

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Detekce protilátek u heparinem indukované
trombocytopenie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Gabriela Svobodová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	6.5. 2011

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

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala panu Mgr. Lud'ku Slavíkovi PhD., který mi po celou dobu pomáhal a věnoval mi spoustu času a cenných informací.

Poděkování věnuji i svým rodičům a příteli, kteří mi poskytli během studia morální i finanční podporu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Gabriela Svobodová
Název práce	Detekce protilátek u heparinem indukované trombocytopenie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Koagulační laboratoř: Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	

V této bakalářské práci se zabývám detekcí protilátek u pacientů léčených heparinem. S tímto nežádoucím účinkem léčby se může setkat každý lékař. Jedná se o klinicko-patologický syndrom, který postihuje 3-5% pacientů léčených heparinem. Onemocnění je způsobeno tvorbou protilátek proti komplexu destičkového faktoru 4 (PF4)/ heparinu.

V teoretické části je popsána funkce hemostázy, která se zejména podílí na zachování krevního oběhu a udržení krve v tekutém stavu. Hemostáza tvoří celek, který při vzniku nerovnováh může přestat optimálně fungovat. Hlavním úkolem hemostázy pro lidský organismus je zabránění krvácení při jakémkoliv poranění nebo invazivním výkonu. Optimální stav hemostázy je regulován antikoagulační léčbou. Jednou z jejich závažných komplikací je heparinem indukovaná trombocytopenie, která se manifestuje klinicky poklesem trombocytů nebo naopak trombózou.

Experimentální část pojednává o použitých metodách v mé bakalářské práci. Onemocnění HIT bylo stanoveno dvěma odlišnými metodami a to pomocí vícekanálové impedanční agregometrie – multiple electrode aggregometry, kdy je měření založeno na vychytávání aktivovaných krevních destiček. Destičky po aktivaci zvýší svůj povrch tvorbou filopodií a takto aktivované destičky jsou pak vychytávány na elektrodách. Druhou použitou metodou byla detekce protilátek pomocí imunochemického stanovení za použití testu TECHNOZYM HIT IgG. ELISA je chromogenní test pro stanovení heparin-dependentní protilátky IgG v lidské plazmě.

Klíčová slova	Heparin, PF4, trombocytopenie
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Gabriela Svobodová
Title	Detection of antibodies in heparine induced thrombocytopenia.
Type of thesis	Bachelor
Department	Coagulation laboratory: Departement of Hemato-Oncology, University Hospital, Olomouc
Supervisor	Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>In this bachelor thesis is written detection of antibodies in patients treated by heparin. With this disease can be encountered every doctor. This is clinicopathological syndrom that affects 3-5% of patients treated with heparin. The disease is caused by complex formation of antibodies againts platelet factor 4 (PF4)/heparin.</p> <p>The main theme of theoretical part is hemostasis, which is mainly involved in maintaining blood circulation and keeps blood in the liquid state. Hemostasis forms a whole, which in development of disorders may stop working. The main target of hemostasis for the human body is to prevent bleeding in some injury or invasive procedures. Optimal hemostasis is regulated by the state of anticoagulation therapy. One of the serious complications is heparin-induced thrombocytopenia, which is clinically manifested by decrease of platelet or thrombosis.</p> <p>Experimental section discusses about the methods, which are used in my work. HIT disease was determined by two different methods, by multichannel impedance arggegometry- multiple electrode aggregometry is based on the uptake of activated platelets. Activated platelets form filopodia and it causes increase of surface platelets. These platelets are taken by electrodes. The second method is detection of antibodies by immunoassay. The test is TECHNOZYM HIT IgG. ELISA is a chromogenic test for the determination of heparin-dependent IgG antibodies in human plasma.</p>
Keywords	Heparin, PF4, thrombocytopenia
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
Úvod	9
Složky hemostázy	10
Cévní stěna	10
Složka tkáňová	11
Krevní destičky	11
Mechanismus hemostázy	15
Primární hemostáza	15
Plazmatický koagulační systém	16
Fibrinolytický systém	18
Inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy	18
Patofyziologie hemostázy	20
Antikoagulační léčba	24
Heparinem indukovaná trombocytopenie - HIT	27
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
Materiál a chemikálie	32
Metody	33
Odběr krve	33
Impedanční agregometrie	33
ELISA TECHNOZYM HIT IgG	34
VÝSLEDKY A DISKUSE	36
ZÁVĚR	42
LITERATURA	43
POUŽITÉ ZKRATKY	46

Seznam obrázků

Obrázek 1. Schéma hemostázy	9
Obrázek 2. Podélný řez cévou	10
Obrázek 3. Formování krevních buněk	12
Obrázek 4. Morfologie krevní destičky	12
Obrázek 5. Schéma koagulačních dějů	16
Obrázek 6. Polymerace fibrinu	17
Obrázek 7. Přirozené inhibitory krevního srážení	19
Obrázek 8. Heparinem indukovaná trombocytopenie	26
Obrázek 9. Multiplate® analyzátor	30
Obrázek 10. Graf z Multiplate analyzátoru	34
Obrázek 11. Soubor pacientů	36
Obrázek 12. Typ heparinu	36
Obrázek 13. Výsledky MEA	39
Obrázek 14. Výsledky ELISA	40
Obrázek 15. Porovnání MEA a ELISA testu	41

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled plazmatických faktorů	19
Tabulka 2: Výsledky MEA, 2 IU/ml	37
Tabulka 3: Výsledky MEA, 50 IU/ml	38
Tabulka 4: Výsledky ELISA	39

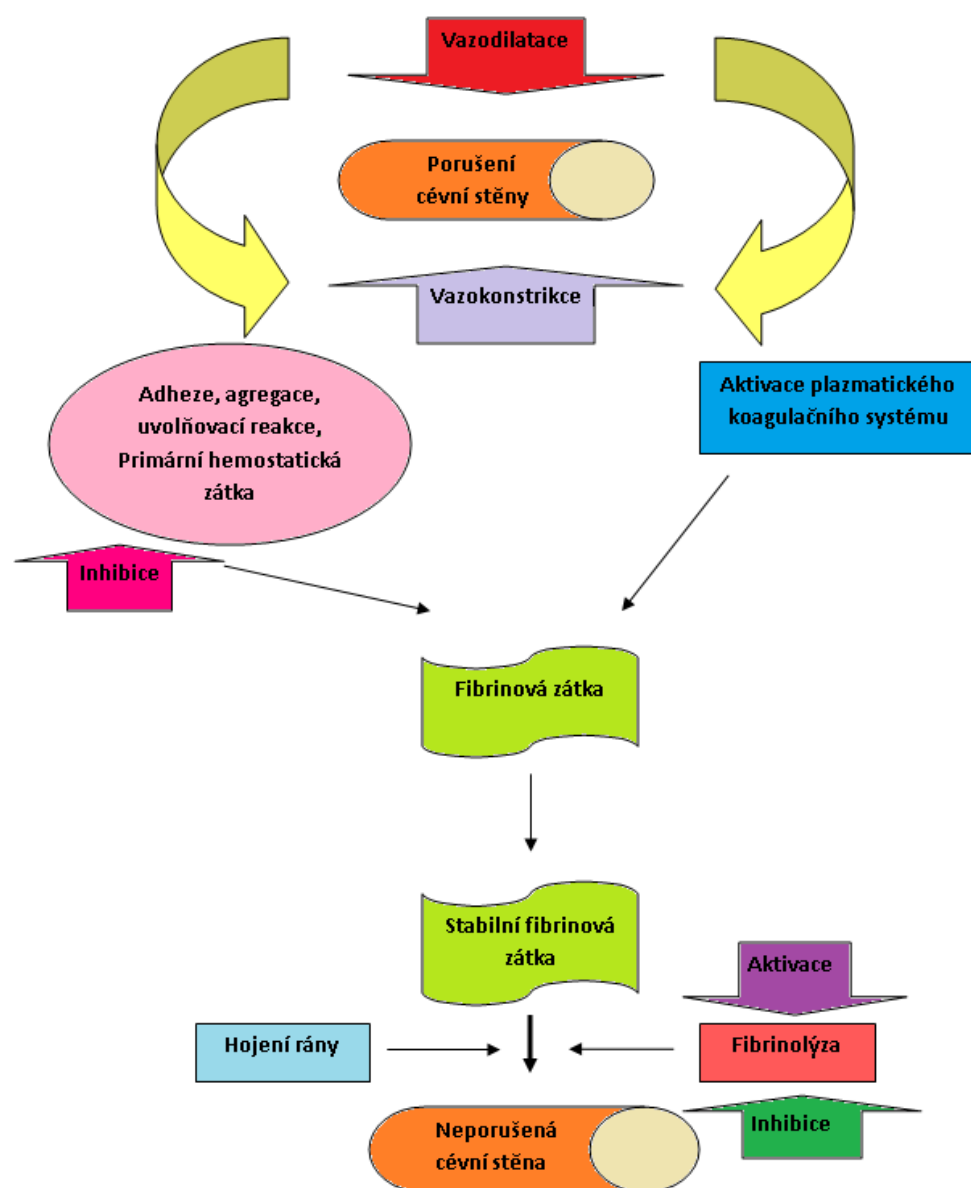
CÍLE PRÁCE

1. Zpracování literární rešerše na danou problematiku.
2. Aplikace metodik vyšetření HIT.
3. Detekce HIT u pacientů léčených heparinem dvěma komparativními metodami.
4. Vyhodnocení detekce protilátek na souboru pacientů léčených heparinem.

TEORETICKÁ ČÁST

Úvod

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení. Jedná se o komplexní proces, na kterém se podílí řada složek, jako jsou buněčné a plazmatické systémy v krvi vázané na cévní stěnu. Vzhledem k biologickému potenciálu krevního srážení je nutná přísná regulace a přítomnost kontrolních mechanismů, které zabraňují nekontrolovatelnému srážení nebo krvácení. Mechanismy regulují hemostázu různými vstupy a účinky, spojené s řadou pozitivních a negativních vazeb (Pecka 2004), (Matýšková et al., 1999).



Obr. 1. Schéma hemostázy (přepřacované podle Pecka, 2004).

Složky Hemostázy

- Cévní stěna
- Složka tkáňová
- Krevní destičky

CÉVNÍ STĚNA

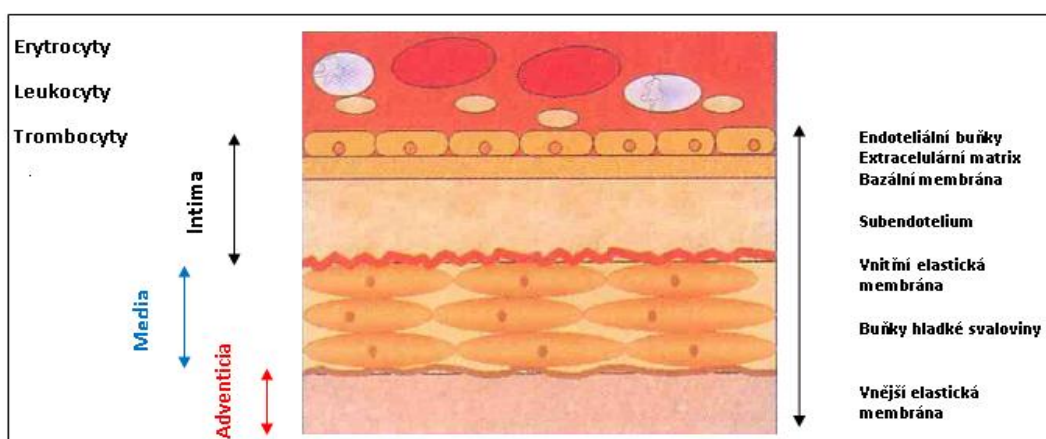
Struktura cévní stěny je rozdělena do tří částí: intima, media a adventicie.

Intima je tvořena jednou vrstvou endoteliálních buněk uložených na bazální membráně. Zde cévní endotel vytváří styčnou plochu mezi cirkulující krví a tkáněmi. Buňky endotelu jsou ploché a tenké. Spolu se subendoteliální plochou vytváří sekundární bariéru přechodu tekutin, makromolekul a formovaných elementů do extracelulárního prostoru. Součástí subendoteliální bazální membrány je extracelulární matrix (EC). Extracelulární matrix je tvořen kolagenem typu IV a V, elastinem, mikrofibrily a glykoproteiny (Pecka, 2004).

