



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
Zdravotně sociální fakulta
Katedra

Bakalářská práce

Rezistence na aktivovaný protein C

Vypracoval: Kateřina Blatníková
Vedoucí práce: MUDr. Eva Fenclová

České Budějovice 2014

Abstrakt

Trombofilií označujeme vrozený nebo získaný stav organismu, při kterém je zvýšené riziko vzniku žilní trombózy. Tato život ohrožující komplikace se u nositelů trombofilního rizika objevuje v porovnání s ostatní populací významně častěji, zejména v období tzv. přídatných rizik – imobilizace končetin po úraze, gravidita, užívání hormonální antikoncepce, operace a imobilizující onemocnění, delší cesty letadlem. V současné době jsou běžně k dispozici preparáty, které mohou riziko trombózy v těchto obdobích snížit. Je ale potřeba, aby nositel rizika o jeho přítomnosti věděl a mohl mu tak předcházet, nebo toto riziko mohl alespoň zmenšit.

Screening rizikových osob je proto zcela klíčový. K těmto účelům slouží mnohá vyšetření. V praxi jsou nejčastěji používány funkční a molekulárně genetické testy, kterými se budu zabývat ve své práci. Jejich porovnáním a porovnáním výsledků, které těmito metodami získáváme.

Metodický díl mé bakalářské práce jsem tvořila v Klinické laboratoři Oblastní nemocnice Kladno a.s., na pracovním úseku koagulace. Vzorky krve jsem získávala z rutinního provozu této laboratoře, kde jsem zaměstnána. Vzorky jsem vyhledávala mezi nově přichozími pacienty, u nichž byla odhalena rezistence na aktivovaný protein C a následně i Leidenská mutace na základě preventivního vyšetření tak i mezi pacienty kteří byli sledováni na základě rodinné anamnézy. Data mnou naměřená, jsem zanášela do tabulky spolu s výsledky naměřenými metodou PCR a porovnávala jsem je. Tato práce obsahuje popis funkčního vyšetření prováděného Klinickou laboratoří Oblastní nemocnice Kladno a.s. Preanalytickou fází, metodiku, popis samotného analyzátoru Sysmex CA 1500 firmy Siemens, který provádí měření na principu optické metody, kdy červené světlo prochází kyvetou obsahující vzorek s reagentií a detekuje tak změnu v rozptylu světla. Dále pak popisuje užívané reagentie včetně postupu jejich přípravy před použitím, tak i jejich skladování. Všechny tyto mnou uvedené postupy jsem vedla podle standardních operačních postupů (SOP), kterými se Klinická laboratoř řídí a které

byly schváleny auditem. Vyšetřovací metodu PCR jsem popsala na základě konzultací s MUDr. Václavem Maňoškou a mé krátkodobé stáže v Laboratoři molekulární diagnostiky nemocnice na Homolce a též za spolupráce s Ing. Jaroslavou Hájkovou z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Principem PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ve směru 5'-3', prostřednictvím DNA polymerázy. Tento proces spočívá ve třech krocích a v požadovaném množství cyklů. Každý z těchto kroků probíhá za určité teploty. Pro tyto účely se používá tzv. termocykler, což je přístroj konstruovaný tak, aby byl schopen měnit teplotu v požadovaných intervalech a to v těchto krocích: Denaturace- během této fáze je DNA postupně zahřívána až na teplotu vyšší než 92°C, většinou 94-95°C, kdy se rozpadnou vodíkové můstky pojící k sobě komplementární vlákna DNA. Hybridizace - Dochází k nasednutí primerů a jejich hybridizaci s jednotlivými vlákny DNA. To probíhá za teploty snížené na hodnotu v rozmezí 50-65°C. Elongace (extenze, syntetická fáze) - pro syntézu nových řetězců je třeba teploty 65 – 75 °C v závislosti na použité DNA polymeráze. Obvyklá je teplota 72°C.

Po porovnání mnou naměřených výsledků s výsledky molekulárně genetických testů (PCR) jsem došla k závěru, že funkční testy používané v naší laboratoři jsou dostatečně citlivé k odhalení rezistence na aktivovaný protein C a tím i poukázání na Leidenskou mutaci.

Abstract

Thrombophilia is a congenital or acquired disease which is characterized by an increase in the risk of occurrence of venous thrombosis. Compared to non-carrier population this life-threatening complication more frequently occurs in thrombophilia risk carriers especially in a period also known as additive risk – for instance limb immobilization after an injury, gravidity, the use of hormonal contraceptive pills, surgery, diabetes, which are characterized by immobilization and long distance travel by plane. Currently there are common pharmaceuticals available that can reduce the risk of thrombosis in the additive periods. However it is necessary for the risk carrier to be aware, of its presence and to avoid or at least minimize the risk.

For this reason screening of people at high risk plays a key role. There are many kinds of examinations for these purposes. The most common testing procedures used in practice are functional examinations and molecular-genetic tests which are the topic of my bachelor degree thesis, as well as a comparison of the methods and the results we get.

The methodological part of my bachelor degree thesis was completed in the clinical laboratory of the Regional Hospital in Kladno, coagulation ward. The blood samples were obtained during routine operation of the laboratory where I am employed. I searched samples among newcomer patients that were found to be resistant against activated protein C and consequently positive for the Leiden mutation too, based on preventive examinations and among patients observed for their family anamneses University Hospital in Prague. The measured data were inserted in a table together with the results obtained by PCR method and then were compared to each other. My bachelor degree thesis describes functional examinations carried out by the clinical laboratory in the Regional Hospital in Kladno. A preanalytic phase, a method part, a description of analyzer Sysmex CA 1500 made by Siemens, which operates in a principle based on an optical method, where a red light goes through a cell with reagents and so indicates a change at light scattering. Next are described reagents which were used include their storage neither, the reagents used including the process of their preparation before use and storage. All of the foregoing procedures have been carried

out in line with standard operation procedures (SOPs) which are used in the clinical laboratory in Kladno hospital and which have been fully authorized and audited. The method of examination by PCR was described based on my consultations with MUDr. Vaclav Mařoška and based on my short term internship in the laboratory of molecular diagnostics in the Hospital Na Homolce, and my co-operation with Ing. Jaroslava Hájková from the Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital in Prague.

This proces consists in three steps and in desired number of cycles. Each of these steps take place at a certain temperature's conditions. For this purpose is used a so-called thermocycler that is a machine what is designed in a way to be able change a temperature in the desired time intervals and it is working exactly in these following steps: Denaturation - During this step there is a DNA graduadely heated up to a temperature over 92 C, usual 94-95C, when the hydrogen bonds, which connected complementary strands, break down. A hybridisation - there are primers and their hybridisations annealing to the complementary DNA strands. This is performed on lowered temperature conditions to interval in range 50-65 C. A elongation (a extention, a synthetic phase) there is a need a temperature about 65-75C for new DNA strands syntheses, depending on used DNA polymerase.

After a comparing the resultes I measured to the resultes measured by functional molecular genetics tests (PCR) I have concluded that the functional tests used in our laboratory are sensitive enough to detect active protein C resistance and thus to pointing out the Leiden mutation.

Prohlášení

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – 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 (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Ráda bych poděkovala MUDr. Evě Fenclové za její vedení, užitečné rady, názory a za její trpělivost. Dále bych ráda poděkovala svým nejbližším za jejich podporu. Ing. Jaroslavě Hájkové za její ochotu a také kolektivu laboratoře, kde jsem zaměstnána.

Obsah

Seznam použitých zkratk	10
1. Úvod	11
2. Teoretická část	13
2.1. Složky hemostázy	13
2.1.1. Cévní stěna	13
2.1.2. Tkáňové složky	13
2.1.3. Trombocyty	13
2.2. Faktory krevního srážení	14
2.3. Fáze hemostázy	18
2.3.1. Primární fáze hemostázy	18
2.3.2. Sekundární fáze hemostázy	18
2.3.3. Koagulační kaskáda	19
2.4. Inhibitory hemostázy	19
2.4.1. Antitrombin (AT)	20
2.4.2. Protein C (PC)	20
2.4.3. Protein S	20
2.5. Fibrinolytická aktivita	21
2.6. Trombotické stavy	22
2.6.1. Získané rizikové faktory	22
2.6.2. Vrozené rizikové faktory	22
2.7. Vrozené rezistence na aktivovaný protein C	23
2.7.1. Leidenská mutace	23
2.7.2. Faktor V Cambridge	23

2.7.3.	Haplotyp HR2	23
3.	Cíl práce a předpokládané hypotézy	25
3.1.	Cíl	25
3.2.	Předpokládané hypotézy	25
4.	Metodika	26
4.1.	Preanalytická fáze	26
4.1.1.	Odběr	26
4.1.2.	Příjem vzorku	27
4.1.3.	Centrifugace	27
4.1.4.	Uskladnění vzorku	28
4.2.	Analytická fáze	29
4.2.1.	Analyzátor	29
4.2.2.	Nastavení přístroje	29
4.2.3.	Princip testu APC rezistence	32
4.2.4.	Kalibrace	32
4.2.5.	Interní kontrola kvality	33
4.2.5.1.	Validace	34
4.2.5.2.	Verifikace	35
4.2.5.3.	Chyba	35
4.2.5.4.	Přesnost	36
4.2.5.5.	Správnost	36
4.2.6.	Externí kontrola kvality	36
4.2.7.	Postup měření APC rezistence	37
5.	Polymerázová řetězová reakce	40

5.1.	Vyšetření mutace v genu pro faktor V – FV Leiden (1691G/A) metodou real-time PCR.....	41
5.1.1.	Vzorek.....	41
5.1.2.	Příprava vzorku.....	41
5.1.3.	Princip metody.....	41
5.1.4.	Genotypizace.....	42
6.	Výsledky měření.....	43
7.	Diskuse.....	47
8.	Závěr.....	48
9.	Klíčová slova.....	50
10.	Přílohy.....	50
	Seznam obrázků.....	51
	Seznam tabulek.....	52
	Seznam použité literatury.....	53

Seznam použitých zkratk

ADP – adenosin difosfát

APC – aktivovaný protein C

FV – faktor V

FVL – faktor V Leiden

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PC – protein C-

Plg - plazminogen

PS – protein S

SERPIN – serine protease inhibitor

F - faktor

TF – tkáňový faktor

TM – trmobomodulin

1. Úvod

Motto:

„Plížilo se to pozvolna, hlouběji a hlouběji...
doprava – doleva – daleko a široko
- se sténáním prokleté duše
k mému srdci plíživým krokem tygra“.

E. A. Poe: Jáma a kyvadlo

Krev, život proudící v krevním řečišti, prostupující každou částí našeho těla. Zachování krve v tekutém stavu, v neporušeném krevním řečišti je pro život zcela zásadní. Při poškození celistvosti cévního řečiště je hemostáza tím mechanismem, který se stará o nápravu tohoto stavu pomocí složitých procesů hemokoagulace. Existují však i stavy, při nichž dochází k srážení krve i v neporušeném cévním řečišti.

