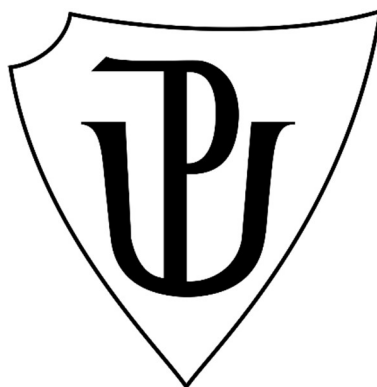


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Stanovení vlivu přímých perorálních antikoagulancií na trombin generační test

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jana Kolenovská
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Úlehlová, Ph.D.
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Kolenovská
Název práce	Stanovení vlivu přímých perorálních antikoagulancií na trombin generační test
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Úlehlová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Hemostáza je komplikovaný, ale životně důležitý proces tvorby krevní sraženiny. Pro posouzení, jak tento proces probíhá, slouží široká škála laboratorních testů. Jedním z nich je trombin generační test založený na principu měření kinetiky tvorby trombinu po celou dobu srážení. Na rozdíl od klasických koagulačních laboratorních testů, jako je aktivovaný parciální tromboplastinový čas nebo protrombinový čas, poskytuje trombin generační test komplexnější informace o daném hemostatickém systému, a proto je zařazován mezi globální hemostatické testy. Nadměrně zvýšená nebo naopak snižená tvorba trombinu může být spojena s řadou patologických stavů. Nicméně výsledek trombin generačního testu může být ovlivněn reakčními podmínkami, například použitými aktivátory reakce nebo přítomností antikoagulačních léčiv (inhibitorů) ve vzorku. Tato léčiva mohou ovlivňovat jak celý proces tvorby trombinu, tak jednotlivé parametry trombin generačního testu. Takto nám tento test umožňuje blíže poznat princip účinku jednotlivých antikoagulačních léků na základě cílů, proti kterým jsou tato léčiva namířena.

Klíčová slova	Trombin generační test, koagulační kaskáda, trombin, hemostáza, přímá perorální antikoagulancia
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jana Kolenovská
Title	Determination of the effect of direct oral anticoagulants on the thrombin generation assay
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Úlehlová, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Haemostasis is a complicated but vital process of blood clot formation. A wide range of laboratory tests are used to assess this process. One of them is the thrombin generation assay based on the principle of measuring the kinetics of thrombin generation throughout the clotting time. Unlike classic coagulation laboratory tests, such as activated partial thromboplastin time or prothrombin time, the thrombin generation assay provides more comprehensive information about the haemostatic system in question and is therefore included among global haemostatic tests. Excessively increased or, conversely, decreased thrombin production can be associated with numerous pathological conditions. However, the result of the thrombin generation assay can be influenced by the reaction conditions, for example the reaction activators used or the presence of anticoagulant drugs (inhibitors) in the sample. These drugs can affect both the entire process of thrombin formation and the individual parameters of the thrombin generation assay. Thus, this assay allows us to get to know the principle of action of individual anticoagulant drugs based on the targets against which these drugs are directed.

Keywords	Thrombin generation assay, thrombin generation test, coagulation cascade, thrombin, haemostasis, direct oral anticoagulants
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Hemostáza	3
2.1.1	Krevní cévy	3
2.1.2	Primární hemostáza	3
2.1.3	Sekundární hemostáza	4
2.1.4	Terciární hemostáza.....	5
2.2	Trombin	6
2.3	Inhibitory koagulace	8
2.3.1	Přirozené inhibitory	8
2.3.2	Léčiva	11
2.4	Laboratorní vyšetření hemostázy.....	20
2.4.1	Aktivovaný parciální tromboplastinový čas	20
2.4.2	Protrombinový čas.....	21
2.4.3	Trombinový čas	22
2.5	Trombin generační test	22
2.5.1	Princip.....	22
2.5.2	Analyt	23
2.5.3	Reagencie	24
2.5.4	Detekce trombinu	25
2.5.5	Přístrojové vybavení.....	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Materiál.....	27
3.2	Přístrojové vybavení	29
3.3	Metody.....	29
3.4	Kalibrace.....	30
3.5	Vlastní měření.....	31
3.5.1	Příprava vzorků a reagentů	31
3.5.2	Měření s různými koncentracemi tkáňového faktoru a fosfolipidů.....	31
3.5.3	Měření s HemosIL RecombiPlasTin 2G	32
3.5.4	Měření s DOACs	33
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	34
4.1	Měření s různými koncentracemi tkáňového faktoru a fosfolipidů.....	34
4.1.1	Původní koncentrace reagentů Ceveron® TGA RC Low.....	34
4.1.2	Ostatní koncentrace reagentů Ceveron® TGA RC Low	37
4.2	Měření s HemosIL RecombiPlasTin 2G	41
4.3	Měření s inhibitory koagulace	46
4.3.1	Apixaban.....	46
4.3.2	Rivaroxaban.....	49
4.3.3	Dabigatran	53
5	ZÁVĚR	56
6	LITERATURA	57
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	67

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- Provedení literární rešerše ke zvolené problematice

Praktická část

- Zvládnutí základních laboratorních dovedností a zaškolení v obsluze automatického analyzátoru
- Analýza vlivu různých koncentrací fosfolipidů a tkáňového faktoru na trombin generační test
- Analýza vlivu přímých perorálních antikoagulancií a na trombin generační test
- Zpracování dat a optimalizace metody

1 ÚVOD

V dnešní době je k dispozici široká škála laboratorních testů, díky kterým můžeme rychle a spolehlivě posoudit průběh srážení krve v lidském organismu. Tyto testy jsou potřeba k odhalení hypokoagulačních a trombotických poruch hemostázy ale i k monitorování léčby těchto patologických stavů. Tradičním postupem je měření časů od aktivace koagulační kaskády po vytvoření krevní sraženiny. Jednotlivé testy v této kategorii se liší látkou používanou pro aktivaci koagulace. Měří se aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT), trombinový čas (TT) a protrombinový čas (PT), někdy také nazýván Quickův. Další možností je kvantitativní stanovení jednotlivých srážecích faktorů, jejich kofaktorů a inhibitorů. Lze také využít molekulárně genetické metody ke stanovení mutací v příslušných genech, které způsobují vrozené dispozice k poruchám hemostázy (Hluší et al., 2010a).

Problém těchto klasických testů je, že pomocí nich nelze postihnout celý komplexní hemostatický systém a výsledky *in vitro* nemusí odpovídat výsledkům *in vivo*. Možné řešení nabízí trombin generační test (thrombin generation assay, TGA), patřící do skupiny globálních testů, při kterém se sleduje tvorba trombinu v čase po aktivaci koagulace. Trombin byl vybrán, protože ovlivňuje nejen srážení krve ale také mezibuněčnou signalizaci, zánětlivé procesy, a dokonce i inhibici koagulace (Hluší et al., 2010a; Tripodi, 2016).

Zásadním nedostatkem TGA je standardizace a velká variabilita mezi laboratořemi provádějícími toto vyšetření (Hluší et al., 2010a). Dnes už je běžné použití fluorogenního substrátu pro stanovení koncentrace trombinu, což umožňuje měřit jak plasmu obsahující krevní destičky, tak bezdestičkovou plasmu. Také už není nutné odstraňovat fibrin ze vzorku. Měření je prováděno na plně automatických analyzátořech vybavených programem pro výpočet a sestavení trombingenerační křivky, která se následně používá pro vyhodnocení testu (Hemker et al., 2017). Všechny tyto zásadní pokroky umožnily rychlejší a spolehlivější průběh testu a reprodukovatelnější výsledky, přesto se zde stále vyskytují problémy. Výsledky TGA velmi závisí na reagentii zahajující reakci. Tato reagentie obsahuje tkáňový faktor (TF) a fosfolipidy (PH). Jednotlivé reagentie, které jsou v dnešní době k dispozici pro TGA, se navzájem liší koncentracemi a metodou přípravy TF a PH. Také se liší strukturou PH a velikostí fosfolipidových micel. Situaci komplikuje fakt, že přesné složení činidel často nebývá výrobcem uváděno (Depasse et

al., 2021). Proto je nutné analyzovat vliv různých koncentrací TF a PH na TGA, což je také cílem této práce.

TGA může být využit nejen k rozpoznání poruch hemostázy a k monitorování případné léčby, ale má také využití v toxikologických studiích a při vývoji nových léčiv (Hluší et al., 2010a; Artang et al., 2017; Duarte et al., 2019). Také lze pomocí TGA sledovat vliv protilátek proti jednotlivým koagulačním faktorům nebo PH na srážení krve (Depasse et al., 2021; Radin et al., 2022). Tato bakalářská práce se bude věnovat vlivu antikoagulačních léků, konkrétně Apixabanu, Rivaroxabanu a Dabigatranu, na TGA.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Hemostáza

Hemostáza je proces tvorby krevní sraženiny, který se spouští jako odpověď na poranění cévy. Pro jeho správnou funkci je potřeba interakce jak krevních elementů, jako jsou trombocyty, tak i proteinových koagulačních faktorů a tkání tvořících cévní výstelku. Díky tomuto komplexnímu procesu je v organismu zajištěna nepřetržitá cirkulace krve nutná pro přenos kyslíku a živin do všech buněk.

Hemostázu můžeme rozdělit do tří fází. V první fázi označované jako primární hemostáza dochází k vazokonstrikci cév, aby se minimalizovala ztráta krve z poškozeného místa, a aktivaci a agregaci destiček. Druhá fáze (sekundární hemostáza) zahrnuje aktivaci koagulační kaskády na jejímž konci je vytvoření nerozpustné fibrinové sítě. V poslední fázi, nazývané terciární hemostáza, dochází k odstranění trombu po regeneraci poškozeného místa (Periayah et al., 2017).

2.1.1 Krevní cévy

Vnitřní výstelka cév je tvořena endotelem, pod kterým se nachází kolagenová vlákna zvenku obalená hladkou svalovinou. V klidovém stavu uvolňuje endotel do krve látky zabraňující srážení, jako je heparan (kofaktor antitrombinu) a inhibitor tkáňového faktoru. Dále látky sloužící jako vazodilatátory, což je oxid dusnatý nebo prostacyklin. Tyto inhibitory udržují systém hemostázy neaktivní a zabraňují koagulaci vyvolané malými podněty (Škorňová & Slavík, 2021).

Endotel ale zároveň také hraje významnou roli při aktivaci hemokoagulace. V buňkách endotelu je syntetizován von Willebrandův faktor (vWF), který je buď v malých množstvích uvolňován do krve nebo uskladněn ve Weibel-Paladeho tělískách. vWF hraje klíčovou roli v primární hemostáze. Při poškození endoteliálních buněk je do krevního řečiště uvolňován také TF, který startuje vnější cestu aktivace sekundární hemostázy (Škorňová & Slavík, 2021).

2.1.2 Primární hemostáza

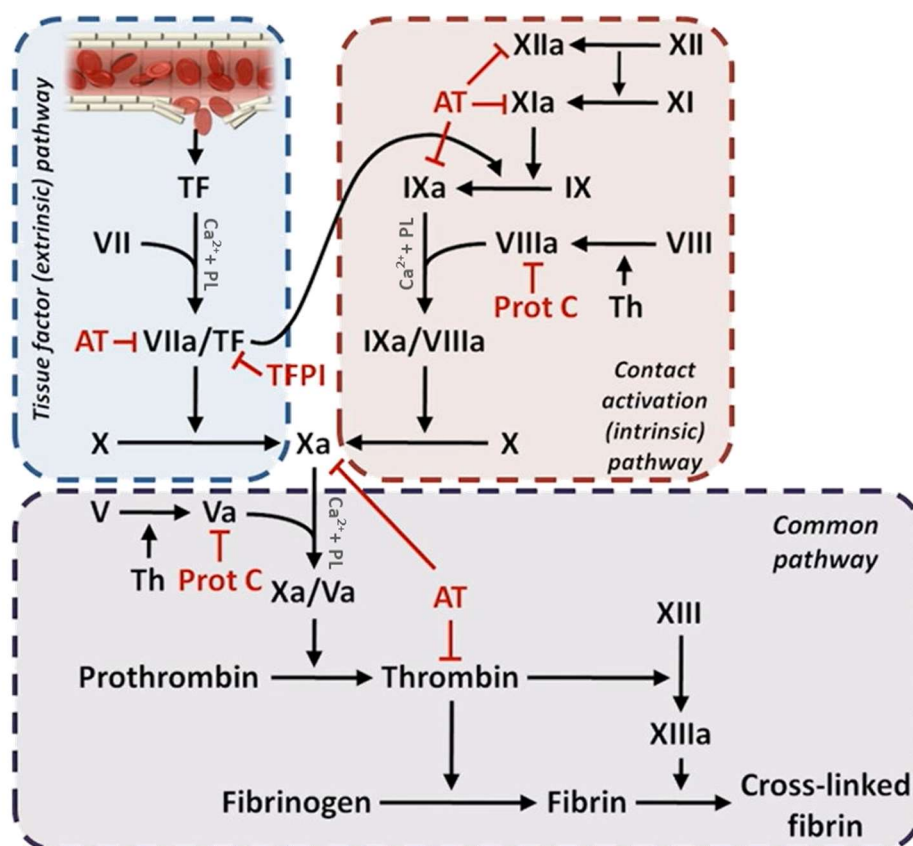
Při poškození cévního endotelu dochází k obnažení subendoteliálního kolagenu. Na tyto kolagenová vlákna se váže vWF, který následně aktivuje trombocyty vazbou na jejich receptory. Trombocyty přilnou k místu poškození a uvolňují látky, jako je tromboxan A2 (TXA2) a ADP, podporující aktivaci dalších destiček. TXA2 způsobí také vazokonstrikci cév v okolí. Zároveň je z Weibel-Paladeho tělísek uvolněný další vWF. Aktivované

destičky mění svůj tvar na hvězdicovitý a exprimují na svém povrchu receptory pro fibrinogen. Fibrinogen vytváří mezi agregovanými destičkami vláknitou síť a tvoří se tak primární trombotická zátka. Jedná se o velmi rychlý děj, ke kterému dochází během několika sekund (Škorňová & Slavík, 2021).

2.1.3 Sekundární hemostáza

Koagulační kaskáda (Obr. 1) je tvořena koagulačními faktory, které se v krevní plasmě vyskytují jako zymogeny. K aktivaci jednotlivých enzymů dochází po proteolytickém štěpení jedním z předchozích faktorů. Existují dvě cesty aktivace této kaskády.

K aktivaci zevní koagulační cesty dochází pomocí TF. TF se nevyskytuje v buňkách endotelu, ale je produkován fibroblasty ve vazivovém obalu cév. Tyto fibroblasty jsou také v menším množství rozptýlené mezi buňkami hladké svaloviny obalující cévy. Tím je zajištěno, že k aktivaci zevní koagulační cesty nedojde při malých nevýznamných poraněních endotelu, ale poranění musí narušit i vazivo nebo svalovinu kolem cévy



Obr. 1: Schéma koagulační kaskády (AT – antitrombin, Prot C – aktivovaný protein C, TF – tkáňový faktor, TFPI – inhibitor dráhy tkáňového faktoru, Th – trombin, PL – fosfolipidy, modře – vnější cesta aktivace, tmavě červeně – vnitřní cesta aktivace, fialově – společná cesta, černé šipky – aktivace, červené „T“ šipky – inhibice). Převzato od Strong Medicine, 2022, upraveno podle Škorňová & Slavík, 2021.

(Drake et al., 1989). Tato cesta se nazývá zevní, protože při srážení *in vitro* je pro zahájení nutné dodat TF z vnějšího prostředí pro iniciaci srážení (Škorňová & Slavík, 2021).

TF vytváří komplex s aktivovaným koagulačním faktorem VII (FVIIa, EC 3.4.21.21). Tento komplex poté aktivuje koagulační faktor X (FXa, EC 3.4.21.6) a koagulační faktor IX (FIXa, EC 3.4.21.22) (Osterud & Rapaport, 1977; Škorňová & Slavík, 2021). FXa vytváří malé množství aktivovaného koagulačního faktoru II (trombin, FIIa, EC 3.4.21.5). Toto množství trombinu je příliš malé na tvorbu dostatku nerozpustných fibrinových vláken, ale je dostačující na tvorbu FVa a FVIIIa. Po aktivaci těchto dvou koagulačních faktorů vznikají další komplexy – tenasový komplex (FIXa-FVIIIa) sloužící k aktivaci FX a protrombinasový komplex (FXa-FVa) vytvářející větší množství trombinu. Vzniká tak zpětnovazebná smyčka, jejíž účel je amplifikace tvorby trombinu. Pro vznik tenasového, protrombinasového a TF-FVIIa komplexu jsou potřebné Ca^{2+} ionty a záporně nabitě fosfolipidové povrchy krevních destiček. Na počátku srážení je málo aktivovaných trombocytů a tím je k dispozici málo povrchů pro tvorbu koagulačních komplexů, později dochází k aktivaci více krevních destiček, které poskytují více vazebných míst pro aktivované koagulační faktory. Trombin generovaný protrombinasovým komplexem vytváří z rozpustného fibrinogenu nerozpustný fibrin a pokud je trombinu dostatek, je aktivována protein-glutamin γ -glutamyltransferasa (aktivovaný faktor XIII, FXIIIa, EC 2.3.2.13), která vzniklá vlákna fibrinu zesiluje do pevné sraženiny (Škorňová & Slavík, 2021).

Vnitřní neboli kontaktní cesta je aktivována odhaleným kolagenem v poškozené cévě. *In vitro* může být aktivována negativně nabitým skleněným povrchem zkumavky. Je aktivován koagulační faktor XII (FXIIa, EC 3.4.21.38), který následně aktivuje koagulační faktor XI (FXIa, EC 3.4.21.27) a ten aktivuje FIX. Další kroky probíhají stejně jako v předchozí vnější cestě (Škorňová & Slavík, 2021).

2.1.4 Terciární hemostáza

Po vytvoření fibrinové sraženiny a zastavení krvácení dochází k vazodilataci a zvýšení propustnosti cévy. Díky těmto mechanismům se mohou do blízkosti poškozeného místa dostat buňky imunitního systému zabraňující možné infekci (Simon et al., 2021). Jedná se o neutrofilů a makrofágy. Jejich funkcí je pohlcování a odstraňování bakterií a produkce proteas, které rozkládají poškozené buňky. Makrofágy také produkují faktory aktivující fibroblasty a endoteliální buňky. Celý tento proces je regulován cytokiny (Schultz et al., 2003).

V této fázi také dochází k rozkladu fibrinové sítě pomocí plasminogenu (Simon et al., 2021). Plasminogen je štěpen na aktivní plasmin (EC 3.4.21.7) t-plasminogen aktivátorem (tkáňový aktivátor plasminogenu, t-PA, EC 3.4.21.68) nebo u-plasminogen aktivátorem (urokinasa, u-PA, EC 3.4.21.73). t-PA za normálních podmínek nemá velkou afinitu k plasminogenu, což se mění v přítomnosti fibrinu. Plasminogen má schopnost vázat se na fibrinová vlákna, která také poskytují vhodný povrch pro absorpci t-PA. Následně dojde k tvorbě cyklického terciálního komplexu, což zvyšuje efektivitu aktivace plasminogenu na plasmin (Hoylaerts et al., 1982; Wu et al., 1990). u-PA působí podobně jako t-PA. u-PA volně v plasmě má nízkou afinitu k plasminogenu, což se změní, pokud se u-PA naváže na svůj receptor (Ellis et al., 1991). Tento receptor se vyskytuje v buněčné membráně neutrofilů a monocytů (Vassalli et al., 1985). u-PA vázaný na receptor má vyšší afinitu k plasminogenu a tím ho efektivněji aktivuje. Díky tomuto mechanismu je plasmin generován na buněčném povrchu, což ho chrání před jeho inhibicí α 2-antiplasminem. Pokud plasmin oddisociuje z buněčné membrány je okamžitě inhibován. Tím je zajištěno že aktivita plasminu bude omezena pouze na okolí buněk, které se vyskytují na místě poranění (Ellis et al., 1991). Schopnost aktivovat plasmin má také FXIIa. Plasmin poté rozkládá fibrin. Při jeho rozkladu dochází ke tvorbě D-dimerů, které jsou sledovány v klinických testech sledujících průběh srážení (Škorňová & Slavík, 2021).

Proces hojení rány je dokončen syntézou elastinu, proteoglykanů a kolagenu a proliferací epiteliálních buněk (Schultz et al., 2003).

2.2 Trombin

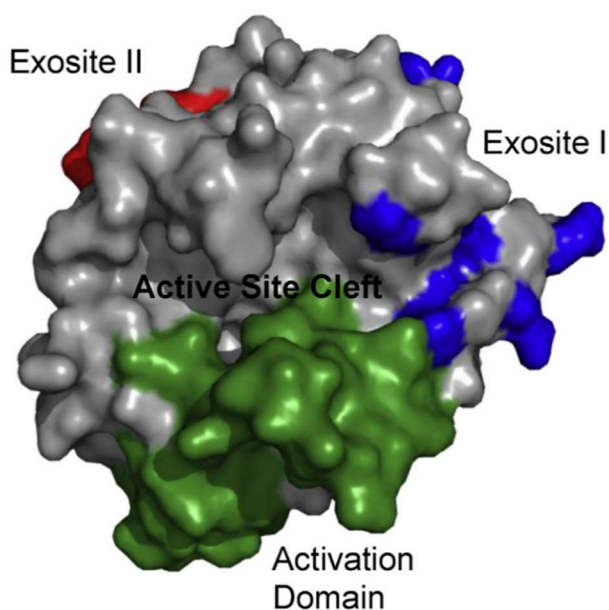
Trombin je syntetizován v játrech jako neaktivní protrombin. V plasmě je po iniciaci hemostázy štěpen protrombinasovým komplexem, nejdříve na meizotrombin a poté na trombin (Krishnaswamy et al., 1986).

Svou strukturou je trombin podobný s ostatními serinovými proteasami jako je například chymotrypsin a trypsin. Všechny tyto proteasy mají ve svém aktivním místě serinové residuum, v případě trombinu tvoří aktivní místo ještě histidin a aspartát. Kromě aktivního místa má trombin ještě dvě místa pro vazbu široké škály aniontových kofaktorů – exosite I a II (Obr. 2) (Bode et al., 1992). Exosite I interaguje s fibrinogenem, popřípadě fibrinem (Fenton II et al., 1988). Exosite II interaguje s heparinem (Carter et al., 2005). Na exosite I a II se také vážou inhibitory srážení vyskytující se v hadích jedech (Zingali, 2008).

Základní funkcí trombinu je katalýza štěpení fibrinogenu na fibrin. Fibrin má symetrickou dimerní strukturu. Každý dimer se skládá ze tří polypeptidových řetězců, které jsou navzájem propojeny disulfidickými vazbami, a oba dimery jsou uprostřed spojeny E doménou. Právě v tomto místě trombin štěpí fibrinogen a vznikají nerozpustná fibrinová vlákna, která stabilizují vznikající krevní sraženinu (Škorňová & Slavík, 2021).

Fibrinogen ale není jediný substrát pro trombin. Trombin také katalyzuje tvorbu FVa, FVIIIa pro vznik komplexů generující další trombin a FXIIIa pro cross-linkování vzniklých fibrinových vláken. Během hemostázy také aktivuje trombocyty (Škorňová & Slavík, 2021).

Je zřejmé, že trombin hraje centrální úlohu v celé koagulační kaskádě, ale nemá pouze jen koagulační funkci. Na povrchu endotelu se může vázat k trombomodulinu, což změní funkci trombinu na antikoagulační. Komplex trombin-trombomodulin může aktivovat protein C (APC, EC 3.4.21.69), který společně se svým kofaktorem, proteinem S, působí jako inhibitor FVa a FVIIIa a tím zpomaluje další vznik trombinu (Kisiel et al., 1977; Esmon et al., 1982). Inaktivace FVa probíhá mnohem efektivněji na povrchu endotelu než na povrchu trombocytů, což svědčí to tom, že tento proces má především sloužit ke zpomalení generace trombinu v místech příliš vzdálených od místa poranění. Tím je regulována tvorba sraženiny, aby nezasahovala do zdravých, nepoškozených částí cévy, a přitom není ohrožena generace trombinu v protrombinasovém komplexu na povrchu krevních destiček (Oliver et al., 2002). Komplex trombin-trombomodulin dále aktivuje



Obr. 2: Zobrazení struktury trombinu (modře – exosite I, červeně – exosite II, zeleně – aktivační doména a poblíž ní je vyznačena dutina tvořící aktivní místo). Převzato od Adams & Huntington, 2016.

karboxypeptidasu U (trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy, TAFI, EC 3.4.17.20), která snižuje rychlost fibrinolýzy inhibicí procesu aktivace plasminogenu a stabilizuje fibrinovou síť odštěpením lysinových zbytků z jednotlivých vláken. Na takto upravená vlákna se poté nemůže vázat plasminogen (Bajzar et al., 1996; Wang et al., 1998; Miles et al., 1991).

2.3 Inhibitory koagulace

Hemostáza je regulována širokým spektrem inhibitorů, které zajišťují, aby se původně ochranný mechanismus srážení krve nestal životu nebezpečný. Snížení funkce některého z přirozených inhibitorů se projeví zvýšeným rizikem vzniku trombózy, což může mít za následek velké množství patologických stavů. Arteriální trombóza může dále způsobit infarktu myokardu (IM) nebo cévní mozkovou příhodu (CMP). Vznik trombu v žíle může vést dále ke stavu označovanému jako hluboká žilní trombóza (HŽT) a ta může dále vést k plicní embolii (PE). Léčba těchto stavů zahrnuje podporu funkce přirozených inhibitorů již přítomných v krvi, použití syntetických inhibitorů koagulace nebo inhibici syntézy srážecích faktorů (Mackman, 2008).

2.3.1 Přirozené inhibitory

Mezi přirozené inhibitory koagulace patří mimo jiné antitrombin, APC a jeho kofaktor protein S a inhibitor dráhy tkáňového faktoru (tissue factor pathway inhibitor, TFPI).

2.3.1.1 Antitrombin

Antitrombin je jeden z hlavních inhibitorů srážení krve. Je syntetizován v játrech a patří mezi serinové inhibitory proteas (serpiny) (Olson et al., 2010; Škorňová & Slavík, 2021). Byl objeven v roce 1936 a zpočátku bylo předpokládáno, že existuje více druhů antitrombinů, které byly označovány jako frakce I-IV, a byly jim připisovány různé antikoagulační vlastnosti (Quick, 1938; Fell et al., 1954). Později se ukázalo, že všechny tyto vlastnosti má pouze jedna molekula původně označovaná jako antitrombin III, dnes nazývaná pouze antitrombin (Mammen, 1998).

Navzdory jeho názvu, antitrombin neinhibuje jen trombin, ale i jiné koagulační faktory, jako je FIXa a FXa a v menší míře také FXIa a FXIIa. Inhibuje také komplex TF-FVIIa a plasmin. V normální plasmě je jeho inhibiční schopnost potlačena a pro jeho aktivaci je nutný kofaktor heparan, který udržuje molekulu antitrombinu v optimální trojrozměrné konformaci (Olson et al., 2010; Škorňová & Slavík, 2021).

Antitrombin, podobně jako většina serpinů, se chová při inhibici cílových proteas jako sebevražedný substrát (Gettins, 2002). Váže se do aktivního místa a je štěpen proteasou stejně jako její původní substrát (Björk et al., 1992). V průběhu tohoto štěpení vzniká mezi antitrombinem a proteasou vazba a vzniká prakticky nedisociovatelný komplex. Takto jsou nevratně inaktivovány vždy jedna molekula proteasy a jedna molekula antitrombinu (Rosenberg & Damus, 1973).