Pod bazální membránou se nachází subintima, která obsahuje žírné buňky. Tyto buňky syntetizují a skladují heparin, histamin a serotonin (Pecka, 2004).

Media je tvořena hladkým svalstvem obklopeným pojivovou tkání. Z obou stran je media ohraničena vnitřním a zevním elastickým listem (lamina). Hlavním úkolem medie je zajištění elasticity a tonusu cévy. Tuto vlastnost jí umožňují elastická vlákna a hladká svalovina, která mají na starost průsvit cévy. Součástí medii je kolagen typu I a III, elastická vlákna, glykosaminoglykany a glykoproteiny (Matýšková et al, 1999)

V adventicii jsou fibroblasty, které syntetizují pojivové tkáně. Dále adipocyty sloužící k syntéze lipidů a žírných buněk (Pecka, 2004).



Obr. 2. Podélný řez cévou (přepřacované podle Pecka, 2004).

Cévní stěna takto složená hraje v hemostáze důležitou roli. Ve vlastním procesu srážení krve se účastní reakce v několika krocích, kdy zejména zajišťuje vazokonstrikci v místě poškození cévy reflexním smrštěním. Krev v místě poškození nemůže proudit a je tak zabráněno jejímu úniku. Dále je místem interakce jednotlivých složek všech systémů hemostázy a současně zdrojem a zásobárnou důležitých složek v hemostáze jako jsou faktory, inhibitory a další významné látky pro přerušení krvácení. (Pecka, 2004)

Nejdůležitějším protisrážlivým prostředkem v organismu je neporušený, nesmáčivý endotel. Protisrážlivě zde působí několik mechanismů (Matýšková et al., 1999).

- Elektronegativní náboj povrchu endoteliálních buněk.
- Prostacyklin PGI_2 - vyvolává vazodilataci. Vzniká metabolismem kyseliny arachidonové.
- Receptory membrány.
- Glykosaminoglykany (GAG) - podílejí se na celé řadě cévních procesů včetně lipidového metabolismu, hemostázy, propustnosti cévní stěny a proliferaci buněk.
- Na povrchu endotelu jsou navázány přirozené inhibitory krevního srážení (Matýšková et al., 1999).

SLOŽKA TKÁŇOVÁ

Z poraněné tkáně a okolních buněk se uvolňují:

Adenosindifosfát (ADP), který je prostřednictvím endonukleas přeměněn na neaktivní adenosinmonofosfát (AMP). ADP je zodpovědný za primární agregaci krevních destiček (Pecka, 2004).

Tkáňový faktor, který se účastní na přeměně protrombinu na trombin (Pecka, 2004).

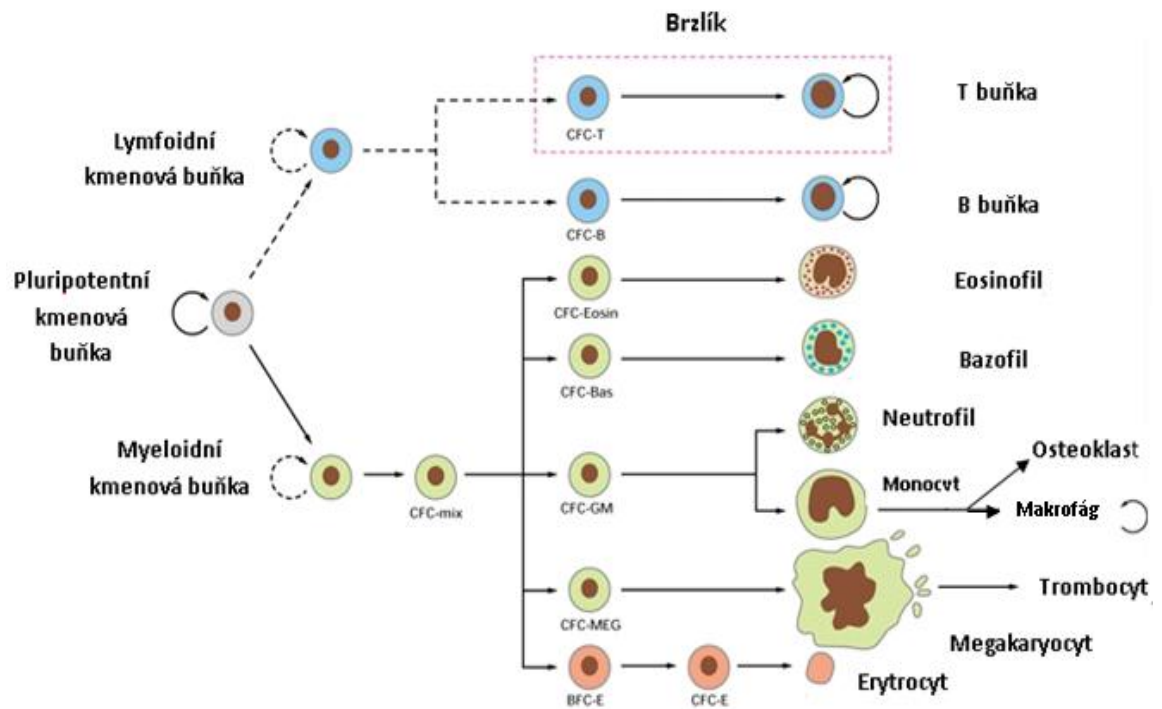
KREVNÍ DESTIČKY

Krevní destička - trombocyt, je součástí lidské krve. Spolu s bílými a červenými krvinkami představuje 45% objemu krve.

Krevní destičky vznikají v kostní dřeni odštěpením z megakaryocytů. Prekurzorem megakaryocytů je pluripotentní kmenová buňka, která se diferencuje na myeloidní kmenovou buňku (CFU- GEMM) a následně na megakaryocytární kmenovou buňku (CFU-Meg), která je základem promegakaryocytu. Promegakaryocyt poté vyžívá v megakaryocyt, ze kterého fragmentací vznikají trombocyty (Matýšková et al., 1999).

Krevní destičky jsou bezjaderné buňky, které přežívají 7-10 dní. Staré a poškozené trombocyty jsou zachyceny makrofágo-histiocytárním systémem především ve slezině,

v játrech a kostní dřeni (Matýšková et al., 1999).

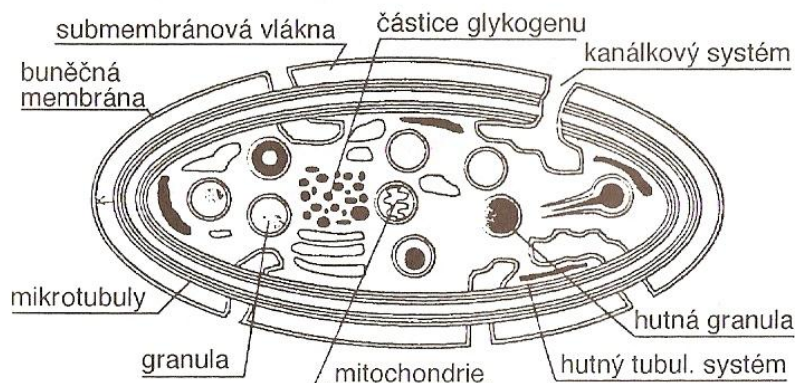


Obr. 3. Formování krevních buněk (přepřacované podle Alberts B. et al., 3.vydání, 1994, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28347/figure/A6165/?report=objectonly>).

Počet krevních destiček v 1 mm³ krve se u člověka pohybuje v rozmezí 150 000 – 350 000 (Vácha et al., 2008).

Vznik trombocytů označujeme trombocytopoézou a je regulován humorálně za účasti trombopoetinu nebo interleukinu 6 a 11 (Matýšková et al., 1999).

MORFOLOGIE KREVŇÍ DESTIČKY



Obr. 4. Morfologie krevní destičky (přepřacováno podle Matýšková et al., 1999).

Krevní destičku lze rozdělit na základě její funkce a biochemie do čtyř oblastí (Matýšková et al., 1999).

- Periferní zóna
- Zóna sol-gel
- Organelová zóna
- Membránový systém

PERIFERNÍ ZÓNA

Vytváří bariéru, která slouží k ochraně cytoplazmatických orgánů destičky od vnějšího prostředí.

Destičková membrána se skládá ze tří částí: (Nosál & Jančinová, 1990).

- Glykokalix
- Plazmatická atmosféra
- Vlastní destičková membrána

Glykokalix tvoří zevní plášť. Ten je převážně tvořen glykoproteiny. Glykoproteiny zde plní funkci receptorovou.

Adsorpcí proteinové plazmy na povrchu destiček se vytváří plazmatická atmosféra, která má důležitou roli při destičkových reakcích (Nosál & Jančinová, 1990).

Vlastní destičková membrána se skládá z dvojvrstvy fosfolipidů (PL), které hrají důležitou roli v plazmatické koagulaci a bývají často nazývané jako destičkový faktor 3 (PF3).

Fosfolipidová dvojvrstva je tvořena fosfatidylcholinem a sfingomyelinem na vnější straně a fosfatidyletanolaminem, fosfatidylserinem a fosfatidyinozitem, které tvoří vnitřní vrstvu (Matýšková et al., 1999).

Další skupinou lipidů je cholesterol s jeho estery. Ten spolu s fosfolipidy je zodpovědný za fluiditu destičkové membrány a současně se podílí na biofyzikální bariéře (Nosál & Jančinová, 1990).

ZÓNA SOL- GEL

Představuje matrix destičkové cytoplazmy, která je složena z vláknitých struktur v různém stavu polymerace. Hlavní funkcí zóny sol-gel je udržení diskovitého tvaru

intaktní destičky. Struktura zóny je tvořena třemi základními komponenty a to: mikrotubuly, mikrofilamenty a středními filamenty (Nosál & Jančinová, 1990).

Mikrotubuly jsou reprezentovány bílkovinou tubulinem. Mikrofilamenta (MF) tvoří aktin, který je v klidovém stavu monomerem, po jeho aktivaci polymerizuje. Další bílkovinou MF je profilin. Ten má schopnost vazby na monomer aktinu a tím inhibovat jeho polymerizaci. Současně je profilin důležitý regulační protein. Za vytvoření gelu zodpovídá protein ze skupiny MF tzv. protein vázající aktin (ABP). Kontrakcí MF se vytváří hexamer myozin, který se nachází všude v cytoplazmě klidových destiček (Matýšková et al., 1999).

ZÓNA ORGANEL

Organelovou zónu destiček tvoří granula, elektronová denzní tělíska, mitochondrie, lysozomy a peroxizomy. Regulují metabolické procesy destičky, slouží jako skladovací místa pro enzymy, biogenní aminy, proteiny a ionty vápníku. Významně se podílejí na regulaci hemostázy, nejvíce v regulaci tonu hladké svaloviny cév (Nosál & Jančinová, 1990).

MEMBRÁNOVÝ SYSTÉM

V krevních destičkách se nacházejí dva membránové systémy. Otevřený kanalikulární systém (OKS) a denzní tubulární systém (DTS). OKS je systém vychlípenin destičkové stěny. Tvoří jej komplikovaná síť kanálků uvnitř destičky, která má důležitou roli při uvolňování intracelulárního obsahu, zejména α -granul a také při příjmu extracelulárního materiálu (Nosál & Jančinová, 1990).

DTS je tvořen hladkými, úzkými a navzájem propojenými tubuly. Jsou nepravidelně rozptýlené v intracelulárním prostředí (Nosál & Jančinová, 1990). Přítomnost peroxidasy a glukoso-6-fosfát dehydrogenasy ukazuje na jeho odvození z hladkého endoplazmatického retikula. Slouží i jako zásobárna Ca^{2+} , cyklooxygenasy, tromboxansyntetasy a adenylát cyklasy (Matýšková et al., 1999). Takový vápník je uvolněn z vazebných míst v DTS po stimulaci destiček a je dostupný pro průběh kontrakci destiček a sekreci jejich granulárního obsahu.