Hemostáza je nezbytná pro život (Penka et al. 2011). Nazýváme tak schopnost organismu udržet stálost vnitřního prostředí, a zajistit tím tekutost krve v neporušeném krevním řečišti. Při porušení celistvosti cévní stěny zajišťuje zástavu krvácení a dále odpovídá za následnou fibrinolýzu, která zajistí opětovné zprůchodnění cévního řečiště. Její narušení jak vrozené tak získané se může projevit jednak krvácivými stavy nebo stavy trombofilními (Pecka et al. 1993).

Požadavky kladené na hemostatické mechanismy se liší podle toho, zda tyto mechanismy probíhají v arteriální nebo venózní části cévního řečiště (Pecka et al. 2004).

Systém hemostázy nevzniká při porodu, ale vyvíjí se již od fetálního věku. V tomto období je však hemostáza ještě velmi nevyzrálá. Probíhá již syntéza plazmatických proteinů a jejich koncentrace s postupným vyžíváním plodu stoupá. V dětském věku hemostáza dále vyžívá, ale její rovnováha je velmi křehká. Koncentrace plazmatických proteinů je velmi podobná koncentracím dospělých.

Vrozené nebo získané poruchy hemostázy jsou spojeny se zvýšeným rizikem trombózy, jejímž nejvýznamnějším klinickým projevem je žilní tromboembolismus.

Příčiny trombózy mohou být různé, například: hyperkoagulace, poškození cévní stěny, zpomalení krevního proudu, porucha fibrinolýzy, endotelová dysfunkce nebo změněné reologické vlastnosti krve. Projevem trombofilií tedy mohou být: žilní tromboemolismus (Deep Venous Thrombosis a plicní embolie), tepenná trombóza a komplikace v těhotenství (časný spontánní potrat, pozdní ztráta plodu, zpomalení růstu plodu, preeklampsie nebo také HELLP syndrom). Trombofilie mohou být vrozené, získané nebo smíšeného původu.

V mé bakalářské práci se chci zabývat první variantou a to vrozenou mutací faktoru V.

Rezistence faktoru V na aktivovaný protein C je způsobena bodovou mutací genu pro faktor V. Tato mutace způsobuje, že aktivovaný faktor V je odolný vůči inhibičnímu vlivu aktivovaného proteinu C a zůstává po delší dobu v aktivní formě. Proto může i nadále pokračovat tvorba trombinu a následkem toho, i nadměrná a neúčelná tvorba trombu v místě aktivace koagulace. To má za následek zvýšené riziko trombózy. Rezistence na aktivovaný protein C (mutace faktoru V – Leidenská) je nejčastější vrozenou koagulopatií a zvyšuje riziko mezi nosiči v průběhu jejich života na 50%. Toto riziko může nadále stoupat, pokud se v průběhu pacientova života přidruží i další získané nebo vrozené koagulopatie. Například u pacientek užívajících hormonální antikoncepci dochází ke zvýšení rizika vzniku hluboké žilní trombózy až padesátkrát. U pacientek s Leidenskou mutací užívajících hormonální antikoncepci stoupá riziko hluboké žilní trombózy.

Tento fakt je již významným rizikem, které by mělo být bráno v potaz lékařem, který ji předepisuje, nebo by před podáním hormonální antikoncepce mělo být provedeno vyšetření, odhalující rezistenci na aktivovaný protein C (mutace faktoru V – Leidenská).

2. Teoretická část

Hemostáza je nezbytná pro život. Jedná se o velmi komplikovaný, přesně regulovaný proces, který dokáže zastavit krvácení pouze v místě poranění, při neporušeném cévním řečišti a naopak udržuje tekutost krve. Na hemostáze mají podíl všechny látky přítomné v krvi a na vnitřní straně cév (Penka et al. 2011).

2.1. Složky hemostázy

2.1.1. Cévní stěna

Céva je tvořena třemi vrstvami. Intimou, médií a adventicií. Kromě látkové výměny, regulace cévního tonu a účasti na zánětlivých reakcích hraje cévní stěna klíčovou roli i v procesech aktivace hemostázy a její kontroly. (Sakalová et al. 2010). Integrita cévního systému je důležitým faktorem hemostázy. Při poranění dochází k reflexnímu spazmu arterií, venul a menších cév (Penka et al. 2011). To napomáhá redukovat krevní ztráty. Na zastavení krvácení to však nestačí. To vyžaduje účinnější mechanismy primární a sekundární hemostázy (Sakalová et al. 2010). Úloha cévní stěny v hemostáze tedy spočívá ve vazostriktu při jejím poranění a v dodávání látek v ní obsažené (faktory, inhibitory) uplatňujících se při zástavě krvácení.

2.1.2. Tkáňové složky

Hlavními tkáňovými složkami uvolňovanými z poraněné tkáně je tkáňový faktor (TF), aktivující přeměnu protrombinu na trombin. Dále adenosin difosfát (ADP), vyvolávající primární agregaci (Pecka et al. 1998).

2.1.3. Trombocyty

Trombocyty jsou přímými účastníky primární hemostázy, která zahrnuje interakci destiček s poraněnou cévní stěnou a vede k vytvoření tzv. primární hemostatické zátky. Destičky mají důležitý podíl na obnově vnitřního povrchu cévní stěny při poškození či poranění aterosklerotickým procesem nebo při fyziologicky probíhajícím odlučování endotelia. Trombocyty mají schopnost fagocytózy, schopnost přenosu látek a pomocí svých povrchových receptorů jsou účastníky procesů různých reaktivních systémů (Penka et al. 2009). K tomu, aby dostatečným způsobem

zajišťovaly proces primární hemostázy, nedostačuje jen jejich normální počet ale ani jejich normální funkce. K tomu je třeba, aby destičky disponovaly odpovídajícím vybavením. Tím jsou především granula uspořádaná většinou v centrální části destiček (Penka et al. 2011).

2.2. Faktory krevního srážení

Proteiny plazmy, které se přímo účastní krevního srážení, označujeme jako plazmatické faktory. Podle jejich hlavního místa účinku je dělíme na faktory koagulační, přirozené inhibitory krevního srážení a faktory fibrinolýzy (Penka et al. 2011). Hemokoagulace se účastní 13 plazmatických faktorů, které jsou označeny římskými číslicemi v pořadí, v jakém byla zjištěna jejich úloha v krevní srážlivosti (Sakalová et al. 2010). Většina plazmatických faktorů a jejich inhibitorů, s výjimkou von Willebrandova faktoru, se syntetizuje v játrech. Proto je selhání jater spojeno se změnami v hemostatickém systému (Senzolo et al. 2006).

Koagulační faktory cirkulují v krevním řečišti v neaktivní formě, výjimkou je faktor VII, který cirkuluje jak v inaktivní tak ve velmi malé koncentraci jako aktivní forma. Aby se neaktivní faktory mohli stát aktivními, musí být proteolyticky rozštěpeny.

Fibrinogen

(Faktor I)

Fibrinogen je nejlépe charakterizován jako glykoprotein přítomný jak v plazmě, tak i v granulích krevních destiček. Je syntetizován v játrech (Schafer et al. 1988, Blombäck at al. 1996). Fibrinogen je protein akutní fáze a jeho koncentrace je nejvyšší z plazmatických faktorů cirkulujících v krevním řečišti, zároveň podporuje agregaci krevních destiček. Stabilitu fibrinogenu zajišťují vápenaté ionty (Ca^{2+}), pro něž má molekula fibrinogenu tři vazebná místa. Biologický poločas fibrinogenu je 64-96 hodin, jeho fyziologické hodnoty u dospělých 1,8-4,2 g/l. Fibrinogen není K dependentním faktorem.

Protrombin

(Faktor II)

Protrombin je serinová proteáza vážící se pomocí Ca^{2+} , je tvořen v játrech za přítomnosti vitamínu K. Je schopen působit koagulačně i antikoagulačně (inhibičně), to je závislé na momentální potřebě. Jeho aktivní forma – trombin štěpí fibrinogen za vzniku fibrinu a jeho působením dochází též k aktivaci krevních destiček. Je stěžejním faktorem, který je schopen významně regulovat rychlost koagulace. V hemokoagulaci zajišťuje pozitivní a negativní zpětnou vazbu. Aktivuje limitovanou proteolýzou kofaktory FV a FVIII (pozitivní zpětná vazba). Po vazbě na TM aktivuje protein C (PC) na aktivní enzym (APC) a není již schopen zasáhnout do procesů srážení krve - negativní zpětná vazba (Matýšková M., et al. 1999). Je významným aktivátorem krevních destiček a také se uplatňuje v procesech zánětu a hojení.

Tkáňový faktor

(TF)

TF se za normálních okolností na buňkách krevní cirkulace nevyskytuje, endotelové buňky a leukocyty normálně TF neexprimují (Pecka M. 2004). TF zahajuje koagulaci, k jeho expresi na buněčných površích však nemusí docházet pouze za předpokladu, že dojde k porušení nebo k poranění cévy ale může k ní docházet i za jiných okolností (stimulace endotoxiny nebo imunitním komplexem).

Kalcium

(Faktor IV)

Vápníkové ionty jsou nezbytné pro celou řadu reakcí ve všech systémech hemostázy. Nejmenší nutná koncentrace pro hemokoagulaci je 0,5 mmol/l (Pecka M., 2004), kalcium není K dependentním faktorem.

Faktor V

(Proakcelerin)

Faktor V patří mezi neenzymatické plazmatické faktory, jejichž základní funkcí je akcelerace koagulačního procesu (kofaktor). Vzniká v játrech a v megakaryocytech, k jeho syntéze není zapotřebí vitamínu K. Plazmatická hladina faktoru V, je obrazem jaterní syntézy. Megakaryocytární faktor V je uložen v α granulích trombocytů a uvolňuje se při jejich degranulaci. Inaktivní faktor V má biologický poločas 12 – 15 hodin. Pro správnou funkci faktoru V jsou nezbytné Ca^{2+} , které ho stabilizují a jsou taktéž nezbytné pro jeho aktivaci. Schopnost aktivovat FV mají i plazmin, esteráza neutrofilů a jed Russelovy zmije (této schopnosti hadího jedu je využíváno v některých koagulačních vyšetřeních jako např. APC rezistence). Inhibitorem FV je APC, štěpen může být i plazminem (Matýšková M., et al 1999). Společně s proteinem C a proteinem S se neaktivovaný faktor V účastní inaktivace faktoru VIII^a.