2.3.1.2 Aktivovaný protein C

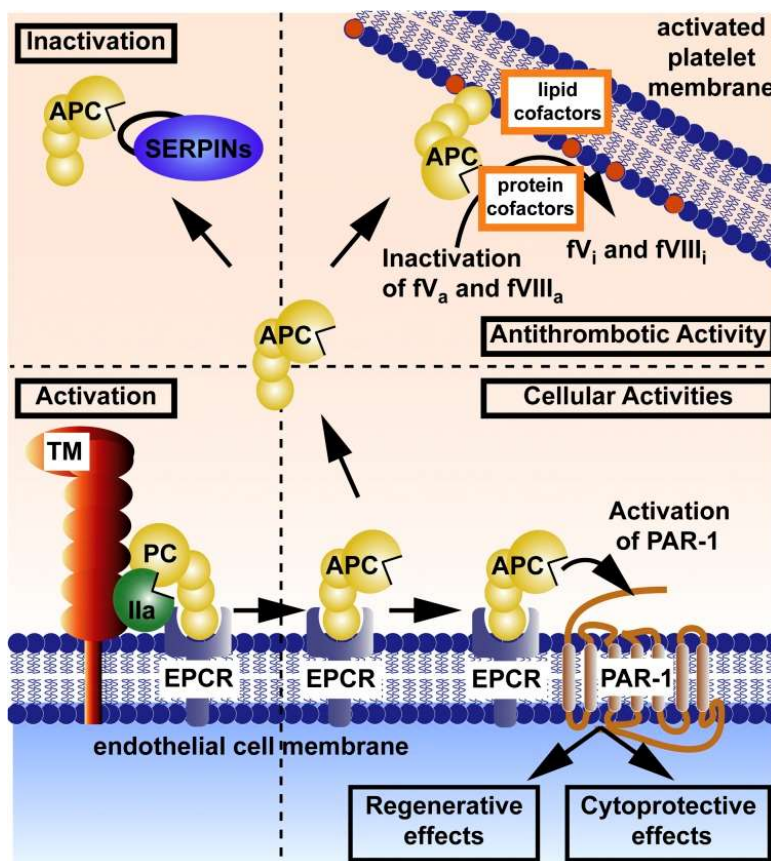
APC je, jak již název napovídá, aktivovanou verzí proteinu C. Je aktivován komplexem trombin-trombomodulin a stejně jako trombin je to serinová proteasa (Kisiel et al., 1977; Esmo et al., 1982). Sekvence aminokyselin v aktivním místě APC je podobná sekvenci aminokyselin v aktivním místě trombinu, FIXa, FVIIa a FXa. Další podobnost s těmito faktory je taková, že je pravděpodobné, že obecný mechanismus aktivace těchto koagulačních faktorů je podobný jako mechanismus aktivace APC. K aktivaci dochází po odštěpení peptidu z N-terminální části polypeptidového řetězce, dochází ke změně konformace a vytvoření serinového aktivního místa (Kisiel et al., 1977). Narozdíl od aktivace výše zmíněných koagulačních faktorů, probíhá aktivace proteinu C na endoteliální výstelce cévy, kde se APC váže na endoteliální receptor proteinu C (EPCR) (Obr. 3). Po své aktivaci APC oddisociuje a chová se jako inhibitor FVa a FVIIIa (Stearns-Kurosawa et al., 1996; Škorňová & Slavík, 2021). Inhibice těchto dvou faktorů dále inhibuje generaci FXa a FIXa a následně inhibuje generaci trombinu. Tato negativní zpětná vazba představuje přirozený kontrolní mechanismus, který musí být při hemostáze překonán, aby mohla být vytvořena sraženina (Škorňová & Slavík, 2021).

Kromě antikoagulační funkce má APC také cytoprotektivní funkci, která se projeví, pokud APC zůstane po své aktivaci navázaný na EPCR (Obr. 3). Přes receptor 1 aktivovaný proteasami (PAR-1) ovlivňuje APC genovou expresi uvnitř endoteliálních buněk (Mosnier et al., 2006). APC zvyšuje transkripci antiapoptotických genů a protizánětlivých genů, čímž chrání buňku, a proto má tato dráha název cytoprotektivní (Joyce et al., 2001). Také skrze PAR-1 aktivuje sfingosin kinasovou dráhu, která se podílí na ochraně endoteliální bariéry a tím zabraňuje možnému napadení patogeny nebo rozvoji zánětu (Feistritzer & Riewald, 2005).

Pod názvem Captoprin se APC izolovaný z lidské plasmy používá pro léčbu vrozené deficeince proteinu C (FDA, 2021). V preklinických studiích APC navíc prokázal schopnost okamžitě a vratně inhibovat tvorbu trombu v krvi za podmínek simulujících

normální arteriální průtok (Gruber et al., 1989). Také měl pozitivní vliv na léčbu širokého spektra patologických stavů, jako je například sepse nebo diabetes (Taylor et al., 1987; Xue & Jackson, 2014).

Klinické využití APC pro jeho cytoprotektivní účinky je ale spojeno s několika problémy. Jedním z nich je jeho imunogenicita, tedy schopnost vyvolávat imunitní odpověď, která je v tomto případě nežádoucí. Druhým problémem léčby APC je jeho antikoagulační funkce, která není vždy vhodná pro léčbu daného onemocnění (De Ceunynck et al., 2018). Takovýto problém se vyskytl u léku Drotrecogin Alfa. Jednalo se o APC určený pro léčbu sepse a selhání orgánů v důsledku akutní infekce. Drotrecogin Alfa byl ale stažen o několik let později po jeho uvedení na trh, v reakci na studie, ve kterých se nepodařilo prokázat žádné benefity u pacientů, kteří užívali tento lék v porovnání s placebo skupinou pacientů. Naopak Drotrecogin alfa zvyšoval



Obr. 3: Funkce aktivovaného proteinu C (IIa – trombin, APC – aktivovaný protein C, EPCR – endoteliální receptor proteinu C, PAR-1 – receptor 1 aktivovaný proteasami, PC – protein C, SERPINs – serinové inhibitory proteas, TM – trombomodulin) PC vázaný na EPCR je aktivovaný komplexem TM-IIa na APC. Pokud poté APC odissociuje od EPCR, projevuje se jeho antitrombotická funkce, kdy inaktivuje FVa a FVIIIa. APC nacházející se volně v plasmě může být inhibován SERPINy. Pokud zůstane vázaný na EPCR dochází k aktivaci PAR-1 a projevuje se jeho regenerativní a cytoprotektivní funkce. Převzato od Griffin et al., 2015.

pravděpodobnost výskytu vážných krvácivých stavů u léčených pacientů (Murphy & Bellamy, 2013). Proto De Ceunynck et al. (2018) navrhuje raději využití parmodulinů pro tento účel. Jedná se o nízkomolekulární látky, které aktivují PAR-1 stejně jako APC ale neinhibují FVa a FVIIIa. Další možností je využití rekombinantního APC, jehož struktura byla upravena nahrazením 3 lysinových residuí za alaninové (3K3A-APC), čímž byla téměř úplně inhibována jeho schopnost ovlivňovat FVa a FVIIIa. 3K3A-APC prokázal neuroprotektivní účinky při léčbě pacientů, kteří prodělali CMP, a zároveň nebylo pozorováno zvýšené riziko krvácení (Lyden et al., 2019).

2.3.1.3 Protein S

Protein S je glykoprotein fungující jako kofaktor APC při inhibici FVa a FVIIIa. Jeho syntéza v játrech je závislá na vitamínu K (VK). V krvi se vyskytuje buď jako volný nebo vázaný na C4b-vazebný protein, který je součástí komplementu. Tento C4b-vazebný protein reguluje aktivitu proteinu S, neboť pouze volný protein S má schopnost vázat APC a inhibovat koagulaci (Amiral & Seghatchian, 2019; Škorňová & Slavík, 2021).

2.3.1.4 Inhibitor dráhy tkáňového faktoru

TFPI, dříve nazývaný inhibitor vnější cesty nebo koagulační inhibitor asociovaný s lipoproteiny, je krátký peptid inhibující FVIIa, tedy úplný začátek aktivace koagulace zevní cestou, čímž doplňuje působení APC, který inhibuje vnitřní cestu koagulace. TFPI pro svoji antikoagulační aktivitu nevyžaduje aktivaci (Lindahl et al., 1991a; Škorňová & Slavík, 2021). Většina TFPI je vázaná na endoteliální buňky cév, menší část je poté v plasmě vázána na lipoproteinové částice (Novotny et al., 1989; Mast et al., 2002). Frakce TFPI vázaná na lipoproteiny v plasmě má nižší antikoagulační aktivitu (Lindahl et al., 1991a; Broze Jr. et al., 1994). Frakce vázaná na endotel může být uvolněna do plasmy interakcí s heparinem, což přispívá k antikoagulační léčbě heparinem u pacientů se zvýšeným rizikem trombózy (Lindahl et al., 1991b).

2.3.2 Léčiva

Centrálním regulátorem koagulace je trombin, což je dáno jeho koagulační a antikoagulační funkcí a jeho schopností zpětnovazebně amplifikovat svoji tvorbu skrze tenasový a protrombinasový komplex. Proto je trombin cílem pro prevenci a léčbu tromboembolických onemocnění (van Aken et al., 2001).

Aktivita trombinu může být inhibována nepřímo skrze jeho přirozené inhibitory, jako je například antitrombin, jehož aktivita je podpořena podáváním heparinu, nebo může být

inhibována generace trombinu inhibicí ostatních koagulačních faktorů, což způsobuje například Warfarin nebo inhibitory FXa. Přímá inhibice trombinu spočívá ve vazbě antikoagulantu na trombin, což zabraňuje interakci trombinu s dalšími substráty (Weitz & Hirsh, 1998).

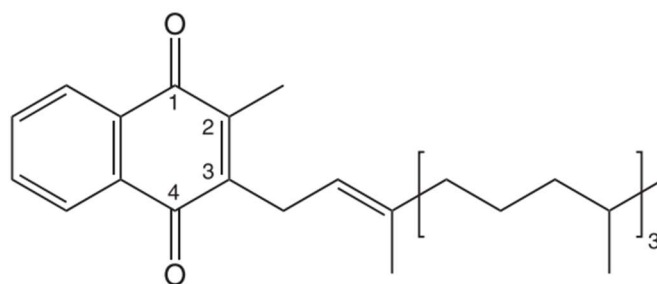
Zvláštní skupinou antikoagulačních léčiv jsou přímá perorální antikoagulancia (direct oral anticoagulants, DOACs). DOACs jsou také někdy nazývaná nová perorální antikoagulancia nebo cílově specifická perorální antikoagulancia. Aby se názvosloví zjednodušilo a zamezilo se nedorozuměním s možnými vážnými následky, doporučila Mezinárodní společnost pro trombózu a hemostázu (International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH) používání pouze označení DOACs (Barnes et al., 2015). Tyto léčiva se dělí na dvě skupiny dle mechanismu účinku. První skupina jsou přímé inhibitory FXa tzv. xabany, mezi které patří Rivaroxaban, Apixaban a Endoxaban. Druhá skupina jsou přímé inhibitory FIIa tedy trombinu, kam spadá Dabigatran, Argatroban a Bivalirudin (Dulíček et al., 2022; Biswas et al., 2023). DOACs mají řadu výhod. Jejich perorální podání a dávkování je jednoduché a léčba nemusí být nutně rutinně monitorována, protože jejich farmakokinetické vlastnosti jsou lépe předvídatelné. Zároveň jejich interakce s jinými léky nebo potravinami je minimální (Dulíček et al., 2022; Biswas et al., 2023). DOACs také vykazují daleko menší riziko vážného krvácení než Warfarin, což z nich dělá v tomto ohledu bezpečnější alternativu (Chai-Adisaksopha et al., 2015). Hlavní nevýhoda DOACs se projeví v případě výskytu vážného krvácení nebo nutnosti urgentního operativního zákroku u pacientů užívajících DOACs, kdy je nutné ihned potlačit funkci daného antikoagulantu. Pouze některá DOACs mají totiž svá antidota, přestože se na jejich vývoji dnes intenzivně pracuje (Almarshad et al., 2018). V nouzových situacích se tedy co nejdříve vysadí dané léčivo a podá se aktivní uhlí, popřípadě se lék odstraní z krve hemodialýzou (Biswas et al., 2023). Pokud tento přístup nestačí podávají se intravenózně koncentráty rekombinantního FVIIa nebo koncentráty protrombinového komplexu (PCC), které obsahují FII, FVII, FIX a FX (Sorensen et al., 2011; Warkentin et al., 2012; Biswas et al., 2023).

2.3.2.1 Antagonisté vitamínu K

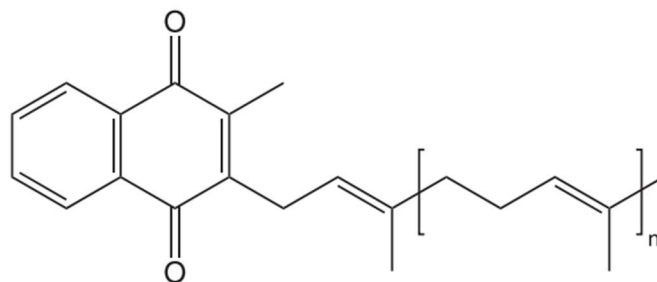
VK je esenciální látka vyskytující se nejvíce v listové zelenině, v menší míře pak v ovoci, sýru a olivovém oleji (Schurgers & Vermeer, 2001). Písmeno K bylo vybráno podle německého názvu tohoto vitamínu Koagulations-vitamin, který odkazuje na jeho klíčovou funkci při srážení krve (Dam, 1935). Existuje více isoformů neboli vitamérů VK

(Obr. 4). Mezi přirozeně se vyskytující patří fylochinon (vitamin K₁) a menachinon (vitamin K₂). Oba mají velmi podobnou strukturu, obsahují 2-methyl-1,4-naftochinonový kruh, ale liší se postranním řetězcem v poloze 3. Fylochinon obsahuje fytylový postranní řetězec složený ze čtyř isopreniodních jednotek. Menachinon obsahuje nenasycený postranní řetězec s variabilní délkou (Shearer & Newman, 2017; Halder et al., 2019). VK slouží jako kofaktor pro peptidyl-glutamát-4-karboxylasu(2-methyl-3-fytyl-1,4-naftochinol-epoxidující) (VK dependentní karboxylasa, GGCX, EC 4.1.1.90), která katalyzuje postranslační konverzi glutamátu na γ -karboxyglutamyl. Tato konverze je nezbytná pro funkci FVII, FIX, FX, trombinu, APC a proteinu S. Karboxyglutamylová residua zajišťují interakci s vápenatými ionty, což je nezbytné pro vznik koagulačních komplexů (Suttie, 1985).

Při deficienci VK nedochází k této postranslační karboxylaci koagulačních faktorů a do krve jsou uvolňovány koagulační faktory neschopné amplifikace generace trombinu v sekundární fázi hemostázy (Škorňová & Slavík, 2021). Deficience VK se poté projevuje zvýšenou krvácivostí. U dospělých je nutriční deficience VK velmi vzácná, většinou je spíše patologického původu. U novorozenců je ale deficience častější, proto je jim preventivně dodáván VK (Shearer, 2009; Shearer & Okano, 2018).



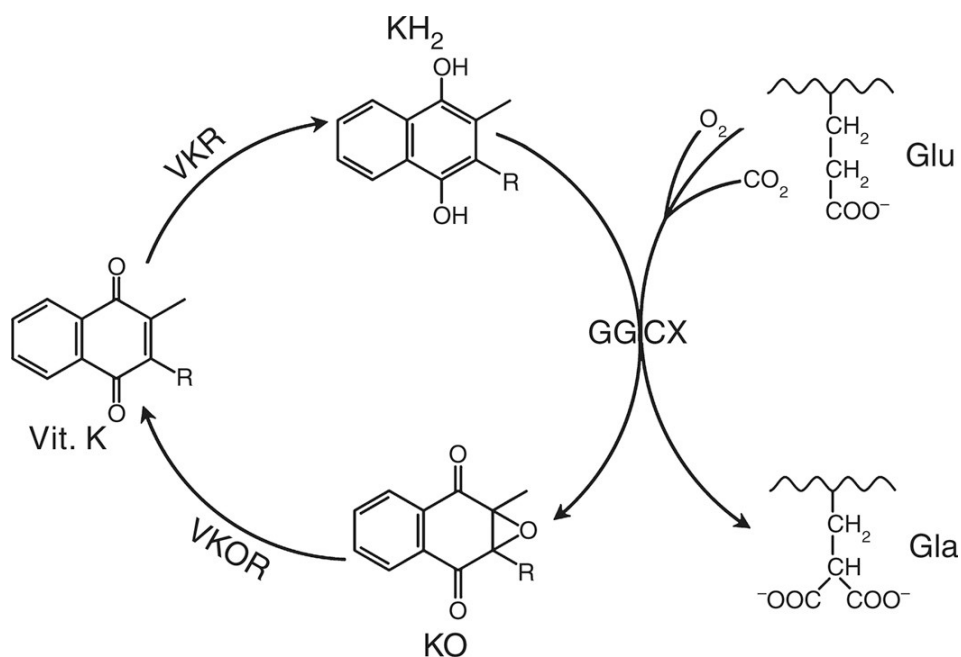
Phylloquinone (Vitamin K₁)



Menaquinones (Vitamin K₂, MK_n)

Obr. 4: Struktura přirozeně se vyskytujících isoformů vitamínu K. Převzato od van Horn, 2013.

Stejný účinek jako deficiencie VK má podávání antagonistů VK například Warfarinu, který se používá k prevenci nebo léčbě žilní trombózy, PE nebo ke snížení rizika opakovaného IM (Wysowski et al., 2007; Škorňová & Slavík, 2021). Warfarin zasahuje do recyklační dráhy VK v organismu (Obr. 5), což vede k vyčerpání VK v buňkách (Škorňová & Slavík, 2021). VK přijatý v potravě musí být nejdříve aktivovaný redukcí na hydrochinonovou formu (KH_2), v takovéto formě potom může sloužit jako kofaktor GGCX (van Horn, 2013). V průběhu karboxylasové reakce dojde k epoxidaci KH_2 na 2,3-epoxid (KO), který musí být redukován zpátky na KH_2 přes dvoukrokovou redukci. V prvním kroku je KO redukován na VK, ve druhém kroku je VK redukován na KH_2 (Tie & Stafford, 2016). Díky této recyklační dráze se deficiencie VK u lidí vyskytuje jen výjimečně (van Horn, 2013). Warfarin zasahuje do redukce KO na VK a do následné redukce VK na KH_2 (Tie & Stafford, 2016). Redukce VK na KH_2 je pravděpodobně katalyzována dvěma různými enzymy, Warfarin-senzitivním enzymem a Warfarin-rezistentním enzymem, který je také nazýván antidotální. Aktivita Warfarin-rezistentního enzymu se projeví, při podání většího množství VK jako antidota proti Warfarinu a tím dojde k obnově normálního metabolismu VK v organismu (O'Reilly & Aggeler, 1966; Wallin, 1986; Tie & Stafford, 2016).



Obr. 5: Recyklační dráha vitamínu K (Gla – γ -karboxyglutamyl, GGCX – vitamin K dependentní karboxylasa, Glu – glutamát, KH_2 – hydrochinonová forma vitamínu K, KO – 2,3-epoxidová forma vitamínu K, VKOR - vitamin K epoxid reduktasa, VKR – vitamin K reduktasa, Vit. K – vitamin K). Převzato od Tie & Stafford, 2016.

Warfarinová terapie má ale několik zásadních nevýhod. Jednou z nich je malé terapeutické rozmezí, což znamená, že se často vyskytují komplikace jako je nadměrné krvácení, a také může docházet k interakci s jinými léčivy nebo může být výsledek terapie ovlivněn množstvím VK přijatým v potravě. Proto musí být warfarinová terapie u pacienta pečlivě monitorována. Protože Warfarin zasahuje do koagulační kaskády nespecificky, byly vyvinuty léčiva, které přímo cílí na jednotlivé koagulační faktory. Patří zde přímé inhibitory trombinu a přímé inhibitory FXa (Wysowski et al., 2007; van Gorp & Schurgers, 2015).

2.3.2.2 Heparan a hepariny

Heparan sulfát a hepariny jsou glykosaminoglykanové kofaktory antitrombinu. Jejich vazbou na antitrombin pomocí specifické pětisacharidové sekvence dochází ke konformační změně antitrombinu a k jeho aktivaci (Olson et al., 2010). Heparan sulfát je ukotven v buněčné membráně endoteliálních buněk vazbou na hydrofobní proteinovou doménu (Marcum et al., 1986). Takováto lokalizace zajišťuje, že srážení krve probíhá pouze v okolí poranění a nepostupuje dále v cévě. Heparin je do krve uvolňován extravaskulárními heparinocyty v místě poranění (Olson et al., 2010).

Heparin se používá pro prevenci a léčbu žilní trombózy už od 30. let 20. století (Qiu et al., 2021). Nemůže být ale užíván perorálně, a proto se podává ve formě kontinuální intravenózní infuze nebo jako subkutánní injekce (Garcia et al., 2012). Nefrakcionovaný heparin (UFH), je skupina glykosaminoglykanů s průměrnou molekulovou hmotností 15 kDa. Je získáván purifikací z živočišných tkání (Oduah et al., 2016; Wang et al., 2020). Řetězce UFH se navzájem liší svojí strukturou a délkou, což komplikuje předpověď farmakokinetického chování (Garcia et al., 2012). Proto byl v 80. letech vyvinut heparin s nízkou molekulovou hmotností (LMWH), který v mnohém nahradil UFH.

LMWH se vyrábí depolymerizací nebo frakcionací UFH. Je tvořen polysacharidovými řetězci o délce 16-20 jednotek a molekulová hmotnost jednotlivých glykosaminoglykanů je 3-6,5 kDa (Qiu et al., 2021). Vlastnosti jednotlivých LMWH se mohou lišit v závislosti na metodě přípravy a zdroji výchozího UFH, ale i tak mají LMWH oproti UFH mnoho výhod. Díky zvýšené biodostupnosti mohou být podávány nižší dávky a odpověď organismu na danou dávku může být lépe předvídána. To umožňuje ambulantní podávání LMWH bez nutnosti hospitalizace pacientů. Na druhou stranu LMWH spolu s antitrombinem inaktivují trombin méně než UFH. Inaktivace FXa ale probíhá u UFH a LMWH stejně dobře (Onishi et al., 2016).

Hepariny s velmi nízkou molekulovou hmotností (ULMWH), tedy hepariny o průměrné molekulové hmotnosti pod 3 kDa, téměř vůbec neinhibují trombin a podílí se pouze na inhibici FXa (Liu et al., 2014). Do této skupiny patří například přípravek Fondaparinux, který vykazuje lepší farmakokinetické vlastnosti než LMWH, zejména vyšší biodostupnost, a může být použit i u pacientů s alergií na heparin (Hannon & Lamont, 2012; Kavut & Koca, 2012). Nevýhodou je vysoká cena a fakt, že neexistuje antidotum (Liu et al., 2014; Onishi et al., 2016).

Stejně jako o ostatních antikoagulantech je i u léčby hepariny hlavním nežádoucím účinkem zvýšené riziko krvácení. Může dojít, ale také k trombóze (Onishi et al., 2016). Heparin cirkulující v krvi může vázat destičkový faktor 4, což způsobí konformační změnu a umožní tvorbu protilátek proti tomuto komplexu. Vytvořené protilátky poté aktivují trombocyty (Reilly, 2003). Aktivované trombocyty se shlukují a může dojít ke spuštění koagulační kaskády a vytvoření trombu (Ahmed et al., 2007). I když k vytvoření trombu nedojde, je daný stav nebezpečný. Shluky trombocytů jsou odstraňovány z krve retikulo-endoteliálním systémem, což má za následek pokles počtu krevních destiček v krvi až o 50 %. Tento stav se označuje jako heparinem indukovaná trombocytopenie (Chong, 2003; Škorňová & Slavík, 2021). Dále mohou hepariny, hlavně UFH, způsobovat osteoporózu při dlouhodobé léčbě, protože je snížena diferenciace a funkce osteoblastů, což zabraňuje tvorbě nové kostní tkáně (Rajgopal et al., 2008).

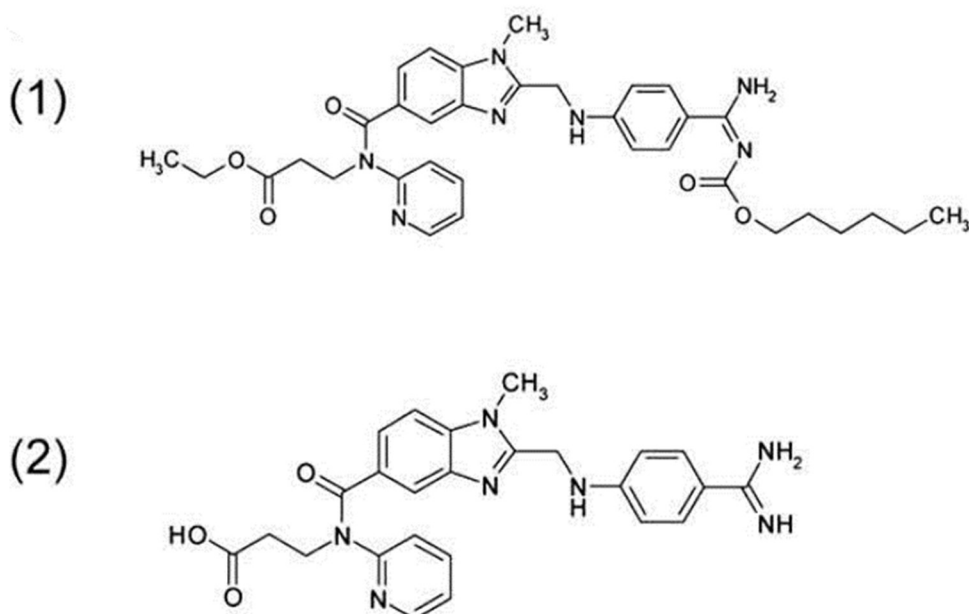
2.3.2.3 Přímé inhibitory trombinu

První přímý inhibitor trombinu schválený pro klinické použití byl hirudin. Původně byl izolován z pijavice *Hirudo medicinalis*, dnes je produkován kvasinkami jako rekombinantní protein. Hirudin se používá při léčbě heparinem indukované trombocytopenie a při prevenci trombotických stavů po ortopedických operacích (Eriksson et al., 1997; Greinacher & Warkentin, 2008). Vazba hirudinu na trombin není ovlivněna přítomností substrátu v aktivním místě trombinu. Při této vazbě vzniká komplex s velmi nízkou disociační konstantou a může tedy být označen za prakticky ireverzibilní. Trombin v tomto komplexu má sníženou schopnost štěpit fibrinogen a také sníženou schopnost aktivovat FV, čímž je zpomalena také tvorba protrombinasového komplexu (Stone & Hofsteenge, 1986; Fenton II et al., 1991).

Největší nevýhodou léčby hirudinem je riziko krvácení. Toto riziko nezávisí na věku nebo na pohlaví, ale závisí na funkci ledvin u jednotlivých pacientů (Lubenow et al., 2005). U pacientů s poškozením ledvin dochází k pomalejšímu odbourávání hirudinu

a zvyšuje se tak jeho biologická dostupnost, což má za následek zvýšené riziko krvácení. U takovýchto pacientů je velmi obtížné určit vhodnou dávku hirudinu (van Aken et al., 2001; Greinacher & Warkentin, 2008). Při menším krvácení je ve většině případů dostatečným zastavením podávání hirudinu, ale v případě, kdy je krvácení život ohrožující tento přístup nestačí. Proti hirudinu neexistuje antidotum, které by ho specificky inaktivovalo, a proto se používají nesespecifické metody jako hemodialýza a hemofiltrace, které mohou snížit koncentraci hirudinu v krvi. Účinnost těchto metod je velmi variabilní a záleží na použitých filtrech (Bucha et al., 1999; Frank et al., 1999; Greinacher & Warkentin, 2008). V nouzových situacích je použití těchto metod omezené (Greinacher & Warkentin, 2008). Místo hirudinu může být pro léčbu použit jeho semisyntetický fragment Bivalirudin, také nazývaný Hirulog, který na rozdíl od hirudinu tvoří s trombinem pouze přechodný komplex, čímž se snižuje riziko nadměrného krvácení při používání tohoto léčiva (Witting et al., 1992; Weitz & Hirsh, 1998). Dalším problémem hirudinu je jeho imunogenita. U většiny pacientů opakovaně vystavených hirudinu se vyvinuly antihirudinové protilátky. Tyto protilátky nezpůsobují alergické reakce, ale mohou vázat hirudin a snižovat jeho účinnost nebo naopak zpomalovat jeho odbourávání, což dále komplikuje léčbu (Huhle et al., 1999; Huhle et al., 2001).

Mezi přímé inhibitory trombinu patří také Dabigatran, používaný jako léčivo pod názvem Pradaxa. V léčivu je ve formě Dabigatran-etexilátu (Obr. 6), který je v těle hydrolyzován na aktivní Dabigatran a poté na čtyři různé acylglukuronidy. Jak Dabigatran, tak jeho glukuronidy mají schopnost specificky inhibovat volný trombin i trombin vázaný v krevní sraženině (Hussar & Zimmerman, 2011). Dabigatran byl schválen v USA Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration, FDA) v roce 2010 jako první z DOACs. Je používán pro snižování rizika CMP a také pro léčbu a prevenci HŽT a PE (Biswas et al., 2023). Kontraindikací pro léčbu Dabigatranem je snížená funkce ledvin. Užívání antikoagulačních léčiv s sebou vždy nese zvýšené riziko krvácení, v případě Dabigatranu je zejména zvýšené riziko krvácení do gastrointestinálního systému (Pollack et al., 2017). Proti Dabigatranu existuje specifická protilátka Idarucizumab, která má schopnost zvrátit jeho účinek. Je to první a zatím jediné dostupné specifické antidotum pro Dabigatran (Galliazzo et al., 2018). V České a Slovenské republice je k dispozici od roku 2016 (Václavík, 2016; Škorňová & Slavík, 2021). Jedná se o monoklonální humanizovanou myší protilátku, která napodobuje strukturu trombinu. Afinita Dabigatranu k Idarucizumabu je až 350krát větší než afinita Dabigatranu k trombinu. Po vazbě dabigatranu na strukturu protilátky jsou



Obr. 6: Proléčivo Dabigatran etexilát (1) a jeho aktivní forma Dabigatran (2). Převzato od Schiele et al., 2013.

vzniklé komplexy vyloučeny ledvinami. Idarucizumab neváže žádné jiné substráty trombinu a tím se ani neúčastní agregace krevních destiček. Při absenci Dabigatranu nemá Idarucizumab žádný vliv na koagulaci (Schiele et al., 2013; Glund et al., 2017; Galliazzo et al., 2018).

