

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Vliv vrozených hyperkoagulačních stavů na hladinu
D-dimerů se zaměřením na gravidní ženy**

Diplomová práce

Zuzana Štíhová

Školitel: MUDr. Ivan Vonke, MBA

České Budějovice 2017

Štíhová Z., 2017: Vliv vrozených hyperkoagulačních stavů na hladinu D-d se zaměřením na gravidní ženy [The effect of inherited trombophilia on D-dimer concentration in pregnancy. Mgr. Thesis, in Czech] – p. 88, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The thesis analyses the female patients' data from Clinical hematology department in České Budějovice hospital from year 2014 to 2015 and tries to statistically confirm connection between D-dimer level and hypercoagulable states described in previous bachelor thesis. D-dimer assay is due to negative predictive value and high sensitivity an initial laboratory test to rule out tromboembolic disease. However, it has low specificity. The elevated level of D-dimer is observed in conditions like infection, trauma, acute cancer, recent surgery or pregnancy and last studies showed increased D-dimer level even in combination with inherited hypercoagulable states. Thus, it is necessary to analyse the level of D-dimer in pregnant women related to specific hypercoagulable states. Moreover, the thesis analyses the influence of other factors like anticoagulation therapy on D-dimer level and tries to find connection between D-dimer level and pregnancy associated complication, birth weight or a type of delivery.

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

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

V Českých Budějovicích, 11. 12. 2017

.....

Zuzana Štíchová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu primáři MUDr. Ivanu Vonkemu, MBA za cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou projevoval po celou dobu vedení diplomové práce. Další poděkování patří vedoucí pracoviště hematologie Mgr. Nadě Roučkové za odborné rady a Mgr. Ondřeji Mottlovi za pomoc se statistickým zpracováním dat. Poděkování patří i celé mé rodině za podporu a trpělivost nejen při psaní diplomové práce, ale po celou dobu studia

OBSAH

1 Úvod	- 1 -
2 Literární přehled	- 3 -
2. 1 Fyziologie srážení krve.....	- 3 -
2. 2 Hemostáza	- 3 -
2. 2. 1 Vazokonstrikce	- 4 -
2. 2. 2 Primární hemostáza	- 5 -
2. 2. 3 Sekundární hemostáza	- 8 -
2. 2. 4 Tvorba fibrinové sítě	- 11 -
2. 3 Fibrinolýza.....	- 13 -
2. 3. 1 D-dimery.....	- 14 -
2. 4 Trombofilie.....	- 16 -
2. 4. 1 Leidská mutace	- 18 -
2. 4. 2 Mutace protrombinu 20210A	- 19 -
2. 4. 3 Deficit antitrombinu	- 19 -
2. 4. 4 Deficit proteinu C	- 20 -
2. 4. 5 Deficit proteinu S	- 21 -
2. 4. 6 Zvýšená hladina FVIII.....	- 22 -
2. 4. 7 Hyperhomocysteinemie	- 23 -
2. 4. 8 Antifosfolipidový syndrom	- 24 -
2. 5 Trombofilie a těhotenství.....	- 26 -
2. 5. 1 Příčiny TEN v těhotenství	- 26 -
2. 5. 2 Diagnostika TEN v těhotenství	- 27 -
2. 5. 3 Léčba TEN v těhotenství	- 28 -
3 Cíle práce	- 30 -
4 Materiály a metodika	- 31 -

4. 1 Indikace ke koagulačnímu vyšetření	- 31 -
4. 2 Odběr krve a její zpracování.....	- 32 -
4. 3 Kvantitativní automatizované stanovení hladiny D-d	- 33 -
4. 3. 1 Innovance D-dimer	- 34 -
4. 4 Metodika získání a úpravy dat.....	- 37 -
4. 5 Statistické zpracování dat	- 38 -
4. 5. 1 Vliv hyperkoagulačního stavu na hladinu D-d	- 38 -
4. 5. 2 D-dimery ve vztahu k predikci porodních komplikací.....	- 38 -
4. 5. 3 Vliv nezávislých náhodných proměnných na hladinu D-d.....	- 39 -
5 Výsledky	- 40 -
5. 1 Analýza údajů vyšetřovaného souboru.....	- 40 -
5. 2 Prevalence vrozených hyperkoagulačních stavů v souboru	- 43 -
5. 2. 1 Charakteristika dat se zaměřením na hyperkoagulační stavy.....	- 43 -
5. 2. 2 Určení prevalence vrozených hyperkoagulačních stavů v souboru.....	- 45 -
5. 3 Stanovení hladin D-d u vrozených hyperkoagulačních stavů	- 46 -
5. 3. 1 Základní statistická analýza.....	- 47 -
5. 3. 2 Vliv hyperkoagulačního stavu na hladinu D-d.....	- 48 -
5. 4 D-dimery ve vztahu k predikci porodních komplikací.....	- 53 -
6 Diskuse.....	- 59 -
6. 1 Analýza údajů vyšetřovaného souboru.....	- 59 -
6. 2 Prevalence vrozených hyperkoagulačních stavů v souboru	- 61 -
6. 3 Vliv hyperkoagulačního stavu na hladinu D-d	- 63 -
6. 4 D-dimery ve vztahu k predikci porodních komplikací.....	- 65 -
7 Závěr	- 68 -
8 Seznam použitých zkratk	- 69 -
9 Seznam použité literatury	- 72 -

1 Úvod

Kardiovaskulární choroby jsou v současné době nejčastější příčinou smrti v rozvinutých zemích. Ačkoliv Česká Republika patří ke špičce v léčbě nemocí oběhové soustavy, jsou zde i přesto nemoci srdce a cév hlavní příčinou úmrtí. Například v roce 2016 dle Českého statistického úřadu zemřelo 47 611 osob na nemoci oběhové soustavy, což tvoří 44 % z celkového počtu zemřelých.

Jednotlivá onemocnění oběhové soustavy mají často jediného původce a tím je tzv. tromboembolická nemoc (TEN). TEN je komplexní onemocnění, které vzniká v důsledku společného působení vrozených a získaných rizikových faktorů a dochází při něm k nadměrnému srážení krve, které se v organismu projevuje jako hluboká žilní trombóza či plicní embolie. Včasnou diagnostikou společně se znalostí rizikových faktorů spojených se zvýšeným nebezpečím rozvoje TEN je možné těmto život ohrožujícím stavům předejít.

V laboratorní diagnostice je k vyloučení tromboembolické příhody používáno vyšetření tzv. D-dimerů (D-d). D-d jsou fragmenty fibrinu vznikající v organismu při rozkladu krevní sraženiny, které už nejsou dále štěpeny a jejichž hladina v plazmě může být detekovatelná imunochemickými metodami. Vyšetření D-d je laboratorním testem s tzv. negativní prediktivní hodnotou, kdy výpovědní hodnotu má negativní výsledek vyšetření, který s vysokou citlivostí vylučuje TEN. Avšak je to vyšetření s poměrně nízkou diagnostickou specifitou, protože hladiny D-d stoupají nejen u TEN, ale u celé řady dalších stavů, které jsou spojovány se zvýšeným rizikem trombóz, jako je např. těhotenství. U těchto stavů je vyšetření D-d často indikováno, nicméně při použití běžných cut-off hodnot dochází k výraznému snížení diagnostické senzitivity D-d.

Stavů spojených s nárůstem hladiny D-d existuje celá řada a kromě výše zmíněné gravidity se jedná např. o pooperační stavy, infekce či rakovinu v aktivním stádiu. Zaznamenán byl nárůst D-d i u vrozených hyperkoagulačních stavů, jakým je např. leidská mutace FV. K tomu, aby vyšetření D-d mohlo být s dostatečnou citlivostí použito i v těchto případech, je potřeba provést studie sledující změny v hladinách D-d u konkrétních stavů a u jejich kombinací.

Skutečnost, že hladina D-d postupně během těhotenství vzrůstá, je potvrzena mnohými studii a známy jsou dokonce i přibližné cut-off hodnoty pro jednotlivé trimestry. Avšak v organismu se často objevuje více hyperkoagulačních stavů najednou a můžeme pouze spekulovat, jak se v takovém případě hladina D-d zachová. V lékařské praxi je například velmi častý společný výskyt hyperkoagulačního stavu a gravidity, kterým se zabývá tato diplomová práce. Otázkou je, zda i v takovém případě bude hladina D-d postupně během jednotlivých trimestrů stoupat, aniž by odrážela TEN. Pro lékaře je proto důležité znát alespoň přibližné změny hodnot D-d u těchto stavů, které pomohou správně načasovat vhodnou profylaxi a zabránit tromboembolické příhodě, či rozvoji porodních komplikací.

Z výše uvedených důvodů se ve své diplomové zaměřím na prevalenci konkrétních hyperkoagulačních stavů u pacientek Ambulance klinické hematologie nemocnice v Českých Budějovicích (AKH) a pokusím se určit, jak se chová hladina D-d těhotných žen u nejčastěji diagnostikovaných trombofilních stavů. Hladina D-d bude analyzována i vzhledem k užívání antikoagulační léčby, konkrétně nízkomolekulárních heparinů (LMWH) a dále bude sledována i závislost hladiny D-d a trombofilie na rozvoji porodních komplikací. U gravidních žen s vrozenou trombofilií totiž vzrůstá riziko předčasných porodů a ve větší míře se objevují porodní komplikace, jako je preeklampsie, HELLP syndrom, či předčasné odloučení placenty.

2 Literární přehled

2.1 Fyziologie srážení krve

Krev je vysoce specializovaná tělní tekutina, plnící v organismu celou řadu úloh nezbytných k životu. Zajišťuje rozvod živin a kyslíku, odvod odpadních látek, termoregulaci, obranu organismu proti infekci, udržuje acidobazickou rovnováhu a onkotický tlak. Všechny tyto mechanismy se krev podílí na udržování stálosti vnitřního prostředí – homeostáze, která je nezbytná pro fyziologický průběh veškerých dějů.

Lidský organismus je citlivý i k sebemenším změnám ve složení tělních tekutin, a tudíž homeostáza krve musí být přísně udržována v každém okamžiku. Děje se tak za pomoci stálého toku krve, krevních destiček, cévního endotelu a koagulačních faktorů. Za fyziologických podmínek jsou v krevním řečišti přítomny koagulační faktory společně s trombocyty v neaktivním stádiu, kdy plynule cirkulují a nikterak vzájemně nereagují. Stejně tak cévní endotel je za fyziologického stavu neporušený a vylučuje různé vazodilatační a antiagregační látky. Pokud ale dojde k narušení této rovnováhy například zpomalením průtoku krve či poraněním cévního endotelu, organismus musí velmi rychle zareagovat a pokusit se homeostázu obnovit v co nejkratším čase.

Rychlý návrat k rovnováze zajišťují dva základní systémy. Prvním z nich je systém hemostatický vytvářející krevní sraženinu – trombus a zabraňující vykrvácení. Druhým je systém fibrinolytický, který má naopak za úkol včas proces srážení krve zastavit a posléze i vzniklý trombus rozpustit. Ačkoliv každý systém plní v organismu trochu jinou úlohu, jejich cíl je společný – navrátit rovnováhu vnitřního prostředí, a zabránit tak nekontrolovatelnému krevnímu srážení, nebo naopak krvácení.

2.2 Hemostáza

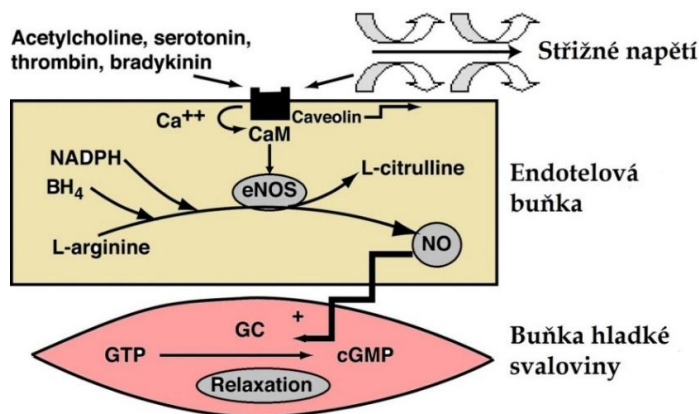
Hemostatický systém nastupuje v případě poranění cévy a jeho hlavními činiteli jsou trombocyty společně s cévní stěnou a plazmatickými koagulačními faktory. Celý proces zástavy krvácení – hemostázy je možno rozdělit do tří kroků: vazokonstrikce, tvorba primární zátky a posléze tvorba sekundární krevní zátky (Cito et al. 2013). Toto rozdělení je ale pouze obrazné, protože srážení krve je složitý dynamický proces a výše zmíněné kroky nepostupují jeden po druhém, ale vzájemně se prolínají a ovlivňují.

2. 2. 1 Vazokonstrikce

Vazokonstrikce je prvním rychle nastupujícím obranným mechanismem při poruchách homeostázy krevního řečiště. Při vazokonstrikci dochází ke smrštění buněk hladké svaloviny (VSMC), které se nacházejí v prostřední vrstvě cévy zvané *tunica media*. Smrštěním se zmenší průtok a sníží ztráty krve, dokud se nezaktivují trombocyty a nezačnou vytvářet tzv. primární zátku v místě poranění. Podnětem vyvolávajícím vazokonstrikci není jen přímé poranění cévní stěny, ale také pouhá změna proudění krve, či nízké střižné napětí krve. Tyto děje, ať už samostatně nebo společným působením, ovlivňují uvolňování vazoaktivních faktorů z vnitřní výstelky cévy – endotelu.

Endotel je „aktivním orgánem“, který produkuje faktory ovlivňující vasomotorický tonus. Mezi takové látky patří oxid dusnatý (NO), prostacyklin (PGI_2) a endoteliální hyperpolarizační faktor (EDHF), které působí vazodilatačně a jejich produkce za fyziologického stavu převládá. Existují ale i vazokonstrikčně působící faktory produkované endotelem jako je tromboxan A_2 (TXA_2) nebo endotelin-1 (ET-1). Z výše zmíněných je nejdůležitějším a nejlépe prostudovaným vazoaktivním faktorem NO.

Oxid dusnatý je tvořen přímo v endotelových buňkách z L-argininu pomocí enzymu NO syntézy (Obr. 1), konkrétně její endotelovou izoformou (eNOS). Tato izoforma enzymu se nachází v malých vchlípeninách membrány – kalveolech a je vázána na protein kaveolin. K tvorbě NO dochází při vzestupu intracelulární hladiny Ca^{2+} , která aktivuje eNOS (oddělí se od proteinu kaveolinu v kalveolách). Vápenatými ionty indukovaná tvorba NO je pouze krátkodobá a později jsou zapojeny i další mechanismy aktivace eNOS, například přímá fosforylace přes proteinkinázy. Takto vzniklá molekula NO pak difunduje přes endotelové buňky k VSMC, na které má přímý i nepřímý účinek. Tvorba NO je neustále aktivním mechanismem, jehož pochopení je klíčové v patogenezi hypertenze, aterosklerózy a dalších stavů spojených s rizikem tvorby krevních sraženin (Maiorana et al. 2003). Mechanismus účinku ostatních vazoaktivních faktorů vylučovaných endotelovými buňkami je podobný a většinou nastupuje až v případě nedostatečné tvorby NO.



Obr. 1: Tvorba oxidu dusnatého v endotelu a jeho působení na buňky hladké svaloviny: Vzniklá molekula NO se váže na rozpustnou guanylátcyklázu (GC). Takto aktivovaná GC způsobí defosforylaci GTP za vzniku cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), který funguje jako druhý posel a redukuje kontrakce buněk hladké svaloviny. Navíc NO působí i přímo na sarkoplazmatické retikulum VSMC a snižuje uvolňování Ca^{2+} a je také důležitým inhibátorem agregace krevních destiček (Van Hove et al. 2009). Upraveno dle Lauf et al. 1998.

2. 2. 2 Primární hemostáza

V druhém kroku hemostázy, kdy dochází k tvorbě prvotní krevní zátky – rozpustného bílého trombu, hrají hlavní roli krevní destičky. Trombocyty (trb) jsou diskovité úlomky buněk, které volně plují ve své neaktivní formě krevním řečištěm. Díky zápornému náboji endotelu a působkům jím vylučovaným nejsou trombocyty schopny přilnout (adherovat) k cévní stěně ani se vzájemně sdružovat (agregovat). Teprve pokud dojde k poškození cévy, obnaží se cévní stěna pod endotelem (subendotel), dojde ke změně náboje a krevní destičky se začnou svými adhesivními receptory přichytávat na odhalená kolagenová vlákna subendotelu.

Adheze

K adhezi dochází díky komplexu glykoproteinových receptorů GP Ia/IIa, GP Ib/V/IX a GP VI, které se nacházejí v různých počtech na povrchu trombocytů. Nejhojněji zastoupeným receptorem je na leucin bohatý glykoproteinový komplex GP Ib-V-IX, nacházející se na trombocytu až v 25 000 kopiích (Versteeg et al. 2013). Na rozdíl od ostatních dvou není tento transmembránový protein schopen přímé vazby na kolagenová vlákna, ale GP Ib-V-IX nese vazebné místo pro von Willebrandův faktor (vWF), který slouží jako můstek, přes nějž se destička na kolagenová vlákna váže. Poté, co destička takto adhezuje ke kolagenovým vláknům, dojde k její aktivaci.

Aktivace

Aktivace trombocytů je složitě provázaný děj, jehož se účastní nejen látky vylučované okolím, ale i agonisté postupně vznikající a uvolňující se z krevní destičky. Za hlavní signální molekulu v aktivaci krevní destičky je považován receptor GP VI. GP VI svou vazbou na kolagen aktivuje tyrosin kinázu a díky ní dojde k rychlé přestavbě cytoskeletu trb, tvorbě filopódií (výběžky cytoplazmy) a posléze vylití obsahu α a denzních granul z destičky (Yun et al. 2016).

Krevní destičky však nejsou aktivovány k adhezi jen poškozenou cévní stěnou, ale například i nádorovými či autoimunitními buňkami a také mnohými patogeny tvořícími komplexy s imunitními buňkami (ICs). Tato aktivace je zprostředkována díky dvěma dalším receptorům nacházejícím se na povrchu trb. Prvním z nich je nízkoafinní imunoglobulinový ITAM receptor Fc γ RIIa, jehož signál transdukční dráha je velmi podobná receptoru GP VI. Ligandem Fc γ RIIa receptoru je konstantní (Fc) oblast imunoglobulinů. Přítomnost tohoto receptoru umožňuje destičkám obklopit patogena a pomocí různých chemokinů a cytokinů přítomných v α granulích zlikvidovat cizorodý organismus. Tento mechanismus ale může bohužel působit i patologicky, protože často je na vzniklé ICs vázáváno až příliš mnoho trombocytů. Následná aktivace velkého počtu trb je spojena s trombofilií a rizikem vzniku trombu, který může vést až infarktu, jako se tomu děje například u infekčního zánětu endokardu (Arman a Krauel 2015).

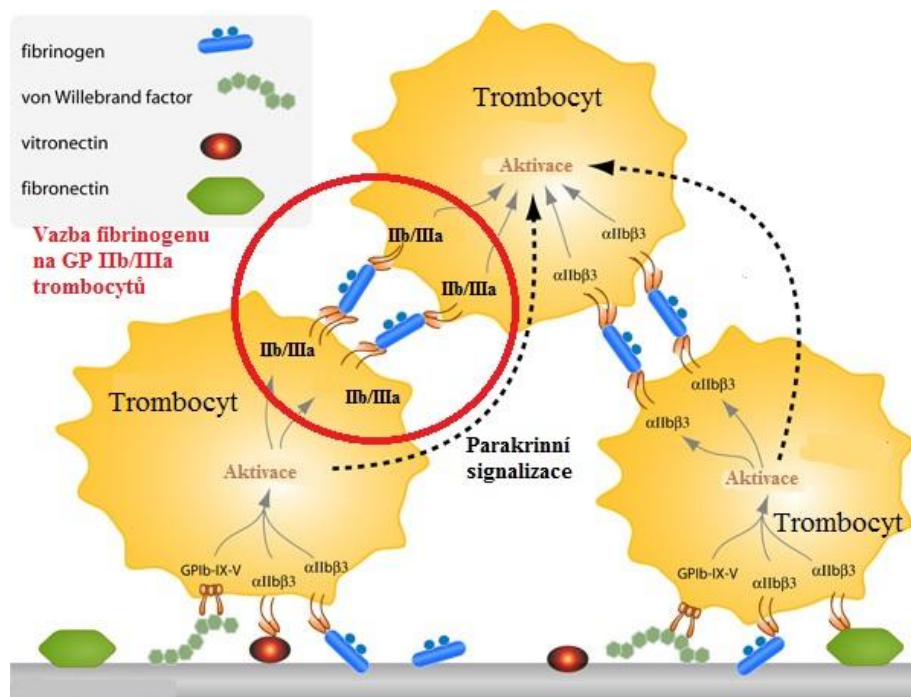
V poslední době byl objeven ještě jeden typ receptoru, který zprostředkovává aktivaci trombocytu a tím je **CLEC-2** (C-type lektin-like receptor). Ligandem tohoto receptoru je podoplanin, což je siaolomucinu podobný glykoprotein, nacházející se v epitelu lymfatických cest a žláz, v pneumocytech I. typu nebo také v choroidním plexu mozku (Suzuki-Inoue et al. 2011; Gitz et al. 2014). Podoplanin je navíc tvořen i nádorovými buňkami, kde akumulace trb kolem nádorové tkáně znemožňuje její likvidaci pomocí NK buněk a vede ke snížení hladin trombocytů v krvi (trombocytopenii) za současného zvýšení hladin D-d doprovázeného vysokým rizikem tromboembolie. Pochopení složitých cest aktivace trb umožňuje vytvořit inhibitory konkrétních receptorů, a zabránit tak život ohrožujícím tromboembolickým komplikacím (Riedl et al. 2017).

Agregace

Mechanismy adheze trombocytů jsou tedy díky přítomnosti odlišných receptorů na povrchu trb různé, avšak všechny vedou ke stejným změnám krevních destiček, které v důsledku umožní agregaci trb. Poté, co byla vytvořena monovrstva adherovaných destiček v místě poranění, dochází k uvolnění mediátorů z granul trombocytů. V současné době bylo identifikováno více jak 300 různých proteinů, uvolňujících se z granul trb. Patří mezi ně ADP, tromboxan A₂ (TXA₂), fibrinogen, vWF, epinefrin či destičkový faktor 4 (PF4). Díky uvolněným mediátorům jsou do místa poranění přitahovány destičky z cirkulace a je zesilována primární odpověď destiček na poranění (Davi a Patrono 2007; Whiteheart 2011).

Uvolnění agonisté se okamžitě váží na destičky a přes receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) je signál o vazbě přenesen do nitra trb. Každý agonista má na membráně trombocytu vlastní receptory, jejichž aktivace spouští v destičce různé pochody, které vedou přes různé dráhy ke společnému cíli - aktivaci GP IIb/IIIa receptoru. GP IIb/IIIa patří do rodiny integrinů a je nejhojněji zastoupeným receptorem na membráně trb. Přes složitou signální dráhu spojenou s nárůstem hladiny intracelulárního Ca²⁺ dojde ke konformační změně GP IIb/IIIa a k odhalení vazebného místa. Ligandem receptoru jsou molekuly nesoucí RDG sekvenci (triplet AMK argininu, glycinu a aspartátu). Takovými molekulami jsou například fibrinogen, vWF, fibronectin, vitronektin nebo kolagen. Hlavním ligandem GP IIb/IIIa receptoru je však fibrinogen.

Molekula fibrinogenu je symetrická molekula nesoucí na každém α polypeptidovém řetězci D-domény dvě RDG sekvence umožňující vazbu na GP IIb/IIIa. Fibrinogen se tak každým svým α řetězcem váže k jiné destičce a vzhledem k tomu, že na povrchu trb je až 80 000 kopií GP IIb/IIIa receptoru, každý trb může vázat několik dalších destiček (Varga-Szabo et al. 2008; Sánchez-Cortés a Mrksich 2009) . Tento proces shlukování a provazování destiček se nazývá agregace (Obr. 2) a umožňuje vznik primární hemostatické zátky.



Obr. 2: Adheze trombocytů k buněčnému povrchu a jejich vzájemná agregace pomocí molekul fibrinogenu: Nejprve jsou jednotlivé trombocyty za spolupráce povrchových receptorů (GPIb-IX-V, α IIb β 3) a adhezivních molekul (von Willebrandův faktor, vitronektin, fibronektin či fibrinogen) přichyceny k cévní stěně a poté vzájemně agregují za pomoci GPIIb/IIIa a molekul fibrinogenu. Obrázek upraven dle: <http://platelets.se/platelet-interactions/>.

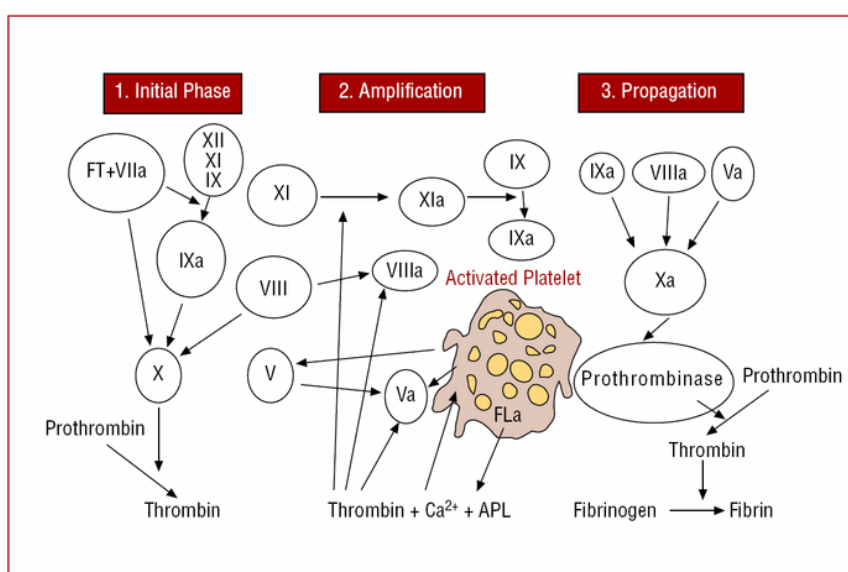
2. 2. 3 Sekundární hemostáza

O sekundární hemostáze se hovoří také jako o látkové, protože hlavními činiteli už nejsou „buňky“ – krevní destičky, ale systém plazmatických faktorů. Jedná se o glykoproteiny plazmy s koagulačními účinky, jejichž cílem je zesílit a stabilizovat primární zátku pomocí fibrinových vláken. Plazmatické koagulační faktory jsou přítomné v plazmě v neaktivní formě (zymogen) až na FVIIa, které jsou postupně aktivovány během složitěho sledu na sebe navazujících reakcí – koagulační kaskády. Konečným krokem koagulační kaskády je aktivace protrombinu na proteolyticky aktivní trombin, který přemění původně rozpustná fibrinogenová vlákna na nerozpustná fibrinová, a stabilizuje tak krevní zátku. Hemostáza je dynamický proces, při kterém koagulační faktory nenastupují až po vzniku primární zátky, ale už současně s agregací destiček vznikají i první vlákna fibrinové sítě.

Koagulační kaskáda

Koagulační kaskáda může být aktivována dvěma způsoby a díky tomu se podle starého systému rozděluje na vnitřní a vnější cestu. Vnitřní cesta je aktivována při kontaktu s cizím (abnormálním) povrchem a prvním aktivovaným je FXII. Při vnější cestě jsou koagulační faktory podobně jako trombocyty aktivovány při poranění obnažením extravaskulárních tkání, konkrétně uvolněným tkáňovým faktorem (TF, FIII). Společným krokem obou cest je aktivace FX, vedoucí za přítomnosti FVa k aktivaci protrombinu a tvorbě trombinu. Obě cesty vedou ke stejnému cíli, ale liší se způsobem aktivace a složením komplexu aktivujícího FX - tenázový komplex.

Model koagulační kaskády dobře popisuje biochemické interakce probíhající mezi faktory a umožnil pochopení základních kroků koagulace. Avšak již plně neodráží *in vivo* hemostázu a ani nedokáže vysvětlit některé procesy probíhající za patologických podmínek během srážení krve. Z těchto a mnoha dalších důvodů se v současné době model koagulační kaskády již téměř nepoužívá a je nahrazen tzv. „cell-based modelem“, který nahlíží na koagulaci jako na komplexní děj, při kterém dochází k řadě interakcí mezi „vnitřní“ a „vnější“ cestou. V tomto novějším modelu se koagulační kaskáda rozděluje do tří (někdy čtyř) fází: fáze iniciace, amplifikace, propagace a případně terminace (Obr. 3). Jednotlivé fáze se uskutečňují na různých buněčných površích, a proto název cell-based (Ferreira et al. 2010; McMichael 2012; Palta et al. 2014).



