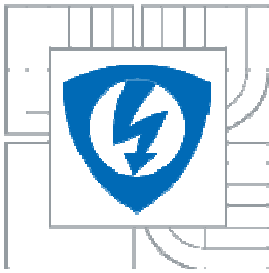




**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ**  
**ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**

**FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION**  
**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING**

## **ZÁVISLOST DERIVOVANÉHO FIBRINOGENU NA HODNOTÁCH DH U APTT A QUICK(P.T) METODY**

**DEPENDENCE OF DERIVED FIBRINOGEN ON VALUES OF DH FROM APTT AND  
QUICK(P.T) METHODS**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**  
MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**  
AUTHOR

**Bc. MICHAL KLUS**

**VEDOUCÍ PRÁCE**  
SUPERVISOR

**Ing. HELENA ŠKUTKOVÁ**

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

## Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor  
**Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

**Student:** Bc. Michal Klus  
**Ročník:** 2

**ID:** 119719  
**Akademický rok:** 2012/2013

### NÁZEV TÉMATU:

**Závislost derivovaného fibrinogenu na hodnotách DH u APTT a QUICK(PT) metody**

### POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Vypracujte literární rešerši metod pro vyšetření krevní srážlivosti, popište parametry, které se hodnotí a jejich standardní hodnoty. Zaměřte se na specifickou metodu stanovení derivovaného fibrinogenu a zhodnoťte její spolehlivost, výhody a nevýhody. 2) Seznamte se s obsluhou vybraných hemostatických přístrojů (koagulometrů) na pracovišti konzultanta a otestujte je na referenčních vzorcích. 3) Navrhněte metodiku měření derivovaného fibrinogenu, vyjádření přesnosti a nejistoty měření a kontrolu kvality měření. 4) Statisticky zpracujte změřené data a vyhodnoťte závislost mezi derivovaným fibrinogenem a standardními metodami APTT a PT. Využijte data poskytnuté konzultačním pracovištěm. 5) Proveďte diskuzi získaných výsledků a zhodnoťte klinickou aplikaci měření.

### DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] MURRAY, Robert K., et al. Harperova biochemie. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová et. al. 4. vyd. v ČR. Praha: H & H, 2002. ix, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.  
[2] SCHAFER, Andrew I. The Hypercoagulable States. *Annals of Internal Medicine*. 1985, roč. 102, č. 6, s. 814-828.

**Termín zadání:** 11.2.2013

**Termín odevzdání:** 24.5.2013

**Vedoucí práce:** Ing. Helena Škutková  
**Konzultanti diplomové práce:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**  
*Předseda oborové rady*

### UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

# Abstrakt

Hemokoagulace, krevní srážení, je důležitým ukazatelem hemostatické rovnováhy lidského těla. Existuje mnoho způsobů, jak vyšetřovat krevní srážlivost. V praxi se vedle testů vyšetřujících čas koagulační kaskády z pohledu vnitřní cesty (APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas) a vnější cesty (PT – protrombinový čas) často používá stanovení koncentrace fibrinogenu pomocí Claussovy metody.

Metoda derivovaného fibrinogenu také stanovuje koncentraci fibrinogenu odečtením ze srážecí křivky u testu PT. Odpadá zde reakce nutná pro Claussův test. Derivovaný fibrinogen není v praxi příliš využíván, proto se diplomová práce navazující na tento projekt pokusí dokázat závislost mezi koncentrací fibrinogenu a standardními testy APTT a PT. K této studii budou využita klinická data.

**Klíčová slova:** derivovaný fibrinogen, APTT, PT, Claussův test, krev, hemostáza, hemokoagulace, koagulační faktory, fibrinolýza, koagulometry

# Abstract

Hemocoagulation, blood coagulation, is an important indicator of hemostatic balance in the human body. There are many ways how to investigate blood clotting. In practice, next to the tests investigating time of coagulation cascade from view of internal way (APTT – activated partial thromboplastin time) and external way (PT – prothrombin time) is often used determining of fibrinogen concentration by Clauss method.

Derived fibrinogen method determined fibrinogen concentration, too, by subtracting from the clotting curve in PT test. The reaction for Clauss method is not necessary here. Derived fibrinogen is not used much in practice. This is the reason, why the thesis related to this project will try to find relationship between concentration of fibrinogen and standard tests APTT and PT. Clinical data will be used for this.

**Key words:** derived fibrinogen, APTT, PT, Clauss test, blood, hemostasis, hemocoagulation, coagulation factors, fibrinolysis, coagulometers

## **Bibliografická citace**

KLUS, M. Závislost derivovaného fibrinogenu na hodnotách DH u APTT a QUICK (PT) metody. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 86 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Helena Škutková

# Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Závislost derivovaného fibrinogenu na hodnotách DH u APTT a QUICK(PT) metody jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 22. května 2013

.....  
podpis autora

# Poděkování

Děkuji vedoucí diplomové práce Ing. Heleně Škutkové za účinnou, metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne 22. května 2013

.....  
podpis autora

# Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>1. KREV</b> .....	<b>9</b>
<b>2. HEMOSTÁZA</b> .....	<b>11</b>
2.1. PRIMÁRNÍ HEMOSTÁZA .....	11
2.2. SEKUNDÁRNÍ HEMOSTÁZA – HEMOKOAGULACE .....	12
2.3. KOAGULAČNÍ FAKTORY .....	14
2.4. VNITŘNÍ DRÁHA HEMOKOAGULACE .....	14
2.5. VNĚJŠÍ DRÁHA HEMOKOAGULACE .....	15
2.6. KONCOVÁ SPOLEČNÁ DRÁHA HEMOKOAGULACE.....	15
2.7. FIBRINOLÝZA .....	17
<b>3. TESTY POUŽÍVANÉ V HEMOSTÁZE</b> .....	<b>19</b>
3.1. GLOBÁLNÍ TESTY.....	19
3.2. SKUPINOVÉ TESTY .....	20
3.3. SPECIFICKÉ TESTY.....	22
<b>4. KOAGULOMETRY</b> .....	<b>24</b>
4.1. DETEKCE KOAGULA .....	24
4.2. DETEKCE CHROMOGENNÍCH A IMUNOLOGICKÝCH TESTŮ .....	24
4.3. KOAGULOMETRY SYSMEX.....	25
4.4. PRÁCE S PŘÍSTROJEM SYSMEX CA-1500 .....	29
4.5. TECHNICKÝ POPIS ANALYZÁTORU SYSMEX CA – 1500 .....	38
<b>5. DERIVOVANÝ FIBRINOGEN</b> .....	<b>48</b>
5.1. METODA DERIVOVANÉHO FIBRINOGENU .....	48
5.2. MĚŘENÍ DERIVOVANÉHO FIBRINOGENU NA PŘÍSTROJI SYSMEX CA – 1500 .....	49

<b><u>6. ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT .....</u></b>	<b><u>51</u></b>
6.1. PRÁCE S DATY.....	51
6.2. ZÁVISLOST DERIVOVANÉHO FIBRINOGENU NA DH PT.....	57
6.3. POROVNÁNÍ DERIVOVANÉHO FIBRINOGENU S CLAUSSOVOU METODOU .....	60
6.4. ZÁVISLOST DERIVOVANÉHO FIBRINOGENU NA DH APTT.....	71
6.5. POROVNÁNÍ KONCENTRACE FIBRINOGENU V ZÁVISLOSTI NA POHLAVÍ .....	76
6.6. ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	77
<b><u>ZÁVĚR .....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>SEZNAM LITERATURY.....</u></b>	<b><u>81</u></b>
<b><u>SEZNAM ZKRATEK.....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>SEZNAM PŘÍLOH .....</u></b>	<b><u>86</u></b>

# Úvod

Krev je možná nejstarší známou tělní tekutinou. Byla známá již Hippokratovi ve starém Řecku. První anglické záznamy slova krev pocházejí kolem roku 1000 našeho letopočtu a v roce 1628 byl poprvé popsán krevní oběh anglickým fyzikem Williamem Harveym.

Význam krve z lékařského hlediska je velkým ukazatelem činnosti vnitřního systému. Krevní testy jsou jedny ze základních kvalitativních i kvantitativních možností pro stanovení diagnózy a případné nastolení léčby pacienta. Odběr krve je sice invazivní proces, ale vedle ostatních lékařských invazivních zákroků se jedná o maličkost. Výťažnost informací z malého množství odebrané krve je obrovská.

Vlastnosti krevního srážení jsou důležitou podskupinou krevních testů. Ideálním výsledkem těchto testů je zlatá střední cesta, protože pokud se nám krev sráží příliš, máme ideální výchozí pozici pro trombotické onemocnění až kardiovaskulární potíže. V případě, že je srážení nedostatečné, vnitřní cirkulace a rozvod krve může být v pořádku, ale i při lehkém poranění, nebo invazivním zákroku mohou nastat komplikace.

Krevní srážení od porušení celistvosti systému až po krevní zátku (koláč) je velmi složitý sled reakcí a doprovodných pochodů. Existuje mnoho způsobů jak určit správnost koagulace (krevního srážení) od jednoduchého píchnutí do prstu až po složitější laboratorní procesy vyžadující specifický postup spolu s vhodnými reagensy a principy měření.

Mezi nejběžnější testy patří APTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas) pro vyšetření vnitřní a společné cesty srážení. Quickův, neboli PT (protrombinový čas), test zastupující vnější a společnou cestu srážení. Claussův test pro stanovení koncentrace fibrinogenu ve vzorku.

Zkoumaný test derivovaného fibrinogenu stanovuje koncentraci fibrinogenu v krvi v závislosti na test PT. Měla by zde být i závislost na test APTT. Derivovaný fibrinogen má potenciál pro zjednodušení stanovení koncentrace fibrinogenu ve zkoumané krvi. Vlastnosti a teoretický význam tohoto testu se pokusíme vyhodnotit v této diplomové práci. Pro hledání závislosti budou použita skutečná patientská data.



# 1. Krev

Červeně zbarvená tělní tekutina tvořená z 45% krevními elementy (pevnou částí) a z 55% krevní plazmou (tekutou částí). Dospělý člověk má přibližně 5 litrů krve, což odpovídá asi 6 – 8 % tělesné hmotnosti, na každý kilogram přibližně 70 – 75 ml. Úloha krve spočívá v několika funkcích. [19] [39]

Transportní funkce – přivádění kyslíku z plic do tkání a odvádění oxidu uhličitého zpět do plic. Přenos živin ze střev do jater a z jater ke tkáním. Odvedení odpadních metabolitů z tkání do ledvin a plic. Mezi transportní funkce lze zařadit i distribuce hormonů, které se do krve dostávají ze žláz s vnitřní sekrecí. Někdy se přenos hormonů zařazuje jako vlastní funkce informační. [19] [39]

Hemostatická funkce – zachování stálosti vnitřního prostředí, což odpovídá udržování teploty těla, pH (acidobazická rovnováha), koncentrace iontů, osmotického tlaku, arteriálního a venózního tlaku, to souvisí s udržením objemu. Zástava krvácení díky hemokoagulaci. Regulace vodní rovnováhy. pH krevní plazmy je udržováno na hodnotě 7,40 a to jen s malou odchylkou  $\pm 0,04$ , na čemž má hlavní zásluhu hydrogenuhličitanový pufr. [19] [39]

Obranná funkce – zajišťována bílými krvinkami a obsaženými protilátkami bránícími infekci. [19] [39]

Hlavní podíl na transportu látek mají červené krvinky, erytrocyty (z řeckého *erytros* = červený a *kýtos* = buňka), které mají bikonkávní tvar o průměru asi 7,2  $\mu\text{m}$  a tloušťku přibližně 2,1  $\mu\text{m}$ . Jedná se o bezjaderné buňky vznikající v dřeni velkých kostí (u dospělých hlavně v hrudní kosti, v obratelch, v žebrech, v klíční kosti, v pánevních kostech, v proximálních epifýzách některých dlouhých kostí a v plochých kostech lebečních). Hlavním hormonem zodpovědným za tvorbu erytrocytů je erythropoetin syntetizovaný v ledvinách. Odhaduje se, že obsah erytrocytů v lidském těle odpovídá 3250  $\text{m}^2$ , muži mívají 5 milionů v  $\text{mm}^3$ , 4,5 milionů v  $\text{mm}^3$  červených krvinek nalezneme u žen. Základní stavební jednotkou červených krvinek je hemoglobin, červené krevní barvivo obsahující iont železa, který slouží jako vazební místo pro transport. Ve tkáních se uvolňuje z hemoglobinu kyslík a navazují se molekuly  $\text{CO}_2$ , z oxyhemoglobinu vzniká karbaminohemoglobin. Velmi nebezpečná je vazba oxidu uhelnatého (CO), kdy vzniká karboxyhemoglobin, který není schopen přenášet kyslík. Červené krvinky žijí přibližně 120 dní a poté zanikají ve slezině. Muži mívají přibližně o 5 % více červených krvinek než ženy. Živiny do krve putují mizovodem, výměna plynů probíhá v plicích. [19] [39]

Obranná funkce lidského těla připadá hlavně na bílé krvinky, leukocyty, kterých je v lidském těle 6 až 9 tisíc v  $\text{mm}^3$ . Podle obsahu specifických granul dělíme leukocyty na granulocyty a agranulocyty. Granulocyty rozlišujeme neutrofilní (pohlcují a ničí bakterie), eozinofilní (účastní se zánětlivých reakcí) a bazofilní (uvolňují histamin a serotonin).

K agranulocytům řadíme lymfocyty (imunitní odpověď organismu), monocyty (ve tkáních se transformují v makrofágy), plazmatické buňky. [19] [39]

Tekutou součástí krve je krevní plazma (z řeckého *plassein* – tvořit). Můžeme ji získat centrifugací, nebo odstátím krve s přidanými antikoagulačním činidlem. Jedná se o extracelulární světle žlutou kapalinu obsahující především vodu (a v ní rozptýlené ionty) z 92%, bílkoviny 7% a zbylé anorganické a organické látky 1%. Proteiny krevní plazmy dělíme na albuminy, udržující osmotický tlak krve, globuliny, mající transportní funkce, fibrinogen, základní bílkovina krevního srážení, glykoproteiny, faktory krevního srážení. Lipidy (tuky) obsažené v krevní plazmě se vyskytují jako triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a cholesterol obsažený v lipoproteinových částicích HDL a LDL. Lipidy jsou využívány jako energetická rezerva organismu, dále slouží jako stavební součást membrán. Cukry (sacharidy) slouží jako zisk okamžité energie. Nejdůležitější je glukóza, její koncentrace v krvi se označuje jako glykémie. Dusíkaté sloučeniny jako urea (močovina), kreatinin a kyselina močová se vyskytují v plazmě ve zvýšené koncentraci při poškození ledvin. Mezi anorganické látky vyskytující se v plazmě patří  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  ionty, udržující rovnovážný stav nitro a mimobuněčné tekutiny,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  uplatňující se při srážení krve, při obranných reakcích a ve funkci nervové soustavy.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , nalézají uplatnění při krvetvorbě. V plazmě nalezneme i anionty jako  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{J}^-$ , fosfáty, uhličitany a sírany. [19] [39]

## 2. Hemostáza

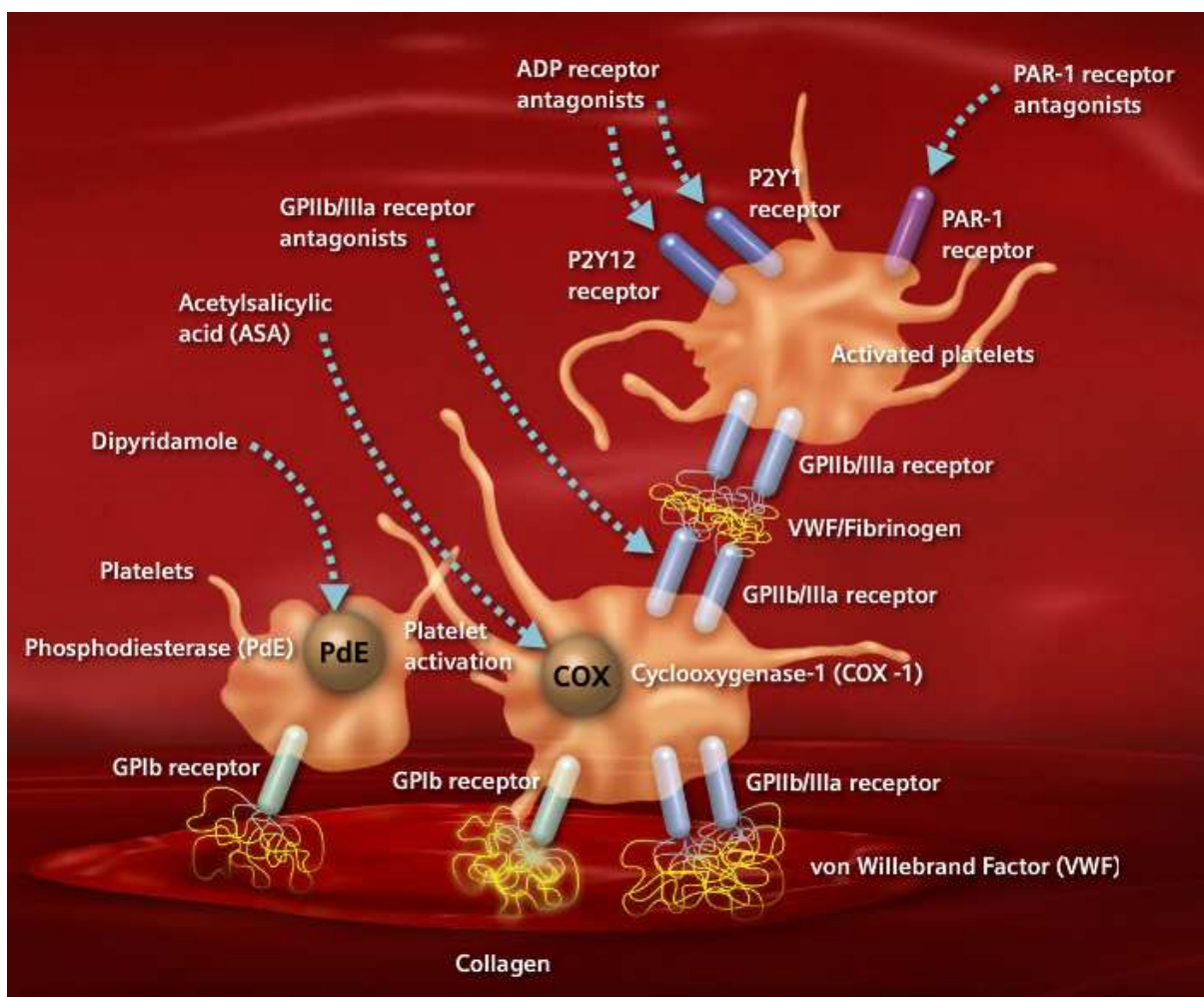
Hemostáza je schopností organismu zastavit krvácení. Jedná se o proces, na kterém má podíl řada složek a mechanismů s různými účinky. Zahrnuje srážení krve (koagulaci), což není zcela definovatelné jako fyziologický děj, protože u zdravého jedince se za normálních okolností krev srážet nemá. Na krevním srážení se podílejí cévy, krevní destičky a proteiny krevní plazmy. Hemostázu lze rozdělit na 3 základní fáze. Primární hemostázu zajišťující vznik primární zátky. Sekundární hemostázu, hemokoagulaci, vedoucí k definitivní zátce. A fibrinolýzu sloužící k opětovné rekanalizaci cévního řečiště.[20] [37]

Homeostatická, nebo spíše koagulační teorie pochází z prací od Morawitze z roku 1905 a uplatňují se v ní 4 faktory (fibrinogen – F I, protrombin – F II, tromboplastin - F III – tkáňový faktor,  $\text{Ca}^{2+}$  - F IV). Poraněná tkáň uvolňuje tromboplastin, který za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů aktivuje v plazmě proenzym protrombin na enzym trombin. Trombin poté aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Ve 40. letech byly objeveny další koagulační faktory na základě studií pacientů, kterým chyběl některý z koagulačních faktorů. V roce 1964 prováděl MacFarlane pokusy in vitro za cílem odhalit subendotelové struktury. Při kontaktu s těmito strukturami se aktivoval faktor XII. Faktor XIIa spustil kaskádovitou reakci, během které došlo k aktivaci dalších faktorů (XI, IX a X). Tuto kaskádu chápal jako reakci vedoucí k tvorbě trombinu, který dále působil na fibrinogen. Složky podílející se na celkové reakci nazval jako faktory plazmatického koagulačního systému.[20] [19] [8]

### 2.1. Primární hemostáza

Jedná se o proces tvorby primární hemostatické zátky trvající přibližně 3 až 5 minut. Hlavní podíl zde mají trombocyty a cévní stěna. Nejdříve dochází k vazokonstrikci poraněné cévy s účelem snížit přítok krve (co nejmenší ztráty). Přicházejí na řadu destičky, které se vážou na kolagen (smáčivý povrch) pomocí glykoproteinových receptorů (GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/IX/V). Tento proces je podporován von Willebrandovým faktorem (vWF) a fibronectinem. Poté jsou aktivovány trombinem nebo ADP z již aktivovaných destiček. Dochází k centralizaci granulí a poté k degranulaci (sekreční fázi), tedy k sekreci proagregačních a chemotaktických mediátorů (adhezivní proteiny, ADP,  $\text{TxA}_2$ , prokoagulační faktory, lyzosomální enzymy). Po aktivaci dochází ke změně tvaru z diskového na améboidní (kulovitý s výběžky) a k obnažení vazebných míst receptorů GP IIb/IIIa. Umožní se vzájemná vazba trombocytů bivalentními proteiny (fibrinogenem, vWF a fibronectinem.). Dochází k agregaci destiček. Nejdříve probíhá primární agregace vyvolaná hlavně ADP z porušených buněk. Po následné degranulaci začnou působit další proagregační činitelé, vytvoří stabilizující můstky a agregace je nezvratná – sekundární.

Dochází k vytvoření tzv. destičkové zátky – bílý trombus. Uvolňují se fosfolipidy z vnitřní membránové dvojvrstvy do vnějších membránových struktur trombocytu. Tyto fosfolipidy (fosfatidylserin a fosfatidyletanolamin) následně výrazně potencují polymeraci rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin. [20] [17]

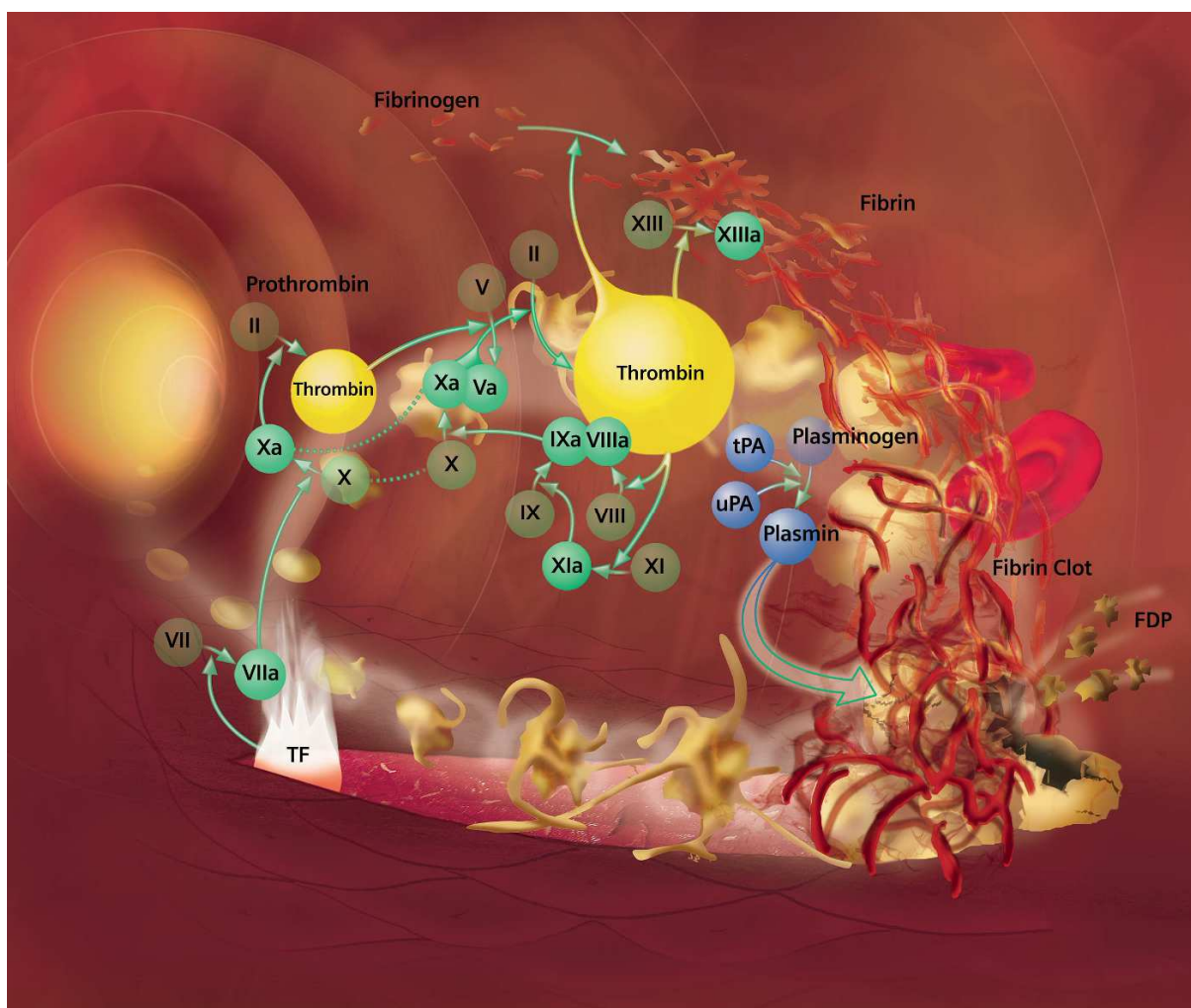


Obrázek 1: Primární Hemostáza [27]

## 2.2. Sekundární hemostáza – hemokoagulace

Srážení krve, nebo koagulace (hemokoagulace) patří mezi hlavní pochody hemostázy, a má za úkol zástavu krvácení. Jedná se o složitý mechanismus, který je propojený celou řadou pozitivních i negativních zpětných vazeb, vedoucí k udržení rovnováhy mezi hypokoagulací a hyperkoagulací. K vytvoření koagula vedou 2 cesty, a to vnitřní a vnější. Tyto cesty na sobě nejsou zcela nezávislé a na konci obě přecházejí ve společnou cestu. Podstatou hemokoagulace je přeměna fibrinogenu na nerozpustnou síť

fibrinu, jinými slovy jde o tvorbu definitivní (sekundární) zátky. Tento proces trvá za normálních podmínek 5 až 10 minut. [20] [17]



Obrázek 2: Koagulační kaskáda [27]

## 2.3. Koagulační faktory

Tabulka 1: Přehled faktorů hemokoagulační kaskády [37]

Používaný název	Synonyma
Fibrinogen	Faktor I, F I
Protrombin	Faktor II, F II
Tkáňový tromboplastin	Faktor III, F III, zevní faktor, tkáňový faktor, TF, TP
Ca <sup>2+</sup>	Faktor IV, F IV
Faktor V	Proakcelerín, labilní faktor, akcelerátový (Ac-) globulín, F V
Faktor VII	Sérový akcelerátor přeměny protrombinu na trombin (SPCA), prokonvertin, kothromboplastin, F VII
Faktor VIII	Antihemofilický globulín (AHG), antihemofilický faktor A, F VIII
Faktor IX	Antihemofilický faktor B, plazmatická složka tromboplastinu (PTC), Christmas faktor, F IX
Faktor X	Stuartův - Prowerův faktor, F X
Faktor XI	Antihemofilický faktor C, plazmatický předchůdce tromboplastinu (PTA), F XI
Faktor XII	Hagemanův faktor, F XII
Faktor XIII	Fibrin – stabilizující faktor (FSF), fibrinoligasa, F XIII
HMWK	Vysokomolekulární kininogen, Fitzgeraldův faktor
Prekalikrein	Fletcherův faktor
(destičkový faktor 3)	(Fosfolipid, PL, PL 3)

## 2.4. Vnitřní dráha hemokoagulace

Vnitřní systém zahrnuje faktory XII, XI, IX, VIII, X, prekalikrein, vysokomolekulární kininogen (HMWK), Ca<sup>2+</sup> ionty a destičkové fosfolipidy. Tato dráha začíná kontaktní fází, kdy negativně nabitý aktivační povrch interaguje s prekalikreinem, HMWK a faktory XI a XII. In vivo je tímto místem pravděpodobně kolagen. Když se tyto komponenty spojí na aktivačním povrchu, působením kalikreinu se proteolyticky aktivuje faktor XII na XIIa (přípona *a* značí aktivovaný faktor). Faktor XIIa působí na prekalikrein za vzniku dalšího kalikreinu, čímž vzájemně aktivuje další faktor XII. Dále faktor XIIa aktivuje faktor XI na XIa a uvolňuje z HMWK bradykinin, což je nanopetid s výraznými vazodilatačními účinky. Za přítomnosti Ca<sup>2+</sup> a faktoru XIa je aktivován faktor IX na proteasu serinového typu, faktor IXa. Ten dále štěpí vazbu aminokyselin Arg – Ile faktoru

X a vzniká dvouřetězcová serinová proteáza, faktor Xa. Tato reakce vyžaduje spojení komponent tzv. tenasového komplexu nacházejícího se na povrchu aktivovaných destiček. Zahrnuje  $\text{Ca}^{2+}$  a faktory VIIIa, IXa a X. Zymogeny se zbytkem Gla (faktory II, VII, IX a X) zúčastněné v reakcích mají zmíněné Gla zbytky v amino – koncových oblastech molekuly, což je vazebné místo s vysokou afinitou pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Gla zkratka znamená zvýšený výskyt g-karboxyglutamátu, který umožňuje vazbu vápenatých iontů. Gla zbytky vznikají za účasti vitamínu K posttranslační karboxylací glutamátových zbytků. Než se spojí tenasový komplex, je nutné nejdříve aktivovat destičky, aby se kyselé (aniontové) fosfolipidy, fosfatidylserin a fosfatidylinositol, exponovaly. Faktor VIII je kofaktor, sloužící jako receptor faktorům IXa a X na povrchu destiček. Faktor VIIIa vzniká aktivací faktoru VIII pomocí malého množství trombinu. [20] [17]

## 2.5. Vnější dráha hemokoagulace

Vnější systém stejně jako vnitřní systém vede k aktivaci faktoru X na faktor Xa. Tento bod je společným uzlem vnější a vnitřní dráhy. Vnější dráha zahrnuje faktory VII a X, tkáňový faktor (TK) a vápenaté ionty  $\text{Ca}^{2+}$ . Systém je inicializován v místě poškození tkáně, kdy dochází k uvolnění tkáňového faktoru. Při poškození dochází k narušení endoteliální vrstvy a tkáňový faktor vstupuje do cirkulující krve. V plazmě je vždy přítomno malé množství aktivovaného faktoru VIIa, ten vytvoří s tkáňovým faktorem koagulačně aktivní komplex. Faktor VIIa štěpí stejnou vazbu Arg – Ile obsaženou ve faktoru X, jako tenasový komplex u vnitřní dráhy. Syntéza faktoru VII, cirkulujícího glykoproteinu s obsahem Gla, probíhá v játrech. Koagulačně aktivní komplex TF – VIIa za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  způsobuje aktivaci faktoru X na Xa. [20] [17]