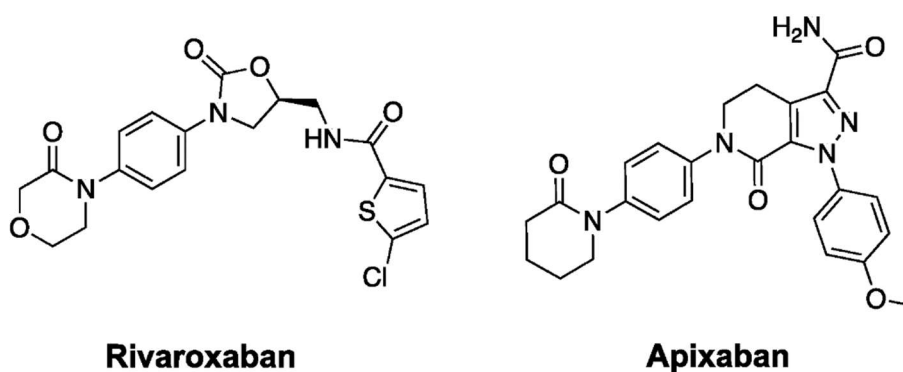
2.3.2.4 Přímé inhibitory FXa

Jinou strategií při snaze snížit srážení krve je cílení na FXa namísto trombinu, protože tvorba FXa je rychlost limitujícím faktorem při generaci trombinu a zároveň se u FXa sbíhá zevní i vnitřní cesta aktivace hemostázy (Rand et al., 1996; Samama, 2011). Byly vyvinuty léčiva jako Rivaroxaban a Apixaban, které inhibují FXa přímo, a také léčiva jako Fondaparinux, které účinkují nepřímo (Samama, 2011).

Rivaroxaban (Obr. 7), obsažený v léčivu nazvaném Xarelto, je další ze zástupců DOACs. Byl schválen FDA v roce 2011 pro použití u pacientů podstupující operaci kloubů, o rok později bylo jeho použití rozšířeno a dnes je využíván pro stejné účely jako Dabigatran. Podobná látka Apixaban (Obr. 7), s obchodním názvem Eliquis, byla schválena FDA v roce 2012 také pro stejné použití (Biswas et al., 2023). Zda je výhodnější použití Rivaroxabanu nebo Apixabanu při léčbě žilní trombózy porovnávala studie, kterou vypracovali Fukasawa et al. (2022). Po dobu 180 dnů sledovali skupinu 6 959 pacientů hospitalizovaných s HŽT a/nebo PE, kteří byli následně léčeni Rivaroxabanem, Apixabanem nebo Edoxabanem. Byl sledován případný výskyt krvácení

nebo opakujících se trombotických komplikací. V této studii nebyl pozorován žádný zásadní rozdíl v efektivitě a bezpečnosti těchto tří léků.

Pro cílené zvrácení účinku Rivaroxabanu a Apixabanu při život ohrožujícím krvácení je používána látka Andexanet alfa, v EU známá pod obchodním názvem Ondexxya, v USA pod názvem Andexxa (Škorňová & Slavík, 2021; Brinkman et al., 2022). V České republice je k dispozici od roku 2019 (Kvasnička, 2020). Jde o rekombinantní lidský FXa, jehož struktura obsahuje dvě hlavní změny oproti obvyklému FXa. První je odstranění domény bohaté na γ -karboxyglutamovou kyselinu, což zabraňuje tvorbě protrombinasového komplexu s FVa a následné generaci trombinu. Druhou změnou je mutace aktivního místa, konkrétně záměna serinu v katalytické triádě za alanin, která zajišťuje že Andexanet alfa není katalyticky aktivní. I přes tyto změny si tento rekombinantní FXa zachoval schopnost vázat léčiva inhibující FXa (Lu et al., 2013). Andexanet alfa kompetuje s přirozeně se vyskytujícím se FXa o vazbu na léčivo a snižuje tak koncentraci dostupného léčiva v krvi (Brinkman et al., 2022). Kromě Andexanet alfa lze pro léčbu krvácení také intravenózně podat PCC, který může být použit u všech DOACs (Biswas et al., 2023). Rozdíl mezi Andexanet alfa a PCC při zastavování krvácení u pacientů užívajících Rivaroxaban nebo Apixaban byl sledován v následujících dvou statistických analýzách. Jaspers et al. (2021) a Nederpelt et al. (2021) porovnávali efektivitu těchto dvou léčiv a zároveň sledovali výskyt trombotických komplikací po léčbě. Celkem analyzovali 42 již dříve publikovaných studií na toto téma. Obě analýzy shodně uvádějí mírně vyšší efektivitu PCC a častější tromboembolické komplikace při použití Andexanet alfa. Právě teď také probíhá kontrolovaná klinická studie, která má za cíl zhodnotit účinnost a bezpečnost Andexanet alfa oproti běžné léčbě u pacientů s intrakraniálním krvácením, kteří užívají inhibitory FXa. Běžná léčba dle definice v této



Obr. 7: Léčiva patřící mezi přímá perorální antikoagulantia – Rivaroxaban a Apixaban. Převzato od Santana-Romo et al., 2020.

studii zahrnuje jakoukoliv léčbu, která je uznána za vhodnou, kromě podání Andexanet alfa. Studie by měla být dokončena v roce 2024 (ClinicalTrials.gov, 2023).

2.4 Laboratorní vyšetření hemostázy

Základní screeningové testy používané pro vyšetření hemostázy jsou APTT, PT a TT. Podle výsledků těchto testů je rozhodnuto o dalším postupu a o provedení specifických testů pro stanovení aktivity jednotlivých koagulačních faktorů (Tab. 1) (Škorňová & Slavík, 2021).

Před samotným provedením jednotlivých laboratorních testů je důležité věnovat pozornost preanalytické fázi, která má zásadní vliv na výsledek testů. Tato fáze zahrnuje přípravu pacienta na odběr, samotný průběh odběru a transport, zpracování a skladování vzorku. Chyby v této fázi se poté přenášejí do samotného měření a způsobují nesprávnost výsledků. Správné postupy jsou uvedeny v dokumentech Institutu pro klinické a laboratorní standardy (Škorňová & Slavík, 2021).

2.4.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas

Toto vyšetření, také nazýváno aktivovaný parciální tromboplastinový test, slouží k monitorování vnitřní cesty aktivace koagulační kaskády, která začíná aktivací FXII. Je tedy možné detekovat deficienci FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, trombinu a fibrinogenu. Tato metoda nese také historický název doba srážení kaolin-cefalin podle prvních látek používaných pro iniciaci srážení. V dnešní době je jako iniciátor používána látka s negativně nabitým povrchem, například oxid křemičitý nebo elagová kyselina, a syntetické PH podobné PH na povrchu trombocytů. Pro umožnění srážení je také nutné dodat vápenaté ionty. Tyto reagenty se přidávají do citrátové plasmy inkubované při 37 °C a měří se čas do vzniku fibrinového vlákna (Levy et al., 2014; Škorňová & Slavík, 2021).

Výsledky APTT jsou uváděny buď v sekundách nebo jako poměr naměřeného času ke koagulačnímu času normální plasmy. Referenční časový interval normální plasmy se liší mezi jednotlivými laboratořemi a závisí na použitých reagentech a přístrojích (Škorňová & Slavík, 2021). I ve zdravé populaci je hodnota APTT variabilní, což způsobuje, že referenční intervaly bývají široké. APTT může být prodloužený z důvodu užívání antikoagulačních léčiv jako jsou DOACs a hepariny, při deficienci již výše zmíněných faktorů nebo při zvýšené aktivitě FVIII (Škorňová & Slavík, 2021).

Tab. 1: Interpretace výsledků laboratorních testů. Převzato od Leonardi, 2019.

Výsledek vyšetření			Možné ovlivněné koagulační faktory	Další možné příčiny
PT*	APTT†	TT‡		
Prodloužený	Normální	Normální	FVII	
Normální	Prodloužený	Normální	FVIII, FIX, FXI, FXII	Lupus antikoagulans Von Willebrandova choroba
Prodloužený	Prodloužený	Normální	FII, FV, FX	Onemocnění jater Nedostatek vitamínu K
Prodloužený	Prodloužený	Prodloužený	FI (fibrinogen)	Onemocnění jater
Normální	Normální	Normální	FXIII	Porucha funkce trombocytů Nadměrná fibrinolýza Von Willebrandova choroba

* PT – protrombinový čas

† APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas

‡ TT – trombinový čas

2.4.2 Protrombinový čas

PT, také nazýván protrombinový test, je nejběžnějším laboratorním koagulačním testem. Byl vypracován v roce 1935 Armandem J. Quickem a díky němu bývá také označován jako Quickův test (Quick et al., 1935; Škorňová & Slavík, 2021). Kromě tohoto názvu bývá také označován jako tromboplastinový test/čas podle reagentie používané k zahájení srážení. Princip PT je velmi podobný APTT. Spočívá v přidání TF (tromboplastinu) a vápenatých iontů do citrátové plasmy a měření času do vytvoření fibrinového vlákna. Pro test může být použit tkáňový tromboplastin izolovaný z lidské placenty nebo rekombinantní tromboplastin obsahující také vápenaté ionty a PH. Při PT je aktivována zevní dráha koagulace, je tedy možné detekovat deficienci FV, FVII, FX, trombinu a fibrinogenu (Škorňová & Slavík, 2021).

U pacientů, kteří nejsou léčeni warfarinem, se výsledky obvykle uvádí jako poměr koagulačního času pacienta a normální plasmy, tedy stejně jako u APTT. Tento výsledek by měl spadat do intervalu 0,8-1,2. U pacientů léčených warfarinem jsou výsledky PT nejčastěji uváděny jako mezinárodní normalizovaný poměr (international normalized ratio, INR). INR byl zaveden proto, aby bylo možné porovnávat výsledky z různých laboratoří při monitorování warfarinové terapie. Kromě PT pacienta a PT normální plasmy, zohledňuje také mezinárodní index citlivosti (international sensitivity index, ISI)

použitého tromboplastinu při konkrétním testu v dané laboratoři. ISI udává míru odpovědi dané reagentie na snížení koncentrace VK-dependentních koagulačních faktorů a závisí především na zdroji tromboplastinu a složení PH. ISI je uváděn výrobcem na každé šarži tromboplastinu (Hoffman et al., 2018; Škorňová & Slavík, 2021).

2.4.3 Trombinový čas

Trombinový čas/test je založený na přidání nadbytku trombinu do citrátové plasmy a měření času do vytvoření fibrinové sraženiny. Používá se hovězí trombin s přidávkem hovězího albuminu nebo lidský trombin. Trombin se poté zředí pufrům obsahujícím chlorid vápenatý na potřebnou koncentraci pro screeningový test nebo na vyšší koncentraci používanou při monitorování léčby heparinem (Škorňová & Slavík, 2021).

Stejně jako u APTT a PT se výsledky TT vyjadřují v sekundách nebo poměrem k normální plasmě (Škorňová & Slavík, 2021). Prodloužený TT může způsobit snížená hladina fibrinogenu v plasmě, abnormální funkce fibrinogenu nebo přítomnost inhibitoru trombinu. Vliv mají také látky interferující s polymerizací fibrinogenu, což může být zvýšená koncentrace produktů degradace fibrinu, paraproteiny nebo valproová kyselina, používaná na léčbu epilepsie (Chou et al., 2008; Hayward & Moffat, 2013; Hoffman et al., 2018). Paraproteiny jsou monoklonální imunoglobuliny produkované nekontrolovatelně proliferujícími klony B-lymfocytů. Jejich přítomnost v plasmě se nemusí projevit žádnými příznaky nebo může způsobovat abnormality při srážení krve jako například hyperviskózní syndrom (Maniatis, 2009).

2.5 Trombin generační test

Tato laboratorní metoda patří mezi globální testy hemostázy. Mimo TGA do této skupiny spadá také tromboelastografie založená na měření viskoelastických vlastností koagula v průběhu srážení krve. Její vylepšenou formou je rotační tromboelastometrie, kde jsou mechanické vlastnosti zaznamenávány pomocí oscilujícího trnu v kyvetě. Globální testy jsou složitější než základní screeningové, ale dávají komplexnější výsledky lépe vypovídající o stavu hemostázy *in vivo* (Škorňová & Slavík, 2021).

2.5.1 Princip

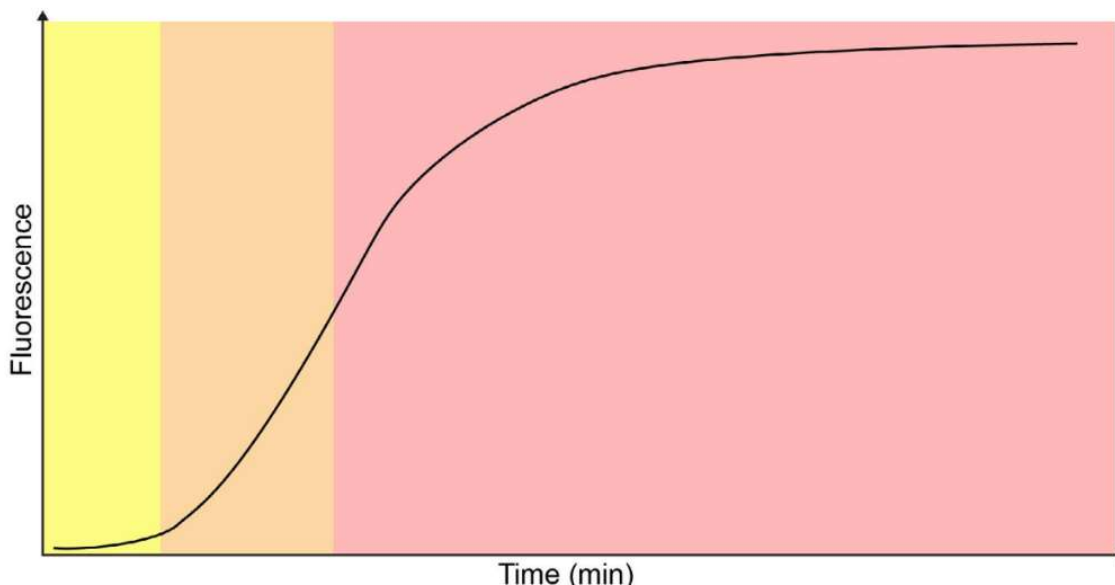
TGA je koagulační test založený na měření kinetiky generace trombinu. Umožňuje sledování prokoagulačních a antikoagulačních komponentů hemostázy zároveň. Generace trombinu je spuštěna přidáním TF a okamžitě se také spouští její přirozená inhibice. Vzniklý trombin poté reaguje s trombin-specifickým substrátem, nejčastěji

fluorogenním. V iniciační fázi dochází ke spuštění koagulace, je generováno malé množství trombinu a generace je téměř okamžitě inhibována. Detekovaná fluorescence je nízká. V zesilovací/propagační fázi je generace trombinu vyšší než jeho inhibice a fluorescence roste. Ve třetí konečné fázi dochází k úplné inhibici generace trombinu díky jeho přirozeným inhibitorům v plasmě. Fluorescence se zde příliš nemění (Duarte et al., 2017; Depasse et al., 2021). Závislost fluorescence na čase (Obr. 8) je následně zderivována a porovnána kalibrační křivkou a tím je získán trombogram (Obr. 9) popisující závislost koncentrace trombinu na čase. V tomto grafu jsou důležité parametry:

- Lag fáze – čas od spuštění měření do vytvoření prvního zaznamatelného množství trombinu vyjádřený v minutách
- Maximální koncentrace trombinu (C_{MAX}) – vyjádřená v $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$
- Čas do dosažení maximální koncentrace trombinu (T_{MAX}) – vyjádřený v minutách
- Čas do skončení generace trombinu – čas, kdy byl všechen vytvořený trombin inhibován, vyjádřený v minutách
- Rychlostní index (RI) – sklon křivky v úseku od lag fáze do času dosažení maximální koncentrace trombinu
- Plocha pod křivkou – celkové generované množství trombinu, také endogenní trombinový potenciál (ETP) (Hluší et al., 2010b; Tripodi, 2016; Depasse et al., 2021)

2.5.2 Analyt

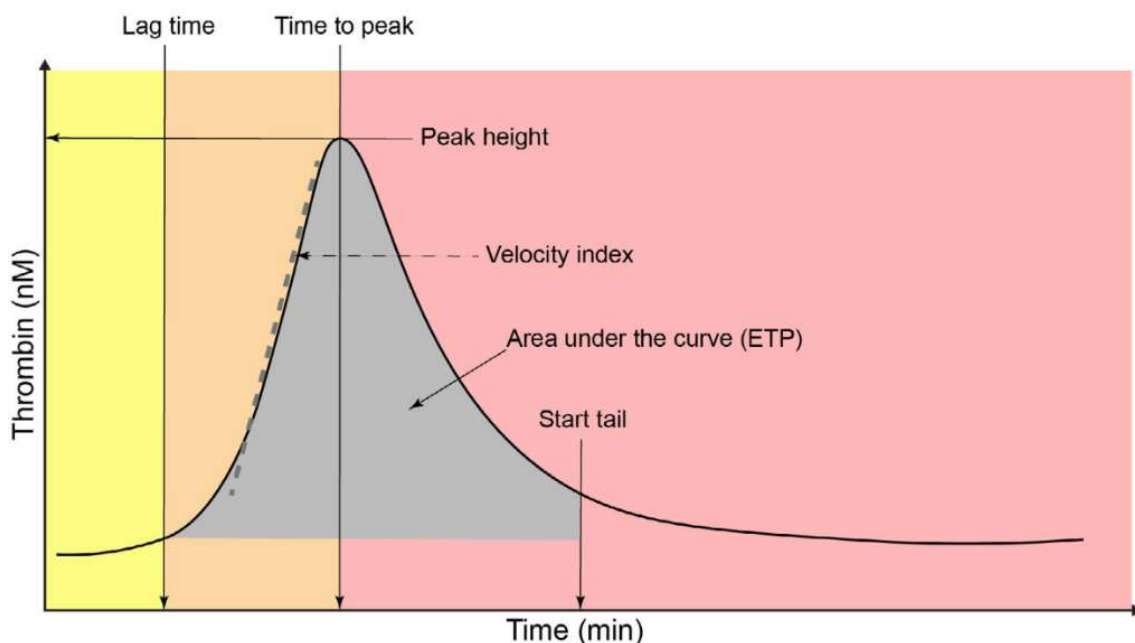
Pro TGA může být použita plná krev, plasma s destičkami nebo bezdestičková plasma, ale pro každý z těchto analytů je nutné použít jiné reagentie nebo přístroje. Nejvíce propracovaná je metoda používající plasmu bez trombocytů (Al Dieri et al., 2012; Prior et al., 2018; Depasse et al., 2021). Podmínky, které by měly být dodrženy při odběru vzorku a provádění TGA jsou uvedeny v dokumentu vydaném ISTH v roce 2017. Tyto podmínky zahrnují použití citrátu jako antikoagulačního činidla po odběru vzorku (Dargaud et al., 2017). Loeffen et al. (2012) doporučuje ještě přidání kukuřičného inhibitoru trombinu do odběrové zkumavky, aby bylo úplně zabráněno aktivaci koagulace kontaktní cestou, což by mohlo ovlivnit výsledky TGA zvláště, pokud by byla při měření použita nízká koncentrace TF (Spronk et al., 2017). Bohužel odběrové zkumavky obsahující citrát a kukuřičný inhibitor trombinu nejsou komerčně dostupné a musely by být připravovány přímo v laboratoři, což je finančně náročné a může být zdrojem chyb (Depasse et al., 2021).



Obr. 8: Závislost fluorescence na čase při trombin generačním testu (žlutá – iniciační fáze, oranžová – zesilovací/propagační fáze, červená – konečná fáze). Převzato od Depasse et al., 2021.

2.5.3 Reagencie

Pro iniciaci srážení se nejčastěji používá TF a Ca^{2+} ionty, popřípadě také PH. Tyto reagencie jsou stejné jako reagencie používané pro APTT, ale v mnohonásobně menší koncentraci, což činí TGA citlivější k malým odchylkám v hemostáze (Tripodi, 2016). Použité reagencie jsou hlavním zdrojem variability výsledků při srovnávání různých laboratoří (Depasse et al., 2021). Koncentrace TF a PH závisí na typu vzorku a charakteru prováděného vyšetření (Hluší et al., 2010a). Nízká koncentrace TF ($0,4 - 2 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a PH ($0,4 - 4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) je využívána pro detekci deficiencie FVIII a FXI, způsobující hemofilii, a pro monitorování léčby této nemoci (Škorňová & Slavík, 2021; Váradí et al., 2003; Depasse et al., 2021). Vysoká koncentrace TF ($5 - 40 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v kombinaci s nízkou koncentrací PH umožňuje lepší detekci trombotických onemocnění jako je HŽT a také je vhodná pro studium faktorů přispívajících k trombotickým komplikacím (Depasse et al., 2021). Vysoká koncentrace TF ($20-50 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$) i PH ($4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) se používá pro monitorování antikoagulační léčby warfarinem nebo DOACs. Při experimentálních studiích bylo také popsáno přidání trombomodulinu do reakční směsi pro pozorování aktivity APC v plasmě, aktivace koagulace kontaktní cestou pomocí kyseliny elagové nebo celkové vynechání TF, kdy koagulace byla aktivována pouze mikročásticemi (Ogiwara et al., 2020; Depasse et al., 2021).



Obr. 9: Parametry trombin generační křivky – trombogramu (Lag time – lag fáze, Peak height – C_{MAX} , Time to peak – T_{MAX} , Velocity index – rychlostní index, Area under the curve – plocha pod křivkou vyjadřující endogenní trombinový potenciál, Start tail – čas do skončení generace trombinu, žlutá – iniciační fáze, oranžová – zesilovací/propagační fáze, červená – konečná fáze). Převzato od Depasse et al., 2021.

2.5.4 Detekce trombinu

Původní provedení TGA vypracované Hemker et al. (1993) zahrnovalo detekci vznikajícího trombinu pomocí chromogenního substrátu. Použití chromogenního substrátu vyžadovalo odstranění fibrinu ze vzorku nebo přidání inhibitoru polymerizace fibrinu. Měření mohla být také pouze plasma bez destiček. Tato metoda již není komerčně dostupná a místo chromogenního substrátu se dnes využívá fluorogenního karboxybenzyl-glycyl-glycyl-arginyl-7-aminomethyl-4-kumarinu (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Po štěpení trombinem se uvolní molekula 7-amino-4-methylkumarin (AMC), která je ozářena světlem o vlnové délce 390 nm a poté emituje záření o vlnové délce 460 nm, které je zaznamenáno detektorem (Depasse et al., 2021).

2.5.5 Přístrojové vybavení

Po zahájení srážení je možné provádět měření ručně odebíráním vzorků reakční směsi v pravidelných časových intervalech (Tripodi, 2016). Mnohem rychlejší měření umožňují automatické analyzátoři. Jejich výhodou je přesnější pipetování, vyšší optické rozlišení a možnost lepší kontroly teploty reakční směsi a reagentů, což je nutné pro správné výsledky TGA (Depasse et al., 2021).

Kalibrace přístroje se provádí proměřením vzorků obsahujících stabilizovaný trombin o známé koncentraci. Sestavením kalibrační křivky je možné dát do lineární závislosti naměřené referenční fluorescenční jednotky (RFU) a koncentraci trombinu uváděnou nejčastěji v $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Hluší et al., 2010b).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

- Ceveron® TGA CAL Set (katalogové číslo 5006347, Technoclone – Vienna, Austria)
 - Ceveron® TGA CAL – 1,000 nmol·l⁻¹ trombin, pufr, hovězí sérový albumin
 - Ceveron® TGA CAL BUF – pufr Hepes-NaCl
- Ceveron® TGA RC Low Kit (katalogové číslo 5006013, Technoclone – Vienna, Austria)
 - Ceveron® TGA RC Low – rekombinantní lidský TF, nízká koncentrace fosfolipidových micel, Tris-Hepes-NaCl pufr
 - Ceveron® TGA BUF – Tris-Hepes-NaCl pufr
 - Ceveron® TGA SUB – 1 mmol·l⁻¹ fluorogenní substrát Z-G-G-R-AMC
 - Ceveron® TGA CONT H – vysoká kontrola (HC) – lidská plasma se zvýšenou schopností generovat trombin
 - Ceveron® TGA CONT L – nízká kontrola (LC) – lidská plasma se sníženou schopností generovat trombin
 - Roztok CaCl₂ (25 mmol·l⁻¹)
- Coagulation Control A (katalogové číslo 5021060, Technoclone – Vienna, Austria) – abnormální kontrola (AC) – lidská plasma se sníženým množstvím koagulačních faktorů
- Coagulation Control N (katalogové číslo 5020050, Technoclone – Vienna, Austria) – normální kontrola (NC) – lidská plasma s průměrným obsahem všech koagulačních faktorů
- HemosIL Direct Thrombin Inhibitor Assay Kit – Dabigatran Calibrators (katalogové číslo 0020013400, Werfen, Instrumentation Laboratory Company – Milan, Italy)
 - Dabigatran Calibrator 1 (0 ng·ml⁻¹) – plasma pro vytvoření kalibrační křivky
 - Dabigatran Calibrator 2 (~500 ng·ml⁻¹) – plasma obsahující Dabigatran pro vytvoření kalibrační křivky
- HemosIL Direct Thrombin Inhibitor Assay Kit – Dabigatran Controls (katalogové číslo 0020013500, Werfen, Instrumentation Laboratory Company – Milan, Italy)

- Dabigatran Low Control ($\sim 50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – nízká kontrola – plasma obsahující Dabigatran o přibližné koncentraci $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, pufr a stabilizátor
- Dabigatran High Control ($\sim 250 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – vysoká kontrola – plasma obsahující Dabigatran o přibližné koncentraci $250 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, pufr a stabilizátor
- HemosIL Liquid Anti-Xa Assay Kit – Apixaban Calibrators (katalogové číslo 0020014200, Werfen, Instrumentation Laboratory Company – Milan, Italy)
 - Apixaban Calibrator 1 ($0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – plasma pro vytvoření kalibrační křivky
 - Apixaban Calibrator 2 ($\sim 500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – plasma obsahující Apixaban pro vytvoření kalibrační křivky
- HemosIL Liquid Anti-Xa Assay Kit – Apixaban Controls (katalogové číslo 0020014300, Werfen, Instrumentation Laboratory Company – Milan, Italy)
 - Apixaban Low Control ($\sim 80 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – nízká kontrola – plasma obsahující Apixaban o přibližné koncentraci $80 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, pufr a stabilizátor
 - Apixaban High Control ($\sim 300 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – vysoká kontrola – plasma obsahující Apixaban o přibližné koncentraci $300 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, pufr a stabilizátor
- HemosIL Liquid Anti-Xa Assay Kit – Rivaroxaban Calibrators (katalogové číslo 0020013600, Werfen, Instrumentation Laboratory Company – Milan, Italy)
 - Rivaroxaban Calibrator 1 ($0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – plasma pro vytvoření kalibrační křivky
 - Rivaroxaban Calibrator 2 ($\sim 500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – plasma obsahující Rivaroxaban pro vytvoření kalibrační křivky
- HemosIL Liquid Anti-Xa Assay Kit – Rivaroxaban Controls (katalogové číslo 0020013700, Werfen, Instrumentation Laboratory Company – Milan, Italy)
 - Rivaroxaban Low Control ($\sim 80 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – nízká kontrola – plasma obsahující Rivaroxaban o přibližné koncentraci ng/ml , pufr a stabilizátor
 - Rivaroxaban High Control ($\sim 300 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) – vysoká kontrola – plasma obsahující Rivaroxaban o přibližné koncentraci ng/ml , pufr a stabilizátor

- HemosIL RecombiPlasTin 2G (katalogové číslo 0020003050, Werfen, Instrumentation Laboratory Company – Milan, Italy) – rekombinantní lidský TF, syntetické PH, CaCl₂, pufr, stabilizátor

3.2 Přístrojové vybavení

- Automatické pipety Eppendorf Research Plus (Eppendorf – Hamburg, Germany)
- Automatické mikropipety ACURA 825 (Socorex – Ecublens, Switzerland)
- Automatický koagulometr Ceveron® alpha (výrobní číslo 100 04/9820010/, Technoclone – Vienna, Austria)
- Laboratorní chladnička (výrobní číslo 818459557, Liebherr – Bulle, Switzerland)
- Laboratorní mraznička (výrobní číslo 828520063, Liebherr – Bulle, Switzerland)

3.3 Metody

Měření TGA bylo prováděno na plně automatickém koagulačním analyzátoru Ceveron® alpha (Obr. 10) a byly použity reagentie z kitu Ceveron® TGA RC Low Kit. Tento kit se používá při měření trombofilních stavů. Pro vyšetření se používá citrátová bezdestičková plasma. Nízká koncentrace fosfolipidových micel zajišťuje, že dochází především ke spuštění vnější cesty aktivace koagulační kaskády (Technoclone, 2018).