V krevních destičkách probíhá metabolismus mastných kyselin. Pro funkci trombocytů je nejdůležitější metabolismus kyseliny arachidonové (AA). Metabolismus probíhá dvěma cestami – jednou cestou zprostředkovanou enzymem cyklooxygenasou, který poskytuje prostaglandiny, prostacyklin PGI₂ a druhou cestou zprostředkovanou tromboxanem A₂ a lipooxygenasou (Matýšková et al., 1999).

Mechanismus hemostázy

Hemostatický proces je sled 4 kroků, kde aktivace prvního způsobí stimulaci ostatních.

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

PRIMÁRNÍ HEMOSTÁZA

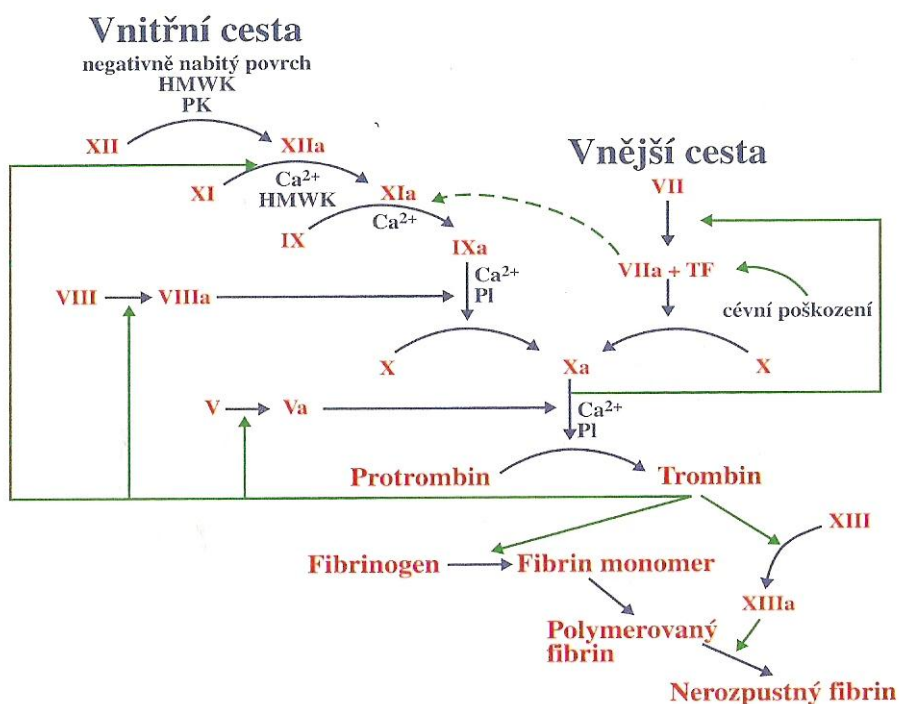
Primární hemostáza je proces tvorby primární hemostatické zátky, která uzavírá místo narušení celistvosti cévní stěny a zastavuje tak krvácení (Levy-Toledano et al., 1997). Celého procesu se účastní cévní složka a krevní destičky.

Neaktivní cirkulující destičky mají oválný diskoidní tvar. Na normální endotelovou výstelku cévní stěny nereagují. Při poranění nebo při zánětlivých a degenerativních procesech dochází k obnažení pojivové tkáně v endotelu a kolagenních vláken v subendotelu. Na takto aktivovaném endotelu dochází k adhezi krevních destiček pomocí glykoproteinových receptorů (Colman et al., 2001). Vazba destiček na glykoprotein Ib je zprostředkována von Willebrandovým faktorem (vWf), (Nosál & Jančinová, 1990). Adherující destičky po kontaktu s kolagenními vlákny mění svůj tvar na kulatý a objevují se pseudopodia. Paralelně dochází ke změnám povrchových vlastností membrány a k tzv. uvolňovací reakci (Matyášková et al., 1999). Tímto procesem dochází k uvolnění proagregačních a chemických působků, zejména PDGF, PF4, β TG, fibrinogenu a dochází k aktivaci receptorů GP IIb/IIIa. Pomocí mezibuněčných signálů se kontaktují i další destičky, protože aktivované destičky secernují ADP ze svých granulí a metabolismus kyseliny arachidonové dává podnět ke vzniku TXA_2 . Tyto látky jsou významnými stimulatory agregace krevních destiček. Váží se na receptory okolních destiček a aktivují je. Dochází k agregaci krevních destiček tj. spojení krevních destiček za vzniku bílého trombu – destičkové zátky (Pecka, 2004). Vyvrcholením primární hemostázy je přesun fosfolipidů, z vnitřní membránové dvojvrstvy (fosfatidylserinu, fosfatidyletanolaminu) do vnějších membránových struktur krevní destičky. Uvolněné fosfolipidy výrazně potencují další fázi procesu hemostázy, tedy polymeraci rozpustného fibrinu na nerozpustný fibrin (Colman et al., 2001). Vytvořením nerozpustného fibrinu se vytváří fibrinová síť, která slouží k vychytávání červených a bílých krvinek. Tím se bílý trombus mění na červený (Pecka, 2004).

PLAZMATICKÝ KOAGULAČNÍ SYSTÉM

Plazmatický koagulační systém se podílí na vytvoření nerozpustného fibrinu. Vzniku takového vlákna je dosaženo postupnou kaskádovitou enzymatickou reakcí. Při ní jsou faktory, které jsou v krvi přítomny v neaktivní formě - proenzymy, štěpeny předcházejícím enzymem na aktivní formu (Matýšková et al., 1999).

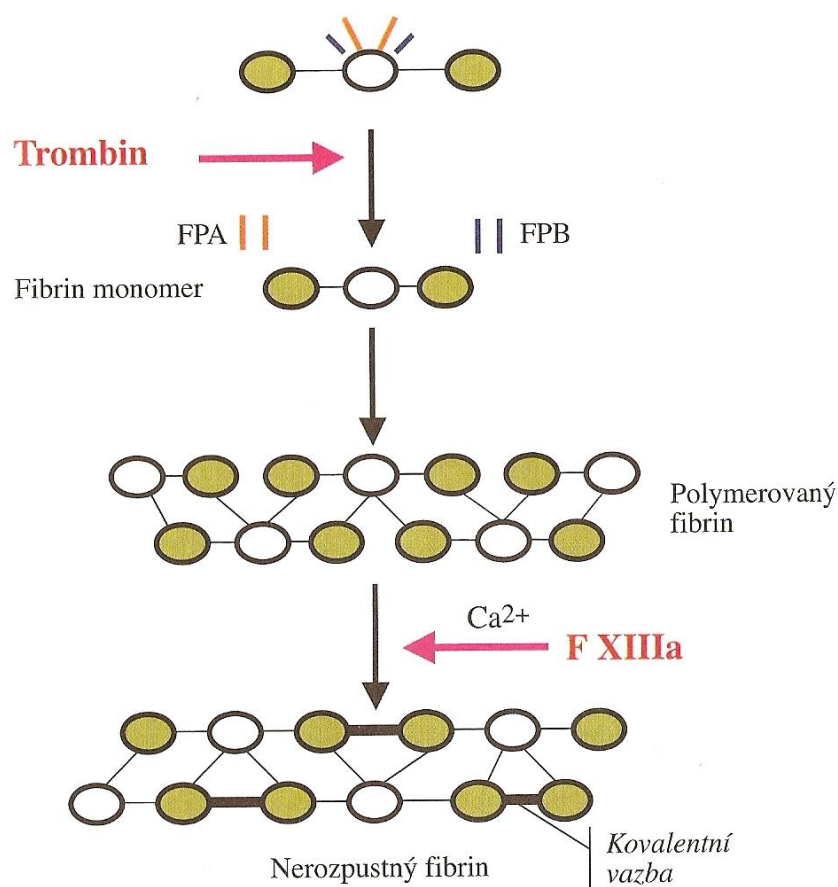
Koagulační kaskáda se podle aktivace dělí na vnější a vnitřní systém. K aktivaci vnějšího systému je zapotřebí tkáňového faktoru (TF). TF je membránový protein, který je vylučován povrchem řady buněk. TF nemá enzymatickou aktivitu. Při kontaktu s krví, slouží TF jako vysoce afinitní receptor pro faktor VIIa a vytváří s ním v přítomnosti Ca^{2+} na fosfolipidovém povrchu komplex [TF.VIIa]. Tento komplex způsobuje přeměnu F X na F X_a. Aktivací vzniklý F X_a spolu s F V_a vstupuje do komplexu protrombinasy a konvertuje přeměnu protrombinu na trombin. Trombin se podílí na aktivaci tvorby fibrinu z fibrinogenu. Fibrinové monomery okamžitě polymerují a vzniklý polymer se stabilizuje F XIIIa aktivovaný trombinem. Vzniká nerozpustný fibrin (Pecka, 2004).



Obr. 5 Schéma koagulačních dějů (přepřacované podle Pecka 2004).

Vnitřní cesta se spouští ve fázi kontaktu. Aktivace F IX může probíhat přes komplex [TF.VIIa] nebo F XI_a. Ten je aktivován prostřednictvím F XI a F IX, v této fázi dochází k zesílení vyvolávajícího efektu a k aktivaci faktorů V a VIII. Komplex F IX_a- VIII_a- PL - Ca^{2+} se nazývá tenasa. Tenasa generuje dostatečné množství F X_a a ten společně s faktorem V_a v komplexu protrombinasy způsobí přeměnu protrombinu na trombin.

Trombin je klíčovým enzymem hemostatických reakcí. Jako jediný koagulační enzym má schopnost štěpit fibrinogen na fibrin (Pecka, 2004), (Matyášková et al., 1999). Fibrin se tvoří až po odštěpení dvou specifických vazeb v řetězci A α a B β fibrinogenu trombinem. Vznikají dva fibrinopeptidy A (FPA) a dva fibrinopeptidy B (FPB). Uvolnění FPA je mnohem rychlejší než FPB, vyvolává přeměnu fibrinu v gel složený z fibrinových vláken. Odštěpením těchto peptidů se obnaží vazebná místa v centrální E doméně molekuly fibrinogenu a vznikají fibrinové monomery. Takovéto monomery jsou náchylné k polymeraci (Matyášková et al., 1999). Polymerace v první fázi probíhá na základě interakce komplementárních vazebných míst mezi doménami E a D. Nejprve dojde k vazbě D-domén navzájem a následně reagují E-domény s komplementárními místy γ řetězce D-domény. Tak se postupně tvoří dvouvláknové protofibrily. Zralý fibrin je složen asi ze 100 protofibril. Fibrin je stabilizován F XIII_a (Pecka, 2004). Faktor XIII_a v přítomnosti Ca²⁺ iontů vytváří mezi C-koncovými částmi γ řetězce sousedních molekul v protofibrilách fibrinu příčné kovalentní dvojné vazby. Důsledkem je vyztužení vláken a tím i jejich zvětšení - vzniká polymerní stabilní fibrin (Sobel & Gawinowitz, 1996).



Obr. 6 Polymerace fibrinu (přepřacované podle Pecka, 2004).

FIBRINOLYTICKÝ SYSTÉM

Cílem fibrinolýzy je rozpuštění vytvořené sraženiny a tím zprůchodnit cévu. Je to poslední regulační mechanismus hemostázy. Fyziologicky probíhá jen tam, kde vznikl fibrin. Systém přirozených inhibitorů plazminu spolu s krevním proudem zamezuje rozšíření této reakce do dalších částí organismu. Centrální složkou fibrinolýzy je enzym plazminogen (plg), který je prekurzorem aktivní formy plazminu. Mezi nejvýznamnější aktivátory plazminogenu patří tkáňový aktivátor plazminogenu (t-Pa) a urokinasa (u-Pa) (Pecka, 2004).