Faktor VII

(Prokonvertin)

Faktor VII je jedním z K dependentních faktorů a jedná se o serinovou proteázu. F VII a TF vytváří na negativním fosfolipidovém buněčném povrchu na kalcium závislý komplex [VIIa. TF. Ca^{2+} . PL]. Tento komplex tzv. vnější tenáza, katalyzuje přeměnu faktoru IX na IXa a faktoru X na Xa (Nemerson 1992).

Faktor VIII

(Antihemofilický faktor A)

V cévním řečišti se nevyskytuje samostatně ale v komplexu navázaný na von Willebrandův faktor. Z této vazby se uvolňuje po kontaktu s fosfolipidy nebo s trombinem. Funkčně aktivní F VIII funguje jako proteinový kofaktor ve vnitřní cestě aktivace protrombinu. Syntéza faktoru VIII není ovlivněna hladinou vitamínu K.

Faktor IX

(Christmas faktor)

Tento faktor také vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K. F IXa tvoří koagulačně aktivní komplex vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin [VIIIa.IXa.PI.Ca²⁺] tzv. vnitřní tenáza, která aktivuje F X na Xa (Pecka M., 2004).

Faktor X

(Faktor Stuarda- Prowerové)

Faktor X je dalším zástupcem K dependentních faktorů, který také vzniká v játrech.

Faktor XI

Koluje v krvi v neaktivní formě v podobě zymogenu (proenzymu) serinové proteázy. Je to glykoprotein, který je aktivován při tzv. kontaktní fázi plazmatického koagulačního procesu (Thompson R. E., et al. 1977). Faktor XI není K dependentním faktorem.

Faktor XII

(Hagemanův faktor)

Tato serinová proteáza syntetizovaná v játrech, k jeho syntéze není zapotřebí přítomnost vitamínu K. K jeho aktivaci, dochází při kontaktu s poraněným subendoteliem za normálních podmínek se kontaktem s povrchem cévy neaktivuje. Aktivačním povrchem může být i sklo, kaolin, celit, dextran, sulfáty, elagová kyselina, kloubní chrupavka, kůže, mastné kyseliny a endotoxiny (Pecka M. 2004)

Faktor XIII

Synonymem pro faktor XIII je fibrin stabilizující faktor nebo také transglutamináza. Jak již napovídá název, jeho funkcí je stabilizace fibrinové sraženiny. Jeho funkce v hemostáze není jediná, ale účastní se i hojení ran, hraje svou roli v udržení těhotenství. Faktor XIII není K dependentním faktorem.

2.3. Fáze hemostázy

2.3.1. Primární fáze hemostázy

V primární fázi hemostázy dochází k vytvoření primární hemostatické zátky. Nejprve dojde k vazokonstrikci cévní stěny. Za pomoci von Willebrandova faktoru, fibronektinu a také Ca^{2+} dojde k adhezi trombocytů na odhalený subendotel cévní stěny a jejich aktivaci. Tento proces je omezen na místo, ve kterém došlo k porušení celistvosti cévní stěny v důsledku poranění cévy, porušení nesmáčivosti cévní stěny, poškozením endotelu komplexem antigen – protilátka, vířením krve (v aneurysmatech), nebo na místo ve kterém byla cévní stěna poškozena endotoxiny. V místě aktivace adherují destičky k poškozenému místu, adheze vede k jejich aktivaci, což se projeví změnou jejich tvaru. Adherované krevní destičky uvolňují do krevního řečiště obsah svých granulí (ADP, tromboxan, trombin atd.) a tento obsah aktivuje další destičky, čímž dochází k agregaci destiček a k vytvoření primární rozpustné zátky.

2.3.2. Sekundární fáze hemostázy

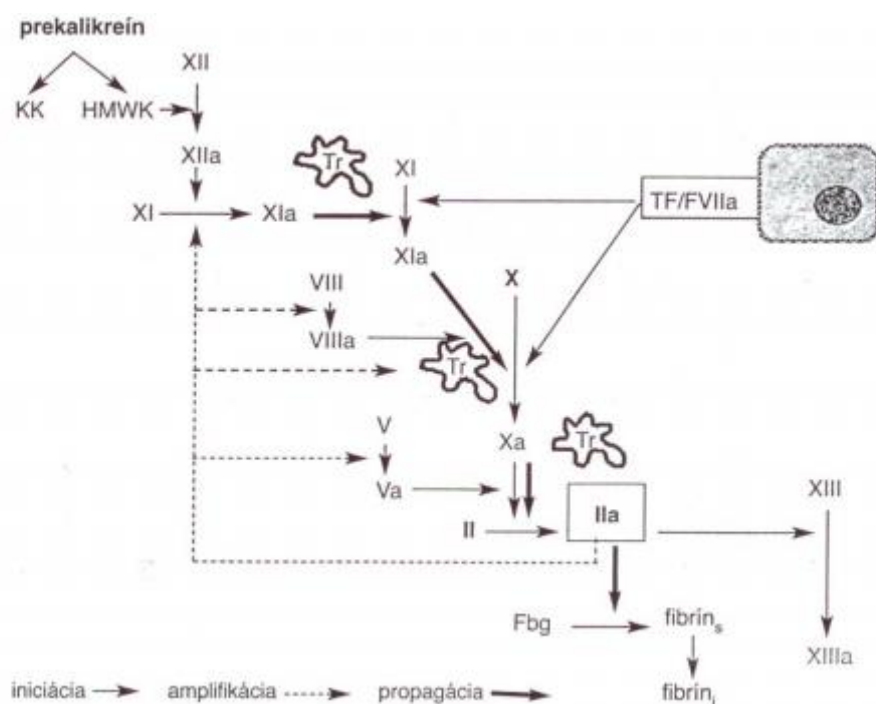
Tato fáze je zahájena současně s aktivací destiček. Při poškození endoteliálních struktur dojde k expresi tkáňového faktoru (TF), ten aktivuje koagulační kaskádu. Tkáňový faktor je receptor pro F VII^a, který jako jediný cirkuluje v krevním řečišti v aktivované formě. V klidovém stavu není na buňkách v krevním řečišti přítomen (TF). Po aktivaci se exprimuje na membránách buněk a váže na sebe F VII^a. Tento komplex (TF/ F VII^a) aktivuje další koagulační faktory (X, IX II) po jejich aktivaci začíná vznikat trombin.

V úvodní fázi tohoto procesu je trombinu jen malé množství, které nestačí na rozštěpení fibrinogenu, ale toto množství je dostatečné k přeměně faktoru VIII a V na jejich aktivní formy. Aktivní FV_a a FVIII_a jsou významnými kofaktory umožňujícími explozivní urychlení koagulace. To má za následek významné zvýšení produkce trombinu. Následně vzniklé množství trombinu je již schopno štěpit fibrinogen na fibrin a vytvořit tak fibrinové koagulum. Všechny tyto procesy probíhají na fofolipidových površích, které dodávají trombocyty. Trombin odštěpí z fibrinogenu fibrinopeptidy A a B a zbylé části (fibrinový monomer), polymerují a vytváří tak

rozpustné fibrinové vlákno. Tato Vlákna jsou poté zpevněna F XIII na definitivní fibrinové vlákno.

2.3.3. Koagulační kaskáda

Enzymatická reakce, při níž jsou neaktivní faktory přítomné v krvi enzymaticky štěpeny na své aktivní formy. Průběh koagulační kaskády má tři fáze: inicializace, amplifikace a propagace.



Obrázek 1 - Průběh koagulační kaskády

Zdroj: Sakalová A. et al. 2010

2.4. Inhibitory hemostázy

Po skončení srážení krve musí být aktivované koagulační faktory zneškodněny, aby srážení krve nepokračovalo, případně se nerozšířilo do jiných částí cévního systému. K tomu slouží systém přirozených inhibitorů, které neustále kontrolují koagulaci (Sakalová A., et al. 2010). Inhibitory se rozdělují podle různých kritérií dle

původu, specifity a systémů. Plazmatické proteiny: antitrombin, protein C, protein S aj. Dále jsou to inhibitory působící na povrchu endotelu: inhibitor cesty tkáňového faktoru (TFPI-tissue factor pathway inhibitor) (Kvasnička et al. 2003).

2.4.1. Antitrombin (AT)

Antitrombin patří do skupiny tzv. SERPINŮ, je tvořen v játrech a v endotelových buňkách.

Tvoří ireverzibilní komplex nejen s trombinem ale i s dalšími serinovými proteázami (Penka et al. 2011). Jedná se o antikoagulačně nejúčinnější látku, která je schopna neutralizovat účinek trombinu (Lechner K. et al., 1995).

2.4.2. Protein C (PC)

Protein C řadíme jako glykoprotein, který je vytvářen v játrech a endoteliálních buňkách za přítomnosti vitamínu K (K dependentní). K nejúčinnější aktivaci PC dochází in vivo na povrchu cévních endoteliálních buněk, trombinem navázaným na trombomodulin, -TM (Esmon et al. 1982). Aktivovaný PC reguluje tvorbu trombinu tím, že inaktivuje aktivované koagulační kofaktory, to vede k potlačení aktivovaného koagulačního procesu (Debize et al. 1995).

Společně s AT a TFPI je systém proteinu C nejúčinnějším inhibičním systémem hemostázy. Systém proteinu C je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem (Esmon, 1992)

2.4.3. Protein S

Protein S, je stejně, jako protein C závislý na vitamínu K. Je syntetizován v játrech, megakaryocytech, endotelu a Leydigových buňkách. Část proteinu S, která je syntetizována v megakaryocytech, je uložena v alfa granulích trombocytů. Za předpokladu, že by došlo k degranulaci trombocytů, se zvýší lokální koncentrace volného proteinu S. Protein S je stejně jako protein C glykoprotein. Na rozdíl od proteinu C se však jedná o glykoprotein s jedním řetězcem. Volný PS působí především jako neenzymový kofaktor proteinu C. Váže jej k fosfolipidovým povrchům trombocytů a endotelií. Protein S tímto zhruba dvojnásobně zvyšuje účinnost štěpení aktivních faktorů V a VIII (Va a VIIIa) aktivovaným proteinem C. Biologický poločas

proteinu S v organismu je 60 hodin. Protein S cirkuluje ve formě volné (40%) a vázané (60%).

Pro působení jako inhibitor koagulace je dostupný pouze volný protein S. Vázaná forma cirkuluje ve vazbě na C4BP (vazný protein C4 složky komplementu) a nemá vliv na koagulaci. Protein C4BP je pozitivní reaktant akutní fáze a proto se může při zánětech zvýšit podíl vázaného PS.