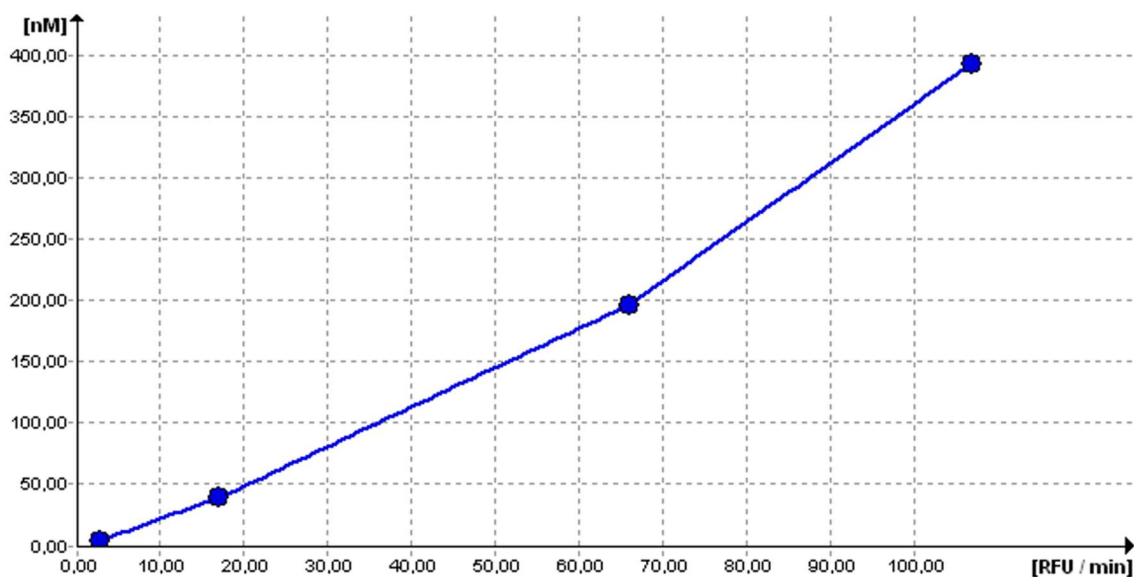
Obr. 10: Automatický koagulační analyzátor Ceveron® alpha. Převzato od Technoclone, 2007.

Přístroj Ceveron® alpha umožňuje provádět nejen rutinní koagulační testy, ale také chromogenní a turbidimetrická měření. Díky speciálnímu fluorescenčnímu modulu je také schopen zaznamenávat fluorescenční signál, čehož je využíváno právě při měření TGA. Dále přístroj vybaven čtečkou čárových kódů, termostatovaným prostorem pro reagentie a rotory se vzorky a kyvetami. Pipetování je prováděno automaticky pomocí dvou pipetovacích jehel (Technoclone, 2007).

V základním provedení TGA je 40 µl vzorku napipetováno do kyvety. Následně je přidáno 20 µl pufru Ceveron® TGA BUF, 15 µl Ceveron® TGA RC Low a 40 µl Ceveron® TGA SUB. Generace trombinu je iniciována přidáním 35 µl roztoku CaCl₂ a jeho množství je detekováno pomocí reakce trombinu s fluorogenním Z-Gly-Gly-Arg-AMC. Volný AMC v reakční směsi je excitován světlem o vlnové délce 360 nm a následně emituje záření. Toto záření prochází přes filtr ve fluorescenčním modulu, který propouští pouze danou měřenou vlnovou délku (v tomto případě 460 nm), a dopadá na fotodiodu. Měření fluorescence je takto prováděno po dobu 0,5 s každou minutu. Celková doba měření je 45 minut. Pokud do této doby nedojde k ukončení generace trombinu, je měření prodlouženo na celkovou dobu 120 minut. Naměřená data jsou poté zpracována pomocí specializovaného softwaru, který sestrojí příslušné trombin generační křivky. Ze získaných trombin generačních křivek jsou dále vyhodnocovány parametry: délka lag fáze, T_{MAX}, C_{MAX}, ETP a RI. Najednou je takto přístroj schopen změřit přibližně 50 vzorků. (Technoclone, 2015).

3.4 Kalibrace

Kalibrace přístroje se provádí proměřením vzorků obsahujících stabilizovaný trombin o známé koncentraci. Pro kalibraci byl použit Ceveron® TGA CAL Set. Rozpuštěním reagentie Ceveron® TGA CAL v příslušném objemu pufru Ceveron® TGA CAL BUF, vznikl roztok trombinu o koncentraci 392,5 nmol·l⁻¹, který byl následně napipetován do první kyvety. Tento roztok byl poté naředěn do dalších tří kyvet v poměru 1:2, 1:10 a 1:100, čímž vznikly koncentrace 196,25; 39,25 a 3,92 nmol·l⁻¹. Ke vzorkům v kyvetách byl přidán Ceveron® TGA SUB a byla změřena fluorescence AMC. Množství fluorescence je vyjadřováno jako RFU. Korelací RFU·min⁻¹ a koncentrace trombinu v příslušném vzorku byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 11). Tato kalibrační křivka byla poté použita k určení aktuální koncentrace trombinu ve vzorcích při všech dalších měřeních.



Obr. 11: Kalibrační křivka sestavená při provádění kalibrace automatického koagulometru Ceveron® alpha (RFU - referenční fluorescenční jednotky).

3.5 Vlastní měření

3.5.1 Příprava vzorků a reagií

Všechny vzorky a reagentie pro TGA byly rozpuštěny v objemu destilované vody uvedeném na lahvičce a následně byly důkladně promíchány při laboratorní teplotě. Lahvičky s reagentii byly vloženy na příslušné místo v automatickém koagulometru.

3.5.2 Měření s různými koncentracemi tkáňového faktoru a fosfolipidů

V této první části měření byly jako vzorky používány kontroly Ceveron® TGA CONT H, Ceveron® TGA CONT L, Coagulation Control N a Coagulation Control A. Měření bylo prováděno podle již výše popsaného základního pipetovacího schématu s tím rozdílem, že byly používány různé koncentrace reagentie Ceveron® TGA RC Low. Přestože přesné koncentrace TF a PH v tomto činidle nejsou výrobcem uváděny, bylo na základě článku od Depasse et al. (2021) předpokládáno, že původní koncentrace TF v této reagentii byla $40 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a původní koncentrace PH byla $4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Z Ceveron® TGA RC Low bylo připraveno dalších osm koncentrací (Tab. 2) a tyto koncentrace spolu s původní byly použity pro provedení TGA. Finální koncentrace TF a PH v reakční směsi jsou vždy 10x menší vzhledem k tomu, že do reakční směsi je dle základního schématu pipetováno $15 \text{ } \mu\text{l}$ a celkový objem reakční směsi je $150 \text{ } \mu\text{l}$. Celkem bylo provedeno 36 měření.

Tab. 2: Koncentrace tkáňového faktoru (TF) a fosfolipidů (PH) použité pro TGA v první části měření

Zředění	Koncentrace TF ($\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$)		Koncentrace PH ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	
	V činidle	V reakční směsi	V činidle	V reakční směsi
žádné	40,00	4,00	4,00	0,40
1,5x	26,67	2,67	2,67	0,27
3x	13,33	1,33	1,33	0,13
10x	4,00	0,40	0,40	0,04
15x	2,67	0,27	0,27	0,03
30x	1,33	0,13	0,13	0,01
100x	0,40	0,04	0,04	0,004
150x	0,27	0,03	0,03	0,003
300x	0,13	0,01	0,01	0,001

3.5.3 Měření s HemosIL RecombiPlasTin 2G

V druhé části měření byla reagencie Ceveron® TGA RC Low nahrazena reagencí HemosIL RecombiPlasTin 2G. Jedná se o rekombinantní lidský TF od jiného výrobce určený pro stanovení PT a fibrinogenu metodou odvozenou od PT. Výrobce neuvádí koncentraci tkáňového faktoru v činidle, uvádí pouze očekávané výsledky PT při měření normální plasmy (Tab. 3) (Werfen, 2017). Podle měření Yau et al. (2011) je v reagencii HemosIL RecombiPlasTin koncentrace TF $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Reagencie HemosIL RecombiPlasTin byla v roce 2007 nahrazena reagencí HemosIL RecombiPlasTin 2G. V této reagencii byl změněn poměr fosfolipidů, aby se snížila interference antibiotické látky Daptomycinu s hemostatickými testy. (FDA, 2007) Bylo tedy předpokládáno, že koncentrace TF zůstala stejná jako u reagencie HemosIL RecombiPlasTin. Pokud budeme uvažovat, že TF má velikost 47 kDa, odpovídá $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ koncentraci $6,4 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Han et al., 2014). Pro měření na čtyřech kontrolách (stejných jako v první části) byly použity různé koncentrace tohoto činidla (Tab. 4). Celkem bylo takto provedeno 20 měření.

Tab. 3: Očekávané výsledky uváděné výrobcem při měření normální plasmy za použití HemosIL RecombiPlasTin 2G na různých automatických koagulometrech. Převzato od Werfen, 2017.

Test	Systém	Rozsah hodnot (s)
PT*	ACL Classic (100-7000)	8,0 – 10,8
PT*	ACL 8/9/10000/Elite/Elite Pro	9,1 – 12,1
PT*	ACL TOP Family/ACL TOP Family 50 Series	9,4 – 12,5

*PT – protrombinový čas

Tab. 4: Koncentrace tkáňového faktoru (TF) použité pro TGA v druhé části měření

Zředění	Koncentrace TF (pmol·l ⁻¹)	
	V činidle	V reakční směsi
žádné	6 400,0	640,0
10x	640,0	64,0
100x	64,0	6,4
400x	16,0	1,6
800x	8,0	0,8

3.5.4 Měření s DOACs

Ve třetí části měření byl sledován vliv antikoagulačních léčiv na trombin generační křivku. Měření bylo prováděno podle již výše popsaného základního pipetovacího schématu. Jako vzorky byly používány reagentie z HemosIL Liquid Anti-Xa Assay Kit obsahující léčiva Apixaban a Rivaroxaban, a reagentie z HemosIL Direct Thrombin Inhibitor Assay Kit obsahující Dabigatran. Od každého léčiva byly použity čtyři reagentie obsahující různé koncentrace daného léčiva (Tab. 5) – Calibrator 1, Calibrator 2, Low Control a High Control. Dále byla z reagentie Calibrator 2 připravena dvojnásobná koncentrace daného léčiva tím, že lyofilizovaný obsah lahvičky byl rozpuštěn v polovičním množství destilované vody, než je uvedeno na obale. Vzhledem k tomu, že se jednalo o reagentie z jiné šarže, koncentrace neodpovídá přesně dvojnásobku koncentrace léčiva v první reagentii Calibrator 2.

Poté za použití další šarže reagentií byly připraveny koncentrace 600, 700, 800 a 900 ng/ml od každého léčiva. Tyto koncentrace byly také použity jako vzorky při provádění TGA. Měření Apixabanu a Rivaroxabanu probíhalo 45 minut. Měření Dabigatranu bylo prodlouženo na 120 minut, protože stále nedošlo k ukončení generace trombinu po 45 minutách.

Tab. 5: Koncentrace daných léčiv v reagentiích použitých pro TGA ve třetí části měření

Léčivo	Koncentrace (ng·ml ⁻¹)				
	Kalibrátor 1	Nízká kontrola	Vysoká kontrola	Kalibrátor 2	Zakonzentrovaný Kalibrátor 2
Apixaban	0	83	312	501	1002
Rivaroxaban	0	77	293	497	996
Dabigatran	0	47	184	473	932

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

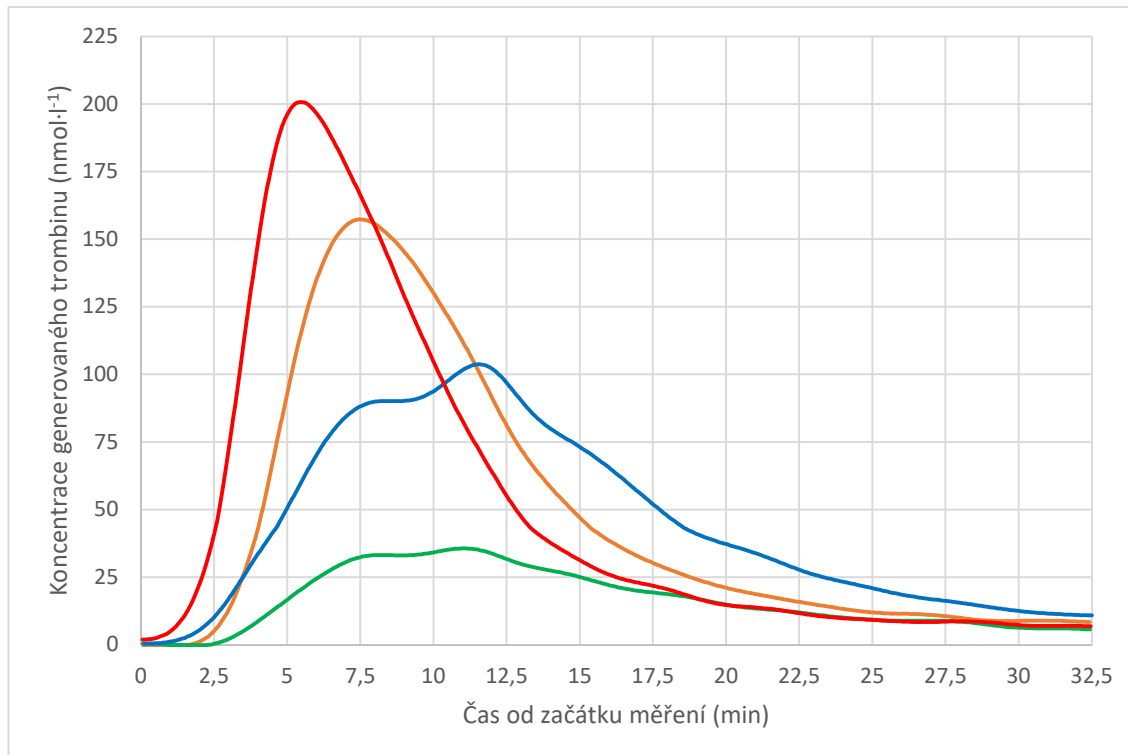
4.1 Měření s různými koncentracemi tkáňového faktoru a fosfolipidů

Při vyhodnocování výsledků byly zohledňovány tyto parametry trombin generační křivky: C_{MAX} , T_{MAX} , lag fáze, ETP a RI.

4.1.1 Původní koncentrace reagentie Ceveron® TGA RC Low

Nejdříve byly vyhodnoceny výsledky měření, při kterých byla používána původní koncentrace reagentie Ceveron® TGA RC Low ($40 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TF a $4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PH). V tomto případě se finální koncentrace TF v reakční směsi ($4 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$) blíží fyziologické hodnotě TF při hemostáze. Za fyziologické koncentrace TF při srážení krve jsou považovány koncentrace od $3 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ do $6 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. (Gerotziafas et al., 2005). Do grafů trombin generačních křivek všech čtyř kontrol (Obr. 12) byla zaznamenána data pouze do doby 32,5 minut, protože dále už nedocházelo ke generaci trombinu.

Při měření NC (Tab. 6) měla TGA křivka obvyklý tvar (Obr. 12), velmi podobný tomu který uvádí Depasse et al. (2021). Vzhledem k tomu, že reagentie Coagulation Control N není primárně určena pro TGA, ale pro APTT, PT, TT a stanovení fibrinogenu, nejsou



Obr. 12: Porovnání trombin generačních křivek normální kontroly (oranžová), abnormální kontroly (zelená), nízké kontroly (modrá) a vysoké kontroly (červená) při měření s původní koncentrací reagentie Ceveron® TGA RC Low, obsahující $40 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci tkáňového faktoru a $4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci fosfolipidů

výrobce uváděny referenční hodnoty pro TGA. (Technoclone, 2017) Při měření normální zdravé plasmy pomocí kitu Ceveron® TGA RC Low by naměřená C_{MAX} měla dosahovat hodnot v rozmezí 43–368 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a ETP v rozmezí 1236–2945 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Technoclone, 2018). Mnou naměřené hodnoty spadají do těchto intervalů.

U AC, což je plasma se sníženým množstvím koagulačních faktorů, byl T_{MAX} delší než u NC, ale lag fáze byla nečekaně kratší (Tab. 6). C_{MAX} byla 4,4x nižší než u NC. ETP byl 2,7x nižší a RI byl 8,7x nižší než u NC. Ani u této reagentie nejsou výrobcem uváděny referenční hodnoty pro TGA, naměřené výsledky ale odpovídají snížené schopnosti této plasmy generovat trombin. Pík v trombin generační křivce byl celkově širší a nižší než u NC a u vrcholu byl rozdělen na dvě části (Obr. 12), takže vznikla tzv. dvoufázová křivka. Tento tvar trombin generační křivky byl popsán Makhoul et al. (2019) při měření plasmy s trombocyty, do které byl přidán Rivaroxaban. Tento jev vysvětlují tím, že dochází k celkovému prodloužení trvání generace trombinu, zejména k prodloužení doby mezi spuštěním amplifikační smyčky a další tvorbou trombinu. Dále pozorovali, že tento jev je ovlivněn také přítomností PH a aktivitou TFPI v plasmě. Dle Kremers et al. (2017) způsobuje vznik dvoufázové křivky inhibice FXa přítomností TFPI. Je tedy možné, že při mém měření AC a LC došlo po iniciaci koagulační kaskády ke spuštění amplifikační smyčky tvorbou tenasového komplexu (FIXa-FVIIIa) a protrombinasového komplexu (FXa-FVa), což se projevilo píkem v trombogramu. S narůstajícím množstvím FXa, ale došlo také k jeho inhibici TFPI, což se projevilo platem v křivce. Tato inhibice byla po čase překonána zvýšeným množstvím FXa a v křivce se to projevilo druhým píkem. Důvod proč tuto inhibici nepozorujeme u NC a HC je, že u těchto kontrol je dostatečné množství koagulačních faktorů, aby byla inhibice TFPI ihned překonána.

Tab. 6: Výsledky TGA při měření normální, abnormální, nízké a vysoké kontroly s původní koncentrací reagentie Ceveron® TGA RC Low, obsahující 40 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci tkáňového faktoru a 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci fosfolipidů

Kontrola	Lag fáze (min)	T_{MAX}^* (min)	C_{MAX}^\dagger ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	ETP [‡] ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	RI [§] ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
Normální	3,2	7,5	157,4	1676,5	36,5
Abnormální	2,7	11,1	35,7	628,0	4,2
Nízká	2,1	11,5	103,8	1629,3	11,0
Vysoká	2,1	5,5	200,8	1802,7	58,9

* T_{MAX} – čas do dosažení maximální koncentrace trombinu

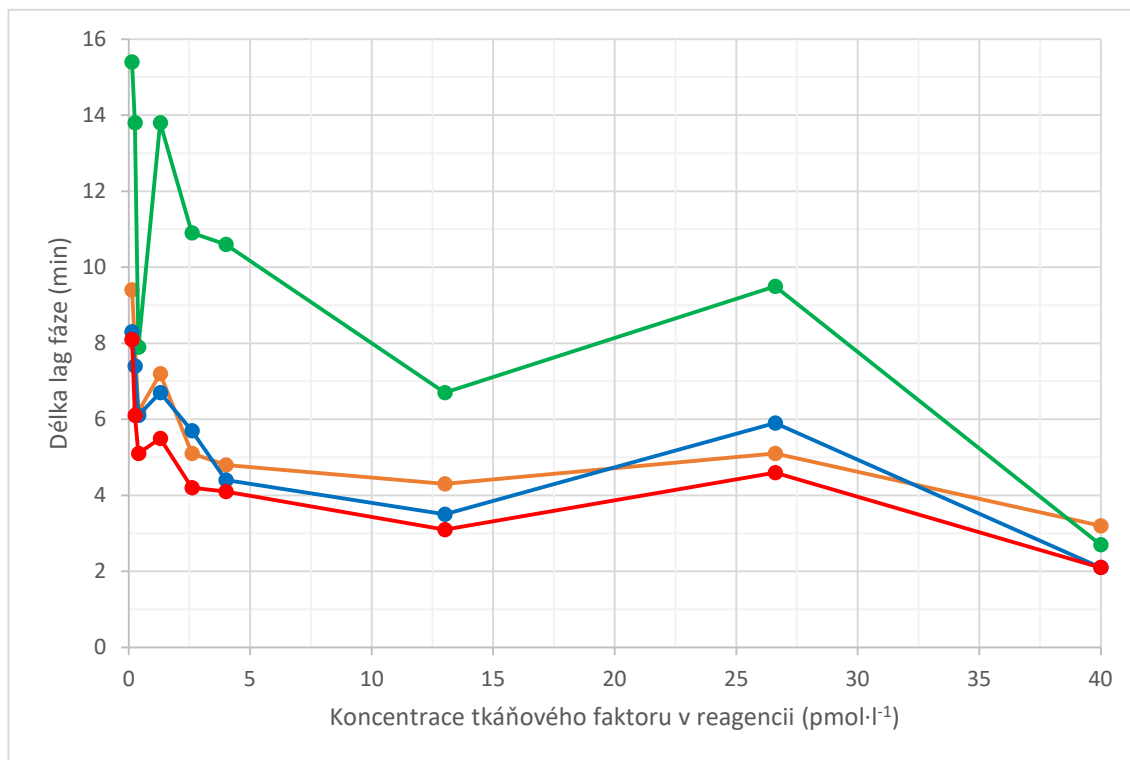
† C_{MAX} – maximální koncentrace trombinu

‡ ETP – endogenní trombinový potenciál

§ RI – rychlostní index

LC, stejně jako AC, má sníženou koncentraci koagulačních faktorů. I přesto byla lag fáze LC kratší než lag fáze NC (Tab. 6). Hodnota T_{MAX} u LC byla velmi podobná hodnotě T_{MAX} u AC. Sklon křivky v úseku od skončení lag fáze do T_{MAX} byl nižší než u NC a docházelo tedy k pomalejší generaci trombinu, čemuž odpovídá také nižší RI LC v porovnání s NC. C_{MAX} LC byla vyšší než u AC, ale stále nižší než u NC. Hodnoty ETP LC a NC byly téměř totožné. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že AC má nižší koncentraci koagulačních faktorů, a tedy i nižší schopnost generovat trombin než LC. U LC dochází ke generaci trombinu mnohem pomaleji než u NC, ale jeho celkové množství bude u obou těchto kontrol stejné. Tvar křivky LC je podobný křivce abnormální kontroly (Obr. 12). Navzájem se ale liší ve výšce píku. U této kontroly je výrobcem uváděna očekávaná hodnota C_{MAX} $110 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a interval spolehlivosti 72–148 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

HC obsahuje plasmu se zvýšenou schopností generovat trombin. Proto byla lag fáze kratší než u NC a stejně tak byl kratší i T_{MAX} (Tab. 6). Hodnota C_{MAX} a ETP byla vyšší než u NC. RI u HC byl přibližně 1,5x vyšší než u NC. Tyto výsledky potvrzují, že došlo ke zvýšené generaci trombinu. Tvar trombin generační křivky vysoké kontroly (Obr. 12) je podobný křivce NC s tím rozdílem, že je posunut více vlevo a pík je užší. U této



Obr. 13: Závislost délky lag fáze na koncentraci tkáňového faktoru v reakci (oranžová – normální kontrola, zelená – abnormální kontrola, modrá – nízká kontrola, červená – vysoká kontrola).

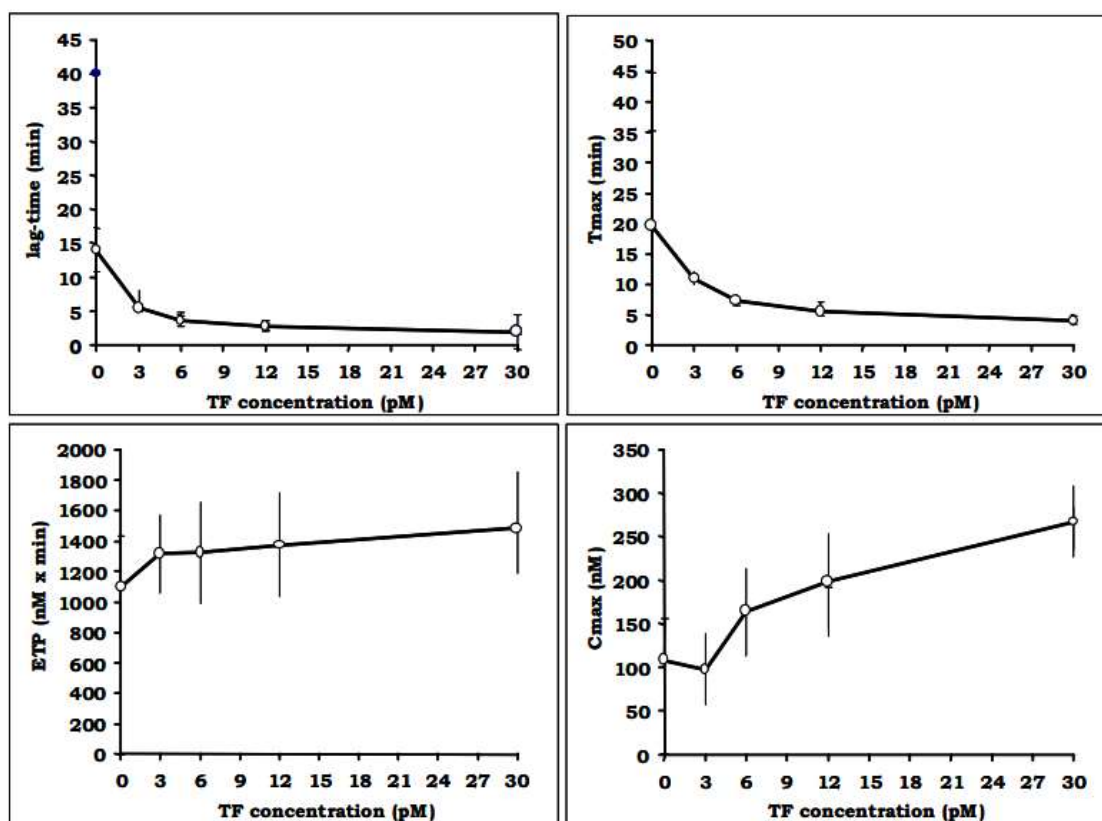
kontroly je uvedena předpokládaná hodnota C_{MAX} 230 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a interval spolehlivosti 152-308 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.1.2 Ostatní koncentrace reagentie Ceveron® TGA RC Low

Výsledky tohoto měření byly zaznamenány ve formě grafů (Obr. 13, 15, 16, 17 a 18), kde je vždy vyjádřena závislost příslušného parametru trombin generační křivky na koncentraci TF v reagentii.

Z měření vyplývá, že i nejnižší použitá koncentrace TF ($0,13 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$) vyvolala aktivaci hemostázy u všech kontrol. Butenas et al. (2005) dokonce uvádí, že u zdravých pacientů nesmí koncentrace TF v krvi překročit $0,02 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$, neboť by došlo k iniciaci srážení.

Při porovnávání délek lag fáze u jednotlivých kontrol (Obr. 13) můžeme vidět, že lag fáze AC byla vždy mnohem delší než lag fáze NC, až na jednu výjimku při nejvyšší použité koncentraci TF. Délky lag fáze LC a NC nejsou tak rozdílné. Jak již bylo zmíněno výše, hodnoty lag fáze AC a LC jsou při koncentraci $40 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TF nečekaně nižší než

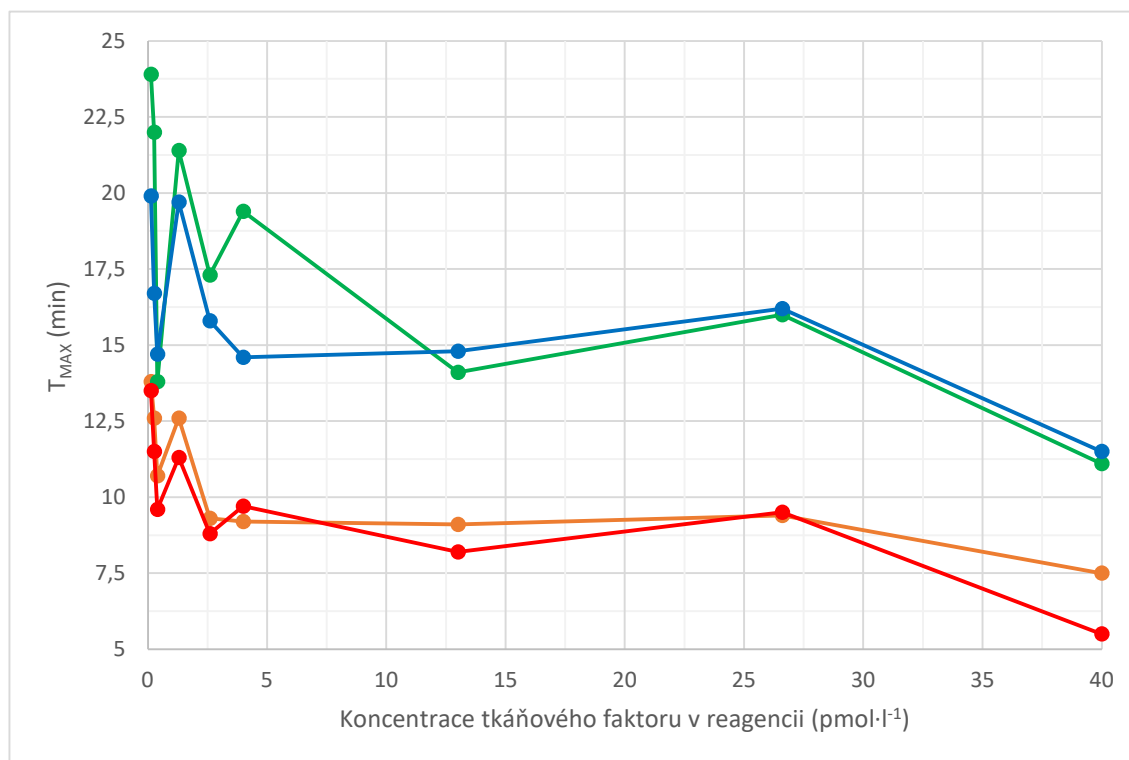


Obr. 14: Vliv koncentrace tkáňového faktoru v reakční směsi na parametry trombin generační křivky (C_{MAX} – maximální koncentrace trombinu, ETP – endogenní trombinový potenciál, T_{MAX} – čas do dosažení maximální koncentrace trombinu). Převzato od Gerotziapas et al., 2005.

u NC. U LC byla tato hodnota dokonce shodná s hodnotou lag fáze HC. U všech kontrol můžeme vidět zkracování lag fáze s rostoucí koncentrací TF. Tento trend není úplně pravidelný kvůli nečekanému prodloužení lag fáze při použití $26,67 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku TF. Gerotziafas et al. (2005) při stanovování vlivu koncentrace TF parametry TGA pozorovali mnohem pravidelnější zkracování délky lag fáze se zvyšující se koncentrací TF (Obr. 14). Používali ovšem pouze plasmu od zdravých dobrovolníků, která navíc obsahovala i trombocyty. Já jsem jako vzorky používala bezdestičkovou plasmu, což může být příčinou odchylek.