Obr. 3: Nový model koagulační kaskády: 1- iniciační fáze, 2 – fáze amplifikace, 3 - fáze propagace.

Obrázek převzat z: <http://www.revespcardiol.org/en/the-new-coagulation-cascade-and/articulo/13114167>.

Cell-based model koagulace

První fází je **iniciace**, která probíhá na povrchu buněk schopných exprimovat TF. Tento transmembránový protein není tvořen jen buňkami cévní stěny, jak bylo původně myšleno, ale nachází se i v celé řadě dalších tkání. Zvýšené hladiny TF byly naměřeny například v astrocytech mozku, epitelových buňkách plic, v kardiomyocytech srdce či v endotelových buňkách placenty (Butenas a Saulius 2012). Ve všech případech se jedná o aktivní, pro život důležité tkáně, ve kterých má zvýšená hladina TF protektivní účinky (Mackman 2009). V případě poškození těchto tkání je díky přítomnosti TF rychle aktivována hemostáza a nedojde k poškození těchto životně důležitých orgánů.

Podle posledních studií je ovšem pro zahájení hemostázy nejdůležitější TF exprimovaný aktivovanými monocyty či mikročásticemi kolujícími v krvi. Obecně není žádná z těchto buněk exprimující TF při poškození, či stimulaci zánětlivými cytokiny schopna udržet negativně nabitě fosfolipidy na vnitřní straně membrány a dochází k jejich přesunu – „flip-flop fenomén“. Vlivem změny složení membrány dojde k obnažení extracelulární části TF, která nese vazebné místo pro FVII (FVIIa) a umožňuje zahájit koagulaci. Vzniklý komplex (TF/FVIIa), označovaný jako tenázový, je zodpovědný za aktivaci FX a FIX a následnou tvorbu trombinu. Množství trombinu vzniklé v iniciační fázi je malé a nestačí na přeměnu fibrinogenu na fibrin, ale hraje důležitou úlohu při přechodu do amplifikační fáze koagulace (Hoffman 2003).

Druhou fází je **amplifikace**, která probíhá na membráně trb a hlavní roli zde hraje trombin vzniklý během iniciace. Trombin je nejsilnějším aktivátorem destiček a i jeho malé množství stačí k proteolýze vysokoafinního PAR 1 receptoru, která spouští v trb celou řadu dějů jako je uvolnění granul, či tvorba prokoagulační membrány trb díky přesunu fosfolipidů z vnitřní do vnější vrstvy. Nově vzniklý povrch trb přitahuje koagulační faktory a zesiluje tak aktivaci trb. Trombin je navíc zodpovědný i za aktivaci FXI a FV na membráně trb a dokáže i štípat vazby mezi vWF a FVIII, a uvolňuje tak vWF k adhezi a agregaci trb (Bahuleyan 2015). Díky aktivaci FXI pomocí trombinu také dokážeme vysvětlit, proč již není potřebný FXII, který byl v klasické vnitřní cestě koagulace aktivován kontaktem s poškozeným povrchem a teprve takto aktivovaný FXII mohl aktivovat FXI (Ferreira et al. 2010).

Poslední fází je **propagace**, při které vzniká množství trombinu dostatečné k tvorbě fibrinové sítě. Trombin je pomocí zpětnovazebných smyček schopen zvýšit vlastní tvorbu, ale největší množství trombinu je generováno díky tzv. protrombinázovému komplexu na povrchu trb, který je tvořen FXa/FVIIIa. Avšak k tomu, aby tento komplex mohl vzniknout, je potřeba určitá hladina FXa. Množství FXa vzniklé v iniciační fázi koagulace je nedostačující, a tak během propagační fáze na povrchu trb vzniká ještě další tenázový komplex (FIXa/FVIIIa) schopný generovat větší množství FXa. Význam komplexu FIXa/FVIIIa je patrný u hemofilie A a B, kde v důsledku deficitu FIX a FVIII dochází k rozvoji krvácivých chorob, ať už jsou hladiny TF jakkoli vysoké (Swieringa et al. 2015). Výsledkem propagační fáze koagulace je zpevnění primární zátky fibrinovými vlákny a jejich stabilizace pomocí FVIIIa, na jehož aktivaci se podílí také trombin.

V úvodu byla zmíněna i čtvrtá – **terminační fáze**, která probíhá souběžně s výše zmíněnými fázemi a umožňuje udržet rovnováhu mezi nadměrným srážením a krvácením. Hlavními činiteli terminace jsou tzv. přirozené inhibitory krevního srážení, které jsou zodpovědné za včasné zastavení koagulace a zabraňují šíření hemostázy mimo místo poranění. Existuje celá řada přirozených inhibitorů koagulace, ale mezi nejdůležitější a nejlépe prostudované patří inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), systém proteinu C, antitrombin (AT), heparinový kofaktor II (HP II) či endotelem exprimovaný trombomodulin (Šlechtová 2007; Féléto 2011).

2. 2. 4 Tvorba fibrinové sítě

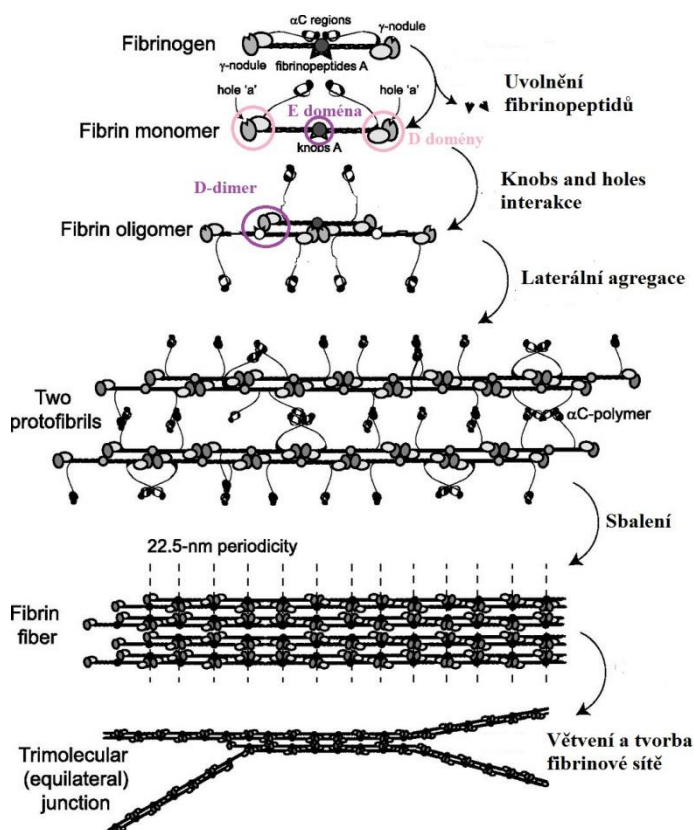
Za tvorbu fibrinového koagula je zodpovědný trombin, což je centrální serinová proteáza koagulační kaskády štěpící vazby v molekule fibrinogenu. Fibrinogen je glykoprotein syntetizovaný hepatocyty a volně dostupný v plazmě. Jedná se o 340 kDa velkou molekulu se třemi páry polypeptidových řetězců ($A\alpha$, $B\beta$, γ) vytvářející centrální E doménu a dvě koncové D domény (Marder 2012). Trombin vytvořený během koagulační kaskády specificky štípe peptidové vazby mezi argininem a glycinem na N-konci α a β řetězce fibrinogenu, a dává tak vznik fibrinovým monomerům, které posléze polymerizují (Berg et al. 2002).

Zpočátku trombin odštěpuje hexadekapeptid z $A\alpha$ řetězce, který nazýváme fibrinopeptid A (FpA). Po jeho odštěpení vzniká na α řetězci nová terminální sekvence GPR (glycin-prolin-arginin), označovaná jako „knobs A – hrbolek A“. Takto vzniklý hrbolek

v centrální E doméně se páruje s polymeračními místy na γ řetězcích. Tato polymerační místa na konci D domén, tvořící jakési prohlubně a specifické interakce mezi „prohlubní a“ a „hrbolkem A“ propojují jednotlivé monomery fibrinu. Vznikne jakýsi D-ED komplex dvou fibrinových monomerů, ke kterému se připojují další, čímž vzniká dvouvláknová protofibrila, která při dostatečné délce (20 – 25 monomerů) začíná interagovat s ostatními protofibrilami a spouští laterální agregaci fibrinových vláken (Weisel a Litvinov 2013).

V laterální agregaci protofibril hraje nejspíše úlohu fibrinopeptid odštěpený z vlákna B β (FpB). FpB je tvořen 14 aminokyselinovými zbytky a na B β vlákně vytváří odlišný hrbolík „knobs B“ tvořený sekvencí GHRP (glycin-histidin-arginin-prolin). Úloha FpB v organismu zatím není zcela jasná. V nepřítomnosti FpA je uvolnění FpA dostačující k zahájení polymerizace, ale stejně tak i samotný FpB dokáže sám zahájit polymerizaci. Avšak bylo prokázáno, že fibrinová vlákna vzniklá jen odštípnutím FpA jsou tenčí ve srovnání s vlákny po odštípnutí obou fibrinopeptidů (Weisel a Litvinov 2017). Z tohoto důvodu přisuzujeme FpB úlohu při laterální agregaci vláken.

Laterální agregace protofibril je navíc zesílena interakcí domén na C-konci α řetězce. α C- α C interakce vedou k formaci α C polymerů, které jsou následně zpevněny FXIIIa. Tyto interakce nejsou nezbytné, ale v jejich přítomnosti se tvoří silnější fibrinová síť (Collet et al. 2005). Za zesílení fibrinové sítě je tedy zodpovědný zejména FXIII, který poté, co je za přítomnosti trombinu a Ca^{2+} aktivován, katalyzuje kovalentní propojení nejen α , ale zpočátku hlavně C-konce γ řetězců sousedních molekul fibrinu. Tyto kovalentní interakce pomocí FXIIIa zvyšují odolnost koagula nejen před mechanickými vlivy, ale i před trombolytickými enzymy a polymerace se stává nevratnou (Weisel a Litvinov 2013). Z původně rozpustného fibrinogenu vzniká velice odolný viskoelastický polymer, fibrin (Obr. 4).



Obr. 4: Tvorba fibrinové sítě: Molekula fibrinogenu se skládá z jedné E a dvou D koncových domén. Uvolněním fibrinopeptidů (FpA a FpB) vznikne z molekuly fibrinogenu fibrin s nově vzniklými vazebnými místy (knobs and holes), které interagují se sousední molekulou fibrinu a vytváří fibrinové oligomery. Fibrinové oligomery vytvořené 20 až 25 monomery dají vznik dvojité stočené protofibrile, které pokud dosáhne určité délky (600 – 800nm) začne laterálně agregovat a vytvářet fibrinové vlákno. Jednotlivá vlákna se větví a vytváří složitou fibrinovou síť stabilizovanou kovalentními vazbami vzniklými díky FXIIIa. Při rozpadu sítě – fibrinolýze je porušena většina vazeb kromě kovalentní vazby mezi dvěma sousedními D-doménami (D-dimer). Upraveno dle Weisel a Litvinov 2013.

2. 3 Fibrinolýza

Poté, co byla spolupůsobením cévní stěny, trombocytů a systému plazmatických koagulačních faktorů a jejich inhibitorů vytvořena krevní sraženina, musí po čase dojít i k jejímu rozpuštění. Ponechání fibrinového koagula v místě poranění by vedlo k jeho rozšíření do cévního řečiště, k dlouhodobějším změnám v toku krve a rozvoji patologických stavů. Správně načasované rozpuštění sraženiny je umožněno pomocí plasminogen-plasminového systému, zvaného též fibrinolytický.

Na fibrinolytický systém můžeme nahlížet jako na opačně působící koagulační kaskádu s jinými činiteli. Zpočátku je pomocí tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA),

urokinázy (uPA) či FXII štěpen plasminogen na aktivní molekulu plasmin. Účinkem plasminu je nerozpustná fibrinová síť degradována na tzv. fibrin degradační produkty (FDP), které jsou rozpustné v krevní plazmě a tlumí v organismu další produkci fibrinu, a regulují tak proces srážení krve. Navíc jsou FDP, konkrétně tzv. D-dimery, používány jako laboratorní ukazatelé fibrinolýzy, které jsou schopné predikovat riziko trombózy (Chapin a Hajjar 2015).

2. 3. 1 D-dimery

D-dimery jsou jedním ze základních ukazatelů aktivity fibrinolytického systému a definovat je můžeme dvojím způsobem. Zaprvé je tímto pojmem označován konečný produkt degradace fibrinu, který je tvořen dvěma D-doménami přilehlých fibrinových jednotek a jehož γ řetězce jsou spojeny kovalentní vazbou přes glu-lys. Plasmin nedokáže tuto vazbu rozštěpit, a tak je D-d s molekulovou hmotností okolo 180 kDa nejmenším FDP. V současné lékařské praxi se však označení D-d nepoužívá jen pro konečný štěpný produkt, ale pro všechny FDP vzniklé degradací fibrinu zesíťovaného FXIIIa. D-d jsou tedy jakousi směsí různých fragmentů o různé molekulové hmotnosti, které nesou společný epitop – D-d antigen (Adam et al. 2009).

Objev D-d antigenu byl průlomem v laboratorní diagnostice. Dřívější laboratorní testy nebyly schopné rozlišit mezi fibrinogenem a FDP a měřit aktivitu fibrinolytického systému v organismu bylo tudíž téměř nemožné. Vše se změnilo až s objevem D-d antigenu, který je detekovatelný pouze v FDP nerozpustného fibrinu, díky čemuž jsou měřeny pouze produkty vznikající při odbourávání krevní sraženiny a ne i ty, které se podílejí na její tvorbě (fibrinogen). Současné laboratorní testy užívají monoklonální protilátky (mAb) proti tomuto epitopu a je tak stanovována koncentrace pouze těch FDP, které vznikly při odbourávání fibrinu zesíťovaného FXIIIa. Koncentrace D-d tedy přímo odráží aktivitu fibrinolytického systému.

V laboratorní diagnostice jsou D-d používány jako ukazatelé nadměrného srážení krve v organismu, které se objevuje u patologických stavů, jakými jsou diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), akutní infarkt myokardu, plicní embolie (PE) či hluboká žilní trombóza (DVT) (Adam et al. 2009). DVT a PE se často objevují v organismu v přímé návaznosti a bývají označovány společným názvem jako tromboembolická nemoc (TEN), či žilní tromboembolie (VTE – venous thromboembolism). Stanovení hladiny D-d má tzv.

negativní prediktivní hodnotu a využívá se k vyloučení výše zmíněných onemocnění. V praxi to znamená, že pokud je námi naměřená hodnota nižší (negativní výsledek), než známá prediktivní (cut-off) hodnota, můžeme s vysokou pravděpodobností říci, že v organismu nedochází k nadměrnému krevnímu srážení. V praxi se stanovení hladiny D-d používá zejména k vyloučení VTE a také k diagnóze a sledování stavu u pacientů s DIC (Sathe a Patwa 2014).

Stanovení D-d je prováděno různými imunochemickými metodami, mezi které patří ELISA, ELFA a také v rutinní laboratoři nejčastěji používané latex-aglutinační techniky. Ať už je použita jakákoliv metoda, vždy je stanovení hladiny D-d laboratorním testem s vysokou sensitivitou, ale nízkou specificitou. Test dokáže díky vysoké citlivosti stanovit i velmi malé koncentrace D-d a s jistotou (>95 %) vyloučit DVT nebo PE (Pulivarthi a Gurram 2014). Avšak na druhou stranu má pozitivní výsledek vzhledem k nízké specificitě testu velmi malou výpovědní hodnotu. Zvýšené D-d znamenají, že v organismu pravděpodobně dochází k nadměrnému srážení krve a následnému odbourávání, ale proč se tak děje, nejsme z výsledků testu schopni určit. Navíc se při měření často objevují tzv. falešně pozitivní D-d, kdy zaznamenáme vyšší hladiny D-d i u stavů, které nejsou spojeny se zvýšenou tvorbou krevních sraženin. Takto zvýšené hodnoty koncentrace D-d se objevují ve stáří, po nedávných operacích, při dlouhodobější nepohyblivosti, při rakovině v aktivním stádiu, či v těhotenství (Kabrhel et al. 2010).

Kromě falešně pozitivních výsledků je měření D-d doprovázeno dalším problémem, kterým je nemožnost mezilaboratorní reprodukovatelnosti výsledků. Nejčastěji jsou v laboratořích používány automatizované latex-aglutinační testy, které se liší nejenom výrobcem, ale ve většině případů i použitou mAb. Specificita mAb používaných v analyzátoch není identická, a ve výsledku tak každý analyzátor (mAb) reaguje k různě velkým FDP s jinou citlivostí. Navíc výsledky testu jsou v závislosti na použité reagenzi udávány v jiných jednotkách - DDU (D-dimer unit) nebo FEU (Fibrinogen equivalent unit) a každý test má i odlišnou cut-off hodnotu. Vzhledem ke všem výše zmíněným faktům není možné porovnávat a pracovat s výsledky prováděnými na různých analyzátoch, což bylo potvrzeno i studií prováděnou v roce 2015 v hematologické laboratoři nemocnice v Českých Budějovicích (Štíchová 2015).

2. 4 Trombofilie

Trombofilie je souhrnné označení pro stavy se sklonem k abnormální tvorbě krevních sraženin, které se v organismu manifestují jako TEN. Trombofilie je hyperkoagulační stav, který nejčastěji vzniká na podkladě společného působení genetických a získaných rizikových faktorů (Tab. 1) a je charakteristický výskytem trombóz v mladém věku, které často recidivují a objevují se na neobvyklých místech (Procházka et al 2004). Podle příčiny vzniku se trombofilie rozdělují na primární (vrozené hyperkoagulační stavy) a sekundární (získané hyperkoagulační stavy).

Tab. 1: Vrozené a získané rizikové faktory trombofilie.

Vrozené faktory	Získané faktory
APC rezistence	Antifosfolipidový syndrom
Leidenská mutace	Těhotenství a šestinedělí
Mutace protrombinu G20210A	Dlouhodobější imobilizaci
Deficit proteinu C	Stav po prodělané trombóze
Deficit proteinu S	Léčbu estrogyeny
Deficit antitrombinu	Nefrotický syndrom
Hyperhomocysteinémie	Paroxysmální noční hemoglobinurie
Zvýšená aktivita FVIII	Malignity
Disfibrinogénémie	Kouření

Upraveno dle: Matýšková et al 2009

Příčinou **primární trombofilie** je genetická změna v některém z koagulačních faktorů či v jejich inhibitech nebo kofaktorech a mezi nejznámější patří deficit antitrombinu, leidenská mutace, mutace protrombinu 20210A či deficit proteinu C nebo S. Charakteristický je rodinný výskyt s odlišnou prevalencí u jednotlivých etnik, přičemž nejčastěji se vrozené trombofilie objevují v kavkazské populaci. Častý je i společný výskyt více vrozených trombofilií u jednoho pacienta, hovoříme o tzv. kombinované trombofilii. Kombinované trombofilie stejně jako homozygotní formy mutací jsou poměrně vzácné, ve většině případů neslučitelné se životem a relativní riziko první epizody TEN je v jejich

případě výrazně zvýšeno. Například u homozygotní formy leidenské mutace je RR první trombotické příhody 80, vztaženo k RR 2-3 na tisíc pacientů zdravé populace ročně (Poul 2006). Na druhou stranu heterozygotní formy mají někdy velmi mírný průběh a bývají odhaleny až laboratorním vyšetřením cíleným na jinou chorobu. K jejich klinické manifestaci dochází nejčastěji v těhotenství, při dlouhodobější imobilizaci či operacích. Například v těhotenství přítomnost heterozygotní formy vrozené trombofilie zvyšuje riziko ataky TEN až osminásobně (Tab. 2) a hraje roli v etiopatogenezi závažných stavů jako je preeklampsie, abrupce placenty, opakované potraty či intrauterinní úmrtí plodu (Procházka a et al 2004).

Tab. 2: Riziko TEN u těhotných pacientek s vrozenou trombofilií.

Vrozené trombofilie	Absolutní riziko TEN (AR/1000 pacientů)
Leidenská mutace - heterozygot	8
Leidenská mutace - homozygot	34
Mutace protrombinu G20210A - heterozygot	6
Mutace protrombinu G20210A - homozygot	26
Deficit antitrombinu	4
Deficit proteinu C	4
Deficit proteinu S	3

Zdroj: Bates 2007

V případě **získaných trombofilií** je příčina nejasná a je představována heterogenní skupinou poruch, které nejčastěji vznikají důsledkem jiného onemocnění např. při maligních procesech, myeloproliferativních onemocněních či septických stavech. Za skutečnou sekundární trombofilii je považován antifosfolipidový syndrom, který klinickým obrazem připomíná vrozené formy. Za získaný hyperkoagulační stav jsou považovány i změny fyziologického stavu s predispozicí k trombofilii jako je těhotenství, dlouhodobá imobilizace či obezita (Musil 2001; Poul 2006).

2. 4. 1 Leidenská mutace

Nejčastější vrozenou příčinou TEN je rezistence k aktivovanému proteinu C, která je v 95 % způsobena tzv. Leidenskou mutací FV (Bertina et al. 1994). Leidenská mutace je jednobodová mutace v genu pro FV, během které je adenin nahrazen guaninem, a tudíž ve výsledném proteinu je na pozici 506 místo argininu glutamin. Takto pozměněný FV se nazývá Leidenský FV (FVL) a je rezistentní k proteolytickému působení APC.

APC je vedle AT dalším důležitým přirozeným inhibitorem koagulace, který za fyziologických podmínek brzdí přeměnu protrombinu na trombin, tím že inaktivuje FVa a FVIIIa. APC v přítomnosti fosfolipidů a volného proteinu S štípe arginové zbytky FVa, čímž ho inaktivuje a navíc z něj štípnutím argininu v pozici 506 vytváří protisrážlivý faktor (FV_{ac}), který poté slouží APC jako kofaktor k degradaci FVIIIa. Normální FV nese celkem tři arginové zbytky (R306, R506 a R679), takže i při mutaci FVL je APC stále schopen přes dva zbylé argininové zbytky inaktivovat FVa. Avšak už nedokáže inaktivovat FVIIIa, protože k tomu je nezbytný FV_{ac}. Důsledkem mutace FVL je zpomalení štěpení FVa a neschopnost inaktivace FVIIIa pomocí APC (Van Cott et al. 2016). Existují i jiné mutace FV vedoucí k APC-R, ale jejich prevalence je podstatně nižší.

FVL mutace je nejběžnější vrozenou trombofilií zejména v kavkazské populaci, kde je nosiči její heterozygotní formy až 5% jedinců (Ridker et al. 1997). Homozygotní forma je stejně jako u ostatních vrozených trombofilií vzácná a její prevalence je ve stejné populaci jen 0,1 %. Obě formy jsou spojeny s rostoucím rizikem vzniku krevní sraženiny, které u homozygótů FVL dosahuje až padesátinásobku oproti wild type FV. Oproti tomu riziko u pacientů s heterozygotní formou FVL se zvyšuje jen mírně (5 – 7 násobně) a během života u nich často vůbec nedojde k rozvoji TEN.

Problém však představuje kombinace mutace FVL s dalšími protrombotickými stavy, jakými je například těhotenství. V takovém případě stoupá nejen RR TEN, ale zvyšuje se i riziko projevu porodních komplikací jako je odloučení placenty, předčasný porod, či intrauterinní růstová retardace plodu (Langan 2004; Bates 2007).

2. 4. 2 Mutace protrombinu 20210A

Mutace postihující koagulační faktor II je druhým nejčastějším vrozeným hyperkoagulačním stavem. Jedná se o bodovou záměnu guaninu za adenin v pozici 20210 (G20210A), která se nachází na 3' konci v tzv. promotoru protrombinového genu. Tato mutace patří mezi tzv. gain-of-function mutace (mutace zisku funkce), která zvyšuje efektivitu štěpení pre-mRNA a tím i následnou expresi proteinu (Flaujac et al. 2007). Výsledkem je zvýšená tvorba protrombinu vedoucí k nadměrné tvorbě krevních sraženin.

Protrombinová mutace 20210A (PGM) je autozomálně dominantní onemocnění, které se vyskytuje výhradně u bělochů. Jeho prevalence v evropské populaci je okolo 2 – 6 % a nosiči heterozygotní formy mají třikrát vyšší riziko vzniku VTE než má zdravá populace (Poort et al. 1996). PGM byla nalezena u 17 % gravidních žen trpících VTE a je dávána do souvislosti s recidivujícími potraty. Podle dřívějších studií byl výskyt opakovaných potratů u žen s PGM až 4krát častější (Foka et al. 2000). Avšak studie prováděné v poslední době vyloučily jakoukoliv souvislost mezi recidivujícími potraty, preeklampsií a PGM (Silver et al. 2010; Rodger et al. 2010).

2. 4. 3 Deficit antitrombinu

Antitrombin je glykoprotein tvořený játry, který v organismu funguje jako inhibitor trombinu (FIIa) a dalších koagulačních faktorů např. FXa, FIXa či FXIIa (Khor a Van Cott 2010). AT vazbou na tyto receptory ovlivňuje aktivitu hemostázy a zabraňuje nadměrnému srážení krve. Kromě toho má AT na svém povrchu ještě vazebné místo pro heparin, který funguje jako kofaktor a mnohonásobně zvyšuje inhibiční účinek AT na koagulační kaskádu. Z výše uvedených skutečností je zřejmé, že jakákoli změna koncentrace či funkce AT výrazně ovlivní průběh hemostázy.

Deficit antitrombinu byl objeven v roce 1965 Olavem Egebergem a patří k vůbec první vrozené trombofilii, která byla popsána. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění, které se objevuje ve dvou formách – I. a II. typu. První typ je deficitem kvantitativním, kdy dochází k poklesu koncentrace AT, která je způsobena delecí nebo inzercí několika málo bází. U AT deficitu II. typu většinou nedochází k poklesu koncentrace, ale je změněna jeho funkční aktivita. Mutace se v tomto případě objevuje například ve vazebném místě pro heparin, a účinnost AT je tak výrazně ovlivněna (Patnaik a Moll 2008).

Přestože prevalence deficitu AT v populaci je nízká 0,02 – 0,2 %, jedná se o závažný, život ohrožující stav, jehož homozygotní forma je ve většině případů neslučitelná se životem nebo se projevuje těžkými DVT ihned po narození. Heterozygotní forma má mírnější průběh s hladinami AT okolo 40 – 60 % (normál nad 80 %) a DVT se objevuje u více jak poloviny pacientů s deficitem AT až mezi 20. – 50. rokem života (Patnaik a Moll 2008). Dříve se myslelo, že mezi hladinou AT a rizikem VTE platí nepřímá úměra, tedy že nižší hladiny AT znamenají vyšší relativní riziko VTE. V nedávné době však bylo prokázáno, že u pacientů s hladinou AT mezi 70 – 80 % je riziko VTE stejné jako u pacientů, jejichž hladina je <70 %. Z toho vyplývá, že je důležité brát v potaz i mírně snížené hladiny AT u pacientů, kteří prodělali VTE v mladším věku (Di Minno et al. 2014).

2. 4. 4 Deficit proteinu C

Aktivovaný protein C (APC) je přirozený inhibitor koagulace, který v organismu brzdí tvorbu trombinu. Vlastní PC je glykoprotein o molekulové hmotnosti 62kDa, který je syntetizován játry a v plazmě se vyskytuje v neaktivní formě. Aktivován je trombinem navázaným na transmembránový glykoprotein endotelových buněk trombomodulin. Aktivace PC pomocí komplexu trombin-trombomodulin (T-TM komplex) je nadále zesilována působením PS, FV nebo vazbou PC na specifický endotelový receptor pro protein C (ERPC). Vzniklý APC inaktivuje FVa a FVIIIa, jak již bylo uvedeno výše, a tím brzdí aktivaci FX i následnou tvorbu trombinu, a zabraňuje tak nekontrolovatelnému srážení krve. Kromě výše uvedeného antikoagulačního působení, má PC i významné protizánětlivé a cytoprotektivní účinky. Například podání rekombinantního APC zvyšuje přežití u pacientů se sepsí a podává se i u infarktu myokardu, u onemocnění plic či při zánětu (Griffin et al. 2007; Nguyen et al. 2000). Ve výsledku PC ovlivňuje v organismu celou řadu úloh a jeho nedostatek vede k závažným, až život ohrožujícím stavům. Existují dvě formy deficitu PC – vrozená a získaná.

