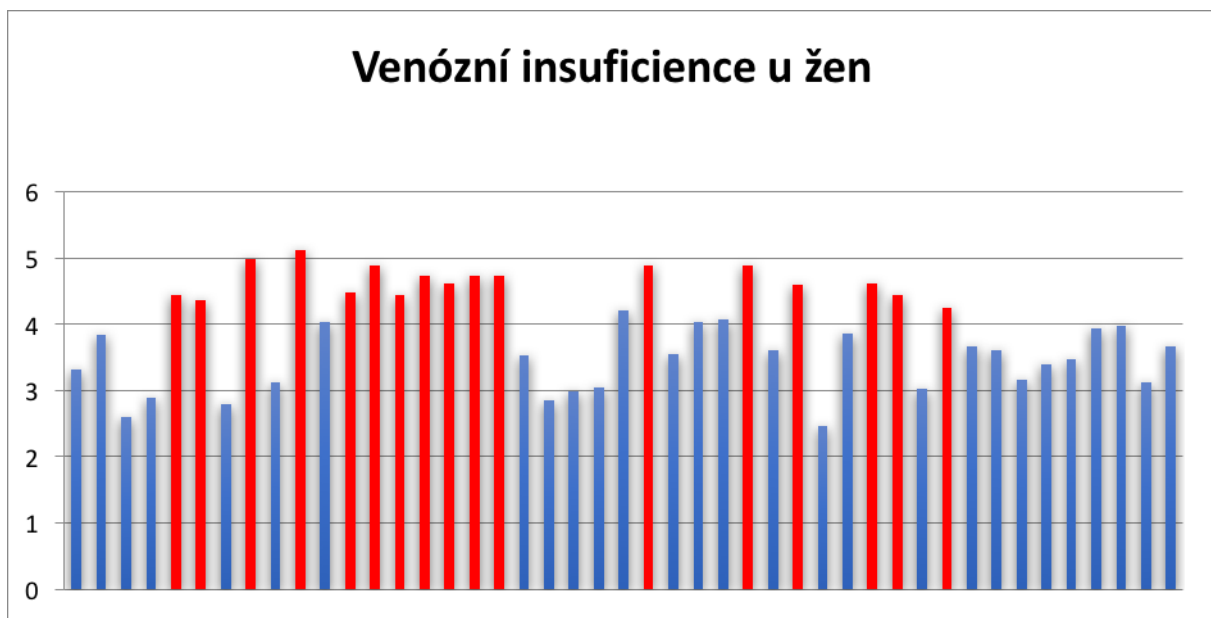
U jednotlivých diagnóz mě ještě zajímalo, jaké jsou hladiny fibrinogenu u jednotlivých pacientů. Vybrala jsem si pouze ty diagnózy, u kterých bylo více pacientů, abych měla lepší porovnání.

Graf 8: postflebitický syndrom u žen- diagnóza I870.