2.5. Fibrinolytická aktivita

Kompenzačním mechanismem koagulace je fibrinolytická aktivita. V sekundární fázi hemostázy dojde k vytvoření nerozpustného (stabilního) fibrinového koagula. Tím fibrinová zátka brání průtoku krve cévou a v krajních případech může cévu zcela ucpat. Na fibrinové koagulum nebo na přítomnost fibrinových vláken reaguje organismus aktivací fibrinolytického systému (Davie et al. 1991). Fibrinolýza má za úkol opětovné zprůchodnění cévy a znovuobnovení její celistvosti. K aktivaci fibrinolytického systému dochází současně s aktivací koagulační kaskády při porušení endotelu. Fibrinolýza ale probíhá pomaleji. Fibrinolytický systém jednak kontroluje tvorbu koagula a zároveň odpovídá za jeho odstranění.

Základním proteinem fibrinolýzy je glykoprotein plazminogen (plg), který se naváže na fibrinovou zátku a je pomocí aktivátorů přítomných v plazmě (tPA – tkáňový aktivátor plazminogenu) aktivován na plazmin. Plazmin proteolyticky působí na koagulum a je nakonec inaktivován cirkulujícími antiplazminy. Fibrinolytická aktivita je fyziologicky vázána na místo poranění, plazmin je generován pouze na povrchu koagula (Pecka M. 2004). Dalo by se tedy říci, že rovnovážný stav systému (hemostázu) zajišťuje pozitivní a negativní zpětná vazba, tedy aktivátory a inhibitory. Tyto zajišťují, aby v celém systému (organismu) nedošlo k hyperkoagulaci a tím k tvorbě trombů nebo k hypokoagulaci, která by mohla vyvolat krvácivé stavy.

Zvýšení fibrinolytických schopností krve může vést ke krvácení, snížení fibrinolýzy může naopak vyvolat trombotické stavy (Bachman F., 1994).

2.6. Trombotické stavy

Trombofilie je vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, která je pravděpodobnou příčinou zvýšené tendence k trombóze (Matýšková et al. 1999).

Trombotický stav může provázet řadu cévních onemocnění a ve svém konečném důsledku může být příčinou tromboembolické příhody, to je stavu, při kterém dojde k uvolnění trombu a následnému ucpání některé z důležitých cév uvolněným trombem – embolem (Alving, 1996). Z nejzávažnějších je to infarkt myokardu, způsobený většinou ucpáním věnčitých tepen trombem, plicní embolie a náhlá cévní příhoda mozková. Patří sem i trombózy žil, hlavně končetinových (Tabernero et al., 1991).

2.6.1. Získané rizikové faktory

Mezi tyto patří obezita, kouření, imobilizace, chirurgické zákroky, poranění včetně popálení, nádory a také varixy. U žen je kromě předešlých, rizikovým faktorem i užívání antikoncepce, těhotenství, porod a také šestinedělí.

2.6.2. Vrozené rizikové faktory

Vrozených rizikových faktorů může být celá řada např.:

- Dysfibrinogenémie
 - Rezistence na aktivovaný protein C
 - Deficience antitrombinu
 - Deficience proteinu C
 - Deficience proteinu S
 - Mutace protrombinu
- a některé další.

Ve své práci bych se chtěla zabývat hlavně tématem rezistence na aktivovaný protein C.

Vznik žilních trombóz může být zapříčiněn například i rezistencí některého aktivovaného koagulačního faktoru na jeho inhibitor. Za jeden z těchto inhibitorů můžeme označit i protein C.

Rezistence na aktivovaný protein C představuje nedostatečnou nebo vůbec žádnou odpověď na aktivovaný protein C (Poort et al. 1996). Aktivovaný protein C je

hlavní složkou přirozené antikoagulační cesty. Nedostatek proteinu C zvyšuje riziko trombózy asi osmkrát až desetkrát (Penka et al. 2001) Jeho antikoagulační účinky jsou dány jeho schopností inaktivovat kofaktory (aktivované faktory V a VIII). Rezistence FVa vůči aktivovanému proteinu C může být získaná nebo dědičná. Dědičná forma APC rezistence je zapříčiněna mutací genu pro faktor V (Kvasnička 2003).

2.7. Vrozené rezistence na aktivovaný protein C

2.7.1. Leidenská mutace

Tato mutace byla podle místa objevu nazvána Leidenská. Jedná se o autozomálně kodominantně dědičnou formu rezistence na aktivní protein C.

Rezistence faktoru V Leiden vůči aktivnímu proteinu C je způsobena záměnou báze guaninu za adenin v genu pro hemokoagulační faktor V. Tato bodová mutace genu pro faktor V má za následek záměnu aminokyseliny argininu za glycin (Arg506Gln), což způsobuje, že takto vzniklý F V je rezistentní vůči inhibičnímu vlivu aktivovaného proteinu C (jeho prokoagulační vlastnosti mu ale i nadále zůstávají). Faktor V^a tak zůstává po delší dobu v krevním oběhu a nadále tedy probíhá tvorba trombinu. Protože se sníží rychlost štěpení faktoru V^a vlivem APC, dochází jen pozvolna k jeho inaktivaci (Badimon a Badimon, 1996).

2.7.2. Faktor V Cambridge

V tomto případě jde o jednobodovou mutaci faktoru V (Williamson et al. 1998). A sice mutaci nukleotidu 1091 (F5G1091C) v kodonu 306 vedoucí k nahrazení argininu treoninem, což vyvolá pokles kofaktorové aktivity faktoru V Cambridge. Tato rezistence vůči aktivovanému proteinu C má menší klinický dopad než předchozí Leidenská mutace.

2.7.3. Haplotyp HR2

Tato mutace je vyvolána polymorfismem A4070G v exonu 13 genu faktoru V, který způsobí záměnu Histaminu za Arginin. Tato záměna má za následek pokles hladiny faktoru V, kdy pokles k 20% normální hodnoty způsobí, také mimo jiné rezistenci na aktivovaný protein C. Dochází zde také k omezení kofaktorové aktivity při

štěpení aktivovaného faktoru VIII.

V asijské populaci se objevují mutace vedoucí k záměně argininu³⁰⁶ za glycin, nebo argininu³⁰⁶ za lysin (faktor V Hong-Kong).

Mutace faktoru V odlišné od Leidenské mutace mají také různé vyjádření trombofilního vlivu a vedou k pozitivě ve funkčních testech vyšetřujících rezistenci na aktivovaný protein C. Avšak, tyto odlišné mutace jsou méně závažné a hlavně významně méně časté ve srovnání s Leidenskou mutací.

3. Cíl práce a předpokládané hypotézy

3.1. Cíl

Cílem mé práce bylo zjistit, zda funkční vyšetření rezistence na aktivovaný protein C je dostatečně citlivé pro screening a záchyt pacientů s Leidenskou mutací a odhalení, zda se jedná o heterozygotní nebo homozygotní formu. Naměřené výsledky poté porovnat s výsledky molekulárně genetických testů měřených metodou PCR.

3.2. Předpokládané hypotézy

- Hypotéza 1: Funkčními testy lze monitorovat pacienty ohrožené rezistencí na APC

- Hypotéza 2: Funkční test APC rezistence je dostatečně citlivý pro poukázání na Leidenskou mutaci

- Hypotéza 3: Výsledky získané funkčními testy korelují s výsledky genetických vyšetření

4. Metodika

Měření funkčními testy jsem prováděla v Klinické laboratoři Oblastní nemocnice Kladno a.s.

Naměřená data jsem vzhledem k četnosti vyšetření a záchytu mutací shromažďovala po dobu dvou let. Vzorky jsem testovala na přítomnost rezistence na aktivovaný protein C a mnou takto naměřené hodnoty jsem poté porovnávala s daty získanými ve spolupráci s hematologickou poradnou ON Kladno a. s. laboratoří molekulární diagnostiky Nemocnice na Homolce.

4.1. Preanalytická fáze

Preanalytická fáze je doba od provedení požadavku na vyšetření až po vložení vzorku do analyzátoru. Je to soubor činností a úkonů, které je nutné správně provést, protože pochybení může mít za následek zkreslení nebo úplné znehodnocení výsledku.

4.1.1. Odběr

Pacient by se měl dostavit k odběru řádně poučen. To znamená, že by měl odpoledne a večer před odběrem vynechat tučná a příliš kořeněná jídla. Dále by měl pacient tři dny před odběrem vynechat veškeré léky, pokud to není možné, užívané léky by měly být uvedeny na žádance. Ráno před odběrem by pacient neměl trpět žízní, je vhodné, napije-li se pacient před odběrem $\frac{1}{4}$ l neslazeného čaje nebo vody.

Odběr venózní krve provádíme většinou ráno, obvykle nalačno. Odběr provádíme bez zaškrvení paže a bez cvičení. V případě, že je nutné zaškrvení paže z důvodu špatně viditelných žil, je možno použít škrtidlo, maximálně však 1 minutu a 3-5 cm nad vpichem. Odebere se 4,5 ml krve nebo 2x 3ml do zkumavky z umělé hmoty s 0,5 ml (0,106 mol/l) citrátu sodného (zkumavky nesmí obsahovat zbytky trombinu a detergentů) – odběrové systémy s předplněnými odběrovými zkumavkami s objemem citrátu určeným pro koagulační testy (ne pro FW). Po odebrání plné krve je potřeba krev ve zkumavce opatrně promíchat, aby se dostatečně promísila s antikoagulačním roztokem, a nedošlo tak k nežádoucímu sražení vzorku. Zkumavky s takto odebraným materiálem musí být zasílány uzavřené, neprodleně po odběru. Pokud je prodleva mezi odběrem a doručením do laboratoře delší, například při přepravě

z odběrových center, které vlastní naše laboratoř nebo od externích obvodních lékařů. Jsou vzorky umístěny do přepravních boxů.

4.1.2. Příjem vzorku

V laboratoři při příjmu vzorku jsou zkontrolovány povinné údaje vyplněné v žádance:

- jméno a příjmení pacienta
- rodné číslo
- kód pojišťovny
- diagnóza
- razítko
- podpis ordinujícího lékaře.

Údaje uvedené na zkumavce (jméno, příjmení a rodné číslo) musí být shodné s údaji žádance. Pokud tomu tak není, je toto zaznamenáno jako neshoda a materiál není možné přijmout do laboratoře.

Když všechna data souhlasí, je žádanka zadána do laboratorního informačního systému (LIS) a jsou jí přiřazeny požadované metody a číslo vzorku. Vyšetření rezistence na aktivovaný protein C se v naší laboratoři neprovádí jako statimové vyšetření a není tedy nutné, aby spolu s identifikací pacienta byl na štítku i čárový kód, který je jinak přiřazován k rutinním a statimovým vyšetřením. Takto přijaté a štítkem opatřené zkumavky putují k centrifugaci.