V grafu závislosti T_{MAX} na koncentraci TF (Obr. 15) už došlo k jednoznačnějšímu rozdělení kontrol. Hodnoty LC a AC jsou při většině měření velmi podobné. Stejně tak podobné, jsou ale hodnoty HC a NC, které se výrazněji liší až při nejvyšší koncentraci TF. S rostoucí koncentrací TF se T_{MAX} u všech kontrol zkracuje, nejpravidelnější je tento trend u NC. V porovnání měření NC s měřením Gerotziafas et al. (2005) (Obr. 14) tady pozorujeme pouze jednu výraznější odchylku od trendu a to při $1,33 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci TF.

Vhodný parametr pro rozlišení jednotlivých kontrol je C_{MAX} (Obr. 16), protože zde existují velké rozdíly mezi kontrolami. C_{MAX} AC a LC je výrazně snížena oproti NC při

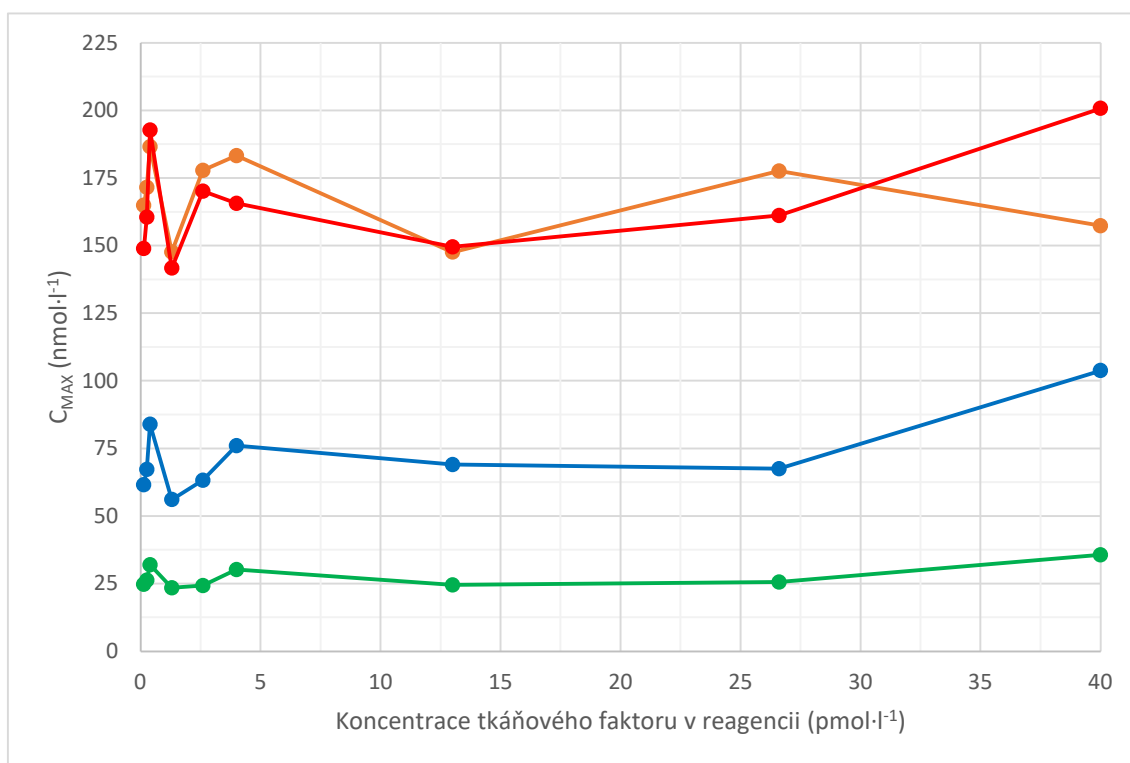


Obr. 15: Závislost délky T_{MAX} (času do dosažení maximální koncentrace trombinu) na koncentraci tkáňového faktoru v reagentii (oranžová – normální kontrola, zelená – abnormální kontrola, modrá – nízká kontrola, červená – vysoká kontrola).

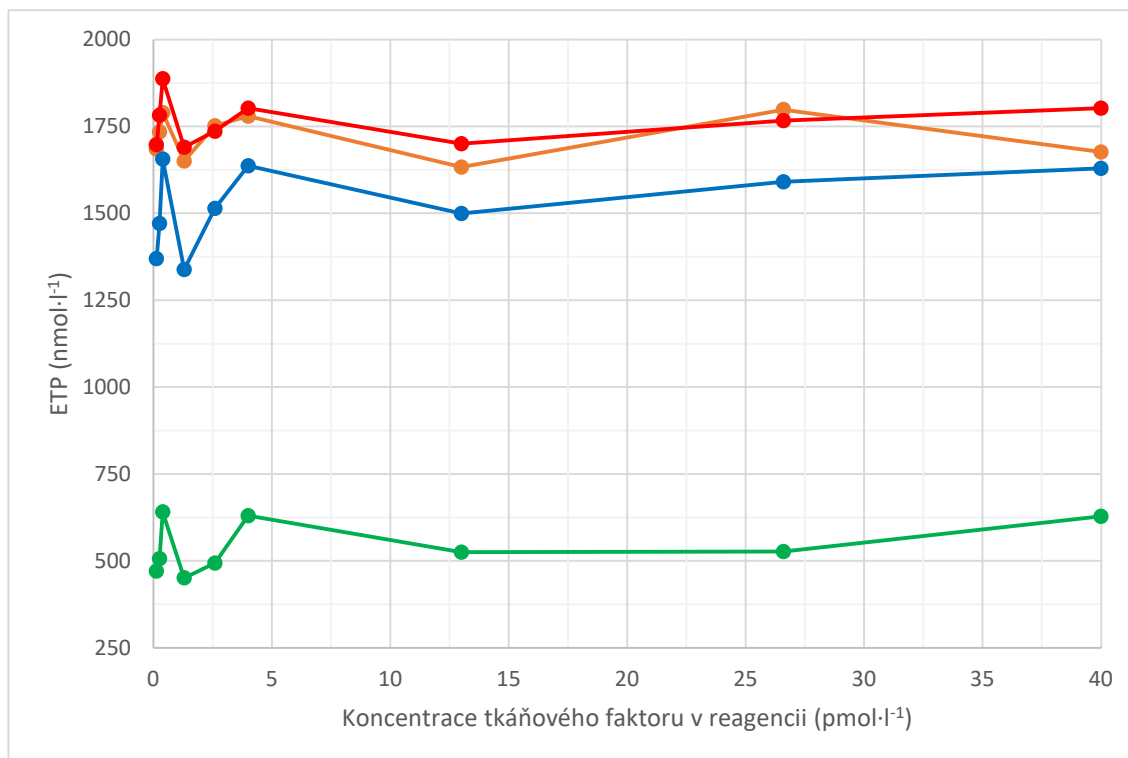
všech měřeních. U HC jsou výsledky opět hodně podobné jako u NC. Rozlišit tyto dvě kontroly je možné až při nejvyšší použité koncentraci, tedy $40 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TF. Gerotziafas et al. (2005) (Obr. 14) pozorovali růst C_{MAX} s rostoucí koncentrací TF, s výjimkou náhlého poklesu při použití $3 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TF. Já jsem při svém měření NC takovýto růst C_{MAX} nepozorovala. Hodnoty C_{MAX} se příliš neměnily v závislosti na koncentraci TF.

Dalším vhodným parametrem pro porovnávání jednotlivých kontrol je ETP (Obr. 17). Zde opět vidíme, že ETP AC je velmi nízký v porovnání s NC při všech měřeních. Také ETP LC u všech měření je nižší než ETP NC, tento rozdíl není ale tak velký jako u AC. U HC jsou hodnoty ETP vyšší než u NC s výjimkou výsledku s $26,67 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TF. Opět se nedá říci, že by hodnoty ETP u všech kontrol rostly s rostoucí koncentrací TF. Gerotziafas et al. (2005) (Obr. 14) také tento trend nepozorovali a naměřili přibližně stejné hodnoty ETP při koncentraci TF 3, 6, 12 a $30 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

V grafu závislosti RI na koncentraci TF v činidle (Obr. 18) můžeme vidět jasné vydělení hodnot AC a LC od hodnot zbylých dvou kontrol. Při použití $40 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TF je RI nejlepší parametr pro posouzení schopnosti dané plasmy generovat trombin. Při této koncentraci byly pozorovány největší rozdíly mezi hodnotami RI u jednotlivých kontrol.



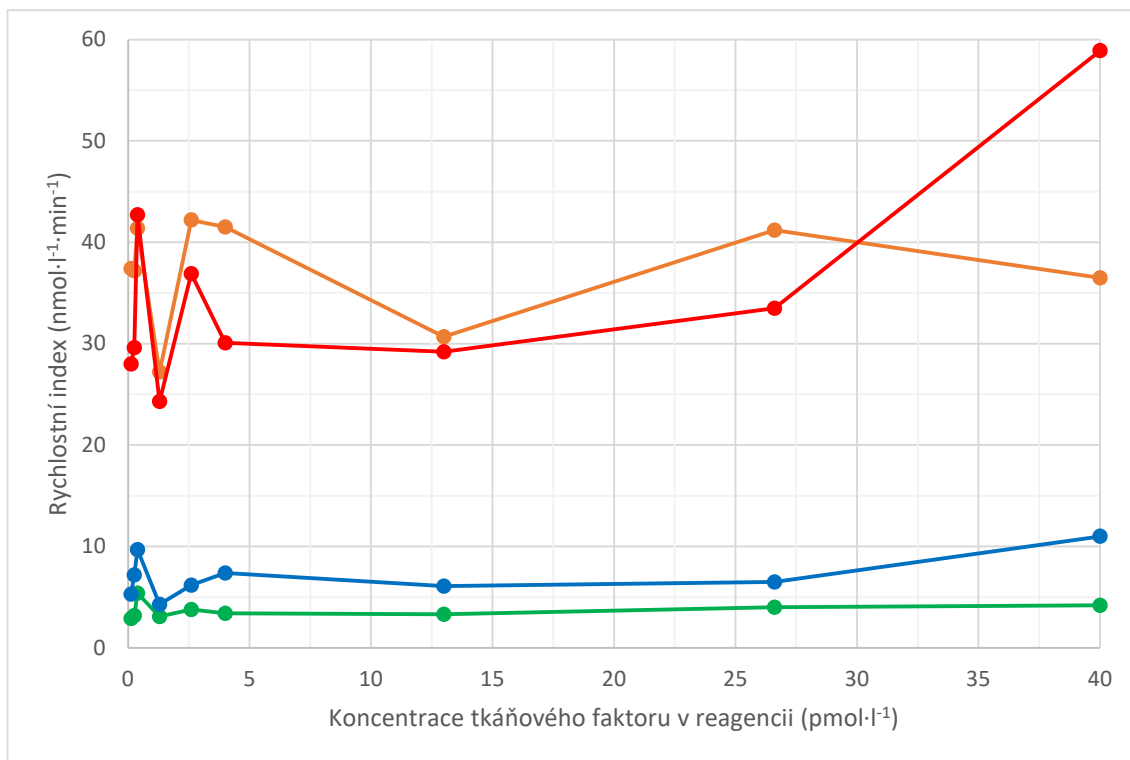
Obr. 16: Závislost C_{MAX} (maximální koncentrace trombinu) na koncentraci tkáňového faktoru v reagentii (oranžová – normální kontrola, zelená – abnormální kontrola, modrá – nízká kontrola, červená – vysoká kontrola).



Obr. 17: Závislost ETP (endogenního trombinového potenciálu) na koncentraci tkáňového faktoru v reagentii (oranžová – normální kontrola, zelená – abnormální kontrola, modrá – nízká kontrola, červená – vysoká kontrola).

Jinak ale opět nemůžeme říci, že by hodnota RI závisela na koncentraci TF. Hodnoty RI AC a LC, jsou téměř konstantní, zatímco hodnoty RI NC a HC jsou nepravidelné.

Z tohoto měření vyplývá, že délka lag fáze a T_{MAX} závisí na koncentraci TF, zatímco hodnoty C_{MAX} , ETP a RI na TF nezávisí. Při všech měřeních lze vidět velkou variabilitu výsledků při použití koncentrací TF pod $5 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Při těchto nízkých koncentracích TF hraje velkou roli koncentrace PH a je možné, že tyto PH spouštějí také kontaktní cestu aktivace hemostázy. Proto je vhodné při měření používat spíše vyšší koncentrace TF. Také je výhodné použít vyšší koncentrace TF, pokud očekáváme nižší generaci trombinu ve vzorku. Takto zajistíme vyšší signál u těchto vzorků, který bude také lépe měřitelný. Také dosáhneme zkrácení lag fáze a T_{MAX} a měření tak může probíhat rychleji a efektivněji.

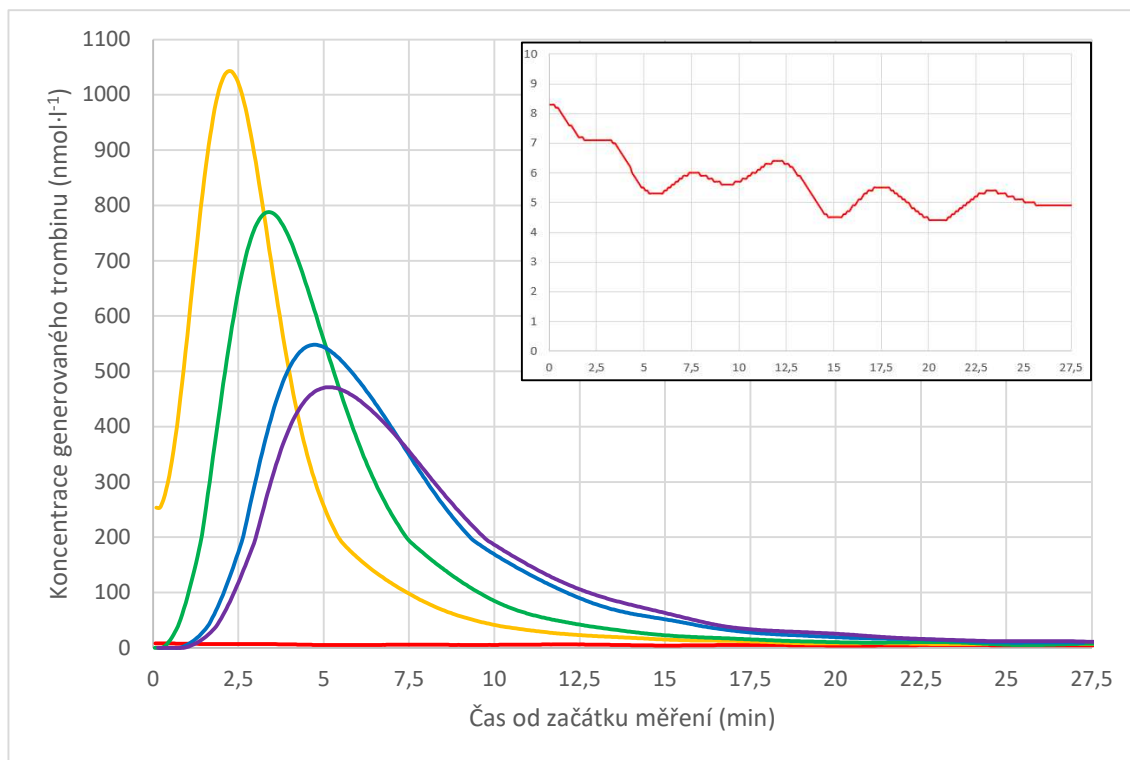


Obr. 18: Závislost RI (rychlostního indexu) na koncentraci tkáňového faktoru v reagentii (oranžová – normální kontrola, zelená – abnormální kontrola, modrá – nízká kontrola, červená – vysoká kontrola).

4.2 Měření s HemosIL RecombiPlasTin 2G

Stejně jako v případě měření kontrol s původní koncentrací reagentie Ceveron® TGA RC Low bylo měření prováděno po dobu 45 minut. Trombin generační křivky jsou zaznamenány do grafů do doby 27,5 minut.

U NC (Tab. 7, Obr. 19) nebyly při nejvyšší koncentraci reagentie HemosIL RecombiPlasTin 2G pozorovány žádné měřitelné parametry. Trombin generační křivka měla tvar sinusoidy, na které je možné pozorovat periodicky se opakující úseky, kdy docházelo k tvorbě trombinu, a úseky, kdy docházelo k inhibici generace trombinu. Tvorba trombinu byla vždy inhibována ještě před zahájením amplifikační fáze, proto jsme nepozorovali vznik píku jako u všech ostatních měření. Očekávané hodnoty PT při měření s reagentií HemosIL RecombiPlasTin 2G (Tab. 3) jsou v rozmezí od 8 do 12,5 s. Při TGA s touto reagentií tedy dojde k velmi rychlé tvorbě trombinu během prvních desítek vteřin, kterou není přístroj schopný zaznamenat, ale dále se pak koncentrace generovaného trombinu příliš nemění. Velké množství trombinu totiž aktivuje také velké množství antitrombinu, který další vznikající trombin rychle nevratně inaktivuje. Tímto je hned na začátku měření vyčerpáno téměř veškeré množství trombinu.



Obr. 19: Měření normální kontroly s různým zředěním reagencie HemosIL RecombiPlasTin 2G (červená – žádné zředění, žlutá – 10x zředěno, zelená – 100x zředěno, modrá – 400x zředěno, fialová – 800x zředěno).

Při nižších koncentracích TF (větším zředění reagencie) jsou již parametry měřitelné. Můžeme vidět, že délky lag fáze i T_{MAX} jsou velmi krátké. Při $8 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ TF je lag fáze a T_{MAX} stále kratší než při měření NC s $40 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$ TF a $4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PH. Z toho můžeme usuzovat, že zde má také velký vliv koncentrace PH v reagentii HemosIL RecombiPlasTin 2G, která pravděpodobně bude mnohonásobně vyšší než $4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Také hodnoty C_{MAX} , ETP a RI jsou několikanásobně vyšší než při měření NC s Ceveron® TGA RC Low. V grafu se to projevuje vysokými píky.

Při měření AC (Tab. 7, Obr. 20) při nejvyšší koncentraci se podařilo naměřit určité parametry, ale vzhledem k tomu, že trombin generační křivka zde nemá obvyklý tvar, naměřené parametry nejsou příliš smysluplné. Tvar křivky je podobný jako u NC, s tím rozdílem, že je více nepravidelný. Můžeme vidět, že docházelo k větší generaci trombinu na začátku měření a poté generace zpomalovala. V případě měření s nižšími koncentracemi činidla jsou délky lag fází a T_{MAX} opět kratší než při měření AC za použití reagencie Ceveron® TGA RC Low a jsou delší než při měření NC s reagentií HemosIL RecombiPlasTin 2G. Oproti NC jsou u AC při tomto měření velmi nízké hodnoty C_{MAX} , ETP a RI. Vždy jsou ale vyšší než u AC při měření s Ceveron® TGA RC Low. Nejvyšší C_{MAX} byla naměřena při 100násobném zředění. Trombin generační křivky mají tvar

nižších a širších píků, které jsou vlevo strmější a vpravo klesají pozvolněji. Jde vidět, že ke generaci trombinu dochází rychle, ale jeho inhibice probíhá pomaleji.

U LC (Tab. 7, Obr. 21) se opět při nejvyšší koncentraci nepodařilo naměřit žádné parametry. Trombin generační křivka je má v tomto případě spíše klesající tendenci. Při desetinásobném zředění iniciačního činidla se určité parametry podařilo získat, ale křivka opět vykazuje sinusoidní tvar. Při nižších koncentracích pozorujeme podobný tvar píků jako u AC. Hodnoty lag fáze a T_{MAX} jsou opět nižší než u LC při měření s Ceveron® TGA RC Low. Hodnoty C_{MAX} , ETP a RI jsou vyšší. Při porovnání s NC při měření s HemosIL RecombiPlasTin 2G jsou hodnoty ETP velmi podobné, což jsme mohli pozorovat i při měření obou kontrol s Ceveron® TGA RC Low.

Tab. 7: Výsledky TGA při měření kontrol s různými zředěními reagentie HemosIL RecombiPlasTin 2G

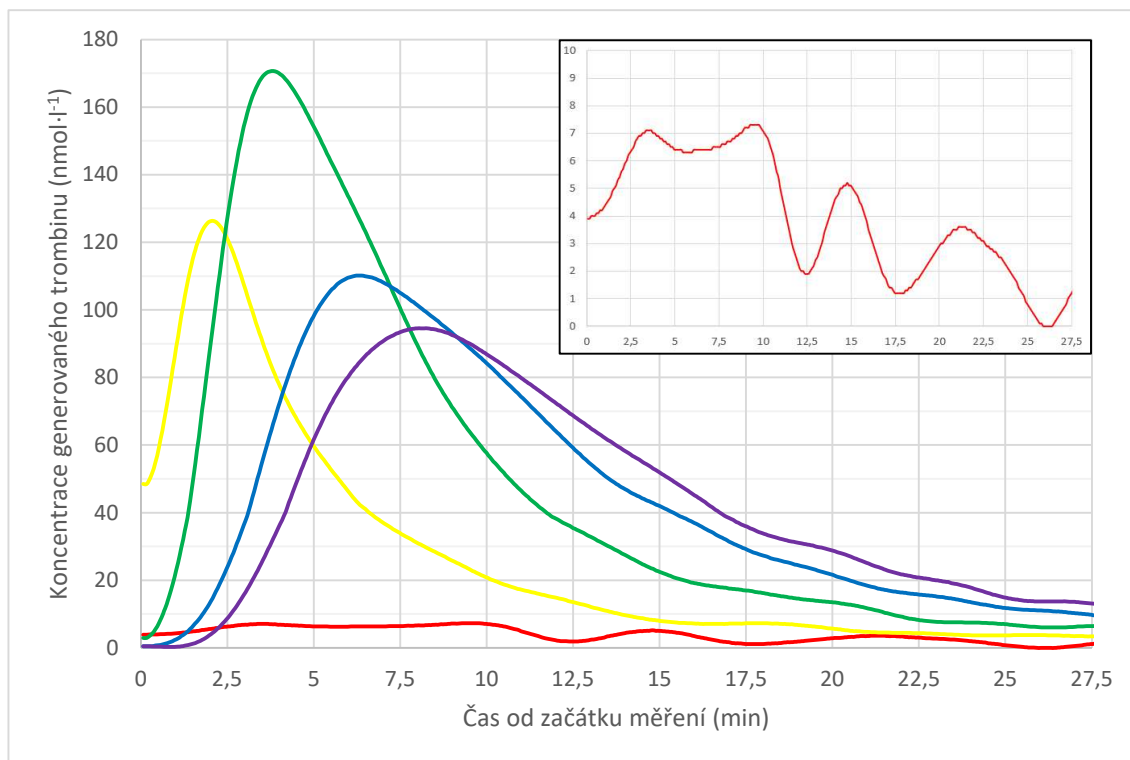
Vzorek	Zředění	Koncentrace TF v činidle (pmol·l ⁻¹)	Lag fáze (min)	T_{MAX} * (min)	C_{MAX} † (nmol·l ⁻¹)	ETP‡ (nmol·l ⁻¹)	RI§ (nmol·l ⁻¹ ·min ⁻¹)
	1x	6 400			Neměřitelné parametry		
NC	10x	640	0,6	2,2	1091,9	4093,8	679,7
	100x	64	1,0	3,4	788,1	3994,0	327,0
	400x	16	1,7	4,8	548,2	3765,5	181,9
	800x	8	1,8	5,2	471,5	3607,8	142,2
	1x	6 400	0,5	9,6	7,3	146,2	0,8
AC	10x	640	0,5	2,1	126,4	810,4	78,7
	100x	64	1	3,8	170,7	1431	60,8
	400x	16	1,9	6,3	110,2	1330,6	25
	800x	8	2,4	8,1	94,6	1312,2	16,5
	1x	6 400			Neměřitelné parametry		
LC	10x	640	0,3	34,4	4,3	169,1	0,1
	100x	64	1	4	646,8	4181,9	214,9
	400x	16	1,7	6,3	353,4	3690,8	76,6
	800x	8	1,9	6,8	302,8	3573,7	61,6
	1x	6 400	0,5	1,8	20,9	358,9	16
HC	10x	640	0,4	0,9	599,6	2391,4	1196,1
	100x	64	0,8	3,1	816,1	4081,2	354
	400x	16	1,3	4,4	556,6	3807,9	178,9
	800x	8	1,6	4,8	496,1	3606,8	154,4

* T_{MAX} – čas do dosažení maximální koncentrace trombinu

† C_{MAX} – maximální koncentrace trombinu

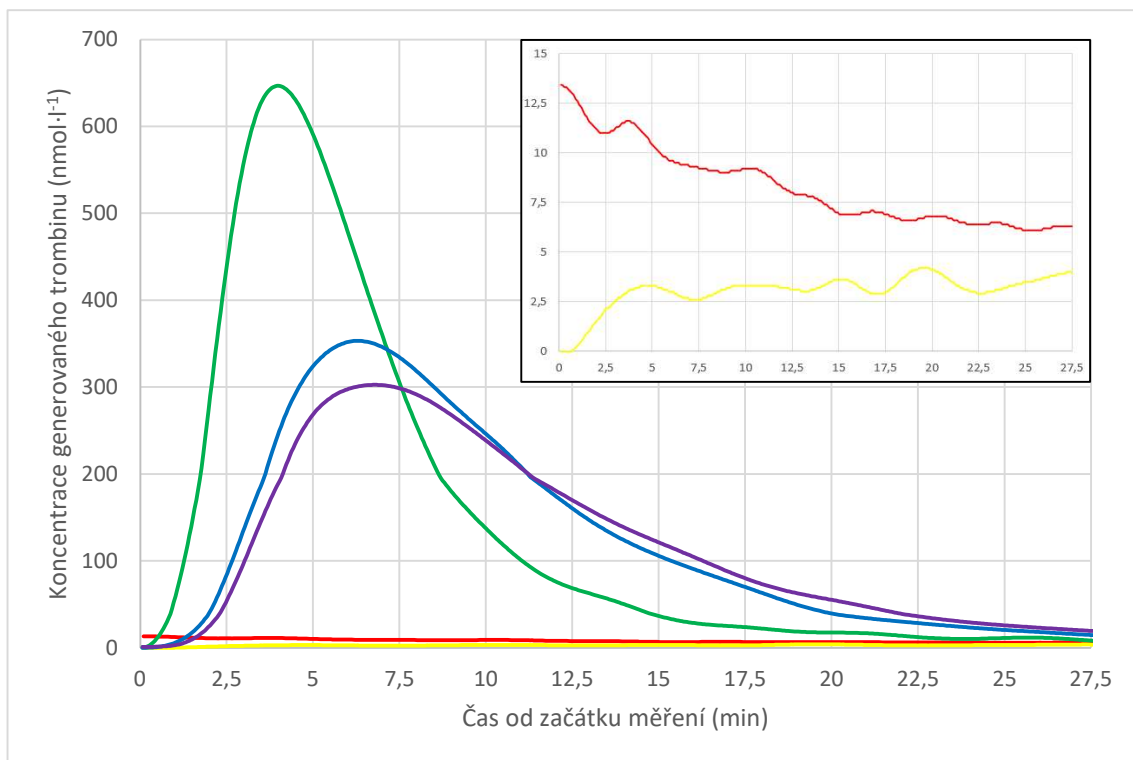
‡ ETP – endogenní trombinový potenciál

§ RI – rychlostní index

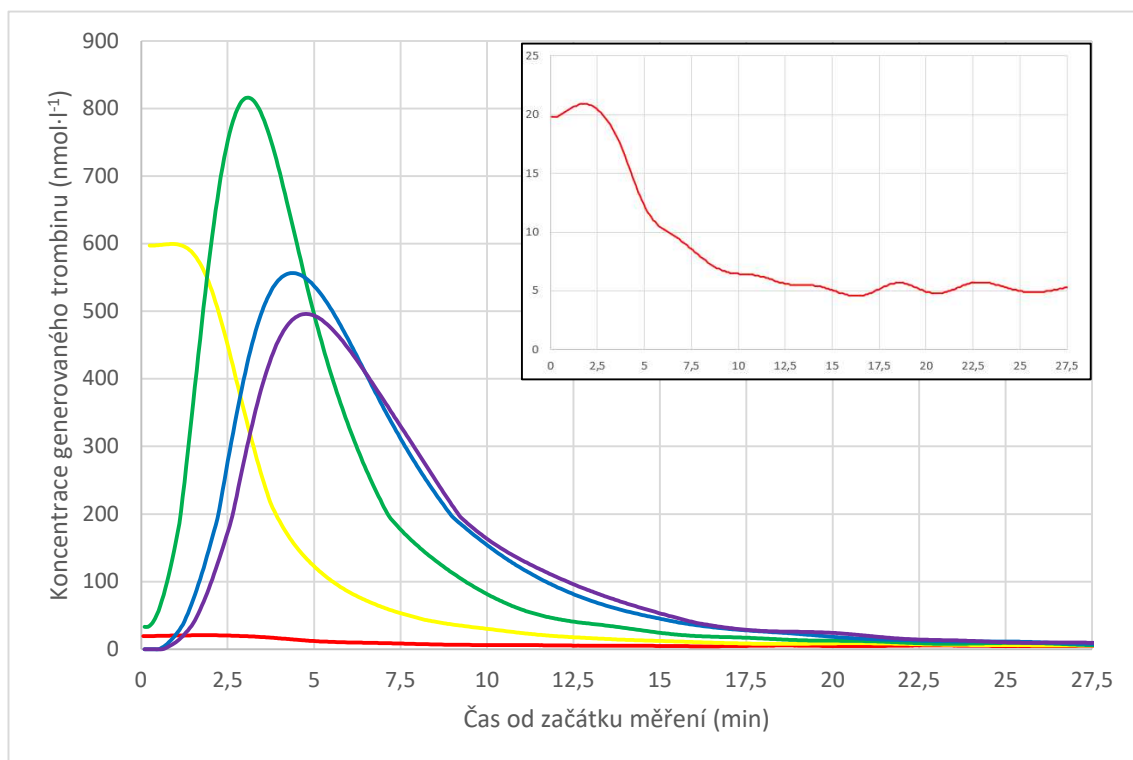


Obr. 20: Měření abnormální kontroly s různým zředěním reagentie HemosIL RecombiPlasTin 2G (červená – žádné zředění, žlutá – 10x zředěno, zelená – 100x zředěno, modrá – 400x zředěno, fialová – 800x zředěno).