Vrozený deficit PC je vzácné, autozomálně dominantní onemocnění, které se objevuje v běžné populaci s prevalencí 0,2 – 0,5 % (Khan a Dickerman 2006). V současné době je dle databáze lidských genových mutací (HGMD) známo více jak 360 mutací způsobujících deficit PC a ve většině případů se jedná o bodové mutace. Vrozený nedostatek PC může být jak kvantitativní, tak kvalitativní, podle čehož se rozděluje na I. a II. typ. Běžnější je I. typ deficitu PC, kvantitativní, který je charakteristický poklesem hladiny PC pod 50 % oproti normální hodnotě a rozdílným fenotypovým projevem stejných mutací.

U obou typů je častější výskyt heterozygotní formy, u které se první trombotická příhoda objevuje nejčastěji mezi 10. a 50. rokem života a je zde až 7x vyšší riziko TEN oproti zdravé populaci (Nakashima a Rogers 2014). Homozygotní forma je podobně jako u ostatních vrozených trombofilií vzácná a projevuje se ihned po narození jako purpura fulminans, což je těžká porucha krevní srážlivosti projevující se krvácením z kůže. Bez vhodné terapie je v takovém případě až téměř 100% úmrtnost novorozenců, avšak záleží na typu mutace a i na zbylé hladině PC (Knoebl 2008).

Oproti vrozené formě je **získaný deficit PC** častější a objevuje se společně s deficitem vitamínu K při jaterních chorobách či při terapii warfarinem. Warfarinová terapie je zacílena na blokaci vit. K, díky které se sníží syntéza K-dependetních koagulačních faktorů, např. protrombinu, a sníží se tak míra koagulace. Nicméně i tvorba PC je závislá na vitamínu K a vzhledem ke krátkému biologickému poločasu PC dochází při užívání warfarinu k rozvoji přechodného hyperkoagulačního stavu, který se projevuje kožními nekrózami. Nekróza kůže je vedle zvýšeného rizika TEN jednou z nejčastějších klinických manifestací deficitu PC a projevuje se i u vrozených forem (Chlumský a Havlín 2013). Hladina PC je snížena i u nedávné nebo právě probíhající trombózy, v pooperačních stavech, u nefrotického syndromu, ale také v těhotenství a u novorozenců (Nakashima a Rogers 2014).

2. 4. 5 Deficit proteinu S

Protein S (PS) je jednořetězcový glykoprotein s antikoagulačními účinky, který v organismu slouží hlavně jako kofaktor APC. Do nedávné doby byl za kofaktor APC považován pouze volně dostupný PS, který zvyšuje proteolytickou aktivitu APC v arginonovém místě R³⁰⁶ až 20krát a nikterak neovlivňuje štěpení v místě R⁵⁰⁶. Nicméně nedávno bylo objeveno, že i PS vyskytující se v plazmě vázaný na C4b složku komplementu a dříve označovaný jako neaktivní, se podílí na zrychlení proteolytické činnosti APC.

Bylo prokázáno, že komplex PS-C4b zvyšuje až 10krát účinnost APC při štěpení R³⁰⁶ a že navíc tento komplex funguje i jako specifický inhibitor při proteolytickém štěpení R⁵⁰⁶. Komplex PS-C4b má tedy dva mechanismy účinky – aktivační na arginové místo R³⁰⁶ a inhibiční na R⁵⁰⁶, přičemž silnější je ten inhibiční a tím se vysvětluje, proč byl dříve komplex PS-C4b považován za inhibitora inaktivace FVa APC. Ve výsledku převládá inhibiční efekt PS-C4b a inaktivace FVa aktivovaným proteinem C je až 8krát snížena.

Tento efekt ale mizí u osob s FVL, které mají pozměněné R⁵⁰⁶ a inhibiční účinek PS-C4b se neprojeví a naopak dojde ke zvýšení inaktivace v místě R³⁰⁶ (Maurissen et al. 2008) .

Kromě kofaktoru má PS i funkci přirozeného antikoagulantu. V nepřítomnosti APC, dokáže PS inhibovat aktivaci protrombinu přímou vazbou na fosfolipidy, FVa, VIIIa a FXa a navíc působí i jako kofaktor TFPI. Inhibiční konstanta TFPI se mění z původních 4,4 nM na 0,5nM v přítomnosti PS (Hackeng et al. 2006).

Vrozený deficit PS je autozomálně dominantní onemocnění, jehož prevalence v populaci je velmi nízká a nachází se mezi 0,2 – 0,5 % a je spojován zejména se zvýšeným rizikem DVT (Ten Kate a Van Der Meer 2008). Deficit PS má i svou získanou formu, která se objevuje při akutní zánětlivé odpovědi organismu, ale velmi často také v těhotenství, kde PS klesá přibližně o 40 % (Cumming et al. 1995).

2. 4. 6 Zvýšená hladina FVIII

Koagulační faktor VIII je 330 kDa velký glykoprotein, který koluje v plazmě navázaný na vWF. Po aktivaci je FVIIIa součástí tzv. vnitřního tenázového komplexu (FVIIIa, FIXa, Ca²⁺, fosfolipidy), kde slouží jako neenzymatický kofaktor IXa, a zesiluje tak aktivaci FX, která vede k následné tvorbě trombinu. FVIII je známý hlavně jako antihemolitický faktor A, protože jeho deficit způsobuje závažnou krvácivou chorobu - hemofilii A. Nicméně negativní vliv na organismus má nejen snížená, ale i zvýšená hladina FVIII, která je řazena mezi hyperkoagulační stavy. Za zvýšenou je považována koagulační aktivita FVIII (FVIII:C) nad 150 %, která se objevuje u 10 % populace a zvyšuje nejen riziko první ataky VTE, ale i recidivujících trombóz (Vavrušková 2010).

Prvně bylo poukázáno na vyšší riziko TEN u pacientů se zvýšenou hladinou FVIIIa v roce 1995 ve studii zabývající se leidenskou mutací, kdy prevalence zvýšené aktivity FVIII:C byla dvakrát vyšší u osob s VTE oproti kontrolám (Koster et al. 1995). Od té doby proběhlo mnoho dalších studií, které potvrdily vyšší riziko jak první, tak opakované trombotické příhody u osob se zvýšenou FVIII:C. Avšak přesný mechanismus, díky kterému se zvyšuje riziko TEN v přítomnosti vyšší aktivity FVIIIa, objeven nebyl. Pravděpodobně se jedná o kombinaci jak genetických, tak získaných příčin.

Nicméně je jisté, že v některých případech se jedná o vrozenou trombofilii, protože v jedné z nedávných studií byl téměř u poloviny příbuzných první linie pacientů se zvýšenou FVIII:C objeven nárůst aktivity FVIII (Bank et al. 2005). Konkrétně byly objeveny dva polymorfismy v genu pro protein příbuzný LDL receptoru (LRP), které zvyšují hladinu FVIII nezávisle na koncentraci vWF či CRP a až trojnásobně zvyšují riziko TEN (Vormittag et al. 2009). Navíc je prevalence zvýšené aktivity FVIIIa vázána i na krevní skupinu, kdy lidé s krevní skupinou 0 mají podstatně nižší hladiny FVIIIa. S tím je spojena i vyšší prevalence této trombofilie u Afroameričanů, kde se krevní skupina 0 vyskytuje mnohem méně často než v kavkazské populaci (Jenkins et al. 2012).

2. 4. 7 Hyperhomocysteinemie

Homocystein (Hcy) je aminokyselina vznikající v organismu jako vedlejší produkt při syntéze cysteinu z metioninu. Pokud vše funguje správně, Hcy je v organismu rychle přeměňován na neškodné, tělu prospěšné látky a kofaktory těchto reakcí jsou vitamíny skupiny B, zejména vit. B6 a vit. B12 a také kyselina listová. Důležitou úlohu v přeměně Hcy má i několik enzymů, zejména methyltetrafolátreduktáza (MTHFR) a cystation-B-syntáza (CBS). Při nedostatku výše zmíněných látek či genetické změně v jednom z enzymů, je přeměna Hcy zpomalována a ten se ve zvýšené míře hromadí v plazmě (hyperhomocysteinémie) a patologicky působí na organismus.

Příkladem může být homocysteinurie, což je závažné onemocnění, jehož příčinou je mutace v CBS, enzymu který přeměňuje Hcy na cystathion. V tomto případě hladiny Hcy v organismu až desetinásobně převyšují normální hodnoty Hcy (5-15 μ M) a v některých případech dosahují koncentrace až 500 μ M (Hirmerová 2013). Takto vysoká hladina Hcy zpomaluje duševní vývoj, narušuje metabolismus kostní tkáně a vede k rozvoji kardiovaskulárních chorob již v dětství (Přistoupilová et al. 1999). Nicméně mnohými experimentálními studiemi bylo prokázáno, že i mírná hyperhomocysteinémie, jejíž hladiny jsou mezi 15 – 30 μ M, je nezávislým rizikovým faktorem ischemické choroby srdeční, cévních mozkových příhod, či TEN.

Na druhou stranu ale bylo dokázáno, že samotné zvýšení Hcy bez přítomnosti dalších rizikových faktorů se neprojevuje zvýšenou tendencí k tvorbě trombů a je pouze velmi slabým prediktorem kardiovaskulárních chorob (Žák a Zeman 2004; Fay 2012). Záleží také na příčinách vzniku hyperhomocysteinémie, kterých je celá řada - od deficitu výše

zmíněných kofaktorů, životosprávy až po genetické změny, a v případě jejich kombinace se toxické působení Hcy zvyšuje. Zvýšená hladina Hcy působí patologicky i v těhotenství a je dávana do souvislosti s vývojovými vadami plodu, preeklampsií, opakovanými potraty či těhotenskou cukrovkou (GDM). Avšak podle jedné z posledních studií se vyšší hladiny Hcy nakonci prvního trimestru ani později neprojevovaly častějším výskytem vrozených vývojových vad, předčasných porodů a ani GDM. Byla potvrzena pouze asociace hyperhomocysteinémie s hyperkoagulačními poruchami vznikajícími v těhotenství, jako je preeklampsie a častějšími potraty (Mascarenhas et al. 2014).

2. 4. 8 Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom (APS) je nejčastěji se vyskytující vrozená trombofilie s prevalencí 3 – 5 % v běžné populaci (Nakashima a Rogers 2014). Jedná se o autoimunitní onemocnění, při kterém se v organismu vytvářejí tzv. antifosfolipidové protilátky (APA). APA jsou heterogenní skupinou protilátek, jejichž cílovými antigeny jsou proteiny vázající se na negativně nabitě fosfolipidy jako je kardiolipin, beta 2 glykoprotein 1 (B2GP1), či protrombin. Podle způsobu detekce se rozlišují dvě základní skupiny APA. První skupinou jsou antifosfolipidové protilátky prokazatelné koagulačními metodami, které se nazývají souhrnným názvem lupus antikoagulant (LA) a jsou spojeny s vyšším rizikem tromboembolických komplikací. Druhou skupinou jsou APA detekovatelné ELISOU, které nesou název podle použitého antigenu a patří tam antikardiolipinové (aCL), antifosfolipidové a antiB2GP1 protilátky (Hluší a Krčová 2003). Jednotlivé druhy APA se v organismu objevují buď z neznámé příčiny (primární APS) nebo v souvislosti s jiným onemocněním (sekundární APS) a jejich klinickou manifestací je prodloužení aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT). Přítomnost APA v organismu ovšem nevede ke krvácivým stavům, ale je spojována se zvýšeným rizikem žilní i arteriální trombózy.

Na rozdíl od vrozených hyperkoagulací, jejichž trombotické příhody bývají většinou orgánově či cévně specifické, se APS projevuje generalizovanou nerovnováhou hemostázy, vedoucí k trombózám kdekoliv v těle (Salmon a de Groot 2008). Příčinou je schopnost APA ovlivňovat na fosfolipidech závislé reakce hemostázy, čímž dokážou např. potlačit inaktivaci FVa a FVIIIa, zvýšit expresi prokoagulačních faktorů (TF, vWF) či inhibovat přirozené inhibitory koagulace (AT, protein C a S). Pomocí těchto mechanismů posouvají APA hemostatickou rovnováhu směrem k hyperkoagulacím a APS vede k tvorbě jak arteriálních, tak žilních trombóz (Hluší a Krčová 2003).

Tromboembolické stavy se projevují nejčastěji u osob s prokázanými LA a to více jak 10krát častěji oproti jedincům s negativními APA a navíc jsou příčinou celé řady těhotenských komplikací. Například předčasné ukončení těhotenství (RPL) se objevilo u 33,9 % žen s pozitivními LA a jen u 2,9 % žen s negativními LA a podobně byla u LA pozitivních patientek zaznamenána i vyšší incidence HELLP syndromu a intrauterinní růstové retardace plodu (Clark et al. 2013).

2. 5 Trombofilie a těhotenství

Těhotenství je v důsledku komplexních změn v hemostáze řazeno mezi získané trombofilie. Riziko TEN je u těhotných žen až desetinásobně vyšší a příčinou jsou hemodynamické, prokoagulační a hormonální změny fyziologicky probíhající v těhotenství (Izadi et al. 2015). Na jednu stranu jsou takové změny hemostázy nezbytné, protože umožňují udržet správnou funkci placenty a zabraňují výrazným ztrátám krve při porodu, ale na druhé straně jsou predispozičním faktorem trombózy a mnohých dalších patologických stavů (Réger et al. 2013a).

TEN se vyskytuje u 1 z 1 500 těhotných žen a manifestuje se hlavně jako DVT a pouze asi z 20 % jako PE (Bloomenthal et al. 2002; James 2009). Pro těhotenství jsou charakteristické trombózy postihující v 90 % levou dolní končetinu. Přítomnost TEN dále zvyšuje riziko rozvoje porodních komplikací, kam patří předčasné porody, potraty, preeklampsie, HELLP syndrom či předčasné odloučení placenty. Zejména nebezpečná v těhotenství je kombinace více rizikových faktorů TEN jako je vysoký věk rodičky, kouření, přítomnost vrozené trombofilie, či předchozí anamnéza TEN.

Obecně byla přítomnost TEN v graviditě pokládána za jednu z hlavních příčin úmrtí matek při porodu a v šestinedělí, což se v současné době díky rychlému medicínskému pokroku změnilo. Podle studie prováděné v roce 2006 se smrt matky v důsledku TEN objevuje přibližně u jednoho ze 100 000 porodů (James et al. 2006). Tato incidence souhlasí i s daty Českého statistického úřadu z roku 2006, kdy z celkového počtu 113 083 porodů, zemřela jediná pacientka.

2. 5. 1 Příčiny TEN v těhotenství

V graviditě dochází k výrazným změnám ve všech třech rizikových faktorech podílejících se na rozvoji trombózy, označovaných jako Virchova triáda. Mezi ně patří zpomalení toku krve, změny cévní stěny a abnormality ve složení krve se sklonem k nadměrnému srážení. Konkrétně se jedná hlavně o změny v hladinách koagulačních a fibrinolytických faktorů (Tab. 3), ale i o reologické změny způsobené zvýšeným objemem krevní plazmy, hormony či útlakem žil rostoucí dělohou. Všechny tyto změny společně vedou k zdvojnásobení koagulační aktivity, a proto je těhotenství označováno jako hyperkoagulační stav. Navíc přítomnost dalších rizikových faktorů jako je historie tromboembolické příhody, trombofilie,

rodička starší 35 let, či výskyt opakovaných potratů, dále výrazně zvyšují riziko TEN v průběhu těhotenství a šestinedělí.

Tab. 3: Změny hemostatických parametrů během těhotenství.

Hemostatické parametry	Změna hladin v těhotenství
FII a FV	Žádná
Fibrinogen	Zvýšení o >100%
FVII	Zvýšení až o 1 000%
FVIII, FIX, FX, FXII a vWF	Zvýšení >100%
FXI	Různé
FVIII	Snížení až o 50%
Protein C	Žádná
Protein S	Snížení až o 50%
D-dimery	Zvýšení až 400%
Trombocyty	Snížení až o 20%

Zdroj: Katz a Beilin 2015

2. 5. 2 Diagnostika TEN v těhotenství

U gravidních pacientek jsou příznaky akutní TEN jako je otok dolních končetin či dušnost nedostačující k diagnóze, protože stejné příznaky se běžně objevují v těhotenství v důsledku fyziologických změn. Stejně tak běžně používané skórovací systémy, jako je Wellsovo skóre, které určuje míru pravděpodobnosti TEN, nejsou v těhotenství kvůli nízké pozitivní prediktivní hodnotě doporučovány, ale neměly by být ani úplně opomíjeny, protože mohou pomoci odhadnout klinickou pravděpodobnost TEN.

Nicméně byl vytvořen nový skórovací systém specifický pro vyloučení DVT v těhotenství, tzv. LEft skóre. LEft skóre zkoumá pouze tři kritéria: L (left) – přítomnost symptomů v levé noze, E (edema) – více jak dvoucentimetrový rozdíl v obvodu lýtky, Ft (first trimestr) – projev v prvním trimestru těhotenství. K tomu, aby toto predikční skóre mohlo být běžně využíváno v klinické praxi, je potřeba provést ještě mnoho nezávislých studií, ale ty současné ukazují jeho vysokou spolehlivost ve vyloučení DVT. Negativní prediktivní hodnota (NPV) LEft skóre je až 100% (Simcox et al. 2015a; Righini et al. 2013; Musil 2009).

Z laboratorních testů má takto vysokou NPV jen měření D-d, ale pouze za předpokladu, že je brána v potaz vyšší cut-off hodnota charakteristická pro těhotenství (Chan et al. 2010). Hladina D-d v těhotenství postupně stoupá a v třetím trimestru dosahuje až dvojnásobných hodnot, a proto běžně používané cut-off hodnoty v těhotenství neplatí. Navíc v přítomnosti dalšího rizikového faktoru, jakým je např. leidská mutace, hladina D-d dále vzrůstá (Štíhová 2015). I přesto je vyšetření D-d velmi citlivým a často používaným testem i u gravidních pacientek.

V současné době se ke stanovení TEN používá kombinace klinického hodnocení, laboratorního vyšetření D-d a kompresní ultrasonografie (CU). Kompresní ultrasonografie je dostatečně citlivá i specifická metoda k vyloučení DVT a navíc je i cenově dostupná, šetrná a je zde možnost opakovatelnosti (Musil 2009). Vzhledem ke všem výše zmiňovaným výhodám je CU diagnostickou metodou číslo jedno u pacientek se symptomy společnými jak pro DVT, tak pro PE. U takových pacientek se provede důkladný anamnestický rozbor, určí se přítomnost rizikových faktorů TEN, provedou se laboratorní koagulační vyšetření a CU k vyloučení DVT. Pokud je CU negativní, ale jsou přítomné faktory nasvědčující TEN, jsou provedena další vyšetření, jako je ventilační scintigrafie plic nebo CT angiografie, které jsou používány k diagnostice PE. Tato vyšetření jsou oproti CU nákladnější a představují i určité riziko pro matku i plod, a proto se k nim přistupuje až v druhém kroku.

2. 5. 3 Léčba TEN v těhotenství

Léčba TEN v těhotenství musí probíhat nejen s ohledem na zdraví matky, ale i na nenarozeného potomka. U každé pacientky je dle rizika rozvoje TEN potřeba zvážit podání antikoagulačních léků, které sice dokážou velmi efektivně zabránit vzniku trombu, ale na druhou stranu mohou vést až k život ohrožujícímu krvácení. Incidence velkých krvácivých příhod u TEN pacientů léčených antikoagulancii je 7,2/100osob/rok a riziko život ohrožujícího krvácení je 1,31/100osob/rok (Linkins et al. 2003). Mimo to způsobují některá antikoagulancia řídnutí kostí a při užívání léků na bázi heparinu se objevuje i tzv. heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT).

Antikoagulační terapie navíc působí patologicky i na nenarozeného potomka. Mnoho běžně používaných léků, jako je warfarin a další antagonisté vitamínu K, prostupují placentou, působí teratogenně na plod a jsou zodpovědné za častější výskyt vrozených vývojových vad a spontánních potratů (Bates 2007). Z tohoto důvodu je jejich užívání

v průběhu těhotenství vyloučené. Naštěstí v současné době existují nová, méně agresivní antikoagulancia, která neprostupují placentou např. nefrakcionované hepariny (UFH) či nízkomolekulární hepariny (LMWH).

LMWH jsou v současné lékařské praxi nejčastěji používaná antikoagulancia k léčbě TEN v těhotenství. Důvodem je vysoká účinnost, jednoduchá subkutánní aplikace bez potřeby laboratorních kontrol a také menší riziko nežádoucích účinků oproti ostatním heparinům. Jednotlivé preparáty LMWH (Fraxiparine, Clexane, Fragmin, Clivarine) se liší nejen metodou přípravy a molekulovou hmotností, ale také poměrem FXa/FIIa (Krčová et al. 2003). LMWH jsou předepisovány na základě hmotnosti pacientky a užívají se nejčastěji jedenkrát denně podkožně. Během těhotenství by se dávky měly měnit v závislosti na vzrůstající tělesné hmotnosti těhotné, ale také z důvodu zvyšující se renální clearance. Plazmatický poločas LMWH totiž není závislý na velikosti dávky, ale na renální clearance, která v těhotenství postupně stoupá a dle toho by měly být dávky LMWH upravovány.

3 Cíle práce

- 1) Analýza údajů souboru pacientek vyšetřených na D-dimery v letech 2014 – 2015 na ambulanci klinické hematologie nemocnice v Českých Budějovicích.

- 2) Určení prevalence vrozených hyperkoagulačních stavů v souboru.

- 3) Stanovení hladiny D-dimerů u vrozených hyperkoagulačních stavů selektovaných skupin (gravidní a negravidní pacientky).

- 4) D-dimery ve vztahu k predikci porodních komplikací u zkoumaných hyperkoagulačních stavů.

4 Materiály a metodika

4.1 Indikace ke koagulačnímu vyšetření

V současné době se neustále zvyšuje úroveň laboratorní diagnostiky, a lékař proto může k diagnóze trombofilie využít celou řadu různých testů. Nicméně před každým koagulačním vyšetřením je důležité nejprve provést u pacienta důkladný anamnestický rozbor. Lékař se zajímá o prodělané choroby, současná onemocnění, užívané léky, životní styl a hledá symptomy trombofilie jak v osobní, tak rodinné anamnéze. Po správně provedené anamnéze by měl mít lékař alespoň přibližnou představu o diagnóze pacienta a tu si následně potvrdit nebo vyvrátit konkrétními laboratorními testy. Kromě anamnézy je důležité znát i charakteristiky jednotlivých laboratorních testů – jakou metodou probíhá stanovení, jaká je diagnostická specifita a senzitivita testu, či zda je výsledek závislý např. na věku nebo pohlaví. Lékař by neměl zatěžovat ani pacienta, ani laboratoř „zbytečnými“ vyšetřeními a každé vyšetření předepisovat po předchozím uvážení.

Například podle České angiologické společnosti by mělo být koagulační vyšetření trombofilních stavů indikováno až při splnění alespoň dvou klinických kritérií, protože pouze v těchto případech má indikace k vyšetření hyperkoagulací své opodstatnění a získáme výsledky, které nám umožní díky vhodné profylaxi zabránit dalším TEN příhodám.

Klinická kritéria k indikaci vyšetření trombofilních stavů

- První tromboembolická příhoda v mladším věku
 - žilní trombóza před 45. rokem věku
 - arteriální trombóza před 35. rokem věku
- Recidivující trombózy
- Trombóza v neobvyklé lokalizaci
- Pozitivní rodinná anamnéza
- Tromboembolická příhoda vzniklá v souvislosti s graviditou či léčbou estrogeny
- Opakované potraty a jiné komplikace těhotenství

(Hirmerová et al. 2014; Matýšková et al. 2009)

Kromě výše zmíněných kritérií je častou indikací k vyšetření hyperkoagulačních stavů i nepříznivá gynekologická anamnéza. Jedná se o pacientky s opakovaně neúspěšným těhotenstvím, u kterých se v anamnéze vyskytují opakované potraty, nitroděložní úmrtí plodu ke konci těhotenství, intrauterinní růstové retardace plodu či těžká preeklampsie (Gaillyová et al. 2005). Častou příčinou těchto problémů jsou právě hyperkoagulační stavy a bylo prokázáno, že pouze ¼ pacientek s trombofilií a předchozí nepříznivou gynekologickou anamnézou, úspěšně dokončí těhotenství bez antikoagulační terapie (Poul 2006).

Kvůli výše zmíněným rizikům jsou těhotné ženy s nepříznivou gynekologickou anamnézou, prokázaným hyperkoagulačním stavem nebo prodělanou tromboembolickou příhodou vyšetřeny na AKH. Lékař AKH zváží dle přítomnosti jednotlivých rizikových faktorů, výsledků laboratorního vyšetření a stavu pacientky nasazení antikoagulační léčby a pacientku sleduje v průběhu celého těhotenství a šestinedělí. Ve zpracovaných datech tak máme často k dispozici díky zvolenému dvouletému období více výsledků od jedné pacientky.

4. 2 Odběr krve a její zpracování

Všechny vzorky zpracované v této práci byly odebrány specializovaným pracovníkem na ambulanci klinické hematologie (AKH) nemocnice České Budějovice, kde se k odběrům používá systém Becton Dickinson Vacutainer (BDV). Při něm jsou odběry prováděny do předem připravených, popsaných zkumavek, které se liší barvou uzávěru, podle vyšetření, ke kterému jsou určeny. Ke koagulačním vyšetřením jsou používány zkumavky se světle modrým uzávěrem, které obsahují pufrovaný roztok citrátu sodného. Citrát sodný vyvazuje ze vzorku krve Ca^{2+} , a zabraňuje tak jejímu srážení. Při odběru je důležité dodržet správný poměr krve k antikoagulačnímu činidlu, který je u 3,8% citrátu sodného 9:1, nejčastěji tedy 4,5 ml krve na 0,5 ml citrátu. V současné době je díky užívání vakuových systémů jako je BDV dodržení poměru usnadněno podtlakem, který se při odběru ve zkumavce vytvoří, a výrazně se tak snížilo množství chyb v analytické části odběru krve.

Po správně provedeném odběru by měly být zkumavky 3 – 4 krát jemně převráceny a společně se správně vyplněnou žádankou co nejrychleji doručeny do Centrální laboratoře Nemocnice v Českých Budějovicích (dále jen CL). Pracovník laboratoře nejprve zkontroluje správnost údajů na vzorku i žádance a v případě shody přidělí oběma identifikační štítek se stejným kódem, pod kterým je pacient zadán do laboratorního informačního systému (LIS)

a vzorek v laboratoři zpracován. Ihned poté jsou vzorky určené ke koagulačnímu vyšetření odstředěny při 1500 g po dobu 15 min a až poté doručeny na hematologické oddělení CL.

Před vlastní analýzou je ještě každý vzorek překontrolován laborantkou. V tomto kroku jsou vyřazeny vzorky se špatně provedeným odběrem, kde nebyl dodržen správný poměr antikoagulačního činidla k množství krve, či je přítomna hemolýza v důsledku špatného odběru. V takovém případě laboratoř neprovede analýzu a požádá o nový odběr. Úkolem laborantky je také zaznamenat nežádoucí vlastnosti vzorku, které mohou ovlivnit výsledek měření, jako je hemolytická či chylózní plazma. Míra zkreslení výsledku je závislá na koncentraci látky způsobující tuto nedokonalost (Tab. 4) a některé nedokonalosti vzorku, jako je přítomnost lipidových částic, mohou být odstraněny opakovanou centrifugací po dobu 10 min při 15 000 g. Pokud ani po opakované centrifugaci nedojde k odstranění nedokonalostí, nebo pokud vyjdou hraniční hodnoty u vzorků s chylózní či hemolytickou plazmou, je požádáno o nový odběr.

Tab. 4: Koncentrace látek, při kterých dochází ke zkreslení výsledků měření D-d při použití analyzátoru Sysmex CS-5100.