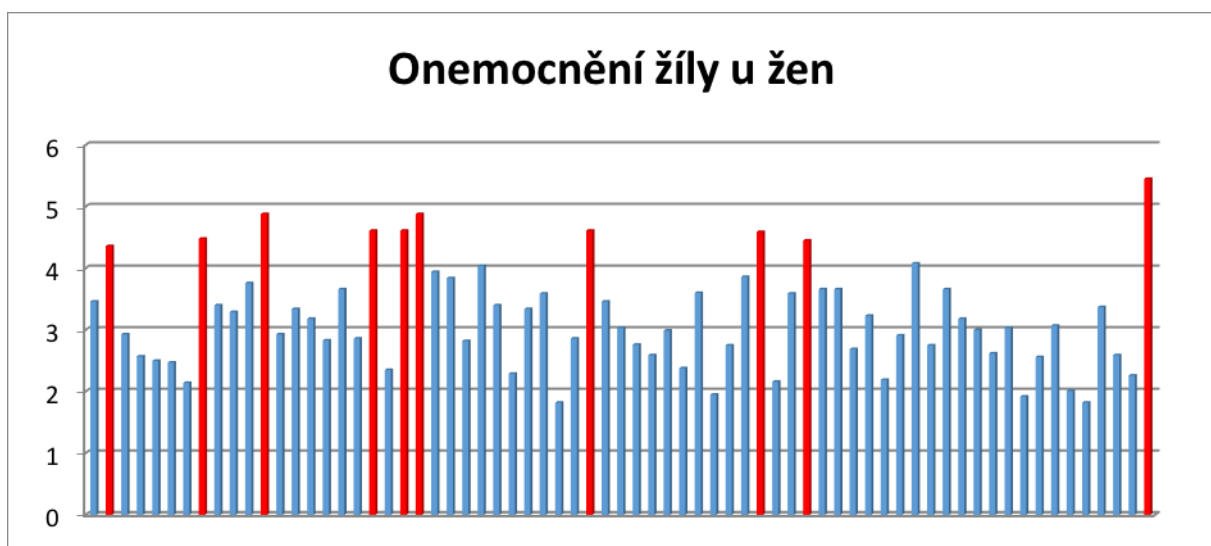
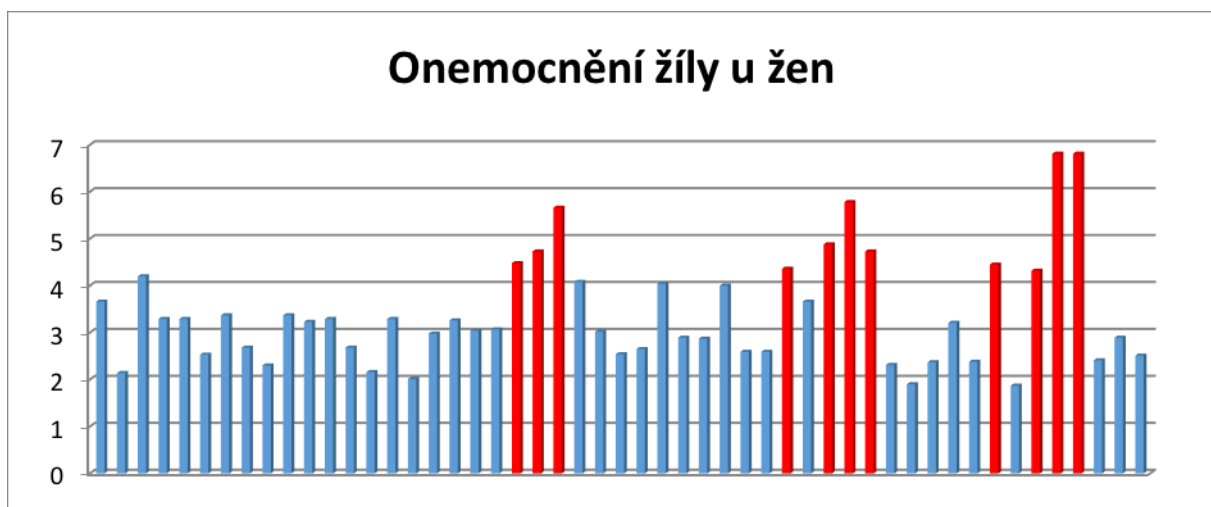
U grafu č. 8 můžeme vidět, že hladina fibrinogenu byla zvýšená u 14 vzorků a u 21 vzorků byla ve fyziologických mezích. Červenou barvu mají zvýšené hladiny fibrinogenu nad hladinu 4,2 g/l.

Graf 9: venózní insuficience- diagnóza I872



Z grafu č. 9 můžeme vidět, že zvýšená hladina fibrinogenu nad 4, 2 g/l byla naměřena u 17 pacientek a u 28 pacientek byla ve fyziologických mezích.