Setkání vnitřní a vnější dráhy neprobíhá pouze na úrovni faktoru X, ale dochází také k interakci, kdy komplex TF – VIIa aktivuje faktor IX ve vnitřním systému. Vytvoření komplexu TF – VIIa může mít klíčový význam pro srážení krve in vivo. Velikost významu faktoru XII, prekalkreinu a HMWK není jasná, protože pacienti s vrozeným deficitem těchto komponent nemají problémy s krvácivostí. Podobně nemusejí mít problémy ani pacienti s deficitem faktoru XI. [20] [17]

## 2.6. Koncová společná dráha hemokoagulace

V koncové dráze figuruje faktor Xa vytvořený vnitřním či vnějším systémem jako aktivátor protrombinu (faktoru II) na trombin (faktor IIa) a trombin poté mění rozpustný fibrinogen na nerozpustný fibrin. [20] [17]

Aktivace protrombinu probíhá také na povrchu aktivovaných destiček a vyžaduje vznik tzv. protrombinásového komplexu, který obsahuje destičkové aniontové fosfolipidy,  $\text{Ca}^{2+}$ , faktor Va, faktor Xa a protrombin. Faktor Va se váže svým lehkým i těžkým řetězcem k faktoru Xa a k protrombinu se váže těžkým řetězcem. Protrombinása (protrombinásový komplex) se váže na receptorová místa membrány krevní destičky, kterých může být 1000 až 3000. Protrombin je jednořetězcový glykoprotein vytvářený v játrech. Faktor V je glykoprotein homologický k faktoru VIII a ceruloplasminu. Jeho syntéza probíhá v játrech, slezině a ledvinách. Aktivace faktoru V na Va probíhá díky zbytkům trombinu. Po vytvoření protrombinásového komplexu je trombinem nepřímo inaktivován. Protrombinása štěpí protrombin na trombin ve dvou místech, tam, kde je navázána aminokyselina arg, zároveň se uvolňují fragmenty 1 a 2 (F1, F2). Faktor Xa dokáže sám o sobě vytvářet trombin, ale protrombinása je v tomto procesu až 200000 krát rychlejší. Vzniká aktivní dvouřetězcová trombinová molekula. [20] [17]

Okolní endoteliální buňky reagují na přítomnost trombinu vystavením proteinu trombomodulinu na svém povrchu. Trombomodulin je receptorem trombinu. Po jeho navázání začíná produkce plasmatického proteinu C (inhibitoru koagulace). Aktivovaný protein C (APC) vytváří komplex s proteinem S (kofaktorem proteinu C), který je také obsažen v plazmě. Tento proteinový komplex degraduje faktory Va a VIIIa, což způsobí rozpad membránových komplexů produkujících trombin. Zjednodušeně řečeno, trombin redukuje sám sebe. Mezi další inhibitory hemokoagulace patří například proteinový inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), dle názvu reguluje činnost tkáňového faktoru. Inhibuje také faktor Xa. Dále se na inhibici podílí antitrombin III (AT III) a heparinový kofaktor II (HC II), který se na rozdíl od AT III úzce specifikuje proti trombinu. [20] [17]

Působením trombinu se z fibrinogenu odštěpí dva fibrinopeptidy A (FPA) a dva fibrinopeptidy B (FPB). Jedná se o malé peptidy (FPA 16 aminokyselin, FPB 14 aminokyselin), které jsou v molekule fibrinogenu zastoupeny přibližně 3 hmotnostními procenty. Peptid FPA se uvolňuje jako první, po něm přichází na řadu FPB. Vzniká fibrinový monomer. Reakce pokračuje polymerací fibrinových monomerů. Tvoří se dvouvláknové protofibrily, ve kterých jsou jednotlivé vázané monomery navzájem posunuty o polovinu délky molekuly fibrinogenu. Zatím se jedná o rozpustná vlákna fibrinu dlouhá přibližně 40 až 200 nm. Trombin aktivuje faktor XIII na XIIIa, což je vysoce specifická transglutaminása. Faktor XIIIa v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů vytváří dvojnou, příčnou kovalentní vazbu mezi sousedními molekulami vzniklých fibrinů. Dochází ke zvětšení a zpevnění koagula a vzniká polymerní stabilní fibrin. Tato struktura není rozpustná v močovině a je odolnější proti účinku proteináz. Struktura je určovaná počáteční rychlostí odštěpování FPA a FPB a koncentrací fibrinogenu. Vytvořením nerozpustného polymeru je zajištěno zachytávání krevních destiček, červených krvinek a dalších komponent za vzniku bílého nebo červeného trombu. [20] [17]



Bílý trombus je tvořen destičkami a fibrinem. Tvoří se většinou v oblastech s rychlým tokem krve (artérie). Červený trombus obsahuje převážně červené krvinky a fibrin. Morfologicky připomíná více sraženinu vzniklou ve zkumavce. In vivo se tvoří převážně v místech se zpomaleným tokem krve. [20] [17]

## 2.7. Fibrinolýza

Fibrinové koagulum značně omezuje tok krve, což, při nekontrolovatelné aktivaci, může vést až k uzavření cévy. Účelem fibrinolýzy je opětovné zprůchodnění cév. Na přítomnost fibrinových vláken reaguje organismus aktivováním fibrinolytického systému. Jeho základní složkou je plazminogen, proenzym serinové proteázy plazminu. Podobně jako u hemokoagulace může být fibrinolýza aktivována vnější cestou a vnitřní cestou. Obě cesty vedou k aktivaci plazminogenu na plazmin. [20] [17]

Plazminogen je jednořetězcový glykoprotein syntetizovaný játry ve formách Glu – a Lys – plazminogen. Lys plazminogen tvoří menší molekulu s kratším biologickým poločasem než Glu – plazminogen. Plazminogen se váže na povrchy různých buněk a na receptory membrán krevních destiček. Lidský plazminogen je složen z 5 „Kringles“ modulů společných disulfidickými vazbami, dále z proteázové domény a peptidu s koncovou aminoskupinou. „Kringles“ obsahují afinitní místa pro vazbu lysinu. Tato místa zprostředkovávají interakci s fibrinem a  $\alpha_2$ -antiplazminem. Také jsou tato místa uzpůsobena pro vazbu aktivátorů plazminogenu. [20] [5]

Vnitřní systém je součástí krevní plazmy a je tvořen hlavně faktorem XII, prekalkikreinem a vysokomolekulárním kininogenem (HMWK). Aktivace nastává po kontaktu s faktorem XII a poškozenou cévní stěnou. Dalšími aktivátory vnitřního systému jsou trombin a trypsin. [20] [17]

Vnější aktivátory jsou také uvnitř lidského organismu, ale mimo krevní řečiště. Za fyziologického stavu se na aktivaci podílí faktor XIIa z 1/4, aktivátor plazminogenu urokinázového typu (u-PA) z 1/4, a tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) z 1/2. Pevážně v ledvinách se nachází prourokináza, která vlivem kontaktního systému (kalikrein, HMWK, faktor XIIa) a plazminu přechází z jednořetězcové formace na aktivní dvouřetězcovou urokinázu (u-PA). Urokináza je vázaná na fibrinové koagulum, protože proenzym u-PA aktivuje plazminogen vázaný na fibrin a aktivní plazmin mění jednořetězcovou molekulu na dvouřetězcovou. Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) se uvolňuje jako jednořetězcová molekula ze zdravých endotelových buněk stimulovaných aktivovaným proteinem C (APC), nebo trombinem, histaminem, bradykinem. Výskyt t-PA je hlavně v orgánech s bohatým krevním zastoupením, jako děloha, plíce, ledviny. Jedná se o slabý aktivátor plazminu, ale v přítomnosti fibrinu jeho aktivita stoupá. Podobně jako u-PA je t-PA lokalizováno na fibrinové koagulum a vyskytuje se jako jednořetězcová

neaktivní molekula. Po působení plazminu, tkáňového kalikreinu, nebo faktoru Xa se proteolyticky štěpí za vzniku dvouřetězcové aktivní formy. [20] [17]

Fibrinolytický systém se začíná aktivovat hned po vytvoření prvních struktur fibrinu. Vzniká ternární komplex tvořený t-PA a plazminogenem, který je vázán na lysinové struktury fibrinu. Plazminogen je v tomto komplexu aktivován na plazmin, fibrin má zde funkci kofaktoru. Plazmin štěpí fibrinové koagulum na jednotlivé fragmenty, dochází zde k zesílení zpětnou vazbou. Koncové karboxylové lysinové řetězce degradovaného fibrinu na sebe navazují další plazminogen a t-PA. Tvoří se plazmin a zrychluje se fibrinolýza. Na místo t-PA v ternárním komplexu může vystupovat i jiný aktivátor. Celý fibrinolytický děj trvá 48 až 72 hodin. Poruchy fibrinolýzy jsou hyperfibrinolýza (vznikají těžké krvácivé stavy) a hypofibrinolýza (spojována s trombotickými onemocněními).[20] [34]

### 3. Testy používané v hemostáze

Testy používané v hemostáze lze rozdělit do 3 skupin.

- Globální testy popisující celý srážecí proces
- Skupinové
- Specifické

#### 3.1. Globální testy

V roce 1913 zavedli Lee a White metodu nazvanou doba srážlivosti nativní krve. Jedná se o určení času srážení nativní žilní krve. Měří se čas od odběru (2. fáze hemostázy) až po srážení. Ve skleněné zkumavce o průměru 1 cm odpovídá fyziologické době čas 4 až 9 minut při 37 °C. Dvojnásobně až trojnásobně delší časy jsou naměřeny v plastových nebo silikonových zkumavkách. Dnes se tato metoda nepoužívá a nahrazuje se skupinovými testy. [20] [9]

Krvácivost, doba krvácení, je rychlá orientační metoda podávající první informaci o funkci krevních destiček. Měří se čas, při kterém dojde k zástavě krvácení při standardním vpichu (Duke, 1910) nebo řezu (Soulier, 1952, nebo Ivy, 1935). Pro objektivnost se vyšetření provádí na dvou nezávislých místech. Podle vybraného postupu jsou fyziologické hodnoty uvedené v tabulce 2. [20] [9]

Tabulka 2: Fyziologické časy krvácivosti

Postup	Duke	Soulier	Ivy
Čas [min]	2 – 5	2- 4,5	3 - 8

Test konzumpce (spotřeby) protrombinu stanovuje množství protrombinu v séru za určitou dobu po vysrážení za standardních podmínek. U normální krve se většina protrombinu mění na trombin, zbytek (asi 20 až 30 %) zůstává v séru. Při poruchách zůstává značná část protrombinu nespotebována. Fyziologické hodnoty jsou nad 30 – 45 sekund. Test se již skoro nepoužívá. [20] [9]

Retrakce krevního koagula měří smrštění krevní zátky. Měří se objem přebytečné tekutiny vytlačené z krevního koagula pomocí kontraktivity krevních destiček. Fyziologická hodnota odpovídá 30 až 50 % objemu odebrané krve. Test probíhá buď v krvi, nebo v plazmě bohaté na krevní destičky (PRP – Platelet Rich Plasma). [20] [9]

V roce 1948 vyvinul Hartert metodu trombelastogramu (TEG). Jedná se o speciální přístroj (tromboelastograf), ve kterém dochází ke srážení krve nebo plazmy vyvolané přidáním  $Ca^{2+}$  iontů. Mechanický detekční systém měří změnu elasticity během tvorby sraženiny formované mezi pístem a stěnou kyvety. Na pohyblivém pístu je uloženo

zrcadélko. Přístroj má výkyvné zrcadlo odrážející světelný paprsek ze světelného zdroje. Pokud se neprojevuje viskozita, kreslí přístroj jednolitou čáru, protože paprsky z obou zrcadel se setkávají v jednom místě. Zvýšení viskozity má za následek rozdělení paprsků a kresbu křivky. [20] [9] [13]

Po odběru nativní krve dochází nejdříve k jejímu srážení, později k retrakci koagula a nakonec se začne projevovat fibrinolitičká aktivita rozkládající krevní zátku. Fyziologicky začíná fibrinolýza probíhat více než po 4 hodinách. Diagnostický význam má značné zkrácení času nástupu fibrinolýzy, hlavně pod 30 minut. [20] [9]

### 3.2. Skupinové testy

V roce 1935 zavedl Armand Quick protrombinový test (PT, tromboplastinový test, Quickův test). PT test sleduje vnější cestu aktivace protrombinu na trombin. Zachycuje faktory II, V, VII, X a fibrinogen. Jako reagentie se používají rekombinantní PT reagentie, tkáňové tromboplastiny, nebo kombinované tromboplastiny. Rekombinantní PT reagentie obsahují rekombinantní tkáňový faktor, fosfolipidy, pufr, stabilizátory a nutné  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Tkáňové tromboplastiny obsahují extrakt z tkání bohatých na tkáňový faktor (králičí mozek, lidská placenta) a ionty  $\text{Ca}^{2+}$ . Kombinované tromboplastiny tkáňový tromboplastin (například z hovězího mozku, obvykle absorbovanou hovězí plazmu a  $\text{Ca}^{2+}$ ). Mnoho reagentií ke stanovení PT obsahuje činidlo neutralizující heparin (polybren), PT výsledek potom není závislý na koncentraci heparinu. Hodnoty kontrolní plazmy pro PT test jsou závislé na použité reagentii (řádově v jednotkách sekund). Fyziologické hodnoty Quickova testu odpovídají hodnotám kontrolní plazmy  $\pm 20\%$ . Abnormální výsledek může být způsoben nedostatečností faktorů II, V, VII, X a fibrinogenu. Nebo při antikoagulační léčbě, při nedostatku vitamínu K, při jaterních nemocech (pokles faktorů protrombinového komplexu), nebo při přítomnosti autoprotilátek proti faktorům a lupus antikoagulans. [20] [1] [9] [21]

Komerčně dodávané tromboplastiny (PT reagentie) mají odlišnou citlivost. Aby bylo možné výsledky PT testu standardizovat, počítá se protrombinový poměr (PR – protrombin ratio), což je poměr reakční doby vzorku ku reakční době normální plazmy.

$$\text{PR} = \frac{\text{Reakční doba vzorku (s)}}{\text{Reakční doba normální plazmy (s)}} \quad (1)$$

Pokud je ke stanovení PR použita normální plazma, která nemá sama o sobě PR rovnu 1,0, je nutné to zahrnout do výpočtu.

$$PR = \frac{\text{Reakční doba vzorku (s)} * PR \text{ normální plazmy}}{\text{Reakční doba normální plazmy (s)}} \quad (2)$$

Pro mezinárodně srovnatelné hodnoty je nutné přepočítat PR na INR (International normalized ratio – mezinárodní normalizovaný poměr). Pro tento výpočet je nutné znát takzvaný ISI index (International sensitivity index), který je uváděn u každé šarže reagensů pro PT test. INR se pak vypočítá jako PR umocněné na ISI. [29]

$$INR = PR^{ISI} \quad (3)$$

Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT) zavedli do klinické praxe Proctor a Rapaport v roce 1961. Naproti PT testu se zde jedná o sledování vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin. APTT zachycuje faktory II, V, VIII, IX, X, XI, XII, fibrinogen, prekalikrein a HMWK. Pro test se používá plazma spolu s fosfolipidem a aktivátorem. Jako startovací reagentie figuruje chlorid vápenatý. Fyziologické hodnoty odpovídají hodnotám kontrolní plazmy  $\pm 10\%$ . Hodnota kontrolní plazmy je podobně jako u PT testu závislá na použité reagentii a její normály (obecně delší časy než u PT). Jako reagentie se používají kontaktní aktivátory, fosfolipidy a  $Ca^{2+}$ . Kontaktní aktivátory zahrnují negativně nabitě povrchy. Patří sem kaolin, křemičitany, elagová kyselina, polyfenoly, nebo sulfatidy kombinované s kaolinem. Jako fosfolipidy mohou vystupovat syntetické fosfolipidy, fosfolipidy ze zvířecích tkání nebo z rostlin. Většinou se používají směsi různých fosfolipidů, hledá se optimální složení a hlavně zastoupení fosfatidylserinu. Typ a koncentrace fosfolipidů je pro test důležitější než negativně nabitě povrchy. Molarita chloridu vápenatého má také vliv na výsledek testu. Komerční reagentie mohou mít zvýšenou citlivost na faktory, lupus antikoagulans, nebo heparin. Abnormální hodnoty APTT mohou poukazovat na trombotické stavy při zkrácených časech. Prodloužené APTT naznačuje deficit faktoru VIII (nebo von Willebrandova faktoru), nedostatečnost faktorů IX a XI, případně dalších mimo faktory VII a XIII. Dále může prodloužený test ukazovat na terapii nefrakcionovaným heparinem, hirudinem a aprotininem. Také na dysfibrinogenemii nebo afibrinogenemii. Při zvýšené hodnotě APTT se provede směsný test s normální plazmou v poměru 1:1. Dojde-li k normalizaci, jedná se nejspíše o deficit některého z faktorů. Pokud je APTT stále zvýšené, může se jednat o přítomnost inhibitorů proti některému z faktorů vnitřní cesty aktivace trombinu, nebo o přítomnost protilátek typu lupus antikoagulans. [20] [1] [9] [22]

Trombinový test (TT) použil v roce 1957 Jim (v angličtině thrombin clotting time – TCT). TT je jednoduchý fibrinový test ke stanovení polymerace fibrinu. Detekuje koncentraci fibrinogenu v plazmě a poruchu jeho molekuly, nebo přítomnost antitrombinu (inhibitoru trombinu). Do vyšetřované plazmy se jako reagentie přidává roztok trombinu.

Za fyziologické jsou brány výsledky kontrolní plazmy s tolerancí  $\pm 20\%$ . Kontrola nabývá hodnot 14 – 16 sekund, podle koncentrace trombinu v reagenzii. Prodloužené časy trombinového testu mohou být způsobeny heparinem, nebo při vysoké koncentraci degradačních produktů fibrinogenu a fibrinu, paraproteiny, nebo v přítomnosti přímých inhibitorů trombinu. [20] [1] [9]

Reptilázový test (Reptilase time, Batroxobin time) byl zaveden do klinické praxe Funkem v roce 1971. Z hadího jedu se získává batroxobin, neboli reptiláza, je trombinu podobná proteáza schopná přeměny fibrinogenu na fibrin. Odštěpuje z molekuly fibrinogenu jen fibrinopeptid a nemá další aktivitu k jiným trombinovým substrátům, jako jsou faktory V a VIII. Není ovlivněna antitrombinem, nefrakcionovaným heparinem, ani LMWH (low molecular weight heparin). Používá se plazma spolu s roztokem jedu hada *Bothrops atrox*. Podobně jako v jiných testech se za fyziologický počítá výsledek s odchylkou  $\pm 20\%$  od kontrolní plazmy (16 – 20 sekund). Zvýšené hodnoty se mohou vyskytovat u afibrinogémie a u těžkých nedostatečností fibrinogenu. [20] [1] [9] [32]

Metoda aktivovaného koagulačního času (activated clotting time – ACT) byla zavedena Hattersleyem roku 1966. Principiálně se metoda podobá testu APTT, také se využívá kontaktních látek jako silica nebo kaolín, ale bez přidání fosfolipidů a iontů  $\text{Ca}^{2+}$ . Kontaktní aktivátory jsou umístěny ve speciálních kazetách, které se používají k měření hodnot testu ve speciálních přístrojích. Tvorba fibrinu je měřena elektromechanicky, nebo opticky. ACT je výrazně ovlivňováno nefrakcionovaným heparinem. Dále se projevuje nevyváženost koagulačních faktorů a inhibitorů, lýza destiček, zvýšená hemodiluce a další. [20] [1] [9] [12]

### 3.3. Specifické testy

U specifických testů se stanovuje aktivita nebo přítomnost určitého proteinu (faktoru nebo inhibitoru). [20]

Mezi specifické testy primární hemostázy patří například Rumpel – Leedův test rezistence kapilár. Subjektivně se hodnotí počet petechií na předloktí po stlačení manžetou. Dále specifický test trombocytů. Můžeme hodnotit počet a morfologii trombocytů, a nebo jejich funkce, tedy adhezivitu, agregaci, retrakci. Do primární hemostázy lze zařadit také diagnózu von Willebrandovy choroby, což je nejčastější krvácivé onemocnění. Vyšetřuje se doba krvácení, agregace destiček, imunologicky hladina a struktura vWF, funkční aktivita vWF, APTT a faktor VIII. Choroba se může projevit snížením hladiny nebo aktivity vWF. [20] [1] [9] [4]

Stanovení fibrinogenu patří mezi testy sekundární hemostázy. Fibrinogen se stanovuje vícero způsoby. U Metody podle Clause, z roku 1957, se jedná o koagulaci ředěné plazmy po přidání trombinu. Tento koagulační čas je nepřímo úměrný koncentraci

fibrinogenu v plazmě. Kinetické měření fibrinogenu je založeno na nefelometrické nebo turbidimetrické detekci. Celkové zvýšení turbidity systému je přímo úměrné koncentraci fibrinogenu. Kinetické měření dobře koreluje s Claussovou metodou. [20] [1] [9]

Do sekundární fáze hemostázy patří testy stanovení jednotlivých koagulačních faktorů. Buď lze postupovat imunologicky, navázáním na antigen, nebo pomocí vyšetření založených na principu koagulačního testu (PT pro faktory vnější cesty a APTT pro faktory vnitřní cesty). Vyšetřovaná plazma se smíchá s deficitní plazmou, která obsahuje všechny koagulační faktory v normálním množství, kromě jediného (vyšetřovaného). Pokud tento faktor chybí i ve vyšetřované plazmě, dojde k narušení koagulace. [20] [1] [9]

Koagulační testy jsou při deficitu faktoru XIII normální, proto se mezi specifické testy řadí stanovení faktoru XIII. Lze stanovit imunologicky, nebo sledováním rozpustnosti fibrinu v močovině, případně měřením reakce aktivovaného faktoru XIII s umělými substráty.

Pro odlišení nedostatku faktorů od přítomnosti inhibitorů se využívá trojího ředění vyšetřované plazmy s normální plazmou. Vzorky se inkubují při 37 °C. Vzorky s faktorovým deficitem se postupně, se vzrůstajícím podílem normální plazmy, blíží normálním hodnotám. V přítomnosti inhibitorů nebude docházet k výrazné změně výsledků. K vyšetření přirozených inhibitorů hemokoagulace patří především vyšetření antitrombinu III, proteinu C a S, rezistence k aktivovanému proteinu C, trombomodulinu, kofaktoru heparinu II. [20] [1] [9]

Za 4. neoficiální skupinu testů hemostázy lze považovat vyšetření fibrinolytického systému. Mezi tyto testy řadíme stanovení plazminogenu a aktivátorů plazminogenu, stanovení fibrinových monomerů, fibrinogen/fibrin degradačních produktů (FDP), stanovení D-dimerů a další. [20] [1] [9]

## 4. Koagulometry

Detektory koagulace lze obecně rozdělit na manuální a automatické. Manuální slouží pouze pro koagulační testy jako PT, APTT, fibrinogen a další. Automatické přístroje dokáží stanovovat testy koagulační, chromogenní a imunologické. [33]

### 4.1. Detekce koagula

Elektromechanické stanovení se rozděluje do dvou hlavních skupin, háčkové a kuličkové stanovení. U háčkového stanovení jsou do měřicí kyvety zasunuty dvě elektrody. Jedna elektroda je pohyblivá, a druhá je pevná. Na obě elektrody se přivádí elektrický proud. Při vytvoření fibrinového vlákna dojde mezi elektrodami k elektrickému impulzu a zastavuje se čas měření. U kuličkového stanovení se kovová kulička pohybuje v kyvetě se vzorkem a reagensí (krouživý nebo kývavý pohyb). Při srážení směs houstne, mění se viskozita vzorku a dochází ke zpomalení, vychýlení až zastavení pohybu kuličky. Mění se magnetické pole, tato změna se převádí na elektrický impuls, který zastavuje měření času. Pohyb kuličky je možno detekovat i opticky. Výhodou těchto metod je menší ovlivnění u vzorků hemolytických, ikterických a lipemických. Nevýhodou může být nižší citlivost při stanovení vzorků s nízkým fibrinogenem, kdy může dojít k obalení kuličky koagulem a nedochází ke zpomalení jejího pohybu. Další nevýhodou je nemožnost sledování průběhu reakční křivky. [33]

Optické stanovení koagula může být ovlivněno ikterickými, hemolytickými a lipemickými vzorky. Na kyvetu dopadá monochromatické záření a jeho detekce je možná buď v přímém směru, nebo se měří intenzita rozptýleného světla. Vznikem koagula dochází v kyvetě k nárůstu zákalu (turbidity) vzorku. U přístrojů pracujících v přímém směru průchodu paprsků bývá napevno dána hranice nárůstu turbidity, jejíž překročení detekuje koagulaci. U měření rozptylu světla se na časové ose vynáší křivka intenzity dopadajícího světla. Rozdíl intenzity na začátku a na konci reakce se rozpůlí a stanovuje se jako bod koagulace. Optické metody jsou citlivější na vzorky s nižším obsahem fibrinogenu. Je zde také možnost prohlížet si průběh reakce na reakční křivce. [33]

### 4.2. Detekce chromogenních a imunologických testů

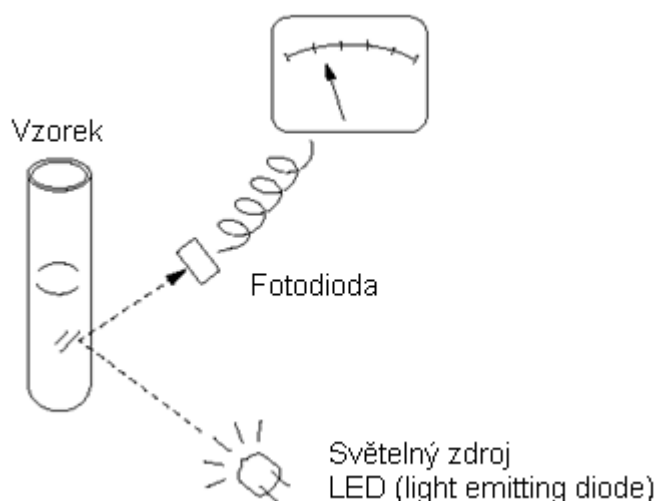
Mechanické přístroje mají pro tyto testy optickou jednotku. Optické přístroje měří buď ve stejné jednotce jako koagulaci, nebo mají vlastní měřicí kanál. Vždy je měřen přímý průchod světla kyvetou s reakční směsí. Vyhodnocuje se změna optické hustoty za časový interval, zbarvení u chromogenních testů a zákal u imunologických testů.



Chromogenní testy se měří většinou při vlnové délce 405 nm. Imunologické testy se měří v rozsahu vlnových délek od 405 po 800 nm (575 nm, 770 nm, a podobně). [33]

### 4.3. Koagulometry Sysmex

Tato práce dále využívá data z přístroje Sysmex CA – 1500, proto si popíšeme přístroje japonské značky Sysmex spolupracující s reagensy společnosti Siemens. Níže budou uvedeny principy měření, průběhy analýzy a popis pro metody koagulační, chromogenní a imunologické.[33]



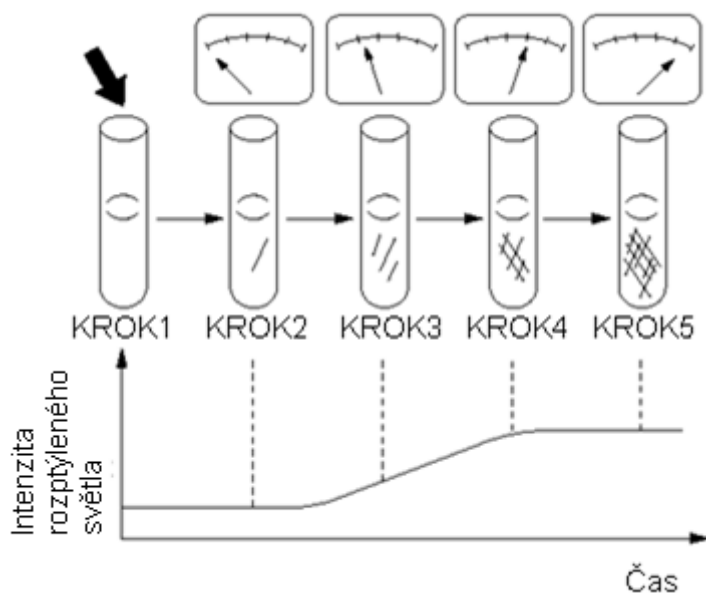
Obrázek 3: Systém optické detekce [33]

Pro koagulometrickou metodu pracuje analyzátor CA – 1500 s definovaným množstvím krevní plazmy, která je po určitou dobu zahřívána a poté je k ní přidána reagencie. Metoda využívá optického principu měření rozptýleného světla. Při tom se zjišťuje změna zákalu reakční směsi. S rostoucím zákalem roste poměr přeměněného fibrinu z fibrinogenu. Na vzorek dopadá světelné záření o vlnové délce 660 nm. Rozptýlené světlo odražené od vzorku dopadá na fotodiodu, ze které je získáván elektrický signál. Sled těchto signálů během reakce je ukládán a následně zpracován počítačem za účelem zjistit čas koagulace. [33]

Nakonec vydává analyzátor průběh reakce ve formě koagulační křivky. Průběh lze popsat v 5 časově následných krocích.

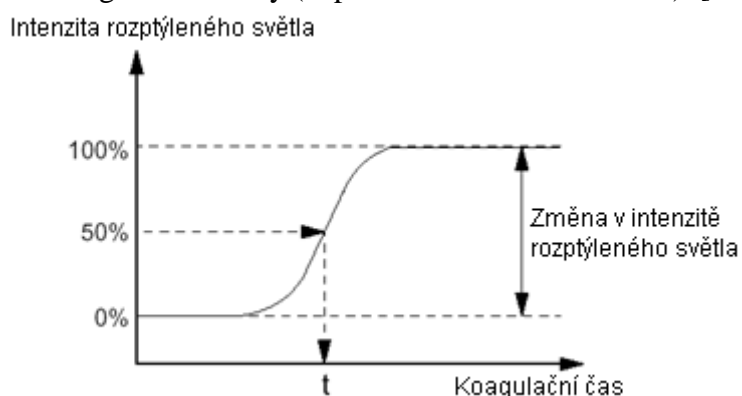
1. Zahřátá reagencie je přidána do rovněž zahřáté plazmy
2. Rozptyl světla je slabý a ihned po přidání reagencie se nezaznamenává žádná změna.

3. V průběhu reakce se začínají tvořit sraženiny fibrinu, což provází zvýšení zákalu vzorku. Intenzita rozptýleného světla narůstá.
4. Reakce pokračuje stejně jako ve 3. kroku.
5. Po skončení srážení (koagulace) nárůst intenzity rozptýleného světla ustává, intenzita detekovaného světla se stabilizuje na určité úrovni.