Látky zkreslující výsledky D-d	Koncentrace, při níž dochází ke zkreslení D-d (mg/dl)
Triglyceridy	300
Hemoglobin	200
Bilirubin	12

Zdroj: Aplikační list pro D-d, Sysmex CS-5100

4. 3 Kvantitativní automatizované stanovení hladiny D-d

V laboratoři klinické hematologie (LKH) nemocnice v Českých Budějovicích, dále jen laboratoř, je měření D-d prováděno imunoturbidimetrickým testem Innovance D-dimer od společnosti Siemens na koagulometru Sysmex CS-5100 (Obr. 5). Laboratoř má navíc k dispozici ještě hematologický analyzátor CS 2100i, který pracuje se stejnými reagensy, ale D-d na něm nejsou běžně měřeny. Nicméně i při použití analyzátoru CS 2100i by se výpovědní hodnota vyšetření neměla měnit, protože dle studie prováděné společností Siemens je mezi oběma systémy skvělá korelace, a tudíž výsledné hodnoty obou analyzátorů jsou téměř shodné (Flieder et al. 2016).

Oba přístroje japonské společnosti Sysmex jsou plně automatizované optické analyzátory sloužící k *in vitro* diagnostice, které podle potřebného vyšetření pracují na základě koagulačních, chromogenních nebo imunologických metod. K vyšetření D-d je používána imunologická metoda, při které agregáty vzniklé reakcí Ag-Ab mění průchodnost světla vzorkem. Analyzátor tedy neměří přímo koncentraci D-d, ale zaznamenává změnu optické hustoty (dOD) plazmy a poté za pomoci kalibrační křivky stanovuje výslednou hodnotu D-d v mg/L FEU.



Obr. 5: Automatický koagulační analyzátor Sysmex CS-5100. Zdroj: vlastní foto

4. 3. 1 Innovance D-dimer

Innovance D-dimer (ID-d) je diagnostický test vyvinutý společností Siemens Healthcare Diagnostics, který umožňuje kvantitativní stavovení D-d. Tento test je používán v LKH přibližně od září roku 2013 a může být použit na celé řadě různých koagulačních analyzátorů. Zpočátku byly D-d měřeny tímto testem na analyzátoru CA-7000 a v současné době je používán modernější analyzátor CS-5100, oba od společnosti Sysmex. Nicméně vždy je potřeba s testem zacházet podle referenčních návodů specifických pro daný analyzátor.

Pokud jsou všechny reagencie i kontroly ID-d připraveny správně a nevyskytla-li se chyba v koagulometru, je kombinace ID-d a analyzátoru CS-5100 rychlým diagnostickým testem k vyloučení TEN. V laboratoři je tak možné stanovit hladinu D-d až u 268 vzorků za hod. a to s negativní prediktivní hodnotou a diagnostickou sensitivitou vyšší než 99 %. Bohužel ale specifita testu ID-d je nízká a v závislosti na použitém analyzátoru kolísá mezi 35 – 40 %.

Princip metody a příprava reagencií

ID-d pracuje na imunoturbidimetrickém principu, kdy do analyzovaného vzorku jsou přidány polystyrénové částice pokryté MAbs proti epitopu D-d (8D3), které reagují s D-d a vedou k tvorbě imunokomplexů. Vzniklé ICs odrážejí a částečně i pohlcují monochromatické světlo vycházející z halogenové lampy, a snižují tak intenzitu světla procházejícího měřicí kyvetou. Jinými slovy vznik ICs zvyšuje zákal ve vzorku a je měřen stupeň zákalu - turbidity. Měření je prováděno v přímém směru, po ose světelného paprsku a úbytek intenzity prošlého světla je analyzátozem zaznamenáván jako změna absorbance za daný časový úsek. Analyzátor vynese takto zjištěnou hodnotu na kalibrační křivku a stanoví koncentraci D-d ve vyšetřovaném vzorku přepočtenou na mg/L FEU. Rozsah měření testu ID-d je 0,19 - 4,40 mg/L FEU, přičemž může být na analyzátoru CS-5100 rozšířen automatickým nařazením vzorků až na 80 mg/L FEU.

Problém při měření představují lipemické vzorky nebo vzorky obsahující částice neodstranitelné centrifugací. Přítomnost těchto částic mění rozptyl světla v analyzované plazmě a může podobně jako přítomnost heterofilních Ab (např. HAMA či revmatoidní faktor) vést k falešně vyšším, ale i nižším výsledkům. Nicméně koagulometr CS-5100 má několik filtrů, které částečně snižují vliv interference.

Test ID-d pracuje s pěti základními reagenciemi, které jsou dle typu dodávány buď v kapalně, nebo lyofilizované formě (Tab. 5) a měly by být skladovány při teplotě 2 až 8 °C. Důležité je dodržovat pokyny pro přípravu jednotlivých komponent a kromě diluentu vždy pracovat s reagenciemi stejné šarže, protože kombinace jiných šarží, stejně jako jejich nesprávná příprava, mohou vést k nesprávným výsledkům. V laboratoři je zavedeno používání všech reagencií stejné šarže, tedy i diluentu a jejich příprava se provádí vždy den dopředu. Pouze tak je zabráněno zbytečným analytickým chybám, jako je např. špatné nařazení reagencie, které často vznikalo při spěšné přípravě.

Pro zajištění přesnosti a reprodukovatelnosti výsledku jsou v laboratoři dvakrát denně prováděny interní kontroly kvality. K tomuto měření slouží reagentie Controls, která obsahuje dvě lahvičky kontrol, jednu s plazmou v normálním a jednu v patologickém rozmezí. Obě kontroly musí být před použitím rozpuštěny v 1 ml destilované vody, opatrně protřepány a ponechány v klidu po dobu alespoň 15 min. při pokojové teplotě a před měřením opět opatrně protřepány. Výsledek kontrolní reagentie Control 1 by se měl nacházet v intervalu 0,25 – 0,37 mg/ L FEU a rozsah patologické kontroly – Control 2 v rozsahu 2,03 – 3,05 mg/L FEU. Pokud naměřené hodnoty neleží v deklarovaném rozmezí, je měření provedeno znovu, a pokud je i poté odchylka přítomna, musí dojít k nové kalibraci pomocí reagentie ID-d Calibrator.

Tab. 5: Reagentie používané v testu Innovance D-dimer a jejich složení.

Innovance D-dimer	Forma	Složení	Původ
REAGENT	Lyofilizovaný	Polystyrenové částice pokryté MAbs proti D-d Lidský sérový albumin KL: amfotericin B, gentamycin	Myší Lidský
BUFFER	Kapalný	Pufrovaný fyziologický roztok Dextran Imidazol KL: azid sodný	
SUPPLEMENT	Kapalný	Pufrovaný fyziologický roztok Reagent blokující heterofilní protilátky KL: azid sodný	Myší
DILUENT	Kapalný	Pufrovaný fyziologický roztok Imidazol KL: azid sodný	
CALIRATOR	Lyofilizovaný	Lidská plazma, preparát D-d KL: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazol-3-on 2-metyl-4-isothiazol-3-on Azid sodný	Lidský

Zdroj: Aplikační list Innovance D-dimer, 2017

4. 4 Metodika získání a úpravy dat

Všechna data zpracovaná v této diplomové práci pocházejí od pacientek Ambulance klinické hematologie (AKH) nemocnice v Českých Budějovicích, u kterých byla v letech 2014 – 2015 vyšetřena hladina D-d. AKH byla zvolena jako zdroj dat z důvodu vysoké pravděpodobnosti společného výskytu obou zkoumaných faktorů – hyperkoagulačního stavu a gravidity u téže pacientky. Dle slov pana primáře MUDr. Ivana Vonkeho je více jak 90 % žen účastnicích se opakovaného odběru na AKH těhotných, což bylo potvrzeno již v předchozí práci (Štíhová 2015) a navíc hlavními a nejčastějšími důvody vyšetření D-d na AKH je podezření na vrozený hyperkoagulační stav či kontrola pacientek s již diagnostikovanou trombofilií.

Všechny odebrané vzorky byly měřeny imunoturbidimetrickým testem Innovance D-dimer společnosti Siemens Healthcare Diagnostics na analyzátoru Sysmex CS-5100 a výsledky byly poté uloženy do laboratorního informačního systému (LIS) nemocnice. Pro účely diplomové práce byla z LIS vyselektována data pacientek AKH do 55 let, u kterých byla v roce 2014 a 2015 vyšetřena hladina D-d. Celkem bylo získáno 1599 výsledků a ke každému odběru byly v LIS AKH dohledány potřebné informace – hyperkoagulační stav, osobní a rodinná anamnéza, antikoagulační léčba, gravidita, týden těhotenství v době vyšetření, termín ukončení těhotenství, způsob porodu, pohlaví a porodní váha dítěte. Část informací týkající se porodní váhy, pohlaví dítěte a způsobu porodu musela být dále dohledána v porodopisech neonatologického oddělení nemocnice, a i přesto u některých pacientek tyto informace chybí, protože ne všechny těhotné pacientky AKH rodily v českobudějovické nemocnici.

Získaný soubor dat byl před vlastní analýzou upraven. Vzhledem k tomu, že hladina D-d může být ovlivněna i věkem, byl soubor dat zúžen dle věku nejmladší (19 let) a nejstarší těhotné ženy (46 let). Navíc byly z důvodu omezené přesnosti přístroje ze souboru vyloučeny i výsledky D-d $<0,190$ mg/L. Ve výsledku tak bylo zpracovááno 1415 vzorků pacientek AKH ve věku 19 - 46 let, u kterých byly v roce 2014 – 2015 měřeny D-d. Některé pacientky se však v daném období účastnily odběru vícekrát, a proto byl odstraněním duplicitních hodnot vyselektován druhý soubor dat (dále jako data pacientek), který obsahoval pouze jeden náhodně vybraný odběr od každé pacientky a tvořilo ho 560 vzorků.

4. 5 Statistické zpracování dat

Všechny výsledky byly zpracovány programem Excel 2007 a za pomoci Mgr. Ondřeje Mottla i statistickým programem R verze 3. 2. 5. Data byla vyhodnocena lineárním modelem se smíšenými efekty a průkaznost jednotlivých proměnných byla testována pomocí ANOVY doplněné post-hoc Tukeyho testem. Vzhledem k nenormálnímu rozložení dat hladin D-d, byly v celé práci použity přirozené logaritmy hladin D-d (ln D-d). Všechna srovnání byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$ a souhrnné hodnoty D-d byly vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (SEM).

4. 5. 1 Vliv hyperkoagulačního stavu na hladinu D-d

Pro otestování hypotézy zda diagnostikovaný hyperkoagulační stav nějakým způsobem ovlivňuje hladinu D-d, byl vytvořen lineární model se smíšenými efekty, kde hladina D-d (ln D-d) byla závislou proměnnou a diagnostikovaný hyperkoagulační stav nezávislou proměnnou s pevným efektem. Nezávislé proměnné s náhodným efektem byly: identita pacientky, věk, rodinná anamnéza, osobní anamnéza tromboembolické příhody a antikoagulační léčba. Jednotlivé hladiny vysvětlující proměnné (hyperkoagulační stav) byly porovnány s kontrolou za pomoci post-hoc Tukeyho testu.

Sledování hladiny D-d v závislosti na diagnostikovaném hyperkoagulačním stavu bylo testováno i u menšího datasetu těhotných pacientek (1084 vzorků). V tomto případě byl použit lineární model se smíšenými efekty, kde logaritmované hodnoty hladiny D-d byly závislou proměnnou a hyperkoagulační stav společně s týdnem gravidity v době odběru a jejich interakcí byly nezávislé proměnné s pevným efektem. Proměnné s náhodným efektem byly stejné jako v předchozím kroku (identita, věk, rodinná a osobní anamnéza, antikoagulační léčba). Jednotlivé závislé efekty byly testovány ANOVOU (tzn. týden těhotenství v době odběru, hladina D-d u jednotlivých trombofilií a zároveň i efekt interakce týdne těhotenství společně s trombofilií na D-d).

4. 5. 2 D-dimery ve vztahu k predikci porodních komplikací

K potvrzení předpokladu, že výše hladiny D-d ovlivňuje průběh porodu a porodní váhu dítěte, byl opět použit lineární model se smíšeným efektem, doplněný post-hoc Tukeyho testem. Závislou proměnnou byl přirozený logaritmus hladiny D-d a nezávislou proměnnou s pevným efektem porodní váha a způsob porodu. Oproti předchozím případům

do nezávislých náhodných proměnných přibyl týden těhotenství v době odběru a diagnostikovaný hyperkoagulační stav. Pomocí ANOVY byla opět sledována závislost hladiny D-d na obou nezávislých proměnných zvlášť a zároveň i na jejich interakci.

4. 5. 3 Vliv nezávislých náhodných proměnných na hladinu D-d

Navíc byl sledován i vliv nezávislých náhodných proměnných – věk, osobní a rodinná anamnéza a antikoagulační léčba, na hladinu D-d. Analýza byla opět provedena lineární metodou se smíšenými efekty, kdy ve všech případech byla závislou proměnnou logaritmovaná hladina D-d a nezávislá proměnná s pevným efektem se měnila dle sledovaného faktoru. Například při hledání souvislosti mezi antikoagulační léčbou a hladinou D-d, byla nezávislou proměnnou s pevným efektem antikoagulační léčba aproměnnými s náhodným efektem byly zbývající faktory – věk, identita, hyperkoagulační stav, osobní a rodinná anamnéza. V případě antikoagulační léčby se porovnávala hladina D-d u léčených a neléčených pacientek obecně a konkrétně i u pacientek s terapií LMWH oproti pacientkám, který byly léčeny jiným antikoagulanciem a i oproti neléčeným pacientkám pomocí Tukeyho testu.

5 Výsledky

5.1 Analýza údajů vyšetřovaného souboru

Prvním krokem práce bylo zanalyzovat získaný soubor dat. Zjistit, zda odběry pacientek z Ambulance klinické hematologie nemocnice v Českých Budějovicích jsou opravdu vhodným zdrojem dat ke splnění cílů této diplomové práce, čili zda jsou zde zastoupeny hlavně vzorky těhotných žen, které mají zároveň i diagnostikovaný hyperkoagulační stav.

V letech 2014 – 2015 byla v LKH nemocnice v Českých Budějovicích vyšetřena hladina D-d u 1599 vzorků od 687 pacientek do 55 let, které pocházely z AKH. Z tohoto souboru bylo na základě dvou kritérií zmíněných v kapitole 4. 4 – věk těhotné a přesnost přístroje, vybráno k vyhodnocení 1415 výsledků od 560 pacientek ve věku 19 – 46 let. Počet analyzovaných dat v jednotlivých letech je uveden v následující tabulce (Tab. 6).

Tab. 6: Počet vyšetřených pacientek a jejich odběrů v roce 2014 a 2015.

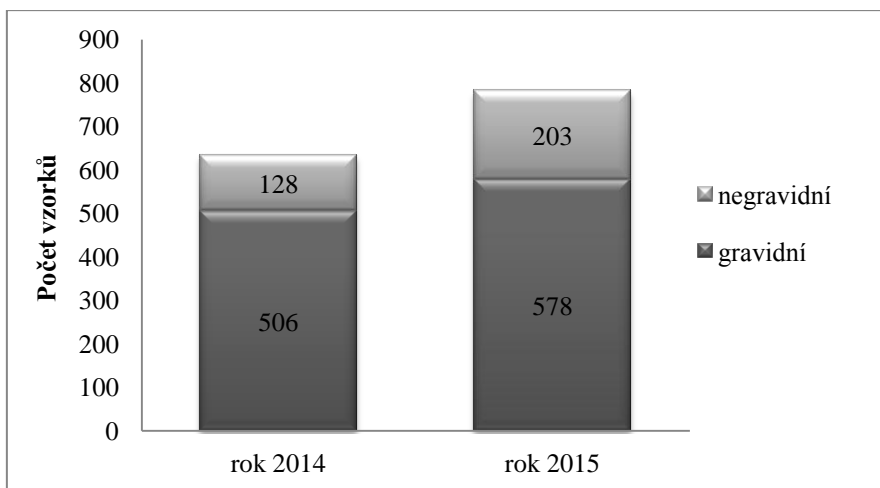
	počet vzorků	počet pacientek
2014	634	292
2015	781	268
celkem	1415	560

Množství odběrů v obou letech převyšuje počet vyšetřených pacientek, protože v závislosti na konkrétním zdravotním stavu docházely pacientky během roku k opakovaným vyšetřením, která sloužila nejen k diagnóze hyperkoagulačního stavu, ale pomocí D-d se sledovala například i účinnost antikoagulační léčby či průběh těhotenství. V roce 2014 byla hladina D-d u každé pacientky změřena průměrně dvakrát za rok a v roce 2015 dokonce třikrát. V obou letech většina vyšetřených vzorků patřila těhotným ženám (Obr. 6), u nichž byl stejně jako v předchozích pracích prokázán nárůst hladiny D-d, která dosahovala téměř trojnásobných hodnot oproti vzorkům negravidních pacientek (Tab. 7).

Tab. 7: Průměrná koncentrace D-d u odběrů rozdělených dle gravidity pacientky.

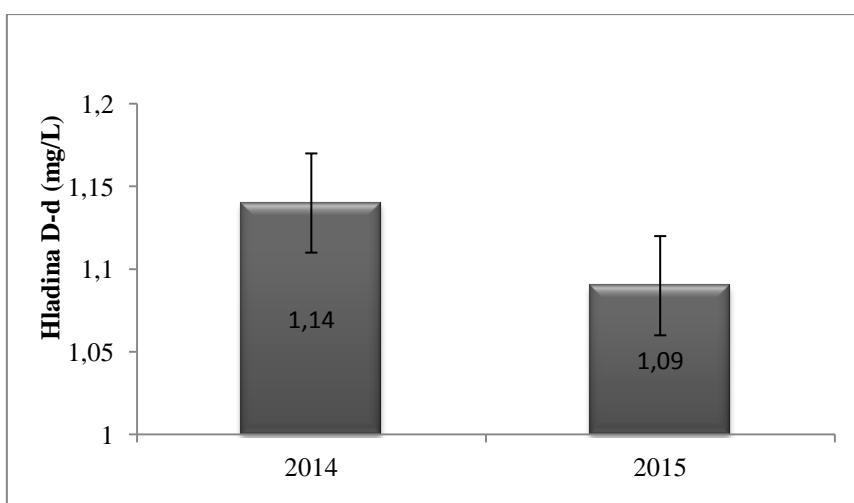
	Průměr. hl. D-d	Medián	Min	Max	Rozptyl Výběru
gravidní	1,30 ± 0,03	1,07	0,19	7,11	0,99
negravidní	0,50 ± 0,03	0,35	0,19	6,26	0,33

Pozn.: hodnoty D-d jsou udávány v mg/L



Obr. 6: Počet odběrů těhotných žen ve studovaném souboru v jednotlivých letech.

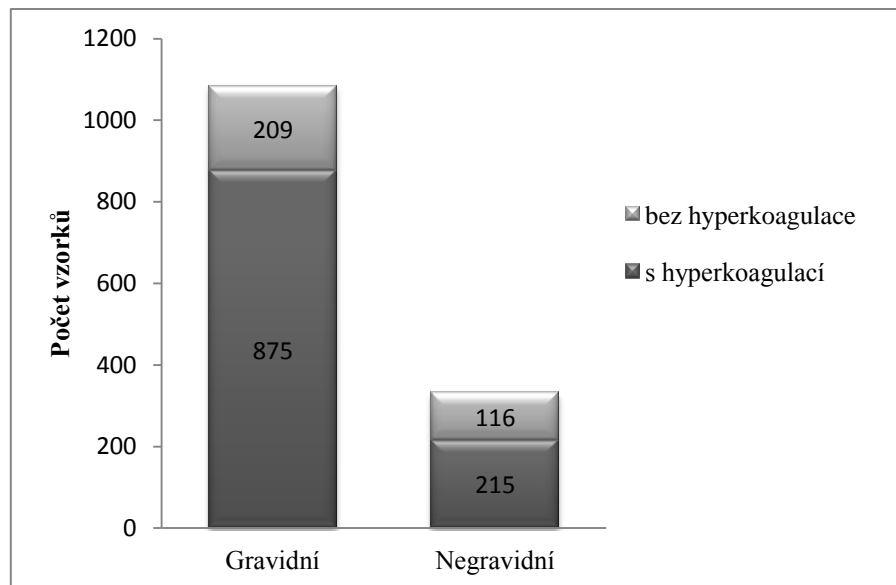
Z výše uvedeného grafu (Obr. 6) je patrné, že v roce 2015 bylo vyšetřeno větší množství vzorků od gravidních pacientek, než v roce 2014. Nicméně i přes vyšší počet odběrů bylo v souboru dat z roku 2015 menší procentuelní zastoupení těhotných žen. Vzorky gravidních pacientek tvořily v roce 2015 pouze 65 % ze všech vyšetřených odběrů oproti 75 % v roce 2014. Tomuto rozdělení odpovídala i hladina D-d (Obr. 7).



Obr. 7: Průměrná hladina D-d analyzovaných dat rozdělená dle roku, ve kterém byl vzorek odebrán.

U hladiny D-d je prokázáný vzrůst v průběhu těhotenství, a tudíž vyšších průměrných hodnot D-d bylo dosaženo v roce 2014, kde bylo oproti roku 2015 odebráno o 10 % víc vzorků gravidních pacientek. V roce 2014 byla průměrná hladina D-d ($1,14 \pm 0,03$ mg/L) dokonce i o něco málo vyšší, než v celém studovaném souboru ($1,12 \pm 0,02$ mg/L).

Ani počet odběrů pacientek s trombofilií nebyl v roce 2015 vyšší. Zastoupení vzorků od pacientek s hyperkoagulací bylo stejné v obou sledovaných letech a tvořilo zhruba 77 % z analyzovaného souboru. Avšak při rozdělení odběrů dle gravidity pacientky byl výskyt trombofilie častější u gravidních pacientek (Obr. 8).



Obr. 8: Porovnání celkového počtu odběrů dle gravidity pacientky v době vyšetření.

Z grafu (Obr. 8) je zřejmé, že většina odběrů patřila pacientkám s diagnostikovaným hyperkoagulačním stavem, přičemž u gravidních pacientek byl výskyt trombofilie častější. U odběrů gravidních pacientek byl hyperkoagulační stav diagnostikován v 80 % případů, ve skupině negravidních pouze u 65 % odběrů. Z celého souboru pak patřilo pouze 325 odběrů pacientkám bez diagnostikovaného hyperkoagulačního stavu.

Podobně tomu je i u rozboru dat pacientek. Z celkového počtu 560 pacientek jich mělo 402 diagnostikovanou trombofilií, a v kontrolní skupině tak bylo pouze 158 pacientek. Nicméně v datech pacientek je nižší zastoupení těhotných, než v celém souboru vyšetřovaných vzorků. Gravidní pacientky zde tvoří pouze něco málo přes polovinu (54 %) oproti 77 % v souboru odběrů. Od každé pacientky byl totiž ponechán jeden programem náhodně vybraný vzorek a dle výsledků to byl v mnoha případech odběr, při kterém pacientka nebyla gravidní.

Nicméně v celém souboru analyzovaných dat většina (77 %) vzorků patřila těhotným ženám, u kterých byl v 80 % případů i diagnostikovaný hyperkoagulační stav. Tímto se potvrdila správnost výběru AKH jako zdroje dat pro tuto práci.

5. 2 Prevalence vrozených hyperkoagulačních stavů v souboru

Druhým cílem práce bylo analyzovat zastoupení jednotlivých hyperkoagulačních stavů ve studovaném souboru a zaměřit se zejména na vrozené hyperkoagulační stavy, jako je Leidenská mutace FV či mutace protrombinu G20210A, které patří k nejčastěji diagnostikovaným vrozeným trombofiliím.

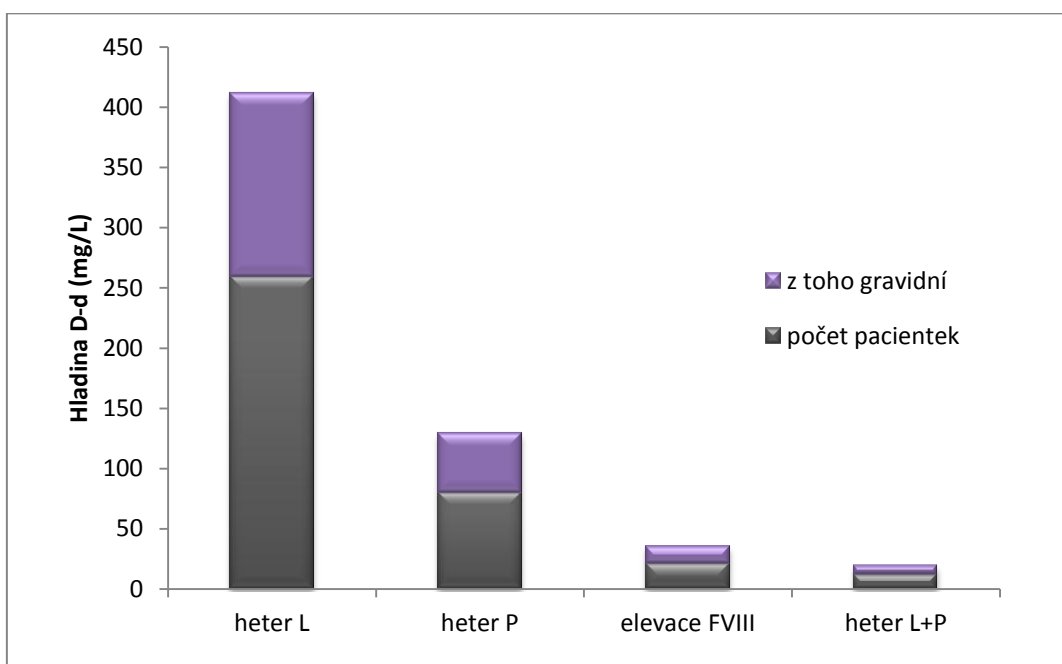
5. 2. 1 Charakteristika dat se zaměřením na hyperkoagulační stavy

Jak již bylo uvedeno výše, v celém analyzovaném souboru 1415 vzorků patřilo 77 % odběrů pacientkám s diagnostikovaným hyperkoagulačním stavem. Kontrolu tudíž tvořilo pouze 325 vzorků od 158 pacientek, které byly nejčastěji vyšetřovány na základě pozitivní rodinné anamnézy tromboembolické příhody či nepříznivé gynekologické anamnézy, ale hyperkoagulační stav u nich nebyl prokázán. Zbývajících 1090 vzorků bylo rozděleno dle konkrétní trombofilie a výsledky byly zaznamenány do tabulky (Tab. 8). Nejčastěji diagnostikovaným stavem v celém souboru byla heterozygotní forma Leidenská mutace FV (heter L).

Tab. 8: Zastoupení jednotlivých trombofilií ve vyšetřovaném souboru.

Trombofilie	Počet vzorků
heter L	672
heter P	221
elevace FVIII	64
heter L+P	40
homo L	23
APS	14
heter L, elevace FVIII	14
deficit AT	9
deficit C	9
heter MTHFR	8
homo MTHFR	7
heter L+P, elevace FVIII	3
hyperhomoc	3
APC R	2
heter L, hyperhomoc	1
celkem	1090

Stejně tomu bylo i u dat pacientek, kde z celkového počtu 402 pacientek s hyperkoagulačním stavem mělo 64 % z nich diagnostikovanou heterozygotní formu Leidenské mutace FV. Druhou nejčastěji se vyskytující trombofilií, jak v datech pacientek, tak v celém studovaném souboru, byla heterozygotní forma protrombinové mutace (heter P). Výskyt jednotlivých hyperkoagulačních stavů byl sledován i u selektovaných skupin gravidních a negravidních pacientek a zastoupení těch nejčastějších trombofilií v obou skupinách je uvedeno v následujícím grafu (Obr. 9).



Obr. 9: Zastoupení jednotlivých hyperkoagulačních stavů u gravidních pacientek:

Heter L – heterozygotní forma Leidenské mutace FV; **heter P** – heterozygotní forma mutace protrombinu G20210A; **elevace FVIII** – zvýšená hladina FVIII; **heter L+P** – kombinovaná trombofilie heterozygotní formy.