4.1.3. Centrifugace

Pro koagulační vyšetření má být plazma chudá na destičky, centrifugací se oddělí plazma od krevních elementů. V případě, že plazma musí být zamražena by došlo k prasknutí zbylých krevních destiček, čímž by se do plazmy uvolnil obsah jejich granulí a došlo by tak ke znehodnocení vzorku. Pokud má být plazma zamražena jsou požadavky na přítomnost destiček přísnější. Proto je používán speciální postup k přípravě tzv. bez destičkové plazmy.

Pro stáčení zkumavek určených na koagulační vyšetření je na našem pracovišti určena centrifuga Heraeus Megafuge 1,0 nechlazená. Správně odebraný vzorek se

nejprve centrifuguje 10 – 15 minut při cca 2500 g – 2800 g.

Plazma s citrátem sodným se stáhne do plastové zkumavky tak, že na rozhraní plazmy a krvinek se ponechá cca 3 mm vrstva plazmy a znovu se centrifuguje 30 minut za stejných podmínek, následně se vzorek opět stáhne do prázdné zkumavky s šroubovacím uzávěrem po cca 0,5 ml. Takže v původní centrifugované zkumavce zůstane po druhém stáčení zbytek plazmy s trombocyty ve spodní části zkumavky.

4.1.4. Uskladnění vzorku

V naší laboratoři se vyšetření provádí přibližně jedenkrát do týdne. Mezi tím se vzorky s požadavky, která jsou v naší laboratoři označována, jako speciální koagulační metody shromažďují. Jsou to tedy metody, které nejsou běžně zařazovány do rutinního či statimového provozu.

Vzorky a jejich alikvoty jsou ukládány do hluboko mrazicího boxu při -80 °C. Plazma v tomto hluboko mrazicím boxu se v naší laboratoři skladuje až po dobu jednoho měsíce. Každý vzorek (pokud to umožňuje odebrané množství plazmy) je zamrazován ve více alikvotech. Obecně se uvádí stabilita vzorků (plazmy) takto:

- -80°C by měl mít stabilitu alespoň jeden rok
- -20°C 2 měsíce
- + 2 až + 8°C 24 hodin
- + 15 až +25°C má plazma stabilitu pouze 4 hodiny.

Před upotřebením musí být zmrazená plazma rychle (během 5 minut) rozmrazována ve vodní lázni.

V naší laboratoři k těmto účelům používáme vodní lázeň LW 102, s nastavenou teplotou na 37°C. Během rozmrazování musí být plazma průběžně jemně promíchávána. Zabrání se tak ztrátě aktivity koagulačních faktorů nebo tvorbě precipitátu. Musíme se však vyvarovat vytvoření pěny ve vzorku během míchání. Nezbytně musíme dbát na to, aby byl vzorek plazmy zamrazován a rozmrazován pouze jednou.

4.2. Analytická fáze

4.2.1. Analyzátor

Přístroj používaný pro měření funkčními testy v Klinické laboratoři je Sysmex CA 1500 automatický koagulometr určený pro koagulační a chromogenní metody k stanovení koagulačně aktivních proteinů v lidské citrátové plazmě. Přístroj obousměrně komunikuje s laboratorním informačním systémem (LIS). Tento koagulometr analyzuje vzorek třemi metodami. Vlastní měření je založeno na principu optickém, červené světlo o vlnové délce 660 nm prochází vzorkem s reagentií a detekuje změnu hustoty vzorku změnou rozptylu světla. Takto získané údaje jsou zpracovány bodovou detekční metodou, kterou je spočten čas koagulace jako čas nutný k dosažení určitého stupně rozptylu světla. Vstupní rozptyl se označí jako 0%, kompletní koagulace jako 100%. V tomto rozmezí je možné nastavit bod detekce koagulace – většinou se doporučuje bod 50%. Pro každý vzorek analyzátor vydá jako součást výsledku i kompletní koagulační křivku se základními údaji. Těmito údaji jsou: bH – rozptyl světla ihned po přidání reagentie (0%) – určen zákalem vzorku (lipemie). dH – změna rozptylu světla po kompletní koagulaci vzorku (100%) – tedy poté, co přestal narůstat rozptyl světla.

Další metoda je založená na změně zbarvení vzorku, po přidání substrátu do tohoto vzorku. Tato metoda se nazývá chromogenní. Změna zbarvení vzorku je zde detekována fotodiodou jako změna absorbance. Tedy, paprsek při průchodu vzorkem ztratí na své intenzitě což je zaznamenáno. Z kalibrační křivky se odečítají hladiny měřených proteinů odpovídající naměřené změně absorbance za minutu.

4.2.2. Nastavení přístroje

Přístroj je pro metodu vždy nastaven podle doporučení výrobce reagentie. Nastavení stroje je třeba provést ještě před započítím měření, protože vyšetření rezistence na aktivovaný protein C se rutinně neprovádí. Je třeba přístroj nastavit do modu speciálních koagulačních vyšetření. Správnost a funkčnost metody se vždy ověřuje validací a verifikací.

Test s APC:

Sample Vol.		40 ml		
Diluent Vol.	None	0 ml		
Rinse		None		
Second Dilution		0 ml		
Diluent Vol.	None	0 ml		
Rinse		None		
Factor Plasma	APC DP	25 ml		
Rinse (pre/post)	None	None		
First Reagent	APC plus	50 ml	30 sec	
Push-out Solution	No	0 ml		
Rinse (pre/post)	None	x0	CleanI	x1
Second reagent	APC PTA	50 m	240 sec	
Push-out Solution	No	0 ml		
Rinse (pre/post)	None	x0	CleanI	x1
Third Reagent	None	0 ml	0 sec	
Push-out Solution	No	0 ml		
Rinse (pre/post)	None	x0	None	x0
Detector	Clot	for other 2		
Sens/Wavelength	Low sense			
Maximum Time		300 sec		

Tabulka 1 - Test s APC

Test bez APC:

Sample Vol.		40 ml	
Diluent Vol.	None	0 ml	
Rinse		None	
Second Dilution		0 ml	
Diluent Vol.	None	0 ml	
Rinse		None	
Factor Plasma	APC DP	25 ml	
Rinse (pre/post)	None	None	
First Reagent	APC min.	50 ml	30 sec
Push-out Solution	No	0 ml	
Rinse (pre/post)	None x0	CleanI	x1
Second reagent	APC PTA	50 ml	240 sec
Push-out Solution	No	0 ml	
Rinse (pre/post)	None x0	CleanI	x1
Third Reagent	None	0 ml	0 sec
Push-out Solution	No	0 ml	
Rinse (pre/post)	None x0	None	x0
Detector	Clot	for other 2	
Sens/Wavelength	Low sense		
Maximum Time	100 sec		

Tabulka 2- Test bez APC

Reagencie umístíme na daná místa v přístroji, necháme vyrovnat teplotu. Poté provedeme pomocí kontrolních plazem kontroly testu. Pokud kontroly vyjdou v určených mezích, můžeme pomocí pracovního listu (v analyzátoru označen jako Work list) navolit vyšetření u jednotlivých vzorků pacientů. Spustíme analýzu. Po ukončení analýzy výsledky hodnotíme a vytiskneme.

Výsledkem je poměr naměřených časů.

4.2.3. Princip testu APC rezistence

Test je založen na specifické funkci enzymů z hadích jedů, není založen na APTT. Vyšetřuje se koagulační čas dvou testů, z nichž jeden je měřen za přítomnosti aktivovaného PC, druhý bez přítomnosti aktivovaného PC. Protože je využíváno specificky působících hadích jedů, není test ovlivněn hladinou FVIII, přítomností antifosfolipidových protilátek ani terapií Warfarinem. Na citlivost testu nemá vliv ani deficit fibrinogenu, protrombinu, FX, ATIII, Proteinu C nebo proteinu S (do 100%) nebo zvýšený fibrinogen a ATIII. Součástí testu je i neutralizátor heparinu (polybren), takže lze vyšetřovat i heparinizované vzorky.

Prvním krokem v obou testech je ředění vzorku plazmou deficitní pro FV – je součástí setu. Druhý krok se pro dvojici testů liší. Je přidán enzym RVV-V (z *Daboia russelli*), který přemění FV obsažený ve vzorku na jeho aktivní formu FVa – v obou testech a současně s ním v jednom testu přidán aktivovaný protein C, v druhém testu aktivovaný protein C není přítomen. Po dobu inkubace je vznikající FV^a v jednom testu inaktivován přidaným aktivním PC, v druhém testu inaktivován není. Po ukončení inkubační doby se přidá startující reagentie, což je aktivátor, který je vyroben z hadího jedu (*Notechis scutatus*) aktivující FII bez přítomnosti vápníku a fosfolipidů, k aktivaci vyžaduje pouze přítomnost FV^a. Čas do vzniku koagula je tedy závislý pouze na hladině FV^a přítomného po ukončení inkubace.

4.2.4. Kalibrace

Kalibrace se pro metodu APC rezistence neprovádí. Výsledkem je poměr časů testu s APC v čitateli a testu bez APC ve jmenovateli

$$\text{poměr} = \text{test s APC} / \text{test bez APC}$$

4.2.5. Interní kontrola kvality

Kvalita je definována jako: „celkový souhrn vlastností a znaků výrobku nebo služby, které zaručují schopnost uspokojovat předem stanovené nebo předpokládané potřeby zákazníka.“

(norma ČSN 8402).

Interní (vnitřní) kontrola kvality, též označovaná zkratkami VKK nebo také IQC (internal quality control) slouží ke snížení rizika vydání nesprávného výsledku. Tato kontrola je prováděna příslušnými pracovníky laboratoře, kteří dodržováním zásad správné laboratorní práce a postupů uvedených výrobcem kontrolního materiálu zajistí, že nedojde k nesprávnému provedení vnitřní kontroly kvality. Zanedbání nebo nedodržení některého kroku v postupu práce by se následně projevilo v záznamu VKK který si laboratoř vede. Kontrola kvality by měla být provedena vždy alespoň jedenkrát denně, nebo pokud jako v tomto případě není daná metoda součástí rutinního provozu, vždy před započítáním vlastního měření patientských vzorků danou metodou. V naší laboratoři se kontrola pro rezistenci na aktivovaný protein C provádí na vzorcích o známé variantě FV Leiden – nejčastěji heterozygot a na vzorcích bez přítomnosti mutace.

K tomuto účelu slouží souprava Pefakit APC-R FV Leiden Control, která obsahuje plazmy od jedinců s normálním FV a jedinců s heterozygotním FV Leiden. Kontrolní set obsahuje 3x1 ml lyofilizované plazmy s FV Leiden PCR negativním a 3x1 ml lyofilizované plazmy s FV Leiden v heterozygotní formě PCR ověřeno. Lyofilizované reagentie rozpouštíme 1 ml destilované vody do každé lahvičky.