Obrázek 4: Koagulace krve a intenzita rozptýleného světla v jednotlivých časových krocích [33]

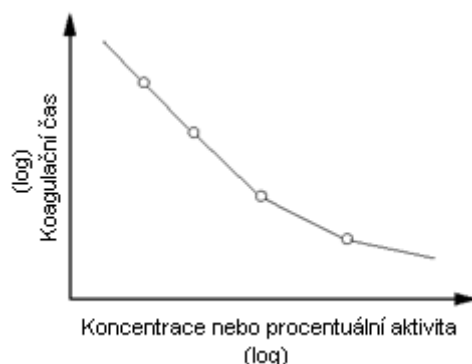
Pro detekování času koagulace je použita metoda procentuální detekce. Takto lze stanovit bod koagulace a tím i odečíst zkoumaný čas reakce. Intenzita rozptýleného světla po přidání reagentie je definována jako 0 % a intenzita po ukončení reakce (při maximálním zákalu) jako 100 %. Koagulační čas poté odpovídá procenticky definované intenzitě detekovaného světla z koagulační křivky (například 50 % na obrázku 5). [33]



Obrázek 5: Určení času koagulace při 50 % intenzitě rozptýleného světla [33]

Tato metoda je vhodná i pro vzorky, u kterých dochází jen k malé změně v intenzitě rozptýleného světla. Příkladem mohou být vzorky s nízkým obsahem fibrinogenu.

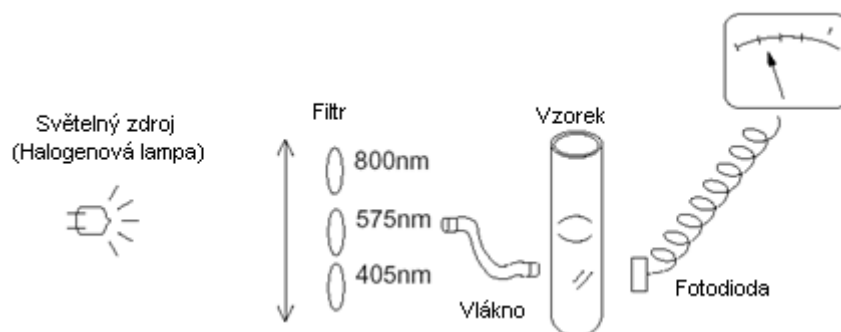
Případně lze měřit i vzorky s prodlouženým koagulačním časem (pomalá změna v intenzitě detekovaného světla). U parametrů měřených koagulometrickou metodou existuje lineární závislost mezi koagulačním časem a koncentrací (nebo aktivitou v procentech), pokud jsou data v grafu jako log-log křivka (obrázek 6). [33]



Obrázek 6: Standardní kalibrační křivka pro koagulometrickou metodu pro Sysmex CA – 1500 [33]

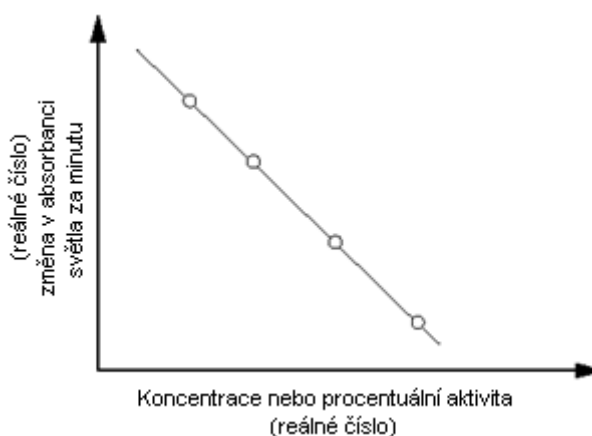
Body dvou po sobě jdoucích koncentrací jsou spojeny přímkou. Oba konce standardní (kalibrační) křivky jsou vypočítány jako lineární aproximace dvou následujících koncentračních bodů. Změnou nastavení lze zvolit i jiné kalibrační křivky. [33]

U chromogenní metody, podobně jako u koagulační, je k zahřáté plazmě přidána reagensie a navíc substrát. Při reakci vzorku krevní plazmy a substrátu dochází ke vzniku molekul pohlcujících světlo, díky tomu lze použít fotometrický princip měření. Koncentrace těchto molekul je měřena jako změna procházejícího světla. Světlo světelného zdroje, halogenové lampy, je filtrováno jedním ze 3 filtrů na paprsky o vlnových délkách 405 nm, 575 nm nebo 800 nm. Analyzátozem podporované aplikace jsou pro vlnovou délku 405 nm a 800 nm, filtr 575 nanometrů lze použít pro vlastní aplikaci. Filtrovaný světelný paprsek prochází vzorkem a dopadá na fotodiodu. Změna intenzity se přepočítá jako absorbance za minutu ( $\Delta OD/min$ ). Tento výpočet je prováděn metodou lineární regrese dat mezi počátečním a koncovým bodem. [33]



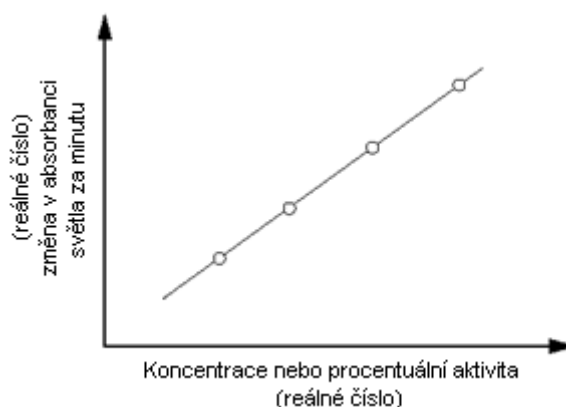
Obrázek 7: Systém pro měření absorbance [33]

Kalibrační křivka u chromogenní metody má lineární závislost mezi změnou absorbance ( $\Delta OD/min$ ) a koncentrací (aktivitou v procentech). Stejně jako u koagulačních metod lze použít i jiné nastavení standardní kalibrační křivky. [33]



Obrázek 8: Kalibrační křivka pro chromogenní metodu [33]

Imunologická metoda je velmi podobná chromogenní metodě. Vzorek je inkubován definovanou dobu a poté se přidává stabilizátor a antisérum. Znovu je vzorek prosvěcován světelným paprskem konkrétní vlnové délky a měří se změna absorbance za časový úsek ( $\Delta OD/min$ ). Princip měření změny absorbance je stejný jako u chromogenní metody (obrázek 7), rozdíl je pouze v tom, že analyzátor podporuje aplikace se všemi třemi filtry (405, 575 a 800 nm). I zde existuje lineární závislost mezi změnou absorbance a koncentrací, pokud jsou tyto naměřené hodnoty zaneseny do křivky. Tento vztah může analyzátor využít pro sestavení standardní kalibrační křivky. [33]



Obrázek 9: Kalibrační křivka pro imunologickou metodu [33]

Při vysoké koncentraci antigenu vede další zvyšování koncentrace antigenu ke snížení absorbance, systém vydá chybové hlášení. V tomto případě je nutno vzorek naředit natolik, aby se popsáný jev již neprojevil a analýzu opakovat.[33]

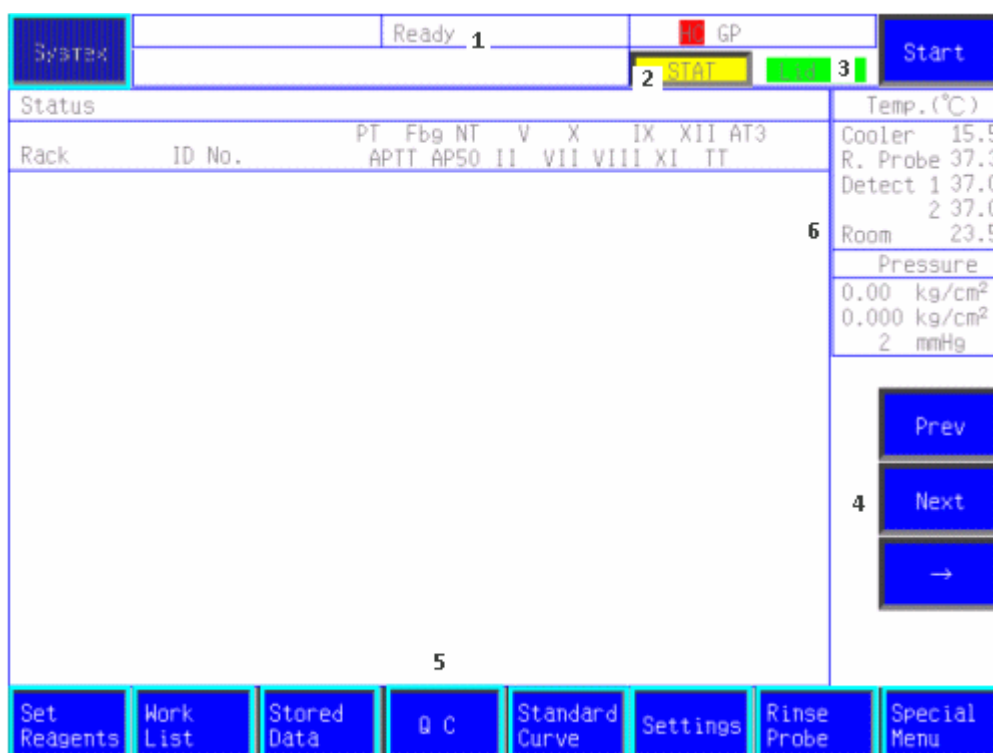
#### 4.4. Práce s přístrojem Sysmex CA-1500

Koagulometry firmy Sysmex v České republice distribuované společností Siemens jsou značeny CA (Coagulation Analyzator) a číslem podle modelové řady. Dále si popíšeme ovládání modelu CA-1500, protože právě z těchto přístrojů máme získaná data pro hledání závislosti derivovaného fibrinogenu na standardních testech APTT a PT.



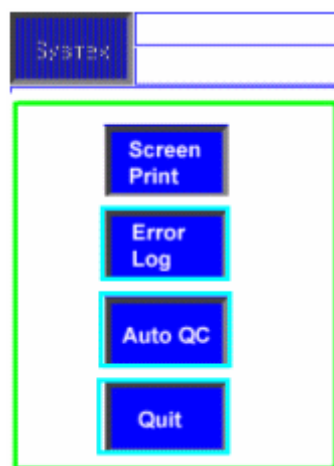
Obrázek 10: Sysmex CA 1500

Všechny modely jsou ovládány skrz dotykovou obrazovku. Obrázky zde umístěné jsou ze simulačního programu určeného pro servisní techniky. Na obrázku 11 vidíme úvodní obrazovku přístroje. V běžném provozu se nalézá pouze ten rozdíl, že v prostřední bílé ploše vidíme stav zpracování zadaných vzorků.



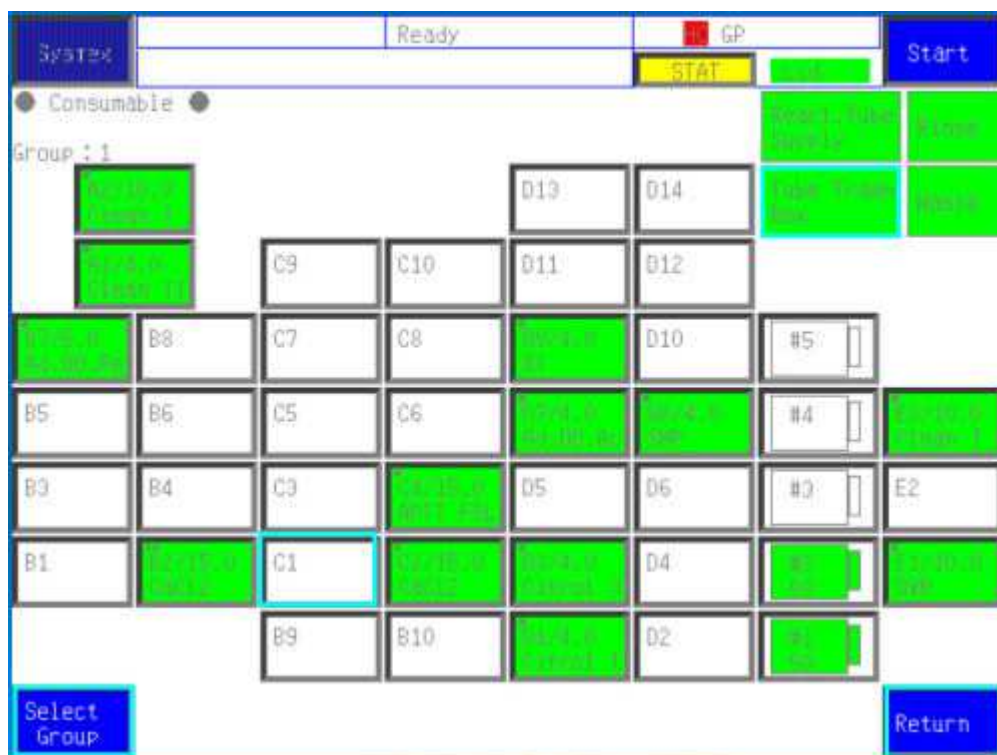
Obrázek 11: Úvodní obrazovka analyzátoru Sysmex CA 1500 [26]

Pro zjednodušení orientace jsou na obrázek 11 přidány číselné popisky. U čísla 1 je uveden stav analyzátoru, *Ready* – znamená, že je připraven. Tlačítko *STAT* (číslo 2) umožňuje změření statimu, tedy urgentního vzorku přednostně před naplánovanými testy. Indikace *Lid* (3) nám udává stav víka přístroje. Svítí-li zeleně, lze víko otevřít, svítí-li červeně, přístroj pracuje a otevřením víka jeho práci okamžitě zastavíme. Tlačítka u čísla 4 jsou pro procházení vzorků zpracovaných nebo zpracovávaných analyzátozem. Systémová tlačítka na spodní liště (5) budou popsána dále. U čísla 6 vidíme informační hodnoty teploty a tlaku systému. Jedná se o teploty chladiče, pipetovací jehly, na detektorech a v místnosti. Horní ukazatel tlaku patří elektromagnetickým ventilům sloužícím pro přívod a odvod kapalin v systému. Běžně se nastavuje na 2,4 atm, tedy 2,66 kg/cm<sup>2</sup>. Prostřední hodnota tlaku je pro čerpání destilované vody ze zásobníku. Spodní hodnota odpovídá odsávání odpadu z promývací stanice (běžně 530 torr, neboli milimetrů Hg sloupce). Tlačítkem *Start* v pravém horním rohu spouštíme měření. Stisknutím tlačítka *Sysmex* v levém horním rohu vyvoláme 4 rychlé příkazy (obrázek 12). *Screen Print* pošle na tiskárnu aktuální otevřenou obrazovku. Tlačítko *Error Log* zobrazí mechanické chyby přístroje. Stiskem *Auto QC* se provede automatická kontrola kvality měření přístroje. Tento test je dopředu přednastaven a jeho výsledky se ukládají na pevný disk. Podmínkou je mít kontrolní materiál v přístroji, což není výhodné pro všechny laboratoře především z důvodu omezené stálosti kontrolního materiálu. Tlačítkem *Quit* opustíme nabídku tlačítka *Sysmex*.



Obrázek 12: Nabídka tlačítka Sysmex [26]

Systemové tlačítko *Set Reagents* zobrazí rozmístění reagentů v přístroji (obrázek 13. Zjednodušeně lze říct, že se jedná o modelovou mapu přístroje.



Obrázek 13: Set Reagents [26]

Každé políčko má označenu svou pozici, za lomítkem je zbytkový objem a na druhém řádku se nachází název reagentie. Kliknutím na danou pozici můžeme nastavit požadovanou reagentii. Na 5 pozicích označených # se nacházejí tzv. sample plates. Jedná se o kazety s 50 pomocnými zkumavkami, které jsou využívány u některých testů. Indikátory v pravém horním rohu indikují zásobník kyvet, zásobník odpadních kyvet, stav vody určené k proplachování systému a stav kapalného odpadu. V levém dolním rohu je

možnost zvolit si skupinu tlačítkem *Select Goup*. V analyzátoru je možné přednastavit reagenzie pro celé skupiny testů. Tlačítkem *Return* se vracíme na úvodní obrazovku.

Stisknutím tlačítka *Work List* na úvodní obrazovce se dostáváme do nabídky zadávání a načítání vzorků. V horní části obrazovky můžeme zvolit požadované testy.



Obrázek 14: Nabídka tlačítka *Work List* [26]

V pravé části obrazovky jsou tlačítka pro pohyb mezi jednotlivými záznamy. V dolní části obrazovky jsou dva řádky tlačítek. Horní řádek udává pozice, z kterých budou přicházet zkoumané vzorky. *Rack* je klasický stojan se zkumavkami. *Stat Holder* je statimový držák pro přednostní vzorky. *Reagent Holder* je držák přednostně určený pro vložení kalibračních nebo kontrolních vzorků. Tlačítka *Micro* a *Reflex* slouží k nastavení módu přístroje. V dolním řádku zadáváme čísla vstupního stojanu nebo vzorku. U tlačítka *ID No. Entry* můžeme manuálně zadat kontrolu kvality vložení *QCXX* (*XX* – odpovídá zvolenému číslu), (obrázek 15). Dále je možné nastavit opakování tesu. Tlačítkem *Sample Specific* nastavíme individuální zastavení postupu měření. Tlačítko *Standard Curve* spouští kalibraci





Obrázek 15: ID No. Entry [26]

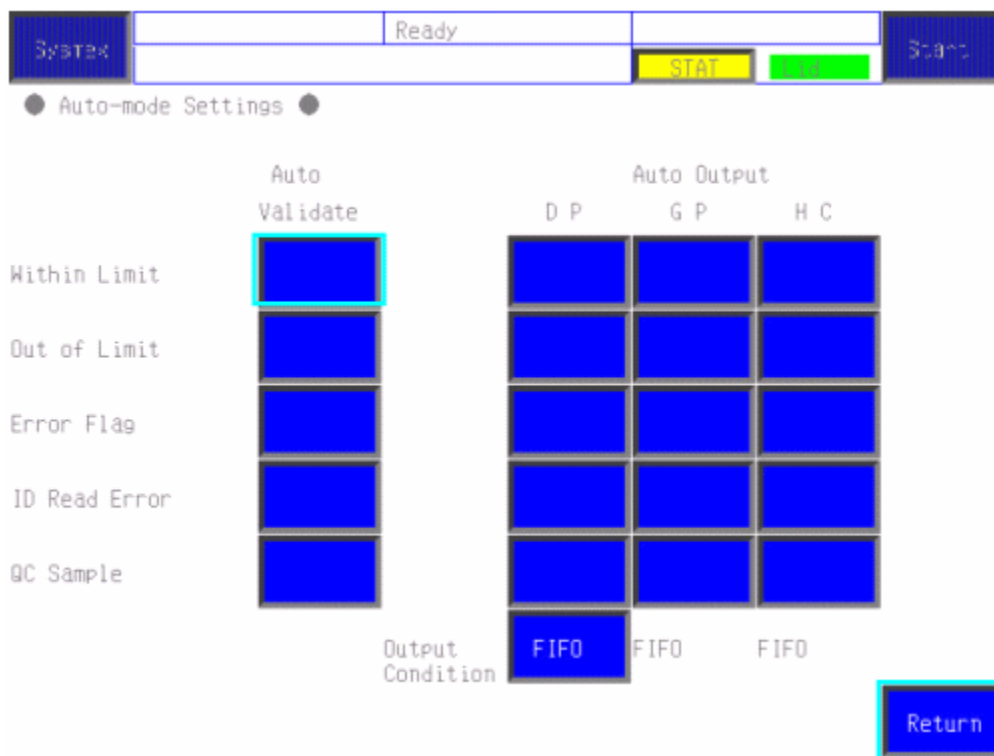
Pro zobrazení uložených výsledků slouží na úvodní obrazovce tlačítko *Stored Data* (obrázek 16). Opět jsou zde po pravé straně navigační tlačítka navíc s tlačítkem *Mark*, sloužícím k označení pro další práci se záznamem. Tlačítkem *Graph* si zobrazíme grafické průběhy změřených testů. *Search* slouží pro vyhledávání záznamu podle různých kritérií. Tlačítkem *sort* můžeme data seřadit podle zvoleného klíče. *Select Display* dává možnost zobrazení pouze záznamů podle žádaných parametrů. Tlačítkem *Output* přikážeme výstup záznamů do nastaveného systému. Tlačítko *Validate* slouží k ruční validaci, potvrzení, výsledků obsluhou. Dále máme tlačítko k editaci identifikačního čísla a ke smazání vybraných záznamů. Tlačítkem *Re. Calc* zvolíme nový přepoččet výsledků (například při nové kalibraci). Poslední 3 tlačítka se zobrazí po stisknutí tlačítka *More*.

System		Ready		GP		Start	
● Stored Data ●		= All Samples =				0/ 892 ( 892)	
ID No.	PT	PT INR	APTT	APTT R.	A50	Fbg	
	s	INR	s	Ratio	s	s	
F	7	13.2	1.28	****.*	+++.--	34.3	! 23.9
	10188171+I	13.2	1.28	29.7	1.12		
R	10188171+I	13.0	1.26				
F	10188171+I	13.0	1.26	29.7	1.12		
	10188170+I	13.3	1.29	30.0	1.13		
R	10188170+I	13.2	1.28				
F	10188170+I	13.2	1.28	30.0	1.13		
	10188169+I	13.0	1.26	29.1	1.10		
R	10188169+I	13.1	1.27				
F	10188169+I	13.1	1.27	29.1	1.10		
	18*	13.3	1.29	30.1	1.14		
R	18*	13.3	1.29	30.1	1.14	34.2	
F	10188168 I	13.3	1.29	30.1	1.14	34.2	
	10188167+I	13.0	1.26	30.9	1.17		
R	10188167+I	13.0	1.26	30.4	1.15	35.3	
F	10188167+I	13.0	1.26	30.4	1.15	35.3	
	10188166+I	50.3	5.35	85.9	3.24		
R	10188166+I			80.3	3.03	****.*	
F	10188166+I	50.3	5.35	80.3	3.03	****.*	
	10188165 I			77.5	2.92		

Obrázek 16: Stored Data [26]

QC tlačítko slouží k nastavení kontroly kvality a vyhodnocování výsledků. Tato nabídka obsahuje další tlačítka pro nastavování. Pomocí tlačítka *Standard Curve* se nastavují kalibrační křivky pro jednotlivé testy. Tlačítko *Rinse Probe* slouží pro údržbové promytí dodávanými prostředky. Tlačítkem *Maintain* se uživatel dostává do nabídky sloužící k běžné údržbě zákazníkem proškoleným od dodavatele.

Stisknutí *Settings* na úvodní obrazovce umožňuje nastavení analyzátoru. Pod volbou *Auto Val/Out* lze nastavit automatické validace, schválení výsledků a zároveň automatický výstup výsledků z přístroje (obrázek 17). *Data Check* navádí k nastavení kontroly výsledků. Je zde mnoho parametrů nastavení, například možnost nastavení automatické rediluce, přředělení, opakování měření, dvojité měření a porovnání, hlídání zvoleného parametru, nebo podmíněný postup měření a další.



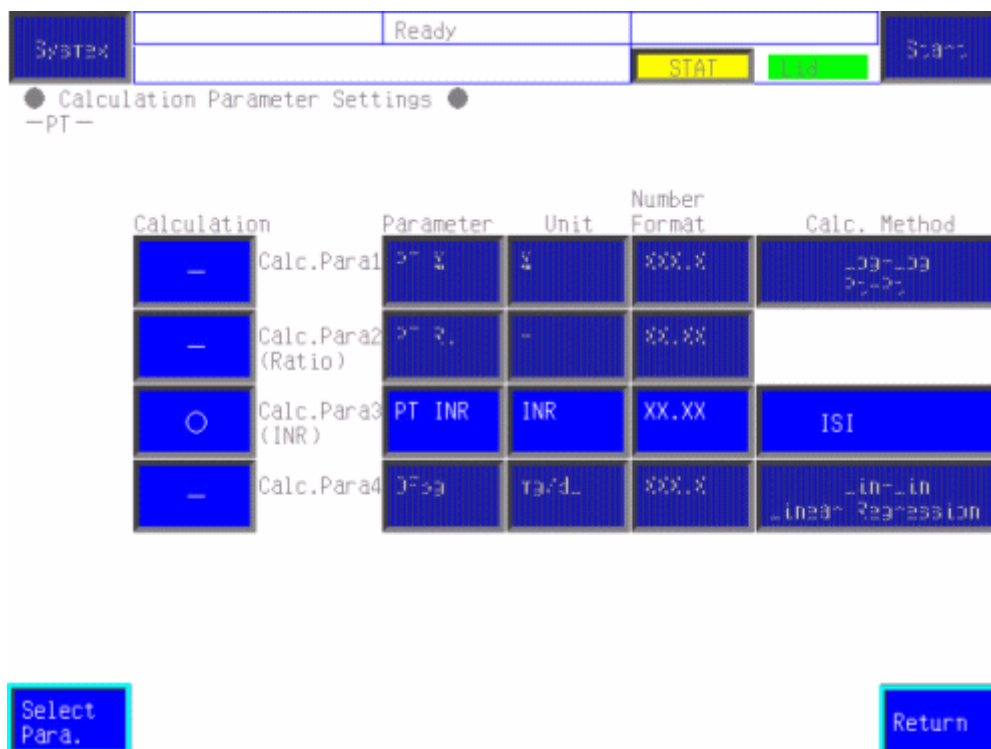
Obrázek 17: Auto Val/Out [26]

V nabídce *Settings* se dále nachází tlačítko *Analysis Settings* skrývající další nastavení analýzy. Tlačítka ve zkratce:

- *Reagent Info.* - nastavení reagensů
- *Test Protocol* - schéma pipetovacího postupu (obrázek 18)
- *Replic.* - počet opakování a možnost několikanásobného měření
- *Detector Settings* - detekce, kdy má začít měření jednotlivých testů
- *Group Setting* - nastavení skupinových schémat testů
- *Reagent Position* - nastavení reagensů
- *Parameter Setting* - nastavení parametrů pro jednotlivé testy (obrázek 19)
- *Add Calc Param.* - možnost vložení až 4 vlastních rovnic
- *Conversion* - matematické upravování výsledků
- *Alarm Setting* - nastavení výstrahy (alarmu)
- *Plate Setting* - nastavení *Micro* a *Normal* módu (možnost využívání sample plate)



Obrázek 18: Test Protocol [26]



Obrázek 19: Parameter Setting [26]

Pomocí tlačítka *I/O Settings* v nabídce nastavení lze nastavit vstupy a výstupy analyzátoru.



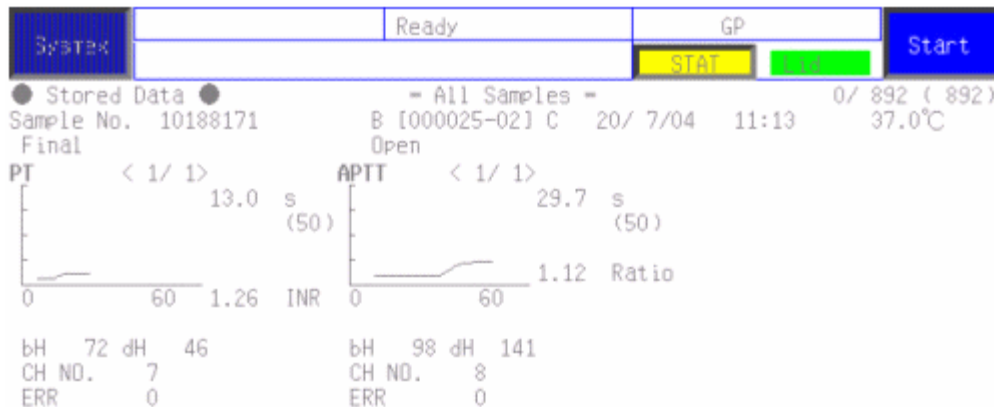
Obrázek 20: I/O Settings [26]

- *H C* - laboratorní informační systém
- *G P* - grafická tiskárna
- *D P* - tiskárna štítků
- *I D* - čtečka čárových kódů

Tlačítkem *Stored Data* v nabídce nastavení lze upravit zobrazování výsledků podle přání uživatele. *General Set Up* umožňuje změnu všeobecných nastavení, jako jsou jednotky, datum a čas, zaheslování analyzátoru a další. Možnost *Print SetValue* nám dává kopii kompletního nastavení na disketu nebo do tisku.

Obrázek 21 demonstuje možný způsob zobrazení naměřených výsledků pro testy PT a APTT. Vedle absorpčních křivek jsou zřetelné časy pro jednotlivé testy. Vypočítanou hodnotu INR, hodnoty dH a bH obou testů, měřící kanály a počet chyb během testu. Nad grafy se nachází popis vzorku (číslo, datum, čas a teplota měření).

Ovládání koagulometru se po krátké zkušenosti stává jednoduchým, přehledným a intuitivním. V dnešní době možná lehce graficky zastaralý vzhled je vyvážen spolehlivou funkčností celého systému. Při troše snahy zvládne používání analyzátoru skoro každý.



Obrázek 21: Grafické zobrazení výsledku pro PT a APTT[26]

## 4.5. Technický popis analyzátoru Sysmex CA – 1500

Analyzátor CA – 1500 je vyráběn v Japonsku již více než 10 let bez větších obměn a inovací. Na první pohled „staromódní“ provedení je vyvažováno poměrně vysokou spolehlivostí, funkčností a relativně jednoduchou technickou údržbou.

Celý systém je řízen počítačem se softwarem postaveném na operačním systému MS-DOS. Zde je velkou výhodou stabilita systému i při náhlém vypnutí. Jako vstupní a zároveň výstupní zařízení slouží barevná dotyková obrazovka v pravé horní části přístroje s možností jednoduchého nastavení kontrastu otočným ovladačem. Touch screen je na odporovém principu, tedy obrazovka reaguje na tlak v daném bodě. I na starších přístrojích je reakce bezproblémová, tedy není důvod přecházet na modernější kapacitní displeje. Dalším výstupem je standardní tiskárna připojená paralelním portem jako externí zařízení. Síťovým kabelem je možné připojení do laboratorního informačního systému, kde informace putují obousměrně. Výsledky do laboratorního informačního systému (LIS) a požadavky na testy přiřazené k čárovému kódu patientského vzorku. Další možnosti exportu výsledků je pomocí disketové mechaniky, nicméně disketová mechanika je primárně určena k zálohování nastavení přístroje (rozložení reagentů, nastavení testových protokolů, kalibrace pohybu pipetou atd.) a případně k přenesení tohoto nastavení na jiný přístroj. I tato datová mechanika je velmi spolehlivá i po letech, avšak od března 2013 začíná distribuce nových analyzátorů se čtečkou paměťových karet.



Obrázek 22: Řídící deska a zásobník kyvet



Na obrázku 22, pořízeném při instalaci, je pohled shora na odkrytovanou pravou část koagulometru. V horní části obrázku je vidět masivní řídicí deska pro práci pipetorů a pneumatického systému. Na poměry dnešních počítačů a notebooků je velmi velká, což je opět z důvodů bezproblémové stability a funkčnosti i po letech pravidelného provozu. V dolní části obrázku je zásobník na kyvety. Zásobník pojme až 300 jednorázových kyvet, které mohou být doplňovány průběžně za chodu přístroje. Směrem od zásobníku kyvet k dotykové obrazovce (dopředu) se nachází řídicí počítač. Pod horním krytem se také nachází termistor citlivý na teplotu okolí.