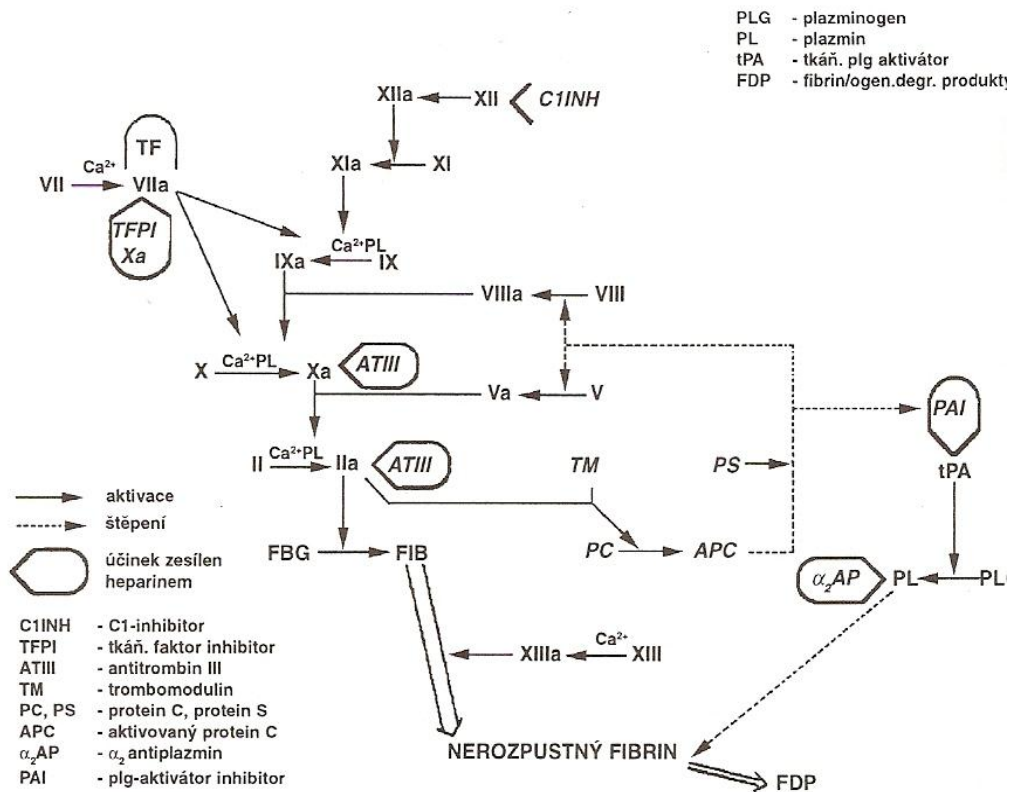
Aktivace plg může probíhat dvojím způsobem a to vnitřní - krevní cestou nebo vnější cestou přes tkáňové aktivátory. Mezi vnitřní aktivátory řadíme kalikerin, F XIa, F XIIa a trombin. Druhou skupinu reprezentují t-Pa a u-Pa (Matýšková et al., 1999).

- PŘEMĚNA PLAZMINOGENU NA PLAZMIN

Fibrinolýza je zaktivována vznikem fibrinu. Na takto vytvořený fibrin se váže plg a t-Pa. Vzniká komplex [plg. t-Pa. fibrin]. Dochází ke štěpení fibrinového koagula na jednotlivé fragmenty – fibrin degradační produkty (FDP). Nejprve vznikají fragmenty X a Y a poté vznikají konečné produkty D a E. Fragmenty X a Y se od sebe neoddělují a vytvářejí D-dimery jako konečný produkt, které jsou odplavovány do obvodové krve. FDP mohou působit i jako antitrombiny a jsou schopné inhibice agregace krevních destiček (Pecka, 2004).

INHIBITORY KREVNIHO SRÁŽENÍ A FIBRINOLÝZY

Představují regulační mechanismus, který slouží jako zpětnovazebná regulace, která zabrání nekontrolovatelnému srážení krve a udrží koagulační rovnováhu (Matýšková et al., 1999). Inhibitory můžeme rozdělit podle původu, specifiity a lokalizace v systému. Dalším důležitým rozdělením je na inhibitory přirozené a získané. Přehled plazmatických faktorů je uveden v Tab. 1.



Obr. 7 Přírodní inhibitory krevního srážení (přepřacované podle Matýšková et al., 1999).

Název	Zkratka	Cílový enzym
Antitrombin III	ATIII	Ila, Xa
Heparin faktor II	HCII	Ila, Xa
α_2 -makroglobulin	α_2 MG	Ka, plazmin, Ila
C1-inhibitor	C1INH	XIIa, Ka
α_1 -atntitrypsin	α_1 AT	Xa, APC
α_2 -antiplazmin	α_2 AP	plazmin
Plazminogen aktivní inhibito-1	PAI-1	tPA, uPA
Plazminogen aktivní inhibito-2	PAI-2	uPA
Tkáňový faktor inhibitor	TFPI	Xa, TF/VIIa
Protein C	PC	Va, VIIIa
Protein S	PS	Xa, FVIII
Trombomodulin	TM	IIA, (Xa)
Inhibitor aktivní PC	iAPC	APC, Ka

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

Patofyziologie hemostázy

Hemostatická rovnováha je výsledkem normální a správné funkce cévní stěny, krevních destiček a plazmatických činitelů zahrnující koagulační a fibrinolytický systém s jejich aktivátory a inhibitory. Obecně se její narušení může projevit krvácivými stavy nebo naopak trombotickým stavem (trombofilním stavem), (Pecka, 2004).

Krvácivé stavy jsou charakterizovány spontánními krvácivými projevy nebo krvácením, které je neúměrné stavům nebo podnětům, jež je vyvolaly (Pecka, 2004), (Matýšková et al., 1999).

Poruchy primární hemostázy lze rozdělit na kvantitativní a kvalitativní poruchy.

Kvalitativní poruchy: *vrozené*
 získané

Vrozené trombocytopenie jsou velmi vzácné poruchy a jsou provázeny silným krvácením po extrakci zubů, malých poranění a u kožního a slizničního krvácení.

Takovéto choroby můžeme dělit podle: (Matýšková et al., 1999)

- Typu postižení na poruchy membrány krevních destiček.
- Poruchy skladovacích granulí.
- Enzymatické poruchy.
- Poruchy adheze krevních destiček.
- Porušení sekrece.
- Porucha v aktivaci destiček TXA₂ a prostaglandiny.
- Porucha funkce agregace krevní destičky.
- Postižení prokoagulační funkce.

Výskyt získaných trombocytopenií je mnohem častější. Nejčastěji se s ním setkáváme u hematologických onemocnění.

Kvantitativní poruchy: *trombocytopenie*
 trombocytózy

Trombocytóza je nález zvýšeného počtu krevních destiček. Vyskytuje se u infekcí, zánětlivých onemocnění, u nádorů a při fyzické a psychické námaze.

Trombocytopenie je způsobena sníženým počtem krevních destiček a členíme ji na získanou a vrozenou. Vrozená trombocytopenie je vzácná a může být z nejrůznějších příčin. Naopak získaná je rozdělena na imunní a neimunní. Trombocytopenie může vznikat z předčasného zániku trombocytů, z nedostatečné produkce trombocytů a ze zadržování trombocytů (Pecka, 2004).

Trombotické stavy představují opak stavům krvácivým, u kterých je hemostatická rovnováha narušena opačným směrem. U těchto stavů nacházíme v krevním oběhu aktivované formy činitelů hemostázy a může dojít ke vzniku trombu. Konečným důsledkem vzniku takového většího nebo menšího trombu může být trombembolická příhoda, při které dochází k uvolnění trombu s následným uzavřením některé z důležitých cév (Pecka, 2004).

Trombofilie je vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, která je pravděpodobnou příčinou zvýšené tendence k trombóze (definice Pracovní skupiny pro hemostázu a trombózu Britské společnosti pro hematologii).

Trombotické stavy a jejich příčiny:

- Postižení cévní stěny – trombóza venózní a arteriální.
- Porucha hemodynamiky.
- Porucha složení a funkce krve.
- Narušení plazmatického koagulačního systému včetně inhibitorů.
- Narušení fibrinolytického mechanismu (Pecka, 2004).

Trombofilie je vyšetřována u pacientů, kteří splňují následující kritéria:

- Žilní trombózy před 45. rokem.
- Opakované žilní trombózy.
- Tepenné trombózy před 35. rokem bez známek přítomnosti arteriální choroby.
- Rodinná anamnéza TEN.
- Nezvyklá lokalizace trombóz.
- Opakované ukončení gravidity (Matýšková et al., 1999).

Trombofilní stavy lze rozdělit:

vrozené
získané

U vrozených trombofilních stavů byl zjištěn velký počet genetických mutací, které mohou vést ke zvýšenému riziku trombózy. Nicméně z klinického hlediska mají význam

pouze mutace u 7 inhibitorů. Tyto genetické mutace mají většinou autozomální dědičnost. Mezi nejznámější patří:

- Nedostatek proteinu C a proteinu S. Většinou se vyskytují v dětství a způsobují nejčastěji žilní trombózy v dolních končetinách. V případě proteinu S bylo objeveno až 70 mutací genu.
- Rezistence na aktivovaný protein C (APC-R). Jedná se jednobodovou mutaci způsobenou záměnou aminokyseliny argininu za glutamin. Takto vzniklý triplet kódující F V má snížený inhibiční efekt na aktivovaný koagulační systém. Důsledkem je nedostatečné štěpení faktoru Va a ten zůstává neustále v aktivované podobě a neustále se podílí na zvyšování hladiny trombinu v komplexu protrombinasy. Nejčastěji se objevuje v těhotenství, při vysoké hladině F VIII, při nízké hladině PS a v přítomnosti lupus antikoagulans (Pecka, 2004), (Matyášková et al., 1999).
- Mutace protrombinu je spojovaná s 20210 A alelou protrombinového genu – F II 20210. Tato mutace postihuje ve vzorku zdravé skupiny jedinců přibližně 3%.
- Homocystein (Hc) je metabolit degradace Met. V plazmě se objevuje v rozmezí 5-15 $\mu\text{mol/l}$. Hyperhomocysteinnémie je charakterizována zvýšenou hladinou homocysteinu v krvi. Způsobuje časnou aterosklerózu a trombózu. Zvýšená hladina Hc se vyskytuje i u osob s ischemickými příhodami a tranzitorními mozkovými ischemiemi (Matyášková et al., 1999).
- Poruchy fibrinolytického systému mohou také vést k trombembolickému onemocnění. Dysfibrinogenémie je mutace β -fibrinogenu (455 G-A), při které dochází ke zvýšení hladiny fibrinogenu v plazmě a důsledkem je zvýšená viskozita krve a plazmy a dochází ke zvýšené agregaci červených krvinek (Pecka, 2004).

Mezi získané trombofilní stavy se zařazuje přítomnost antifosfolipidových protilátek. Jejich výskyt nejčastěji doprovází autoimunní onemocnění - systémový lupus erythematosus a srpkovitou anémií. U těchto onemocnění se vytváří protilátky proti negativně nabitým fosfolipidům, proteinům vázající fosfolipidy nebo proteinům (kofaktorům) v případě, že fosfolipidy nejsou přítomny. Klinické nálezy mohou souviset

s trombózami a mohou zasahovat většinu orgánů, jako jsou například játra, CNS, ledviny a plíce (Matýšková et al. 1999).

Antikoagulační léčba

V případě jakékoli nerovnováhy v koagulačním systému je nutné navodit fyziologické nebo optimální léčebné podmínky pro krevní srážení antikoagulačními léky. Tyto léky se používají především na snížení aktivity koagulačního systému.

Koagulační systém lze inhibovat různými způsoby, které mají své výhody ale i nevýhody, mezi něž se řadí především riziko krvácení - nejdůležitější je stanovit správnou dávku těchto léků, jelikož se z terapeutického hlediska jedná o léky s nízkým terapeutickým indexem.