I v případě gravidních pacientek bylo zastoupení jednotlivých hyperkoagulačních stavů téměř stejné jako v celém souboru. Pouze homozygotní forma Leidenské mutace FV (homo L) byla u gravidních pacientek častější než antifosfolipidový syndrom (APS). Ve všech analyzovaných skupinách tak byly nejčastěji diagnostikovány dva vrozené hyperkoagulační stavy - heter L a heter P, jejichž příčinou je autozomálně dominantně děděná změna genu, a jsou tak řazeny mezi tzv. vrozené trombofilie.

5. 2. 2 Určení prevalence vrožených hyperkoagulačních stavů v souboru

Prevalence vrožených hyperkoagulačních stavů byla určována pouze z dat pacientek (Tab. 9), protože opakovaný výskyt téže pacientky v celém souboru odběrů by vedl ke zkresleným výsledkům. Například heterozygótní forma protrombinové mutace (heter P) má stejné (20%) zastoupení jak v celém souboru, tak i v datech pacientek, ale existují i trombofilie, u kterých je prevalence ovlivněna použitým souborem dat. Takovým příkladem může být homozogótní forma Leidenské mutace, která se v Tab. 8 objevuje na páté pozici, ale u dat pacientek je až na sedmé. Z toho důvodu byla k potvrzení druhého cíle práce použita pouze data pacientek.

Tab. 9: Počty pacientek s konkrétní diagnostikovanou trombofilií.

hyperkoagulační stav	počet pacientek
heter L	259
heter P	80
elevace FVIII	21
heter L+P	12
heter L, elevace FVIII	6
APS	4
homo L	4
heter MTHFR	4
homo MTHFR	3
deficit C	3
hyperhomoc	2
deficit AT	2
heter P, elevace FVIII	1
heter L, hyperhomoc	1
Celkem	560

Vzhledem k nízkým počtům pacientek s konkrétními diagnostikovanými trombofiliemi byla prevalence určována pouze u prvních čtyř hyperkoagulačních stavů – heter L, heter P, u zvýšené hladiny FVIII (elevace FVIII) a u kombinované trombofilie heter L a zároveň heter P (Tab. 10).

Tab. 10: Prevalence vybraných vrozených hyperkoagulačních stavů v souboru.

Trombofilie	Prevalence
heter L	0,46
heter P	0,14
elevace FVIII	0,04
heter L+P	0,02

Pacientkami AKH jsou ze 72 % ženy s diagnostikovaným hyperkoagulačním stavem. Z toho téměř polovina (46 %) pacientek přichází k vyšetření s diagnózou heterozygotní formy leidské mutace FV, která patří obecně k hyperkoagulacím s nejvyšší prevalencí v populaci. Na druhém místě se nachází heterozygoti pro mutaci protrombinu G20210A, jejichž prevalence ve vyšetřovaném souboru je 0,14. Zbývající část hyperkoagulačních stavů diagnostikovaných u pacientek AKH tvoří zejména zvýšená hladina FVIII a různé kombinované trombofilie, jako je např. společná přítomnost heter L a zvýšené hladiny FVIII či heter L společně s heter P, které se objevily u méně jak 5 % vyšetřovaných pacientek.

5. 3 Stanovení hladin D-d u vrozených hyperkoagulačních stavů

Hlavním cílem diplomové práce bylo sledovat závislost hladiny D-d na diagnostikovaném hyperkoagulačním stavu u gravidních pacientek. Tato hypotéza vznikla na základě výsledků bakalářské práce (Štíhová 2015), kde se ukázalo, že hladina D-d je odlišná u gravidních pacientek s Leidskou mutací a bez ní. Konkrétně u pacientek s FVL byly zaznamenány vyšší hodnoty D-d (1,82 mg/L) oproti pacientkám bez této mutace (1,38 mg/L), které se v průběhu těhotenství navíc i dále zvyšovaly a dosahovaly stejně jako kontrolní skupina nejvyšších hodnot ve třetím trimestru těhotenství (28. – 40. týden). Nicméně tyto výsledky nebyly statisticky potvrzeny. Cílem této práce tedy bylo pomocí statistických metod potvrdit toto tvrzení a sledovat, zda se hladina D-d mění i u jiných hyperkoagulačních stavů.

5. 3. 1 Základní statistická analýza

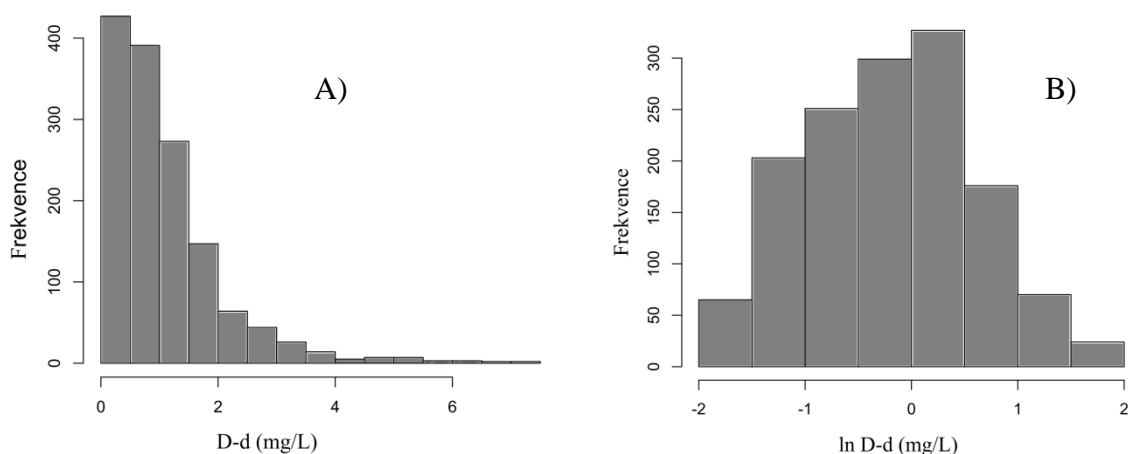
Zpočátku byla provedena základní statistická analýza naměřených hodnot D-d. V tabulce (Tab. 11) je uvedena charakteristika hladin D-d jak v jednotlivých letech, tak v celém souboru, kde průměrná hladina D-d více jak dvojnásobně převyšovala hraniční cut-off hodnotu 0,55 mg/L FEU.

Tab. 11: Základní statistická analýza studovaných vzorků.

	Počet vzorků	Průměr	SEM	Medián	Min	Max	Rozptyl	SD
2014	634	1,144	0,038	0,905	0,19	6,74	0,941	0,97
2015	781	1,094	0,035	0,84	0,19	7,11	0,957	0,978
celý soubor	1415	1,116	0,026	0,87	0,19	7,11	0,95	0,974

Pozn.: hodnoty D-d jsou udávány v mg/L

Nejen podle výše uvedených charakteristik dat, ale i po sestrojení histogramu (Obr. 10) bylo prokázáno, že naměřená data nemají normální rozložení.



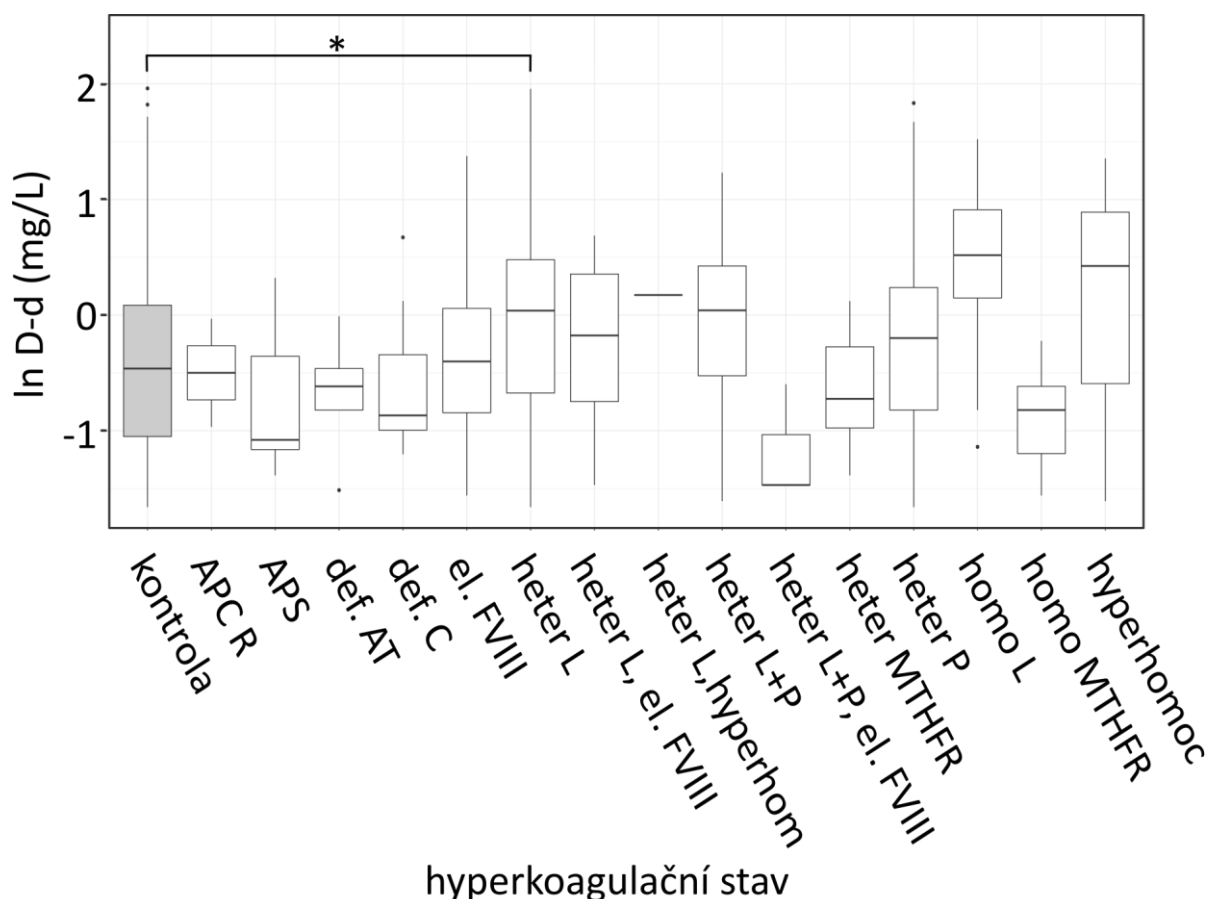
Obr. 10: Histogramy hladiny D-d:

A) Histogram hladiny D-d, B) Histogram logaritmované hladiny D-d.

Z prvního grafu (Obr. 10A) je patrné, že data nezaujímají normální rozložení a jsou tzv. kladně zešikmená. Aby bylo dosaženo normálního rozložení, byly výsledné hodnoty D-d všech 1415 vzorků zlogaritmovány a byl sestaven nový histogram (Obr. 10B) Teprve po vynesení zlogaritmovaných hodnot D-d bylo dosaženo normálního rozložení. Dále tedy bylo v této práci pracováno již jen s přirozenými logaritmy hladin D-d (ln D-d).

5. 3. 2 Vliv hyperkoagulačního stavu na hladinu D-d

Prvním krokem bylo zjistit, zda se hladina D-d nějakým způsobem liší v závislosti na hyperkoagulačním stavu pacientky. Tento předpoklad byl testován na celém souboru vzorků a do výpočtu byly zahrnuty i náhodné proměnné: identifikační číslo pacientky, věk, pozitivní osobní či rodinná anamnéza a antikoagulační léčba. Výsledky jsou uvedeny v následujícím grafu (Obr. 11).

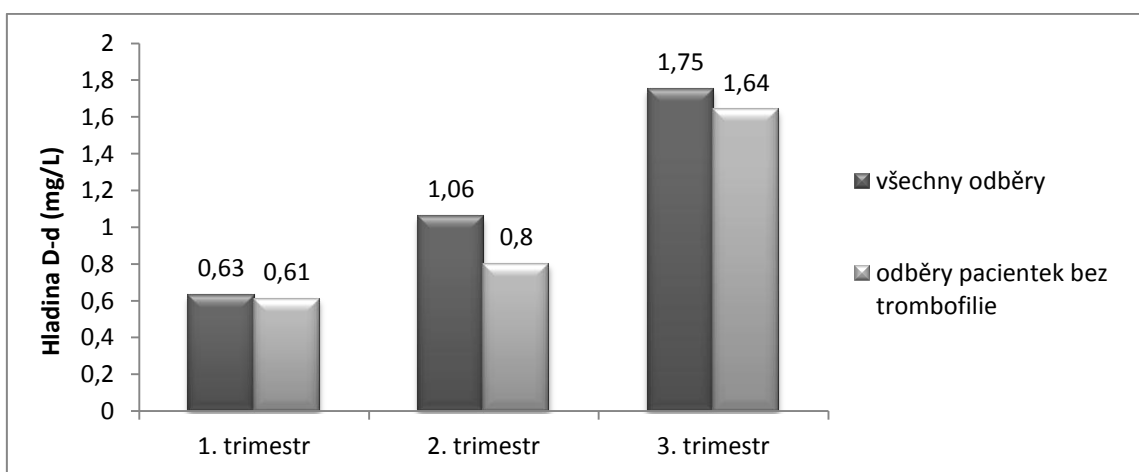


Obr. 11: Hladina D-d u jednotlivých hyperkoagulačních stavů:

Heter L – heterozygotní forma Leidenské mutace FV; **heter P** – heterozygotní forma mutace protrombinu G20210A; **elevace FVIII** – zvýšená hladina FVIII; **heter L+P** – kombinovaná trombofilie heterozygotní formy Leidenské a protrombinové mutace; **homo L** – homozygotní forma Leidenské mutace FV; **APS** – antifosfolipidový syndrom; **heter L, elevace FVIII** – kombinovaná trombofilie heterozygotní formy Leidenské a zvýšené hladiny FVIII; **deficit AT** – deficit Antitrombinu; **deficit C** – deficit proteinu C; **heter MTHFR** – heterozygotní forma mthylentetrahydrofolát reduktázy; **homo MTHFR** – homozygotní forma mthylentetrahydrofolát reduktázy; **hyperhomoc** – hyperhomocysteinémie; **APC R** – rezistence k aktivovanému proteinu C způsobená jinou než Leidenskou mutací; **heter L, hyperhomoc** – kombinovaná trombofilie heterozygotní formy Leidenské mutace a hyperhomocysteinémie.

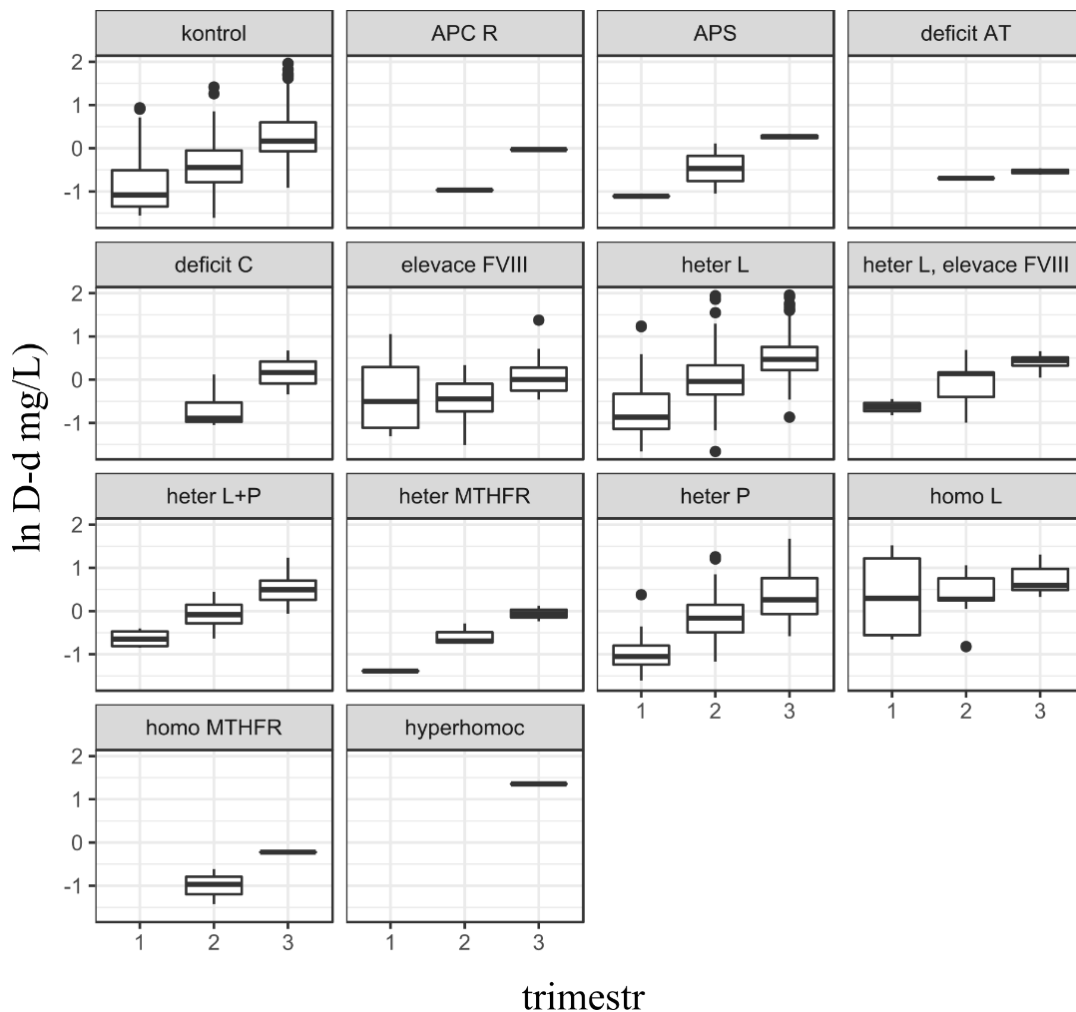
Z grafu (Obr. 11) je patrné, že jediná průkazně odlišná od kontroly je hladina D-d u heter L. Jednotlivé hyperkoagulační stavy byly individuálně testovány ve vztahu ke kontrole a ze všech diagnostikovaných měla prokazatelný vliv na hladinu D-d skutečně pouze heterozygotní forma Leidenské mutace ($t = 4,253$; $df = 599,21$; $p = 0,003$). Průměrná hodnota D-d u vzorků s heter L byla $1,25 \pm 0,04$ mg/L FEU. Tato hodnota více jak dvojnásobně překračovala hraniční cut-off hodnotu $0,55$ mg/L FEU a navíc zde byl i patrný rozdíl od kontrolní skupiny vzorků bez diagnostikované trombofilie, kde byla průměrná hladina D-d $0,95 \pm 0,06$ mg/L FEU.

Analyzovaná data obsahovala vzorky jak gravidních, tak negravidních pacientek a byla snaha zjistit, zda hladina D-d bude nějakým způsobem závislá na hyperkoagulačním stavu pouze u vzorků gravidních pacientek. U těhotných je totiž prokázán postupný nárůst hladiny D-d v průběhu těhotenství nezávisle na přítomnosti jakéhokoliv dalšího faktoru. V nedávných studiích (Štíhová 2015, Felixová 2017, Kabelová 2017) však bylo poukázáno na další zvyšování hladiny D-d v případě diagnostikované trombofilie, které bylo potvrzeno i výsledky této diplomové práce (Obr. 12).



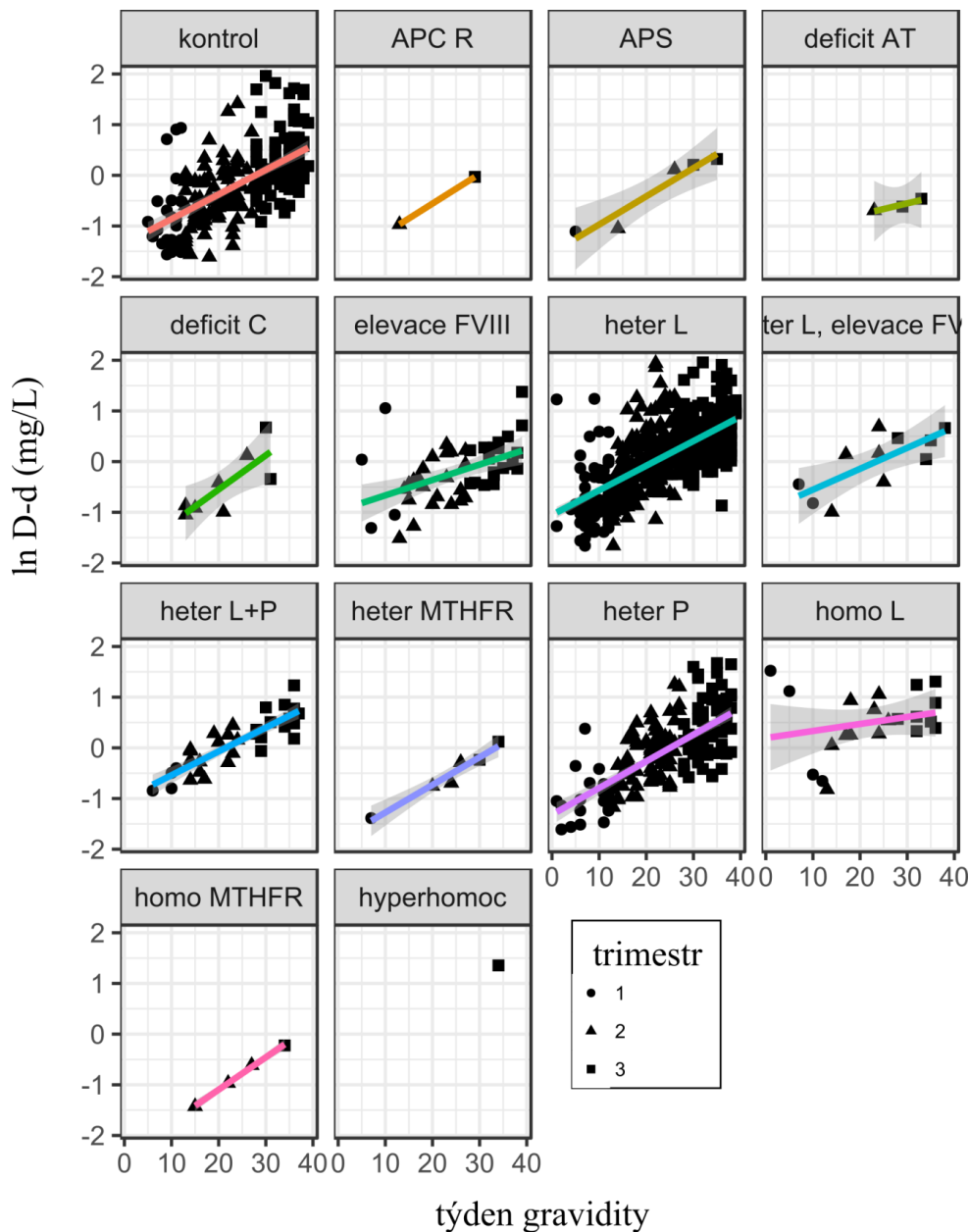
Obr. 12: Postupný nárůst hladiny D-d v průběhu těhotenství v závislosti na přítomnosti trombofilie: 1. trimestr: 1. – 12. týden, 2. trimestr: 13. – 27. týden, 3. trimestr: 28. – 40. týden.

Na základě prokázané skutečnosti zvyšování hladin D-d u gravidních pacientek a mírně odlišných hodnot u pacientek s trombofilií byly ze souboru vyselektovány pouze vzorky gravidních pacientek, u kterých byla sledována závislost hladiny D-d na konkrétním hyperkoagulačním stavu v průběhu těhotenství. Jednotlivé vzorky gravidních pacientek ($N=1084$) byly rozděleny dle diagnostikovaného hyperkoagulačního stavu pacientky a dle trimestru těhotenství v době odběru a vyneseny do grafu (Obr. 13).



Obr. 13: Závislost hladiny D-d na trimestru těhotenství u konkrétních hyperkoagulačních stavů: 1. trimestr: 1. – 12. týden, 2. trimestr: 13. – 27. týden, 3. trimestr: 28. – 40. týden.

První graf na Obr. 13 patřil kontrole, kterou tvořilo 209 vzorků gravidních pacientek, u kterých nebyl diagnostikován hyperkoagulační stav. V této skupině je vidět již zmiňovaný postupný nárůst hladiny D-d v průběhu těhotenství, prokázaný i v předchozí práci (Štíhová 2015). Hladina D-d vzrůstá postupně a maximálních hodnot dosahuje ve třetím trimestru, kde byly průměrné hladiny v kontrolní skupině 2,5krát vyšší oproti prvnímu trimestru. I v ostatních grafech týkajících se konkrétních hyperkoagulačních stavů je nejvyšších hodnot dosaženo ve třetím trimestru těhotenství. Pro lepší názornost a přesnost byla stejná data rozdělena i dle týdnu těhotenství a vynesena do grafu s lineárním proložením, který umožnil lépe sledovat trend stoupání (Obr. 14).

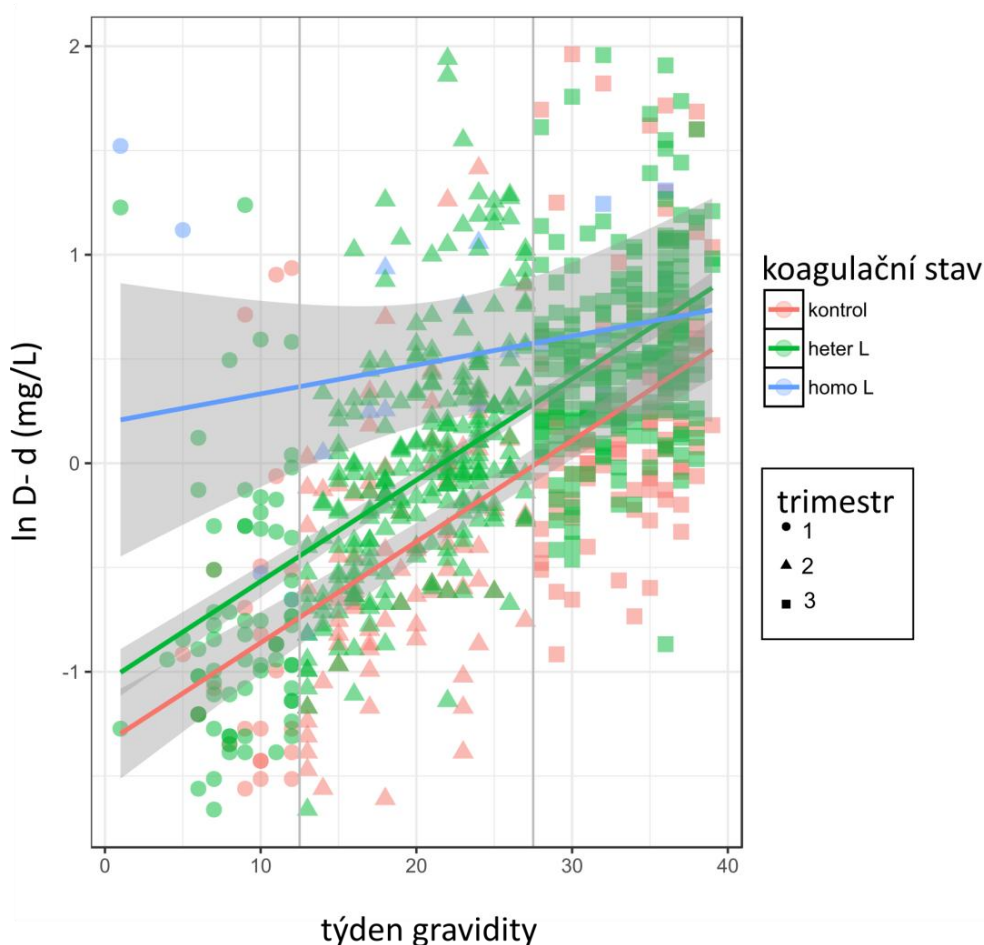


Obr. 14: Závislost hladiny D-d na týdnu těhotenství u jednotlivých hyperkoagulačních stavů: 1. trimestr: 1. – 12. týden, 2. trimestr: 13. – 27. týden, 3. trimestr: 28. – 40. týden.