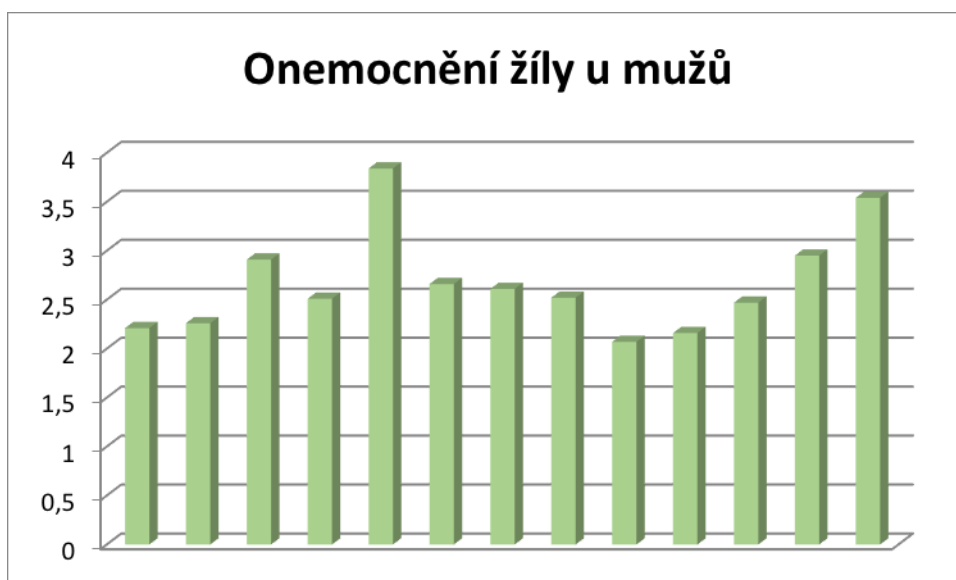
Graf 10 a 11: onemocnění žíly- diagnóza I879



Pro lepší přehlednost jsem tuto skupinu pacientek rozdělila do dvou grafů. Ze 120 vzorků bylo 21 vzorků nad fyziologickou mez a 99 vzorků bylo v normě. Červenou barvou jsou opět vyznačeny pacientky, které měly hladinu fibrinogenu nad 4,2 g/l.

Graf 12: onemocnění žíly u mužů- diagnóza I879

V tomto případě ani jeden z pacientů nevykazoval hodnoty vyšší jak 4,2 g/l. Všechny hodnoty byly stanovené ve fyziologických mezích.



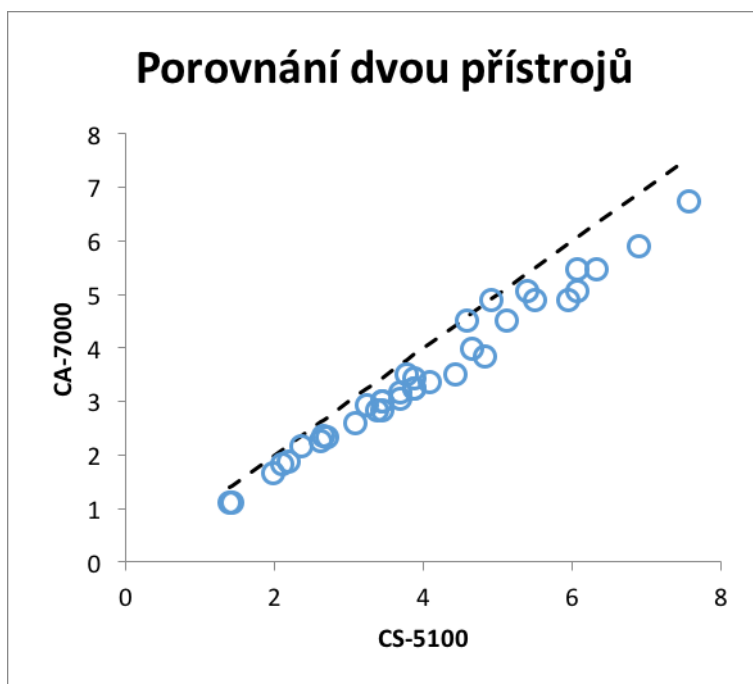
## 8.6 Porovnání dvou přístrojů

Tabulka 2

Průměr	0,52
Směrodatná odchylka	0,27
Párový ttest	$p < 0,1 \%$



Graf 13: porovnání stejných vzorků měřených na dvou různých přístrojích



Data naměřená na přístroji Sysmex CS-5100 a CA-7000 s použitím reagensů stejné šarže.