1. antagonisté vitamínu K

Mezi významné antagonisty vitamínu K patří kumariny. Podstata jejich účinku je v jejich strukturální podobnosti s vitamínem K. Inhibují vitamin K 2,3-epoxid reduktasu a v menším rozsahu i vitamin K-reduktasu. Obecně snižují koagulační aktivitu faktorů a to především faktory II, VII, IX, X, PS a PC. Při takovémto nedostatku vitamínu K, vznikají PIVKA formy koagulačních faktorů (proteiny indukované antagonisté vitamínu K). Tyto formy nejsou schopné vázat vápenaté ionty, které jsou nezbytné pro koagulační enzymatické reakce. Schopnost vazby Ca^{2+} iontů mají prekurzory proenzymů faktorů závislých na vitamínu K. Ca^{2+} ionty se váží na kyselinu glutamovou, která je obsažena ve faktorech. V místě vazby je tzv. γ karboxyglutamové zakončení, které v přítomnosti vitamínu K je karboxylováno enzymem γ glukarkarboxylasou (Pecka et al., 2010). Kumariny se vstřebávají zažívacím traktem a v plazmě se váží na albumin. Volná část kumarinu je metabolizována jaterní buňkou a určuje tak její poločas v plazmě. Podle rychlosti nástupu a úpravy koagulace po jejich vysazení, je dělíme na preparáty s krátkým a delším biologickým poločasem (Matýšková et al., 1999).

Krátký biologický poločas - Pelentan a Pelentanettae působí 2 až 8 hodin

Delší biologický poločas - Warfarin, Coumadin a Marcumar působí 2 až 5 dní

2. fibrinolytické léky

- **streptokinasa**

- **urokinasa**

Tyto léky principiálně obnovují průchodnost uzavřené cévy trombem. Streptokinasa (SK) je neenzymový protein, vzniklý jako produkt β -hemolytického streptokoka. Aktivuje fibrinolytický systém nepřímo. Vyznačuje se vysokou afinitou k plazminogenu, se

kterým vytváří komplex. To vede ke změně molekuly plazminogenu a jeho postupné autoaktivaci na plazmin. Při léčbě je nutné počítat s protilátkami proti SK, které jsou přítomny u dospělých po infekci β -hemolytickým streptokokem (Matýšková et al., 1999).

Urokinasa se vyskytuje v moči zdravých lidí. Neváže se na fibrin a plazminogen štěpí na plazmin přímo.

Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) je syntetizován endoteliálními buňkami a získává se rekombinantní DNA technologií. Molekula obsahuje vazebné místo pro fibrin a katalytické místo, které katalyzuje přeměnu plg na plazmin (Mark et al., 1995). Jelikož jde o humánní enzym, neindukuje antigenní odpověď, stejně jako urokinasa (Pecka, 2004).

3. inhibitory trombinu

- *hepariny*

- *pentasacharidy*

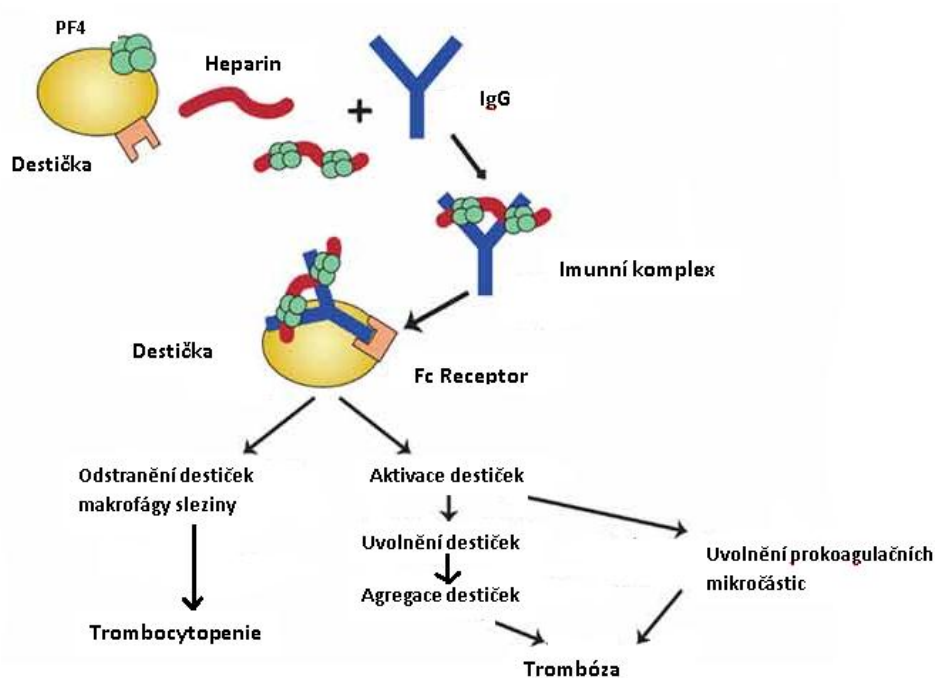
Heparin je mukopolysacharid s vysokým obsahem síry. Tvoří se v játrech, plicích a kůži. Základní složku heparinu tvoří heparan sulfát. Heparin se řadí mezi nepřímý inhibitor trombinu, který vyžaduje pro zajištění funkce další složku, v tomto případě antitrombin. Na ten se váže pomocí pentasacharidové sekvence a podporuje účinek heparinu a usnadňuje vazbu na trombin (Pecka et al., 2010). Heparin inhibuje aktivaci koagulačních faktorů, ovlivňuje primární hemostázu, endotel a fibrinolýzu. Má schopnost vazby na granulocyty, lymfocyty a makrofágy, čehož se využívá u zánětlivého onemocnění a také se váže na makromolekulární látky.

V lékařské praxi se využívá nefrakcionovaný heparin (UFH) a nízkomolekulární heparin (LMWH). UFH je heterogenní směs polysacharidových řetězců, kde jedna třetina řetězců obsahuje pentasacharidovou sekvenci. Vazba UFH na proteiny přítomné v plazmě destičky, buňky endotelu a makrofágy, je obtížně předvídatelná, jelikož nefrakcionovaný heparin obsahuje řadu dlouhých molekul (Andersson et al., 1979). UFH může být inhibován PF4, který vzniká prasknutím aterosklerotického plátu s aktivovanými trombocyty a nemá schopnost inaktivace trombinu vázaného na fibrin (Pecka, 2004).

LMWH vzniká kontrolovanou chemickou depolymerizací, frakcionací a částečným štěpením heparinasou. V přítomnosti AT inhibuje faktor Xa za uvolnění PF4, s kterým netvoří komplex. Takto vzniklý PF4 působí jako induktor agregace destiček. Díky svým kratším řetězcům se mnohem méně váže na plazmatické bílkoviny a buněčné povrchy,

kteře pak mají delší plazmatický poločas a takto disponují vyšším imunogenním potenciálem (Pecka et al., 2010).

Heparin jako antikoagulační lék má však také nežádoucí účinky. Mimo nejzávažnější, kterým je krvácení způsobené předávkováním, je nejčastějším nežádoucím účinkem tvorba protilátek. Tato tvorba protilátek je nazývána heparinem indukovaná trombocytopenie na základě nejčastějšího symptomu, dle kterého je rozpoznávána u léčených pacientů. HIT vzniká na základě produkce protilátek aktivující krevní destičky (Pauzner et al., 2009). Příčinou je vznik komplexu, který je tvořen heparinem – PF4 – Ab. Komplex má vlastnost interakce s Fc receptorem destiček a tím je indukována uvolňovací reakce trombocytu vedoucí k jejich aktivaci a vzájemné agregaci. Protilátky jsou nejčastěji zastoupeny ve třídách IgG a IgM (Matýšková et al., 1999).



Obr. 8 Heparinem indukovaná trombocytopenie (přepřacované podle Greinacher A., 2010).

Podstatou účinku heparinů, jakožto všech pentasacharidů, je inhibice krevního srážení přes AT a selektivní inhibice F Xa. Jsou to analoga pentasacharidové sekvence heparinu. Podílejí se na tvorbě trimerního komplexu, vzniklého interakcí s AT. Tento řetězec obsahuje sekvenci 5 monosacharidů (Pecka, 2004).

Heparinem indukovaná trombocytopenie - HIT

Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je klinicko patologický syndrom, který je diagnostikován u pacientů imunizovaných podáním heparinů a je pro něj typický vývoj protilátek proti komplexům destičkového faktoru 4/heparinu a IgG protilátek aktivujících destičky.

HIT je imunitně indukované onemocnění, jehož příčinou je vazba IgG protilátek na destičkový faktor 4 (PF4). PF4 se stává imunogenním a váže se na heparin. PF4 je homotetramer, který se skládá ze 4 jednotek o molekulové hmotnosti 7,8 kDa (Pecka et al., 2010).

V klinické praxi jsou popsány 2 typy HIT. HIT I je pokles trombocytů po přímém proagregačním účinku heparinu. Nastává časně po nasazení heparinu. HIT II je způsoben protilátkami proti komplexu heparin/PF4 a vzniká s odstupem po podání heparinu (Králová et al., 2006).

Onemocnění se vyskytuje u 0,5 - 5% pacientů s nižším výskytem u LMWH. V současné době jsou pacienti mnohem častěji léčeni nízkomolekulárním heparinem (LMWH), u něhož je výskyt tvorby protilátek nižší než u UFH (Malý & Pecka, 1999).

HIT

Patofyziologie: Heparin se váže na destičky a spouští uvolnění PF4 z α granulí trombocytů. Na povrchu destičky se vytvoří komplex heparin/PF4. V přítomnosti heparinu se protilátka (Ab) váží do komplexu za vzniku imunitního komplexu [heparin.PF4.Ab]. Část protilátky rozpoznává komplex heparin/PF4 a Fc fragment imunoglobulinu za aktivaci destiček. Nejčastějším imunoglobulinem je IgG, který jako jediný disponuje aktivitou vůči destičkám, přítomen může být i IgM. Destičky při aktivaci ztrácejí svůj diskoidní tvar a tvoří četná pseudopodia. Při tomto procesu se odštěpují membranózní částice s výraznou prokoagulační aktivitou. Generuje se trombin a uvolňuje se PF4, který je klíčový pro vývoj HIT (Králová et al., 2006).

Nevyvázaný PF4 se váže na veškeré molekuly podobné heparinu za tvorby komplexu s IgG protilátkami. Tento komplex se váže na Fc receptor destičky, kterou aktivuje. Takto aktivované destičky vzájemně agregují, agregáty jsou odstraňovány z krevního oběhu jako nežádoucí částice a tímto konzumpčním mechanismem je vyvolána trombocytopenie (Pecka, 2004), (Králová et al., 2006). Jednou z pravděpodobných příčin u postižených tímto typem HIT může být genetická odchylka destičkového receptoru. Literárně je popsána záměna aminokyseliny v molekule receptoru, kde v pozici 131 je aminokyselina Arg a ta je nahrazena aminokyselinou His (Pecka, 2004).

Léčebná strategie

V současné době se v případě manifestace HIT heparin nahrazuje jinými antikoagulačními přípravky. Mezi nejvyužívanější antikoagulační léky patří:

- Lepirudin
- Fondaparinux
- Argatroban
- Bivalirudin
- Danaparoid

VYŠETŘENÍ HIT

Zaznamenání HIT II je komplikované. Heparin jako nejvyužívanější antikoagulant je pacientům poskytován s dalšími příčinami trombocytopenie. Diagnostika HIT II využívá ke stanovení klinický obraz a laboratorní testy. Terapie heparinu s vysokou prolongací může vést k hyperkoagulaci a fatálnímu vyústění. Vyšetření HIT II laboratorním testy nemusí být vymožeností každé hematologické laboratoře a současně negativita těchto vyšetření nevylučuje klinickou diagnózu HIT II in vivo (Novotný & Konvičková, 1998).

Vyšetření HIT se opírá o funkční a sérologické testy. Sérologické testy se obecně vyznačují nejvyšší senzitivitou a nejnižší specifitou. Mezi sérologické testy řadíme ELISA testy, které jsou založené na interakci cílového antigenu s komplexem PF4/heparin. V současné době se rozvíjí gelové testy. Princip jejich stanovení spočívá v reakci polystyrénových částic potažených komplexem PF4/heparin s HIT protilátkami. Aglutinace vytváří v gelu zřetelný zákal (Albeiro et al., 2003), (Meyer et al., 1999).

Funkční testy naopak detekují protilátky HIT v pacientově plazmě aktivací destiček. Pro vyšetření jsou používány dárcovské destičky, jejichž aktivace a imunizace je zprostředkována plazmou vyšetřovaných pacientů. Detekce protilátek pak může být monitorována řadou způsobů. V praxi se nejvíce osvědčil serotonin uvolňovací test, kdy podíl aktivace destiček je zajištěn monitorováním uvolnění radioaktivně značeného serotoninu z destiček (SRA). Tento test se stal zlatým standardem pro vyšetření HIT zejména díky vysoké citlivosti a senzitivitě.