Na obrázku 23 je pohled z pozice obsluhy po otevření světelného štítu a zároveň je odstraněn kryt detektorů a catcheru (nosiče kyvet).



Obrázek 23: Pracovní pole přístroje

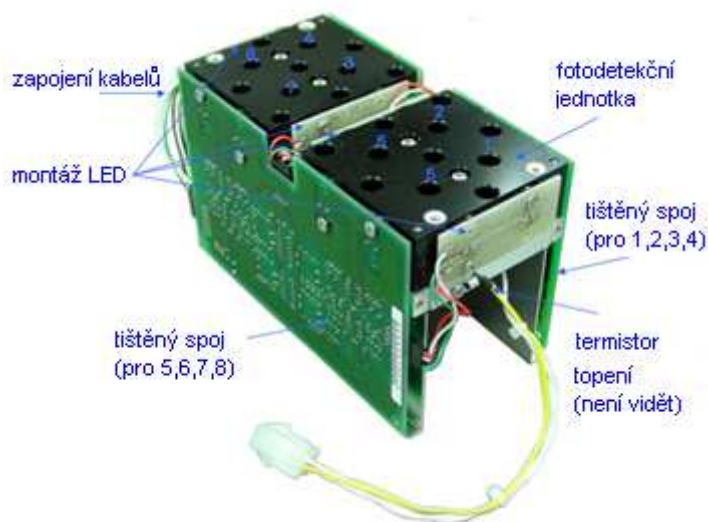
V zadní části, přibližně uprostřed, vidíme jednotku nosiče kyvet. Jedná se v podstatě o plastový dvojitý zobáček zajišťující chytání a držení pracovních kyvet zcela mechanicky, pomocí pružin a vhodného tvaru. Celá jednotka se pohybuje horizontálně, pouze zobáček se posouvá i vertikálně.

Na obrázku 24 je detail catcheru (k modrým šipkám patří popisky dílů pro servisní techniky). Pod jednotkou nosiče kyvet (catcheru) se nacházejí jednotlivé měřící kanály.



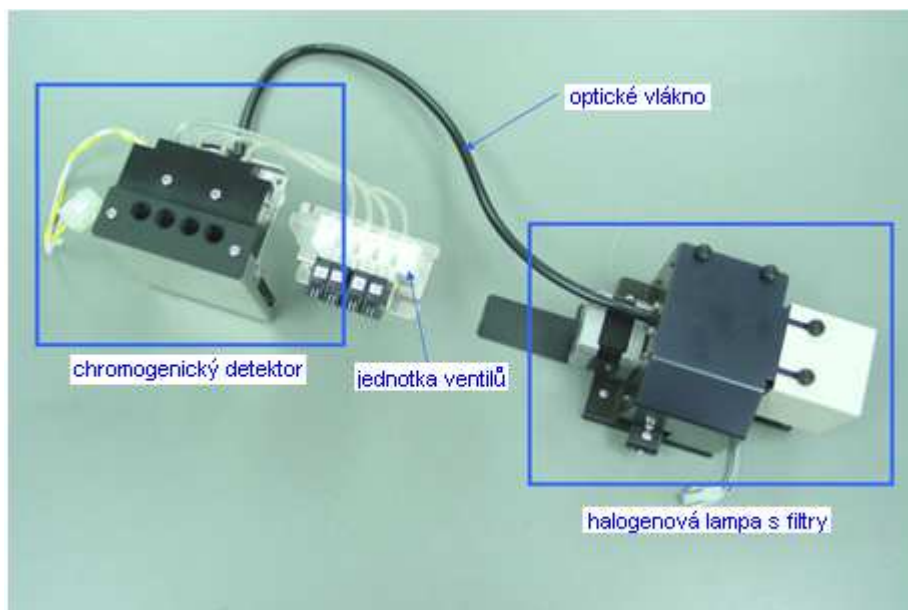
Obrázek 24: Catcher (nosič kyvet)[26]

Vlevo jsou koagulační měřící kanály a vpravo chromogenní. Celkem do 8 koagulačních kanálů jsou catcherem vkládány kyvety. Celý blok je stabilizován termistorem na teplotu 37°C a koagulum je opticky detekováno při vlnové délce 660 nm (obrázek 25). Jako zdroj jsou zde použity diody LED umístěné přímo v měřícím bloku. Chromogenní detektor má pouze 4 měřící kanály a světlo je k nim přiváděno pomocí optického vlákna z halogenové lampy (obrázek 26). Pomocí optických filtrů lze nastavit 3 vlnové délky, pro chromogenní substráty 405 nm a pro imunoturbidimetrické měření 575 nebo 800 nm.



Obrázek 25: Koagulační měřící jednotka[26]





Obrázek 26: Jednotka chromogenního detektoru a halogenová lampa[26]

Po nadzvednutí optického štítu má obsluha přístup k pozicím na vkládání reagensů. Pro snadnější manipulaci jsou zde dva vyjímatelné košíčky s popisem pozic. Do pozic A1 – A2 se vkládají čistící roztoky, všechny pozice B a C jsou určeny pro reagenty. V pozicích D1 – D14 se běžně nacházejí deficitní plazmy, kalibrátory a kontrolní vzorky. Na pozice E1 – E3 se dávají čistící roztoky a disenty. Pozice A, B, C, D jsou chlazeny na teplotu 15°C. Reagenty je možno umístit v různých lahvičkách přiměřené velikosti.



Obrázek 27: Pozice reagensů[26]

V pravé zadní části obrázku 23 je podavač pracovních kyvet ze zásobníku ke catcheru (detail je na obrázku 28). Ze zásobníku se kyvety posouvají za sebou směrem k rotačnímu podavači, který kyvetu přesune do pozice, kde si ji vyzvedne nosič (catcher).



Obrázek 28: Systém podávání kyvet [26]

Nalevo od podavače kyvet se nalézají 5 doků pro vkládání sample plates, které slouží pro pracovní ředění vzorků. Na obrázku 29, mezi rotačním podavačem kyvet a pozicí E3, je vidět komůrka pro oplachování jehly pipetující vzorky.



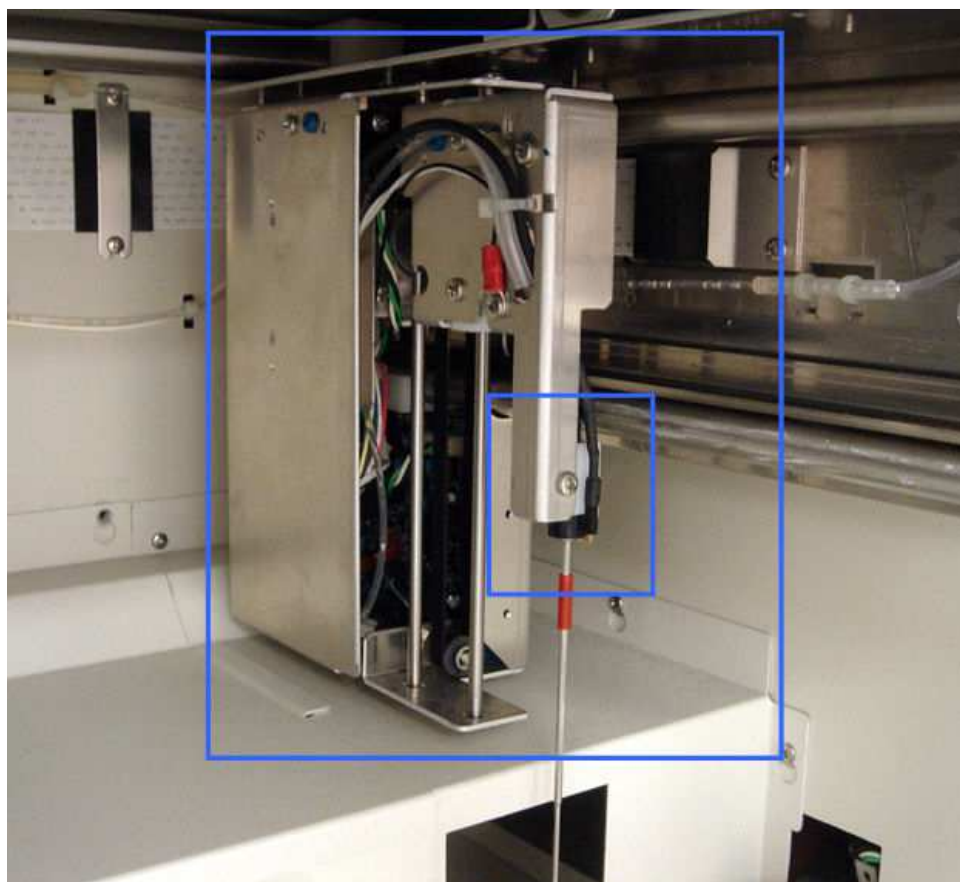
Obrázek 29: Pozice pro Sample plates [26]

Světelný kryt obsahuje malá dvířka pro vložení statimových vzorků. Zda jsou dvířka zavřena, stejně jako u světelného krytu, kontroluje magnetický senzor. Do 5 statimových pozic lze vložit urgentní vzorky opatřené čárovým kódem, pro přesné přiřazení výsledků k pacientovi.



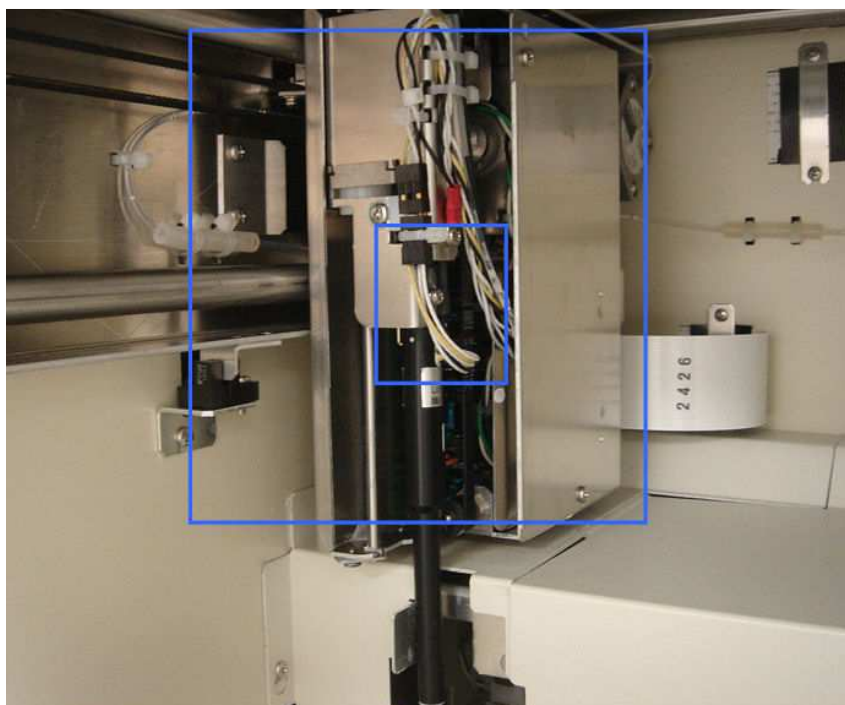
Obrázek 30: Statimové pozice[26]

Přístroj obsahuje dvě samostatná pipetovací ramena. Jedno zajišťuje pipetování vzorku a případně jeho ředění do pracovní kyvety. Druhá, zahnutá jehla se stará o přidávání reagensů. Pipetovací systém je založen na pohybu ve 3 osách, rameno se pohybuje nad pracovním polem a na vhodné pozici se jehla spouští dolů. Kalibrace pozic se nastavuje při instalaci a poté se vždy kontroluje, případně koriguje, při bezpečnostně technických kontrolách. Podle pokynů výrobce se kalibrují 3 body tvořící pomyslný trojúhelník a zbylé pozice se dopočítávají automaticky. Podobně je nastavována maximální hloubka spuštění jehly, i když obě jehly mají senzor hladiny s crash detektorem. Při čelním pohledu se vzorková jehla nachází napravo.



Obrázek 31: Vzorková jehla [26]

Jako dávkovací zařízení slouží syringe (elektricky dávkovatelná stříkačka) s keramickým pístem o objemu 2000  $\mu\text{l}$ . Možnosti pipetovacího objemu jsou od 4 do 200  $\mu\text{l}$ . Před každým pipetováním jsou jehly proplachovány destilovanou vodou ze vnitř i z vnějšku, každá ve vlastní stanici (komůrce). Vzorková jehla je celokovová, schopná propíchnutí vakuové folie na lahvičce diluentu. Druhá jehla nacházející se při čelním pohledu nalevo pipetuje reagentie a je zahnutá, aby pipetování do vzorku probíhalo po stěně pracovní kyvety. Zároveň je tento pipetor vyhříváný pro správnou inkubaci reagentií. Celé rameno reagenčního pipetoru je na obrázku 32.



Obrázek 32: Pipetor reagensí [26]

Do přístroje je možné současně vložit až 50 vzorků, umístěných v pěti stojanech po deseti vzorcích. Stojany se vkládají do sampleru (podavače vzorků), do pravé části, kde je stojan chycen plastovými pacičkami z obou stran a přisunut k přístroji, na konci se začne posouvat směrem doleva přes čtečku čárových kódů do pozice k nabrání vzorku pipetou. Zde je pohyb krokový. Poté je celý stojan odsunut zcela doleva a pak odsouván směrem od přístroje, kde čeká na odstranění obsluhou. Kapacita odběrové plochy je stejná jako podávací plochy. Díky čtečce čárových kódů je zamezeno chybám (například záměně vzorků). Pomocí podavače je možné podávat i kontrolní a kalibrační vzorky. Celý sampler je od výrobce dodáván zvlášť a musí být při instalaci připojen.

Při pohledu na levou stranu přístroje vidíme žebrování skrývající ventilátor, který odvádí teplo z Peltierova článku. Chladicí strana je namířena směrem k pozicím reagensí pro co nejlepší inkubaci. Dále směrem dozadu je zásobník odpadních květ opatřený senzorem. Nejdále od obsluhy se nachází vypínací tlačítko spolu s konektorem pro připojení do elektrické sítě.





Obrázek 33: Levá strana analyzátoru[26]

Při pohledu z pravé strany vidíme disketovou mechaniku (u nových přístrojů čtečku paměťových karet), ruční čtečku čárových kódů. Kartu s konektory pro jednotlivá periferní připojení. Sériové konektory slouží pro připojení k LISu a pro připojení čtečky nebo jako servisní vstup. Paralelní konektory se používají pro připojení grafické a datové tiskárny. Dále jsou na vnější straně regulátory tlaku pneumatického systému. Pod žebrováním je ukryta halogenová lampa.



Obrázek 34: Pravá strana analyzátoru[26]

Po odstranění krytu se v dolní části skrývá kompresor a v horní části jsou uloženy objemové písky. Kompresor a písky (vakuová jednotka) jsou připojeny k soustavě ventilů a

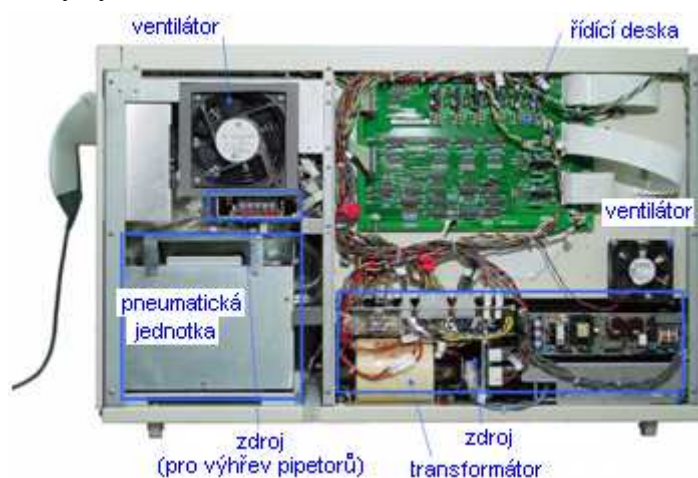
jako celek tvoří hydraulickou jednotku. Na obrázku 35 jsou shora vidět elektropneumatické ventily,



Obrázek 35: Hydraulická jednotka skřívající kompresor a objemové písky[26]

zajišťující jednotlivé funkce pipetorů. Níže jsou vidět vyrovnávací nádoby pro vodu a pro kapalný odpad. V pravé části obrázku jsou vidět regulátory tlaku navázané na otočné ovladače na povrchu.

Zadní část analyzátoru skrývá ventilátor odvádějící teplo z horní řídicí desky a pneumatického systému. Těsně pod ventilátorem se nachází zdroj pro vyhřívání pipetovacích jehel. V dolní části se je vidět zdrojovou jednotku pro celý analyzátor. Velký prostor zabírá řídicí deska pro pohyb pipetovacích ramen. Vlevo dole je ukryt kompresor pohánějící pneumatický systém.



Obrázek 36: Zadní strana bez krytu[26]

## 5. Derivovaný fibrinogen

Fibrinogen je nezbytnou součástí krevního srážení a jeho stanovení se rutinně v laboratořích provádí Claussovou metodou, kdy se měří rychlost přeměny fibrinogenu na fibrin v přítomnosti přebytku trombinu. Čas srážení je přepočítáván přes kalibrátory o známých koncentracích fibrinogenu. Koncentrace fibrinogenu je nepřímo úměrná času srážení. Fyziologické hodnoty odpovídají obsahu fibrinogenu 1,5 až 3 g/l plazmy. [15]

Fibrinogen je protein akutní fáze a jeho zvýšené hodnoty se mohou vyskytovat po prodělaných infekcích, zraněních nebo chirurgických zákrocích. Na druhou stranu může být zvýšená hladina fibrinogenu záminkou pro arteriální trombózu, což může v krajním případě vést až ke kardiovaskulárním úmrtím. [40]

### 5.1. Metoda derivovaného fibrinogenu

Laboratoře s automatickými koagulometry mají zájem o zjednodušení stanovení fibrinogenu, což je pro ně ekonomičtější a rychlejší, protože není nutné použití reagentie pro Claussovou metodu. Lze provést stanovení derivovaného (odečteného) fibrinogenu. Samotný výpočet se provádí ze srážecí křivky protrombinového času (PT testu, Quickova testu) na automatických foto-optických koagulometrech. Rozptyl světla se změří před a po úplném vysrážení a celkový rozdíl signálu koreluje s obsahem fibrinogenu. Zjistilo se však, že výsledky nekorelují zcela přesně s Claussovou metodou. Pro Claussovou metodu se běžně používá lyofilizovaného kalibrátoru, zbaveného vody tzv. ledovým sušením. Takováto plazma nemá vliv na stanovení fibrinogenu Claussovou metodou, ale ovlivní PT test, ze kterého je stanovován derivovaný fibrinogen přibližně o 20 %. Výsledky s čerstvou standardní plazmou jsou si u těchto testů odpovídající. Celkový signálový rozdíl u PT křivek může korelovat s obsahem fibrinogenu lineární závislostí. Toto tvrzení se pokusíme dokázat z patientských dat dodaných od zákazníků společnosti Siemens. [40]



## 5.2. Měření derivovaného fibrinogenu na přístroji Sysmex CA – 1500

Pro měření protrombinového času (PT) a z něj odvození derivovaného fibrinogenu se na přístroji Sysmex CA – 1500 používají nejčastěji 2 typy reagensí. Jedná se o reagentie Thromborel S a Dade Innovin. Ochrannou značku těchto reagensí vlastní společnost Siemens.

### Thromborel S

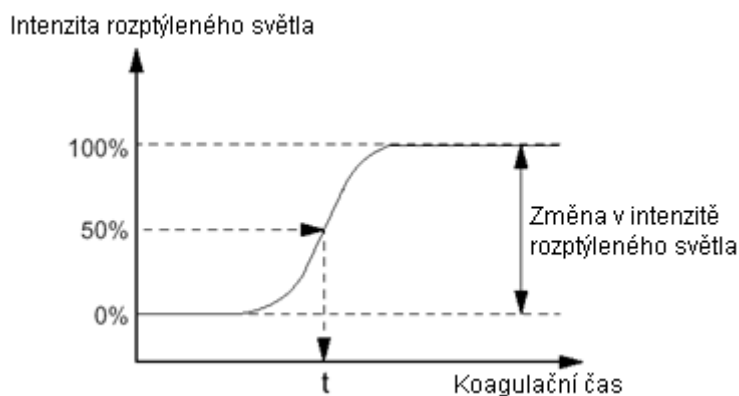
Jedná se o lyofilizovaný tromboplastin z lidské placenty spolu s kalciumchloridem a stabilizátory. Před použitím by měl být zahřátý na 37°C (takto zůstává stabilní po dobu 8 hodin). Po odběru krve se smíchá 1 díl citrátu sodného (0,11 mol/l) s 9 díly venózní krve se snahou nevytvořit pěnu. Vzorek se centrifuguje při přetížení 1500 g nejméně 15 minut při pokojové teplotě. Skladování se doporučuje při pokojové teplotě. Plazma by se měla zpracovat do 24 hodin. Vzorek není stabilní při teplotě 37°C déle než 5 minut. Po vložení do přístroje pipetor nasaje ze zkumavky 50 µl zkoumané plazmy a napipetuje ji do kyvety. Inkubuje kyvetu při teplotě 37°C po dobu 180 vteřin. Poté je přidána reagentie Thromborel S (100 µl) a stále při 37°C je prováděno samotné měření, po dobu maximálně 120 vteřin. Nastavený parametr přístroje je DFbg a jednotky jsou buď g/L nebo mg/dL (v přístroji jednotka litr značená velkým L). Referenční rozsah pro derivovaný fibrinogen je 2,1 až 4,1 g/l. Hodnoty mimo tuto referenci nesmějí být samostatně vydány jako koncentrace fibrinogenu. [30][29]

### Dade Innovin

Tento reagent je produkován bakteriemi E. coli, jedná se o čištěný rekombinantní humánní tissue faktor kombinovaný se syntetickými fosfolipidy (tromboplastin), kalcium, pufrům a stabilizátory. Příprava reagensí je zde totožná jako u Thromborelu S. Zároveň postup měření v analyzátoru je totožný, pouze měření probíhá maximálně 100 vteřin. Testový protokol, podle kterého probíhá měření a slouží zároveň jako předloha nastavení pro analyzátor je na obrázku 22. Referenční rozsah derivovaného fibrinogenu je zde 1,8 až 4,0 g/l. Protokol je stejný jako pro test PT. Hodnota derivovaného fibrinogenu je pak odečtena z optické reakční křivky. Je přímo úměrná změně intenzity rozptýleného světla, která provází vznik koagula (obrázek 23). [28][29]

Testový protokol				Testový protokol			
Settings - Analysis Settings - Test Protocol				Settings - Analysis Settings - Test Protocol			
Parameter	PT			Parameter	PT		
Sample Vol.		50 µL		Sample Vol.		50 µL	
Diluent Vol.	None	0 µL		Diluent Vol.	None	µL	
Rinse		None		Rinse		None	
Second Dilution		0 µL		Second Dilution		0 µL	
Diluent Vol.	None	0 µL		Diluent Vol.	None	0 µL	
Rinse		None		Rinse		None	
Factor Plasma	None	0 µL		Factor Plasma	None	0 µL	
Rinse (Pre./Post.)	None	None		Rinse (Pre./Post.)	None	None	
First Reagent	PT INN	100 µL	180 sec	First Reagent	PT THS	100 µL	180 sec
Push-out Solution	No	0 µL		Push-out Solution	No	0 µL	
Rinse (Pre./Post.)	None	x 0 Clean II	x 1	Rinse (Pre./Post.)	None	x 0 None	x 0
Second Reagent	None	0 µL	0 sec	Second Reagent	None	0 µL	0 sec
Push-out Solution	No	0 µL		Push-out Solution	No	0 µL	
Rinse (Pre./Post.)	None	x 0 None	x 0	Rinse (Pre./Post.)	None	x 0 None	x 0
Third Reagent	None	0 µL	0 sec	Third Reagent	None	0 µL	0 sec
Push-out Solution	No	0 µL		Push-out Solution	No	0 µL	
Rinse (Pre./Post.)	None	x 0 None	x 0	Rinse (Pre./Post.)	None	x 0 None	x 0
Detector	Clot	for PT Innovin (R)		Detector	Clot	for PT THS	
Sens	Low Sens			Sens	Low Sens		
Maximum Time		100 sec		Maximum Time		120 sec	

Obrázek 37: Testové protokoly stanovení PT (derivovaného fibrinogenu) s reagensy Dade Innovin a Thromborel S [29]



Obrázek 38: Procentuální změna intenzity rozptýleného světla (= obrázek 5) [33]

## 6. Zpracování a vyhodnocení naměřených dat

### 6.1. Práce s daty

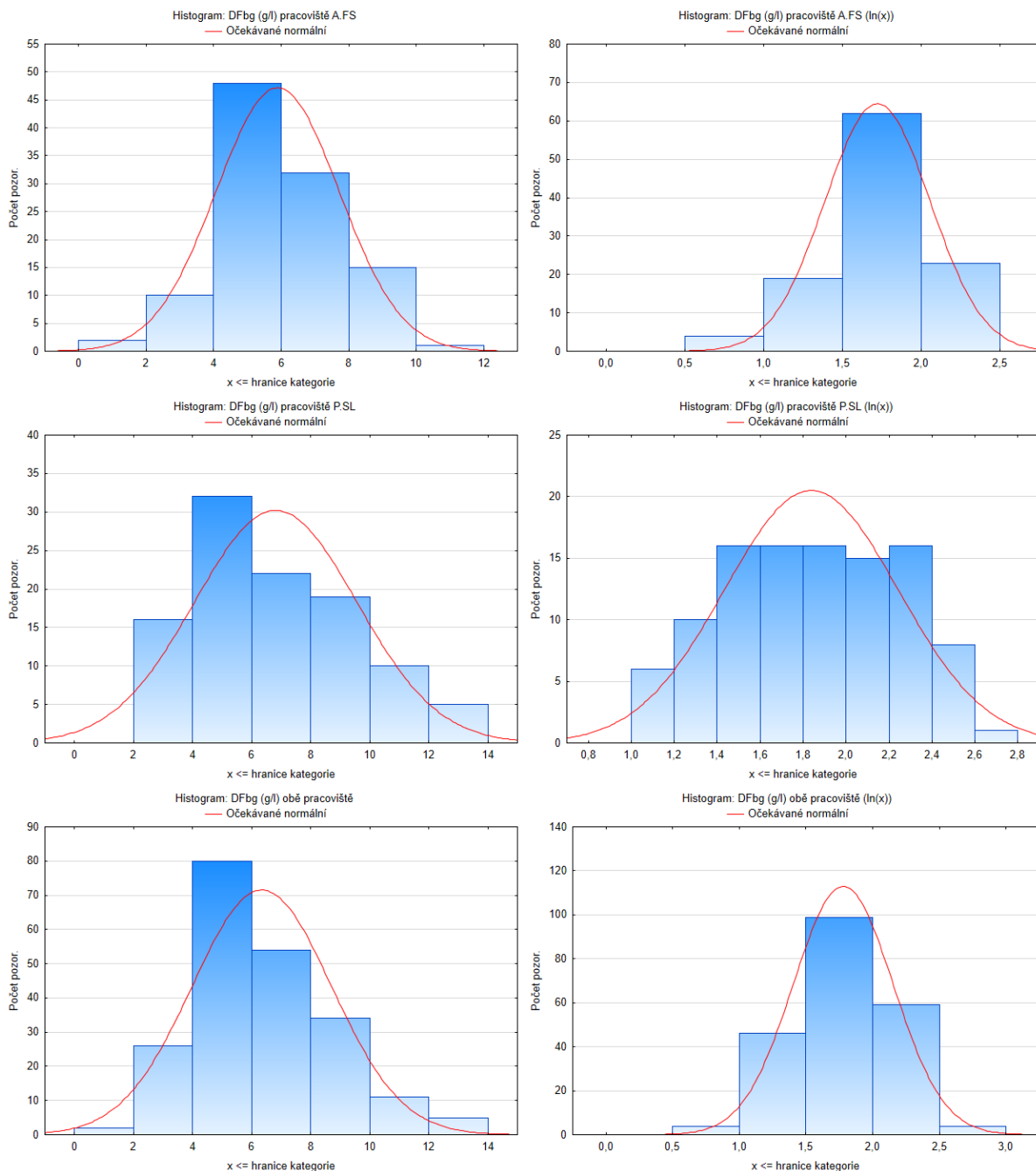
Pro hledání závislosti derivovaného fibrinogenu na hodnotách APTT a PT jsou použity výsledky ze dvou nezávislých pracovišť v Moravskoslezském kraji. Úmyslně jsme požádali o spolupráci dvě nemocnice z důvodu, že každá laboratoř používá jinou reagensii pro test APTT. V jedné laboratoři používají Actin FS, naproti tomu ve druhé používají pro stanovení APTT Pathromtin SL. Obě nemocnice používají analyzátor Sysmex CA – 1500 pro koagulační testování. Zároveň mají obě pracoviště dostatek pacientů, u kterých bylo z jediného odběru prováděno požadované spektrum krevních testů (APTT, PT, koncentrace fibrinogenu Claussovou metodou) navíc se zkoumaným testem derivovaného fibrinogenu (nebyl používán standardně – výsledky zapisovány na naši žádost). V dalším textu budeme pro rozlišení jednotlivých pracovišť používat název „pracoviště A.FS“ pro pracoviště s Actinem FS a název „pracoviště P.SL“ pro reagensii Pathromtin SL.