Z obrázku je patrné, že trend nárůstu hladiny D-d v průběhu gravidity v kontrolní skupině je velmi podobný i téměř ve všech ostatních skupinách s konkrétními trombofiliemi. Jediný prokazatelně odlišný trend byl zjištěn u homo L ($F = 9,277$; $\text{numDF} = 2$; $\text{denDF} = 614,4$; $p < 0,001$), kde nedošlo k tak výrazné změně v hladinách D-d mezi prvním a posledním trimestrem těhotenství. Průměrná hladina D-d u homo L v prvním trimestru byla $1,71 \pm 0,7$ mg/L oproti $0,63 \pm 0,14$ mg/L u kontroly, a byla tak od začátku na výrazně vyšších hodnotách, a ačkoliv pacientky s homo L dosáhly ve 3. trimestru vysoké hladiny D-d

($2,22 \pm 0,32$ mg/L), byl zde i přesto vzrůst hladiny D-d v průběhu těhotenství dvakrát menší než u kontroly ($1,63 \pm 0,13$ mg/L). U gravidních pacientek s homo L byla kromě odlišného sklonu přímky prokázána i závislost hladiny D-d na této mutaci ($F = 14,996$; numDF = 2; denDF = 563,97; $p < 0,001$), která při analýze celého souboru vzorků (gravidní i negravidní) nebyla nalezena.

I přesto, že to ani z jednoho grafu není úplně zřejmé, hladinu D-d u gravidních pacientek ovlivňovala, stejně jako v celém souboru, i heterozygótní forma Leidenské mutace ($F = 8,17$; numDF = 1; denDF = 656,92; $p = 0,004$). Průměrná hladina D-d u pacientek v heter L byla $1,42 \pm 0,04$ mg/L, a poměrně výrazně tak převyšovala hladinu D-d u gravidních pacientek bez hyperkoagulace, která byla $1,18 \pm 0,08$ mg/L. Přítomnost této mutace tak měnila výšku hladiny D-d, ale trend stoupaní během těhotenství zůstal stejný jako u kontroly. Pro lepší názornost byly vzorky pacientek s oběma formami Leidenské mutace FV vyneseny společně s kontrolou do samostatného grafu (Obr. 15).



Obr. 15: Závislost hladiny D-d na týdnu gravidity u vybraných hyperkoagulačních stavů: 1. trimestr: 1. – 12. týden, 2. trimestr: 13. – 27. týden, 3. trimestr: 28. – 40. týden.

Hladina D-d je v těhotenství ovlivněna oběma formami Leidenské mutace FV, avšak každá z nich má na D-d trochu jiný vliv. U obou jsou obecně zaznamenány vyšší hladiny D-d, které se u heterozygótů v graviditě dále zvyšují podobně jako u zdravých žen, ale u homozygotní formy je kromě zvýšené hladiny patrná i výrazná změna trendu stoupaní oproti kontrolní skupině (Obr. 15). Ze všech 15 různých hyperkoagulačních stavů, které byly v souboru diagnostikovány, tak byla Leidenská mutace FV jedinou trombofilií prokazatelně ovlivňující hladinu D-d.

5. 4 D-dimery ve vztahu k predikci porodních komplikací

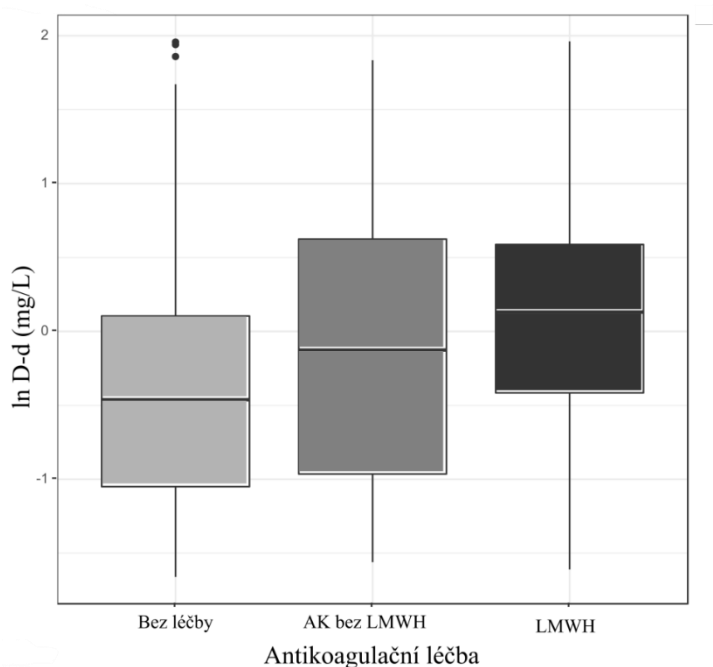
Přítomnost trombofilie společně s dalšími rizikovými faktory jako je vysoký věk rodičky, obezita, či přítomnost jiné choroby výrazně zvyšují riziko porodních komplikací. U těchto pacientek obecně častěji dochází k potratům, předčasným porodům, k odloučení placenty, nebo k rozvoji HELLP syndromu či preeklampsie. Dalším cílem práce tudíž bylo sledovat hladinu D-d a její případný vliv na způsob porodu, váhu plodu či rozvoj porodních komplikací.

K potvrzení tohoto cíle byly z celkového souboru dat vybrány pouze vzorky gravidních pacientek, které rodily v Českobudějovické nemocnici (67 % pacientek). Celkem se jednalo o 713 vzorků od 204 pacientek (Tab. 12). I v takto vyselektovaném souboru dat patřila většina (76 %) odběrů pacientkám s hyperkoagulačním stavem a opět byla nejčastěji diagnostikována heter L a heter P. Ze všech 155 pacientek s trombofilií trpělo 100 z nich heterozygotní formou Leidenské mutace, 34 mělo mutaci protrombinu a zbylých 21 ostatní trombofilní stavy. Přibližně třetina vyšetřovaných měla pozitivní rodinnou anamnézu nebo tromboembolickou příhodu v osobní anamnéze. Na základě těchto rizikových faktorů byla téměř třetina pacientek v době odběru léčena LMWH, díky kterým se v poslední době podařilo výrazně snížit riziko porodních komplikací. Navíc se při analýze dat ukázalo, že terapie LMWH (Obr. 16) jako jediný ze zmíněných faktorů (věk, pozitivní osobní či rodinná tromboembolická anamnéza) ovlivňuje hladinu D-d ($F = 106,03$; $\text{numDF} = 2$; $\text{denDF} = 1395,5$; $p < 0,001$).

Tab. 12: Základní charakteristika vybraného souboru dat.

	Počet vzorků	Počet pacientek
Celkový počet	712	204
z toho:		
Trombofilie	548	155
PRA	279	79
POA	204	56
LMWH	427	71

Pozn.: PRA - pozitivní rodinná anamnéza, POA – pozitivní osobní anamnéza, LMWH – léčba nízkomolekulárními hepariny



Obr. 16: Změna hladiny D-d jako odezva na antikoagulační léčbu LMWH:

Bez léčby – bez antikoagulační terapie, **AK bez LMWH**- pacientky léčené jinou antikoagulační léčbou než LMWH, **LMWH** – pacientky léčené nízkomolekulárními hepariny.

Z grafu je patrné, že antikoagulační léčba, zejména terapie LMWH, průkazně ovlivňuje hladinu D-d u vyšetřovaných pacientek ($t = -14,485$; $df = 1391,51$; $p < 0.001$). Hladina D-d u gravidních pacientek léčených LMWH byla překvapivě mírně vyšší a dosahovala $1,92 \pm 0,11$ mg/L oproti gravidním pacientkám bez léčby, kde průměrná koncentrace D-d byla $1,03 \pm 0,08$ mg/L. I přesto, že u pacientek léčených LMWH byly průměrně vyšší hodnoty D-d, byla terapie LMWH v 99 % účinná. Pouze u 1 % pacientek ($N=5$) došlo k úmrtí plodu, přestože byly léčeny LMWH. Na druhou stranu však byl ve

skupině pacientek léčených LMWH více jak 2x častější výskyt porodních komplikací než u neléčené skupiny, a stejně tak průměrná hladina D-d byla u této skupiny vyšší (Tab. 13). Mezi léčenými a neléčenými pacientkami však nebyly patrné větší rozdíly ve způsobu porodu ani porodní váze dítěte.

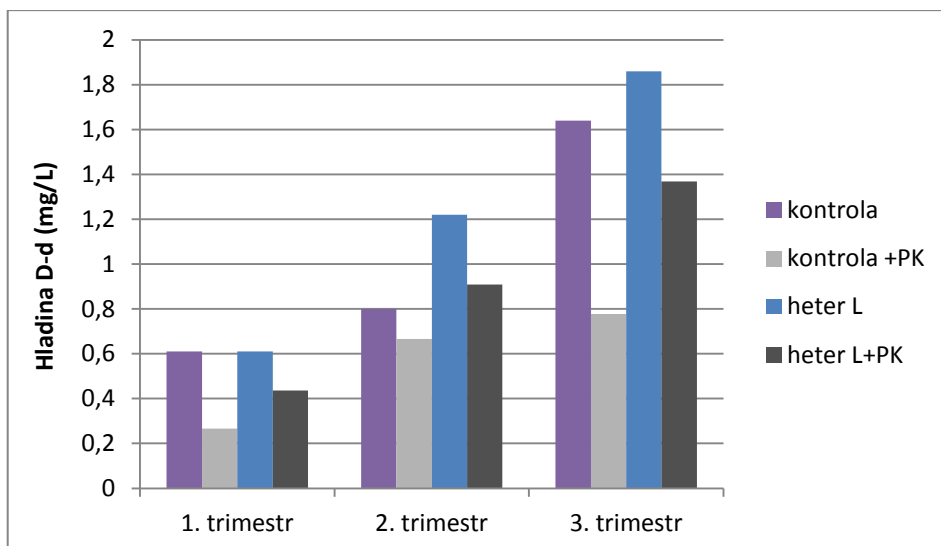
Tab. 13: Výskyt porodních komplikací u skupin pacientek léčených a neléčených LMWH a jejich průměrné hodnoty D-d.

Léčba LMWH	Počet pacientek	Komplikace	Průměrná hladina D-d (mg/L)	Nejčastější způsob porodu	Průměrná porodní váha (g)
Ano	71	14 (20 %)	0,96 ± 0,10	SC	3130
Ne	133	9 (7 %)	0,73 ± 0,11	SC	3171

Pozn.: LMWH – nízkomolekulární hepariny, SC – císařský řez

Ačkoliv nejčastějším způsobem porodu byl v celém souboru císařský řez (SC – *secco caesarea*), kterým rodilo 40 % pacientek (Tab. 14), byl výskyt porodních komplikací ve sledovaném souboru nízký. Pouze u tří pacientek došlo k potratu, u pěti k předčasnému porodu a u 20 pacientek byly zaznamenány porodní komplikace. Z porodních komplikací byl nejčastěji indikován neodkladný císařský řez (CS) kvůli hrozící hypoxii plodu (N = 13) a u jedné pacientky bylo těhotenství ukončeno CS z důvodu intrauterinní růstové retardace plodu. Další komplikací byl předčasný odtok plodové vody (N = 2), počínající HELLP syndrom (N = 2) a předčasné odloučení placenty, které bylo diagnostikováno pouze u jediné pacientky, která rodila spontánním porodem. Celkem tak byly porodní komplikace zaznamenány u 11 % pacientek.

Pouze u dvou z těchto pacientek byla zaznamenána výrazně zvýšená hladina D-d (nad 2 mg/L). Naopak u většiny byly D-d dokonce sníženy pod průměrné hodnoty charakteristické pro konkrétní trombofilní stavy v daném trimestru těhotenství. Jako příklad byla uvedena nejčastěji diagnostikovaná heter L a její průměrné hodnoty pro jednotlivé trimestry v porovnání s průměry pacientek s porodními komplikacemi, které měly diagnostikovanou heter L a s kontrolní skupinou pacientek bez hyperkoagulačního stavu (Obr. 17).



Obr. 17: Odlišnosti v hladinách D-d u pacientek s porodními komplikacemi v porovnání s normálními hodnotami vybraných dvou skupin vzorků - bez hyperkoagulace a s heterozygotní formou LVF: Kontrola (N=209) vzorky gravidních pacientek bez diagnostikovaného hyperkoagulačního stavu, **Kontrola + PK** (N=14) vzorky pacientek bez s diagnostikovaného hyperkoagulačního stavu u kterých se vyskytly porodní komplikace, **heter L** (N=553) vzorky gravidních pacientek s diagnostikovanou heterozygotní formou Leidenské mutace, **heter L+PK** (N=24) vzorky gravidních pacientek s diagnostikovanou heterozygotní formou Leidenské mutace u kterých se vyskytly porodní komplikace.

Na výše uvedeném grafu (Obr. 17) je vidět, že ať už se jednalo o pacientky s hyperkoagulačním stavem (heter L) nebo bez něj, byla u pacientek s porodními komplikacemi zaznamenána nižší průměrná hodnota D-d ve všech trimestrech. Hladina D-d u pacientek s komplikacemi byla od začátku těhotenství na nižších hodnotách, ale v průběhu těhotenství se zvyšovala podobně jako v kontrolní skupině. Celkově byla u pacientek s porodními komplikacemi nižší průměrná hodnota D-d $0,90 \pm 0,14$ mg/L ve srovnání s průměrnou hodnou $1,11 \pm 0,07$ mg/L pacientek bez komplikací. Hladina D-d se tudíž nejevila jako vhodný ukazatele porodních komplikací.

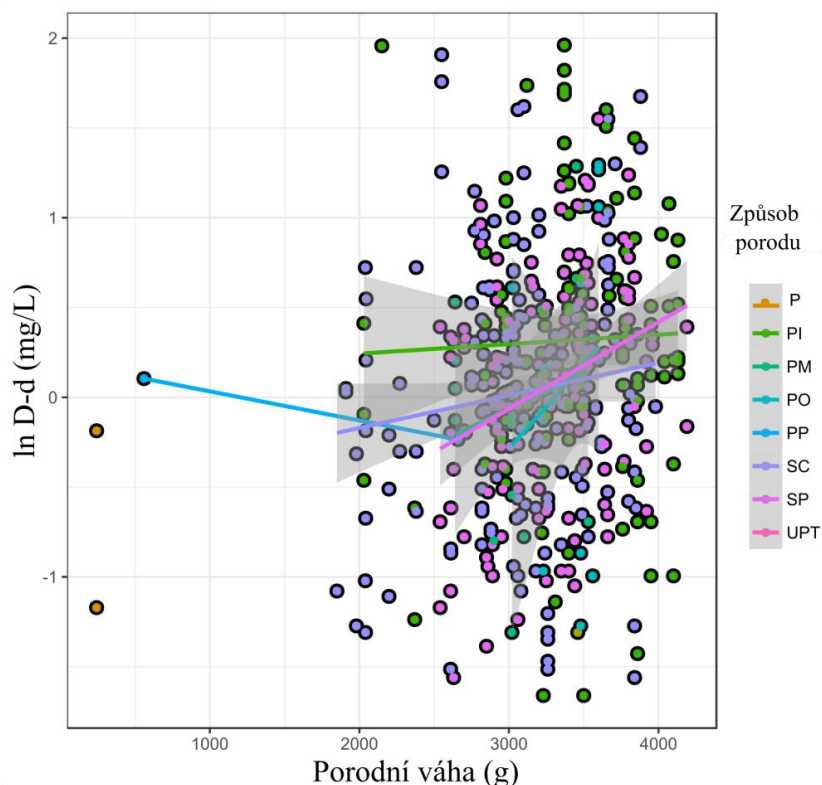
Ve druhém kroku byla hladina D-d analyzována ve vztahu k způsobu porodu a porodní váze dítěte. Nejčastěji prováděný porod ve studovaném souboru byl již výše zmiňovaný císařský řez, následovaný klasickým, spontánním porodem. Na třetím místě se umístil indukovaný porod, u kterého byly zaznamenány nejen nejvyšší průměrné hodnoty D-d, ale i nejvyšší průměrná porodní váha plodu (Tab. 14). Tato skutečnost naznačovala, že by mezi hladinou D-d, způsobem porodu a porodní váhou dítěte mohla existovat nějaká souvislost.

Tab. 14: Zastoupení pacientek ve skupinách podle způsobů porodu společně s charakteristikou vybraných údajů daných skupin.

Způsob porodu	Počet pacientek	Průměr. D-d (mg/L)	Průměr. hmotnost plodu (g)
SC	81	1,05	3061
SP	56	0,93	3244
PI	45	1,41	3396
PM	6	1,23	3300
PO	5	0,94	3161
PP	5	0,83	1673
P	3	0,44	-
UPT	3	1,26	-
Celkem	204	1,01	2972

Pozn.: (-) nezadaný výsledek, který by zkresloval výslednou hodnotu,
SC- císařský řez, **P-** potrat, **SP-** spontánní porod, **PI** – indukovaný p.,
PO- operační p., **PM-** včasný p., **PP-** předčasný p.

Na základě přehledových dat (Tab. 14) byla provedena analýza hladiny D-d u gravidních pacientek ve vztahu k způsobu porodu a porodní váze dítěte a její výsledky jsou uvedeny na následujícím grafu (Obr. 18).



Obr. 18: Souvislost hladiny D-d se způsobem porodu a porodní váhou plodu:

SC- císařský řez, **P-** potrat, **SP-** spontánní porod, **PI** - indukovaný porod, **PO-** operační porod,
PM- včasný porod, **PP-** předčasný porod.

Ukázalo se, že ačkoliv do analýzy byly zahrnuty i ostatní proměnné, u kterých byl vliv na hladinu D-d prokázán (trombofilie, antikoagulační léčba), nebyl mezi hladinou D-d a zkoumanými faktory nalezen vztah. Přímá souvislost mezi hladinou D-d a porodní váhou ($F = 0,468$; $\text{numDF} = 1$; $\text{denDF} = 168,1$; $p = 0,495$) ani způsobem porodu ($F = 0,883$; $\text{numDF} = 7$; $\text{denDF} = 183,2$; $p = 0,493$) nebyla prokázána a stejně tak hladina D-d neměla vliv ani na kombinaci druhu porodu a porodní váhy ($F = 0,824$; $\text{numDF} = 5$; $\text{denDF} = 184,8$; $p = 0,534$).

Ať už je tedy hladina D-d ovlivněna terapií LMWH nebo přítomností Leidenské mutace, nemá vliv ani na způsob porodu, ani na porodní váhu dítěte, a tudíž nebude vhodným predikčním faktorem porodních komplikací.

6 Diskuse

6.1 Analýza údajů vyšetřovaného souboru

Hlavním problémem analyzovaných dat byla kontrolní skupina. Všechny zpracované vzorky patřily pacientkám AKH, kde sice bylo dostatečné zastoupení gravidních pacientek, u kterých navíc byl diagnostikován i hyperkoagulační stav, ale problémem bylo, že ani odběry od pacientek bez trombofilie většinou nepatřily zdravým ženám.

Většina pacientek bez diagnostikovaného hyperkoagulačního stavu byla k vyšetření na AKH odeslána obvodním lékařem nebo častěji gynekologem na základě pozitivní rodinné či osobní anamnézy tromboemlické příhody, nebo kvůli opakovaně nepříznivé gynekologické anamnéze. V malé míře se jednalo i o pacientky trpící krvácivými či nádorovými onemocněními. Celkově tak pouze malé procento z těchto vzorků pocházelo opravdu od zdravých pacientek. Jednalo se zejména o mladší ženy, které byly na AKH vyšetřeny na základě pozitivní rodinné anamnézy, ale trombofilní stav u nich nebyl prokázán. Tyto mladé pacientky netrpěly jinými chorobami ani problémy s opakovaně neúspěšným těhotenstvím a trombofilní stavy u nich byly vyšetřovány preventivně před nasazením hormonální antikoncepce. Takových pacientek však bylo v celém souboru velmi málo. Kontrolní skupina tak byla sice tvořena pacientkami bez hyperkoagulačního stavu, ale nejednalo se o výběr ze zdravé populace.

Ačkoliv kontrolní skupinu netvořily „zdravé“ ženy a byl zde i výrazně menší počet vzorků, bylo v obou skupinách rovnoměrné zastoupení gravidních pacientek. Tato skutečnost byla důležitá, protože mnohými studii (Epiney et al. 2005; Kline et al. 2005; Réger et al. 2013) i v předchozí bakalářské práci (Štichová 2015) byly potvrzeny fyziologicky vyšší hladiny D-d u gravidních pacientek.

I v datech analyzovaných v této práci dosahovala průměrná hladina D-d u vzorků těhotných téměř trojnásobných hodnot oproti vzorkům negravidních pacientek. Pouze 20 % ze všech vyšetřených vzorků gravidních pacientek mělo hodnotu D-d pod hraniční cut-off hodnotu 0,55 mg/L. Naopak u vzorků negravidních bylo pod touto hraniční hodnotou téměř 80 % odběrů. U gravidních pacientek tak D-d nabývají vyšších hodnot a rovnoměrné rozdělení těhotných v jednotlivých analyzovaných skupinách bylo nezbytné k podání objektivních výsledků.

Nárůst hladiny D-d u gravidních pacientek dokazovalo i rozdělení studovaných dat dle roku odběru. Dalo by se očekávat, že vyšší počet vzorků v roce 2015 vztážený k téměř stejnému množství pacientek jako v roce 2014 bude znamenat vyšší prevalenci gravidních pacientek nebo pacientek s diagnózou hyperkoagulačního stavu, které bývají vyšetřovány častěji. Rozbor dat nicméně ukázal opak. Počet vzorků od pacientek s trombofilií byl v obou sledovaných letech stejný, ale zastoupení vzorků od gravidních pacientek bylo v roce 2015 překvapivě nižší (65 %) než v roce 2014 (75%). Tomuto rozdělení odpovídala i hladina D-d, která nabývala vyšších průměrných hodnot v roce 2014, díky většímu zastoupení těhotných pacientek.

Kromě těhotenství a hyperkoagulačního stavu byly sledovány i další faktory, které by mohly mít vliv na hladinu D-d a byly v průběhu zpracování dat u každého vzorku zaznamenány. Jednalo se o věk pacientky, osobní a rodinou anamnézu tromboembolické příhody a antikoagulační léčbu. Pro každý z těchto faktorů byla provedena doplňková analýza, hledající souvislost daného faktoru s hladinou D-d. Na základě znalostí a dostupných informací se očekávalo, že přinejmenším věk a antikoagulační léčba nějakým způsobem ovlivní hladinu D-d, protože například u věku je známo, že podobně jako těhotenství zvyšuje hladinu D-d. U starších pacientů dosahují D-d vyšších hodnot nezávisle na přítomnosti jiného rizikového faktoru, což prokázala i studie společnosti Siemens, která je výrobcem testu používaného v této práci k měření koncentrace D-d (Heidrun 2010).

Nicméně v této diplomové práci nebyla nalezena statisticky průkazná souvislost mezi hladinou D-d a věkem. Důvodem by mohla být homogenita vyšetřovaného souboru. Všechny vzorky patřily ženám v poměrně úzkém věkovém rozmezí 19 - 46 let, kde průměrný věk pacientky byl 32 let. Takto malé rozdíly věku pravděpodobně výrazně neovlivní hladinu D-d, protože u pacientů pod 50 let byl zaznamenán pouze nepatrný efekt věku na hladinu D-d (Kabrhel et al. 2010). Navíc se jednalo o soubor pacientek s celou řadou dalších faktorů, které mohou ovlivnit hladinu D-d, jako je např. těhotenství, které při této doplňkové analýze týkající se věku nebyly brány v potaz.

Druhý důvod bude nejspíše vysvětlovat i průkazně vyšší hladiny D-d u pacientek léčených LMWH. U antikoagulační léčby, jako jediné ze všech zmíněných faktorů, bylo dle očekávání zjištěno statisticky průkazné ovlivnění hladin D-d. Antikoagulační léčba se podává rizikovým skupinám pacientek tak, aby se zabránilo nadměrnému srážení krve, které by mohlo ohrozit život pacientky nebo nenarozeného potomka. Jedním z parametrů, pomocí kterého se vyhodnocuje, že v organismu dochází k nadměrnému srážení krve, je měření

hladiny D-d. Výsledné hodnoty D-d vyšší než stanovená cut-off hodnota znamenají ve většině případů (kromě falešné pozitivity) výrazně zvýšené riziko tromboembolické příhody. Tudíž se předpokládá, že u pacientek užívajících antikoagulační léčbu budou nižší hodnoty D-d, protože antikoagulační léčba zabraňuje nadměrnému srážení krve. Nicméně výsledné hodnoty v této diplomové práci jsou opačné. Průměrně jsou vyšší hodnoty D-d zaznamenány u pacientek léčených LMWH, které byly zjištěny i v nedávno dokončené bakalářské práci prováděné na stejném pracovišti (Kabelová 2017). Vysvětlením bude nejspíše stejně jako u věku gravidita pacientek, protože 86 % pacientek užívajících terapii LMWH bylo těhotných a vliv gravidity na hladinu D-d nebyl do této analýzy zahrnut. Vypadá to tedy, že efekt gravidity na hladinu D-d bude tudíž silnější a převáží vliv antikoagulační léčby.

6. 2 Prevalence vrozených hyperkoagulačních stavů v souboru

Obecně nejčastěji diagnostikovaným hyperkoagulačním stavem je heterozygotní forma Leidenské mutace FV (heter L), která se objevuje u 3 – 7 % běžné populace a je diagnostikována u 20 % pacientů s TEN (Rosendaal 1997). Nicméně její prevalence se liší dle populace a výše zmíněných 3 – 7 % odpovídá výskytu v kavkazské populaci. I v souboru dat v této diplomové práci patřila heter L s prevalencí 0,46 k nejčastěji diagnostikovaným trombofiliím. Zde byla prevalence oproti běžné populaci výrazně vyšší, protože se nejednalo o náhodně vybraný soubor ze zdravé populace, ale byly cíleně vybrány pacientky, u kterých se předpokládala přítomnost hyperkoagulačního stavu. Takto zjištěnou prevalenci tak nemůžeme porovnávat se zdravou populací.

Pokud však vezmeme pacienty s výskytem trombofilie v rodině, kde je pravděpodobnost výskytu hyperkoagulačního stavu blízká souboru studovanému v této diplomové práci, jsou prevalence srovnatelné. Obecně je FVL nezávisle na její formě diagnostikována u více jak poloviny pacientů, u kterých je zaznamenán rodinný výskyt trombofilie (Kujovich 2011), což odpovídá 48 % pacientek AKH, u kterých byly obě formy a různé kombinace FVL s dalšími trombofiliemi diagnostikovány.

Podobná prevalence byla nalezena i u studie sledující výskyt FVL u pacientek s opakovanými potraty, kde ze 110 pacientek byla FVL prokázána u 45 pacientek, čili prevalence byla 0,41 (Finan et al. 2002). Stejně tak tomu bylo i s prevalencí protrombinové mutace, která byla shodná s námi zjištěnou – 0,14. V této studii, prováděné v Libanonu od ledna roku 2001 do konce ledna 2002, byla však vybrána poměrně úzce specifikovaná

skupina pacientek, která není úplně vhodná k porovnání s prevalencí FVL mezi trombofiliemi obecně, jak je tomu v této diplomové práci. Navíc u středomořské populace, a konkrétně právě v Libanonu, je obecně největší prevalence FVL v běžné populaci, která je až 14,4 % (Finan et al. 2002) oproti 3 – 7 % v Evropě. Nicméně byla to jedna z mála studií sledující prevalenci FVL pouze u žen a navíc ve velmi podobném věkovém rozmezí, průměrný věk pacientky byl 32 let, stejně jako u pacientek v této diplomové práci.

Velmi podobný výskyt hyperkoagulačních stavů byl nalezen i ve studii z roku 2010, která probíhala v italské Chioggii (Gessoni et al. 2010). Tato studie rozdělila pacienty do čtyř skupin a sledovala v nich prevalenci jednotlivých hyperkoagulačních stavů. Souboru dat v této diplomové práci se nejvíce blížily první tři skupiny A, B a C, které dohromady tvořilo 694 pacientů a pacientek, kteří buď prodělali TEN (skupina A), nebo patřili do první linie příbuzných ze sk. A (skupina B), anebo se jednalo o ženy vyšetřované před předepsáním antikoncepce (skupina C). Všichni tito pacienti tak byli vyšetřováni ze stejných důvodů jako většina pacientek v diplomové práci a stejně jako u dat pacientek AKH se většinou nejednalo a zdravé pacienty. Výsledná prevalence FVL ve třech výše zmíněných skupinách byla 27 %, přičemž prevalenci zjištěné v diplomové práci nejvíce odpovídala skupina A, kde byla FVL nalezena u 43 % pacientů.