Během rozpouštění je nutné míchat reagentie , aby se uvnitř lahvičky nevytvořil gel. Pokud kontrola nevychází uspokojivě, je nutné kontrolní plasmu vizuálně zkontrolovat, v případě zgelovatění nařídíme novou kontrolu. K ověření reagentií lze též použít plasmu od pacientů s prokázanou APC rezistencí nebo naopak plasmu, u které nebyla APC rezistence nalezena (tj. negativní plasmu).

Kontrola	Teplota	Stabilita
C1	-20°C 15-25°C	6 měsíců 8 hodin
C2	-20°C 15-25°C	6 měsíců 8 hodin

Tabulka 3 - Stabilita kontrol

4.2.5.1. Validace

Validaci můžeme charakterizovat několika definicemi.

- Validace je činnost, na jejímž konci jsou soubory naměřených dat, které nám poskytnou informaci o analytické metodě.
- Validace nám říká, zda je vhodné používat zamýšlený postup a je-li tento postup (analytická metoda) spolehlivý.
- Validace – ověření spolehlivosti námi zvoleného postupu (analytické metody).

Protože různé přístroje mají vzhledem k rozlišným metodám detekce a pipetovacím objemům jiné poměry, je vhodné validovat pro stanovení vlastních referenčních mezí pro PCR FV Leiden negativní a PCR FV Leiden heterozygoty. Materiál je 100% verifikovaný pro kontroly a validace. Dodává jej firma jako Pefakit FV Leiden Control.

Pokud je provedena validace referenčních mezí, je specifita pro FVL 100%. Pro Sysmex CA 1500 v Klinické Laboratoři Oblastní Nemocnice Kladno byly výsledkem validace metody tyto referenční meze:

- FV Leiden negativní – 3,00 a více
- FV Leiden heterozygot 1,40 – 1,90
- FV Leiden homozygot 0,95 – 1,05

4.2.5.2. Verifikace

Pojem verifikace může vysvětlit jako potvrzení správnosti a pravosti či ověřování metody.

Vzorky s poměrem svědčícím pro přítomnost FV Leiden – heterozygotní nebo homozygotní variantě - je vhodné verifikovat PCR metodou.

V klinické laboratoři se verifikují všechny postupy měření a metody (Friedecký et al. 2010). Výsledky měření mají v klinické laboratoři silný dopad na praxi. Mohou být faktorem, který ovlivní zdraví, ale někdy život pacienta. Validací a verifikací si laboratoř zajišťuje při rutinním provozu kvalitu dat (Friedecký et al. 2010)

4.2.5.3. Chyba

Chyba je vždy ukazatelem nesouladu mezi výsledkem stanovení (měření) a skutečným obsahem (hodnotou měřené veličiny) sledované složky v analyzovaném vzorku. Je tedy mírou nesprávnosti. Vyjadřuje se buď jako chyba absolutní nebo chyby relativní (Dastych et al. 2008).

Nejsou známy žádné činitele mající vliv na výsledek nebo citlivost testu v případě deficitu fibrinogenu, FII, FVIII, FX, AT, Proteinu C, S, nebo nadbytku fibrinogenu, FVIII, AT nebo TFPI (do více než pětinasobku normálních hodnot). Může interferovat – vzhledem k optickému principu detekce koagula – lipemie, hemolýza. Přítomnost Lupus antikoagulans test nijak neovlivňuje, hladiny faktoru V nižší než 50% mohou vést k prodloužení koagulačních časů a ke snížené rozlišovací přesnosti. Vliv má též přítomnost aprotininu a protaminu v plazmě.

Přídavek Polybrenu neutralizuje efekt heparinu až do hladiny 2 IU/ml (UHF i LMWH) nebo efekt pentasacharidu do hladiny 2 µg/ml. Efekt přímých inhibitorů (Argatroban, Hirudin, Dabigatran - Pradaxa) není neutralizován Polybrenem a výsledek testu může být deformován. Detekční bod pro měření je 50%. Dostatečné promytí pipetovacích jehel přístroje speciálním roztokem Clean I je podmínkou při užívání hadích jedů - zamezí se tak kontaminaci jedy během pipetování následujících reagensů

4.2.5.4. Přesnost

Přesnost metody je ověřována pomocí opakovaných měření téhož vzorku a to v takovém množství aby s těmito výsledky bylo možné provádět statistické výpočty. Přesnost se dále dělí na opakovatelnost a reprodukovatelnost, podle toho za jakých podmínek měření probíhá.

Opakovatelnost spočívá v měření téhož vzorku na jednom analyzátoru v krátkém časovém období (ideálně těsně po sobě jdoucí vyšetření), kdy měření provádí pouze jeden operátor a podmínky pro analýzu se u jednotlivých vyšetření neliší (jsou měřeny stejnou reagentií). Opakovatelnost také jinak nazýváme jako přesnost v sérii. Oproti tomu, reprodukovatelnost má odlišné podmínky provedení. Ověření reprodukovatelnosti by mělo být měřeno na tomtéž analyzátoru, různými operátory a v časových rozestupech mezi jednotlivými vyšetřeními (např. jednou denně), to se nazývá ověření přesnosti v čase. Slouží především k ověření stability metody během celého dne, nebo po celou dobu jejího provádění. V tomto případě je nutné zajistit, aby hladina vyšetřovaného analytu byla stabilní po celou dobu měření

4.2.5.5. Správnost

Tato veličina udává těsnost shody mezi jediným naměřeným výsledkem a udanou referenční hodnotou

4.2.6. Externí kontrola kvality

EKK, ale správněji EHK (externí hodnocení kvality - External Quality Control EQC). V České republice tuto činnost zajišťuje instituce SEKK neboli Systém externí kontroly kvality. Tato organizace porovnává naměřené výsledky z celé řady laboratoří.

Cílem je zlepšení analytické činnosti, projevující se dosažením maximální shody výsledků měření stejných vzorků (a tedy i vzorků pacientů) v různých laboratořích. (Racek J. et al. 2006)

4.2.7. Postup měření APC rezistence

Před zapnutím přístroje a vlastním měřením vylijeme ze zásobníku starou destilovanou vodu, kterou analyzátor potřebuje k proplachu aparatury. Zásobní nádobu (kanystr) vypláchneme 70% lihem a poté ještě destilovanou vodou. Takto vymytou zásobní nádobu naplníme čerstvou destilovanou vodou a opět připojíme k aparatuře koagulometru. Je nutné dbát na dostatečnou hladinu destilované vody. V opačném případě, kdy se do přívodní hadice koagulometru dostanou vzduchové bubliny, může dojít k porušení vakua v přístroji. Poté otevřeme obslužná dvířka koagulometru a pomocí buničiny navlhčené v 70% spirtusu velice opatrně otřeme vzorkovou i reagenční jehlu koagulometru.

Zkontrolujeme, zda jsou v koagulometru v dostatečném množství doplněny mikrotitrační destičky, kyvety a čisticí roztoky Clean I. Při tomto vyšetření dále jako spotřební materiál budeme potřebovat pipety, špičky k pipetám a mikrozkuřavky, do nichž budeme dávat jednotlivé vzorky pacientů.

Po zapnutí přístroje jej nechám provést inicializaci. Když je stroj připraven, objeví se na obrazovce tabulka se základní nabídkou. Po provedení těchto úkonů si na základní obrazovce navolíme ikonu Rinse a provedeme základní krátký proplach, pomocí ikony Maintenance dále provedeme druhý delší proplach. V této fázi je již koagulometr připraven k provozu.

Do připraveného stroje umístíme reagentie. Reagentie se připravují podle návodu, který je uveden v příbalovém letáku. Ten by měl být součástí každého balení reagentií. Naředěné reagentie necháme 30 minut rozpouštět při laboratorní teplotě a občas je promícháme krouživým pohybem. Poté je umístíme na dané pozice v přístroji a necháme v přístroji ještě 10 minut, aby mohlo dojít ke stabilizaci teploty na přístrojem udržovanou hodnotu.

V naší laboratoři používáme tyto reagentie: Set: Pefakit[®] APC-R Factor V Leiden.

Reagencie	Obsah
R1	APC/RVV-V (+APC) reagent - APC, RVV-V, Polybren, Hepes pufr, bovinní albumin 3 lahvičky (lyofilizát, rekonstituce 2,0 ml destilované vody na jednu lahvičku)
R2	RVV-V (-APC) reagent – RVV-V, Polybren, Hepes pufr, bovinní albumin 3 lahvičky (lyofilizát, rekonstituce 2,0 ml destilované vody na jednu lahvičku)
R3	PTA reagent - Protrombinový aktivátor, EDTA, Hepes pufr, bovinní albumin 3 lahvičky (lyofilizát, rekonstituce 4,0 ml destilované vody na jednu lahvičku)
R4	Diluční plazma (FV deficitní plazma) 3 lahvičky (lyofilizát, rekonstituce 2,0 ml destilované vody na jednu lahvičku)

Tabulka 4 - Reagencie

Reagent	Teplota	Doba stability
R1	-20°C	6 měsíců
	2 až 8°C	14 dní
	15 až 25°C	24 hodin
R2	-20°C	6 měsíců
	2 až 8°C	14 dní
	15 až 25°C	24 hodin
R3	-20°C	6 měsíců
	2 až 8°C	14 dní
	15 až 25°C	24 hodin
R4	-20°C	6 měsíců
	2 až 8°C	14 dní
	15 až 25°C	24 hodin

Tabulka 5 - Stabilita reagensů po naředění

Pokud naředěné reagensy zamrazujeme, měly by být rozmrazovány při 37°C. Před použitím reagensy mírně promícháme. Naředěné reagensy můžeme zamrazit pouze jednou. V naší laboratoři pro tento účel používáme mrazicí box, ve kterém jsou reagensy zamrazeny společně se vzorky určenými k analýze při -80°C.

5. Polymerázová řetězová reakce

Ne vždy bylo pro molekulárně genetické vyšetření dostupné dostatečné množství biologického materiálu a také nebylo vždy možné provést další odběr tohoto materiálu. Převratný objev učinil v roce 1983 Kary Mullis, když přišel s technikou nazvanou polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR). Tato tehdy zcela převratná metoda umožňuje in vitro namnožení vybraného úseku DNA. Kary Mullis za svůj objev také obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii.

Polymerázová řetězová reakce je metoda enzymatické amplifikace DNA, která umožňuje geometrické namnožení specifické části DNA. (Pecka et al. 2010)

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ve směru 5'-3', prostřednictvím DNA polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. (Šmarda et al. 2008)

Tento proces spočívá ve třech krocích a v požadovaném množství cyklů. Každý z těchto kroků probíhá za určité teploty. Pro tyto účely se používá tzv. termocykler, což je přístroj konstruovaný tak, aby byl schopen měnit teplotu v požadovaných intervalech a to v těchto krocích:

1. Denaturace

Během této fáze je DNA postupně zahřívána až na teplotu vyšší než 92°C, většinou 94-95°C, kdy se rozpadnou vodíkové můstky pojící k sobě komplementární vlákna DNA.