Testový protokol				Testový protokol			
Settings - Analysis Settings - Test Protocol				Settings - Analysis Settings - Test Protocol			
Parameter	APTT			Parameter	APTT		
Sample Vol.		50 µL		Sample Vol.		50 µL	
Diluent Vol.	None	0 µL		Diluent Vol.	None	0 µL	
Rinse		None		Rinse		None	
Second Dilution		0 µL		Second Dilution		0 µL	
Diluent Vol.	None	0 µL		Diluent Vol.	None	0 µL	
Rinse		None		Rinse		None	
Factor Plasma	None	0 µL		Factor Plasma	None	0 µL	
Rinse (Pre./Post.)	None	None		Rinse (Pre./Post.)	None	None	
First Reagent	APTT FS	50 µL	60 sec	First Reagent	APTT PSL	50 µL	60 sec
Push-out Solution	No	0 µL		Push-out Solution	No	0 µL	
Rinse (Pre./Post.)	None	x 0	None x 0	Rinse (Pre./Post.)	None	x 0	None x 0
Second Reagent	CaCl <sub>2</sub>	50 µL	240 sec	Second Reagent	CaCl <sub>2</sub>	50 µL	180 sec
Push-out Solution	No	0 µL		Push-out Solution	No	0 µL	
Rinse (Pre./Post.)	None	x 0	None x 0	Rinse (Pre./Post.)	None	x 0	None x 0
Third Reagent	None	0 µL	0 sec	Third Reagent	None	0 µL	0 sec
Push-out Solution	No	0 µL		Push-out Solution	No	0 µL	
Rinse (Pre./Post.)	None	x 0	None x 0	Rinse (Pre./Post.)	None	x 0	None x 0
Detector	Clot		for APTT FS	Detector	Clot		for APTT PSL
Sens	Low Sens			Sens	Low Sens		
Maximum Time		180 sec		Maximum Time		180 sec	

Obrázek 39: Testové protokoly; vlevo Actin FS a vpravo Pathromtin SL[29]

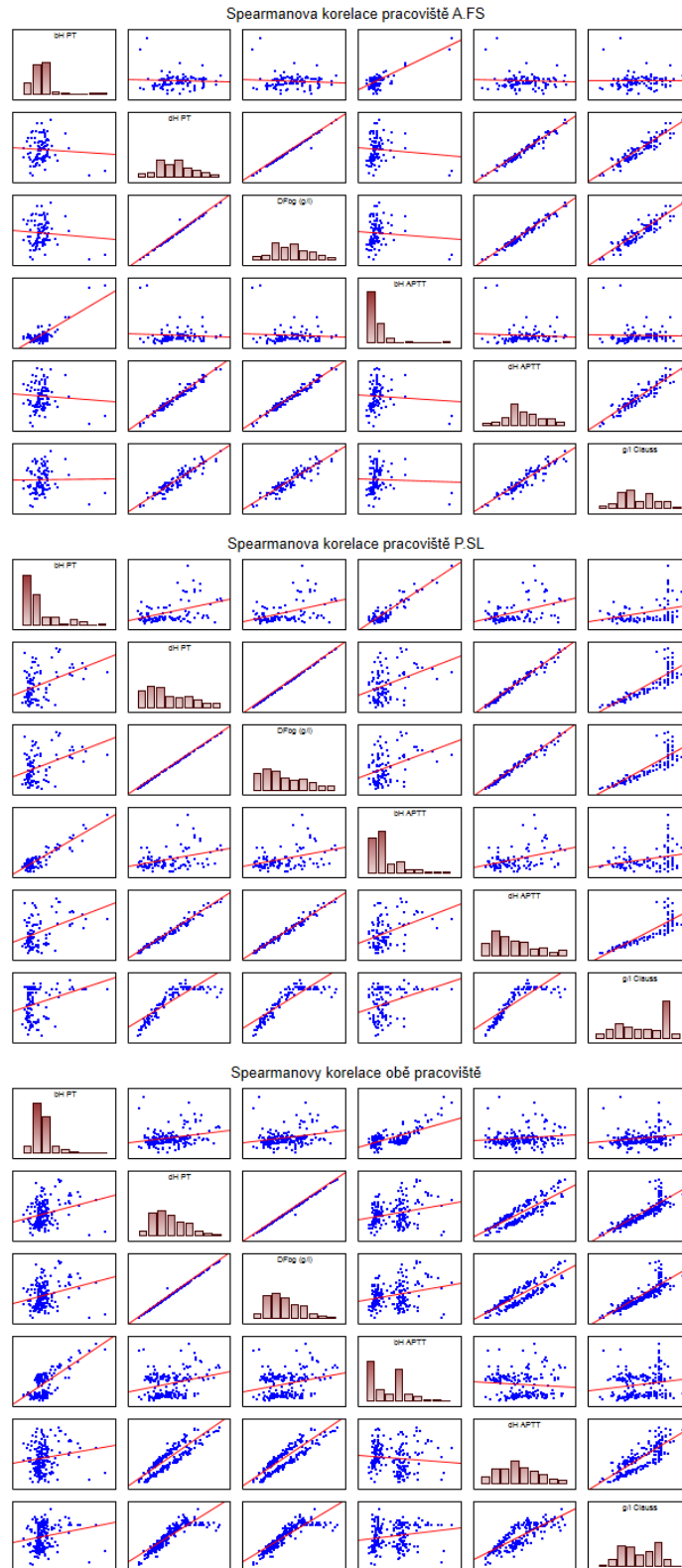
K dispozici máme celkem 212 pacientů, z toho je 104 pacientů z pracoviště P.SL a 108 z pracoviště A.FS. U všech vzorků byl prováděn Quickův test (PT) pomocí reagensie Thromborel S. Jak u APTT tak u PT testu nás nezajímá čas srážení, ale hodnoty koagulační křivky, hlavně hodnota dH, která odpovídá změně optické hustoty reakční směsi provázející vznik koagula. Jako standardní výsledky koncentrace fibrinogenu v krvi použijeme hodnoty změřené Claussovou metodou.

Všechna data jsou zkoumána Lillieforsovým testem vycházejícím z Kolmogorova – Smirnova testu pro ověření normálního rozložení. Nulovou hypotézu zamítáme, získaná data normální rozložení nemají. Ani při převedení dat na přirozený logaritmus nepřinesl normální rozložení hodnot. Na obrázku X je vždy vlevo histogram hodnot a vpravo je jeho logaritmovaný ekvivalent pro derivovaný fibrinogen. Je vidět, že při sjednocení dat z obou pracovišť se díky přirozenému logaritmu dostáváme k normálnímu rozložení, ale neplatí to pro ostatní proměnné.



Obrázek 40: Histogramy rozložení

Z důvodu ne Gaussovského rozložení jsme k testování korelací použili Spearmanovům korelační test, který je vhodný pro veličiny s neznámým pravděpodobnostním rozdělením. Již z matice Spearmanových korelací jsou zřetelné závislosti mezi jednotlivými proměnnými jak u jednotlivých pracovišť, tak i u sjednocených dat.



Obrázek 41: Spearmanovy korelace všech dat

Pro názorné zobrazení Spearmanových korelací jsou níže uvedeny tabulky pro jednotlivé laboratoře a sjednocená data.

**Tabulka 3: Spearmanovy korelace pracoviště A.FS**

<b>A.FS</b>	bH PT	dH PT	DFbg (g/l)	bH APTT	dH APTT	g/l Clauss
bH PT	1,000000	0,166085	0,151020	0,332551	0,125800	0,174079
dH PT	0,166085	1,000000	0,996267	0,310107	0,982290	0,936673
DFbg (g/l)	0,151020	0,996267	1,000000	0,310357	0,985949	0,932133
bH APTT	0,332551	0,310107	0,310357	1,000000	0,324345	0,325250
dH APTT	0,125800	0,982290	0,985949	0,324345	1,000000	0,936947
g/l Clauss	0,174079	0,936673	0,932133	0,325250	0,936947	1,000000

**Tabulka 4: Spearmanovy korelace pracoviště P.SL**

<b>P.SL</b>	bH PT	dH PT	DFbg (g/l)	bH APTT	dH APTT	g/l Clauss
bH PT	1,000000	0,331873	0,331600	0,616877	0,329103	0,255320
dH PT	0,331873	1,000000	0,999989	0,305748	0,990000	0,920832
DFbg (g/l)	0,331600	0,999989	1,000000	0,305273	0,990010	0,920741
bH APTT	0,616877	0,305748	0,305273	1,000000	0,314931	0,241132
dH APTT	0,329103	0,990000	0,990010	0,314931	1,000000	0,927571
g/l Clauss	0,255320	0,920832	0,920741	0,241132	0,927571	1,000000

**Tabulka 5: Spearmanovy korelace obě laboratoře**

<b>Vše</b>	bH PT	dH PT	DFbg (g/l)	bH APTT	dH APTT	g/l Clauss
bH PT	1,000000	0,255625	0,249499	0,416747	0,182078	0,217816
dH PT	0,255625	1,000000	0,998666	0,236212	0,875990	0,941043
DFbg (g/l)	0,249499	0,998666	1,000000	0,234378	0,878754	0,938783
bH APTT	0,416747	0,236212	0,234378	1,000000	-0,113162	0,224101
dH APTT	0,182078	0,875990	0,878754	-0,113162	1,000000	0,819154
g/l Clauss	0,217816	0,941043	0,938783	0,224101	0,819154	1,000000

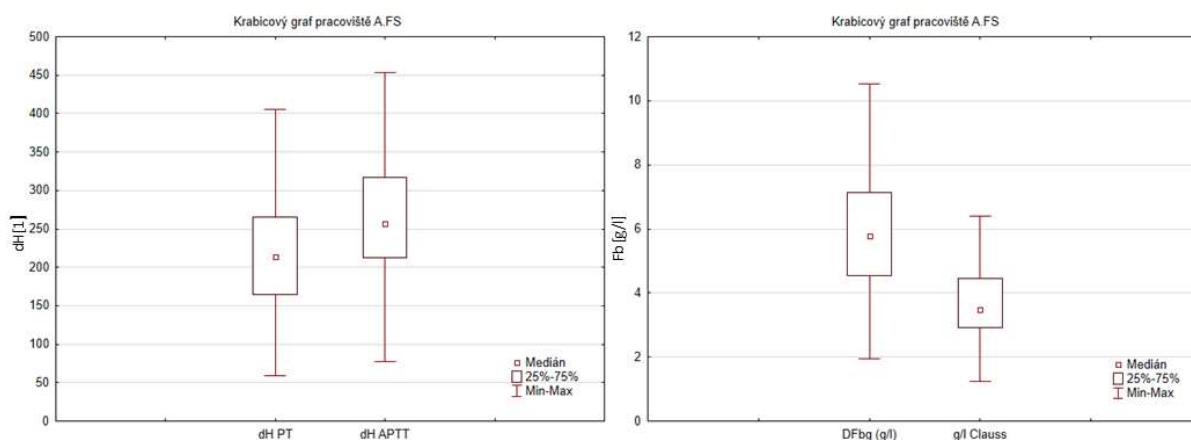
Červeně označené korelace jsou statisticky významné (automatické hodnocení softwaru Statistica  $p < 0,05$ ). Výsledky odpovídají jednotlivým grafům z obrázku 41.

V tabulce 6 jsou uvedeny výsledky popisné statistiky pro data z pracoviště A.FS.

**Tabulka 6: Popisná statistika pracoviště A.FS**

<b>A.FS</b>	Průměr	Medián	Modus	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
bH PT	84,34	83,00	vícenás.	52,00	196,00	75,00	90,00	18,72
dH PT	218,03	214,00	vícenás.	59,00	406,00	164,50	266,00	73,59
DFbg (g/l)	5,89	5,78	vícenás.	1,95	10,52	4,56	7,15	1,83
bH APTT	46,65	43,00	40,00	32,00	151,00	40,00	48,00	16,74
dH APTT	267,64	256,50	222,00	78,00	453,00	212,50	316,50	79,62
g/l Clauss	3,67	3,49	vícenás.	1,24	6,40	2,92	4,45	1,09

Níže jsou uvedeny krabicové grafy pro toto pracoviště. Pro lepší přehlednost jsou ve společném grafu uvedeny hodnoty dH pro PT a APTT, a společně koncentrace fibrinogenu Claussovým testem a odečtením (DFbg).



Obrázek 42: Krabicové grafy pro pracoviště A.FS

Pro krabicové grafy jsme vybrali čtyři nejdůležitější parametry. Podobnost u dH hodnot je náhodná. Koncentrace metodou derivovaného fibrinogenu se pohybuje ve vyšších hodnotách a podstatně s větším rozptylem než je tomu u koncentrace Claussovou metodou. Zdá se tedy, že hodnoty měřené Claussovou metodou mají mezi kvantily normální hodnoty koncentrace fibrinogenu. Minimální hodnoty jenom lehce zasahují pod fyziologickou normu (1,5 g/l), zatímco horní kvantil normu (4,5 g/l) přesahuje výrazněji. Z toho lze usoudit, že pacienti z pracoviště A.FS mají častěji zvýšené hodnoty koncentrace fibrinogenu při testování Claussovou metodou.

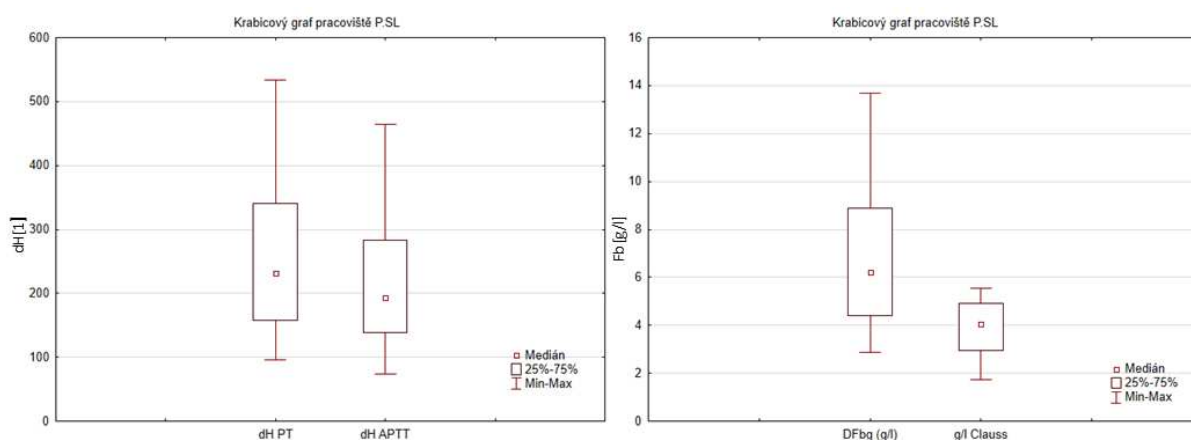
Tabulka 7 představuje přehled základních statistik pro data z pracoviště P.SL.

Tabulka 7: Popisná statistika pracoviště P.SL

P.SL	Průměr	Medián	Modus	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
bH PT	91,85	84,00	80,00	72,00	179,00	80,00	94,50	20,04
dH PT	255,84	232,00	394,00	96,00	534,00	158,00	340,00	111,30
DFbg (g/l)	6,81	6,22	10,22	2,87	13,68	4,40	8,89	2,75
bH APTT	90,20	85,50	vícenás.	71,00	164,00	80,00	93,00	16,55
dH APTT	218,36	192,50	vícenás.	74,00	465,00	139,00	283,00	98,33
g/l Claus	3,93	4,07	4,90	1,73	5,53	2,96	4,90	1,04

Podobně jako v případě pracoviště A.FS jsou níže uvedeny krabicové grafy. Zajímavé je pozorování, že hodnoty dH u APTT (74 až 465) se pohybují níže než hodnoty dH PT testu (96 až 534), naproti tomu v podání pracoviště A.FS je poměr opačný (dH APTT 78 až 453 a dH PT 59 až 406), i když je rozsah hodnot APTT podobný, jedná se o náhodu, ale rozdílný poměr mezi rozsahy je způsoben různými reagenty pro APTT test v obou

laboratořích. Quickův (PT) test používá na obou pracovištích shodnou reagentii a i jeho medián si je navzájem blízký (dH = 214 pro A.FS a dH = 232 pro P.SL). Porovnání derivovaného fibrinogenu a koncentrace fibrinogenu Claussovou metodou je podobná jako u A.FS. Rozdíl mediánů na pracovišti A.FS je 2,29 g/l zatímco na pracovišti P.SL je to 2,15 g/l. Pro pracoviště A.FS mají mediány nižší hodnotu, ale přesto se na pracovišti P.SL pohybují koncentrace fibrinogenu podle Clause v nižších hodnotách. Rozsah mezi kvantily pro koncentrace fibrinogenu je u P.SL větší než u A.FS, což dokazuje, že více pacientů zapadá mezi 25% a 75%, ale na druhou stranu maximum a minimum není tak souměrné jako na pracovišti A.FS. Nicméně extrémní má pracoviště P.SL celkově menší, až na horní hodnotu derivovaného fibrinogenu, k tomuto číslu se blíží jen minimum pacientů.



Obrázek 43: Krabicové grafy pro pracoviště P.SL

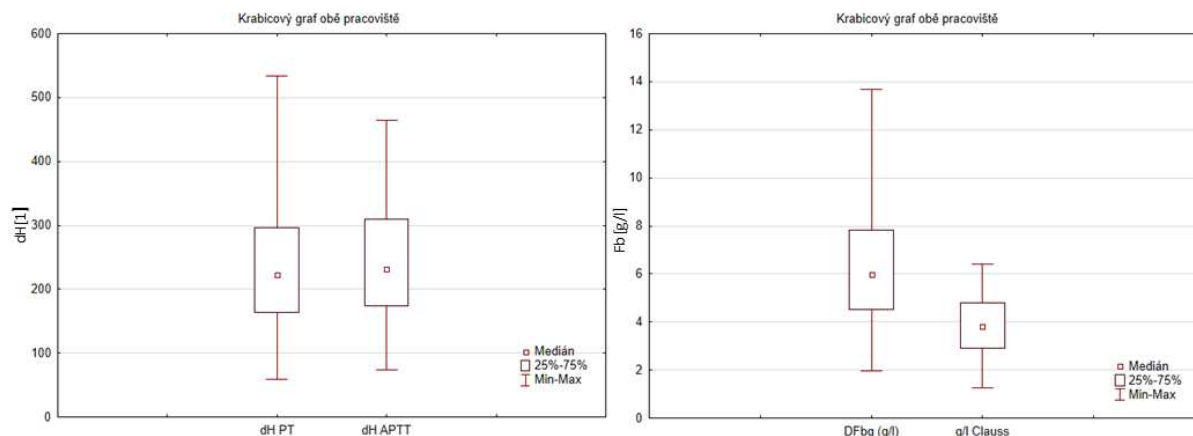
Po sjednocení dat z obou pracovišť získáváme popisné statistiky z tabulky 8.

Tabulka 8: Popisné statistiky pro obě pracoviště

Vše	Průměr	Medián	Modus	Minimum	Maximum	25.000. (kvantil)	75.000. (kvantil)	Sm.Odch.
bH PT	88,02	84,00	80,00	52,00	196,00	78,00	91,00	19,70
dH PT	236,58	222,00	vícenás.	59,00	534,00	164,00	296,00	95,67
DFbg (g/l)	6,34	5,98	vícenás.	1,95	13,68	4,54	7,84	2,36
bH APTT	68,01	71,50	40,00	32,00	164,00	43,00	86,00	27,43
dH APTT	243,46	231,00	222,00	74,00	465,00	174,00	309,50	92,44
g/l Clauss	3,80	3,80	4,90	1,24	6,40	2,92	4,79	1,07

Krabicové grafy pro sjednocená data jsou kombinací separovaných grafů. Hodnoty dH pro APTT nemají tak velký rozsah jako hodnoty Quickova testu. Stejně tak hodnoty koncentrací fibrinogenu Claussovou metodou mají výrazně menší rozsah než hodnoty derivovaného fibrinogenu. I když je minimum ve srovnatelné výšce (1,24 – Clauss a 1,95 - DFbg), je zřetelné, že hodnoty derivovaného fibrinogenu jsou posunuty vůči hodnotám tradiční Claussovy metody.





Obrázek 44: Krabicové grafy pro obě pracoviště

## 6.2. Závislost derivovaného fibrinogenu na dH PT

Derivovaný fibrinogen se vypočítává z dH hodnot Quickova testu (PT). Na obrázku 45 je vidět závislost mezi hodnotami derivovaného fibrinogenu a daty, ze kterých výpočet vychází (dH PT) u pracoviště A.FS. Na 95 % intervalu spolehlivosti má korelační koeficient hodnotu 0,9963. Statistica nám vypočetla rovnici proloženou přímkou metodou nejmenších čtverců. Až na jedinou hodnotu (nejspíš chybovou) jsou všechna data na předpokládané linii. Vzorec pro ideální přímkou je následující.

$$DFbg = dH(PT) * 0,02473 + 0,50332 \quad (4)$$

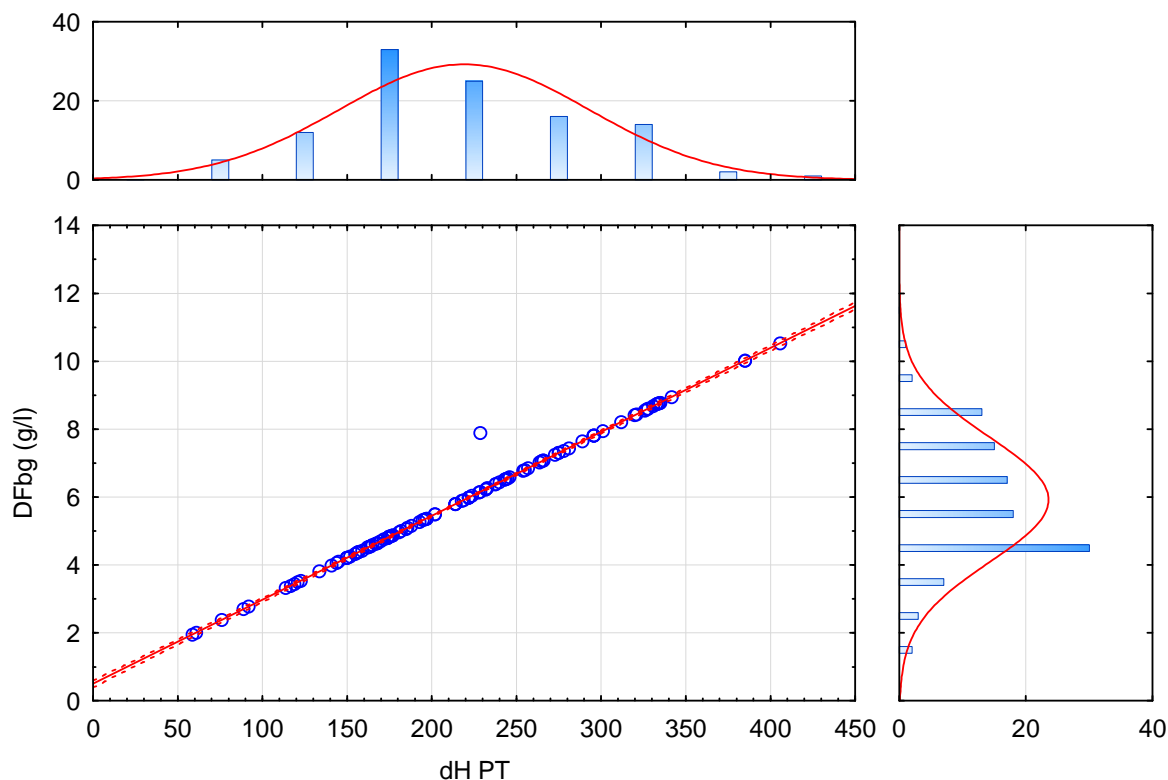
Stejný vzorec potvrzuje i funkce v MS Excel. Použita byla funkce LINREGRESE, která také počítá popisující přímkou metodou nejmenších čtverců.

Tabulka 9: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce přímkou a rezidua (pracoviště A.FS)

A.FS	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	5,8944	5,7800	1,9500	10,5200	4,5550	7,1500	1,8271
Predikovaný DFbg	5,8944	5,7948	1,9622	10,5422	4,5708	7,0805	1,8195
Rezidua	0,0000	0,0158	-1,7143	0,0241	0,0131	0,0184	0,1665

V tabulce 9 je jasně vidět minimální odchýlení dat od proložené přímkou. Pouze minimální hodnota reziduí se týká chybově naměřené hodnoty.

Bodový graf: dH PT vs. DFbg (g/l) pracoviště A.FS (Celé příp. vynech. u ChD)  
 $DFbg (g/l) A.FS = ,50332 + ,02473 * dH PT A.FS$



Obrázek 45: Graf závislosti DFbg na dH PT pro pracoviště A.FS

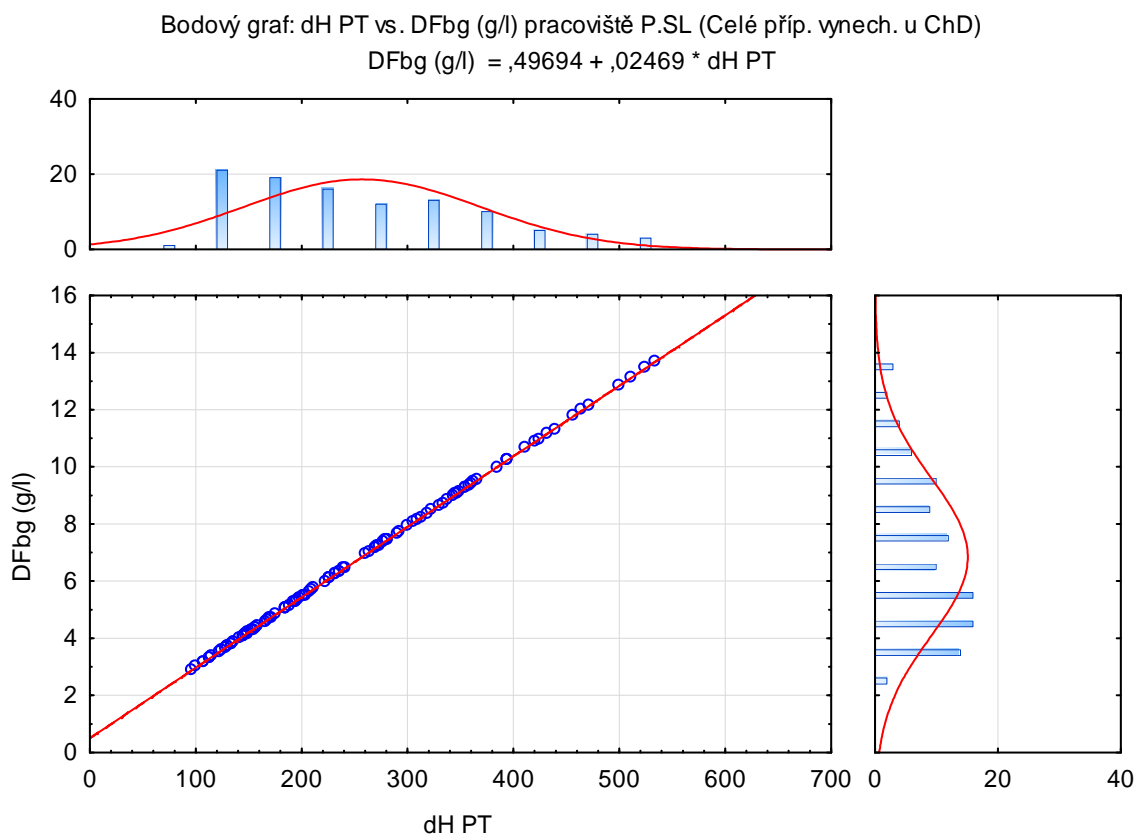
Pro pracoviště P.SL jsou výsledky velmi podobné. Na stejném intervalu spolehlivosti odpovídá hodnota Spearmanova korelačního koeficientu číslu 0,9999. Na první pohled se přímka zdá strmější, ale to je způsobeno jiným rozsahem os grafu. Navržená rovnice (5) je podle předpokladu řádově i číselně velmi podobná jako v případě pracoviště A.FS(4).

$$DFbg = dH(PT) * 0,02469 + 0,49694 \quad (5)$$

Rovnice znovu potvrzena pomocí MS Excel spolu s výpočtem predikovaných hodnot derivovaného fibrinogenu a jeho reziduí. Ve Statistice vyhodnocení základních statistik v tabulce 10.

Tabulka 10: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce přímky a rezidua (pracoviště P.SL)

P.SL	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	6,8123	6,2200	2,8700	13,6800	4,3950	8,8900	2,7476
Predikovaný DFbg	6,8123	6,2239	2,8667	13,6788	4,3972	8,8899	2,7476
Rezidua	0,0000	0,0002	-0,0686	0,0489	-0,0021	0,0029	0,0088



**Obrázek 46: Graf závislosti DFbg na dH PT pro pracoviště P.SL**

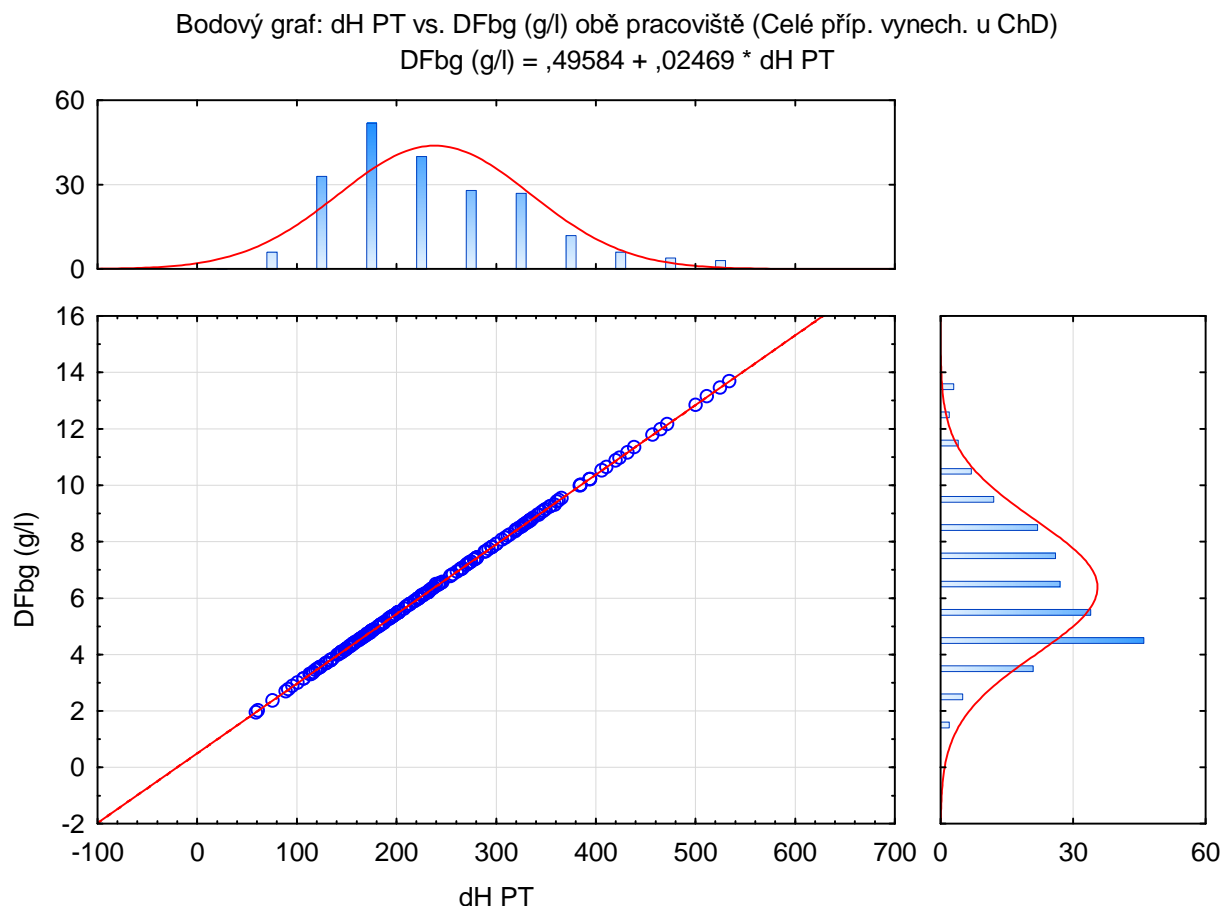
Nejuniverzálnější rovnice lineární regrese mezi derivovaným fibrinogenem a hodnotami dH Quickova (PT) testu získáme bodovým grafem pro všechna data mimo jednu chybovou hodnotu z pracoviště A.FS. I když se jedná o dvě pracoviště, obě měří test PT na stejném přístroji se stejnou reagentií. Spearmanův korelační koeficient odpovídá 0,9999 podle předpokladu.

$$DFbg = dH(PT) * 0,02469 + 0,49584 \quad (6)$$

Rovnice 6 téměř odpovídá rovnici 5, liší se až na třetím desetinném místě přičítané konstanty a to jen o 0,00110. Také hodnoty přímký se velmi blíží skutečným naměřeným hodnotám, jak je vidět z tabulky 11.