## 9. Diskuze

Fibrinogen je pro tělo důležitý glykoprotein. Je prekurzorem fibrinu, který hraje hlavní roli ve schopnosti srážení krve. Při některých závažných onemocněních bývá hladina fibrinogenu snižena a tak dochází k nebezpečnému krvácení. Avšak při zvýšené hladině fibrinogenu, může docházet ke krevním sraženinám, k onemocnění cév, srdce, či ke vzniku mrtvice. Hladina fibrinogenu se vyšetřuje i v těhotenství, a to především z důvodu možných komplikací u porodu.

Za fyziologické hodnoty podle literatury se považují 2- 4 g/l. V nemocnici je to trochu upřesněno, a to na hodnotu 1,8 – 4,2 g/l. Pod hodnotu 1,8 nespádl ani jeden vzorek. Nad hodnotu 4,2 g/l bylo celkem 59 vzorků z celkových 246 vzorků, čímž se nepotvrdil můj předpoklad toho, že bude více jak polovina vzorků nadlimitní.

Při porovnávání koncentrací hladin fibrinogenu jsem zjistila, že u 73 % žen a u 97 % mužů, je hladina fibrinogenu v normálu. U 27 % žen a u pouhých 3 % mužů byla hodnota hladiny fibrinogenu nadlimitní.

Pro zjištění hladin fibrinogenu u různých věkových kategorií, jsem si rozdělila pacienty do různých věkových skupin. Každá skupina je v intervalu 5 let. U žen bylo nejvíce zastoupeno věkové rozmezí 21-40 let a u mužů 56-60. U pacientek ve věkovém rozmezí 21-40 lze předpokládat rozvoj trombotických stavů. Ženy onemocní častěji před 45. rokem než muži. Riziko vzniku žilní trombózy se s rostoucím věkem zvyšuje exponenciálně. U dívek pubertálního a postpubertálního věku se, v souvislosti s užíváním antikoncepce, klade důraz na riziko vzniku trombóz (Chalmers et al, 2011; Quaseem et al, 2007).

Nelze jednoznačně tvrdit, že hladina fibrinogenu stoupá v závislosti na věku. U mužů jsem toto neobjevila, ale je to možná z důvodu malého objemu vzorků. U žen se stoupajícím věkem hladina fibrinogenu mírně zvyšuje, a to od věku 61 let.

Při sestavování grafů jsem se zaměřila i na jednotlivé diagnózy. Z celkových 246 vzorků, bylo 30 vzorků od mužů a z těchto vzorků bylo stanoveno celkem 13 diagnóz. 216 vzorků bylo od žen a z těchto vzorků bylo stanoveno také 13 diagnóz. Mezi

nejčastější diagnózy, na které jsem narazila, patřila u žen onemocnění žil, venózní insuficience a postflebitický syndrom. U mužů to bylo také onemocnění žil.

U postflebitického syndromu jsem narazila na 14 vzorků, které vykazovaly hodnoty vyšší jak 4,2 g/l. U venózní insuficience to bylo 17 vzorků a u onemocnění žil 21 vzorků. U diagnózy onemocnění žil u mužů nevykazoval ani jeden pacient hodnoty vyšší než 4,2 g/l. V případě mužů bych ráda zmínila jeden vzorek, který měl hodnotu hladiny fibrinogenu 6,24 g/l a u tohoto pacienta byla stanovená diagnóza R590-lokalizované zvětšení mízních uzlin.

Další stanovené diagnózy byly: polycythaemia vera, chronická myeloproliferativní onemocnění, esenciální trombocytémie, anémie, vada koagulace, alergická purpura, idiopatická trombocytopenická purpura, trombocytopenie, krvácivé stavy, mnohočetný myelom, myelodysplastický syndrom, von Willebrandova nemoc a agranulocytóza.