Samotná metoda spočívá v detekci protilátek v komplexu s PF4 a heparinem, kdy vzniklé protilátky způsobí aktivaci dárcovských destiček. Takovéto dárcovské destičky se inkubují s komplexem Ab-PF4-heparin v přítomnosti radioaktivně značeného serotoninu. Označené destičky se pak inkubují společně se sérem pacienta,

v přítomnosti a nepřítomnosti heparinu. Finální výsledek je zaznamenán jako množství uvolněného radioizotopu z krevních destiček. Test je pozitivní, pokud minimálně 20% radioaktivního izotopu bylo uvolněno z destiček aktivovaných koncentrací heparinu 0,1 IU/ml.

Druhou skupinu funkčních testů, které byly vyvinuty na bázi modifikace SRA, tvoří agregační testy. Pro tyto testy je charakteristické snadné provedení - bez nutnosti práce s radioaktivitou, rychlá dostupnost a nižší senzitivita. Mezi tyto testy řadíme optickou agregometrii (LTA) a vícenásobnou elektrodovou agregometrii (MEA), která má dle literárních poznatků potenciál senzitivitu zvýšit.

Optická agregometrie je založena na změně optické propustnosti vzorku v závislosti na vzniku agregátů krevních destiček po jejich senzibilizaci plazmou s protilátkami proti PF4 za přítomnosti heparinu o konc. 0,1 IU/ml. K měření se používá dárcovská plazma bohatá na destičky získaná centrifugací při 1000g.

Vícenásobný elektrodový test je založen na detekci dárcovských trombocytů senzibilizovaných přítomností protilátek proti destičkovému faktoru 4. Indukovaná destičková agregace je měřena v nižší koncentraci heparinu 2 IU/ml. V případě pozitivního nálezu se měření opakuje, ale při vyšší koncentraci heparinu. Ta by měla způsobit inhibici komplexu Ab-PF4-heparin.

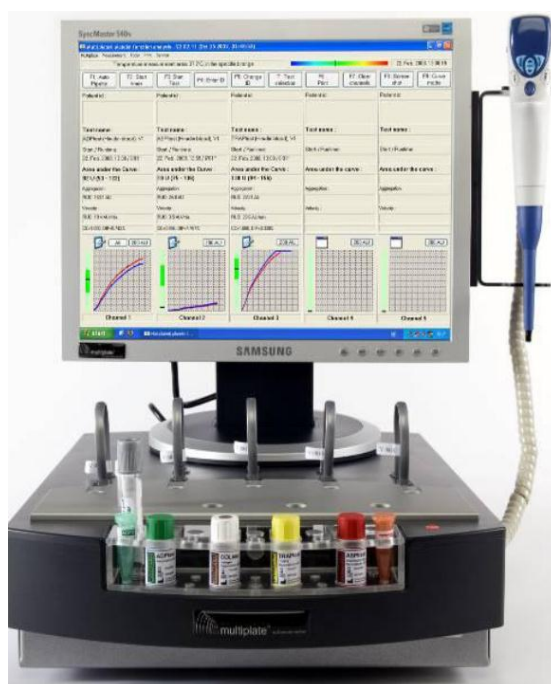
Na rozdíl od optické agregometrie disponuje vyšší citlivostí a měření se provádí v citrátové krvi, nikoliv v plazmě bohaté na krevní destičky. Bylo zjištěno, že u MEA dochází k agregaci mnohem rychleji než u LTA s delší časovou prodlevou (Kopp et al., 2009).

Mezi funkční testy se zařazuje i heparinem indukovaná aktivace destiček (HIPA). Jedná se o test, který se provádí na mikrotitračních destičkách a výsledek se odečítá proti černému pozadí (Králová et al., 2006).

Podle (Walenga et al., 1999) je nejlepší volbou diagnostiky HIT II kombinace všech skupin testů. Tedy ELISA, agregace a SRA. Tento postup zvyšuje senzitivitu až na 83%.

V současné době se provádí studie v objevu nových metod, které jsou schopné detekovat protilátky v případě HIT II. Jednou z nich je cytoflowmetrická detekce aktivace trombocytů HIT protilátkami, využívání reaktivních a promytých dárcovských

trombocytů v agregometrii a lumiagregometrii. Ta je založena na detekci uvolněného ATP z destiček (Stewart et al., 1995), (Tomer et al., 1999).



Obr. 9 Multiplate® analyzer (přepřacované podle <http://multiplate.net/en/leftinstrument.php>).

Princip metody MEA

MEA využívá přístroj Multiplate, který slouží pro komplexní vyšetření funkce krevních destiček v plně nesrážlivé krvi. Měření je založeno na principu impedanční agregometrie, který popsali na začátku 80. let minulého století pánové Cardinal a Flower. Vysoká spolehlivost testu je zajištěna paralelním měřením pomocí dvojice nezávislých senzorů v každé testovací kyvetě. Kontinuita měření je zajištěna magnetickým míchadlem uvnitř kyvety. Senzor v kyvetě se skládá ze dvou vodivých měděných drátků potažených stříbrem. Po aktivaci krevních destiček se senzibilizované trombocyty aktivují, čímž vytvářejí charakteristická filopodia. Takto aktivované trombocyty (díky většímu náboji povrchu buňky) jsou vychytávány na elektrodách, čímž zvětšují odpor mezi těmito elektrodami. Výsledkem je křivka, která udává závislost agregace destiček vyjádřenou v agregačních jednotkách AU, na čase v minutách (Pecka et al., 2010). Obecně se posuzují tři základní parametry měření a to: plocha pod křivkou, maximální amplituda agregace a maximální sklon agregace. Vzorek analyzovaný tímto přístrojem musí být zpracován nejpozději do tří hodin po odběru a musí být uchovávan při pokojové teplotě (Pecka et al., 2010). Samotný

přístroj obsahuje 5 měřících kanálů, které nám umožňují změřit jednoho pacienta pětkrát anebo 5 pacientů současně. Pipetování je obstaráno elektronovou interaktivní pipetou. Instrument využívá software Windows XP a vykonává automatickou analýzu s vlastní dokumentací.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Materiál a chemikálie

- **Přístrojové vybavení**
 - Multiplate® analyzer (Dynabyte, Mnichov, Německo)
 - Pipety (Eppendorf AG, Hamburk, Německo)
 - ELISA reader (LabSystems, Finsko)
- **Diagnostika a odběrový systém**
 - Vakuované zkumavky (3,8% citrát sodný, Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)
 - ELISA TECHNOZYM HIT IgG (Technoclone GmbH, Rakousko)
 - roztok heparinu 2 IU/ml ve fyziologickém roztoku
 - roztok heparinu 50 IU/ml ve fyziologickém roztoku
- **Biologický materiál**
 - Dárcovské trombocyty
 - Krevní plazma
- **Chemikálie**
 - Heparin (5000 UI/1ml, Zentiva, Opava)
 - Fyziologický roztok NaCl 0,9%

Použité metody

ODBĚR KRVE

Vzorek krve byl odebrán mezi 7. a 9. hodinou ranní na lačno. Odběr byl realizován do jednorázové vakuové zkumavky s použitím jehly VACUETTE® (Greiner Bio-One, Rakousko) - obsahují pufrovaný roztok citrátu sodného o koncentraci 0,109 mol/l (3,2%). Systém zajistí promíchání antikoagulantu s krví v požadovaném poměru 1:10. Následně je zkumavka promíchána tím, že je několikrát opatrně převrácena dnem vzhůru a transportována do laboratoře, kde je nejpozději do 2 hodin zpracována. Vzorek je nejprve centrifugován 3 minuty při 7200 g, z horní vrstvy je odpipetováno 0,5 ml plazmy chudé na destičky (PPP) a ta je následně zamražená a uchována při - 70°C do provedení analýzy. Pro vlastní analýzu je vzorek rozmražen v termostatu při 37°C po dobu 20 min. Pro veškerá měření byly odběry provedeny stejným zdravotním personálem.

DÁRCOVSKÉ TROMBOCYTY

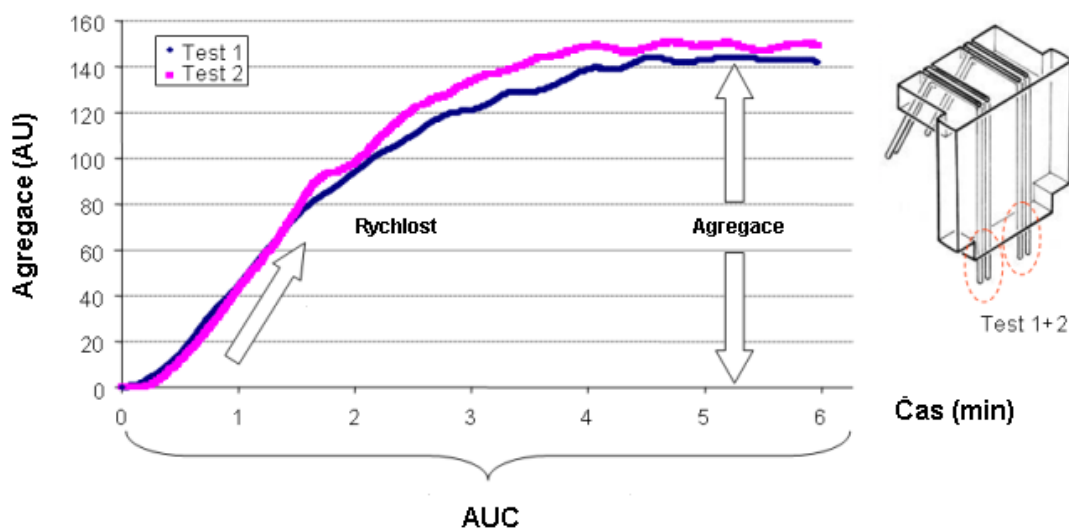
Dárcovské trombocyty jsou získány centrifugací (1000 g po dobu 10 min.) vzorku plné krve odebrané od dárce, který nebyl léčen v posledním roce hepariny, do VACUETTE® (Greiner Bio-One, Rakousko) - obsahují pufrovaný roztok citrátu sodného o koncentraci 0,109 mol/l (3,2%).

IMPEDANČNÍ AGREGOMETRIE

K měření impedanční agregometrie bylo použito přístroje Multiplate s poloautomatickým dávkováním. Vlastní experiment byl proveden následovně:

Automatickou pipetou bylo napipetováno 300 µl citrátové krve s dárcovskými trombocyty, ke kterým bylo přidáno 150 µl roztoku heparinu o koncentraci 2 IU/ml, po inkubaci 2 minut při teplotě 37°C bylo přidáno 150 µl PPP, čímž bylo započato měření impedance, vlastní měření trvá 20 minut za kontinuálního míchání vzorku uvnitř kyvety. Po celou dobu měření je kontinuálně zaznamenávána impedance obou párů elektrod. Konečný výsledek je průměr maximální impedance naměřené po 20 minutách na obou párech elektrod. Výsledky měření jsou zobrazeny graficky - vzor grafu je uveden na obr. 10. Pro hodnocení pozitivitu testu bylo převzato cut-off 20 AU*min. z literárního zdroje (Kopp et al., 2009).

V případě pozitivitu testu se měření provádí opakovaně s koncentrací heparinu 50 IU/ml, která zajišťuje minimálně inhibici aktivace destiček vyvolanou PF4 při aktivaci konc. heparinu 2 IU/ml o více než 50 %.



Obr. 10 Graf z vyhodnocení analýzy na Multiplate analyzátoru: plocha pod křivkou (AUC): sklon a celková výška, agregace (AU): výška oblouku, rychlost (AU*min): maximální sklon křivky (přepracované podle <http://multiplate.net/en/parameter.php>).

ELISA TECHNOZYM HIT IgG

Pro vlastní měření byla použita PPP pacientů opět po rozpuštění při 37°C po dobu 20 minut v termostatu. Vzorky plazmy pacientů o objemu 10 µl byly zředěny roztokem ředícího pufru o objemu 500 µl. Před samotným ELISA testem byly připraveny roztoky promývacího pufru, kontrolní plazmy a pracovní konjugát.