**Tabulka 11: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce přímký a rezidua (pracoviště P.SL)**

Vše	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	6,3374	5,9800	1,9500	13,6800	4,5400	7,8000	2,3675
Predikovaný DFbg	6,3374	5,9767	1,9525	13,6794	4,5447	7,8036	2,3675
Rezidua	0,0000	0,0001	-0,0689	0,0490	-0,0024	0,0029	0,0065



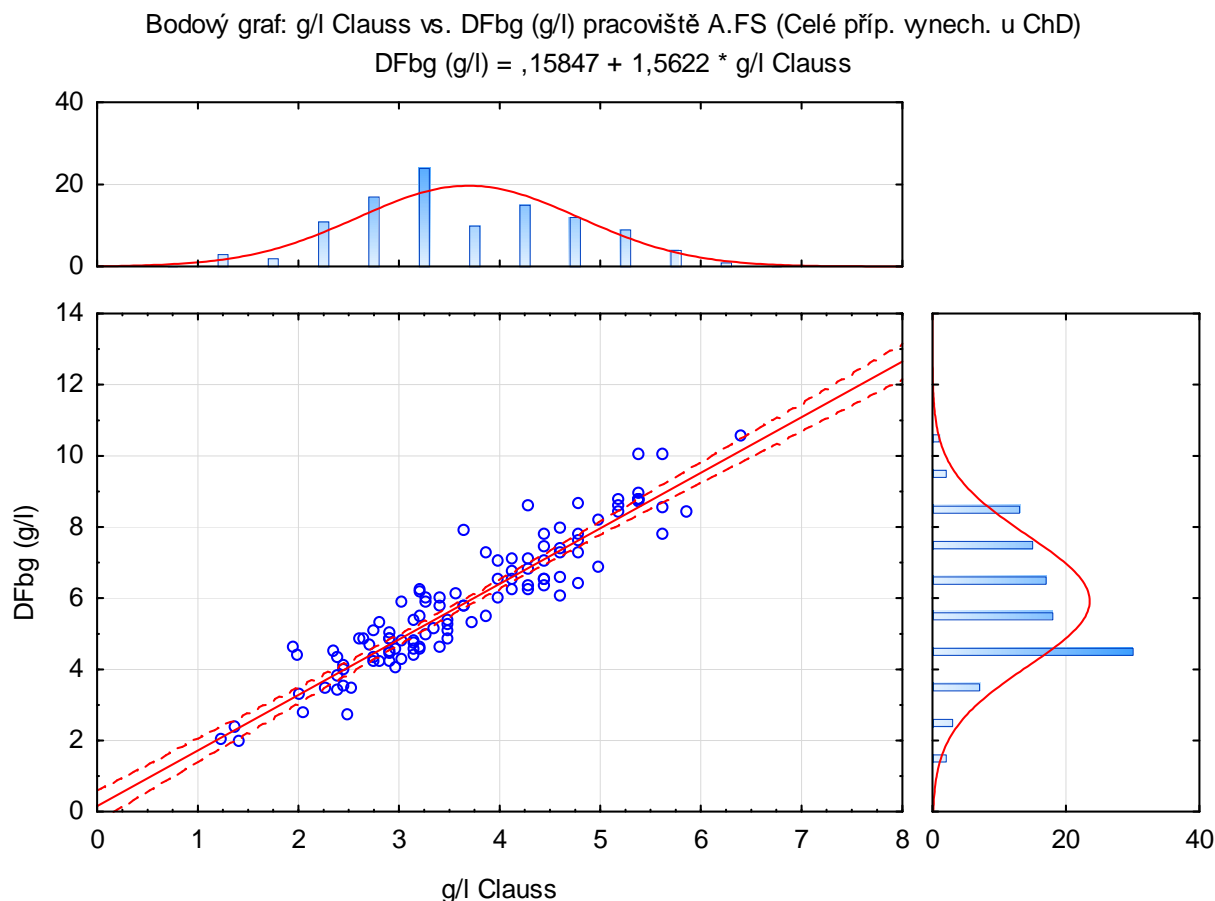
Obrázek 47: Graf závislosti DFbg na dH PT pro obě pracoviště

### 6.3. Porovnání derivovaného fibrinogenu s Claussovou metodou

Za standardní metodu stanovení koncentrace fibrinogenu v krvi se považuje stanovení Claussovou metodou. Proto se nejdříve zaměříme na porovnání derivovaného fibrinogenu právě s těmito výsledky. Již z popisných krabicových grafů bylo zřetelné, že hodnoty derivovaného fibrinogenu jsou vyšší než výsledky Claussovy metody.

V případě pracoviště A.FS je závislost téměř lineární, výsledky se od ideální linie více vzdalují u vyšších koncentrací. Hodnota Spearmanovy korelace pro kompletní A.FS data je 0,932133. I zde je zřejmé, že hodnota derivovaného fibrinogenu je posunuta vůči výsledkům dle Clausse, protože strmost teoretické line je nízká (v grafu vypadá téměř úhlopříčně z důvodu různých rozsahů os). Rovnice byla znovu ověřena i v MS Excel.

$$DFbg = \text{Claus}(g/l) * 1,5622 + 0,15847 \quad (7)$$



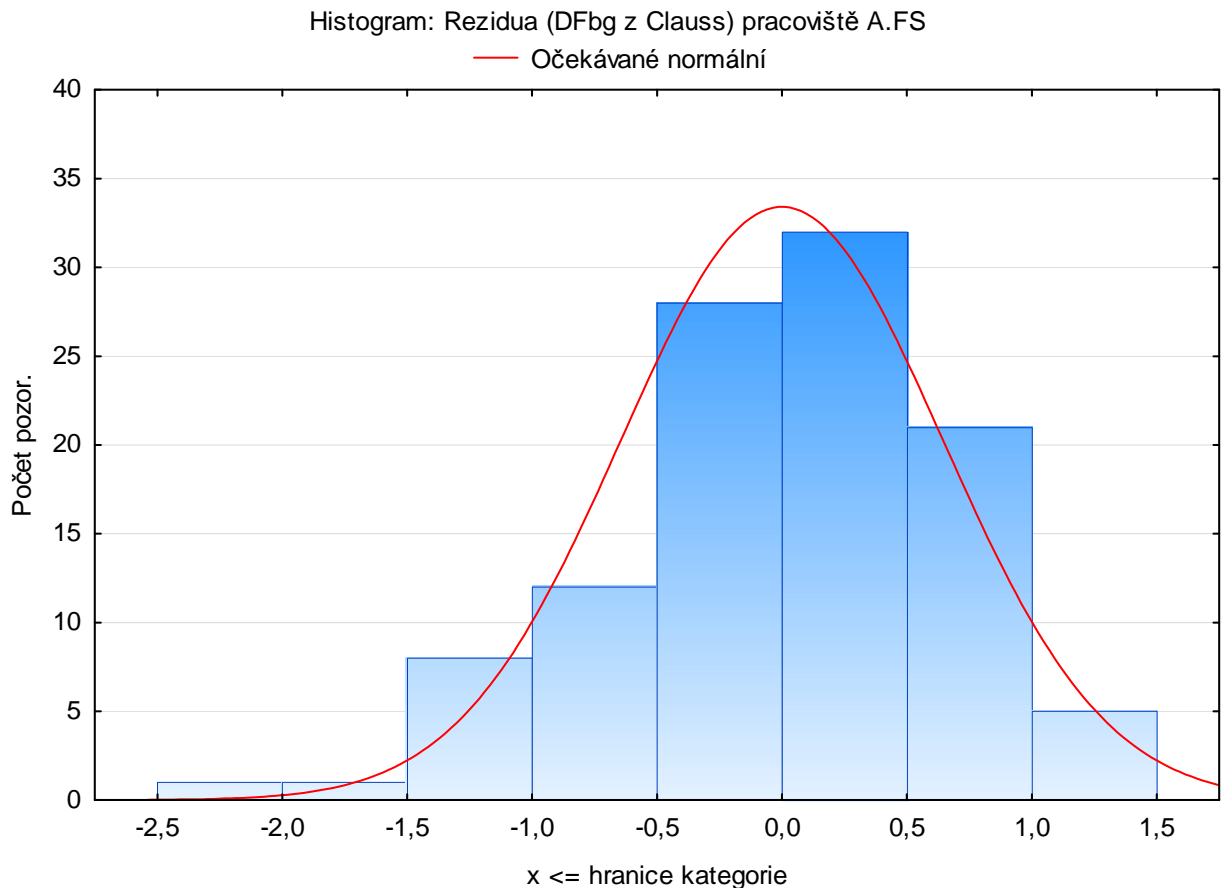
**Obrázek 48: Graf závislosti DFbg na Claussově metodě pro pracoviště A.FS**

Predikované hodnoty jsou rozdílné oproti hodnotám změřeným, ale nejsou to výrazné rozdíly, jak dokazuje tabulka 12.

**Tabulka 12: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce přímky a rezidua (pracoviště A.FS)**

<b>A.FS</b>	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	5,8944	5,7800	1,9500	10,5200	4,5550	7,1500	1,8271
Predikovaný DFbg	5,8944	5,6104	2,0956	10,1563	4,7200	7,1101	1,7096
Rezidua	0,0000	0,0701	-2,0196	1,3583	-0,3626	0,4808	0,6447

Mezi kvantily se reziduum odchyluje na obě strany do hodnoty 0,5 g/l, což je přiměřená hodnota, a ani v extrémech se nejedná o hodnoty zcela nesmyslné. Níže se nachází rozložení reziduí.

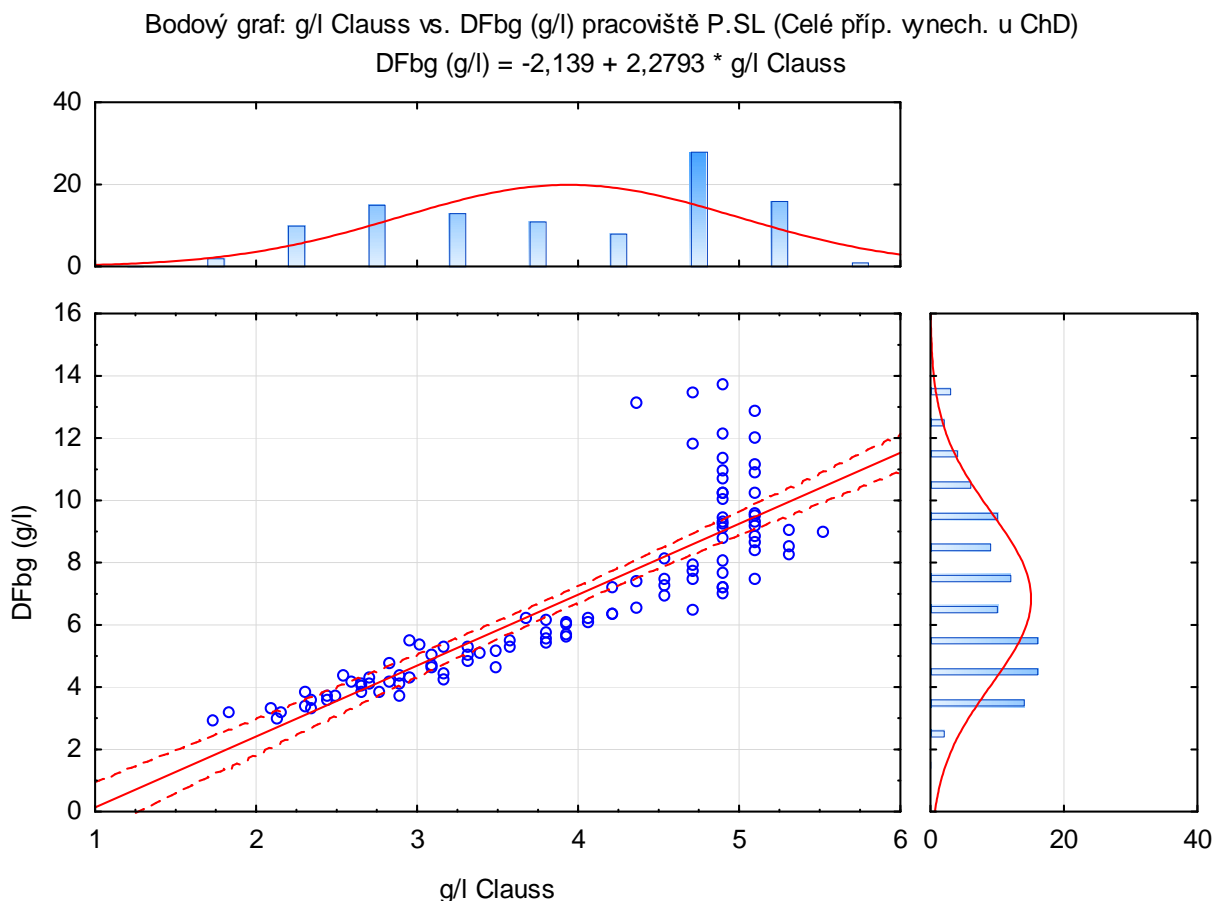


**Obrázek 49: Histogram reziduí derivovaného fibrinogenu a výpočtem z Claussových hodnot (A.FS)**

Obrázek 49 potvrzuje hodnoty tabulky výše a dává lepší představu o odchylkách predikovaných hodnot od naměřených. Většinu tvoří hodnoty od -0,5 do 0,5 g/l, jsou zřejmé větší extrémy do záporných hodnot, ale větší výskyt kladných reziduí. Z toho lze soudit, že derivovaný fibrinogen více převyšuje hodnoty Claussovy metody.

V případě pracoviště P.SL jsou některé výsledky derivovaného fibrinogenu vyšší než 10 g/l, nejvyšší naměřená hodnota je dokonce 13,68 g/l, zatímco na pracovišti A.FS byl nejvyšší naměřený derivovaný fibrinogen 10,52. Právě přibližně od koncentrace DFbg 9,5 g/l výsledky Claussovy metody dále nenarůstají v případě pracoviště P.SL, což u pracoviště A.FS nemůžeme vyloučit ani potvrdit. Spearmanova korelace pro pracoviště P.SL je logicky nižší, tedy 0,920741. Vzorec pro proloženou teoretickou linii vypadá takto.

$$\text{DFbg} = \text{Clauss}(\text{g/l}) * 2,2793 - 2,139 \quad (8)$$



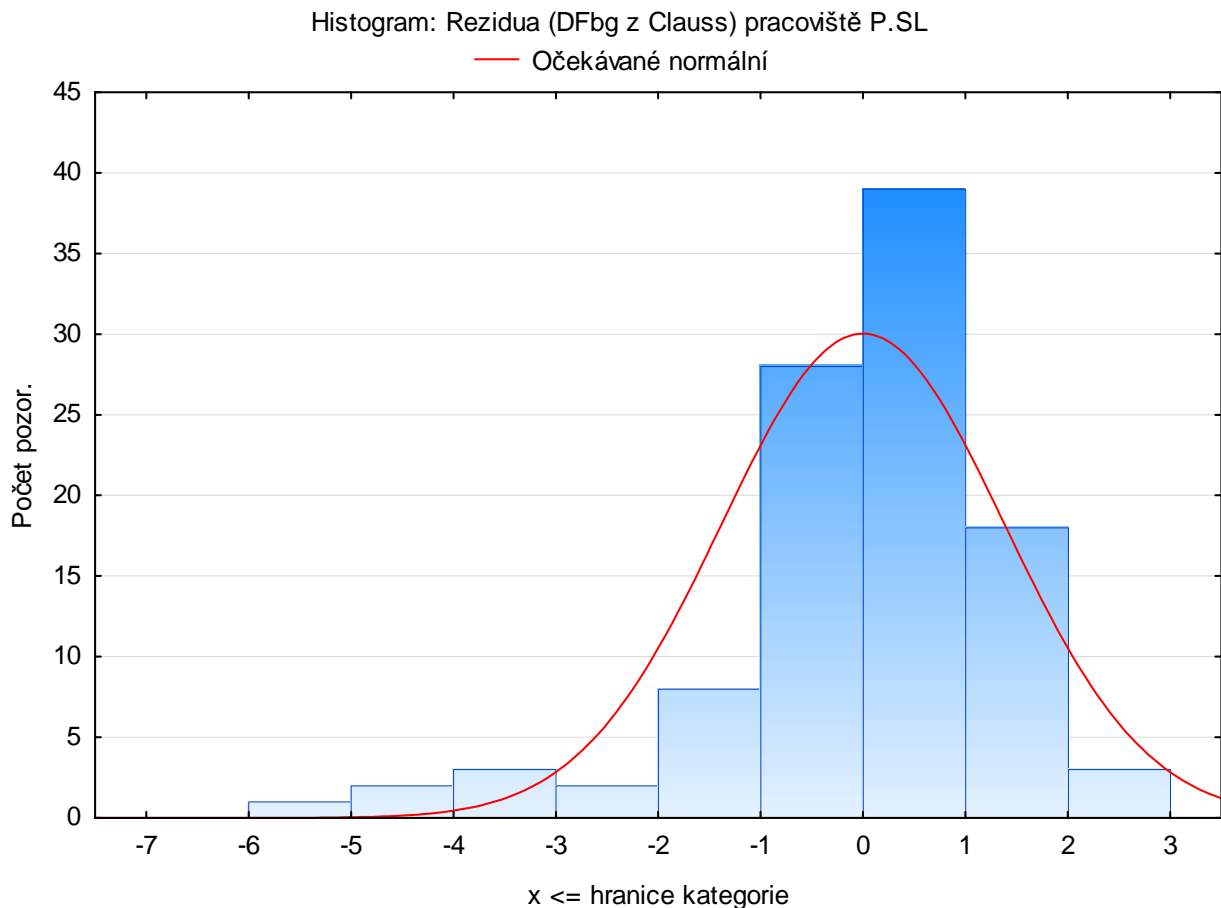
**Obrázek 50: Graf závislosti DFbg na Claussově metodě pro pracoviště P.SL**

Na výsledcích z pracoviště P.SL je zvláštní zastavení nárůstu koncentrace fibrinogenu Claussovou metodou a jeho maximální hodnota pouze 5,53 g/l. Nemůžeme zde zcela vyloučit chybu měření při ředění vzorků s vysokou koncentrací fibrinogenu. Je jasné, že vysoké hodnoty derivovaného fibrinogenu nebudou odpovídat hodnotám predikovaným rovnicí (8).

**Tabulka 13: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce přímky a rezidua (pracoviště A.FS)**

P.SL	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	6,8123	6,2200	2,8700	13,6800	4,3950	8,8900	2,7476
Predikovaný DFbg	6,8123	7,1375	1,8041	10,4653	4,6076	9,0293	2,3750
Rezidua	0,0000	0,2195	-5,3187	2,1263	-0,3683	0,8762	1,3816

Největší rozdíl 5,32 g/l je již neakceptovatelný (větší než fyziologický rozsah), což naznačuje, že v datech můžou být chybné výsledky.



**Obrázek 51: Histogram reziduí derivovaného fibrinogenu a výpočtem z Claussových hodnot (P.SL)**

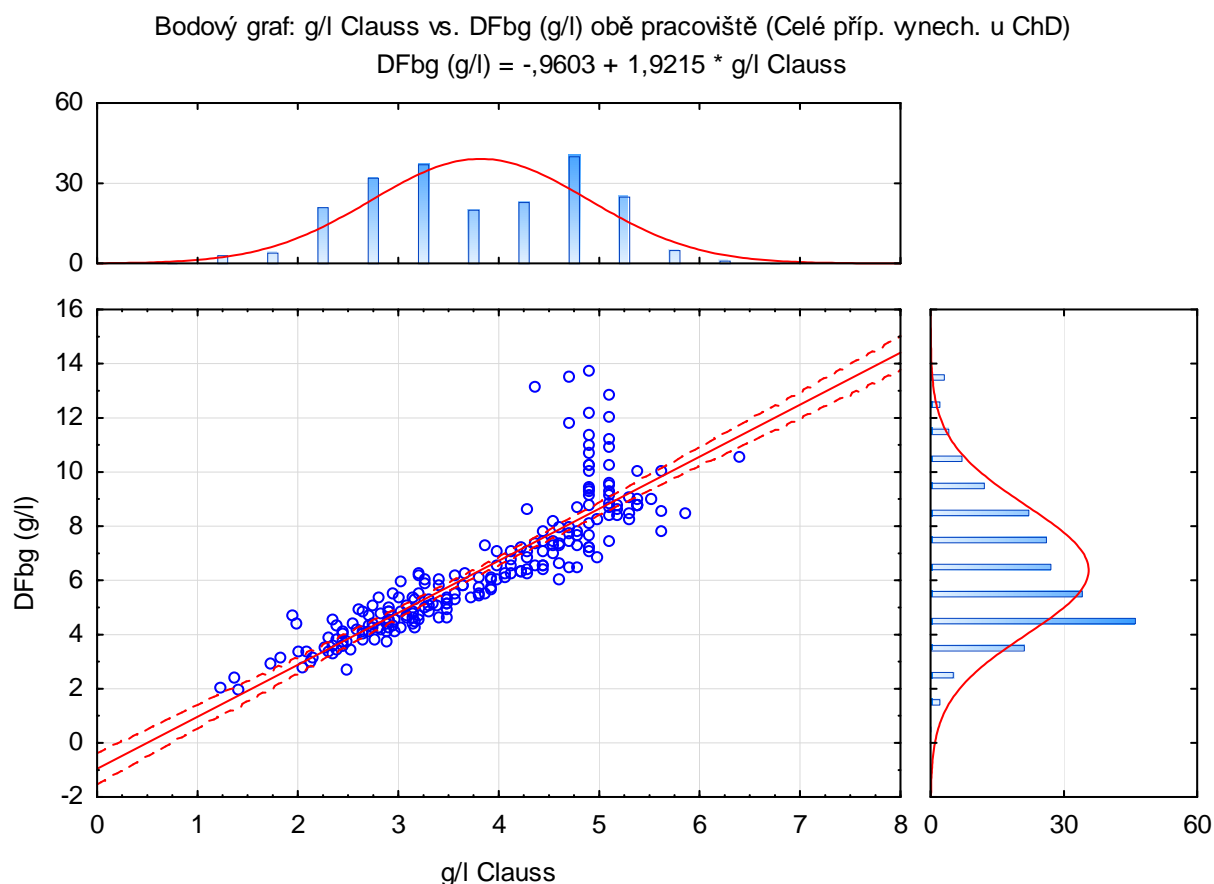
Také histogram rozložení reziduí na pracovišti P.SL potvrzuje velké rozdíly u části hodnot mezi naměřenou velikostí derivovaného fibrinogenu a predikovanou hodnotou danou vzorcem.

Sjednocené hodnoty tvarem grafu odpovídají grafu pracoviště P.SL, ovšem s hustší koncentrací bodů do hodnoty 9,5 g/l derivovaného fibrinogenu, což je obohacení grafu daty z pracoviště A.FS. Spearmanova korelace pro všechna data odpovídá hodnotě 0,938783.

$$\text{DFbg} = \text{Clauss}(\text{g/l}) * 1,9215 - 0,9603 \quad (9)$$

Rovnice pro lineární regresi podle předpokladů zapadá svými koeficienty mezi rovnice z jednotlivých pracovišť (7 a 8).





**Obrázek 52: Graf závislosti DFbg na Claussově metodě pro obě pracoviště**

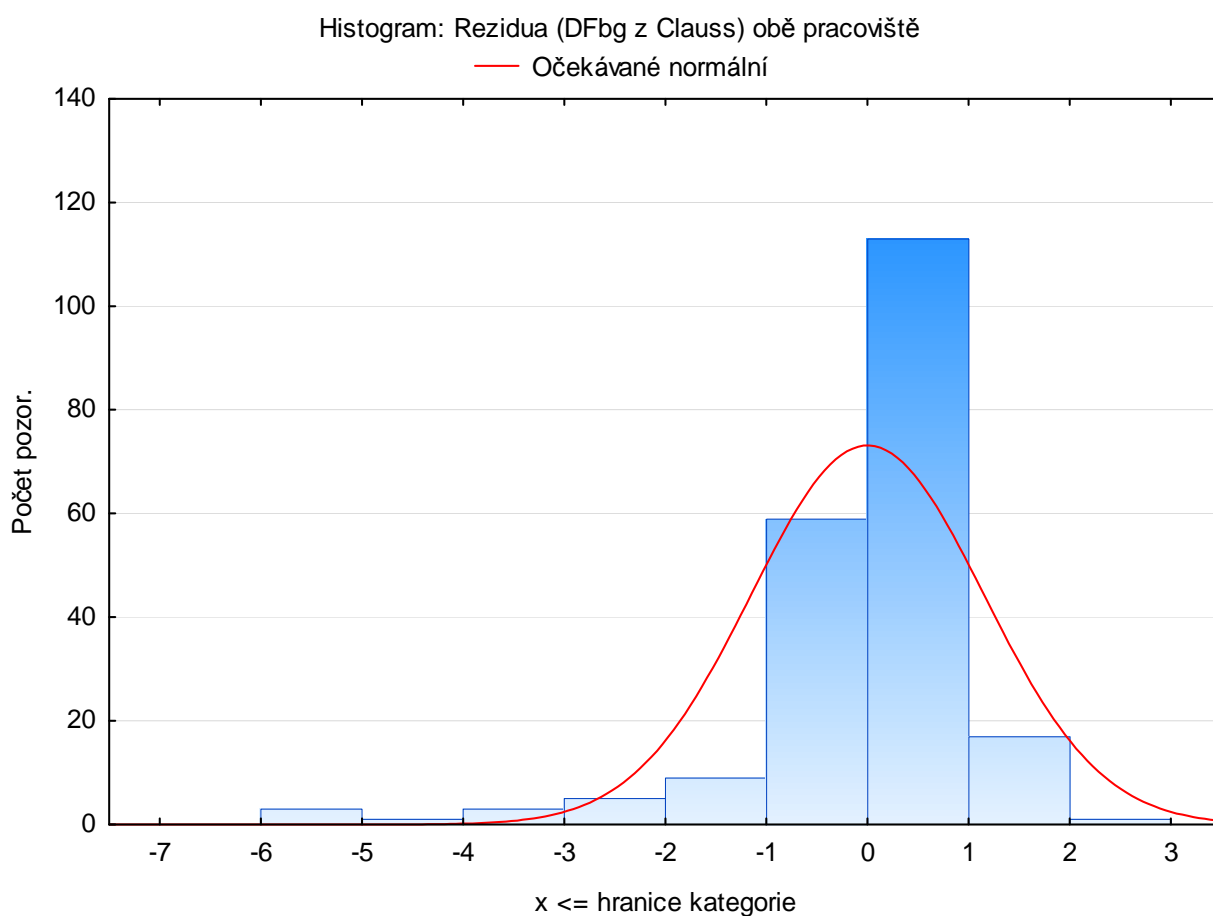
Díky vyšší hustotě dat v koncentracích pod 9,5 g/l DFbg a pod 5 g/l Claussovou metodou má teoretická linie vyšší strmost (rychleji stoupá). Na grafu je celkem dobře viditelné, že závislost jednotlivých proměnných se zdá lineární (v určitém širokém pásmu) až po zlomový bod, přibližně 9,5 g/l derivovaného fibrinogenu a 5,5 g/l koncentrace stanovené Claussovou metodou. V tabulce 14 jsou popisné výsledky pro derivovaný fibrinogen z obou pracovišť.

**Tabulka 14: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce přímky a rezidua (obě pracoviště)**

Vše	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	6,3374	5,9800	1,9500	13,6800	4,5400	7,8000	2,3675
Predikovaný DFbg	6,3374	6,3416	1,4224	11,3376	4,6506	8,2439	2,0688
Rezidua	0,0000	0,2281	-5,7031	2,0388	-0,3394	0,6404	1,1511

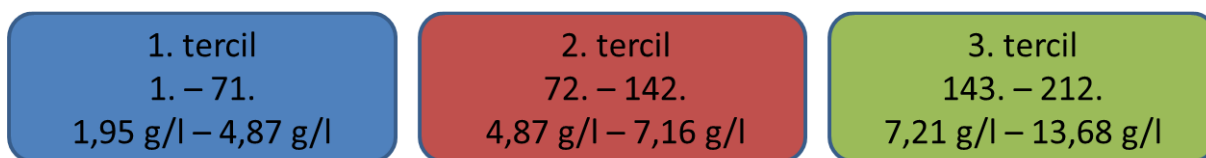
Podle tabulky 14 je jasné, že minimální a maximální odchylka (reziduum) od přímky popsané rovnicí 9 je ovlivněna daty z pracoviště P.SL (hodnoty nejsou totožné jako v tabulce 13 z důvodu jiného sklonu přímk 8 a 9). Taktěž histogram reziduí (obrázek 53)

je tvarově podobný histogramu pracoviště P.SL (52), pouze je výrazně zvýšen výskyt reziduí s hodnotami od -1 do 1 (přičtení dat z pracoviště A.FS).



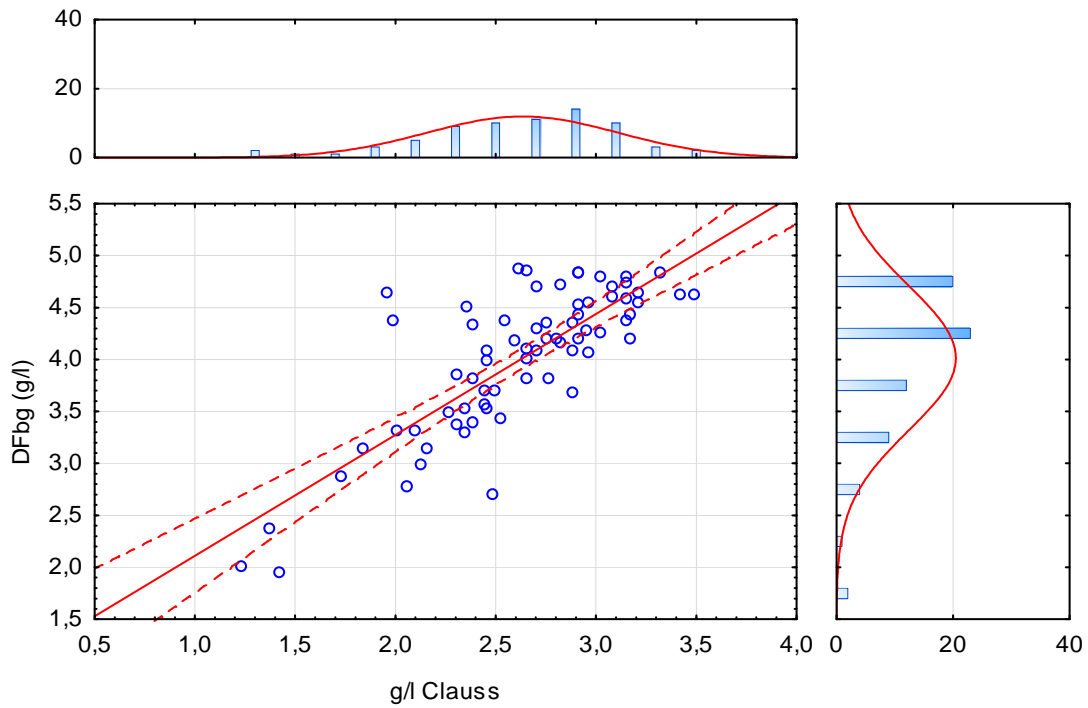
**Obrázek 53: Histogram reziduí derivovaného fibrinogenu a výpočtem z Claussových hodnot (A.FS)**

Podle grafu závislosti derivovaného fibrinogenu na Claussových výsledcích (obrázek 52) bychom teoretické linii nejlépe snížili strmost v první části a poté by mohla rovnoběžná s osou y. Pokusíme se tedy klíčový parametr (derivovaný fibrinogen) rozdělit na tercily a najít závislost s Claussovou metodou. Data seřadíme podle velikosti derivovaného fibrinogenu a rozdělíme je ve dvou bodech na třetiny. Máme 212 pacientů, což nelze rozdělit na 3 stejné díly, budeme mít pacienty rozděleny na dvě skupiny po 71 a jednu se 70 vzorky.