Při porovnávání vzorků, které byly měřené na dvou různých přístrojích, a to Sysmex CS-5100 s Sysmex CA-7000, bylo mým předpokladem, že se výsledky nebudou lišit. Při párovém ttestu mi vyšla hodnota  $p < 0,1\%$ , tudíž mohu tuto hypotézu potvrdit. Při samotném sestavování grafu, jsem samozřejmě drobné odchylky ve výsledcích objevila, avšak tyto drobné rozdíly nemají na výsledek vliv. I kdybychom 10x změřili jeden vzorek, nikdy nám nevyjdou všechny hodnoty stejné.

Při konečné interpretaci výsledků je nejen důležité zkoumat, zda je naměřená hodnota patologická, či ne, ale i na klinický stav pacienta a důvod, proč vlastně k vyšetření došlo. U pacientů, kteří se léčí s trombotickými stavy, je rozhodně důležité pozorovat i předchozí výsledky vyšetření. Kontroluje se razantní vychýlení hodnot od normálu. Toto může znamenat změnu stavu pacienta, nebo nedodržení zásad léčby.

## 10. Závěr

Cílem mé práce bylo osvojení metody vyšetření fibrinogenu. Podařilo se mi stanovit hodnoty u 246 vzorků, z toho bylo 216 vzorků od žen a 30 vzorků od mužů. Z tohoto celkové počtu vzorků byl 1 vzorek od pacienta nad hodnotu 4,2 g/l a 58 vzorků od pacientek bylo nadlimitní.

Dalším mým cílem bylo porovnání dvou přístrojů. Toto se mi podařilo a to při přechodu z přístroje Sysmex CS- 5100 na přístroj Sysmex CA- 7000. Při tomto porovnávání jsem zjistila, že se hodnoty vzorků měřených na obou přístrojích neliší.

Stanovila jsem si tři hypotézy:

1. Vyšetření hladiny fibrinogenu bude u více jak poloviny vzorků nad hodnotu 4,2 g/l.

Tato hypotéza se mi nepotvrdila, protože z celkového počtu 246 vzorků, vykazovalo nadlimitní hodnoty pouze 59 vzorků

2. Fibrinogen stoupá se zvyšujícím se věkem.

Nedá se s jistotou říct, že se hladina fibrinogenu zvyšuje s věkem. U mužů se mi tento předpoklad nenaplnil, možná i z důvodu malého objemu vzorků. U žen se dá říct, že od věku 61 let hladina fibrinogenu stoupá.

3. Při porovnávání dvou přístrojů se výsledky nebudou lišit.

Tato hypotéza se mi potvrdila.

Stanovení hladiny fibrinogenu je rozhodně důležitým vyšetřením. Řekla bych, že v dnešní době je to hlavně kvůli stoupajícím trombofilním stavům, a to už i u velmi mladých dívek, a to hlavně z důvodu užívání antikoncepce. Toto vyšetření slouží k včasné detekci onemocnění a případně k následné léčbě.

## 11. Seznam literatury

ADAM, Zdeněk a Jiří VORLÍČEK. Hematologie pro praktické lékaře. 1. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN: 978-80-7262-453-9.

ASCHERMANN, Michael. Kardiologie. 1. vyd. Praha: Galén, 2004. ISBN: 80-7262-290-0.

BACHMAN, F. Fibrinolysis. Clinical Chemistry [online]. Boston, MA:Springer US, 1989, s. 179 [cit. 2016-04-20]. DOI: 10.1007/978-1-4613-0753-2\_18. ISBN: 978-1-4612-8065-1. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-0753-2\\_18](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-0753-2_18).

CETKOVSKÝ, Petr. Intenzivní péče v hematologii. 1. vyd. Praha: Galén, 2004. ISBN: 80-7262-255-2.

DOBROTOVÁ, Miroslava. Hematológia a transfuziológia: učebnica. 1. Vyd. Praha: Grada; Bratislava: Grada Slovakia, 2006. ISBN: 80-247-1779; 80-8090-000-0.