Při nejvyšší koncentraci TF se u HC (Tab. 7, Obr. 22) podařilo také naměřit určité parametry. Křivka v tomto případě nejvíce připomínala typickou TGA křivku oproti zbylým třem kontrolám. U ostatních měření byly lag fáze a T_{MAX} nejkratší u HC. C_{MAX} a RI byly naopak nejvyšší u HC. Hodnoty ETP u HC byly pouze mírně vyšší než u NC. Při porovnání tohoto měření HC s měřením HC s Ceveron® TGA RC Low můžeme pozorovat stejný trend jako u všech ostatních kontrol. Délky lag fáze a T_{MAX} jsou zde kratší, hodnoty C_{MAX} , ETP a RI jsou zde vyšší.



Obr. 21: Měření nízké kontroly s různým zředěním reagenie HemosIL RecombiPlasTin 2G (červená – žádné zředění, žlutá – 10x zředěno, zelená – 100x zředěno, modrá – 400x zředěno, fialová – 800x zředěno).



Obr. 22: Měření vysoké kontroly s různým zředěním reagenie HemosIL RecombiPlasTin 2G (červená – žádné zředění, žlutá – 10x zředěno, zelená – 100x zředěno, modrá – 400x zředěno, fialová – 800x zředěno).

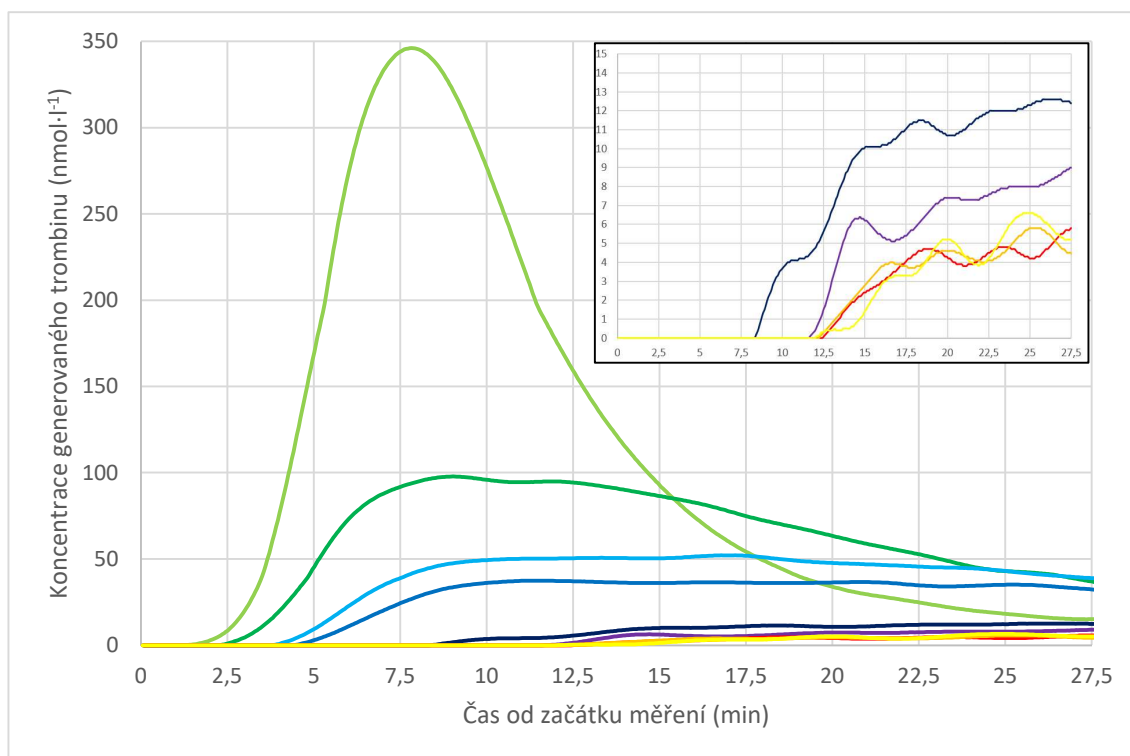
4.3 Měření s inhibitory koagulace

Měření TGA bylo prováděno po dobu 45 minut, ale do trombin generačních křivek byly zaznamenány data pouze do 27,5 minut, protože dále nedocházelo k výraznější generaci trombinu. V případě nejvyšších koncentrací Dabigatranu bylo měření prodlouženo na dobu 120 minut. V grafu jsou poté zaznamenána data do doby 70 minut.

4.3.1 Apixaban

U plasmy obsahující $0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ Apixabanu (Tab. 8), byla naměřena téměř stejná délka lag fáze a T_{MAX} jako u NC (Tab. 6), ale hodnoty C_{MAX} , ETP a RI byly přibližně dvojnásobné. Tvar trombin generační křivky (Obr. 23) odpovídá tvaru TGA křivky NC (Obr. 12). Při koncentraci $83 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tab. 8) zůstala délka lag fáze stejná, ale došlo k prodloužení T_{MAX} a k výraznému snížení C_{MAX} .

Na tvaru trombin generační křivky se to projevilo nižším a širším píkem. Můžeme také pozorovat prodlouženou konečnou fázi generace trombinu, která je také popisována v článku od Rigano et al. (2018). Tento trend je výraznější při vyšších koncentracích Apixabanu, jako je 312 a $501 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Apixaban inhibuje FXa, který je vázaný

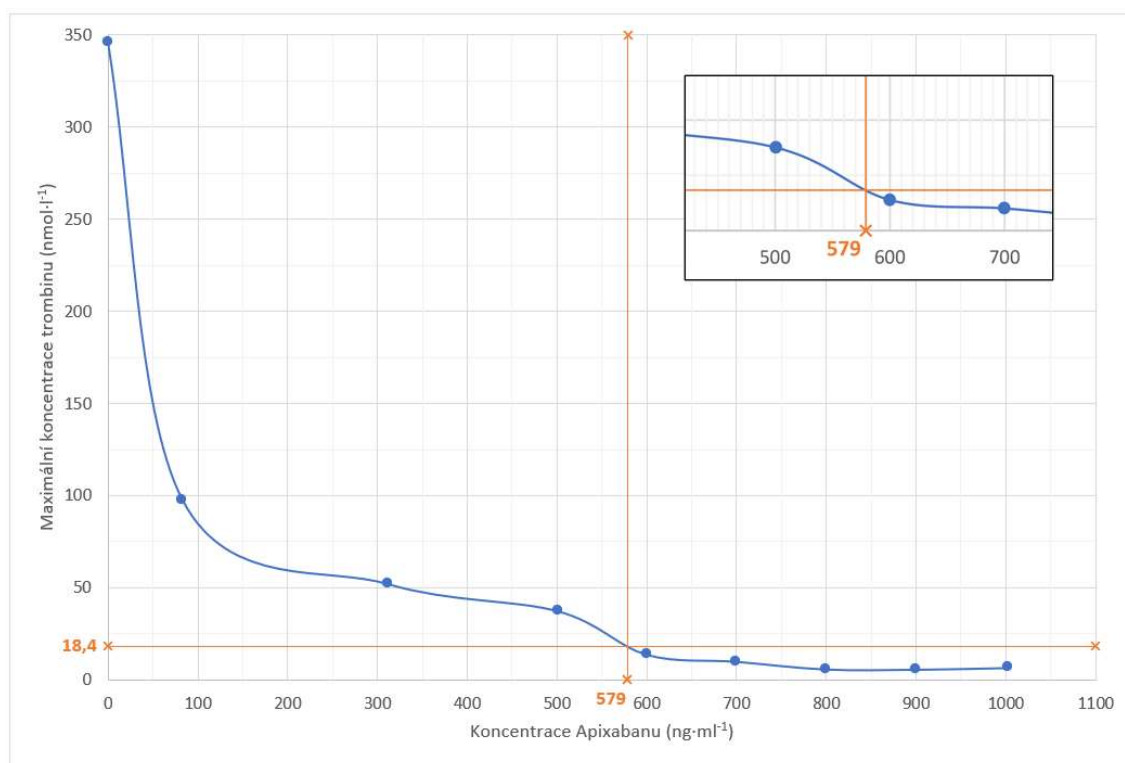


Obr. 23: Trombin generační křivky získané při měření plasmy obsahující různé koncentrace Apixabanu (světle zelená – $0 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, tmavě zelená – $83 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, světle modrá – $312 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, modrá – $501 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, tmavě modrá – $600 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, fialová – $700 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, červená – $800 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, oranžová – $900 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, žlutá – $1002 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

v protrombinasovém komplexu, čímž snižuje generaci trombinu během iniciační a amplifikační fáze. Fakt, že v daném momentu je vytvořeno pouze malé množství trombinu způsobuje, že je také aktivováno pouze malé množství antitrombinu a inhibice srážení tedy probíhá pomaleji, což způsobuje charakteristický tvar trombin generační křivky.

Apixaban tedy hlavně způsobuje snížení C_{MAX} , zatímco ETP není tak výrazně ovlivněno, což se v souladu s pozorováním Shaw et al. (2023). Shaw et al. (2023) dále uvádí, že přímé inhibitory FXa způsobují při TGA zploštění křivky a také mohou zapříčinit rozdělení píku křivky na dva tak, že křivka připomíná „velbloudí hřbet“. Tato změna píku křivky nebyla při mém měření pozorována.

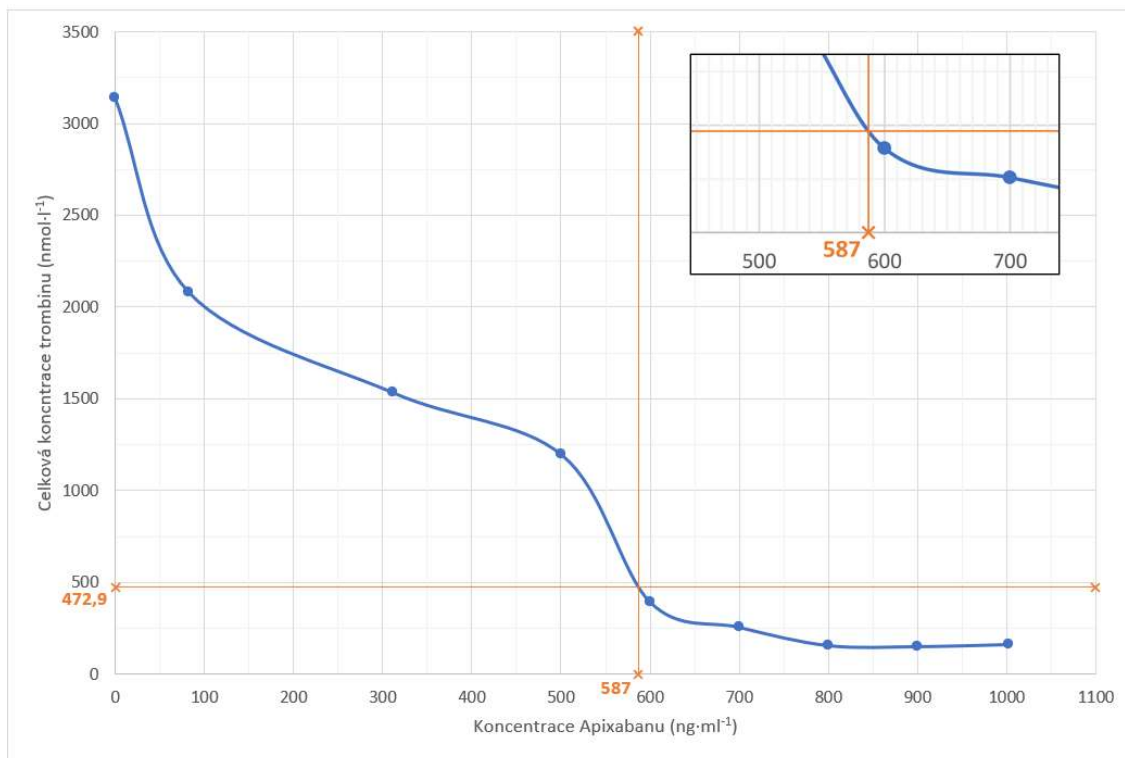
Nad $800 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ nepozorujeme už žádný vznikající trombin, je pravděpodobné, že naměřený signál je pouze šum pozadí. Proto byly koncentrace 800, 900 a $1002 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ využity pro určení meze detekce trombinu. Byl sestrojen graf závislosti C_{MAX} na koncentraci Apixabanu (Obr. 24) a graf závislosti ETP na koncentraci Apixabanu (Obr. 25). Dále byla vypočítána průměrná C_{MAX} ($6,13 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a průměrný ETP ($157,36 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) při koncentracích 800, 900 a $1002 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Trojnásobky těchto hodnot ($18,4 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $472,9 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byly vyneseny do příslušných grafů.



Obr. 24: Graf závislosti maximální koncentrace trombinu (C_{MAX}) na koncentraci Apixabanu. Oranžově vyznačená je minimální detekovatelná koncentrace trombinu a odpovídající koncentrace Apixabanu, při které je generováno toto množství trombinu.

18,4 nmol·l⁻¹ odpovídá minimální koncentraci trombinu, která může být přístrojem Ceveron® alpha ještě detekována a tato koncentrace odpovídá 580 ng Apixabanu na ml plasmy. V případě celkového množství trombinu je tento automatický koagulometr schopen detekovat množství 472,9 nmol·l⁻¹, což odpovídá 587 ng·ml⁻¹ Apixabanu.

Apixaban (Eliquis) je indikován pro prevenci i léčbu mnoha trombotických onemocnění a od charakteru onemocnění se odvíjí i jeho dávkování. Pro prevenci žilních tromboembolických příhod po náhradě kyčelního nebo kolenního kloubu se pacientům předepisuje 2,5 mg přípravku Eliquis dvakrát denně. Koncentrace Apixabanu v plasmě se tedy pohybují mezi 51–77 ng·ml⁻¹. Pro prevenci cévní mozkové příhody a systémové embolie se jinak zdravým pacientům předepisuje 5 mg dvakrát denně. V tomto případě dosahuje koncentrace Apixabanu v plasmě 79–123 ng·ml⁻¹ (SÚKL, 2011). Generaci trombinu u těchto pacientů popisuje nejlépe trombin generační křivka získaná při měření s 83 ng Apixabanu v 1 ml plasmy. Zde nedochází k žádným drastickým změnám hemostázy, neboť to není v tomto případě potřeba, jelikož se jedná pouze o prevenci. Dochází zde ke snížení C_{MAX} trombinu, ale ETP zůstává přibližně stejné jako u normální plasmy. Generace trombinu je tedy pomalejší a pozvolnější, což umožňuje její snadnější inhibici přirozenými inhibitory přítomnými v krvi pacienta.



Obr. 25: Graf závislosti celkové koncentrace trombinu (ETP) na koncentraci Apixabanu. Oranžově vyznačená je limitní detekovatelná koncentrace trombinu a odpovídající koncentrace Apixabanu, při které je generováno toto množství trombinu.

Tab. 8: Výsledky TGA při měření plasmy s různými koncentracemi Apixabanu

Koncentrace Apixabanu (ng·ml ⁻¹)	Lag fáze (min)	T _{MAX} [*] (min)	C _{MAX} [†] (nmol·l ⁻¹)	ETP [‡] (nmol·l ⁻¹)	RI [§] (nmol·l ⁻¹ ·min ⁻¹)
0	3,2	7,8	346,2	3139,6	75,0
83	3,2	9,0	97,9	2078,9	16,8
312	3,8	16,9	52,2	1533,6	4,0
501	4,5	11,4	37,5	1194,7	5,4
600	7,3	31,1	13,9	392,5	0,6
700	7,4	33,5	10,1	256,6	0,4
800	9,3	36,2	5,9	157,3	0,2
900	3,1	25,4	5,8	152,2	0,3
1002	7,8	43,7	6,7	163,4	0,2

* T_{MAX} – čas do dosažení maximální koncentrace trombinu

† C_{MAX} – maximální koncentrace trombinu

‡ ETP – endogenní trombinový potenciál

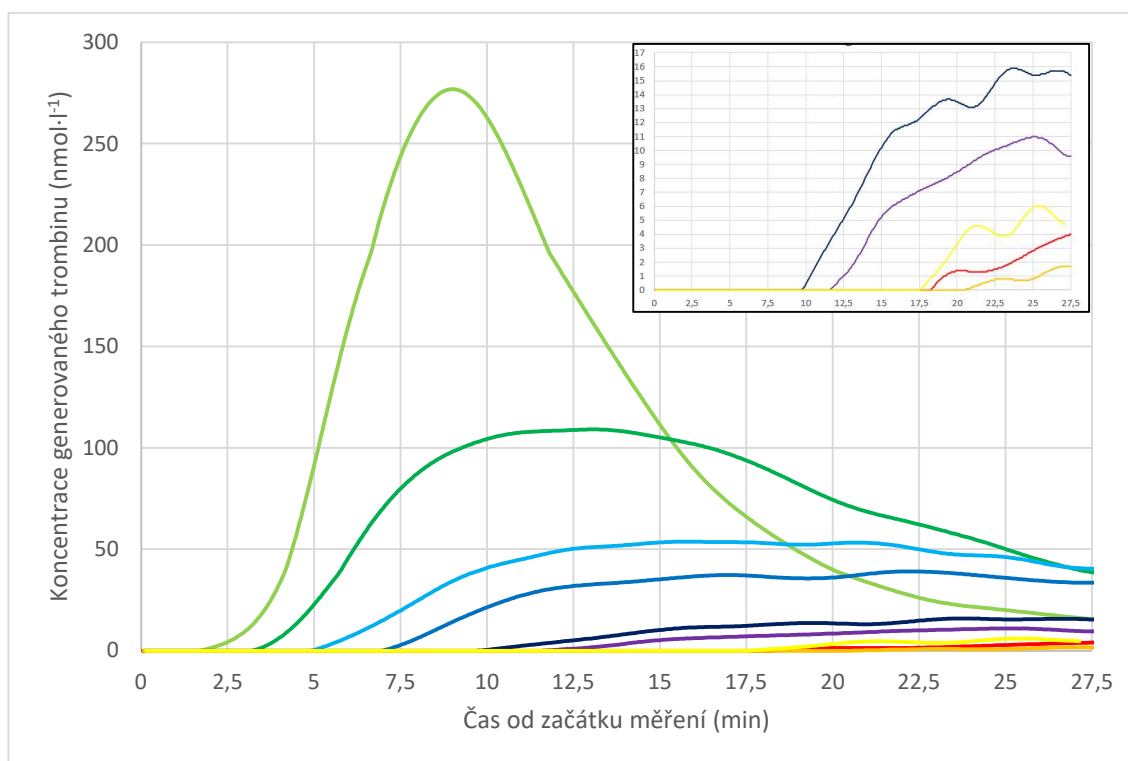
§ RI – rychlostní index

Při léčbě hluboké žilní trombózy je podáváno až 10 mg přípravku Eliquis dvakrát denně a koncentrace Apixabanu v plasmě dosahuje hodnot 120-251 ng·ml⁻¹. (SÚKL, 2011) V tomto případě je nejbližší trombin generační křivka získaná při měření plasmy obsahující Apixaban o koncentraci 312 ng·ml⁻¹. Zde dochází k výraznějšímu prodloužení T_{MAX} a ke snížení C_{MAX}. Přesto zůstává délka lag fáze přibližně stejná jako u normální plasmy. Dochází ke snížení ETP na polovinu. Generace trombinu je nastartována stejně rychle jako u normální plasmy, ale amplifikační fáze je zde potlačena a trombin se tedy tvoří velmi pomalu.

Vzhledem k tomu, že ani při nejvyšším dávkování nepřekročí hladina Apixabanu v plasmě pacienta 300 ng·ml⁻¹, je metodika TGA prováděná na přístroji Ceveron® alpha dostačující pro monitorování této léčby, neboť limity detekce jsou mnohem vyšší.

4.3.2 Rivaroxaban

Při porovnání výsledků NC při původní koncentraci Ceveron® TGA RC Low (Tab. 6) a výsledků měření plasmy obsahující 0 ng·ml⁻¹ Rivaroxabanu (Tab. 9) můžeme vidět, že lag fáze a T_{MAX} jsou mírně delší u Rivaroxabanu. U Rivaroxabanu je dále přibližně 1,5x vyšší C_{MAX}, ETP a RI. Trombin generační křivka má obvyklý tvar (Obr. 26). Při vyšších koncentracích Rivaroxabanu můžeme vidět, že tvar trombin generačních křivek je velmi podobný křivkám u Apixabanu, což je pochopitelné, protože Apixaban i Rivaroxaban mají stejný mechanismus účinku. Obě léčiva inhibují FXa. Při porovnávání obou léčiv nejde jednoznačně říci, které ovlivňuje C_{MAX} a ETP více. U Apixabanu ale byly naměřeny



Obr. 26: Trombin generační křivky získané při měření plasmy obsahující různé koncentrace Rivaroxabanu (světle zelená – 0 ng·ml⁻¹, tmavě zelená – 77 ng·ml⁻¹, světle modrá – 293 ng·ml⁻¹, modrá – 497 ng·ml⁻¹, tmavě modrá – 600 ng·ml⁻¹, fialová – 700 ng·ml⁻¹, červená – 800 ng·ml⁻¹, oranžová – 900 ng·ml⁻¹, žlutá – 996 ng·ml⁻¹).

mírně vyšší RI a křivky mají strmější sklon v propagační fázi, dochází zde tedy k rychlejší generaci trombinu během amplifikační fáze hemostázy.

Rivaroxaban, obsažený v přípravku Xarelto, je indikován pro prevenci dalších trombotických komplikací u pacientů po akutním koronárním syndromu, což je označení pro omezení průtoku krve věnčitými tepnami, které může vyústit až v IM. (SÚKL, 2008a; Bajaj et al., 2022) Pro tuto indikaci je doporučováno podávat 2,5 mg léčiva Xarelto dvakrát denně společně s kyselinou acetylsalicylovou. Koncentrace Rivaroxabanu v plasmě potom dosahují hodnot 8-53 ng·ml⁻¹. (Mueck et al., 2008) Nejlépe popisuje kinetiku tvorby trombinu u těchto pacientů trombin generační křivka získaná při měření s 77 ng·ml⁻¹ Rivaroxabanu. Při porovnání s měřením při 0 ng·ml⁻¹ došlo k prodloužení T_{MAX}, ale délka lag fáze zůstala stejná. Došlo ke snížení C_{MAX} přibližně na polovinu. V ETP tak velký rozdíl nebyl ale RI byl přibližně 4,5x menší. V grafu se to projevilo širokým zaobleným píkem. Situace je tedy podobná jako u Apixabanu, kde je nejvíce ovlivněna C_{MAX}, ale hodnoty ETP zůstávají relativně stejné. Není tedy sníženo celkové množství generovaného trombinu, jeho tvorba je pouze pomalejší.

Dále je přípravek Xarelto používán pro léčbu a prevenci recidivující HŽT a PE. V prvních 21 dnech je pacientů podáváno 15 mg dvakrát denně a poté je dávka upravena na 20 mg jednou denně. (SÚKL, 2008a) Při dávce 20 mg jednou denně dosahuje plasmatická koncentrace Rivaroxabanu až $244 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. (Buller et al., 2008) Této koncentraci nejlépe odpovídá měření při $293 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ Rivaroxabanu. Zde je zásah do hemostázy mnohem větší než při prevenci komplikací po akutním koronárním syndromu, ale zároveň je tato dávka určena pro dlouhodobou léčbu, což znamená, že omezení hemostázy nesmí být příliš drastické. Zde dochází k prodloužení lag fáze i T_{MAX} . C_{MAX} je snížena až na pětinu ETP je sníženo přibližně na polovinu. Trombin generační křivka nemá jasný pík. Je tedy mírně prodloužena iniciační fáze tvorby trombinu, ale nejvíce je opět ovlivněna amplifikační fáze. Můžeme také pozorovat prodlouženou konečnou fázi tvorby trombinu.

Za použití stejného postupu jako v případě Apixabanu byla určena meze detekce (Obr. 27 a 28). Vypočítaná minimální detekovatelná koncentrace trombinu byla $16,6 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což odpovídá $596 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ Rivaroxabanu. Nejnižší detekovatelná celková koncentrace trombinu byla $291,9 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a ta odpovídala $704 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ Rivaroxabanu. Opět můžeme vidět, že tady metodika i přístroj jsou naprosto dostačující pro monitorování léčby Rivaroxabanem.