2. Hybridizace

Dochází k nasednutí primerů a jejich hybridizaci s jednotlivými vlákny DNA. To probíhá za teploty snížené na hodnotu v rozmezí 50-65°C.

3. Elongace (extenze, syntetická fáze)

Pro syntézu nových řetězců je třeba teploty 65 – 75 °C v závislosti na použité DNA polymeráze. Obvyklá je teplota 72°C.

Termocykler umožňuje tyto cykly opakovat v námi požadovaných sekvencích, takže po ukončení procesu můžeme z nepatrného množství původní DNA získat až miliardy jejích kopií.

5.1. Vyšetření mutace v genu pro faktor V – FV Leiden (1691G/A) metodou real-time PCR

5.1.1. Vzorek

Pro metodu PCR odebíráme vzorek periferní plné krve s protisrážlivým činidlem K3EDTA nebo citrátem sodným. Vzorek není vhodné odebrat např. do heparinu, který pak blokuje polymerázovou řetězovou reakci.

5.1.2. Příprava vzorku

Ze vzorku odebrané krve nejprve izolujeme DNA. Tento úkon je možné provádět různými způsoby za použití např. kolonek nebo magnetických partikulí, v dnešní době jsou k dispozici i automatické izolátory. Podstatou izolace DNA je rozrušení jaderných buněk (jádro obsahuje DNA). V případě použití magnetických partikulí je DNA extrahována tak, že je nejprve uchycena na povrchu těchto „kuliček“ a poté pomocí promývacích roztoků o různé iontové síle je DNA uvolněna z jejich povrchu do roztoku. Takto získaný vzorek DNA je napipetován do jednotlivých reakčních nádobek s rozplněnou reakční směsí.

5.1.3. Princip metody

Nejprve se pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) namnoží požadovaný úsek DNA, který obsahuje sledovanou mutaci. Množství amplifikované DNA je sledováno pomocí změn fluorescence. V reakční směsi jsou obsaženy specifické hybridizační sondy, na kterých jsou fluorescenční značky. Tyto sondy během reakce hybridizují s fragmenty DNA vytvářejícími se amplifikací. Ve chvíli, kdy se obě sondy

dostanou do těsné blízkostí, dojde mezi nimi k přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET). Během FRET je fluorescein excitován světelným zdrojem přístroje a emitovaná fluorescence je v průběhu procesu měřena fluorometrem. Její nárůst není na začátku masivní, později je výrazný vzestup ovlivněn tím, jak geometrickou řadou narůstá množství amplifikovaného úseku DNA.

5.1.4. Genotypizace

Hybridizační sondy slouží rovněž k určení genotypu procesem vyhodnocení křivky tání. Tato genotypizace navazuje na dokončení amplifikačních cyklů, kdy jsou amplikony přítomny ve zvýšené koncentraci.

Sondy hybridizují s částí cílové sekvence. Jedna sonda nasedá na oblast, která není mutovaná a slouží k ukotvení sondy. Druhá sonda překlenuje místo se sledovanou mutací (mutační sonda).

Během analýzy křivky tání zvyšující se teplota způsobuje pokles fluorescence, neboť mutační sonda disociuje jako první a tak obě fluorescenční značky již nejsou blízko sebe. Je-li přítomna mutace Faktor V Leiden, neshoda mutační sondy s cílem způsobuje sníženou stabilitu hybridu, takže dochází k poklesu fluorescence již při nižších teplotách. U wild-type genotypu k neshodě nedochází a proto dvoušroubovice DNA má vyšší teplotu tání (T_m).

6. Výsledky měření

Tato tabulka obsahuje výsledky měření osmdesáti nově přichozích i stávajících pacientů pomocí funkčních testů a jejich porovnání s výsledky získanými vyšetřením pomocí molekulárně genetických testů.

Pacient	Narození	pohlaví	PCR	APCV	INTR
1	1985	F	Negativní	4,75	Negativní
2	1963	F	heterozygot	1,49	Pozitivní
3	1968	F	Negativní	6,03	Negativní
4	1981	M	Negativní	5,01	Negativní
5	1948	F	Negativní	5,90	Negativní
6	1973	F	Negativní	4,03	Negativní
7	1991	F	Negativní	5,97	Negativní
8	1995	M	heterozygot	1,48	Pozitivní
9	1962	F	Negativní	5,09	Negativní
10	1993	F	heterozygot	1,58	Pozitivní
11	1980	F	heterozygot	1,51	Pozitivní
12	1953	F	negativní	5,33	Negativní
13	1979	F	heterozygot	1,63	Pozitivní
14	1974	F	negativní	4,73	Negativní
15	1961	M	heterozygot	1,67	Pozitivní
16	1990	F	heterozygot	1,75	Pozitivní
17	1977	F	negativní	5,76	Negativní
18	1991	F	negativní	6,06	Negativní
19	1951	F	negativní	5,42	Negativní

20	1995	F	negativní	6,70	Negativní
21	1982	F	negativní	6,00	Negativní
22	1978	F	negativní	5,52	Negativní
23	1950	F	negativní	5,11	Negativní
24	1988	M	negativní	5,22	Negativní
25	1981	F	negativní	4,99	Negativní
26	1953	F	negativní	5,71	Negativní
27	1976	F	negativní	5,06	Negativní
28	1993	F	negativní	5,86	Negativní
29	1982	F	negativní	5,00	Negativní
30	1985	F	homozygot	1,04	Pozitivní
31	1978	M	heterozygot	1,56	Pozitivní
32	1972	F	negativní	4,44	Negativní
33	1992	F	negativní	5,57	Negativní
34	1992	F	negativní	5,49	Negativní
35	1977	F	heterozygot	1,54	Pozitivní
36	1986	F	negativní	4,54	Negativní
37	1992	F	heterozygot	1,51	Pozitivní
38	1995	F	negativní	5,44	Negativní
39	1992	F	negativní	4,20	Negativní
40	1991	F	negativní	5,18	Negativní
41	1985	M	negativní	5,25	Negativní
42	1990	F	heterozygot	1,45	Pozitivní
43	1990	F	negativní	7,01	Negativní

44	1977	F	Heterozygot	1,52	Pozitivní
45	1994	F	Negativní	5,79	Negativní
46	1992	M	Negativní	3,25	Negativní
47	1978	F	Negativní	5,28	Negativní
48	1955	F	Negativní	5,57	Negativní
49	1946	F	Heterozygot	1,59	Pozitivní
50	1992	F	Heterozygot	1,51	Pozitivní
51	1981	F	Negativní	5,04	Negativní
52	1976	F	Negativní	5,08	Negativní
53	1978	F	Negativní	3,72	Negativní
54	1972	F	Heterozygot	1,59	Pozitivní
55	1969	F	Negativní	5,45	Negativní
56	1990	F	Heterozygot	1,53	Pozitivní
57	1993	F	Heterozygot	1,49	Pozitivní
58	1981	F	Negativní	4,67	Negativní
59	1982	F	Heterozygot	1,52	Pozitivní
60	1945	F	Negativní	4,77	Negativní
61	1956	F	Heterozygot	1,53	Pozitivní
62	1984	F	Heterozygot	1,53	Pozitivní
63	1977	F	Heterozygot	1,54	Pozitivní
64	1977	F	Negativní	4,81	Negativní
65	1995	F	Negativní	6,70	Negativní
66	1984	M	Negativní	5,93	Negativní
67	1978	F	Negativní	6,01	Negativní

68	1972	F	Negativní	4,68	Negativní
69	1990	F	Negativní	5,17	Negativní
70	1991	F	Heterozygot	1,56	Pozitivní
71	1968	F	Heterozygot	1,64	Pozitivní
72	1997	F	Negativní	5,17	Negativní
73	1990	F	Heterozygot	1,50	Pozitivní
74	1988	F	Negativní	4,89	Negativní
75	1990	F	Heterozygot	1,57	Pozitivní
76	1988	F	Negativní	3,41	Negativní
77	1976	F	Negativní	4,78	Negativní
78	1948	F	Heterozygot	1,43	Pozitivní
79	1974	F	Negativní	5,21	Negativní
80	1952	F	Negativní	5,57	Negativní

Tabulka 6 - Výsledky

INTR negativní – nález nesvědčí pro přítomnost APC rezistence

INTR pozitivní – nález svědčí pro přítomnost APC rezistence

7. Diskuse

Jako cíl mé bakalářské práce jsem si stanovila zjistit, zda funkční vyšetření rezistence na aktivovaný protein C je dostatečně citlivé pro screening a záchyt nově přichozích i stávajících pacientů s Leidenskou mutací a odhalení, zda se jedná o heterozygotní nebo homozygotní formu. Naměřené výsledky jsem poté porovnávala s výsledky genetického vyšetření.

Ze získaných výsledků vyplívá, že pro diagnostiku této poruchy je funkční metoda vhodná. Všechny měřené vzorky měly 100% shodu s výsledky měřenými funkční metodou a metodou PCR.

Vyšetření funkčními metodami má tu výhodu, že je méně finančně náročné a neklade speciální nároky na provedení. Lze jej tedy provádět v běžných laboratorních podmínkách, na rozdíl od molekulárně genetických testů, které jsou prováděny v laboratořích zaměřujících se na práci s lidským genomem.

8. Závěr

Tromboembolická nemoc je multifaktoriální onemocnění. To znamená, že příčinou jejího vzniku může být jedna nebo více příčin. Například: vznikem žilní trombózy může být ohrožena žena užívající hormonální antikoncepci po úrazu, při dlouhodobější imobilizaci nebo po operaci. Pokud je tato žena zároveň nositelkou mutace genu pro FV Leiden toto riziko se mnohonásobně zvyšuje.

V Evropě v současné době umírá stále asi 500 000 osob ročně na komplikace tromboembolické nemoci (TEN) přesto, že se jedná o onemocnění, kterému již lze zabránit vhodnou profylaxí. Také incidence tohoto onemocnění je stále vysoká. Během jednoho roku dochází k výskytu 148 případů žilní trombózy a 95 případů plicní embolie v přepočtu na každých 100 000 obyvatel (Cohen et al. 2007).

V České republice s 10,5 milionu obyvatel zatím nemáme k dispozici přesná statistická čísla a vycházíme proto z kvalifikovaných odhadů Puchmayera s Roztočilem (Puchmayer V. et al. 2000) a Chocholy (Chochola M. et al. 2000), (Kvasnička et al. 2012).

S přihlédnutím k předchozím studiím a číslům, lze říci, že vyšetření rezistence na aktivovaný protein C, nebo vyšetření mutace pro FV Leiden, může pomoci předcházet vzniku žilních trombóz.