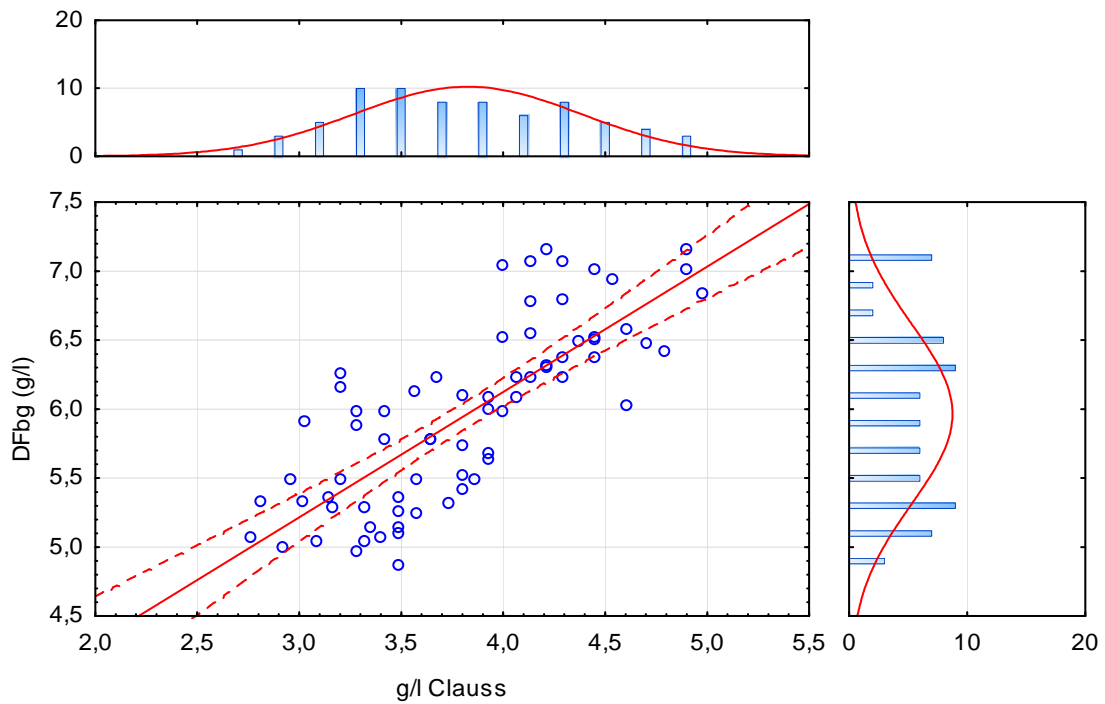
**Obrázek 54: Rozdělení na tercily podle hodnot derivovaného fibrinogenu**

Bodový graf: g/l Clauss vs. DFbg (g/l) (Celé příp. vnech. u ChD) 1. tercil  
 $DFbg (g/l) = ,94883 + 1,1637 * g/l Clauss$

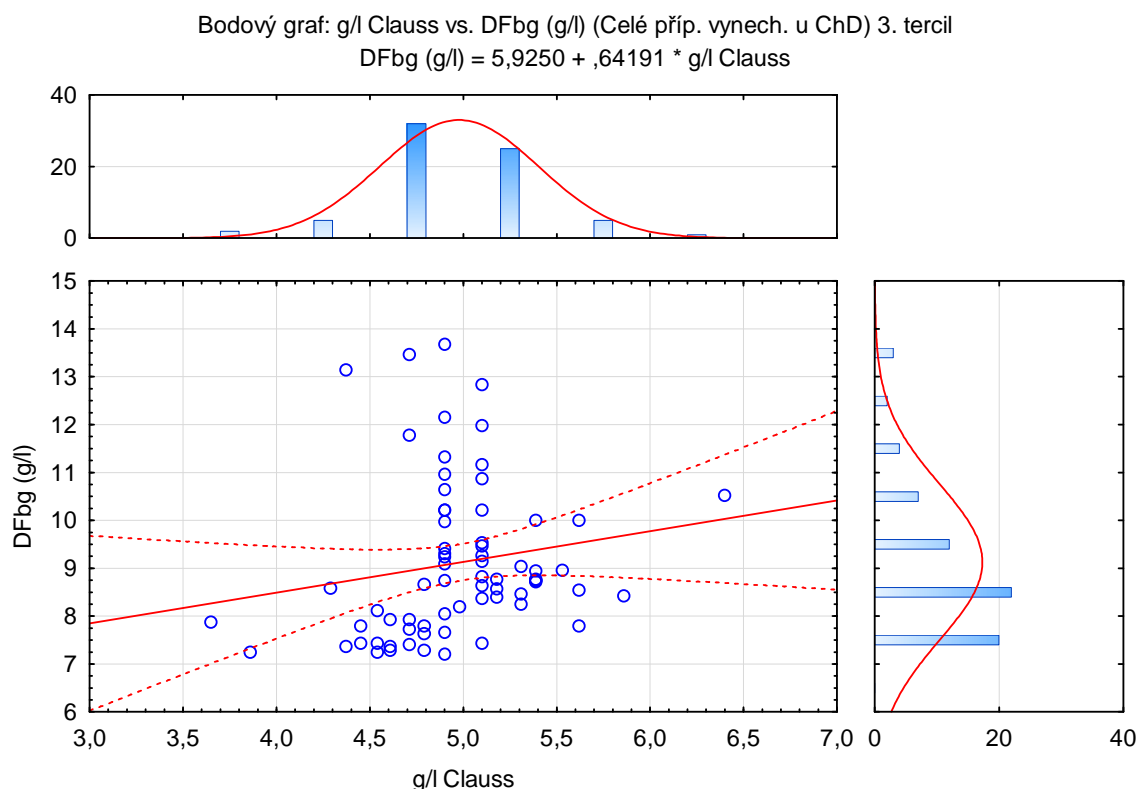


**Obrázek 55: 1. tercil Clauss x DFbg obě pracoviště**

Bodový graf: g/l Clauss vs. DFbg (g/l) (Celé příp. vnech. u ChD) 2. tercil  
 $DFbg (g/l) = 2,4928 + ,90780 * g/l Clauss$



**Obrázek 56: 2. tercil Clauss x DFbg obě pracoviště**



**Obrázek 57: 3. tercil Clauss x DFbg obě pracoviště**

Pro prvních 71 pacientů s rozsahem hodnot derivovaného fibrinogenu od 1,95 g/l do 4,87 g/l odpovídá Spearmanova korelace s Claussovými výsledky hodnotě 0,715876. Druhý tercil dosahoval hodnot derivovaného fibrinogenu mezi 4,87 g/l a 7,16 g/l a Spearmanův korelační koeficient se rovná 0,789227. Shrnutí představuje tabulka 15 Spearmanových korelací pro jednotlivé tercily a rovnice přímek v jednotlivých tercilech.

**Tabulka 15: Spearmanovy korelace při rozdělení klíčového parametru (obě pracoviště)**

Spearmanovy korelace	DFbg (g/l)		
	1. tercil	2. tercil	3. tercil
Clauss (g/l)	0,715876	0,789227	0,326659

$$DFbg = Clauss(g/l) * 1,1637 + 0,9488 \quad (10)$$

$$DFbg = Clauss(g/l) * 0,9078 + 2,4928 \quad (11)$$

$$DFbg = Clauss(g/l) * 0,6419 + 5,9250 \quad (12)$$

Rovnice 10 11 12 odpovídají 1. 2. a 3. tercilu. Výpočet predikovaných hodnot a jejich reziduí (tabulka 16) odpovídá předpokladům Spearmanových korelací z tabulky 15.

**Tabulka 16: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorců a jejich rezidua (obě pracoviště rozdělní na tercily)**

Vše		Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
1. tercil	DFbg (g/l)	4,0011	4,2000	1,9500	4,8700	3,5300	4,5400	0,6914
	Predikovaný DFbg	4,0011	4,0442	2,3918	5,0101	3,6951	4,3933	0,5520
	Rezidua	0,0000	0,0443	-1,4103	1,1564	-0,1756	0,2444	0,4163
2. tercil	DFbg (g/l)	5,9580	5,9800	4,8700	7,1600	5,3600	6,4700	0,6475
	Predikovaný DFbg	5,9580	5,9424	4,9983	7,0136	5,5339	6,3237	0,5030
	Rezidua	0,0000	0,0263	-0,9160	0,7910	-0,3001	0,3010	0,4077
3. tercil	DFbg (g/l)	9,1139	8,7400	7,2100	13,6800	7,8800	10,0000	1,6118
	Predikovaný DFbg	9,1139	9,0704	8,2680	10,0333	8,9484	9,2501	0,2717
	Rezidua	0,0000	0,4975	-4,6096	1,8604	-0,4867	1,0836	1,5887

Je zřejmé, že data korelují výrazně více v prvním a druhém tercilu než v posledním tercilu (nejvyšších naměřených hodnotách koncentrace fibrinogenu). Nejlépe koreluje druhý tercil a nejhůře tercil třetí, tomu odpovídají i hodnoty reziduí, které vykazují nejmenší odchylky od naměřených hodnot ve druhém tercilu. Jelikož si rovnice přímek nejsou příliš podobné, pokusíme se data rozdělit asimetricky, po hodnotu derivovaného fibrinogenu přibližně do 9,5 g/l. Tím bychom mohli získat důkaz o významu a přesnější závislosti derivovaného fibrinogenu na klasické Claussově metodě.

V případě zvoleného limitu získáváme 192 vzorků rozsahu derivovaného fibrinogenu 1,95 g/l až 9,46 g/l. V tomto případě dosahuje Spearmanův korelační koeficient hodnoty 0,946666, což je vyšší hodnota než u všech dat 0,938783. I prvotní pohled na graf dokazuje lineární regresi mezi proměnnými. Je patrné, že vyšší hodnoty se více vzdalují od teoretické linie. Rovnice přímky proložené těmito daty je následující.

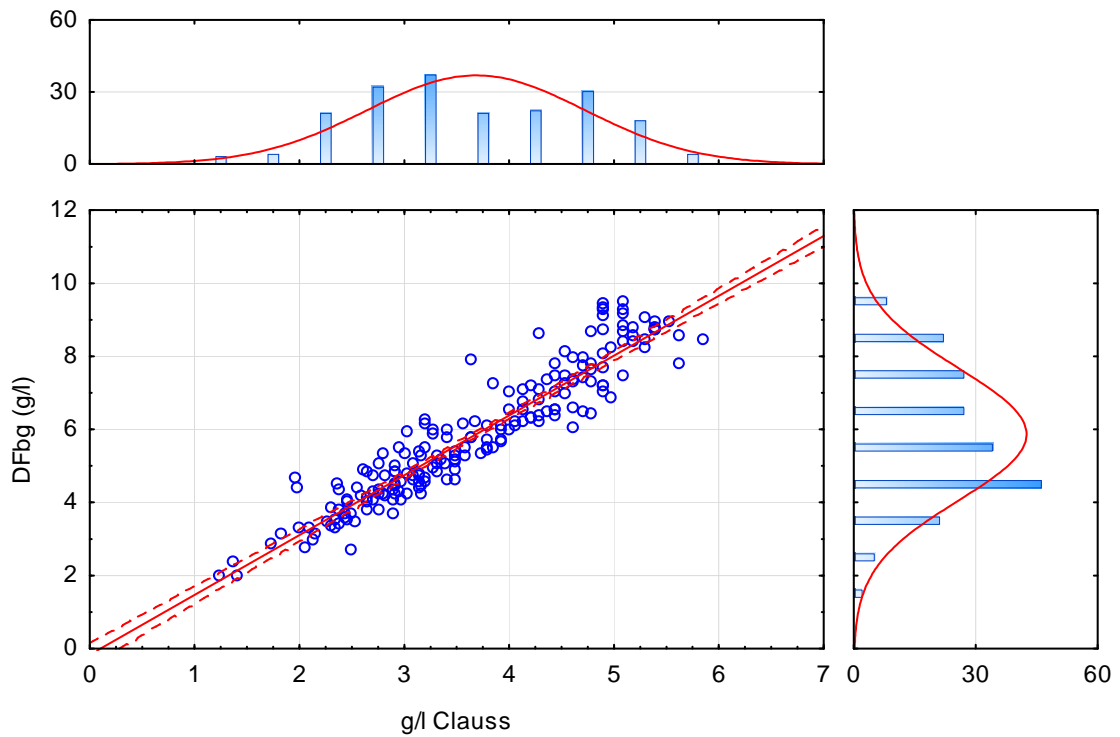
$$DFbg = \text{Clauss}(g/l) * 1,6365 - 0,1649 \quad (13)$$

Dále je tabulka naměřených hodnot, jejich ekvivalentech na proložené přímce a rezidua.

**Tabulka 17: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce a jejich rezidua (obě pracoviště, vybraný rozsah)**

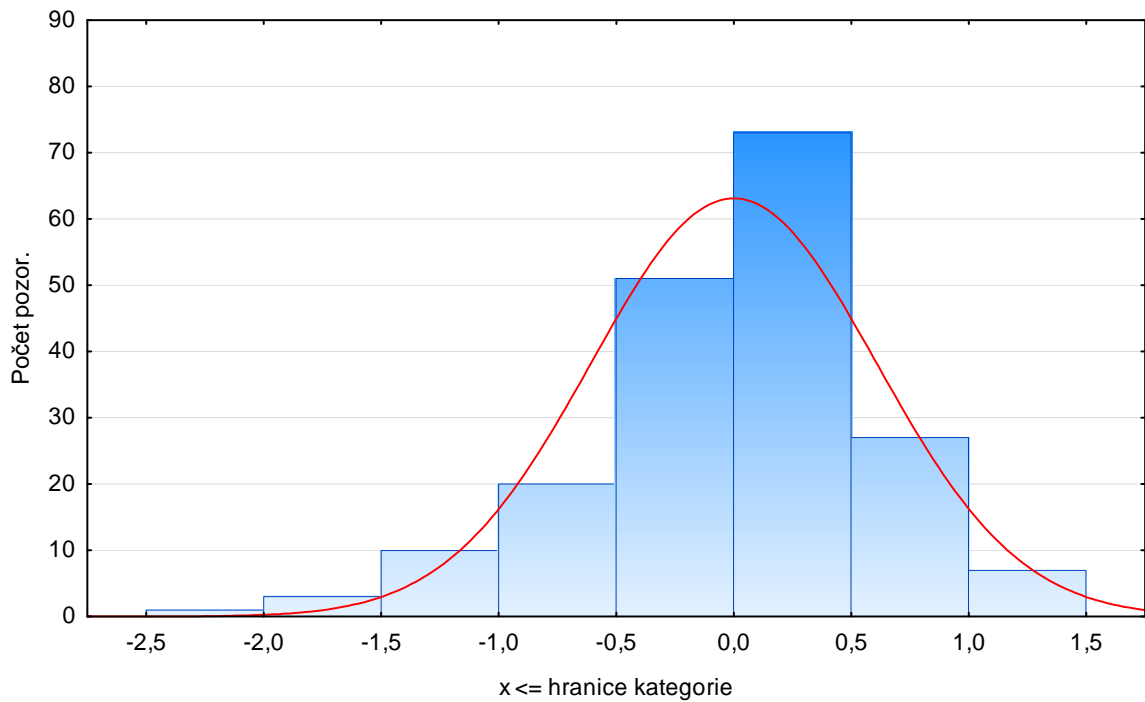
Vše	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	5,8354	5,5700	1,9500	9,4600	4,3950	7,2400	1,8031
Predikovaný DFbg	5,8354	5,5463	1,8643	9,4248	4,5645	7,3219	1,6979
Rezidua	0,0000	0,0791	-2,0718	1,3492	-0,3304	0,4113	0,6067

Bodový graf: g/l Clauss vs. DFbg (g/l) (Celé příp. vnech. u ChD) max DFbg 9,46 g/l  
 $DFbg (g/l) = -0,1649 + 1,6365 * g/l Clauss$



**Obrázek 58: Graf závislosti DFbg na Claussově metodě pro obě pracoviště, omezený rozsah**

Histogram: Rezidua obě pracoviště, omezený rozsah  
 — Očekávané normální



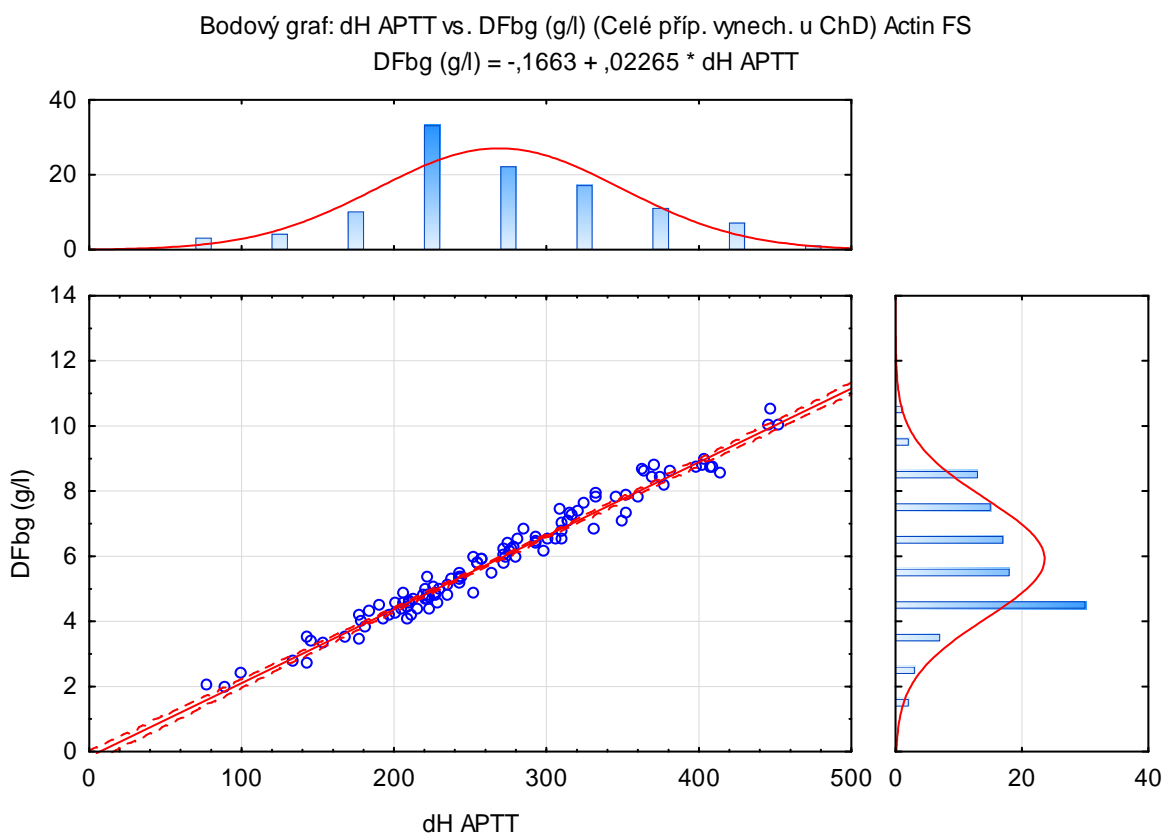
**Obrázek 59: Histogram reziduí derivovaného fibrinogenu a výpočtem z Claussových hodnot (obě pracoviště, omezený rozsah)**

Lze předpokládat, že hodnota derivovaného fibrinogenu má vypovídající hodnotu minimálně v nižších koncentracích, pouze fyziologická norma koncentrace je posunuta přibližně od 2,5 g/l do 7 g/l. Tato hodnota by mohla sloužit jako kontrolní číslo pro standardní test Claussovou metodou. Tedy v případě, že jeden test bude mít fyziologickou hodnotu a druhý ne, je pravděpodobné, že se někde stala chyba a výsledky nejsou důvěryhodné.

#### 6.4. Závislost derivovaného fibrinogenu na dH APTT

Derivovaný fibrinogen je odečítán z dH hodnoty PT testu. Je však pravděpodobné, že nalezneme korelaci také u testu APTT. Ačkoliv jsou testy zaměřeny na vnější a vnitřní cestu aktivace hemokoagulace, jedná se stále o stejnou krev se stejným obsahem fibrinogenu. K dispozici máme výsledky za pomoci reagentů Pathromtin SL (pracoviště P.SL) a Actin FS (pracoviště A.FS).

Po vložení dat do grafu závislosti derivovaného fibrinogenu vůči dH hodnoty APTT testu pomocí Actinu FS získáme téměř lineární závislost. Vzdálenosti bodů od teoretické hlavní linie nejsou velké. Hodnota Spearmanovy korelace je rovna 0,985949, což svědčí o pravděpodobné závislosti mezi proměnnými.



Obrázek 60: Graf závislosti DFbg na dH APTT s Actin FS

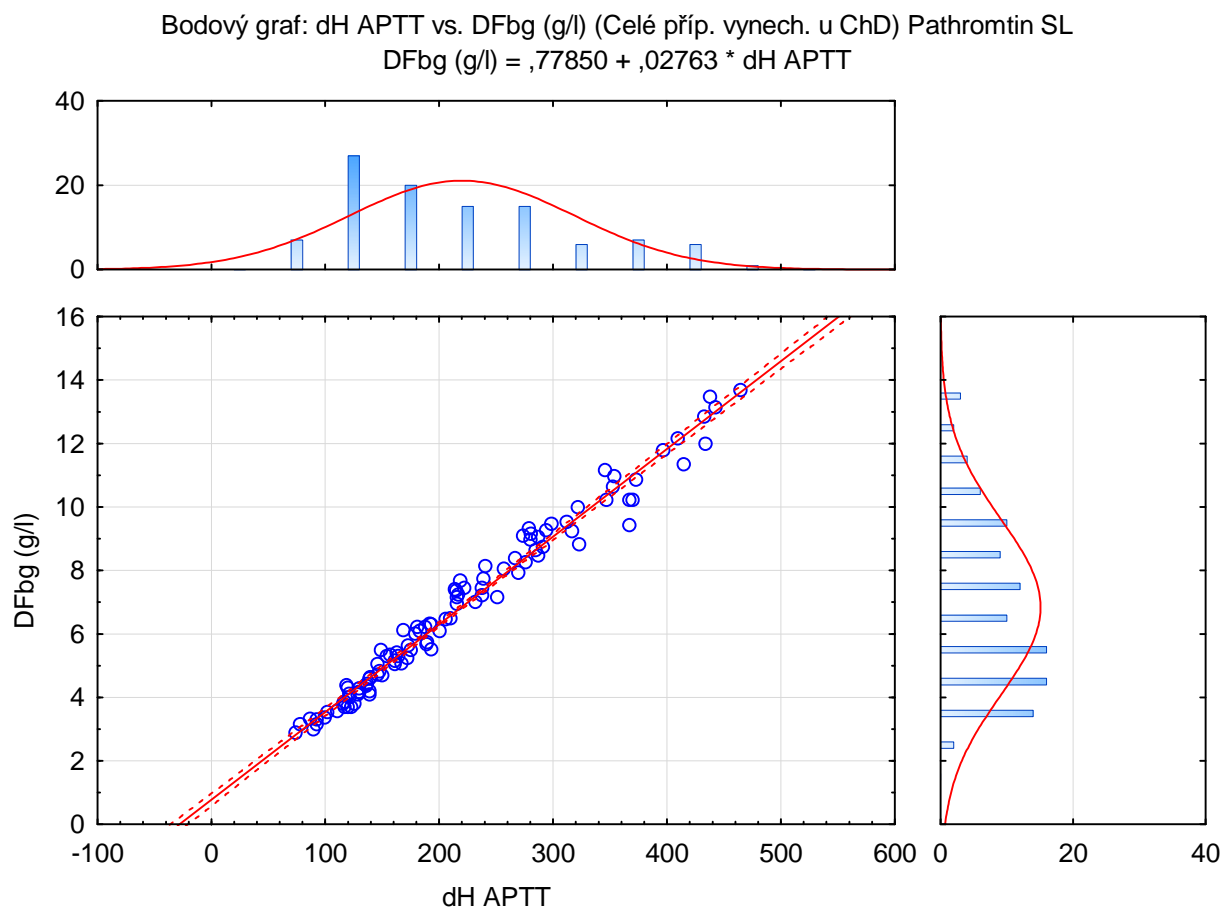
Rovnice přímky a tabulka s predikovanými hodnotami a rezidui je uvedena níže.

$$DFbg = dH APTT * 0,0226 - 0,1693 \quad (14)$$

**Tabulka 18: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce a jejich rezidua (DFbg z APTT Actin FS)**

Vše	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	5,8944	5,7800	1,9500	10,5200	4,5550	7,1500	1,8271
Predikovaný DFbg	5,8944	5,6421	1,6000	10,0919	4,6457	7,0008	1,8029
Rezidua	0,0000	0,0033	-0,6162	0,6994	-0,2041	0,1715	0,2962

Vidíme, že extrémní rezidua se vejdu do rozsahu  $\pm 0,7$  g/l derivovaného fibrinogenu, což se dá považovat za krajně přípustnou hodnotu.



**Obrázek 61: Graf závislosti DFbg na dH APTT s Pathromtin SL**



Situace u APTT testu pomocí Pathromtinu SL je velmi podobná. Data se drží lineární závislosti, ale je zde patrné, že vyšší hodnoty mají větší odklon od teoretické linie než koncentrace derivovaného fibrinogenu do hodnoty přibližně 9 g/l. Spearmanův korelační koeficient je zde 0,990010. Tedy derivovaný fibrinogen koreluje více s dH APTT za použití reagentie Pathromtin SL než u reagentie Acitn FS, i když rozdíl je minimální. Rovnice přímky proložené mezi závislost derivovaného fibrinogenu a dH APTT za pomocí Pathromtinu SL je zde.

$$DFbg = dH APTT * 0,0276 + 0,7785 \quad (15)$$

**Tabulka 19: Porovnání naměřených hodnot s hodnotami podle vzorce a jejich rezidua (DFbg z APTT Pathromtin SL)**

Vše	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
DFbg (g/l)	6,8123	6,2200	2,8700	13,6800	4,3950	8,8900	2,7476
Predikovaný DFbg	6,8123	6,0978	2,8233	13,6278	4,6195	8,5986	2,7172
Rezidua	-0,0079	0,0221	-0,8299	1,5098	-0,2465	0,2208	0,4136

Obě přímky mají velmi podobný směr, jen jsou vzájemně posunuté. U pracoviště P.SL nacházíme větší extrémny rezidua než u pracoviště A.FS. Korelace obou reagentií jsou poměrně vysoké a hodnoty rezidua naopak nevykazují velké odchylky, což nás přivádí na myšlenku závislosti koncentrace fibrinogenu a hodnotou dH APTT testu obecně. Spearmanovy korelační koeficienty pro jednotlivé reagentie a pro všechny výsledky jsou uvedeny v tabulce.

**Tabulka 20: Spearmanovy korelace DFbg a dH APTT**

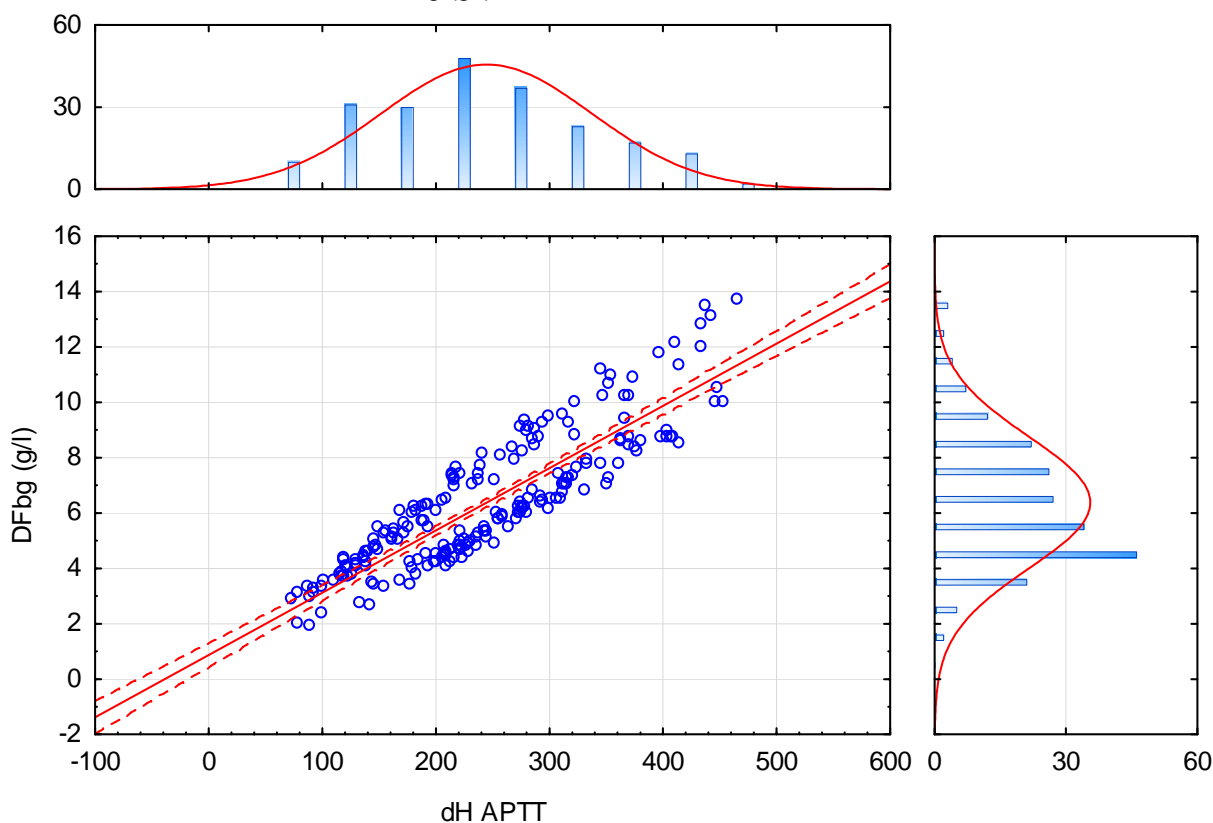
Spearmanovy korelace	dH APTT		
	Actin FS	Pathromtin SL	Vše
DFbg	0,98594864	0,990010323	0,878753862

Na společném grafu je zřetelný rozdíl v závislostech mezi jednotlivými reagentiemi. Všechny hodnoty pod teoretickou linií patří pracovišti A.FS, tedy změřeny na Actinu FS, zatímco všechny hodnoty nad teoretickou linií jsou z pracoviště P.SL, tedy naměřeny za použití Pathromtinu SL. Z toho je zřejmé, proč jsou jednotlivé Spearmanovy korelace vysoké a koeficient pro sjednocená data je relativně nízký. Nemůžeme tedy zcela univerzálně určit závislost derivovaného fibrinogenu na dh hodnotách APTT, ale můžeme tuto závislost určit vůči jednotlivým reagentiím zvlášť. Vzorec a následný výpočet rezidua

není nutné vyjadřovat, protože výpočet derivovaného fibrinogenu by byl vždy nižší s Pathromtinem SL a nebo vyšší při měření s Actinem FS.