CHALMERS, E. et al. Guideline on the Investigation, Management and Prevention of Venous Thrombosis in Children. British Journal of Haematology. 2011. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2010.08543.x/pdf>.

CHARRIN, Martine a Patrick VANNESTE. Hématologie: aspects théoretiques. 1991. ISBN- 13: 978-2704006618.

CHROMÝ, Vratislav. Bioanalytika: analytická chemie v laboratorní medicíně. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2002. ISBN: 80-210-2917-X.

INDRÁK, Karel. Hematologie a transfuzní lékařství. 1. vyd. Praha: Triton, 2014. ISBN: 978-80-7387-722-4.

LEXOVÁ, Stanislava. Hematologie pro zdravotní laboranty. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2000. ISBN: 80-7013-304-X.

MATÝŠKOVÁ, Miloslava. Krevní srážení. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999. 203 s. ISBN 80-7013-278-7.

PECKA, Miroslav. Laboratorní hematologie v přehledu. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN: 80-86682-03-X.

PECKA, Miroslav a Milan BLÁHA. Praktická hematologie: laboratorní metody. Vyd. 1. Český Těšín: Infiniti art, 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.

PENKA, Miroslav. Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC). 1. vyd. Praha: Grada, 2003. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0341-6.

PENKA, Miroslav. Hematologie. 1. vyd. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-247-0023-9.

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. Hematologie a transfuzní lékařství. I, Hematologie. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN: 978-80-247-3459-0.

PENKA, Miroslav, Igor PENKA a Jaromír GUMULEC. Krvácení. 1. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN: 978-80-247-0689-4.

PENKA, Miroslav a Alena BULÍKOVÁ. Neonkologická hematologie. 2. dop. a zcela přepracované vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN: 978-80-247-2299-3.

POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ Jiří MAYER. Molekulární hematologie. 1. vyd. Praha: Galén, 2013. ISBN: 978-80-7262-942-8.

QUASEEM, A. et al. Current Diagnosis of Venous Thromboembolism in Primary Care: A Clinical Practice Guideline from the American Academy of Family Physicians and the American College of Physicians. *Annals of Family Medicine*. 2007, vol. 5, no. 1, s. 57-62. Dostupné z: <http://www.annfammed.org/content/5/1/57.full>

RACEK, Jaroslav. Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.

ROHOŇ, Petr. Molekulární biologie v hematologii- od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN: 978-80-244-2224-4.

ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. Transfuzní lékařství. 1. vyd. Praha: Grada, 2013. ISBN: 978-80-247-4534-3.

ŠVIHÁLEK, Milan. Galénos a ti druzí. *Avicenna revue*, 2004. Dostupné také z: <http://www.avicenna.cz/item/galenos-a-ti-druzi/category/lekar-dejiny-a-my>.

ŠLECHTOVÁ, J. Hemostáza- jak ji možná neznáte. *Klin.Biochem. Metab.*, 15 (36), 2007. No. 2, p. 97- 101.

TROJAN, Stanislav. Lékařská fyziologie. 4. přepracované vydání. Praha: Grada, 2003. ISBN: 80-247-0512-5.

Uživatelský manuál k přístroji Sysmex CA-7000.

VIDNER, Adam. William Harvey a koloběh krve. Planétarium, 2011. Dostupné z: <http://www.rozhlas.cz/planetarium/historie/zprava/william-harvey-a-kolobeh-krve--880936>.

VOJÁČEK, Jan a Martin MALÝ. Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0501-X.

VOKURKA, Martin a Jan HUGO. Praktický slovník medicíny. 8. rozš. vyd. Praha: Maxdorf, 2007. ISBN 978-80-7345-123-3.

[www.lfhk.cuni.cz](http://www.lfhk.cuni.cz)

ZIMA, Tomáš. Laboratorní diagnostika. 1. vyd. Praha: Galén, 2002. ISBN: 80-7262-201-3.