Příprava pracovních roztoků:

- Promývací roztok byl připraven smícháním 25 ml promývacího pufru s 225 ml destilované vody.
- Kontrolní plazmy byly rozpuštěny v 500 µl destilované vody.
- Pracovní konjugát o objemu 80 µl byl naředěn 3,920 ml ředícího pufru.

ELISA test provedení:

Pre-inkubační fáze

- Napipetujeme 200 µl promývacího pufru do každé destičky.
- Inkubace po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.

Inkubační fáze

- Přidání 50 µl naředěných vzorků pacientů (vždy v duplikátu). Do dvou jamek byly napipetovány pozitivní a negativní kontroly plazmy.
- Do jamek přidáme 50 µl pracovního konjugátu.
- Destičku překryjeme filmem a inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 30 minut.

Promývací fáze

- Promývacím pufrům provedeme 5x opakované promytí o objemu 200 µl.

Substrátová reakce

- Přidáme 100 µl substrátu do každé jamky.
- Destičku překryjeme filmem a inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 30 minut.

Stop reakce

- Do jamek přidáme 100 µl Stop pufru.

Fáze měření

- Měření provedeme na ELISA-readeru při vlnové délce 450 nm.

Hodnocení

- Za pozitivní jsou považovány výsledky s cut-off dle výrobce s absorbančí nad 0,5 nm.

VÝSLEDKY A DISKUZE

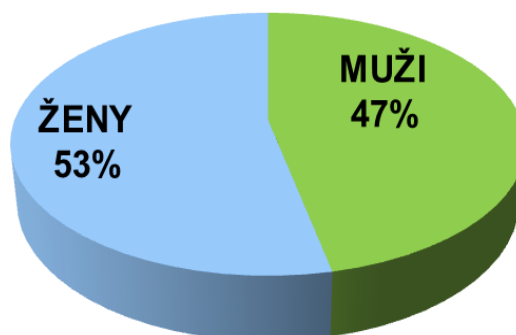
Soubor pacientů

Vyšetření přítomnosti HIT bylo provedeno na skupině 60 pacientů léčených v předešlých 14 dnech hepariny. Pro vyšetření byla vybrána selektovaná skupina pacientů splňujících klinická kritéria možného výskytu HIT protilátek (označovaná jako 4T kritéria) - léčba heparinem v předešlých dvou týdnech, pokles počtu krevních destiček minimálně o 30 % nebo jejich celkové snížení pod $20 \times 10^9/l$, manifestace trombembolie při léčbě hepariny a vyloučení jiné příčiny trombocytopenie.

V souboru pacientů bylo 32 žen (53%) a 28 mužů (47%). Průměrný věk u žen byl 56,5 roku s mediánem 64,5. U mužů byl průměrný věk 64,2 s mediánem 68.

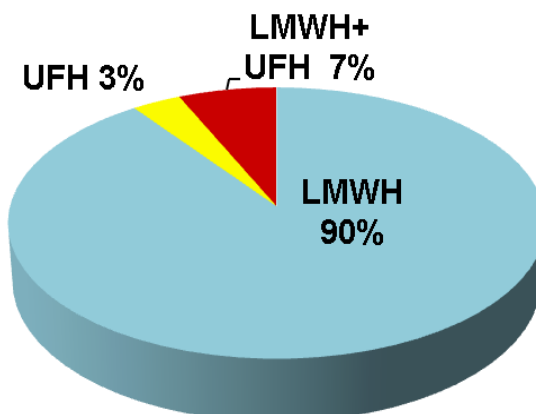
Převážná většina pacientů byla léčena LMWH, část kombinací LMWH a UFH a pouze malé procento samotným UFH.

Soubor pacientů



Obr. 11 Procentuální zastoupení mužů a žen v souboru vyšetřených pacientů.

Typ heparinu



Obr. 12 Procentuální zastoupení typů heparinů v souboru léčených pacientů.

Vlastní výsledky:

- MEA

Přehled naměřených výsledků metodou vícenásobného elektrodového testu je uveden v tabulce 2.

Pacient	MEA - indukce 2 IU/ml UFH (AU*min)	Typ heparinu	PLT (x10 ⁹ /l)	APTT (s)
P1	7,5	LMWH	17	30,2
P2	6,4	LMWH	121	37,1
P3	0,8	LMWH	65	38,6
P4	3,4	LMWH	176	34
P5	1,9	LMWH	176	47,7
P6	1,5	LMWH	46	42,4
P7	2,3	LMWH	86	36,7
P8	0,4	LMWH	66	47,2
P9	6	LMWH	199	35,6
P10	3,4	UFH	414	54
P11	1,9	LMWH	319	68
P12	1,1	LMWH	106	39,6
P13	28,5	LMWH	285	57,7
P14	0,8	LMWH	151	-
P15	16,1	UFH	150	75,4
P16	19,1	LMWH	280	56,5
P17	10,5	UFH + LMWH	186	101,8
P18	8,6	LMWH	149	52,5
P19	15	LMWH	238	59,4
P20	1,9	LMWH	269	41
P21	6,4	LMWH	88	27,5
P22	2,6	LMWH	135	45,5
P23	2,6	LMWH	138	49,2
P24	10,1	LMWH	49	37,3
P25	13,1	LMWH	168	22,8
P26	6,8	LMWH	102	26
P27	3,8	LMWH	218	37,4
P28	1,5	LMWH	238	38,8
P29	21,4	LMWH	57	43,4
P30	14,3	LMWH	166	37
P31	8,6	LMWH	151	38,4
P32	14,3	LMWH	49	29,4
P33	10,9	UFH + LMWH	176	77,9
P34	9,4	LMWH	138	32,4
P35	0,8	UFH + LMWH	173	53,7
P36	4,9	UFH + LMWH	73	42,4
P37	1,1	LMWH	104	43,5
P38	10,5	LMWH	67	29,6
P39	21,4	LMWH	20	40,1
P40	0	LMWH	63	47
P41	12,4	LMWH	48	60,6
P42	9	LMWH	228	54,4

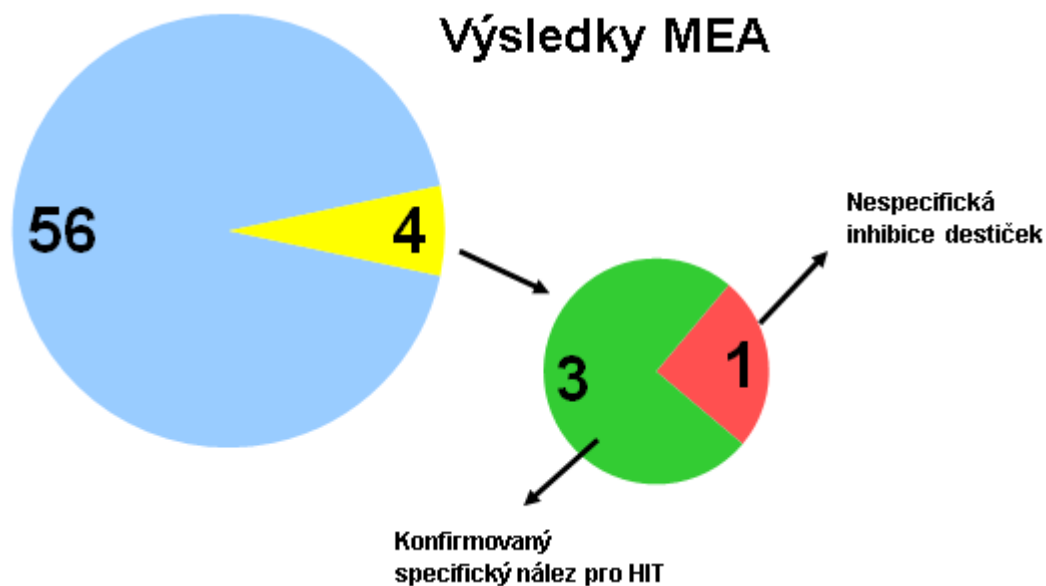
P43	10,1	LMWH	254	33,6
P44	30	LMWH	103	37,7
P45	4,1	LMWH	115	37,7
P46	7,5	LMWH	218	32,2
P47	2,3	LMWH	206	37,4
P48	2,6	LMWH	59	87,6
P49	2,3	LMWH	28	56,4
P50	3,4	LMWH	227	39,4
P51	4,1	LMWH	131	36,4
P52	8,6	LMWH	45	88,7
P53	5,6	LMWH	183	71,8
P54	14,6	LMWH	83	35,8
P55	4,5	LMWH	92	37,9
P56	3,4	LMWH	108	36,6
P57	4,1	LMWH	18	25
P58	5,3	LMWH	215	48,2
P59	2,3	LMWH	260	40,7
P60	2,6	LMWH	130	41,9

Tab. 2 Tabulka naměřených výsledků metodou MEA. Celkový počet vyšetřených pacientů činil 60 mužů a žen léčených heparinem. AU*min. - zkratka vyjadřuje celkové zvýšení měřeného odporu mezi elektrodami přímo úměrné množství aktivovaných krevních destiček. PLT je označení pro počet krevních destiček. Fyziologické hodnoty PLT jsou v rozmezí 150 – 400.10⁹/l. APTT je zkratka pro aktivovaný parciální tromboblastinový čas. APTT je základní koagulační test, který je v koagulačních laboratořích využíván ke sledování léčby heparinem, měří se v sekundách.

Hodnota AU*min. - pro agregaci protilátkou neaktivovaných destiček je definována klinicky i literárně v rozmezí 0,0 – 20,0 AU*min. Pozitivní pacienti byli celkem 4 metodou MEA. Výsledky těchto pacientů byly potvrzeny měřením s vyšší koncentrací heparinu, která inhibuje vliv protilátek proti PF4 (hlavní příčině HIT) tab. 3.

Pacient	MEA - indukce 50 IU/ml UFH (AU*min.)
P13	16,1
P29	38,3
P39	4,9
P44	8,6

Tab. 3 Znárodnění naměřených výsledků metodou MEA při indukci 50 IU/ml UFH. Vyšší koncentrace heparinu způsobila inhibici tvorby komplexu PF4-Ab-heparin u 75 % pacientů pozitivních ve screeningu. Pouze jeden pacient měl hodnotu vyšší.



Obr. 13 Grafické znázornění výsledků metodou MEA.

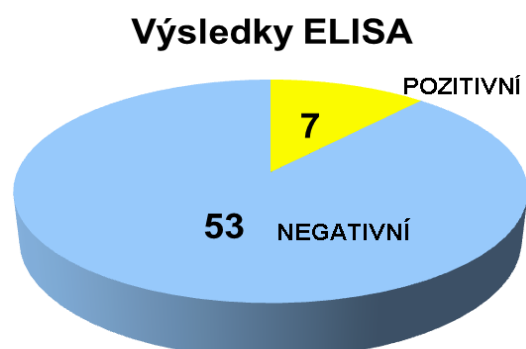
- **ELISA**

Skupina 60 pacientů byla vyšetřena současně imunologickým testem. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 4.