Bodový graf: dH APTT vs. DFbg (g/l) (Celé příp. vynech. u ChD) obě pracoviště

$$DFbg (g/l) = ,86840 + ,02251 * dH APTT$$



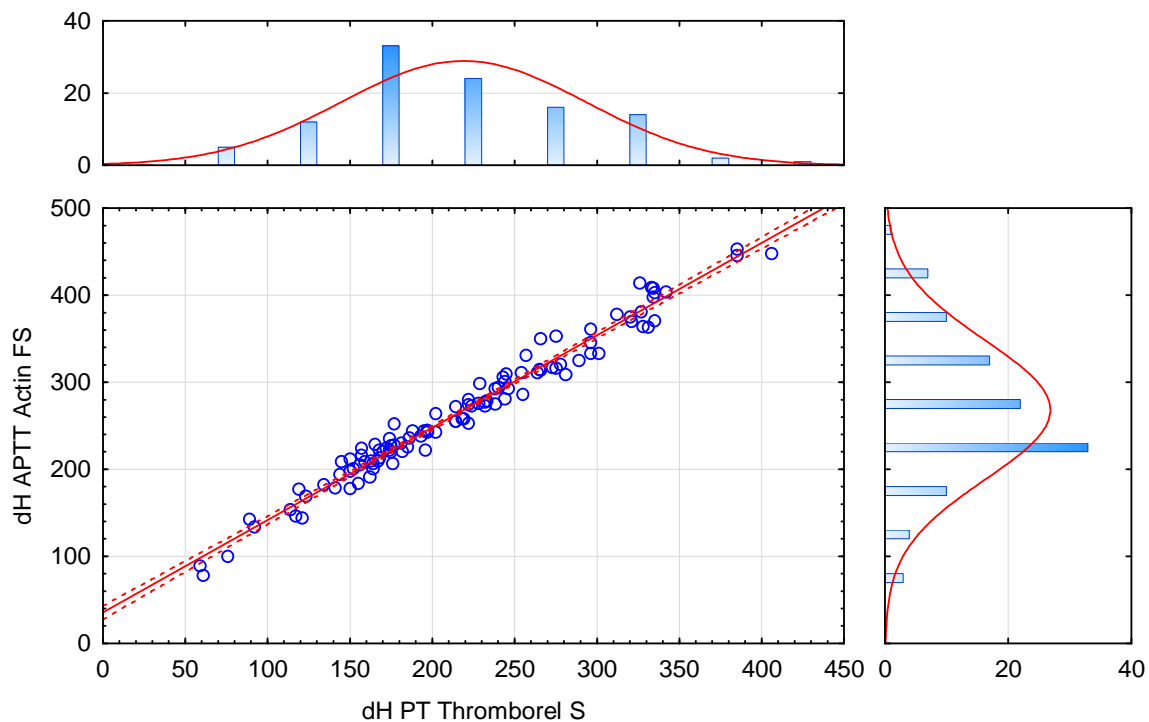
Obrázek 62: Graf závislosti DFbg na dH APTT

Lze předpokládat, že pokud jsme našli závislost mezi dH APTT a derivovaným fibrinogenem, bude nalezena závislost i mezi testy PT a APTT. Pokusíme se tedy zobrazit tuto závislost a porovnáme obě reagenie pro APTT s Thromborelem S používaným pro Quickův test. APTT s Actinem FS má vůči PT testu hodnotu Spearmanova korelačního koeficientu 0,985659 a v případě APTT s Pathromtinem SL je koeficient 0,990000.

Tabulka 21: Spearmanovy korelace mezi APTT a PT

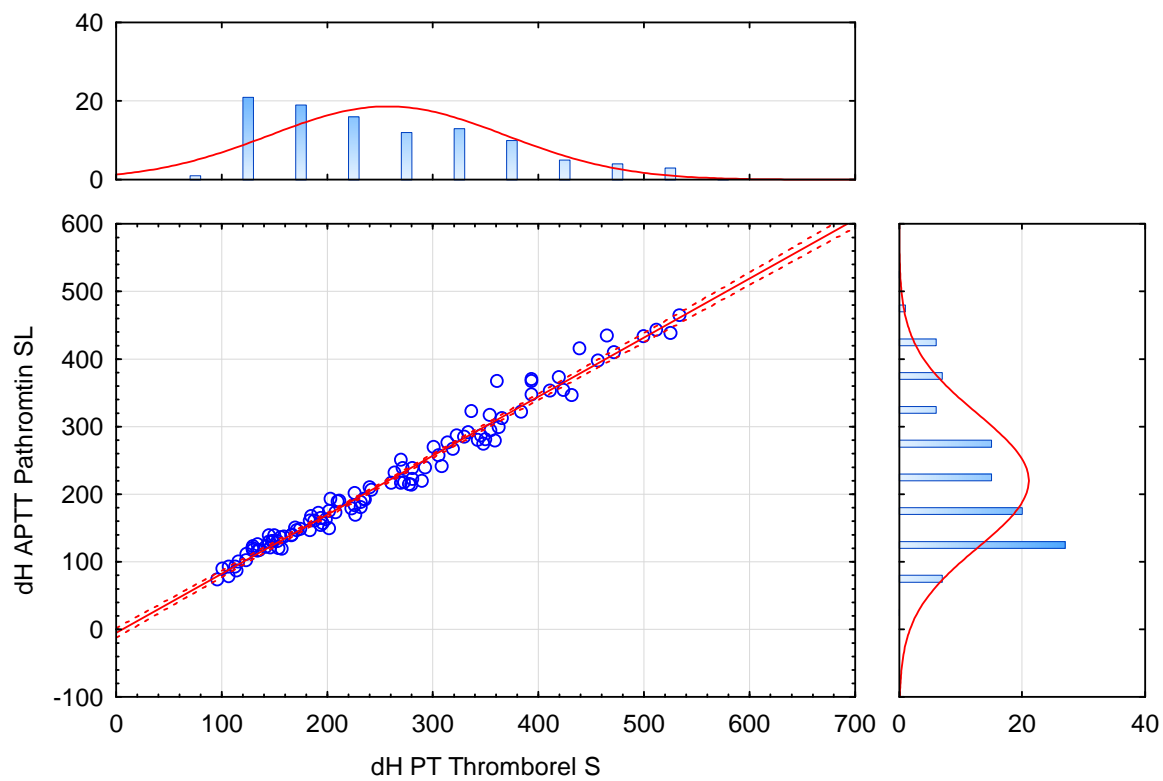
Spearmanovy korelace	dH APTT	
	Actin FS	Pathromtin SL
dH PT Thromborel S	0,985659	0,990000

Bodový graf: dH PT vs. dH APTT (Celé příp. vynech. u ChD) Pracoviště A.FS  
 $dH\ APTT = 35,452 + 1,0618 * dH\ PT$



**Obrázek 63: Graf závislosti dH PT na dH APTT Actin FS**

Bodový graf: dH PT vs. dH APTT (Celé příp. vynech. u ChD) pracoviště P.SL  
 $dH\ APTT = -5,148 + ,87362 * dH\ PT$



**Obrázek 64: Graf závislosti dH PT na dH APTT Actin FS**

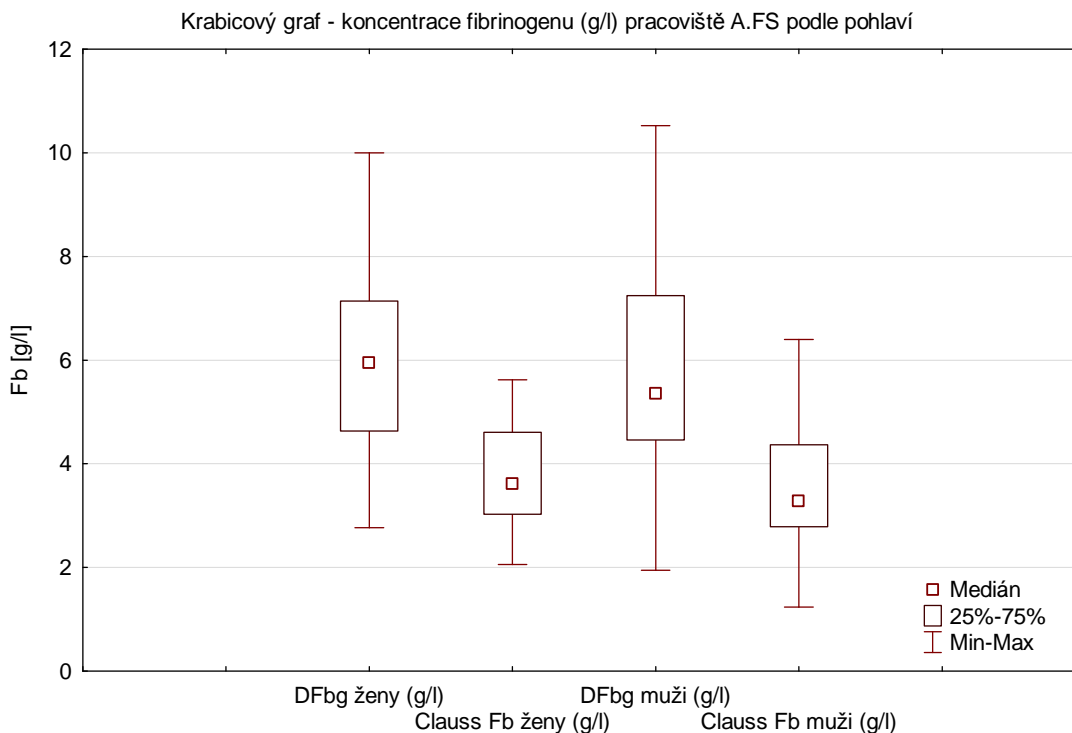
Je zřetelné (podle předpokladu), že korelace jsou téměř totožné s korelacemi mezi APTT a derivovaným fibrinogenem, taktéž grafy mají výraznou podobnost. Test predikovaných hodnot a reziduí je odpovídající APTT testům vůči derivovaného fibrinogenu, samozřejmě hodnoty nejsou stejné, protože se jedná o jinou jednotku a jsou prohozeny osy grafu (PT odpovídající derivovanému fibrinogenu je na obrázcích 62 a 63 jako osa x).

Tabulka 22: Porovnání hodnot výpočtů APTT z PT hodnot

APTT z PT		Průměr	Medián	Minimum	Maximum	25,000. (kvantil)	75,000. (kvantil)	Sm.Odch.
P.SL	dH APTT	218,3558	192,5000	74,0000	465,0000	139,0000	283,0000	98,3313
	Predikovaný APTT	218,3558	197,5317	78,7194	461,3649	132,8838	291,8827	97,2375
	Rezidua	-0,5407	-1,3381	-56,7713	29,4814	-7,4732	9,5317	15,5742
A.FS	dH APTT	267,6389	256,5000	78,0000	453,0000	212,5000	316,5000	79,6167
	Predikovaný APTT	267,6389	263,3566	98,5621	467,4891	210,7287	318,6425	78,2350
	Rezidua	0,0000	0,6354	-73,6956	25,5903	-7,6940	9,3456	14,7681

## 6.5. Porovnání koncentrace fibrinogenu v závislosti na pohlaví

Z pracoviště A.FS máme navíc informaci o tom, zda konkrétní pacient byl muž a nebo žena. Můžeme si proto porovnat koncentrace fibrinogenu mezi pohlavími a zároveň zjistit, zda je výpočet derivovaného fibrinogenu ovlivněn pohlavím.



Obrázek 65: Krabicový graf koncentrací fibrinogenu rozdělný podle pohlaví a metody

Na první pohled lze říct, že u mužů se vyskytují extrémnější hodnoty koncentrací fibrinogenu než u žen. Ženy se prakticky nedostávají pod dolní fyziologickou mez a jejich střední hodnoty jsou posunuty výše než u mužů. Obě pohlaví však v rozsahu koncentrací 25 % - 75 % zapadají do fyziologických hodnot.

**Tabulka 23: Spearmanovy korelace koncentrací fibrinogenu, muži**

<b>Spearmanovy korelace muži</b>	DFbg muži (g/l)	Clauss Fb muži (g/l)
DFbg muži (g/l)	1,000000	<b>0,943147</b>
Clauss Fb muži (g/l)	<b>0,943147</b>	1,000000

**Tabulka 24: Spearmanovy korelace koncentrací fibrinogenu, ženy**

<b>Spearmanovy korelace ženy</b>	DFbg ženy (g/l)	Clauss Fb ženy (g/l)
DFbg ženy (g/l)	1,000000	<b>0,925741</b>
Clauss Fb ženy (g/l)	<b>0,925741</b>	1,000000

Červeně označené hodnoty jsou statisticky významné a také jediné, které nás zde zajímají. Korelace u mužů je lehce vyšší než korelace u žen. Celkový korelační koeficient je mezi hodnotami mužů a žen, tedy 0,932133. Není zcela ve středu, protože žen je v testovací skupině více (56 žen a 52 mužů). Pohlaví nehraje roli ve výpočtu derivovaného fibrinogenu.

## 6.6. Zhodnocení výsledků.

Jednoduchý a prvotní přehled o závislostech mezi daty udávající grafy korelací všech proměnných pro jednotlivá pracoviště a sjednocená data obrázků 41 spolu se Spearmanovými korelacemi pro tyto grafy v tabulkách 3 až 5 (kapitola 6.1.). Z těchto tabulek a grafů je na první pohled patrná závislost mezi derivovaným fibrinogenem a dH PT i APTT a Claussovou metodou a zároveň korelují proměnné mezi sebou. Krabicové grafy na obrázcích 42 až 44 tyto čtyři proměnné porovnávají při společné jednotce na ose y (pro koncentraci fibrinogenu je to g/l a pro hodnoty dH je to změna optické hustoty jako bezrozměrná veličina).

Zabýváme závislostí derivovaného fibrinogenu na hodnotách dh PT (kapitola 6.2.). Jelikož je derivovaný fibrinogen z této hodnoty odečítám, je zde korelace velmi vysoká. Obě nezávislá pracoviště používají stejný typ analyzátoru spolu se stejnou reagentií pro stanovení PT testu, můžeme vycházet z grafu sjednocených dat (obrázek 47) a odpovídající rovnice přímky (6).

Zhodnotíme-li nejzajímavější závislost derivovaného fibrinogenu na běžně používaném Claussově testu (6.3.), Spearmanova korelace není už logicky tak vysoká. I

tak přesahuje hodnotu 0,9, což můžeme považovat za důkaz závislosti mezi těmito hodnotami. Komplikace způsobily vyšší hodnoty koncentrace fibrinogenu u pracoviště P.SL, protože koncentrace fibrinogenu Claussovou metodou přibližně nad 4,5 g/l dále nenarůstala, zatímco derivovaný fibrinogen narůstal. Nelze s jistotou určit, která metoda je chybová. Může se jednat o problém s ředěním u Claussovy metody, anebo o nespolehlivost derivovaného fibrinogenu při vyšších koncentracích. Právě kvůli této komplikaci jsme se pokusili data rozdělit na třetiny a zhodnotit zvlášť, poté ještě asymetricky rozdělit po konkrétní hodnotu derivovaného fibrinogenu 9,46 g/l. Z toho nám vyšla závislost mezi těmito testy s vyšším Spearmanovým korelačním koeficientem. Jak již bylo řečeno, u koncentrací derivovaného fibrinogenu přibližně do 9,5 g/l je tento test spolehlivý, pouze je tato koncentrace posunuta vůči stanovení Claussovou metodou.

Potvrdili jsme, že i test APTT koreluje s derivovaným fibrinogenem (6.4.). Korelace je poměrně vysoká v případě obou používaných reagensů, avšak přímky lineární regrese nejsou totožné. Metoda derivovaného fibrinogenu by mohla být kontrolována pomocí výpočtu z APTT testu s jistou tolerancí (odhadem z vypočtených reziduí pro jednotlivé reagenty bych navrhol  $\pm 0,5$  g/l). Byla-li by tato tolerance překročena, měl by analyzátor upozornit na možnost nepřesnosti jednoho z testů PT nebo APTT společně s nespolehlivostí hodnoty derivovaného fibrinogenu.

Porovnání hodnot dH mezi APTT a PT nám udává pravidelný rozdíl. Hodnota dH pro APTT s Actinem FS je průměrně o 19,47 % vyšší než hodnota dH pro PT s Thromborelem S. Hodnota dH pro APTT s Pathromtinem SL je průměrně o 17,93 % nižší než hodnota dH pro PT s Thromborelem S. I pro tento rozdíl jsou přímky závislosti derivovaného fibrinogenu na APTT odlišné.

## Závěr

V krevní plazmě obsaženy glykoprotein fibrinogen je nezbytnou součástí procesu srážení krve. Znalost koncentrace fibrinogenu v krevní plazmě je jedním ze základních požadavků lékaře před invazním zákrokem, stejně tak při léčbě kardiovaskulárních nemocí. Společně s časy srážení vnější a vnitřní cesty koagulace (PT a APTT) patří koncentrace fibrinogenu mezi běžné testy v laboratořích.

Popis kaskády krevního srážení je velmi obsáhlý a složitý, navíc do dnes nejsou funkce všech součástí zcela jednoznačné. Snaha formulovat princip srážení krve co nejsrozumitelnější formou je obsažena v této diplomové práci, i přesto se nejedná o snadno pochopitelnou kapitolu. K tomu i výklady a zdroje nejsou vždy zcela jednotné, ale rozdíly bývají spíše v detailech.

Pro porozumění krevního srážení je vhodné mít přehled o krvi jako celku. Tato tělní tekutina má mnoho vlastností a funkcí popsanych ve spoustě prací a výzkumů. Alespoň základní součásti a vlastnosti krve jsou zahrnuty v této práci.

Jaké vlastnosti má proces krevního srážení u konkrétního pacienta zjišťují hemostatické testy. Největší vývoj těchto testů probíhal v průběhu 20. století, až postupně došlo k automatizaci pomocí analyzátorů. Hemostatické testy jsou rozděleny do tří logických kategorií (globální, skupinové a specifické).

Pomocí koagulometrů jsou v laboratořích měřeny testy krevního srážení. Základní vlastností je detekce koagula ve vzorku. Přítomnost sraženiny je možná určit elektromechanickou, nebo optickou cestou. Koagulometry Sysmex používají optickou metodu a měří intenzitu rozptýleného světla. Pro chromogenní a imunologické testy je měřena změna intenzity světla dané vlnové délky (absorbance) v přímém směru, z čehož jsou počítány koncentrace požadované látky.

Diplomová práce obsahuje popis ovládání přístroje Sysmex CA - 1500, pro představu o možnostech a funkcích přístupných obsluze analyzátoru. Myslím si, že základní ovládání přístroje by mělo být možné na bázi podkapitoly 4.4 spolu s nezbytnými znalostmi laboranta na hematologickém oddělení. Podrobný popis je uveden v návodu k přístroji, zde se jedná spíše o shrnutí a náhled na vlastní zkušenost. Koagulometr je zajímavý i z technického hlediska, proto je v práci obsažen také popis a funkce dílčích součástí analyzátoru. Jedná se o zjednodušený popis, který přesahuje rámec znalostí nutných pro obsluhu, ale mohl by sloužit jako prvotní seznámení před celkovým vyškolením technika, zajišťujícího servis a údržbu přístroje (školení na tento analyzátor trvá 4 dny).

Stanovení koncentrace fibrinogenu je běžně zjišťováno pomocí Claussovy metody. Koncentrace fibrinogenu v plazmě je však také závislá na hodnotách změny optické hustoty reakční směsi (dH) provázející vznik koagula. Jinými slovy lze koncentraci

vypočítat z dH hodnot pro PT (Quickův) test. Tento výsledek je nazýván derivovaný (odečtený) fibrinogen. Koncentraci fibrinogenu metodou derivovaného fibrinogenu jsme statisticky porovnávali s dalšími výsledky. Zjišťujeme korelaci mezi čtyřmi zkoumanými proměnnými (dH APTT dH PT, DFbg a Claussovou metodou). Je zřejmé, že derivovaný fibrinogen nedává stejné výsledky jako Claussova metoda, dá se ale konstatovat, že závislost mezi těmito proměnnými je lineární do hraniční hodnoty 9,5 g/l derivovaného fibrinogenu. Proto můžeme brát derivovaný fibrinogen jako orientační hodnotu koncentrace fibrinogenu v krevní plazmě. Závislost na PT testu je zřejmá, protože derivovaný fibrinogen je z této hodnoty odečítán. Korelaci s APTT testem jsme také dokázali, a můžeme jej použít pro orientační stanovení koncentrace fibrinogenu v plazmě.

V praxi lze tedy hodnotu derivovaného fibrinogenu použít pro orientační stanovení koncentrace fibrinogenu v plazmě. Dále pak lze odhadnout stav vzorku. Pokud je hodnota dH snížena a zároveň je koncentrace fibrinogenu nízká (Claussovou metodou), může se jednat kromě poruchy u pacienta také o sraženinu ve vzorku. Pokud je dH hodnota snižená a Claussova metoda udává normální hodnotu koncentrace, může se jednat o lipemický vzorek. Navíc, pokud hodnoty dH u PT a APTT společně nekorelují, lze předpokládat technický problém na přístroji.

Derivovaný fibrinogen nedává totožné výsledky jako Claussova metoda, ale je důkazem, že existuje závislost mezi změnou optické hustoty vzorku při vzniku koagula a koncentrací fibrinogenu v plazmě. Zároveň může sloužit jako spolehlivý kontrolní ukazatel správnosti testů a funkčnosti analyzátoru.



## Seznam literatury

- [1] AERTS E., FLIEDNER M., REDMOND K., WALTON A. *Defining the scope of haematology nursing practice in Europe*, European Journal of Oncology Nursing, Volume 14, Issue 1, February 2010, Pages 55-60, ISSN 1462-3889
- [2] ANDERSON P. H., TURNER A. G., MORRIS H. A. *Vitamin D actions to regulate calcium and skeletal homeostasis*, Clinical Biochemistry, Volume 45, Issue 12, August 2012, Pages 880-886, ISSN 0009-9120
- [3] ASARIAN L., GLOY V., GEARY N. *Homeostasis*, In: Editor-in-Chief: V.S. Ramachandran, Editor(s)-in-Chief, Encyclopedia of Human Behavior (Second Edition), Academic Press, San Diego, 2012, Pages 324-333, ISBN 9780080961804
- [4] BARTH, C.A., ROMPEL, R. *Positive Rumpel-Leede-test as an extralésional sign of generalised vascular permeability in purpura pigmentosa progressiva (Schamberg disease) [Positiver Rumpel-Leede-test als extralésionales Zeichen einer generalisierten Gefäßdurchlässigkeit bei purpura pigmentosa progressiva (Morbus Schamberg)]* (1999) Aktuelle Dermatologie, 25 (4), pp. 102-105.
- [5] CIENCALOVÁ BENEŠOVÁ, Zuzana. NEMOCNICE TŘINEC. *Základní koagulační vyšetření a jejich interpretace*. 2012.
- [6] DOOLITTLE R. F. *Structural basis of the fibrinogen–fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography*, Blood Reviews, Volume 17, Issue 1, March 2003, Pages 33-41, ISSN 0268-960X
- [7] ERNST E. *The role of fibrinogen as a cardiovascular risk factor*, Atherosclerosis, Volume 100, Issue 1, April 1993, Pages 1-12, ISSN 0021-9150
- [8] FACULTAS MEDIKA HRADEC KRALOVE. *Hemostáza*. 2006.
- [9] FACULTAS MEDIKA HRADEC KRALOVE. *Koagulační metody*. 2006.
- [10] FURLAN M., FELIX R., ESCHER N., LÄMMLER B. *How high is the true fibrinogen content of fibrinogen standards?*, Thrombosis Research, Volume 56, Issue 5, 1 December 1989, Pages 583-592, ISSN 0049-3848
- [11] HARVEY J. W. *Chapter 7 - Evaluation of Hemostasis: Coagulation and Platelet Disorders*, Veterinary Hematology, W.B. Saunders, Saint Louis, 2012, Pages 191-233, ISBN 9781437701739
- [12] HATTERSLEY, P.G. *Activated coagulation time of whole blood*.(1966) Journal of the American Medical Association, 196 (5), pp. 436-440.

- [13] HOXMEIER, K., GODDARD, D., MORTON, R., CHAPIN, J., LANDERS, D., FLEMING, W. *Thrombelastography (TEG): A graphic profile for analyzing coagulation after cardiopulmonary bypass*, (1992) *Journal of Extra-Corporeal Technology*, 23 (3), pp. 152-153.
- [14] KO G.T.C., YEUNG V. T.F., CHAN J.C.N., CHOW CHUN-CH., LI J. K.Y., SO WING-YI, TSANG L.W.W., COCKRAM C.S. *Plasma fibrinogen concentration in a Chinese population*, *Atherosclerosis*, Volume 131, Issue 2, June 1997, Pages 211-217, ISSN 0021-9150
- [15] LABITEC LABOR BIOMEDICAL TECHNOLOGIES GMBH. *LABiTec – Fibrinogen Kit*. 22926 AHrensburg, Germany, 2011.
- [16] MIESBACH, W., SCHENK, J., ALESCI, S., LINDHOFF-LAST, E. *Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia* (2010) *Thrombosis Research*, 126 (6), pp. e428-e433.
- [17] MURRAY, Robert K., GRANNER Daryl K., Peter A. MAYES Peter A., RODWELL Victor W. *Harperova Biochemie*. 4. vyd. Jinočany: H+H, 2002, 872 s. ISBN 80-7391-013-3.
- [18] NOVÁKOVÁ, Zuzana. *Krev*, MU Brno, 2008
- [19] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krevetvorba*. Český Těšín: FINIDR, 2002, 160 s. ISBN 80-86682-01-3.
- [20] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy*. Český Těšín: FINIDR, 2004, 238 s. ISBN 80-86682-03-X.
- [21] QUICK, A.J. *The bleeding time as a test of hemostatic function*, (1975) *American Journal of Clinical Pathology*, 64 (1), pp. 87-94.
- [22] PROCTOR, R.R., RAPAPORT, S.I. *The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies*. (1961) *American journal of clinical pathology*, 36, pp. 212-219.
- [23] ROSENSON R. S., MOSCA L., STAFFILENO B. A., TANGNEY CH.C. *Variability in fibrinogen measurements: an obstacle to cardiovascular risk stratification*, *Atherosclerosis*, Volume 159, Issue 1, November 2001, Pages 225-230, ISSN 0021-9150

- [24] ROSSI E., MONDONICO P., LOMBARDI A., PREDI L. *Method for the determination of functional (clottable) fibrinogen by the new family of ACL coagulometers*, Thrombosis Research, Volume 52, Issue 5, 1 December 1988, Pages 453-468, ISSN 0049-3848
- [25] RYŠAVÁ J., DYR J.E., HOMOLA J., DOSTÁLEK J., KŘÍŽOVÁ P., MÁŠOVÁ L., SUTTNAR J., BRIESTENSKÝ J., SANTAR I., MYŠKA K., PECKA M. *Surface interactions of oxidized cellulose with fibrin(ogen) and blood platelets*, Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 90, Issues 1–3, 20 April 2003, Pages 243-249, ISSN 0925-4005
- [26] SIEMENS AG. *Computer Based Documentary: Sysmex CA-1500*. 2012.
- [27] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC. *The Coagulation Cascade* [Poster]. USA, 2010.
- [28] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH. *Dade Innovin*. Emil-von-Behring-Straße 76, 35001, Marburg, Germany, 2009.
- [29] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH. *Systém Sysmex CA-1500: Referenční návod 3.03*. Emil-von-Behring-Straße 76, 35001, Marburg, Germany, 2011.
- [30] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH. *Thromborel S*. Emil-von-Behring-Straße 76, 35001, Marburg, Germany, 2012.
- [31] STEVENSON K., EASTON A., CURRY A., THOMSON J., POLLER L. *The reliability of APTT methods and the relationship to lipid composition and ultrastructure*, Thrombosis Research, Volume 41, Supplement 1, 1986, Page 42, ISSN 0049-3848
- [32] STRAUB, P.W., FUNK, C. *The Reptilase time in presence of fibrinogen degradation products*.(1971) Scandinavian journal of haematology. Supplementum, 13, pp. 257-258.
- [33] SYSMEX. *Uživatelský manuál: Automatický koagulační analyzátor CA-1500*. Kobe, Japan, 2009.
- [34] THOMAS, Lothar. *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 5. vyd. Frankfurt: TH-Books, 1998, 1567 s. ISBN 3-9805215-3-2.
- [35] TRIPODI A. *Tests of Coagulation in Liver Disease*, Clinics in Liver Disease, Volume 13, Issue 1, February 2009, Pages 55-61, ISSN 1089-3261

- [36] TVEDTEN H. *5 - Hemostatic Abnormalities, Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods (Fifth Edition)*, W.B. Saunders, Saint Louis, 2012, Pages 92-111, ISBN 9781437706574
- [37] VESELÝ, Jaroslav. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI - LÉKAŘSKÁ FAKULTA. *Vyšetření hemostázy*. Olomouc, 2008.
- [38] VALERIE L. NG. *Prothrombin Time and Partial Thromboplastin Time Assay Considerations*, Clinics in Laboratory Medicine, Volume 29, Issue 2, June 2009, Pages 253-263, ISSN 0272-2712
- [39] WILHELM, Zdeněk. *Stručný přehled fyziologie pro bakalářské studijní programy*. 3. vyd. Brno: MU, 2005, 115 s. ISBN 80-210-2837-8.
- [40] ZANDER, Norbert F., MEYERS Willfried, WEINSTOCK Nicodemo. 'Derived' Fibrinogen Measurement on a New Coagulation Analyzer.
- [41] ZHANG X., BAI B. *Correlation of fibrinogen level and absorbance change in both PT and APTT clotting curves on BCSXP*, Journal of Nanjing Medical University, Volume 22, Issue 3, May 2008, Pages 193-198, ISSN 1007-4376

## Seznam zkratek

ACT	- aktivovaný koagulační čas
ADP	- adenosindifosfát
APC	- aktivovaný protein C
APTT	- aktivovaný parciální tromboplastinový čas
Arg	- arginin
AT	- antitrombin
F	- faktor
Fb	- fibrinogen
FPA	- fibrinopeptid A
FPB	- fibrinopeptid B
FDP	- fibrin degradační produkty
Gla	- g-karboxyglutamát
Glu	- glutamin
GP	- glykoproteinový receptor
HC	- heparinový kofaktor
HMWK	- vysokomolekulární kininogen
Ile	- izoleucin
LMWH	- nízkomolekulární heparin
Lys	- lysin
PT	- protrombinový čas
t-PA	- tkáňový aktivátor plazminogenu
TEG	- tromboelastogram
TFPI	- proteinový inhibitor tkáňového faktoru
TK	- tkáňový faktor
TT	- trombinový test
u-PA	- urokinázou aktivátor plazminogenu
vWF	- von Willebrandův faktor

## **Seznam příloh**

Příloha 1: Naměřená data pracoviště A.FS

Příloha 2: Naměřená data pracoviště P.SL