V ostatních studiích, které se zabývaly výskytem vrozených hyperkoagulačních stavů u osob, které buď prodělaly TEN nebo měly pozitivní rodinnou anamnézu TEN, byly zjištěné prevalence nižší a pohybovaly se pouze mezi 25 – 30 % (Weingarz et al. 2013; Vagdatli et al. 2013). I přesto, že frekvence jednotlivých trombofilií zjištěných v této diplomové práci odpovídají prevalenci stanovené v některých studiích, není možné získané prevalence zobecnit na širší populaci. Prevalence získané v této diplomové práci poskytují částečně zkreslené výsledky, protože ne všechny hyperkoagulační stavy byly vyšetřeny u všech pacientek. Například FVL byla určitě vyšetřena téměř u všech pacientek, zatímco konkrétní polymorfismy MTHHR nebo antifosfolipidové protilátky byly stanovovány pouze u některých.

Výsledky diplomové práce týkající se prevalence konkrétních hyperkoagulačních tak mohou sloužit spíše lékařům AKH a dalším pracovníkům nemocnice, kterým pomohou získat ucelenější přehled o výskytu trombofilií u dané skupiny pacientek.

6. 3 Vliv hyperkoagulačního stavu na hladinu D-d

Hypotéza nárůstu hladin D-d u hyperkoagulačního stavu byla stanovena na základě výsledků několika bakalářských prací ze stejného pracoviště - AKH (Štíhová 2015, Kabelová 2017, Felixová 2017). Ve všech těchto pracích bylo poukázáno na nárůst hladiny D-d u pacientek s FVL, které v těhotenství dále vzrůstaly. Toto zjištění však nebylo ani v jedné z těchto prací statisticky prokázáno, a cílem diplomové práce tudíž bylo analyzovat větší soubor dat, zohlednit další faktory, které mohou hladinu D-d ovlivnit, a stanovit, zda existuje statisticky významná souvislost mezi hladinou D-d a trombofilií.

Ze všech 15 diagnostikovaných hyperkoagulačních stavů v této diplomové práci bylo stejně jako v předchozích pracích zjištěno průkazné ovlivnění hladiny D-d pouze u nosičů Leidenské mutace FV. V celém analyzovaném souboru dat ovlivňovala hladinu D-d pouze heter L, pokud však byly vybrány vzorky pouze gravidních pacientek, byl prokázán signifikantní vliv i homo L.

Vyšší hladina D-d v souvislosti s FVL byla zaznamenána i v odborné literatuře. Na základě výsledků studie zabývající se přežitím v sepsi u pacientů s FVL, se ukázalo, že pacienti s FVL mají zvýšenou aktivitu fibrinolýzy a až o polovinu lepší přežití v septických stavech, protože D-d jsou schopny interagovat s monocyty, stimulovat produkci cytokinů a indukovat zánětlivou odpověď (Kerlin et al. 2003). Při sledování míry přežití v septických stavech byla u nosičů FVL nalezena zvýšená hladina fibrinu a cirkulujících mikropartikulí pocházejících z krevních destiček (CD41a+) a zaznamenán byl i nárůst hladiny D-d související se zvýšenou aktivitou fibrinolýzy (Elmas et al. 2010; Lincz et al. 2012). Všechny tyto studie prokázaly vliv Leidenské mutace na hladinu D-d pouze u nosičů heterozyótní formy, protože prevalence homo L byla stejně jako v diplomové práci ve studovaných souborech nízká.

Počet odběrů pacientek s homo L byl ve studovaném souboru malý (N=23), a i přes statisticky prokázaný vliv na hladinu D-d je potřeba výsledky týkající se homo L potvrdit dalšími studiemi s větším zastoupením pacientů s touto formou mutace. Průměrné hodnoty D-d u pacientů s homo L uvedené v kapitole výsledky jsou tak pouze orientační, zatížené extrémními hodnotami, a tudíž je nelze zobecnit a ani použít jako orientační cut-off hodnoty. Vliv extrémních hodnot by omezilo určení mediánové hodnoty D-d, které je však vzhledem k nízkému počtu vzorků nesmyslné. Při rozdělení odběrů dle týdne těhotenství by se v 1.

trimestru nacházely pouze 4 odběry od dvou pacientek, z čehož první dva odběry pacientky č. 1 dosahují extrémních hodnot (4,58 mg/L; 3,06 mg/L) oproti hodnotě D-d 0,52 mg/L u druhé pacientky. Na základě výsledků diplomové práce je tudíž možné pouze konstatovat, že u gravidních pacientek je hladina D-d signifikantně ovlivněna diagnózou homo L a sleduje odlišný trend nárůstu v průběhu těhotenství. Stanovení v praxi použitelných referenčních mezí však z těchto výsledků není možné.

Situace je opačná u heterozygotní formy FVL. Počet odběrů pacientek s touto diagnózou (N=674) byl dostatečný a vliv na hladinu D-d u nich byl prokázán v celém souboru, ne pouze u gravidních pacientek jak tomu bylo u homo L. Přesto však není možné tvrdit, že heter L ovlivňuje hladinu u negravidních pacientek, protože tato skupina nebyla samostatně analyzována a v celém souboru patřila většina vzorků (77 %) těhotným. Pro potvrzení vlivu heter L na hladinu D-d u negravidních pacientek bude potřeba provést podobnou studii na jiném souboru dat, kde bude nižší výskyt vzorků od těhotných žen. Z dat získatelných z AKH by to mohly být pacientky v jiném věkovém rozmezí, a to buď mladší 19 let, kterých však nejspíš nebude pro objektivní analýzu dostatečný počet, nebo starší 46 let, kde zase naopak bude potřeba brát v potaz vliv vyššího věku na hladinu D-d a s tím spojenou přítomnost dalších chorob.

Dále je možné, že hladinu D-d bude kromě FVL ovlivňovat i jiný hyperkoagulační stav. V této práci jsou analyzovány všechny trombofilie společně a není brána v potaz závažnost deficitu. Je tak možné spolehlivě porovnávat např. heter L s heter P, ale u kvantitativních deficitů jako je např. deficit PC, PS nebo zvýšená hladina FVIII by bylo potřeba analyzovat hladinu D-d v závislosti na míře deficitu. Udává se, že vyšší riziko TEN se u těchto trombofilií (deficit PS, PC, AT) objevuje až při výraznějších poklesech, např. pod 50 % (Vonke, osobní sdělení). Bylo by tedy vhodné vybrat pouze pacientky s deficitem pod konkrétní stanovenou hladinu a pouze tam sledovat změny hladin D-d. Takové stanovení by vzhledem k nízkému počtu vzorků s těmito deficity nebylo možné. Nicméně v nedávné studii bylo prokázáno, že u pacientů s hladinou AT mezi 70 - 80 % je riziko TEN stejné jako u pacientů, jejichž hladina je < 70%. (Di Minno et al. 2014). Riziko TEN tak pravděpodobně může být zvýšeno také mírným poklesem hladiny i u jiných deficitů, a tudíž jediným problémem při stanovení závislosti hladiny D-d v této diplomové práci byl malý počet odběrů od pacientek s deficitem PC, PS, AT atd., které by však mělo statistické zpracování zohlednit.

Nicméně byly provedeny i studie, které vůbec nenašly souvislost mezi hladinou D-d a hyperkoagulačním stavem (Kabrhel et al. 2010; Palareti et al. 2003). Ve studii Palaretiho et al. z roku 2003 měla používaná cut-off (<500 ng/mL) i v případě diagnostikované trombofilie dostatečně vysokou negativní prediktivní hodnotu (95,8 %) ve vztahu k TEN. Tyto výsledky potvrdila i multifaktoriální studie Kabrhela et al. 2010, která nenašla souvislost mezi hladinou D-d a pozitivní rodinou anamnézou ani hyperkoagulačním stavem a tvrdí, že i v přítomnosti trombofilie či pozitivní rodinné anamnézy TEN bude vyšetření D-d dostatečně citlivým testem k vyloučení TEN.

Vzhledem k malému počtu studií zabývajících se vlivem hyperkoagulačního stavu na hladinu D-d a ke sporným výsledkům těch dosavadních, je potřeba provést další výzkumy. Vhodné by bylo analyzovat tuto závislost nejprve u pacientů bez dalších faktorů ovlivňujících hladinu D-d jako je těhotenství či antikoagulační léčba a až posléze se věnovat vybraným skupinám pacientů. I přesto je však na základě výsledků této diplomové možné tvrdit, že jediným hyperkoagulačním stavem ovlivňujícím hladinu D-d je heter L.

6. 4 D-dimery ve vztahu k predikci porodních komplikací

Hyperkoagulační stavy jsou na základě výsledků mnohých studií brány jako rizikový faktor porodních komplikací. Předpokládá se, že zejména vrozené trombofilie zvyšují riziko arteriálních i žilních trombóz v krevním řečišti matky i plodu, které vedou k nedostatečnému zásobení placenty krví a souvisí s rozvojem porodních komplikací, jako je abrupce placenty, intrauterinní růstová retardace plodu (IUGR), preeklampsie či potrat (Simcox et al. 2015).

Nejvíce komplikací je logicky zaznamenáno u nejčastěji diagnostikované Leidenské mutace FV. Bylo prokázáno, že za 44 % TEN v těhotenství je zodpovědná FVL, u které se rizika konkrétních porodních komplikací v různých studiích liší (Gerhardt et al. 2000). Většina z nich potvrdila zvýšené riziko potratu u nosičů FVL, kde se OR pohybuje od 0,78 až do 3,10 dle konkrétní studie (Lissalde-Lavigne et al. 2005; Greer 2009). V této diplomové práci byly zaznamenány pouze 3 případy potratu a všechny patřily ženám s FVL.

U nosiček FVL dále častěji dochází k opakovaným ztrátám plodu, ale statisticky významný rozdíl mezi těhotnými s opakovanými potraty s trombofilií nebo bez ní nebyl nalezen (Sottilotta et al. 2006). Stejně tak abrupce placenty nebo preeklampsie se nejčastěji objevuje u nosiček Leidenské mutace a pouze u růstové retardace plodu byla obecně

zaznamenána větší prevalence u nosiček protrombinové mutace (Alfirevic et al. 2002). Jediná pacientka s IUGR v diplomové práci byla i přesto nosičkou heter L.

Celkově byla prevalence porodních komplikací ve studovaném souboru nízká. Důvodem bude nejspíše správně a včas zvolená antikoagulační léčba, u které je prokázané snížení rizika porodních komplikací až o polovinu oproti neléčeným pacientkám (Rodger et al. 2014). Na prvním místě je vždy zdraví maminky a nastávajícího potomka, a tudíž u pacientek v rizikových skupinách, u kterých došlo v předchozím těhotenství k rozvoji porodních komplikací, jsou často již od začátku těhotenství nasazeny alespoň profylaktické dávky LMWH. U těchto rizikových skupin byla úspěšnost terapie LMWH potvrzena mnohými studiemi. Například studie probíhající v Neapoli již v letech 1995 – 1999 ukázala, že u pacientek s předchozími porodními komplikacemi terapie LMWH několikanásobně zvyšuje možnost dokončit těhotenství bez komplikací - z původních 6,9 % úspěšných porodů bez léčby na 90,3 % po léčbě LMWH (Grandone et al. 2002). V diplomové práci se však porodní komplikace objevily častěji u pacientek léčených LMWH, a to u 14 % pacientek oproti 9 %, u kterých nebyla antikoagulační léčba nasazena.

Na tyto výsledky je potřeba nahlédnout z jiného úhlu. Všech 204 pacientek, které rodily v českobudějovické nemocnici a jejichž data byla v této diplomové práci zpracována, může být zařazeno do výše zmíněné rizikové skupiny těhotných. U všech těchto pacientek bylo z nějakého důvodu vyšší riziko TEN a s tím souvisejících porodních komplikací, a proto byly v době těhotenství vyšetřeny na AKH. Z těchto 204 pacientek nasadili ošetřující lékaři AKH na základě anamnézy a výsledků koagulačního vyšetření antikoagulační léčbu třetině pacientek, u kterých se domnívali výrazně zvýšeného rizika porodních komplikací. V této skupině se porodní komplikace objevily u většího počtu (14 %) pacientek, což poukazuje na správný odhad míry rizika, ale na nedostatečně účinnou léčbu. Ze zbývajících 133 pacientek, které nebyly léčeny LMWH, se objevily porodní komplikace pouze u 9 z nich (7 %). Tyto výsledky ukazují na relativně přesný úsudek lékaře, a tudíž i na správné nastavení klinických kritérií používaných k hodnocení rizika a i na dostatečnou citlivost používaných laboratorních testů, jakými jsou např. D-dimery.

Na základě několika výzkumů existuje hypotéza závislosti výšky hladiny D-d na rozvoji porodních komplikací. Byly provedeny studie, ve kterých měly pacientky s preeklampií signifikantně zvýšenou hladinu D-d (Marcq et al. 2014; Abdelgadir a Gaufri 2017), ale například mezi výskytem růstové retardace plodu a hladinou D-d nebyla nalezena přímá souvislost (Tetik et al. 2014). Tyto porodní komplikace vznikají na základě

patologického krevního zásobení placenty (PVP), jehož výskyt v závislosti na hladině D-d a objemu placenty byl sledován ve studii z roku 2016 (Fang et al. 2016). Výsledky ukázaly, že postupný nárůst hladiny D-d prokazatelně souvisí s růstem placenty, ale na rozvoj PVP nemá hladina D-d vliv. Stejně tak ani u pacientek AKH nebyla nalezena souvislost mezi hladinou D-d a výskytem porodních komplikací, ale výsledná zjištění by měla být potvrzena přesnějšími studiemi.

Důvodem jsou nízké počty pacientek AKH, u kterých došlo k rozvoji porodních komplikací, ale i zaznamenávání komplikací z LIS ambulance klinické hematologie, které bylo u některých pacientek obtížné. LIS AKH byl vhodně zvoleným zdrojem dat k potvrzení hlavního cíle práce, kdy byly dohledávány základní informace o pacientce: diagnóza, gravidita, týden gravidity v době vyšetření, osobní a rodinná anamnéza a antikoagulační léčba. Nicméně dohledání způsobu porodu, porodní váhy a vzniklých komplikací bylo v některých případech problematické. K potvrzení tohoto cíle by bylo lepší využít databázi neonatologického oddělení, kde jsou zaznamenány veškeré údaje týkající se porodu, a která byla použita k dohledání informací pouze u některých pacientek. Tímto způsobem zaznamenané informace by byly přesnější a zvýšily by výpovědní hodnotu tvrzení týkajícího se hladiny D-d a porodních komplikací.

Navíc hladina D-d je parametrem, u kterého se často objevují tzv. falešně pozitivní výsledky, kdy se hladina D-d zvyšuje, aniž by v organismu docházelo k nadměrné aktivaci koagulace. Takovým případem je i výše zmíněné těhotenství, kdy jsou hladiny fyziologicky vyšší, a podobně je tomu ve stáří, při vážných operacích, dlouhodobé imobilizaci či rakovině v aktivním stádiu (Kabrhel et al. 2010). Hladinu D-d navíc ovlivňuje i antikoagulační léčba a pravděpodobně by bylo možné najít celou řadu dalších faktorů, které by měly vliv na hladinu D-d.

V diplomové práci byla např. dále sledována i hladina D-d v závislosti na způsobu porodu a porodní váze plodu, která by mohla blíže souviset s výskytem porodních komplikací, ale statisticky významná souvislost zde nebyla nalezena. Z výše uvedených důvodů není hladina D-d vhodným predikčním faktorem porodních komplikací a pravděpodobně ani s větším množstvím studií nebude tento laboratorní parametr vhodný ke sledování správného průběhu těhotenství.

7 Závěr

1) AKH byla správně zvoleným zdrojem dat k potvrzení hlavního cíle práce. V diplomové práci bylo zpracováno 1415 odběrů od 560 pacientek AKH ve věku 19 – 46 let, které se v roce 2014 a 2015 účastnily vyšetření hladiny D-d. V analyzovaném souboru patřilo 77 % odběrů gravidním pacientkám, u kterých byl v 80 % případů i diagnostikován hyperkoagulační stav.

2) Vrozené hyperkoagulační stavy měly dle očekávání nejvyšší prevalenci ve vyšetřovaném souboru dat. Nejčastěji diagnostikovaným hyperkoagulačním stavem byla heterozygotní forma Leidenské mutace FV, která byla zaznamenána u 46 % pacientek.

3) Rozbor dat ukázal zvýšené hladiny D-d u pacientek s hyperkoagulačním stavem, které v těhotenství dále stoupají. Ze všech 15 diagnostikovaných hyperkoagulačních stavů však průkazně ovlivňovala hladinu D-d pouze Leidenská mutace FV. U obou forem FVL byly u gravidních pacientek nalezeny signifikantně zvýšené hladiny D-d oproti těhotným pacientkám bez hyperkoagulace a u homozygotní formy FVL byla navíc zaznamenána i změna trendu stoupaní D-d v průběhu gravidity.

4) Nebyl nalezen signifikantní vliv hladiny D-d na způsob porodu, porodní váhu dítěte a ani na výskyt porodních komplikací, jejichž prevalence byla ve studovaném souboru nízká. Byla však nalezena zvýšená hladina D-d u pacientek užívajících LMWH, u kterých byly častěji zaznamenány porodní komplikace.

8 Seznam použitých zkratek

AKH	ambulance klinické hematologie
APA	antifosfolipidové protilátky
APC	aktivovaný protein C
APS	antifosfolipidový syndrom
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas (activated partial thromboplastime time)
AT	antitrombin
B2GP1	beta 2 glykoprotein 1
CBS	cystation-B-syntáza
cGMP	cyklický guanosin monofosfát (cyclic guanosine monophosphate)
CLEC-2	C-lektinový receptor (C-type lektin-like receptor)
C4bBP	protein vázající C4b složku komplementu (C4b-binding protein)
CU	kompresní ultrasonografie
D-d	D-dimery
DDU	D-dimer unit
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
DVT	hluboká žilní trombóza (deep vein thrombosis)
EDHF	endoteliální hyperpolarizační faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
eNOS	endotelová syntéza NO (endothelial nitric oxide synthese)
ET-1	endotelin 1

ERPC	endotelový receptor pro protein C (endothelial cell protein C receptor)
FEU	fibrinogen equivalent unit
FDP	fibrin degradační produkty
FpA	fibrinopeptid A
FpB	fibrinopeptid B
FSF	faktor stabilizující fibrin
FV _{ac}	antikoagulační FV (FV antikoagulant)
FVIII:C	koagulační aktivita FVIII (FVIII procoagulant activity)
FVL	leidenský FV (factor V Leiden)
GPCR	receptory spřažené s G- proteiny (G-protein coupled receptor)
GP	glykoproteinové receptory
HAMA	human anti-mouse antibodie
HMWK	vysokomolekulární kininogen
MTHFR	methyltetrafolátreduktáza
HGMD	databáze lidských genových mutací (humane gene station database)
HP II	heparinový kofaktor II (heparin cofactor II)
ICs	imunokomplexy (Immunocomplexes)
LIS	laboratorní informační systém
LMWH	nízkomolekulární hepariny (low molecular weight heparin)
mAb	monoklonální protilátka (monoclonal antibodies)
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu (plasmin activator inhibitors)
PAI-1	plasminogen-1

PAI-2	plasminogen-2
PC	protein C
PDG	růstový faktor destiček (platelet derived growth factor)
PE	plicní embolie
PF4	destičkový faktor 4 (platelet factor 4)
PGM	mutace protrombinu 20210A (protrombin gene mutation 20210 A)
PGI ₂	prostaglandin I ₂
PK	prekalikrein
PS	protein S
PVP	patologické krevní zásobení placenty
sCG	rozpustná guanylát cykláza (soluble guanylate cyclase)
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru (tissue factor pathway inhibitor)
tPA	tkáňový aktivátor plasminogenu (tissue plasminogen activator)
trb	krevní destičky (thrombocyte)
TXA ₂	tromboxan A ₂
UFH	nefrakciované hepariny (unfractionated heparine)
uPA	urokináza (urokinase-type plasminogen activator)
VSMC	buňky hladké svaloviny (vascular smooth muscle cell)
VTE	žilní tromboembolie (venous thromboembolism)
vWF	von Willenbrandův faktor

9 Seznam použité literatury

ABDELGADIR, Sara Mohamed Nagib a Nasr Eldeen Ali Mohammed GAUFRI, 2017. Estimation of Plasma D-Dimer Levels in Sudanese Women with Preeclampsia. *OALib* [online]. B.m.: Scientific Research Publishing, **4**(1), 1–6 [vid. 2017-12-06]. ISSN 2333-9721. Dostupné z: doi:10.4236/oalib.1103210

ADAM, Soheir S., Nigel S. KEY a Charles S. GREENBERG, 2009. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **113**(13), 2878–87 [vid. 2017-10-04]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-06-165845

ALFIREVIC, Zarko, Devender ROBERTS a Vanessa MARTLEW, 2002. How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* [online]. B.m.: Elsevier, **101**(1), 6–14 [vid. 2017-12-06]. ISSN 0301-2115. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-2115(01)00496-1

ARMAN, M. a K. KRAUEL, 2015. Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. **13**(6), 893–908 [vid. 2017-09-14]. ISSN 15387933. Dostupné z: doi:10.1111/jth.12905

BAHULEYAN, Biju, 2015. Hemostasis: A Cell Based Model Journal of Physiology and Pharmacology Advances Hemostasis: A Cell Based Model. *J Phys Pharm Adv J. Phys. Pharm. Adv* [online]. **5**(55), 638–642 [vid. 2017-09-21]. Dostupné z: doi:10.5455/jppa.20150520080532

BANK, I., E. J. LIBOUREL, S. MIDDELDORP, K. HAMULYAK, E. C. M. VAN PAMPUS, M. M. W. KOOPMAN, M. H. PRINS, J. VAN DER MEER a H. R. BULLER, 2005. Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. **3**(1), 79–84 [vid. 2017-10-22]. ISSN 1538-7933. Dostupné z: doi:10.1111/j.1538-7836.2004.01033.x

BATES, Shannon M., 2007. Management of pregnant women with thrombophilia or a history of venous thromboembolism. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **2007**(1), 143–50 [vid. 2017-10-10]. ISSN 1520-4391. Dostupné z: doi:10.1182/asheducation-2007.1.143

BERG, Jeremy M., John L. TYMOCZKO, Lubert. STRYER a Lubert. STRYER, 2002. *Biochemistry* [online]. B.m.: W.H. Freeman [vid. 2017-10-02]. ISBN 0716730510. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>

BERTINA, Rogier M., Bobby P. C. KOELEMAN, Ted KOSTER, Frits R. ROSENDAAL, Richard J. DIRVEN, Hans DE RONDE, Pieter A. VAN DER VELDEN a Pieter H. REITSMA, 1994. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* [online]. **369**(6475), 64–67 [vid. 2017-10-09]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/369064a0

BLOOMENTHAL, Dena, Peter VON DADELSZEN, Robert LISTON, Laura MAGEE a Peter TSANG, 2002. The effect of factor V Leiden carriage on maternal and fetal health. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* [online]. B.m.: Canadian Medical Association, **167**(1), 48–54 [vid. 2017-10-09]. ISSN 0820-3946. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12137081>

BUTENAS, Saulius a SAULIUS, 2012. Tissue factor structure and function. *Scientifica* [online]. B.m.: Hindawi, **2012**, 964862 [vid. 2017-09-21]. ISSN 2090-908X. Dostupné z: doi:10.6064/2012/964862

CITO, Salvatore, Marco Domenico MAZZEO a Lina BADIMON, 2013. *A review of macroscopic thrombus modeling methods* [online]. únor 2013. [vid. 2017-09-12]. ISBN 1879-2472; 0049-3848. Dostupné z: doi:10.1016/j.thromres.2012.11.020

CLARK, Christine A., Judith DAVIDOVITS, Karen A. SPITZER a Carl A. LASKIN, 2013. The lupus anticoagulant: results from 2257 patients attending a high-risk pregnancy clinic. *Blood* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **122**(3), 341–7; quiz 466 [vid. 2017-10-16]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-02-485839

COLLET, Jean-Philippe, Jennifer L MOEN, Yuri I VEKLICH, Oleg V GORKUN, Susan T LORD, Gilles MONTALESCOT a John W WEISEL, 2005. The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **106**(12), 3824–30 [vid. 2017-10-03]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-05-2150

CUMMING, A. M., R. C. TAIT, S. FILDES, A. YOONG, S. KEENEY a C. R. M. HAY, 1995. Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *British Journal of Haematology* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **90**(3), 725–727 [vid. 2017-10-30]. Dostupné z: doi:10.1111/J.1365-2141.1995.TB05610.X

DAVÌ, Giovanni a Carlo PATRONO, 2007. Platelet Activation and Atherothrombosis. *N Engl J Med* [online]. **357**, 2482–94 [vid. 2017-09-12]. Dostupné z: <https://eacpt.files.wordpress.com/2013/09/nejm-2007.pdf>

DI MINNO, M. N. D., F. DENTALI, R. LUPOLI a W. AGENO, 2014. Mild Antithrombin Deficiency and Risk of Recurrent Venous Thromboembolism: A Prospective Cohort Study. *Circulation* [online]. **129**(4), 497–503 [vid. 2017-10-05]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003756

ELMAS, Elif, Nenad SUVAJAC, Bernd JILMA, Hartmut WEILER, Martin BORGGREFE a Carl-Erik DEMPFLER, 2010. Factor V Leiden mutation enhances fibrin formation and dissolution in vivo in a human endotoxemia model. *Blood* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **116**(5), 801–5 [vid. 2017-12-07]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-03-213215

EPINEY, M., F. BOEHLEN, M. BOULVAIN, G. REBER, E. ANTONELLI, M. MORALES, O. IRION a P. DE MOERLOOSE, 2005. D-dimer levels during delivery and the postpartum. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. B.m.: Blackwell Science Inc, **3**(2), 268–271 [vid. 2017-12-01]. ISSN 1538-7933. Dostupné z: doi:10.1111/j.1538-7836.2004.01108.x

FANGET, Cécile, Céline CHAULEUR, Amandine STADLER, Emilie PRESLES, Marie-Noëlle VARLET, Jean-Christophe GRIS a Tiphaine RAIJA-BARJAT, 2016. Relationship between Plasma D-Dimer Concentration and Three-Dimensional Ultrasound Placental Volume in Women at Risk for Placental Vascular Diseases: A Monocentric Prospective Study. *PLOS ONE* [online]. B.m.: Public Library of Science, **11**(6), e0156593 [vid. 2017-12-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0156593

FAY, William P., 2012. Homocysteine and thrombosis: guilt by association? *Blood* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **119**(13), 2977–8 [vid. 2017-10-24]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2012-01-401513

FÉLÉTOU, Michel, 2011. *The Endothelium* [online]. B.m.: Morgan & Claypool Life Sciences [vid. 2017-10-02]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850763>

FELIXOVÁ, Veronika, 2017. *D-dimery v graviditě. Vliv Leidenské mutace a antikoagulační léčby*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zdravotně sociální fakulta. Vedoucí práce MUDr. Ivan Vonke, MBA.

FERREIRA, Cláudia Natália, Marinez de Oliveira SOUSA, Luci Maria Sant'Ana DUSSE a Maria das Graças CARVALHO, 2010. A cell-based model of coagulation and its implications. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* [online]. B.m.: Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, **32**(5), 416–421 [vid. 2017-09-20]. ISSN 1516-8484. Dostupné z: doi:10.1590/S1516-84842010000500016

FINAN, Ramzi R., Hala TAMIM, Ghada AMEEN, Huda E. SHARIDA, Mooza RASHID a Wassim Y. ALMAWI, 2002. Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population. *American Journal of Hematology* [online]. B.m.: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, **71**(4), 300–305 [vid. 2017-12-04]. ISSN 0361-8609.