Cílem mé práce bylo zjistit, zda je vyšetření rezistence na aktivovaný protein C funkčními metodami používanými v naší laboratoři dostatečně senzitivní a přesné, aby dokázalo odhalit nejen rezistenci faktoru V, vůči inhibičnímu vlivu proteinu C, ale aby i poukázalo na přítomnost heterozygotního nebo homozygotního pacienta. Výsledky svého měření jsem porovnávala s výsledky poskytnutými Hematologicko-transfuzním oddělením Oblastní nemocnice Kladno, jejíž pacienti byli vyšetřeni v Laboratoři molekulární diagnostiky Nemocnice na Homolce.

Při porovnávání výsledků měřených funkčními testy, tedy na koagulometru Sismex CA1500 a výsledky genetických měření metodou PCR real-time, vyšetření rezistence na aktivovaný protein C ve všech mnou měřených případech odhalilo pacienta s pozitivním nálezem, čímž byla potvrzena první a zároveň druhá hypotéza. V souboru mnou měřených dat byl pozitivní nález pouze jednoho homozygotního pacienta

a tak není možné říci, zda je metoda dostatečně citlivá i pro rozlišení heterozygotní a homozygotní formy mutace. Při porovnávání výsledků naměřených funkčními testy jsem vždy došla ke shodě s výsledky získanými genetickým měření metodou PCR, čímž byla potvrzena třetí hypotéza.

9. Klíčová slova

rezistence na aktivovaný protein C

Leidenská mutace

trombofilie

Key Words

Resistance to activated protei C

Leiden mutation

Trombophilia

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Průběh koagulační kaskády.....	19
--	----

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Test s APC.....	30
Tabulka 2- Test bez APC.....	31
Tabulka 3 - Stabilita kontrol	34
Tabulka 4 - Reagencie.....	38
Tabulka 5 - Stabilita reagensů po naředění.....	39
Tabulka 6 - Výsledky	46

Seznam použité literatury

- Alving B. M.: *The hypercoagulable states. Hosp. Pract.* 28, 2:109-114, 1996
- Badimon L., Badimon J. J.: *Interaction of platelet activation and coagulation. In Fuster V., Topol E. J., eds Atherosclerosis and Coronary Artery Disease.* Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia 639-656, 1996
- Bachman F.: *Fibrinolysis. In: Haemostasis and Thrombosis 1.* Eds: A. L. Bloom, C. D. Forbes, D. P. Thomas, E. G. D. Tuddenham. Churchill Livingstone, London, 549-625, 1994.
- Bartůňková J., Paulík M. a kolektiv: *Vyšetřovací metody v imunologii, 2., přepracované a doplněné vydání.* Praha: Grada Publish a.s., 84-81, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7
- Blombäck B, *Fibrinogen and fibrin - proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis, Stockholm:* IOS Press, 2011, DOI 10.3233/CH-1996-16401
- Buliková A., Smejkal P., Zavřelová J., Clupová G., Penka M.: *Získané inhibitory krevního srážení. Interní medicína pro praxi.* 10 (7): 336-339, 2008
- Cohen A.T., Angelli G., Anderson F.A. et al. : *Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality.* *Thromb. Haemost.* 98: 756-764, 2007
- Colman R.W., Hirsh J., Marden V. J., et al. *Haemostasis and Thrombosis. Basic principles & Clinical Practice.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 779, 2001.
- Coufal Z.: *Nové možnosti prevence a terapie systémové trombofilie* *Interní medicína pro praxi* 14(10): 357-360,2012.
- Dastych M., Breinek P. et al. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant,* 1, vyd. Brno: Masarykova Universita, Lékařská fakulta, 39-49,2008. ISBN 978-80-210-4572-9

- Davie et al.: *The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation*.
Biochemistry: 30, 10363-10370, 1991
- Debize G., Massignom D., Couer P.: *Antiphospholipid antibodies and thrombotic risk: relationship to trombomodulin, D- dimers and prothrombin fragmenr 1+2*. *Nouv. Rev. Fr.Hématol.* 37,2:93-96, 1995.
- Esmon E. L., Owen W. G., Esmon C. T.: *Isolation of a membrane – bound cofactor for trombin – catalized activation of protein*. *C. J. Biol. Chem.* 275:859-864,1982.
- Esmon Ch. T.: Protein S a protein C. *Biochemistry, Physiology and Clinical Manifestation of Deficiencies*. *Trends. Cardiovasc. Med.*2, 6:214-219,1992.
- Esmon Ch. T.: *The protein C. Pathway Chest*, 124: 26-32, 2003.
- Fridecký B., et al. *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích* (on-line). ČSKB, ČLS, JEP. 2010. www.cskb.cz
- Gajda P., Baláž D., Mokáň M., Kubisz P.: *K problematike nového modelu hemostázy*. *Vnitřní lékařství* 44, 11:671-674, 1998.
- Giesen P. L, Nemerson Y.: *Tissue factor on the loose*. *Semin. Thromb. Haemost.*26, 4:379-384,2000
- Hoffman M., Monroe D. M., Roberts H. R.: *Cellular interactions in haemostasis*. *Haemostasis* 26, 1:12-16,1996.
- Hudeček, J., Paceková, M., Chudej, J., Kubisz, P.: *Infekce a hemostáza*. *Vnitřní lékařství*, 50,6:463-471, 2004.
- Hrubíško, M. et al. *Hematologie a krevní transfuze I*. *Hematologie*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1983. ISBN 08-040-83.

Chochola M., Vařejka P., Staněk F., et al. *Novinky v diagnostice a léčbě hluboké žilní trombózy dolních končetin*. Čas. Lék. čes.: 2000; 139: 583.

Indrák, K. et al. *Hematologie. vnitřní lékařství. Postgraduální klinický projekt*. Praha: Trion, 276, 2006.

Kolde, H.J. *Haemostasis*. Basel: Pentapharm Ltd. 2004.

Kvasnička J., Hájková J., Bobčíková P., Kvasnička T., Dušková D., Poletínová Š., Kieferová V. *Prevalence trombofilních mutací FV Leiden, protrombinu G20210A a PAI-1 4G/5G a jejich vzájemných kombinací v souboru 1450 zdravých osob středního věku v regionu Praha a střední Čechy (výsledky real-time PCR analýzy FRET)* Čas. Lék. čes. 151: 76–82, 2012.

Kvasnička, J. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*, Grada Publishing, 2003, ISBN 80-7169-993-4

Lechner, K., Kyrle, P. A.: *Antitrombin III concentrates – are they clinically useful?* Tromb. Haemost.83,3:340-348,1995.

Lexová, S. et al. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Brno: IDVPZ,183, 2000.

Markis, M. *Leidenská mutace: testovat nebo netestovat*, *Krevní transfuze*, 10:255-256,2012.

Matýšková, M., Zavřelová, J., Hrachovinová, I., *Hematologie pro zdravotní laboranty, 2.díl Krevní srážení*, Brno: IDVPZ, 1999. ISBN 80-7013-278-7.

Nemerson, Y., *Tissue factor and haemostasis*. *Blood* 71, 1-8, 1988.

Nemerson, Z., *The tissue factor pathway of blood coagulation*. *Sem. Hematol*, 29, 3:170-176,1992.

Pecka, M. *Laboratorní hematologie v přehledu III, Fyziologie a patofyziologie hemostázy*,

Český Těšín: FINIDR, 2004, ISBN 80-86682-03-X.

Pecka, M., Malý, J., Dejmková, J. *Přehled laboratorní hematologie III.: Hemostáza Imunohemotologie. Český těšín: Galén, 1998. ISBN 80-85824-89-2.*

Pecka, M. *Přehled laboratorní hematologie II. Bílá krevní řada. Krevní destička. Praha: Galén 1996, ISBN 80-85824-43-4.*

Pecka, M., Malý, J. *Laboratorní hematologie. Hradec Králové: HK Credit 55, 2006. ISBN 80-86780-29-5.*

Penka, M., Buliková, A., Matýšková, M., Zavřelová, J. *Diseminovaná intravaskulární koagulace(DIC). Praha: Grada Publishing, a.s., s. 77, 2003. ISBN 80-247-0341-6.*

Penka, M., Tesařová, E. *Hematologie a transfuzní lékařství I. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.*

Penka, M., Buliková, A., et al. *Neonkologická hematologie. 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.*

Penka, M., Buliková, A., Matýšková, M., Zavřelová, J. *Hematologie I, Neonkologická hematologie Grada Publishing spol. s.r.o., Praha, 2001, ISBN 80-247-0023-9.*

Poort S. R., Rosendall F. R., Reitsma P. H., Bertina R. M.: *A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 88, 3698-3703, 1996.*

Puchmayer V., Roztočil K. *Praktická angiologie. Triton, s. 191 Praha 2000.*

Racek J. et al. *Klinická biochemie, Druhé přepracované vydání. Praha: Galén. 41-57,2006. ISBN 80-7262-324-9*

Sakalová, A., Bátorová, A., Mistrík, M., Hrubíško, M. et al. *Klinická hematol'ogia*.
Martin: Osveta, 2010. ISBN 978-80-8063-324-0.

Senzolo, M., Burra, P., Cholongitas, E., Burroughs, A.K. *New insights into the 56
coagulopathy of liver disease and liver transplantation*. *World J Gastroenterol* 12(48):
7725-36, 2006.

Schafer, J.A., Higgins, D.L., *Human fibrinogen, Critical Reviews in Clinical
Laboratory Sciences*, Informa Healthcare, 1988.

Schneiderka P. et al. *Kapitoly z klinické biochemie, 2. doplněné a přepracované vydání*.
Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha. 330- 365, 2004. ISBN
80-246-0678-X

Schumacher H.R., Garvin D.F., Triplett D.A. *Induction to Laboratory Hematology and
Hematopathology*. New York: Alan R. Liss, 628, 1984.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., *Metody molekulární
biologie*,
2008, ISBN 978-80-210-3841-07.

Tabernerero, M.D., Tomas, J. F., Alberca, I. et al.: *Incidence and clinical characteristics of
hereditary disorders associated with venous thrombosis*. *Am. J. Hematol.* 36, 4:249-254,
1991.

Rohoň, P., Ambrůzová, Z., Bačovský, J., Balcárková, J., Katrincsáková, B., Krčová, V.,
Mrázek, F., Papajík, T., Petřek, M., Slavík, L., Úlehová, J., Zemanová, M., *Molekulární
biologie v hematoonkologii – od základních vyšetřovacích metod, ke klinické praxi*.
1, vyd. Olomouc: Universita Palackého, 2009, 127 s. ISBN 978-80-244-2224-4.

Van Tilburg, N.H., Rosendaal, F.R., Bertina, R.M. *Thrombin activatable fibrinolysis
inhibitor and the risk of the deep vein thrombosis*. *Blood*, 95:2855-2859, 2000.