Pacient	ELISA HIT $\lambda=450$ nm (Abs.)	Typ heparinu
P1	0,266	LMWH
P2	0,224	LMWH
P3	1,164	LMWH
P4	0,178	LMWH
P5	0,316	LMWH
P6	0,294	LMWH
P7	0,254	LMWH
P8	0,294	LMWH
P9	0,174	LMWH
P10	0,214	UFH
P11	0,404	LMWH
P12	0,384	LMWH
P13	0,234	LMWH
P14	0,274	LMWH
P15	0,210	UFH
P16	0,304	LMWH
P17	0,278	UFH + LMWH
P18	0,148	LMWH
P19	0,162	LMWH
P20	0,516	LMWH
P21	0,306	LMWH
P22	0,194	LMWH
P23	0,264	LMWH
P24	0,302	LMWH
P25	0,178	LMWH
P26	0,154	LMWH

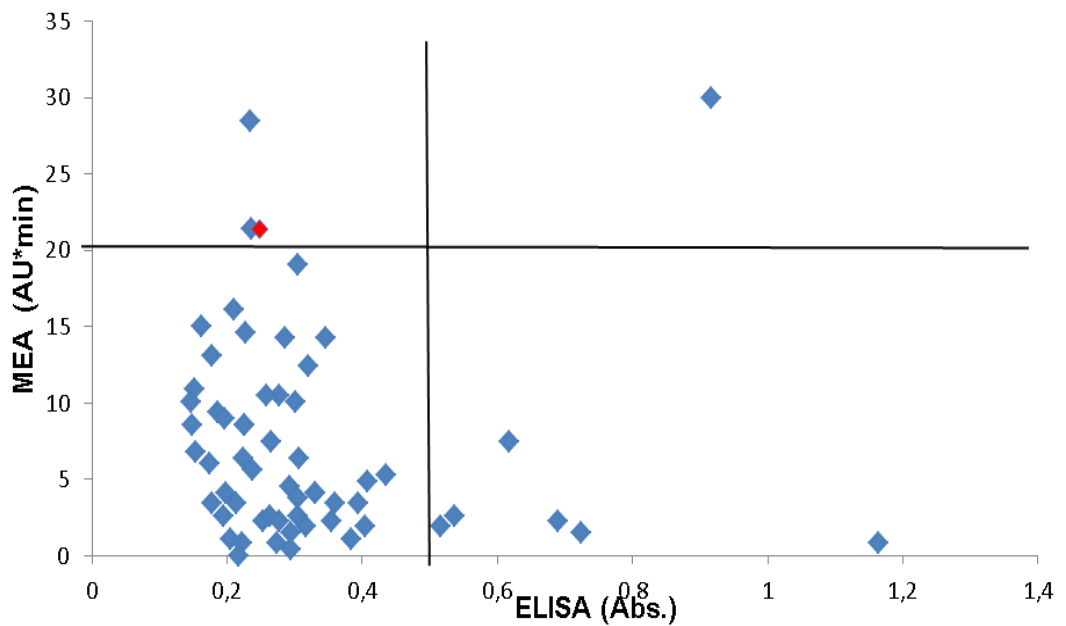
P27	0,304	LMWH
P28	0,724	LMWH
P29	0,248	LMWH
P30	0,286	LMWH
P31	0,226	LMWH
P32	0,346	LMWH
P33	0,152	UFH + LMWH
P34	0,186	LMWH
P35	0,222	UFH + LMWH
P36	0,408	UFH + LMWH
P37	0,206	LMWH
P38	0,258	LMWH
P39	0,236	LMWH
P40	0,218	LMWH
P41	0,320	LMWH
P42	0,196	LMWH
P43	0,146	LMWH
P44	0,916	LMWH
P45	0,330	LMWH
P46	0,618	LMWH
P47	0,354	LMWH
P48	0,304	LMWH
P49	0,690	LMWH
P50	0,360	LMWH
P51	0,198	LMWH
P52	0,226	LMWH
P53	0,238	LMWH
P54	0,228	LMWH
P55	0,292	LMWH
P56	0,394	LMWH
P57	0,33	LMWH
P58	0,436	LMWH
P59	0,278	LMWH
P60	0,536	LMWH

Tab. 4 Znárodnuje pacienty vyšetřené imunologickým testem. V daném měření bylo 7 pacientů pozitivních při cut-off nad 0,5.



Obr. 14 Vyhodnocení ELISA testu.

Porovnání testů



Obr. 15 Porovnání testů MEA a ELISA testu. Graf zaznamenává korelaci výsledků obou metod. U MEA je pozitivita nad hodnotu 20,0 AU*min a u ELISA nad 0,500 Abs. Podle očekávání metodou ELISA vyšlo více pozitivních než u MEA.

Hodnota Abs. - pro vzorky bez přítomnosti protilátek proti PF4 je definována literárně v rozmezí 0,0 – 0,5. Pozitivních pacientů bylo celkem 7.

ZÁVĚR

Výsledky vyšetření pilotního souboru pacientů léčených oběma typy heparinů ukázaly, že použité metodiky poskytují značně rozdílné výsledky. Tento závěr plně koresponduje s teoretickými modely, na jejichž základě byla vyšetření heparinem indukované trombocytopenie navržena. ELISA metodika vyšetření protilátek nám poskytuje informaci o přítomnosti všech typů protilátek (převážně IgG) proti destičkovému faktoru 4, čímž je splněn požadavek na vysokou senzitivitu, nicméně nám neposkytuje žádnou informaci o samotné aktivaci krevních destiček, která je nezbytná ke klinické manifestaci HIT ve formě trombocytopenie.

MEA metodika nám naopak poskytuje informaci pouze o aktivovaných krevních destičkách v přítomnosti heparinu, což plně koresponduje s modelem aktivace krevních destiček při klinické manifestaci HIT. Nicméně nám neposkytuje žádnou informaci o přítomnosti protilátek, které zatím neaktivují krevní destičky, nicméně mohou tuto reakci vyvolat v delším časovém intervalu.

Z naměřených dat plyne, že pouze u jediného pacienta, ze 3 pozitivních metodou MEA resp. 7 ELISA metodou byl pozitivní nález oběma metodami. U dalších pacientů byl pozitivní pouze jeden z testů. Pozitivita ELISA testu na přítomnost protilátek HIT je 11,67 %, pozitivita MEA na přítomnost aktivovaných trombocytů inhibovanou vys. konc. UFH 5 %. Pozitivita alespoň v jednom z testů 13,3 %.

Pro hodnocení specifity a senzitivity obou metod je třeba vyhodnotit větší soubor pacientů s jasně definovanými klinickými kritérii pro manifestaci HIT do formy trombocytopenie nebo dokonce trombembolické příhody.

LITERATURA

1. Albeiro L., Kimmerle S., Baumann A. et al. (2003), Rapid determination of anti-heparin/platelet factor 4 antibody titers in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, *Am J Med* **114**, 528–536.
2. Andersson L. O., Barrowcliffe T.W., Holmer E., Johnson E.A., Söderström G. (1979), Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma, *Thromb Res* **15**, 531-541.
3. Elalamy I., Galea V., Hatmi M., Gerotziafas G.T. (2009), Heparin-induced multiple electrode aggregometry: a potential tool for improvement of heparin-induced thrombocytopenia diagnosis, *J Thromb Haemost* **7**, 1932 – 1934.
4. Greinacher A., Althaus K., Krauel K., Selleng S. (2010), Heparin-induced thrombocytopenia, *Hamostaseologie* **30**, 17-8, 20-8.
5. Greinacher A., Levy J. H. (2008), HIT happens: diagnosing and evaluating the patient with heparin-induced thrombocytopenia, *Anesth Analg* **107**, 356 – 358.
6. Kelton J.G., Warkentin T.E. (1995), Diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, still a journey, not yet a destination, *Am J Clin Pathol* **104**, 611–613.
7. Levy-Toledano S., Gallet C., Nadal F. et al. (1997), Phosphorylation and dephosphorylation mechanism in platelet function a tightly regulated balance, *Thromb Haemost* **78**, 226-227.
8. Malý J., Pecka M., Dulíček P., Bláha M., Jebavý L., Kmoníček M., Vodičková L., (1999), Jsou všechny nízkomolekulární hepariny stejné?, *Trombóza a hemostáza*, Malý J. & Pecka M., pp 24-25.
9. Mark D.B., Hlatky M.A., Califf R.M., Naylor C.D., Lee K.L., Armstrong P.W., Barbash G., White H., Simoons M.L., Nelson C.L. (1995), Cost effectiveness of thrombolytic therapy with tissue plasminogen activator as compared with streptokinase for acute myocardial infarction, *N Engl J Med* **332**, 1418-1424.
10. Matýšková M., Zavřelová J., Hrachovinová I. (1999) *Hematologie pro zdravotní laboranty*, 2.díl Krevní srážení, IDVPZ Brno, Brno.
11. Meyer O., Salama A., Pittet N. et al. (1999), Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4), *Lancet* **354**, 1525–1526.

12. Morel-Kopp M.C., Aboud M., Tan C.W., Kulathilake C, Ward C. (2010), Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies, *Thromb Res* **125**, 234 – 239.
13. Nosál R., Jančinová V. (1990) Krvné doštičky v biológii a medicíne, pp 23-44, Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied, Bratislava.
14. Novotný J., Konvičková L. (1998), Heparinem indukovaná trombocytopenie – prehľadný referát, *Vnitř Léč* **44**, 282–287.
15. Pazuner R., Greinacher A., Selleng K., Althaus K., Shenkman B., Seligsohn U. (2009), False-positive tests for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus, *J Thromb Haemost* **7**, 1070-1074.
16. Pecka M. (2004), Laboratorní hematologie v přehledu- Fyziologie a patofyziologie hemostázy, pp 28-219, FINIDR, Český Těšín.
17. Pecka M., Bláha M., Fátorová I., Kratochvíl J., Měříčka P., Pešková E., Sadílek P., Váchová M., Vokurková D. Vrbacký F. (2010), Praktická Hematologie, Laboratorní metody, pp 43-187, FINIDR, Český Těšín.
18. Polack B., Schved J.F., Boneu B. (2001), Preanalytical recommendations of the 'Groupe d'Etude sur l'Hemostase et la Thrombose' (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories, *Haemostasis* **31**, 61-68.
19. Králová S., Klodová D., Gumulec J., Novotný J., Klaricová K., Wróbel M., Brejcha M., Šumná E. (2006), Heparinem indukovaná trombocytopenie, *Vnitř lék* **52**, 98-106.
20. Selleng S., Malowsky B., Itterman T., Bagemühl J., Wessel A., Wollert H.G., Warkentin T.E., Greinacher A. (2010), Incidence and clinical relevance of anti-platelet factor 4/heparin antibodies before cardiac surgery, *Am Heart J* **160**, 362–369.
21. Sobel J. H., Gawinowicz M.A. (1996), Identification of the alpha chain lysine donor sites involved in factor XIIIa fibrin cross-linking, *J Biol Chem* **271**, 19288-19297.
22. Stewart M.W., Etches W.S., Boshkov K. et al. (1995), Heparin-induced thrombocytopenia: an improved method of detection based on lumi-aggregometry, *Brit J Haematol* **91**, 173–177.
23. Tomer A., Masalunga C., Abshire T.C. (1999), Determination of heparin-induced thrombocytopenia: A rapid flow cytometric assay for direct demonstration of antibody - mediated platelet activation, *Am J Hematol* **61**, 53–61.

24. Vácha M., Fellnerová I., Bičík V., Petrásek R., Šimek V. (2008) Srovnávací fyziologie živočichů, pp. 60–61, Masarykova univerzita, Brno.
25. Walenga J.M., Jeske W.P., Wood J.J. et al. (1999), Laboratory tests for heparin-induced thrombocytopenia: a multicenter study, *Semin Hematol* **36**, 22–28.

POUŽITÉ ZKRATKY

AA	kyselina arachidonová
Ab	protilátky
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
APC	aktivovaný protein C
APC-R	rezistence na aktivovaný protein C
APS	antifosfolipidový syndrom
Arg	Arginin
AT	antitrombin
CNS	centrální nervová soustava
DTS	denzní tubulární systém
F VII	koagulační faktor v neaktivní formě
F VIIa	koagulační faktor v aktivované formě
GP Ib	glykoprotein Ib
GP IIb/IIIa	glykoprotein IIb/IIIa
Hc	homocystein
HIPA	heparin-induced platelet activation
His	Histidin
Ka	kalikrein
LMWH	nízkomolekulární heparin
LTA	light transmission aggregometry
MEA	Multiplate electrode assay
MF	mikrofilamenta
OKS	otevřený kanálikulární systém
PDGF	destičkový růstový faktor
PF3	destičkový faktor 3
PF4	destičkový faktor 4
PL	fosfolipid
plg	plazminogen
PPACK	D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginin chloromethylketon
PPP	plazma chudá na destičky
PS	protein S
SK	streptokinasa
SRA	serotoni release assay
TF	tkáňový faktor

t-Pa	tkáňový aktivátor plazminogen
TXA ₂	tromboxan A ₂
UFH	nefrakcionovaný heparin
u-Pa	urokináza
vWf	von Willebrandov faktor
βTG	β-tromboglobulin