FLAUJAC, C., J. CONARD, M. H. HORELLOU, L. LE FLEM a M. M. SAMANA, 2007. Atypical mutations of the prothrombin gene at positions 20 209 and 20 218, and a novel mutation at position 20 219. Report on 10 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*

[online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, 5(5), 1064–1068 [vid. 2017-10-30]. ISSN 15387933. Dostupné z: doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02478.x

FLIEDER, T., T. GRIPP, C. KNABBE a I. BIRSCHMANN, 2016. The Sysmex CS-5100 coagulation analyzer offers comparable analytical performance and excellent throughput capabilities. *Practical Laboratory Medicine* [online]. B.m.: Elsevier, 6, 38–47 [vid. 2017-11-13]. ISSN 2352-5517. Dostupné z: doi:10.1016/J.PLABM.2016.09.002

FOKA, Z. J., A. F. LAMBROPOULOS, H. SARAVELOS, G.B. KARAS, A. KARAVIDA, T. AGORASTOS, V. ZOURNATZI, P.E. MAKRIS, J. BONTIS a A. KOTSIS, 2000. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Human Reproduction* [online]. B.m.: Oxford University Press, 15(2), 458–462 [vid. 2017-10-06]. ISSN 14602350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/15.2.458

GAILLYOVÁ, R, Z. ČECH, M. VILÉMOVÁ, Š. PRÁŠILOVÁ, Z. KALINA, J. ŠOUKALOVÁ, A. OLTOVÁ, H. VIŠŇOVÁ, M. PENKA a P. VENTRUBA, 2005. Vrozené trombofilie a cytogenetické nálezy u pacientů s opakovanými fetálními ztrátami. *Prakt Gyn* [online]. 9(3), 9–12 [vid. 2017-11-15]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=pg_05_03_03.pdf

GERHARDT, Andrea, Rüdiger Eberhard SCHARF, Matthias Wilhelm BECKMANN, Sabine STRUVE, Hans Georg BENDER, Michael PILLNY, Wilhelm SANDMANN a Rainer Bernd ZOTZ, 2000. Prothrombin and Factor V Mutations in Women with a History of Thrombosis during Pregnancy and the Puerperium. *New England Journal of Medicine* [online]. B.m.: Massachusetts Medical Society , 342(6), 374–380 [vid. 2017-12-05]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM200002103420602

GESSONI, Gianluca, Sara VALVERDE, Rosa CANISTRO a Fabio MANONI, 2010. Factor V Leiden in Chioggia: a prevalence study in patients with venous thrombosis, their blood relatives and the general population. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* [online]. B.m.: SIMTI Servizi, 8(3), 193–5 [vid. 2017-12-04]. ISSN 1723-2007.

GITZ, E., A. Y. POLLITT, J. J. GITZ-FRANCOIS, O. ALSHEHRI, J. MORI, S. MONTAGUE, G. B. NASH, M. R. DOUGLAS, E. E. GARDINER, R. K. ANDREWS, C.

D. BUCKLEY, P. HARRISON a S. P. WATSON, 2014. CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles. *Blood* [online]. **124**(14), 2262–2270 [vid. 2017-09-14]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2014-05-572818

GRANDONE, Elvira, Vincenzo BRANCACCIO, Donatella COLAIZZO, Natale SCIANNAMÉ, Giuseppe PAVONE, Giovanni DI MINNO a Maurizio MARGAGLIONE, 2002. Preventing adverse obstetric outcomes in women with genetic thrombophilia. *Fertility and Sterility* [online]. B.m.: Elsevier, **78**(2), 371–375 [vid. 2017-12-06]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(02)03222-3

GREER, I A, 2009. Low molecular weight heparin for pregnancy complications? *Thrombosis Research* [online]. **123**, 22–25 [vid. 2017-12-05]. Dostupné z: doi:10.1016/S0049-3848(09)70129-X

GRIFFIN, J. H., J. A. FERNANDÉZ, A. J. GALE a L. O. MOSNIER, 2007. Activated protein C. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **5**(s1), 73–80 [vid. 2017-10-22]. ISSN 15387933. Dostupné z: doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02491.x

HACKENG, Tilman M, Kristin M SERÉ, Guido TANS a Jan ROSING, 2006. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. B.m.: National Academy of Sciences, **103**(9), 3106–11 [vid. 2017-10-16]. ISSN 0027-8424.

HIRMEROVÁ, J., D. KARETOVÁ, R. MALÝ, D. MUSIL a K. ROZTOČIL, 2014. *Akutní žilní trombóza 2014: Současný stav prevence, diagnostiky a léčby* [online]. 2014. [vid. 2017-11-06]. Dostupné z: http://csth.cz/soubory/Zilni_tromboza_doporuceni.pdf

HIRMEROVÁ, Jana, 2013. Homocysteine and venous thromboembolism—Is there any link? *Cor et Vasa* [online]. B.m.: Urban & Fischer, **55**(3), e248–e258 [vid. 2017-10-25]. ISSN 0010-8650. Dostupné z: doi:10.1016/J.CRVASA.2013.01.007

HLUŠÍ, Antonín a Věra KRČOVÁ, 2003. Antifosfolipidový syndrom. *Interní med.* [online]. **9**, 434–436 [vid. 2017-10-16]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2003/09/02.pdf>

HOFFMAN, Maureane, 2003. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood reviews* [online]. **17 Suppl 1**, S1-5 [vid. 2017-09-21]. ISSN 0268-960X. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697207>

CHAN, W.-S., A. LEE, F. A. SPENCER, S. CHUNILAL, M. CROWTHER, W. WU, M. JOHNSTON, M. RODGER a J. S. GINSBERG, 2010. D-dimer testing in pregnant patients: towards determining the next “level” in the diagnosis of DVT. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **8(5)**, 1004–1011 [vid. 2017-10-26]. ISSN 15387933. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03783.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03783.x)

CHAPIN, John C. a Katherine A. HAJJAR, 2015. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews* [online]. **29(1)**, 17–24 [vid. 2017-10-04]. ISSN 0268960X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.blre.2014.09.003](https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003)

CHLUMSKÝ, J. a J. HAVLÍN, 2013. Warfarinem indukovaná nekróza kůže. *Prakt. Lék.* [online]. **93(5)**, 231–233 [vid. 2017-10-22]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/prakticky-lekar-clanek/warfarinem-indukovana-nekroza-kuze-41739>

IZADI, Morteza, Mohammad Javad ALEMZADEH-ANSARI, Davood KAZEMISALEH, Maryam MOSHKANI-FARAHANI a Akbar SHAFIEE, 2015. Do pregnant women have a higher risk for venous thromboembolism following air travel? *Advanced biomedical research* [online]. B.m.: Wolters Kluwer -- Medknow Publications, **4**, 60 [vid. 2017-10-10]. ISSN 2277-9175. Dostupné z: [doi:10.4103/2277-9175.151879](https://doi.org/10.4103/2277-9175.151879)

JAMES, Andra H, 2009. Pregnancy-associated thrombosis. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **2009(1)**, 277–85 [vid. 2017-10-25]. ISSN 1520-4383. Dostupné z: [doi:10.1182/asheducation-2009.1.277](https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.277)

JAMES, Andra H., Margaret G. JAMISON, Leo R. BRANCAZIO a Evan R. MYERS, 2006. Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: Incidence, risk factors, and mortality. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. **194(5)**, 1311–1315 [vid. 2017-10-25]. ISSN 00029378. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ajog.2005.11.008](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.11.008)

JENKINS, P. Vince, Orla RAWLEY, Owen P. SMITH a James S. O'DONNELL, 2012.

Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. *British Journal of Haematology* [online]. **157**(6), 653–663 [vid. 2017-10-23]. ISSN 00071048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09134.x

KABELOVÁ, Kristýna, 2017. *Hyperkoagulační stavy v graviditě, vliv nízkomolekulárního heparinu*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce MUDr. Ivan Vonke, MBA.

KABRHEL, Christopher, D. MARK COURTNEY, Carlos A. CAMARGO, Michael C. PLEWA, Kristen E. NORDENHOLZ, Christopher L. MOORE, Peter B. RICHMAN, Howard A. SMITHLINE, Daren M. BEAM a Jeffrey A. KLINE, 2010. Factors Associated With Positive D-dimer Results in Patients Evaluated for Pulmonary Embolism. *Academic Emergency Medicine* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **17**(6), 589–597 [vid. 2017-12-05]. ISSN 10696563. Dostupné z: doi:10.1111/j.1553-2712.2010.00765.x

KERLIN, Bryce A., S. Betty YAN, Berend H. ISERMANN, John T. BRANDT, Rashmi SOOD, Bruce R. BASSON, David E. JOYCE, Hartmut WEILER a Jean-Francois DHAINAUT, 2003. Survival advantage associated with heterozygous factor V Leiden mutation in patients with severe sepsis and in mouse endotoxemia. *Blood* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **102**(9), 3085–92 [vid. 2017-12-07]. ISSN 0006-4971.

KHAN, Salwa a Joseph D. DICKERMAN, 2006. Hereditary thrombophilia. *Thrombosis Journal* [online]. B.m.: BioMed Central, **4**(1), 15 [vid. 2017-10-22]. ISSN 14779560. Dostupné z: doi:10.1186/1477-9560-4-15

KHOR, Bernard a Elizabeth M. VAN COTT, 2010. Laboratory tests for antithrombin deficiency. *American Journal of Hematology* [online]. B.m.: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, **85**(12), 947–950 [vid. 2017-10-06]. ISSN 03618609.

KLINE, Jeffrey A., Ginger W. WILLIAMS a Jackeline HERNANDEZ-NINO, 2005. D-Dimer Concentrations in Normal Pregnancy: New Diagnostic Thresholds Are Needed. *Clinical Chemistry* [online]. **51**(5) [vid. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/51/5/825>

KNOEBL, Paul N., 2008. Severe congenital protein C deficiency: the use of protein C

concentrates (human) as replacement therapy for life-threatening blood-clotting complications. *Biologics: targets & therapy* [online]. B.m.: Dove Press, **2**(2), 285–96 [vid. 2017-10-22]. ISSN 1177-5475. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707361>

KOSTER, T., A. D. BLANN, E. BRIËT, J. P. VANDENBROUCKE a F. R. ROSENDAAL, 1995. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet (London, England)* [online]. **345**(8943), 152–5 [vid. 2017-10-22]. ISSN 0140-6736. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823669>

KRČOVÁ, Věra, Martin PROCHÁZKA, Ivo KRČ, Jana PROCHÁZKOVÁ a Luděk SLAVÍK, 2003. Komplikace dlouhodobé léčby heparinem v těhotenství. *Interní medicína pro praxi* [online]. **4**, 199–201 [vid. 2017-10-30]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2003/04/10.pdf>

KUJOVICH, Jody Lynn, 2011. Factor V Leiden thrombophilia. *Genetics in Medicine* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **13**(1), 1–16 [vid. 2017-12-04]. ISSN 1098-3600. Dostupné z: [doi:10.1097/GIM.0b013e3181faa0f2](https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181faa0f2)

LANGAN, Robert C, 2004. Factor V Leiden mutation and pregnancy. *The Journal of the American Board of Family Practice* [online]. B.m.: American Board of Family Medicine, **17**(4), 306–8 [vid. 2017-10-10]. ISSN 0893-8652. Dostupné z: [doi:10.3122/JABFM.17.4.306](https://doi.org/10.3122/JABFM.17.4.306)

LINCZ, Lisa F., Fiona E. SCORGIE, Anoop ENJETI a Michael SELDON, 2012. Variable plasma levels of Factor V Leiden correlate with circulating platelet microparticles in carriers of Factor V Leiden. *Thrombosis Research* [online]. B.m.: Pergamon, **129**(2), 192–196 [vid. 2017-12-07]. ISSN 0049-3848. Dostupné z: [doi:10.1016/J.THROMRES.2011.06.018](https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2011.06.018)

LINKINS, Lori-Ann, Peter T. CHOI a James D. DOUKETIS, 2003. Clinical impact of bleeding in patients taking oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism: a meta-analysis. *Annals of internal medicine* [online]. **139**(11), 893–900 [vid. 2017-10-25]. ISSN 1539-3704. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644891>

LISSALDE-LAVIGNE, G., P. FABBRO-PERAY, E. COCHERY-NOUVELLON, E.

MERCIER, S. RIPART-NEVEU, J.-P. BALDUCCHI, J.-P. DAURÉS, T. PERNEGER, I. QUÉRÉ, M. DAUZAT, P. MARES a J.-C. GRIS, 2005. Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case-control 'NOHA first' study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. B.m.: Blackwell Science Inc, **3**(10), 2178–2184 [vid. 2017-12-05]. ISSN 15387933.

MACKMAN, Nigel, 2009. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesthesia and analgesia* [online]. B.m.: NIH Public Access, **108**(5), 1447–52 [vid. 2017-09-21]. ISSN 1526-7598. Dostupné z: doi:10.1213/ane.0b013e31819bceb1

MAIORANA, Andrew, Gerard O'DRISCOLL, Roger TAYLOR a Daniel GREEN, 2003. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* [online]. **33**(14), 1013–35 [vid. 2017-09-11]. ISSN 0112-1642. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14599231>

MARCQ, G., L. BEAUGRAND DUBART, A. TOURNOYS, D. SUBTIL a P. DERUELLE, 2014. Intérêt du dosage des d-dimères comme marqueurs de sévérité en cas de prééclampsie. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* [online]. **42**(6), 393–398 [vid. 2017-12-06]. Dostupné z: doi:10.1016/j.gyobfe.2012.09.019

MARDER, Victor J., 2012. *Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice*. [online]. B.m.: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health [vid. 2017-10-02]. ISBN 9781608319060. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101576566>

MASCARENHAS, Mariano, Syed HABEEBULLAH a M G SRIDHAR, 2014. Revisiting the role of first trimester homocysteine as an index of maternal and fetal outcome. *Journal of pregnancy* [online]. B.m.: Hindawi, **2014**, 123024 [vid. 2017-10-25]. ISSN 2090-2735. Dostupné z: doi:10.1155/2014/123024

MATÝŠKOVÁ, Miloslava, Marie ŠLECHTOVÁ a Miroslav PENKA, 2009. Kdy vyšetřit trombofilní stav a interpretovat výsledky? *Interní Med.* [online]. **11**, 355–357 [vid. 2017-11-06]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2009/07/12.pdf>

MAURISSEN, L. F. A., M. C. L. G. D. THOMASSEN, G. A. F. NICOLAES, B.

DAHLBACK, G. TANS, J. ROSING a T. M. HACKENG, 2008. Re-evaluation of the role of the protein S-C4b binding protein complex in activated protein C-catalyzed factor Va inactivation. *Blood* [online]. **111**(6), 3034–3041 [vid. 2017-10-16]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2007-06-089987

MCMICHAEL, Maureen, 2012. New models of hemostasis. *Topics in companion animal medicine* [online]. B.m.: Elsevier, **27**(2), 40–5 [vid. 2017-09-20]. ISSN 1946-9837. Dostupné z: doi:10.1053/j.tcam.2012.07.005

MUSIL, Dalibor, 2001. Hluboká žilní trombóza- současný pohled na etiopatogenezu a diagnostiku. *Interní medicína pro praxi* [online]. **3**(8), 347–54 [vid. 2017-10-05]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2001/08/03.pdf>

MUSIL, Dalibor, 2009. Hluboká žilní trombóza - minimum pro praktické lékaře. *Med. Pro Praxi* [online]. **6**(5), 231–234 [vid. 2017-10-26]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2009/05/02.pdf>

NAKASHIMA, Megan O. a Heesun J. ROGERS, 2014. Hypercoagulable states: An algorithmic approach to laboratory testing and update on monitoring of direct oral anticoagulants. *Blood Research* [online]. **49**(2), 85–94. ISSN 22880011. Dostupné z: doi:10.5045/br.2014.49.2.85

NGUYEN, M, J ARKELL a C J JACKSON, 2000. Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *The Journal of biological chemistry* [online]. B.m.: American Society for Biochemistry and Molecular Biology, **275**(13), 9095–8 [vid. 2017-10-22]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/JBC.275.13.9095

PALARETI, Gualtiero, Cristina LEGNANI, Benilde COSMI, Lelia VALDRÉ, Barbara LUNGHI, Francesco BERNARDI a Sergio COCCHERI, 2003. Predictive Value of D-Dimer Test for Recurrent Venous Thromboembolism After Anticoagulation Withdrawal in Subjects With a Previous Idiopathic Event and in Carriers of Congenital Thrombophilia. *Circulation* [online]. **108**, 313–318 [vid. 2017-12-08]. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.0000079162.69615.0F

PALTA, Sanjeev, Richa SAROA a Anshu PALTA, 2014. Overview of the coagulation system. *Indian journal of anaesthesia* [online]. B.m.: Wolters Kluwer -- Medknow Publications, **58**(5), 515–23 [vid. 2017-09-20]. ISSN 0019-5049. Dostupné z: doi:10.4103/0019-5049.144643

PATNAIK, M. M. a S. MOLL, 2008. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **14**(6), 1229–1239 [vid. 2017-10-05]. ISSN 13518216. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01830.x

POORT, SR., FR. ROSENDAAL, PH. REITSMA a RM. BERTINA, 1996. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. **88**(10).

POUL, H., 2006. Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci. *Vnitřní lékařství* [online]. **52**, 17–25 [vid. 2017-10-05]. Dostupné z: http://www.thrombosis.cz/sources/Guidelines-Trombofilie_STH_III062.pdf

PROCHÁZKA, M. et al., 2004. Trombofilní stavy v porodnictví 1. část. *Praktická gynekologie*. (schéma 1), 12–16.

PŘISTOUILOVÁ, Kamila, Ivan PŘISTOUIPIL a Michael HEYROVSKÝ, 1999. Homocystein - molekula těšící se rostoucí pozornosti. *Chem. Listy* [online]. **93**, 365–374 [vid. 2017-10-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_06_365-374.pdf

PULIVARTHI, Swaroopa a Murali Krishna GURRAM, 2014. Effectiveness of d-dimer as a screening test for venous thromboembolism: an update. *North American journal of medical sciences* [online]. B.m.: Wolters Kluwer -- Medknow Publications, **6**(10), 491–9 [vid. 2017-10-04]. ISSN 2250-1541. Dostupné z: doi:10.4103/1947-2714.143278

RÉGER, Barbara, Ágnes PÉTERFALVI, Ilona LITTER, László PÓTÓ, Réka MÓZES, Orsolya TÓTH, Gábor L. KOVÁCS a Hajna LOSONCZY, 2013. Challenges in the evaluation of D-dimer and fibrinogen levels in pregnant women. *Thrombosis Research*

[online]. **131**(4), e183–e187 [vid. 2017-10-11]. ISSN 00493848. Dostupné z: doi:10.1016/j.thromres.2013.02.005

RÉGER, Barbara, Ágnes PÉTERFALVI, Ilona LITTER, László PÓTÓ, Réka MÓZES, Orsolya TÓTH, Gábor L. KOVÁCS a Hajna LOSONCZY, 2013b. Challenges in the evaluation of D-dimer and fibrinogen levels in pregnant women. *Thrombosis Research* [online]. **131**(4), e183–e187 [vid. 2017-12-01]. ISSN 00493848.

RIDKER, Paul M., Joseph P. MILETICH, Charles H. HENNEKENS a Julie E. BURING, 1997. Ethnic Distribution of Factor V Leiden in 4047 Men and Women. *JAMA* [online]. B.m.: American Medical Association, **277**(16), 1305 [vid. 2017-10-09]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.1997.03540400055031

RIEDL, Julia, Matthias PREUSSER, Pegah Mir Seyed NAZARI, Florian POSCH, Simon PANZER, Christine MAROSI, Peter BIRNER, Johannes THALER, Christine BROSTJAN, Daniela LÖTSCH, Walter BERGER, Johannes A. HAINFELLNER, Ingrid PABINGER a Cihan AY, 2017. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood* [online]. **129**(13) [vid. 2017-09-14]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/129/13/1831?sso-checked=true>

RIGHINI, M., C. JOBIC, F. BOEHLEN, J. BROUSSAUD, F. BECKER, M. JAFFRELOT, M. BLONDON, B. GUIAS, G. LE GAL a EDVIGE STUDY GROUP, 2013. Predicting deep venous thrombosis in pregnancy: external validation of the LEFT clinical prediction rule. *Haematologica* [online]. **98**(4), 545–548 [vid. 2017-10-26]. ISSN 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2012.072009

RODGER, Marc A., Marisol T. BETANCOURT, Peter CLARK, Pelle G. LINDQVIST, Donna DIZON-TOWNSON, Joanne SAID, Uri SELIGSOHN, Marc CARRIER, Ophira SALOMON a Ian A. GREER, 2010. The Association of Factor V Leiden and Prothrombin Gene Mutation and Placenta-Mediated Pregnancy Complications: A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *PLoS Medicine* [online]. B.m.: Public Library of Science, **7**(6), e1000292 [vid. 2017-10-06]. ISSN 1549-1676. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pmed.1000292

RODGER, Marc A, Marc CARRIER, Grégoire LE GAL, Ida MARTINELLI, Annalisa PERNA, Evelyne REY, J I P DE VRIES, Jean-Christophe GRIS a LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARIN FOR PLACENTA-MEDIATED PREGNANCY COMPLICATIONS STUDY GROUP, 2014. Meta-analysis of low-molecular-weight heparin to prevent recurrent placenta-mediated pregnancy complications. *Blood* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **123**(6), 822–8 [vid. 2017-12-05]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-01-478958

ROSENDAAL, F R, 1997. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk, and interaction. *Seminars in hematology* [online]. **34**(3), 171–87 [vid. 2017-12-04]. ISSN 0037-1963. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241704>

SALMON, J. E. a P. G. DE GROOT, 2008. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies. *Lupus* [online]. B.m.: NIH Public Access, **17**(5), 405–11 [vid. 2017-10-16]. ISSN 0961-2033. Dostupné z: doi:10.1177/0961203308090025

SÁNCHEZ-CORTÉS, Juan a Milan MRKSICH, 2009. The platelet integrin alphaIIb beta3 binds to the RGD and AGD motifs in fibrinogen. *Chemistry & biology* [online]. B.m.: NIH Public Access, **16**(9), 990–1000 [vid. 2017-09-18]. ISSN 1879-1301. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2009.08.012

SATHE, Prachee M. a Urvil D. PATWA, 2014. D Dimer in acute care. *International journal of critical illness and injury science* [online]. B.m.: Wolters Kluwer -- Medknow Publications, **4**(3), 229–32 [vid. 2017-10-30]. ISSN 2229-5151. Dostupné z: doi:10.4103/2229-5151.141435

SILVER, Robert M., et al., 2010. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstetrics and gynecology* [online]. B.m.: NIH Public Access, **115**(1), 14–20 [vid. 2017-10-06]. ISSN 1873-233X. Dostupné z: doi:10.1097/AOG.0b013e3181c88918

SIMCOX, Louise E., Laura ORMESHER, Clare TOWER a Ian A. GREER, 2015. Pulmonary thrombo-embolism in pregnancy: diagnosis and management. *Breathe* [online]. B.m.: European Respiratory Society, **11**(4), 282 [vid. 2017-10-26]. ISSN 1810-6838. Dostupné z: doi:10.1183/20734735.008815

SOTTILOTTA, Gianluca, Vincenzo ORIANA, Caterina LATELLA, Francesca LUISE, Angela PIROMALLI, Francesca RAMIREZ, Corrado MAMMÌ, Rita SANTORO, Piergiorgio IANNACCARO, Gaetano MULEO a Vincenzo Trapani LOMBARDO, 2006. Genetic prothrombotic risk factors in women with unexplained pregnancy loss. *Thrombosis research* [online]. B.m.: Elsevier, **117**(6), 681–4 [vid. 2017-12-06]. ISSN 0049-3848. Dostupné z: doi:10.1016/j.thromres.2005.06.005

SUZUKI-INOUE, K., O. INOUE a Y. OZAKI, 2011. Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **9**(s1), 44–55 [vid. 2017-09-14]. ISSN 15387933. Dostupné z: doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04335.x

SWIERINGA, Frauke, Marijke J E KUIJPERS, Moniek M E LAMERS, Paola E J VAN DER MEIJDEN a Johan W M HEEMSKERK, 2015. Rate-limiting roles of the tenase complex of factors VIII and IX in platelet procoagulant activity and formation of platelet-fibrin thrombi under flow. *Haematologica* [online]. B.m.: Ferrata Storti Foundation, **100**(6), 748–56 [vid. 2017-09-21]. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2014.116863

ŠLECHTOVÁ J, 2007. Hemostáza – jak ji možná neznáme. *Biochem. Metab* [online]. **15**(2), 97–101 [vid. 2017-09-11]. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702_Slechtova_97.pdf

ŠTÍCHOVÁ, Zuzana, 2015. *Hladina D-dimerů v graviditě*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce MUDr. Ivan Vonke, MBA.

TEN KATE, M. K. a J. VAN DER MEER, 2008. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **14**(6), 1222–28 [vid. 2017-10-16]. ISSN 1351-8216. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01775.x

TETIK, Kerem, Kerem Doğa SEÇKIN, Fatih Mehmet KARSLI, Seval SARIASLAN, Bülent ÇAKMAK a Nuri DANIŞMAN, 2014. Can we use as a marker the maternal serum

levels of D-dimer and fibrinogen to predict intra uterin growth restriction? *Turkish journal of obstetrics and gynecology* [online]. B.m.: Turkish Society of Obstetrics and Gynecology, **11**(4), 228–232 [vid. 2017-12-06]. ISSN 2149-9322. Dostupné z: doi:10.4274/tjod.39260

VAGDATLI, E., O. SERAFIMIDOU, E. PANTZIARELA, F. TSIKOPOULOU, K. MITSOPOULOU a A. PAPOUTSI, 2013. Prevalence of thrombophilia in asymptomatic individuals with a family history of thrombosis. *Hippokratia* [online]. B.m.: Hippokratia General Hospital of Thessaloniki, **17**(4), 359–62 [vid. 2017-12-04]. ISSN 1108-4189. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031517>

VAN COTT, Elizabeth M., Bernard KHOR a James L. ZEHNDER, 2016. Factor VLeiden. *American Journal of Hematology* [online]. **91**(1), 46–49 [vid. 2017-10-09]. ISSN 03618609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.24222

VAN HOVE, C. E., C. VAN DER DONCKT, A. G. HERMAN, H. BULT a P. FRANSEN, 2009. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* [online]. B.m.: Wiley-Blackwell, **158**(3), 920–30 [vid. 2017-09-11]. ISSN 1476-5381. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00396.x

VARGA-SZABO, David, Irina PLEINES a Bernhard NIESWANDT, 2008. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [online]. B.m.: American Heart Association, Inc., **28**(3), 403–12 [vid. 2017-09-18]. ISSN 1524-4636. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.107.150474

VAVRUŠKOVÁ, Klára, 2010. *Význam trombofilních mutací v klinické genetice*. Praha. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce MUDr. Miloslav Kuklík, CSc.

VERSTEEG, Henri H., Johan W. M. HEEMSKERK, Marcel LEVI a Pieter H. REITSMA, 2013. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews* [online]. **93**(1), 327–358 [vid. 2017-09-11]. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00016.2011

VORMITTAG, R., R. SIMANEK, C. A.Y., D. DUNKLER, P. QUEHENBERGER, C. MAROSI, C. ZIELINSKI a I. PABINGER, 2009. High factor VIII levels independently

predict venous thromboembolism in cancer patients: the cancer and thrombosis study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [online]. B.m.: American Heart Association, Inc., **29**(12), 2176–81 [vid. 2017-10-22]. ISSN 1524-4636. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.109.190827

WEINGARZ, Lea, Jan SCHWONBERG, Marc SCHINDEWOLF, Carola HECKING, Zsuzsanna WOLF, Matthias ERBE, Adele WEBER, Edelgard LINDHOFF-LAST a Birgit LINNEMANN, 2013. Prevalence of thrombophilia according to age at the first manifestation of venous thromboembolism: results from the MAISTHRO registry. *British Journal of Haematology* [online]. **163**(5), 655–665 [vid. 2017-12-04]. ISSN 00071048.

WEISEL, John W. a Rustem I. LITVINOV, 2017. Fibrin Formation, Structure and Properties. In: [online]. s. 405–456 [vid. 2017-09-19]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-49674-0_13

WEISEL, John W a Rustem I LITVINOV, 2013. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood* [online]. B.m.: American Society of Hematology, **121**(10), 1712–9 [vid. 2017-09-20]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2012-09-306639

WHITEHEART, Sidney W., 2011. Platelet granules: surprise packages. *Blood* [online]. **118**(5) [vid. 2017-09-14]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/118/5/1190?sso-checked=true>

YUN, Seong-Hoon, Eun-Hye SIM, Ri-Young GOH, Joo-In PARK a Jin-Yeong HAN, 2016. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed research international* [online]. B.m.: Hindawi, **2016**, 9060143 [vid. 2017-09-12]. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2016/9060143

ŽÁK, A. a M. ZEMAN, 2004. Význam mírné hyperhomocysteinémie pro vnitřní lékařství. *Čas. Lék. čes.* [online]. 367–374 [vid. 2017-10-25]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/casopis-lekaru-ceskych-clanek/vyznam-mirne-hyperhomocysteinemie-pro-vnitrnilekarstvi-25388>