Tab. 9: Výsledky TGA při měření plasmy s různými koncentracemi Rivaroxabanu

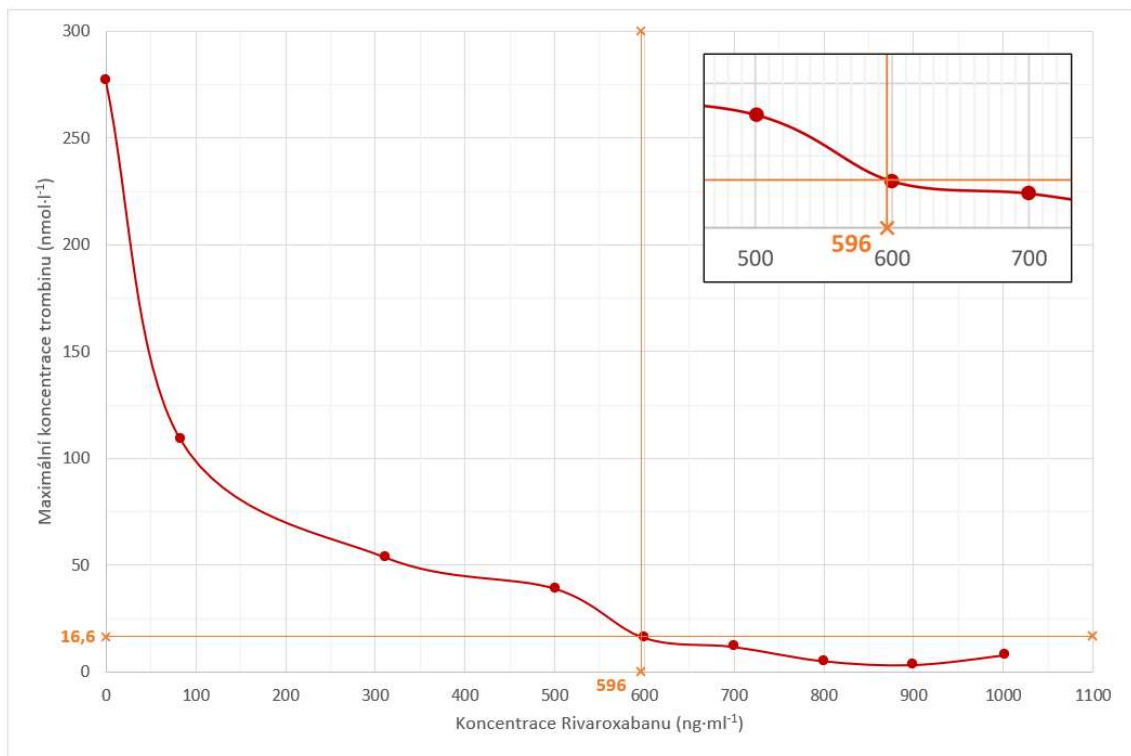
Koncentrace Rivaroxabanu ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Lag fáze (min)	T_{MAX} * (min)	C_{MAX} † ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	ETP ‡ ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	RI § ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
0	3,7	9	276,9	2762,8	52,1
77	3,6	13,1	109,1	2199	11,4
293	4,9	15,7	53,7	1467,3	5
497	6,5	22,2	39,1	1107,7	2,5
600	8,8	31,6	16,1	444,8	0,7
700	10,1	29,9	11,9	297,8	0,6
800	11,2	36,8	5,2	95,5	0,2
900	13,6	33,3	3,4	52,6	0,2
996	11,1	32,7	8	143,8	0,4

* T_{MAX} – čas do dosažení maximální koncentrace trombinu

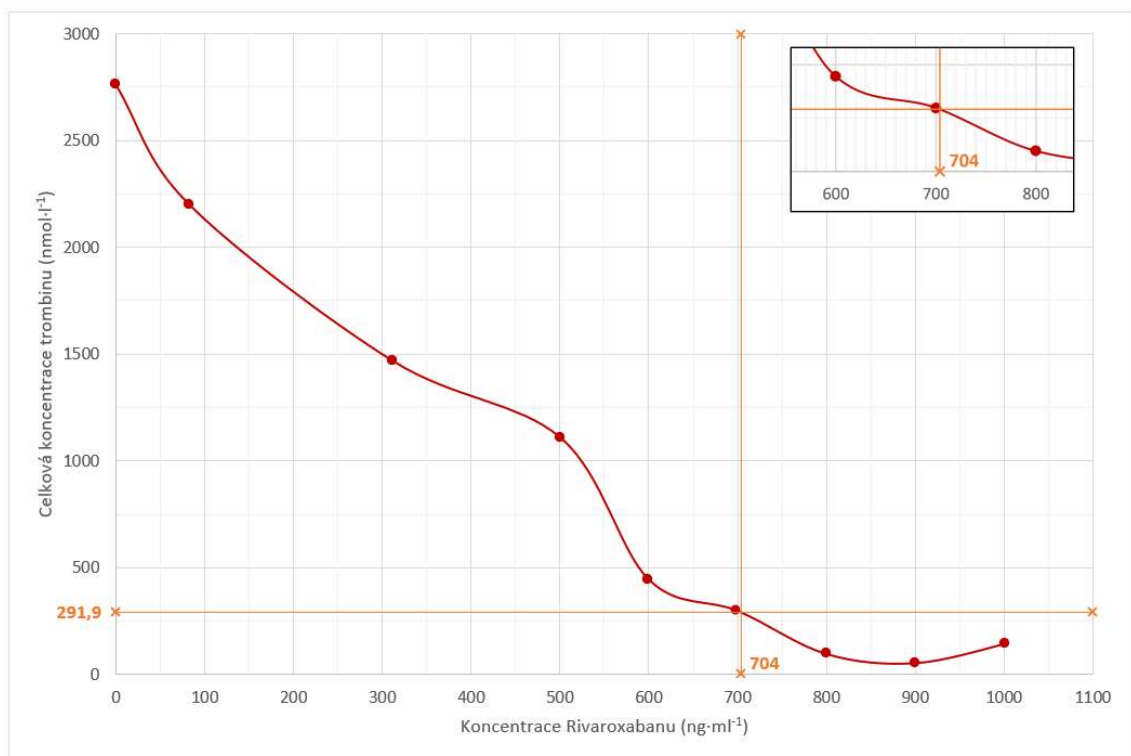
† C_{MAX} – maximální koncentrace trombinu

‡ ETP – endogenní trombinový potenciál

§ RI – rychlostní index



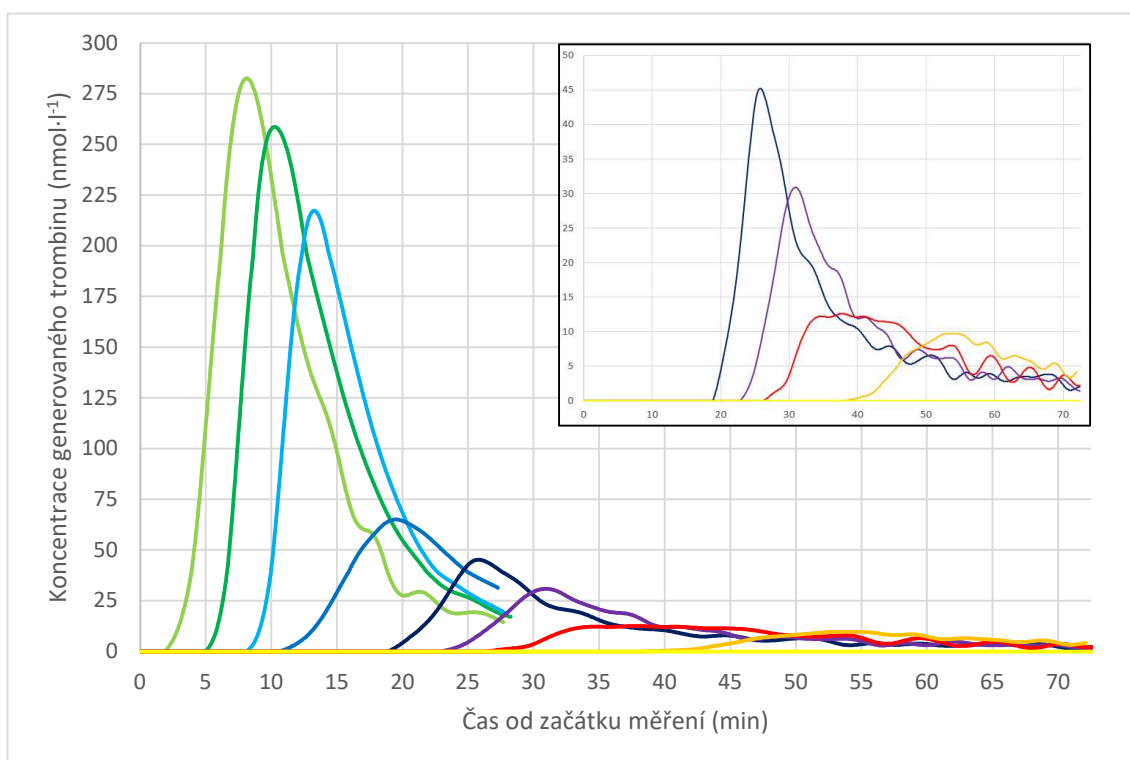
Obr. 27: Graf závislosti maximální koncentrace trombinu (C_{MAX}) na koncentraci Rivaroxabanu. Oranžově vyznačená je minimální detekovatelná koncentrace trombinu a odpovídající koncentrace Rivaroxabanu, při které je generováno toto množství trombinu.



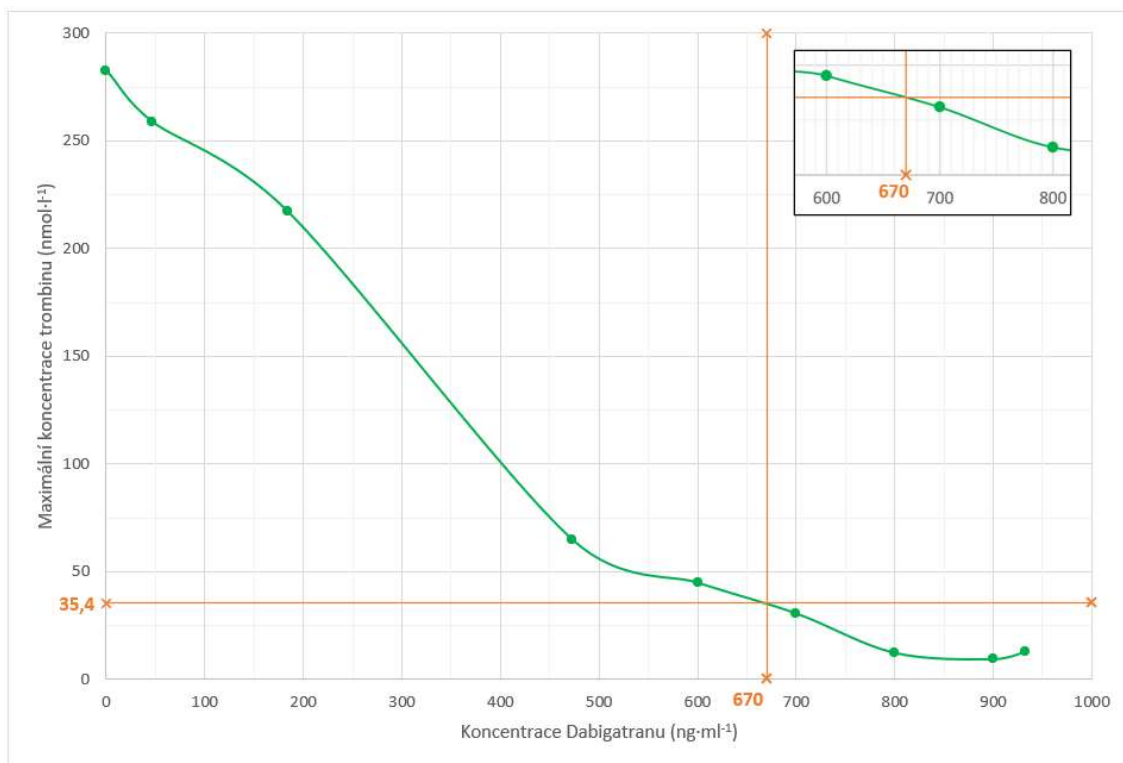
Obr. 28: Graf závislosti celkové koncentrace trombinu (ETP) na koncentraci Rivaroxabanu. Oranžově vyznačená je minimální detekovatelná koncentrace trombinu a odpovídající koncentrace Rivaroxabanu, při které je generováno toto množství trombinu.

4.3.3 Dabigatran

Stejně jako u předchozích dvou léčiv, byl také u měření s Dabigatranem (Tab. 10) rozdíl mezi nulovou koncentrací a NC. Lag fáze a T_{MAX} byla mírně delší než u NC a hodnoty C_{MAX} , ETP a RI byly přibližně 1,5x vyšší než u NC. Tvar trombin generační křivky při nulové koncentraci Dabigatranu (Obr. 29) byl podobný tvaru křivky NC s tím rozdílem, že v konečné fázi byla křivka více vlnitá. Při koncentracích 47 a 184 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ zůstává tvar křivky stejný, ale dochází k posunu doprava. Dochází k prodloužení lag fáze i T_{MAX} . Pík se nerozšiřuje nárůzdíl od měření s Apixabanem nebo Rivaroxabanem. U koncentrace 473 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ poté dochází ke snížení výšky píku a k posunutí více doprava. Tento trend je výraznější u měření s 600 a 700 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nad 800 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ dochází také k rozšíření píku a prodloužení T_{MAX} až na 53,2 minut. Rychlostní indexy jsou vyšší než při měření s Apixabanem a Rivaroxabanem. Podle Shaw et al. (2023) můžeme při měření TGA s přímými inhibitory trombinu pozorovat vysoký úzký pík, který je posunut více doprava. Při nižších koncentracích léčiv může také docházet k paradoxnímu navýšení píku a ETP. Toto navýšení píku ale nebylo při mém měření pozorováno. Zřejmě je způsobeno



Obr. 29: Trombin generační křivky získané při měření plasmy obsahující různé koncentrace Dabigatranu (světle zelená – 0 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, tmavě zelená – 47 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, světle modrá – 184 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, modrá – 473 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, tmavě modrá – 600 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, fialová – 700 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, červená – 800 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, oranžová – 900 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, žlutá – 932 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

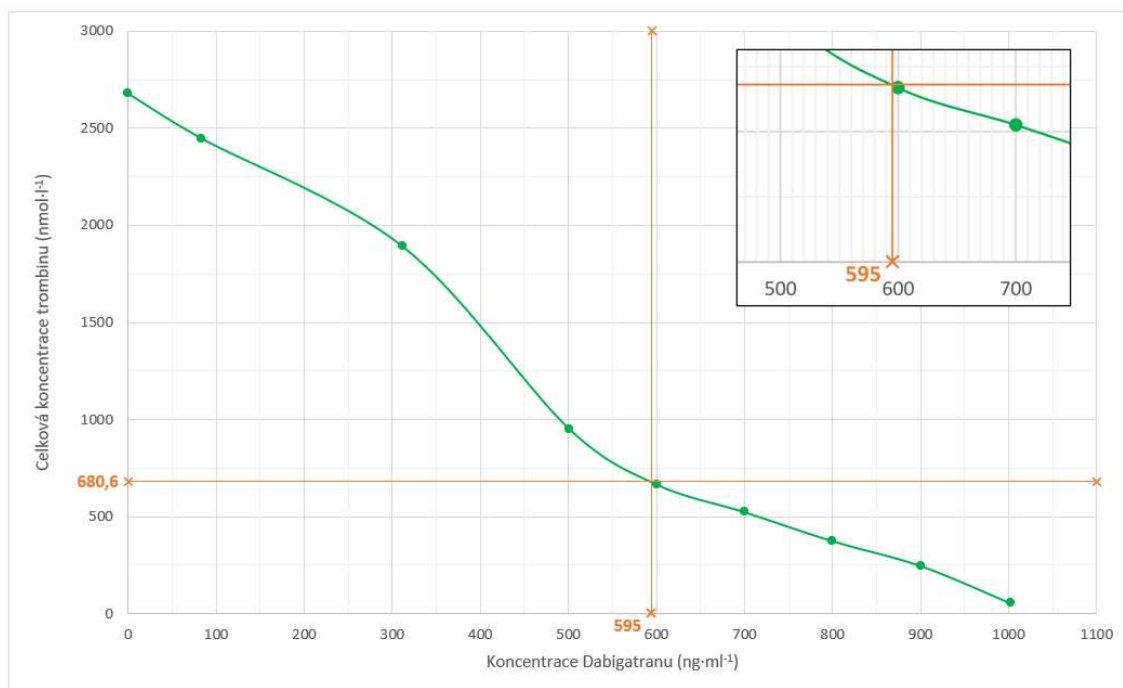


Obr. 30: Graf závislosti maximální koncentrace trombinu (C_{MAX}) na koncentraci Dabigatranu. Oranžově vyznačená je minimální detekovatelná koncentrace trombinu a odpovídající koncentrace Dabigatranu, při které je generováno toto množství trombinu.

přítomností léčiva v kalibrační plasmě nebo nepřesností algoritmu, který zpracovává naměřenou fluorescenci. Proto by měla být antikoagulační aktivita Dabigatranu spíše posuzována podle délky lag fáze a T_{MAX} (Bloemen et al., 2018).

Mez detekce (Obr. 30 a 31) byla u Dabigatranu vypočítána stejně jako v případě Apixabanu a Rivaroxabanu. Vypočítaná limitní koncentrace trombinu byla $35,4 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což odpovídá $670 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ Dabigatranu. Limitní celková koncentrace trombinu byla $680,6 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a ta odpovídala $595 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ Dabigatranu.

Dabigatran je jako léčivo Pradaxa indikován pro prevenci a léčbu trombotických komplikací po ortopedických operacích. Jinak zdraví pacienti dostávají od prvního dne po operaci dávku 110 mg Dabigatranu dvakrát denně. Rovnovážná plasmatická koncentrace Dabigatranu 2 h po užití dávky je $133 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro prevenci CMP u rizikových pacientů je doporučována dávka 150 mg dvakrát denně. Poté rovnovážná plasmatická koncentrace Dabigatranu dosahuje hodnoty $184 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. (SÚKL, 2008b; Reilly et al., 2014) Obě tyto situace popisuje nejlépe trombin generační křivka získaná při měření s $184 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při této koncentraci je navíc ovlivněna délka lag fáze, je prodloužena 2,5x oproti nulové koncentraci Dabigatranu. T_{MAX} je prodloužena 1,6x. Hodnoty C_{MAX} , ETP a RI jsou sníženy, ale nejsou ovlivněny tolik jako lag fáze a T_{MAX} .



Obr. 31: Graf závislosti celkové koncentrace trombinu (ETP) na koncentraci Dabigatranu. Oranžově vyznačená je minimální detekovatelná koncentrace trombinu a odpovídající koncentrace Dabigatranu, při které je generováno toto množství trombinu.

K prodloužení lag fáze dochází, protože trombin generovaný po iniciaci hemostázy je ihned inhibován Dabigatranem a nemůže nastartovat amplifikační smyčku aktivací FV a FVIII. Po překonání této inhibice dostatečným množstvím trombinu probíhá propagační a konečná fáze normálně. Při předávkování Dabigatranem není generováno dostatečné množství trombinu, aby došlo k překonání inhibice, a amplifikační smyčka se nespustí.

Tab. 10: Výsledky TGA při měření plasmy s různými koncentracemi Dabigatranu

Koncentrace Dabigatranu (ng/ml)	Lag fáze (min)	T _{MAX} (min)	C _{MAX} (nM)	ETP (nM)	RI (nM/min)
0	3,7	8,1	282,6	2678,9	64
47	6,3	10,3	258,7	2448,9	64,5
184	9,4	13,2	217,3	1891,4	56,9
473	12,4	19,4	65,1	953,2	9,3
600	19,8	25,8	45,2	667,8	7,5
700	24,4	31	30,9	525,2	4,7
800	24,3	37,8	12,6	375,7	0,9
900	36	53,2	9,7	248,1	0,6
932	34,1	44,4	13,1	56,8	1,3

5 ZÁVĚR

Pro optimalizaci TGA byly na základě vypracované literární rešerše a vlastních měření v experimentální části využity změny koncentrací tkáňového faktoru a fosfolipidů jako klíčových induktorů tvorby trombinu.

Experimentální část této práce analyzovala vliv různých koncentrací TF a PH na parametry trombin generálních křivek při rozdílné koncentraci plazmatických koagulačních faktorů (normální plasma, plasma se sníženým množstvím koagulačních faktorů a plasma se zvýšeným množstvím koagulačních faktorů). Výsledky ukazují, že délka lag fáze a T_{MAX} závisí na koncentraci TF, ale hodnoty C_{MAX} , ETP a RI jsou na této koncentraci nezávislé. Výsledkem optimalizace metody je zjištění, že optimální koncentrace TF je nad $5 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzhledem k měřenému množství trombinu se koncentrace TF chová nepřímo úměrně – pro měření plasmy se sníženou schopností generovat trombin je lepší použít vyšší koncentrace TF než při měření plasmy, u které dochází k větší generaci trombinu. Při extrémně vysokých koncentracích TF jako je $6\ 400$ a $640 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly ale pozorovány trombin generální křivky sinusoidního tvaru s neměřitelnými parametry.

Při využití TGA pro monitoraci antikoagulační léčby, která inhibuje přímo (Dabigatran) nebo nepřímo (Rivaroxaban a Apixaban) tvorbu trombinu byl zjištěn rozdílný vliv těchto látek na TGA. Xabany ovlivňují zejména hodnotu C_{MAX} bez vlivu na ETP, kdežto Dabigatran ovlivňuje délku lag fáze. V grafu xabany způsobují snížení a rozšíření píku. Generace trombinu probíhá pomaleji, ale zato delší dobu než u plasmy bez léčiv. Dabigatran způsobuje posun píku doprava, ale tvar píku zůstává stejný, rozšiřuje se pouze při velmi vysokých koncentracích Dabigatranu.

Z analytických parametrů TGA byly zjištěny limity detekce pro každé léčivo (na základě stanovení limitní maximální koncentrace trombinu a limitní celkové koncentrace trombinu, která může být přístrojem Ceveron® alpha ještě detekována). Také byly určeny koncentrace příslušného léčiva, které odpovídají těmto limitním koncentracím trombinu. Tyto limitní koncentrace léčiv vždy mnohonásobně převyšují koncentrace, kterých je možné dosáhnout v plasmě u pacientů užívajících tato léčiva, aniž by bylo ohroženo jejich zdraví. Zavedená metodika TGA je tedy dostačující pro monitorování antikoagulační léčby DOACs.

6 LITERATURA

- Adams, T., & Huntington, J. (2016). Structural transitions during prothrombin activation: On the importance of fragment 2. *Biochimie*, 122, 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.013>
- Ahmed, I., Majeed, A., & Powell, R. (2007). Heparin induced thrombocytopenia: diagnosis and management update. *Postgraduate Medical Journal*, 83(983), 575-582. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2007.059188>
- Al Dieri, R., de Laat, B., & Hemker, H. (2012). Thrombin generation: What have we learned?. *Blood Reviews*, 26(5), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.06.001>
- Almarshad, F., Alaklabi, A., Bakhsh, E., Pathan, A., & Almegren, M. (2018). Use of direct oral anticoagulants in daily practice. *American Journal of Blood Research*, 8(4), 57-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6334188/>
- Amiral, J., & Seghatchian, J. (2019). Revisiting the activated protein C-protein S-thrombomodulin ternary pathway: Impact of new understanding on its laboratory investigation. *Transfusion and Apheresis Science*, 58(4), 538-544. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.06.008>
- Artang, R., Anderson, M., Riley, P., & Nielsen, J. (2017). Assessment of the effect of direct oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and apixaban in healthy male volunteers using a thrombin generation assay. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 1(2), 194-201. <https://doi.org/10.1002/rth2.12044>
- Bajaj, R., Jain, A., & Knight, C. (2022). Definitions of acute coronary syndromes. *Medicine*, 50(7), 420-423. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2022.04.005>
- Bajzar, L., Morser, J., & Nesheim, M. (1996). TAFI, or Plasma Procarboxypeptidase B, Couples the Coagulation and Fibrinolytic Cascades through the Thrombin-Thrombomodulin Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16603-16608. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.28.16603>
- Barnes, G., Ageno, W., Ansell, J., & Kaatz, S. (2015). Recommendation on the nomenclature for oral anticoagulants: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(6), 1154-1156. <https://doi.org/10.1111/jth.12969>
- Biswas, S., Bahar, Y., Bahar, A., Safiriyu, I., Mathai, S., Hajra, A., Gupta, R., & Aronow, W. (2023). Present Knowledge on Direct Oral Anticoagulant and Novel Oral Anti Coagulants and Their Specific Antidotes: A Comprehensive Review Article. *Current Problems in Cardiology*, 48(2), 101483. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2022.101483>
- Björk, I., Nordling, K., Larsson, I., & Olson, S. (1992). Kinetic characterization of the substrate reaction between a complex of antithrombin with a synthetic reactive-bond loop tetradecapeptide and four target proteinases of the inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27), 19047-19050. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41737-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41737-1)
- Bloemen, S., Zwaveling, S., Douxfils, J., Roest, M., Kremers, R., & Mullier, F. (2018). The anticoagulant effect of dabigatran is reflected in the lag time and time-to-peak, but not in the endogenous thrombin potential or peak, of thrombin generation. *Thrombosis Research*, 171, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.10.005>
- Bode, W., Turk, D., & Karshikov, A. (1992). The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of d-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human α -thrombin: Structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Science*, 1(4), 426-471. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010402>
- Brinkman, H., Zuurveld, M., & Meijers, J. (2022). In vitro reversal of direct factor Xa inhibitors: Direct comparison of andexanet alfa and prothrombin complex concentrates Cofact and Beriplex/Kcentra. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 6(5), e12775. <https://doi.org/10.1002/rth2.12775>
- Broze Jr., G., Lange, G., Duffin, K., & MacPhail, L. (1994). Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 5(4), 551-559. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7841311/>

- Bucha, E., Nowak, G., Czerwinski, R., & Thiel, H. (1999). R-Hirudin as Anticoagulant in Regular Hemodialysis Therapy: Finding of Therapeutic R-Hirudin Blood/Plasma Concentrations and Respective Dosages. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 5(3), 164-170. <https://doi.org/10.1177/107602969900500305>
- Buller, H., Lensing, A., Prins, M., Agnelli, G., Cohen, A., Gallus, A., Misselwitz, F., Raskob, G., Schellong, S., & Segers, A. (2008). A dose-ranging study evaluating once-daily oral administration of the factor Xa inhibitor rivaroxaban in the treatment of patients with acute symptomatic deep vein thrombosis: the Einstein-DVT Dose-Ranging Study. *Blood*, 112(6), 2242-2247. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-160143>
- Butenas, S., Bouchard, B., Brummel-Ziedins, K., Parhami-Seren, B., & Mann, K. (2005). Tissue factor activity in whole blood. *Blood*, 105(7), 2764-2770. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3567>
- Carter, W., Cama, E., & Huntington, J. (2005). Crystal Structure of Thrombin Bound to Heparin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2745-2749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411606200>
- ClinicalTrials.gov. Trial of Andexanet Alfa in ICH Patients Receiving an Oral FXa Inhibitor. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03661528> (29. 01. 2023)
- Dam, H. (1935). The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochemical Journal*, 29(6), 1273-1285. <https://doi.org/10.1042/bj0291273>
- Dargaud, Y., Wolberg, A., Gray, E., Negrier, C., & Hemker, H. (2017). Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 15(8), 1704-1707. <https://doi.org/10.1111/jth.13743>
- De Ceunynck, K., Peters, C., Jain, A., Higgins, S., Aisiku, O., Fitch-Tewfik, J., Chaudhry, S., Dockendorff, C., Parikh, S., Ingber, D., & Flaumenhaft, R. (2018). PAR1 agonists stimulate APC-like endothelial cytoprotection and confer resistance to thromboinflammatory injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(5), E982-E991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718600115>
- Depasse, F., Binder, N., Mueller, J., Wissel, T., Schwerts, S., Germer, M., Hermes, B., & Turecek, P. (2021). Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 19(12), 2907-2917. <https://doi.org/10.1111/jth.15529>
- Drake, T., Morrissey, J., & Edgington, T. (1989). Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *The American journal of pathology*, 134(5), 1087-1097. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2719077/>
- Duarte, R., Ferreira, C., Rios, D., Reis, H., & Carvalho, M. (2017). Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 39(3), 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.03.009>
- Duarte, R., Rios, D., Leite, P., Alves, L., Magalhães, H., & Carvalho, M. (2019). Thrombin generation test for evaluating hemostatic effects of Brazilian snake venoms. *Toxicon*, 163, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.012>
- Dulíček, P., Thibaud, Z., Pejková, A., & Sadílek, P. (2022). Direct anticoagulants and general practitioner. *Medicina pro praxi*, 19(1), 58-61. <https://doi.org/10.36290/med.2022.008>
- Ellis, V., Behrendt, N., & Danø, K. (1991). Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *The Journal of biological chemistry*, 266(19), 12752-12758. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1829461/>
- Eriksson, B., Wille-Jørgensen, P., Kälebo, P., Mouret, P., Rosencher, N., Bösch, P., Baur, M., Ekman, S., Bach, D., Lindbratt, S., & Close, P. (1997). A Comparison of Recombinant Hirudin with a Low-Molecular-Weight Heparin to Prevent Thromboembolic Complications after Total Hip Replacement. *New England Journal of Medicine*, 337(19), 1329-1335. <https://doi.org/10.1056/NEJM199711063371901>
- Esmon, N., Owen, W., & Esmon, C. (1982). Isolation of a Membrane-bound Cofactor for Thrombin-catalyzed Activation of Protein C. *Journal of Biological Chemistry*, 257(2), 859-864. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)68276-1/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)68276-1/pdf)

- FDA. (2007). 510(k) Substantial equivalence determination: decision summary (for HemosIL RecombiPlasTin 2G). U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland, USA, 11 stran.
- FDA. (2021). Package Insert and Patient Information - Ceprotin. U. S. Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland, USA, 18 stran.
- Feistritzer, C., & Riewald, M. (2005). Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood*, *105*(8), 3178-3184. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3985>
- Fell, C., Ivanovic, N., Johnson, S., & Seegers, W. (1954). Differentiation of Plasma Antithrombin Activities. *Experimental Biology and Medicine*, *85*(2), 199-202. <https://doi.org/10.3181/00379727-85-20829>
- Fenton II, J., Olson, T., Zabranski, M., & Wilner, G. (1988). Anion-binding exosite of human .alpha.-thrombin and fibrin(ogen) recognition. *Biochemistry*, *27*(18), 7106-7112. <https://doi.org/10.1021/bi00418a066>
- Fenton II, J., Villanueva, G., Ofosu, F., & Maraganore, J. (1991). Thrombin Inhibition by Hirudin: How Hirudin Inhibits Thrombin. *Haemostasis*, *21*(1), 27-31. <https://doi.org/10.1159/000216259>
- Frank, R., Farber, H., Stefanidis, I., Lanzmich, R., & Kierdorf, H. (1999). Hirudin elimination by hemofiltration: A comparative in vitro study of different membranes. *Kidney International*, *56*(72), S41-S45. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.56.s72.3.x>
- Fukasawa, T., Seki, T., Nakashima, M., & Kawakami, K. (2022). Comparative effectiveness and safety of edoxaban, rivaroxaban, and apixaban in patients with venous thromboembolism: A cohort study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *20*(9), 2083-2097. <https://doi.org/10.1111/jth.15799>
- Galliazzo, S., Donadini, M., & Ageno, W. (2018). Antidotes for the direct oral anticoagulants: What news?. *Thrombosis Research*, *164*(1), S119-S123. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.01.006>
- Garcia, D., Baglin, T., Weitz, J., & Samama, M. (2012). Parenteral Anticoagulants. *Chest*, *141*(2), e24S-e43S. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2291>
- Gerotziakas, G., Depasse, F., Busson, J., Leflem, L., Elalamy, I., & Samama, M. (2005). Towards a standardization of thrombin generation assessment: The influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thrombosis Journal*, *3*(1), Article number: 16. <https://doi.org/10.1186/1477-9560-3-16>
- Gettins, P. (2002). Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chemical Reviews*, *102*(12), 4751-4804. <https://doi.org/10.1021/cr010170+>
- Glund, S., Moschetti, V., Norris, S., Stangier, J., Schmohl, M., Ryn, J., Lang, B., Ramael, S., & Reilly, P. (2017). A randomised study in healthy volunteers to investigate the safety, tolerability and pharmacokinetics of idarucizumab, a specific antidote to dabigatran. *Thrombosis and Haemostasis*, *113*(05), 943-951. <https://doi.org/10.1160/TH14-12-1080>
- Greinacher, A., & Warkentin, T. (2008). The direct thrombin inhibitor hirudin. *Thrombosis and Haemostasis*, *99*(5), 819-829. <https://doi.org/10.1160/TH07-11-0693>
- Griffin, J., Zlokovic, B., & Mosnier, L. (2015). Activated protein C: biased for translation. *Blood*, *125*(19), 2898-2907. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-355974>
- Gruber, A., Griffin, J., Harker, L., & Hanson, S. (1989). Inhibition of platelet-dependent thrombus formation by human activated protein C in a primate model. *Blood*, *73*(3), 639-642. <https://doi.org/10.1182/blood.V73.3.639.639>
- Halder, M., Petsophonsakul, P., Akbulut, A., Pavlic, A., Bohan, F., Anderson, E., Maresz, K., Kramann, R., & Schurgers, L. (2019). Vitamin K: Double Bonds beyond Coagulation Insights into Differences between Vitamin K1 and K2 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4), 896. <https://doi.org/10.3390/ijms20040896>
- Hannon, M., & Lamont, J. (2012). Compartment Syndrome Due to Massive Leg Hematoma After Primary Total Hip Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*, *27*(7), 1414.e9-1414.e11. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2011.10.032>

- Han, X., Guo, B., Li, Y., & Zhu, B. (2014). Tissue factor in tumor microenvironment: a systematic review. *Journal of Hematology & Oncology*, 7(1), Article number: 54. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0054-8>
- Hayward, C., & Moffat, K. (2013). Laboratory testing for bleeding disorders: strategic uses of high and low-yield tests. *International Journal of Laboratory Hematology*, 35(3), 322-333. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12077>
- Hemker, H., Wielders, S., Kessels, H., & Béguin, S. (1993). Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 70(4), 617-624. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7509511/>
- Hemker, C., Giesen, P., Ramjee, M., Wagenvoort, R., & Béguin, S. (2017). The Thrombogram: Monitoring Thrombin Generation in Platelet Rich Plasma. *Thrombosis and Haemostasis*, 83(04), 589-591. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613868>
- Hluší, A., Úlehlová, J., Slavík, L., Krčová, V., & Indrák, K. (2010a). Globální hodnocení funkce hemostázy – část I. Trombin generační test. *Transfúze a hematologie dnes*, 2010(2), 65-70. <https://www.prolekare.cz/casopisy/transfúze-hematologie-dnes/2010-2/globalni-hodnoceni-funkce-hemostazy-cast-i-trombin-generacni-test-33176>
- Hluší, A., Slavík, L., Úlehlová, J., Krčová, V., Zapletalová, J., & Indrák, K. (2010b). Globální hodnocení funkce hemostázy – část II. Vlastní zkušenosti s použitím trombin generačního testu u pacientů s trombofilií. *Transfúze a hematologie dnes*, 2010(3), 121–125. <https://www.prolekare.cz/casopisy/transfúze-hematologie-dnes/2010-3/globalni-hodnoceni-funkce-hemostazy-cast-ii-vlastni-zkusenosti-s-pouzitim-trombin-generacniho-testu-u-pacientu-s-trombofili-33342>
- Hoffman, R., Benz Jr., E. J., Silberstein, L. E., Heslop, H. E., Weitz, J. I., Anastasi, J., & Abutalib, S. A. (2018). *Hematology: Basic Principles and Practice* (7. vydání). Elsevier.
- Hoylaerts, M., Rijken, D., Lijnen, H., & Collen, D. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 2912-2919. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81051-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81051-7)
- Huhle, G., Hoffmann, U., Song, X., Wang, L., Heene, D., & Harenberg, J. (1999). Immunologic response to recombinant hirudin in HIT type II patients during long-term treatment. *British Journal of Haematology*, 106(1), 195-201. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01532.x>
- Huhle, G., Liebe, V., Hudek, R., & Heene, D. (2001). Anti-R-Hirudin Antibodies Reveal Clinical Relevance through Direct Functional Inactivation of R-Hirudin or Prolongation of R-Hirudin's Plasma Half-life. *Thrombosis and Haemostasis*, 85(05), 936-938. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615773>
- Hussar, D., & Zimmerman, D. (2011). New drugs: Dabigatran etexilate mesylate, fingolimod hydrochloride, and ulipristal acetate. *Journal of the American Pharmacists Association*, 51(1), 122-126. <https://doi.org/10.1331/JAPhA.2011.11506>
- Chai-Adisaksopha, C., Hillis, C., Isayama, T., Lim, W., Iorio, A., & Crowther, M. (2015). Mortality outcomes in patients receiving direct oral anticoagulants: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(11), 2012-2020. <https://doi.org/10.1111/jth.13139>
- Chong, B. (2003). Heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7), 1471-1478. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00270.x>
- Chou, H., Yang, R., Chen, C., & Jong, Y. (2008). Valproate-induced Hyperammonemic Encephalopathy. *Pediatrics & Neonatology*, 49(5), 201-204. [https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(09\)60010-3](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(09)60010-3)
- Jaspers, T., Shudofsky, K., Huisman, M., Meijer, K., & Khorsand, N. (2021). A meta-analysis of andexanet alfa and prothrombin complex concentrate in the treatment of factor Xa inhibitor-related major bleeding. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 5(4), E12518. <https://doi.org/10.1002/rth2.12518>
- Joyce, D., Gelbert, L., Ciaccia, A., DeHoff, B., & Grinnell, B. (2001). Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 276(14), 11199 –11203. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100017200>

- Kavut, A., & Koca, E. (2012). Successful desensitization with un-fractionated heparin in a patient with heparin allergy and tolerance to fondaparinux. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 30(2), 162-166. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22830297/>
- Kisiel, W., Canfield, W., Ericsson, L., & Davie, E. (1977). Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry*, 16(26), 5824-5831. <https://doi.org/10.1021/bi00645a029>
- Kremers, R., Wagenvoord, R., & Hemker, H. (2017). Comment on the use of computational models to study the effect of apixaban and rivaroxaban on thrombin generation. *Thrombosis and Haemostasis*, 115(04), 869-870. <https://doi.org/10.1160/TH15-09-0699>
- Krishnaswamy, S., Mann, K., & Nesheim, M. (1986). The prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin proceeds through the intermediate meizothrombin in an ordered, sequential reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 261(19), 8977-8984. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84477-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84477-0)
- Kvasnička, J. (2020). Andexanet alfa – specifické antidotum při závažném krvácení po léčbě apixabanem nebo rivaroxabanem. *Remedia*, 30(3), 284–286. <https://www.remmedia.cz/rubriky/aktuality/andexanet-alfa-specificke-antidotum-pri-zavaznem-krvaceni-po-lecbe-apixabanem-nebo-rivaroxabanem-11348/>
- Leonardi, M. (2019). Laboratory Evaluation of Hemostasis Disorders. *Physician Assistant Clinics*, 4(3), 609-623. <https://doi.org/10.1016/j.cpha.2019.02.014>
- Levy, J., Szlam, F., Wolberg, A., & Winkler, A. (2014). Clinical Use of the Activated Partial Thromboplastin Time and Prothrombin Time for Screening. *Clinics in Laboratory Medicine*, 34(3), 453-477. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.06.005>
- Lindahl, A., Jacobsen, P., Sandset, P., & Abildgaard, U. (1991a). Tissue factor pathway inhibitor with high anticoagulant activity is increased in post-heparin plasma and in plasma from cancer patients. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2(6), 713-722. <https://doi.org/10.1097/00001721-199112000-00004>
- Lindahl, A., Abildgaard, U., & Staalesen, R. (1991b). The anticoagulant effect in heparinized blood and plasma resulting from interactions with extrinsic pathway inhibitor. *Thrombosis Research*, 64(2), 155-168. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(91\)90115-D](https://doi.org/10.1016/0049-3848(91)90115-D)
- Liu, Z., Ji, S., Sheng, J., & Wang, F. (2014). Pharmacological effects and clinical applications of ultra low molecular weight heparins. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.5582/ddt.8.1>
- Loeffen, R., Kleinegris, M., Loubele, S., Pluijmen, P., Fens, D., van Oerle, R., ten Cate, H., & Spronk, H. (2012). Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(12), 2544-2554. <https://doi.org/10.1111/jth.12012>
- Lubenow, N., Eichler, P., Lietz, T., & Greinacher, A. (2005). Lepirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia - results of the third prospective study (HAT-3) and a combined analysis of HAT-1, HAT-2, and HAT-3. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(11), 2428-2436. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01623.x>
- Lu, G., DeGuzman, F., Hollenbach, S., Karbarz, M., Abe, K., Lee, G., Luan, P., Hutchaleelaha, A., Inagaki, M., Conley, P., Phillips, D., & Sinha, U. (2013). A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. *Nature Medicine*, 19(4), 446-451. <https://doi.org/10.1038/nm.3102>
- Lyden, P., Pryor, K., Coffey, C., Cudkowicz, M., Conwit, R., Jadhav, A., Sawyer, R., Claassen, J., Adeoye, O., Song, S., Hannon, P., Rost, N., Hinduja, A., Torbey, M., Lee, J., Benesch, C., Rippee, M., Rymer, M., Froehler, M. et al. (2019). Final Results of the RHAPSODY Trial: A Multi-Center, Phase 2 Trial Using a Continual Reassessment Method to Determine the Safety and Tolerability of 3K3A-APC, A Recombinant Variant of Human Activated Protein C, in Combination with Tissue Plasminogen Activ. *Annals of Neurology*, 85(1), 125-136. <https://doi.org/10.1002/ana.25383>
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451(7181), 914-918. <https://doi.org/10.1038/nature06797>
- Makhoul, S., Panova-Noeva, M., Regnault, V., Ruf, W., Wenzel, P., & Lagrange, J. (2019). Rivaroxaban Effects Illustrate the Underestimated Importance of Activated Platelets in

- Thrombin Generation Assessed by Calibrated Automated Thrombography. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1990. <https://doi.org/10.3390/jcm8111990>
- Mammen, E. (1998). Antithrombin: Its Physiological Importance and Role in DIC. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 24(01), 19-25. <https://doi.org/10.1055/s-2007-995819>
- Maniatis, A. (2009). Pathophysiology of paraprotein production. *Renal Failure*, 20(6), 821-828. <https://doi.org/10.3109/08860229809045179>
- Marcum, J., Atha, D., Fritze, L., Nawroth, P., Stern, D., & Rosenberg, R. (1986). Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 261(16), 7507-7517. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38421-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38421-1)
- Mast, A., Acharya, N., Malecha, M., Hall, C., & Dietzen, D. (2002). Characterization of the Association of Tissue Factor Pathway Inhibitor With Human Placenta. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(12), 2099-2104. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000042456.84190.F0>
- Miles, L., Dahlberg, C., Plescia, J., Felez, J., Kato, K., & Plow, E. (1991). Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of .alpha.-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry*, 30(6), 1682-1691. <https://doi.org/10.1021/bi00220a034>
- Mosnier, L., Zlokovic, B., & Griffin, J. (2006). The cytoprotective protein C pathway. *Blood*, 109(8), 3161-3172. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-003004>
- Mueck, W., Eriksson, B., Bauer, K., Borris, L., Dahl, O., Fisher, W., Gent, M., Haas, S., Huisman, M., Kakkar, A., Kälebo, P., Kwong, L., Misselwitz, F., & Turpie, A. (2008). Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Rivaroxaban – an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor – in Patients Undergoing Major Orthopaedic Surgery. *Clinical Pharmacokinetics*, 47(3), 203-216. <https://doi.org/10.2165/00003088-200847030-00006>
- Murphy, S., & Bellamy, M. (2013). The quest for the magic bullet: Centoxin, Drotrecogin Alfa and lessons not learned. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*, 3(6), 316-319. <https://doi.org/10.1016/j.tacc.2013.05.004>
- Nederpelt, C., Naar, L., Krijnen, P., le Cessie, S., Kaafarani, H., Huisman, M., Velmahos, G., & Schipper, I. (2021). Andexanet Alfa or Prothrombin Complex Concentrate for Factor Xa Inhibitor Reversal in Acute Major Bleeding: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Critical Care Medicine*, 49(10), e1025-e1036. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005059>
- Novotny, W., Girard, T., Miletich, J., & Broze, G. (1989). Purification and characterization of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor from human plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 264(31), 18832-18837. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)51542-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)51542-8)
- Oduah, E., Linhardt, R., & Sharfstein, S. (2016). Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals*, 9(3), 38. <https://doi.org/10.3390/ph9030038>
- Ogiwara, K., Nogami, K., Matsumoto, N., Noguchi-Sasaki, M., Hirata, M., Soeda, T., & Shima, M. (2020). A modified thrombin generation assay to evaluate the plasma coagulation potential in the presence of emicizumab, the bispecific antibody to factors IXa/X. *International Journal of Hematology*, 112(5), 621-630. <https://doi.org/10.1007/s12185-020-02959-x>
- Oliver, J., Monroe, D., Church, F., Roberts, H., & Hoffman, M. (2002). Activated protein C cleaves factor Va more efficiently on endothelium than on platelet surfaces. *Blood*, 100(2), 539-546. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.2.539>
- Olson, S., Richard, B., Izaguirre, G., Schedin-Weiss, S., & Gettins, P. (2010). Molecular mechanisms of antithrombin–heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie*, 92(11), 1587-1596. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.011>
- Onishi, A., Linhardt, R., Dordick, J., & Ange, K. (2016). Heparin and anticoagulation. *Frontiers in Bioscience*, 21(7), 1372-1392. <https://doi.org/10.2741/4462>
- O'Reilly, R., & Aggeler, P. (1966). Surreptitious Ingestion of Coumarin Anticoagulant Drugs. *Annals of Internal Medicine*, 64(5), 1034-1041. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-64-5-1034>
- Osterud, B., & Rapaport, S. (1977). Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5260-5264. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5260>

- Periyah, M., Halim, A., & Saad, A. (2017). Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 11(4), 319–327. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5767294/>
- Pollack, C., Reilly, P., van Ryn, J., Eikelboom, J., Glund, S., Bernstein, R., Dubiel, R., Huisman, M., Hylek, E., Kam, C., Kamphuisen, P., Kreuzer, J., Levy, J., Royle, G., Sellke, F., Stangier, J., Steiner, T., Verhamme, P., Wang, B. et al. (2017). Idarucizumab for Dabigatran Reversal — Full Cohort Analysis. *New England Journal of Medicine*, 377(5), 431–441. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707278>
- Prior, S., Mann, K., Freeman, K., & Butenas, S. (2018). Continuous thrombin generation in whole blood: New applications for assessing activators and inhibitors of coagulation. *Analytical Biochemistry*, 551, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.05.005>
- Qiu, M., Huang, S., Luo, C., Wu, Z., Liang, B., Huang, H., Ci, Z., Zhang, D., Han, L., & Lin, J. (2021). Pharmacological and clinical application of heparin progress: An essential drug for modern medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111561. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111561>
- Quick, A. J., Stanley-Brown, M., & Bancroft, F. W. (1935). A Study of the Coagulation Defect in Hemophilia and in Jaundice. *Thrombosis and Haemostasis*, 44(01), 002–005. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1650068>
- Quick, A. J. (1938). The normal antithrombin of the blood and its relation to heparin. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 123(3), 712–719. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1938.123.3.712>
- Radin, M., Barinotti, A., Cecchi, I., Foddai, S., Rubini, E., Roccatello, D., Menegatti, E., & Sciascia, S. (2022). Thrombin generation assay and lupus anticoagulant synergically distinguish populations of patients with antiphospholipid antibodies. *Journal of Clinical Pathology*, 132022, jclinpath:jcp-2022-208199v1. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208199>
- Rajgopal, R., Bear, M., Butcher, M., & Shaughnessy, S. (2008). The effects of heparin and low molecular weight heparins on bone. *Thrombosis Research*, 122(3), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.10.025>
- Rand, M., Lock, J., van't Veer, C., Gaffney, D., & Mann, K. (1996). Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood*, 88(9), 3432–3445. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8896408/>
- Reilly, R. (2003). Heparin-induced thrombocytopenia in dialysis: The Pathophysiology of Immune-mediated Heparin-induced Thrombocytopenia. *Seminars in Dialysis*, 16(1), 54–60. <https://doi.org/10.1046/j.1525-139X.2003.03013.x>
- Reilly, P., Lehr, T., Haertter, S., Connolly, S., Yusuf, S., Eikelboom, J., Ezekowitz, M., Nehmiz, G., Wang, S., & Wallentin, L. (2014). The Effect of Dabigatran Plasma Concentrations and Patient Characteristics on the Frequency of Ischemic Stroke and Major Bleeding in Atrial Fibrillation Patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(4), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.07.104>
- Rigano, J., Ng, C., Nandurkar, H., & Ho, P. (2018). Thrombin generation estimates the anticoagulation effect of direct oral anticoagulants with significant interindividual variability observed. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 29(2), 148–154. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000678>
- Rosenberg, R., & Damus, P. (1973). The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor. *Journal of Biological Chemistry*, 248(18), 6490–6505. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43472-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43472-8)
- Samama, M. (2011). The mechanism of action of rivaroxaban – an oral, direct Factor Xa inhibitor – compared with other anticoagulants. *Thrombosis Research*, 127(6), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.09.008>
- Santana-Romo, F., Lagos, C., Duarte, Y., Castillo, F., Moglie, Y., Maestro, M., Charbe, N., & Zacconi, F. (2020). Innovative Three-Step Microwave-Promoted Synthesis of N-Propargyltetrahydroquinoline and 1,2,3-Triazole Derivatives as a Potential Factor Xa (FXa) Inhibitors: Drug Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *Molecules*, 25(3), 491. <https://doi.org/10.3390/molecules25030491>

- Shaw, J. R., Castellucci, L. A., Siegal, D., & Carrier, M. (2023). DOAC-associated bleeding, hemostatic strategies, and thrombin generation assays - a review of the literature. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 21(3), 433-452. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2022.11.029>
- Shearer, M. (2009). Vitamin K deficiency bleeding (VKDB) in early infancy. *Blood Reviews*, 23(2), 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2008.06.001>
- Shearer, M., & Newman, P. (2017). Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thrombosis and Haemostasis*, 100(10), 530-547. <https://doi.org/10.1160/TH08-03-0147>
- Shearer, M., & Okano, T. (2018). Key Pathways and Regulators of Vitamin K Function and Intermediary Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 38(1), 127-151. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051741>
- Schiele, F., van Ryn, J., Canada, K., Newsome, C., Sepulveda, E., Park, J., Nar, H., & Litzenburger, T. (2013). A specific antidote for dabigatran: functional and structural characterization. *Blood*, 121(18), 3554-3562. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-468207>
- Schultz, G., Sibbald, R., Falanga, V., Ayello, E., Dowsett, C., Harding, K., Romanelli, M., Stacey, M., Teot, L., & Vanscheidt, W. (2003). Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair and Regeneration*, 11(1), S1-S28. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.11.s2.1.x>
- Schurgers, L., & Vermeer, C. (2001). Determination of Phylloquinone and Menaquinones in Food. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 30(6), 298-307. <https://doi.org/10.1159/000054147>
- Simon, P., Al Moutran, H., & Romo, T. (2021). Skin Wound Healing. *Medscape*. <http://emedicine.medscape.com/article/884594-overview>
- Sorensen, B., Spahn, D., Innerhofer, P., Spannagl, M., & Rossaint, R. (2011). Clinical review: Prothrombin complex concentrates - evaluation of safety and thrombogenicity. *Critical Care*, 15(1), Article number: 201. <https://doi.org/10.1186/cc9311>
- Spronk, H., Dielis, A., Panova-Noeva, M., Oerle, R., Govers-Riemslog, J., Hamulyák, K., Falanga, A., & Cate, H. (2017). Monitoring thrombin generation: Is addition of corn trypsin inhibitor needed?. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(06), 1156-1162. <https://doi.org/10.1160/TH08-10-0670>
- Stearns-Kurosawa, D., Kurosawa, S., Mollica, J., Ferrell, G., & Esmon, C. (1996). The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10212-10216. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10212>
- Stone, S., & Hofsteenge, J. (1986). Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*, 25(16), 4622-4628. <https://doi.org/10.1021/bi00364a025>
- Strong Medicine. https://www.youtube.com/watch?v=chW9cAmG_hg (22. 12. 2022).
- SÚKL. (2008a). Souhrnu údajů o přípravku Xarelto. Státní ústav pro kontrolu léčiv, Prague, Czech Republic, 333 stran.
- SÚKL. (2008b). Souhrnu údajů o přípravku Pradaxa. Státní ústav pro kontrolu léčiv, Prague, Czech Republic, 306 stran.
- SÚKL. (2011). Souhrnu údajů o přípravku Eliquis. Státní ústav pro kontrolu léčiv, Prague, Czech Republic, 84 stran.
- Suttie, J. (1985). Vitamin k-dependent carboxylase. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 459-477. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.002331>
- Škorňová, I., & Slavík, L. (2021). *Hemostáza: laboratorne metódy, ich využitie a interpretácia vo vybraných klinických situáciach = laboratorní metody, jejich využití a interpretace ve vybraných klinických situacích* (2. vydání). Univerzita Palackého v Olomouci.
- Taylor, F., Chang, A., Esmon, C., D'Angelo, A., Vigano-D'Angelo, S., & Blick, K. (1987). Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon. *Journal of Clinical Investigation*, 79(3), 918-925. <https://doi.org/10.1172/JCI112902>
- Technoclone. (2007). Prospekt (1) Technoclone Ceveron Alpha. Technoclone, Vienna, Austria, 6 stran.
- Technoclone. (2015). ML-07-00007_Ceveron-alpha_TGA_Oct-2015. Technoclone, Vienna, Austria, 15 stran.

- Technoclone. (2017). Příbalový leták pro 5020040 a 5020050 Coagulation Control N. Technoclone, Vienna, Austria, 2 strany.
- Technoclone. (2018). Příbalový leták pro 5006113 Ceveron® TGA RC Low Kit. Technoclone, Vienna, Austria, 1 strana.
- Tie, J., & Stafford, D. (2016). Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(2), 236-247. <https://doi.org/10.1111/jth.13217>
- Tripodi, A. (2016). Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*, 62(5), 699-707. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.248625>
- Václavík, J. (2016). Dabigatran antidote idarucizumab has come to clinical practice. *Cor et Vasa*, 58(1), e1-e3. <https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2016.02.001>
- van Aken, H., Bode, C., Darius, H., Diehm, C., Encke, A., Gulba, D., Haas, S., Hacke, W., Puhl, W., Quante, M., Riess, H., Scharf, R., Schellong, S., Schrör, K., Schulte, K., & Tebbe, U. (2001). State-of-the-Art Review: Anticoagulation: The Present and Future. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 7(3), 95-204. <https://doi.org/10.1177/107602960100700303>
- van Gorp, R., & Schurgers, L. (2015). New Insights into the Pros and Cons of the Clinical Use of Vitamin K Antagonists (VKAs) Versus Direct Oral Anticoagulants (DOACs). *Nutrients*, 7(11), 9538-9557. <https://doi.org/10.3390/nu7115479>
- van Horn, W. (2013). Structural and functional insights into human vitamin K epoxide reductase and vitamin K epoxide reductase-like1. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(4), 357-372. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.791659>
- Váradi, K., Negrier, C., Berntorp, E., Astermark, J., Bordet, J., Morfini, M., Linari, S., Schwarz, H., & Turecek, P. (2003). Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(11), 2374-2380. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00450.x>
- Vassalli, J., Baccino, D., & Belin, D. (1985). A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *The Journal of Cell Biology*, 100(1), 86-92. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.1.86>
- Wallin, R. (1986). Vitamin K antagonism of coumarin anticoagulation. A dehydrogenase pathway in rat liver is responsible for the antagonistic effect. *Biochemical Journal*, 236(3), 685-693. <https://doi.org/10.1042/bj2360685>
- Wang, W., Boffa, M., Bajzar, L., Walker, J., & Nesheim, M. (1998). A Study of the Mechanism of Inhibition of Fibrinolysis by Activated Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27176-27181. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27176>
- Wang, T., Liu, L., & Voglmeir, J. (2020). Chemoenzymatic synthesis of ultralow and low-molecular weight heparins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868(2), 140301. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140301>
- Warkentin, T., Margetts, P., Connolly, S., Lamy, A., Ricci, C., & Eikelboom, J. (2012). Recombinant factor VIIa (rFVIIa) and hemodialysis to manage massive dabigatran-associated postcardiac surgery bleeding. *Blood*, 119(9), 2172-2174. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-393587>
- Weitz, J., & Hirsh, J. (1998). New Antithrombotic Agents. *Chest*, 114(5), 715S-727S. https://doi.org/10.1378/chest.114.5_Supplement.715S
- Werfen. (2017). Příbalový leták pro HemosIL RecombiPlasTin 2G - 0020003050. Werfen, Instrumentation Laboratory Company, Milan, Italy, 5 stran.
- Witting, J., Bourdon, P., Brezniak, D., Maraganore, J., & Fenton II, J. (1992). Thrombin-specific inhibition by and slow cleavage of hirulog-1. *Biochemical Journal*, 283(3), 737-743. <https://doi.org/10.1042/bj2830737>
- Wu, H., Chang, B., Wu, D., Chang, L., Gong, C., Lou, K., & Shi, G. (1990). Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation. *Journal of Biological Chemistry*, 265(32), 19658-19664. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)45422-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)45422-6)
- Wysowski, D., Nourjah, P., & Swartz, L. (2007). Bleeding Complications With Warfarin Use. *Archives of Internal Medicine*, 167(13), 1414-1419. <https://doi.org/10.1001/archinte.167.13.1414>

- Xue, M., & Jackson, C. (2014). Activated Protein C and Its Potential Applications in Prevention of Islet β -Cell Damage and Diabetes. *Vitamins & Hormones*, *95*, 323-363. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800174-5.00013-2>
- Yau, J., Stafford, A., Liao, P., Fredenburgh, J., Roberts, R., & Weitz, J. (2011). Mechanism of catheter thrombosis: comparison of the antithrombotic activities of fondaparinux, enoxaparin, and heparin in vitro and in vivo. *Blood*, *118*(25), 6667-6674. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-364141>
- Zingali, R. (2008). Interaction of snake-venom proteins with blood coagulation factors: mechanisms of anticoagulant activity. *Toxin Reviews*, *26*(1), 25-46. <https://doi.org/10.1080/15569540600567412>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

3K3A-APC	rekombinantní APC, jehož struktura byla upravena nahrazením 3 lysinových residuí za alaninové
AC	abnormální kontrola
AMC	7-amino-4-methylkumarin
APC	aktivovaný protein C
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
C _{MAX}	Maximální koncentrace trombinu
CMP	cévní mozková příhoda
DOACs	přímá perorální antikoagulancia
EPCR	endoteliální receptor proteinu C
ETP	endogenní trombinový potenciál
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FVIIa	aktivovaný faktor VII
GGCX	VK dependentní karboxylasa
HC	vysoká kontrola
HŽT	hluboká žilní trombóza
IM	infarkt myokardu
ISTH	Mezinárodní společnost pro trombózu a hemostázu
KH ₂	hydrochinonová forma vitamínu K
KO	2,3-epoxid vitamínu K
LC	nízká kontrola
LMWH	heparin s nízkou molekulovou hmotností
NC	normální kontrola
PAR-1	receptor 1 aktivovaný proteasami
PCC	koncentrát protrombinového komplexu
PE	plicní embolie
PH	fosfolipidy
PT	protrombinový čas
RFU	referenční fluorescenční jednotky
RI	rychlostní index
TF	tkáňový faktor
TFPI	inibitor dráhy tkáňového faktoru

TGA	trombin generační test
T _{MAX}	čas do dosažení maximální koncentrace trombinu
t-PA	tkáňový aktivátor plasminogenu
TT	trombinový čas
TXA2	tromboxan A2
UFH	nefrakciováný heparin
ULMWH	heparin s velmi nízkou molekulovou hmotností
uPA	aktivátor plasminogenu typu urokinázy
VK	vitamin K
vWF	von Willebrandův faktor